

ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์
และฤทธิ์ทางชีวภาพของลำไยเถา

(*Dimocarpus longan* ssp. *longan* var. *obtusus*)

GENETIC DIVERSITY BY ISSR MARKERS AND BIOLOGICAL ACTIVITY
OF LAMYAI-THAO (*Dimocarpus longan* ssp. *longan* var. *obtusus*)



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2565

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ในเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

GENETIC DIVERSITY BY ISSR MARKERS AND BIOLOGICAL ACTIVITY
OF LAMYAI-THAO (*Dimocarpus longan* ssp. *longan* var. *obtusus*)



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY SCHOOL OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2022

KMITL-2022-SC-M-020-085

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2022

SCHOOL OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมาย โมเลกุลไอเอสเอสอาร์และฤทธิ์ทางชีวภาพของลำไยเถา (<i>Dimocarpus longan</i> ssp. <i>longan</i> var. <i>obtusus</i>)
ชื่อนักศึกษา	นางสาวสุวิชญา จันทรสชา
รหัสประจำตัว	62605068
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
พ.ศ.	2565
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.ปิยรัชฎ์ ปริญาพงษ์ เจริญทรัพย์

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ (Inter-Simple Sequence Repeats: ISSR) และฤทธิ์ทางชีวภาพของลำไยเถา (*Dimocarpus longan* ssp. *longan* var. *obtusus*) และลำไยต้น (*Dimocarpus longan* ssp. *longan* var. *longan*) จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของลำไยเถาและลำไยต้นจำนวน 36 ตัวอย่าง เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.64 ถึง 0.97 และที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนที่ 0.64 สามารถแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยภายในกลุ่มของลำไยเถามีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ ยกเว้นตัวอย่าง DLO-35 และ DLO-36 สำหรับฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้ศึกษาสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลของลำไย 2 ชนิด คือ ลำไยเถา (var. *obtusus*) และลำไยต้นสายพันธุ์อืดอ้อม (var. *longan*) พบว่าสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อืดอ้อมมีฤทธิ์ทางชีวภาพส่วนใหญ่ดีกว่าสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถา ยกเว้นฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียสายพันธุ์ *Propionibacterium acnes* และฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ให้ผลไม่แตกต่างกัน สำหรับการทำให้สารสกัดหยาบเมทานอลบริสุทธิ์ด้วยวิธี Liquid-liquid extraction พบว่าสารสกัดในชั้นตัวทำละลายบิวทานอลของสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถาและลำไยต้นสายพันธุ์อืดอ้อมมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียสายพันธุ์ *P. acnes* และฤทธิ์ต้านการอักเสบดีกว่าตัวทำละลายชนิดอื่น เมื่อนำสารสกัดดังกล่าวมาแยกด้วยเทคนิค column chromatography และวิเคราะห์สารสำคัญด้วยวิธี GC-MS พบว่าสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลของลำไยทั้งสองชนิดมีองค์ประกอบของสารที่น่าสนใจหลายชนิด เช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

docosane, teradecane, pyridinecarboxamide และ heptanoic acid ซึ่งเหมาะกับพัฒนาผลิตภัณฑ์ด้านเวชภัณฑ์ชนิดใหม่ต่อไป

คำสำคัญ : ความหลากหลายทางพันธุกรรม เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ ลำไยเถา
ฤทธิ์ทางชีวภาพ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Genetic diversity by ISSR markers and biological activity of Lamyai-thao (<i>Dimocarpus longan</i> ssp. <i>longan</i> var. <i>obtusus</i>)
Student Name	Suwichaya Chantarasaka
Student ID	62605068
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Year	2022
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Supattra Poeaim
Thesis Co-Advisor	Dr. Piyarat Parinyapong Chareonsap

Abstract

The objectives of this study were to investigate the genetic diversity of 36 cultivars from *Dimocarpus longan* ssp. *longan* var. *obtusus* (Lamyai-thao) and *Dimocarpus longan* ssp. *longan* var. *longan* (Lamyai) based on Inter Simple Sequence Repeats: ISSR molecular marker and their biological activities. Cluster analysis based on Jaccard's similarity coefficient and a dendrogram was constructed using the unweighted pair-group method with arithmetic mean (UPGMA). The result found that the similarity coefficient ranged from 0.64 to 0.97. The dendrogram cluster was divided into two major groups with a similarity coefficient of 0.64. Thao group displays less genetic diversity, except for the DLO-35 and DLO-36. For biological activities, The methanolic extracts obtained from the peel of two longan varieties: Thao (var. *obtusus*) and Edor (var. *longan*), were evaluated the biological activities. The results showed that the most activity of Edor peel extract presented higher biological activities than Thao peels extract, except for antibacterial activity against *Propionibacterium acnes* and anti-inflammation activity that the extracts from both varieties had no significant effect. For the purification of the crude methanolic extract by liquid-liquid extraction method, the results found that the butanol extract from both Thao and Edor showed the strongest antibacterial activity against *P. acnes* and the highest activity of anti-inflammatory. That extract was separated by column chromatography, and their chemical compounds were analyzed using GC-MS. It was found that the extracts from both peels of two

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

longan varieties contained many interesting compounds such as docosane, teradecane, pyridinecarboxamide and heptanoic acid for new pharmaceutical products development.

Keywords : Genetic diversity, ISSR markers, Lamyai-thao, Biological activity



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เรื่องความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ และฤทธิ์ทางชีวภาพของลำไยเถา เล่มนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ โดยผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อสนองพระราชดำริในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) ศึกษาวิจัยเกี่ยวกับลำไยเถาซึ่งเป็นพืชประจำถิ่นที่สำคัญของประเทศไทยที่ควรค่าแก่การอนุรักษ์และพัฒนาไปใช้ประโยชน์ในอนาคต โดยโครงการนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ (องค์การมหาชน) และทุนสนับสนุนในโครงการ KMITL Organic Model ซึ่งการศึกษานี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยต้องขอขอบพระคุณ รศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ในการให้คำปรึกษา คำแนะนำ การช่วยเหลือแก้ไขปัญหาในด้านต่าง ๆ ให้ความอนุเคราะห์ในเรื่องการเก็บตัวอย่างในสถานที่ต่าง ๆ ที่นำมาศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบพระคุณ ดร.ปริญญาพงษ์ เจริญทรัพย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ให้คำปรึกษาในการทำวิทยานิพนธ์ คำแนะนำ การช่วยเหลือแก้ไขปัญหาในด้านต่าง ๆ และให้ความอนุเคราะห์ในเรื่องตัวอย่างที่นำมาศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.โองการ วณิชชิวะ ประธานกรรมการที่ให้คำปรึกษา และให้ความอนุเคราะห์โปรแกรมที่ใช้ในเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ในครั้งนี้ และขอขอบพระคุณ รศ.ดร.สร้อยญา พันธุ์ฤกษ์ อาจารย์ประจำบัณฑิต ที่ให้คำแนะนำและช่วยตรวจทานในการทำเล่มวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้อง และสมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัว ที่ให้ความสนับสนุนในการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา ขอขอบคุณสำหรับทุนทรัพย์ในการศึกษา ความเชื่อมั่นในตัวผู้วิจัย การดูแลเอาใจใส่ เป็นกำลังใจในการดำเนินชีวิต และเป็นแรงผลักดันให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณโอกาสที่ดีจากคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้สถานที่อุปกรณ์เครื่องมือต่างๆ ซึ่งเป็นปัจจัยหลักในการทำงานวิจัย

สุดท้ายขอขอบคุณเพื่อน พี่ๆ และน้องๆ ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ โดยเฉพาะพี่ๆ ในระดับบัณฑิตศึกษาทุกคนที่เอาใจใส่ สอนเทคนิคความรู้ต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ ตลอดถึงช่วยตรวจสอบความถูกต้องต่างๆ และขอบคุณเพื่อนร่วมภาควิชาชีววิทยาทุกคนสำหรับมิตรภาพที่ดี ขอขอบคุณสำหรับทุกคำปรึกษา และความช่วยเหลือในทุกๆ เรื่องที่มีให้กับผู้วิจัยตลอดมา

สุวิษฐา จันทรสาขา

กรกฎาคม 2565

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญรูป	ฐ
คำย่อ/สัญลักษณ์	ด
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 ลำไย.....	5
2.1.1 ลำไยต้น	5
2.1.2 ลำไยเถา.....	7
2.2 เครื่องหมายทางโมเลกุล.....	8
2.3 สารออกฤทธิ์และฤทธิ์ทางชีวภาพของลำไย.....	14
2.3.1 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ.....	16
2.3.2 ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย.....	18
2.3.3 ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส.....	20
2.3.4 ฤทธิ์ด้านการอักเสบ	22
2.3.5 ความเป็นพิษต่อเซลล์.....	25
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	28

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.1 ตัวอย่างพืช	28
3.2 เชื้อแบคทีเรีย	28
3.3 เซลล์ไลน์	31
3.4 อุปกรณ์และเครื่องมือ	31
3.5 สารเคมี	33
3.6 โปรแกรม	37
3.7 วิธีการทดลอง	37
3.7.1 การศึกษาคุณภาพผลเบื้องต้นของลำไยเถาและลำไยต้น	37
3.7.2 การสกัดดีเอ็นเอ	37
3.7.3 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ	39
3.7.4 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุล ไอเอสเอสอาร์	39
3.7.5 การสกัดสารและการแยกสาร	42
3.7.5.1 การสกัดสารสกัดหยาบด้วยเมทานอล	42
3.7.5.2 การสกัดสารด้วยเทคนิค Liquid-liquid extraction	43
3.7.5.3 การแยกสารด้วยเทคนิค Column chromatography	45
3.7.6 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเปลือกผลลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ	47
3.7.6.1 การทดสอบสารพิษทุกชนิดเบื้องต้น	47
3.7.6.2 การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด	49
3.7.6.3 การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ	50
3.7.6.4 การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย	52
3.7.6.5 การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส	53
3.7.6.6 การศึกษาความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์	54
3.7.6.7 การศึกษาฤทธิ์การต้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งการหลั่ง ไนตริกออกไซด์ในเซลล์ชนิดแมคโครฟาจ (RAW 264.7)	55

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.7.6.8 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์.....	56
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....	58
4.1 ผลการศึกษาคุณภาพผลเบ้องต้นของลำไยเถาและลำไยต้น	58
4.2 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วย เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์	65
4.2.1 ผลการคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม	65
4.2.2 ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม.....	67
4.3 ผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถา และเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ.....	76
4.3.1 ผลการสกัดสารจากเปลือกผลลำไยด้วยเมทานอล	76
4.3.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลลำไย	77
4.3.2.1 ผลการตรวจสอบสารฟลักซ์เคมีเบื้องต้น	77
4.3.2.2 ผลการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด	78
4.3.2.3 ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ	81
4.3.2.4 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย	86
4.3.2.5 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส	90
4.3.2.6 ผลการศึกษาความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์.....	93
4.3.2.7 ผลการศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งการหลั่ง ไนตริกออกไซด์	97
4.3.2.8 ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์	100
4.3.3 ผลการสกัดสารจากเปลือกผลลำไยด้วยเทคนิค Liquid-liquid extraction.....	103
4.3.4 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกผลลำไยที่สกัด ด้วยเทคนิค Liquid-liquid extraction.....	105

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

4.3.5 ผลการศึกษาความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์และฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ของสารสกัดจากเปลือกผลลำไยที่สกัดด้วยเทคนิค Liquid-liquid extraction	107
4.3.6 ผลการแยกสารจากเปลือกผลลำไยด้วยเทคนิค Column chromatography	112
4.3.7 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลลำไยเถาและลำไยต้นสายพันธุ์อีดอที่แยกด้วยเทคนิค Column chromatography	116
4.3.8 ผลการศึกษาฤทธิ์ความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์และฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ของสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลของลำไยเถาและลำไยต้นสายพันธุ์อีดอที่แยกด้วยเทคนิค Column chromatography	119
4.3.9 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดส่วนย่อยด้วยเทคนิค GC-MS.....	122
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	128
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	128
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	129
เอกสารอ้างอิง	131
ภาคผนวก	148
ภาคผนวก ก.....	149
ภาคผนวก ข.....	155
ผลงานทางวิชาการ.....	174
ประวัติผู้เขียน.....	189

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 รหัส และแหล่งที่มาของตัวอย่างลำไยเถาและลำไยต้นที่ใช้ในการศึกษา คุณภาพผลเบื้องต้นและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วย เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์	29
3.2 ชนิดและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาความหลากหลายทาง พันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์	41
3.3 องค์ประกอบของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ สำหรับ 1 ตัวอย่าง	42
3.4 เวลา อุณหภูมิ และจำนวนรอบในแต่ละขั้นตอนที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์	42
3.5 รหัสตัวอย่างและแหล่งที่มาของเปลือกผลลำไยเถาและลำไยต้นที่สกัดด้วยเมทานอล	43
3.6 องค์ประกอบและปริมาตรของสารที่ใช้ในแต่ละกลุ่มการทดลองของการ ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี DOPA-chrome	54
3.7 องค์ประกอบและปริมาตรของสารที่ใช้ในแต่ละชุดการทดลองของ การศึกษาฤทธิ์การต้านอักเสบ	55
4.1 ข้อมูลคุณภาพผลเบื้องต้นของลำไยเถาและลำไยต้น จำนวน 27 ตัวอย่าง	59
4.2 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักผล เมล็ด ความหนาเนื้อ และความหวานของเนื้อผลของลำไยเถาและลำไยต้น	65
4.3 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไพรเมอร์จำนวน 6 ไพรเมอร์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล ไอเอสเอสอาร์	68
4.4 ข้อมูลรหัสตัวอย่าง และแหล่งที่มาของตัวอย่างจากเปลือกผลลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์ฮือตอ	76
4.5 น้ำหนักของสารสกัดหยาบ ร้อยละของผลได้ ลักษณะของสารสกัดหยาบ และรหัสสี ของสารสกัดหยาบเมทานอลจากเปลือกผลลำไย	77
4.6 ผลการตรวจสอบพิษเคมีเบื้องต้นจากสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์ฮือตอ	78
4.7 ค่าเฉลี่ยปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ของสารสกัดเมทานอลจาก เปลือกผลลำไยทั้ง 3 ตัวอย่าง	79

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.8 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และค่า IC_{50} ของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลลำไยเถาและลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ.....	85
4.9 บริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลของลำไยทั้ง 3 ตัวอย่างที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อดิस्क.....	89
4.10 ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และค่า IC_{50} ของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลของลำไยทั้ง 3 ตัวอย่างที่ความเข้มข้น 500-1500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....	92
4.11 ร้อยละความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ และค่า IC_{50} ของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลของลำไยทั้ง 3 ตัวอย่าง.....	94
4.12 ร้อยละความสามารถในการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ในเซลล์ RAW 264.7 และค่า IC_{50} ของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลของลำไยทั้ง 3 ตัวอย่าง.....	98
4.13 น้ำหนัก ร้อยละผลได้ ลักษณะ และสีของสารสกัดในชั้นตัวทำละลายต่างๆ ของสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ ด้วยวิธี Liquid-liquid extraction.....	104
4.14 บริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย <i>P. acnes</i> ของสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยที่สกัดด้วยเทคนิค Liquid-liquid extraction ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อดิस्क และยาปฏิชีวนะเจนตามัยซินที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิस्क.....	107
4.15 ค่าร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์และค่า IC_{50} ของสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถาและลำไยต้นสายพันธุ์อีดอที่สกัดด้วยเทคนิค Liquid-liquid extraction.....	108
4.16 ผลค่าร้อยละความสามารถในการต้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ในเซลล์ RAW 264.7 และค่า IC_{50} ของสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถาที่สกัดด้วยเทคนิค Liquid-liquid extraction.....	110
4.17 ผลค่าร้อยละความสามารถในการต้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ในเซลล์ RAW 264.7 และค่า IC_{50} ของสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีดอที่สกัดด้วยเทคนิค Liquid-liquid extraction.....	111

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.18 น้ำหนัก ร้อยละ และลักษณะ สีของสารสกัดส่วนย่อยที่แยกด้วยเทคนิค Column chromatography ของสารสกัดชั้นตัวทำละลายบิวทานอลจากเปลือกผลของลำไยเถาและลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ.....	115
4.19 บริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย <i>P. acnes</i> ของสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลลำไยที่สกัดด้วยเทคนิค Column chromatography ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อดิสก์และยาปฏิชีวนะเจนตามัยซินที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์.....	118
4.20 ความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ที่ค่า IC ₅₀ ของสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลของลำไยเถาและลำไยต้นสายพันธุ์อีดอที่แยกด้วยเทคนิค Column chromatography	120
4.21 ความสามารถในการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ค่า IC ₅₀ ของสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลของลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อีดอที่แยกด้วยเทคนิค Column chromatography.....	121
4.22 ผลวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลของลำไยเถา (TF1-TF8) และลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ (EF1-EF8).....	126

สารบัญรูป

ภาพที่	หน้า
2.1 ลักษณะส่วนต่างๆ ของลำไยต้น (<i>Dimocarpus longan</i> spp. <i>longan</i> var. <i>longan</i>) (ก) ลำต้น (ข) ใบ (ค) ช่อดอก (ง) ผล และ (จ) เนื้อผลและเมล็ด	6
2.2 ลักษณะส่วนต่าง ๆ ของลำไยเถา (<i>Dimocarpus longan</i> spp. <i>longan</i> var. <i>obtusus</i>) (ก) ลำต้น (ข) ใบ (ค) ช่อดอก (ง) ผล และ (จ) เนื้อผลและเมล็ด	7
2.3 หลักการพื้นฐานในการเข้าจับของไพรเมอร์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล ไอเอสเอสอาร์ (inter simple sequence repeat: ISSR)	10
2.4 กระบวนการชีวสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน	21
2.5 ปฏิกริยาระหว่างไนตริกออกไซด์ (NO) และอนุมูลอิสระ superoxide anion	23
2.6 NF-KB signaling pathway	24
2.7 การเปลี่ยนแปลงของสาร MTT ที่ถูกรีดิวซ์เป็นผลึกของ formaza	26
3.1 ขั้นตอนของการสกัดสารโดยเทคนิค Liquid-Liquid extraction ของสารสกัดจาก เปลือกผลลำไยเถาและลำไยต้น	45
4.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของดอก และผลของลำไยเถา (ก) และ (ข) ลำไยต้น	58
4.2 การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของน้ำหนักรผลลำไยเถาและลำไยต้น ด้วยโปรแกรม R studio	62
4.3 การจัดกลุ่มของความสัมพันธ์ของน้ำหนักเมล็ดลำไยเถาและลำไยต้น ด้วยโปรแกรม R studio	63
4.4 การจัดกลุ่มของความสัมพันธ์ของความหวานเนื้อผลของลำไยเถา และลำไยต้นด้วยโปรแกรม R studio	64
4.5 แถบดีเอ็นเอของลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์ฮือตอ จำนวน 4 ตัวอย่าง จากการเพิ่ม ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ ด้วยไพรเมอร์ UBC815 และ UBC873 เพื่อหาไพรเมอร์ ที่เหมาะสม เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน VC 100 bp	66
4.6 ลักษณะแถบดีเอ็นเอของลำไยเถาและลำไยต้น จำนวน 36 ตัวอย่าง (DL01-40) จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ของไพรเมอร์ UBC824 เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน VC 100 bp	69

สารบัญรูป (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.7 เคนโตรแกรมแสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมของลำไยเถาและลำไยต้น จำนวน 36 ตัวอย่าง ที่ศึกษาด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ โดยการ จัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYSpc.....	74
4.8 เคนโตรแกรมแสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในกลุ่มลำไยเถา จำนวน 30 ตัวอย่าง ที่ศึกษาด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ โดยการจัดกลุ่ม ด้วยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYSpc	75
4.9 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลลำไย จำนวน 3 ตัวอย่าง โดยตัวอักษร a-b แสดงความแตกต่างทางค่าสถิติจากการทดสอบ ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ $p < 0.05$	79
4.10 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลของ ลำไยทั้ง 3 ตัวอย่างกับค่าร้อยละการต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH.....	82
4.11 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลของ ลำไยทั้ง 3 ตัวอย่างกับค่าร้อยละการต้านสารอนุมูลอิสระ ABTS.....	84
4.12 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (ก) <i>B. subtilis</i> , (ข) <i>K. rhizophila</i> , (ค) <i>S. aureus</i> และ (ง) <i>P. acnes</i> ของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลลำไยทั้ง 3 ตัวอย่าง โดยตัวอักษร N คือ ตัวควบคุมเชิงลบ หรือเมทานอล และ P คือ ตัวควบคุมเชิงบวก หรือยาปฏิชีวนะเจนตามัยซินที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์	87
4.13 ลักษณะ RAW 264.7 cell เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ Inverted microscope ที่กำลังขยาย 100 เท่า เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ชุดควบคุม ที่ไม่ใส่สารสกัดกับเซลล์ที่ทดสอบสารสกัดจากเปลือกผลลำไยทั้ง 3 ตัวอย่าง หลังการบ่มกับสารสกัดครบ 24 ชั่วโมง และหลังการบ่ม MTT 4 ชั่วโมง	96
4.14 ร้อยละการมีชีวิตของ RAW 264.7 cell หลังจากทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอลจาก เปลือกผลลำไยทั้ง 3 ตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยวิธี MTT	96

สารบัญรูป (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.15 ลักษณะเซลล์เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ Inverted microscope ที่กำลังขยาย 100 เท่า เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ชุดควบคุม กับเซลล์ที่ทดสอบ สารสกัดจากเปลือกผลของลำไยทั้ง 3 ตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตรโดยภาพ (ก) หลังการบ่มเซลล์กับสารสกัดครบ 24 ชั่วโมง และภาพ (ข) หลังจากเติม MTT เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ของเซลล์ L929 และ HaCaT.....	101
4.16 ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ L929 และ HaCaT หลังจากทดสอบด้วยสารสกัด เมทานอลจากเปลือกผลลำไยทั้ง 3 ตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร ด้วยวิธี MTT.....	102
4.17 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย <i>P. acnes</i> (ก) สารสกัดชั้นตัวทำละลายบิวทานอลของ สารสกัดจากเปลือกลำไยเถา และ (ข) สารสกัดชั้นตัวทำละลายบิวทานอลของ สารสกัดจากเปลือกผลลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ โดยตัวอักษรในภาพ (ก) สารสกัดจาก เปลือกผลลำไยเถา (TH, TD, TE และ TB) และตัวอักษรในภาพ (ข) สารสกัดจาก เปลือกผลลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ (ED, EE และ EB) ส่วน N คือ ตัวควบคุมเชิงลบ หรือเมทานอล และ P คือ ตัวควบคุมเชิงบวก หรือยาปฏิชีวนะเจนตามัยซินที่ ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อดิสก์.....	106
4.18 องค์ประกอบ และการเคลื่อนที่ของสารผ่านการแยกบน normal phase TLC ในระบบตัวทำละลายคลอโรฟอร์มต่อเมทานอลในอัตราส่วน 9:1 โดย (ก) หลังจากสเปรย์ด้วย Anisaldehyde reagent (ข) เมื่อส่องภายใต้ UV ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (ค) เมื่อส่องภายใต้ UV ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร โดย A และ B คือ สารสกัดในชั้นตัวทำละลายบิวทานอลจากเปลือกผลลำไยเถา (TB) และลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ (EB).....	113
4.19 ตัวอย่างองค์ประกอบ และการเคลื่อนที่ของสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลลำไยเถา แต่ละหลอดที่ตรวจสอบด้วยแผ่น reverse phase TLC โดย (ก) หลังจากสเปรย์ด้วย Anisaldehyde reagent (ข) เมื่อส่องภายใต้ UV ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (ค) เมื่อส่องภายใต้ UV ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร.....	114

สารบัญญรูป (ต่อ)

ภาพที่

หน้า

4.20 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย <i>P. acnes</i> (ก) และ (ข) สารสกัดส่วนย่อยของ สารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถา และ (ค) และ (ง) สารสกัดส่วนย่อยของ สารสกัดจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ โดยตัวอักษรในภาพ N คือ ตัวควบคุมเชิงลบ หรือเมทานอล และ P คือ ตัวควบคุมเชิงบวกหรือยาปฏิชีวนะ เจนตามัยซินที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์.....	117
--	-----



คำย่อ/สัญลักษณ์

ABTS	2,2'-azino-bis[6-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
CTAB	Cetyltrimethylammonium bromide
DMRT	Duncan's multiple range test
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EB	Edor Butanol extract
EF	Edor fraction
ED	Edor Dichloromethane extract
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EE	Edor Ethyl acetate extract
EH	Edor Hexane extract
EW	Edor Water extract
FBS	Fetal bovine serum
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
GC-MS	Gas Chromatography
ISSR	Inter-simple sequence repeat
L-DOPA	L-3,4-dihydroxyphenylalanine
LPS	Lipopolysaccharides
mgAAE	milligram ascorbic acid equivalent
mgGAE	milligram gallic acid equivalent
mgTE	milligram trolox equivalent
MHA	Mueller Hinton agar
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide
NA	Nutrient agar
NOA	Nitric oxide scavenging assay
PBS	Phosphate buffer saline
PVP	Polyvinylpyrrolidone
QTL	Quantitative trait locus

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์ (ต่อ)

RAPD	Random amplified polymorphic DNA
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SRAP	Sequence-related amplified polymorphism
SNP	Sodium nitroprusside
SSR	Simple sequence repeat
TBE buffer	Tris-borate EDTA buffer
TF	Thao fraction
TD	Thao Dichloromethane extract
TE	Thao Ethyl acetate extract
TE buffer	Tris-EDTA buffer
TH	Thao Hexane extract
TLC	Thin layer chromatography
TW	Thao Water extract
TPTZ	2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine
UPGMA	Unweighted pair group method with arithmetic mean

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ลำไย (Longan) เป็นไม้ที่มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อน และกึ่งร้อนของเอเชีย เป็นไม้ผลที่อยู่ในวงศ์ Sapindaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Dimocarpus longan* Lour. โดยมีรายงานการพบลำไยในประเทศไทยเพียง 1 สปีชีส์ (species) แต่แบ่งเป็นจำนวน 3 สายพันธุ์ (variety) (Flora of Thailand, 1999) ได้แก่ (1) *Dimocarpus longan* spp. *longan* var. *longan* หรือลำไยต้น พบมากในเขตภาคเหนือของประเทศไทย มีลักษณะเป็นไม้ยืนต้นทรงพุ่ม ผลมีเมล็ดเล็ก มีเนื้อหนา รสชาติหวานกรอบ ส่งผลให้กลายเป็นสายพันธุ์ลำไยที่นิยมเพาะปลูก บริโภค และมีมูลค่าทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน โดยลำไยต้นสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด (พาวิน และคณะ, 2547) คือ ลำไยดั้งเดิม ลำไยพื้นเมืองหรือลำไยกระดุก และลำไยกะโหลก (2) *Dimocarpus longan* spp. *longan* var. *obtusus* ลำไยเถาหรือลำไยเครือ มีลักษณะลำต้นเป็นไม้เลื้อย มีผลและเมล็ดใหญ่ มีรสหวานจัด พบมากในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย เช่น จังหวัดตราด ระยอง และชลบุรี เป็นต้น และ (3) *Dimocarpus longan* spp. *malesianus* leenh. var. *malesianus* ลำไยป่าหรือเงาะดิเรก พบได้น้อยในประเทศไทย ส่วนใหญ่พบในเขตภาคใต้ ในงานวิจัยนี้สนใจศึกษาลำไยเถา เนื่องจากลำไยชนิดนี้พบได้เพียงบางพื้นที่ในประเทศไทยจึงไม่เป็นที่รู้จักอย่างแพร่หลายเป็นผลให้ไม่นิยมปลูกและบริโภค ทำให้ลำไยเถาชนิดนี้เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ ควรค่าแก่การอนุรักษ์ไว้ (พาวิน และคณะ, 2547) จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาได้มีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของทั้งลำไยต้น (*Dimocarpus longan*) และลิ้นจี่ (*Litchi chinensis*) ซึ่งเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Sapindaceae ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิดต่าง ๆ เช่น การศึกษาด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ (inter-simple sequence repeat: ISSR) (Chemda และคณะ, 2003; Mariana และคณะ, 2013; สิริมา และคณะ, 2562) เครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี (amplified fragment length polymorphism: AFLP) (Lin และคณะ, 2005) และเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี (random amplification of polymorphic DNA: RAPD) (Lin และคณะ, 1998; Yonemoto และคณะ, 2006; แสงทอง และคณะ, 2559) โดย Lin และคณะ (1998) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลำไยสายพันธุ์ต่าง ๆ จากประเทศจีนด้วยเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี (RAPD) สามารถแยกลำไยสายพันธุ์ลูกผสมระหว่างลิ้นจี่กับลำไยออกจากลำไยสายพันธุ์อื่นได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Yonemoto และคณะ (2006) ที่ศึกษาด้วยเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี สามารถแบ่งลำไยต้นออกเป็น 2 กลุ่ม โดยลำไยต้น 3 สายพันธุ์ที่มาจากประเทศไทยจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งให้ผลต่างไปจากวิจัยของ Mei และคณะ (2014) ที่ศึกษาด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุลอาร์เอพีดี (RAPD) และแสงทอง และคณะ (2559) ที่ศึกษาด้วยเครื่องหมายโมเลกุล intron derived

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

random amplified polymorphic DNA (ID- RAPD) สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างลำไยต้นออกเป็น 3 กลุ่ม แต่รายงานเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของลำไยเถา มีเพียงการศึกษาโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดย Chaowasku และคณะ (2017) ได้ศึกษาตัวอย่างลินจี พืชในสกุล *Dimocarpus* ลำไยต้น และลำไยเถา ในระดับนิวคลีโอไทด์ 6 ตำแหน่ง คือ *ITS2*, *matK*, *rbcl*, *trnH-psbA*, *trnL-I* และ *trnL-trnF* พบว่าลำไยเถามีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากตัวอย่างอื่น ๆ อย่างชัดเจน แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลดังกล่าวอาจไม่เพียงพอที่จะยืนยันความแตกต่างของลำไยเถาในระดับสปีชีส์ได้ เนื่องจากยังไม่ได้แสดงความแตกต่างทั้งจีโนม และเป็นการศึกษาตัวอย่างลำไยเถาเพียง 6 ตัวอย่าง ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในกลุ่มของลำไยเถาเป็นเรื่องสำคัญและจำเป็น เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจัดลำดับเป็นชนิดหรือสปีชีส์ รวมทั้งพัฒนาและอนุรักษ์พันธุกรรมของลำไยเถาต่อไป โดยในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ (ISSR) ซึ่งเป็นเครื่องหมายทางโมเลกุลที่สามารถจับกับตำแหน่งเบสคู่สมที่มีลักษณะเป็นลำดับเบสซ้ำกันได้หลายชุดในจีโนม (Barth และคณะ, 2002) เป็นเทคนิคที่รวมเอาข้อดีของเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์ (simple sequence repeat: SSR) เครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี และเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอฟดี เข้าไว้ด้วยกัน มาประยุกต์ใช้ทำให้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความน่าเชื่อถือสูง และมีขั้นตอนไม่ยุ่งยาก

ในการศึกษาครั้งนี้นอกจากสนใจความหลากหลายทางด้านพันธุกรรมของลำไยเถาแล้ว ยังสนใจฤทธิ์ทางชีวภาพของลำไยเถา ซึ่งโดยปกติแล้วเปลือกผลของลำไยเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และอุตสาหกรรม เนื่องจากมีรายงานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเมล็ด เปลือกผล และเนื้อผลของลำไยต้น ที่มีประโยชน์ในการนำมาประยุกต์ใช้หลากหลายด้านได้ ดังเช่น การศึกษาวิจัยของ Rerk-am และคณะ (2016) ศึกษาสารสกัดจากเมล็ด เปลือกผล และเนื้อผลของลำไยต้น ด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography: HPLC พบมีสารประกอบจำพวกสารโพลีฟีนอลิก เช่น กรดแกลลิก (gallic acid) กรดเอลลาจิก (ellagic acid) และเอลลาจิทันนิน (ellagitannins) ซึ่งสารประกอบดังกล่าวพบมาในส่วนของเปลือกผล และเมล็ด ซึ่งสอดคล้องกับฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเปลือกผลลำไยต้น เช่น ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง (Yi และคณะ, 2013; อรัญญา, 2555) ฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย (Udomlak และคณะ, 2010; สุภัก, 2542) และฤทธิ์การยับยั้งสารอนุมูลอิสระ (Rerk-am และคณะ, 2016; สายสุณี, 2554) เป็นต้น

จากข้อมูลงานวิจัยที่ได้กล่าวในข้างต้น รวมทั้งลำไยเถานั้นมีจุดเด่น คือ ขนาดผลที่มีขนาดใหญ่กว่าลำไยต้น และมีเปลือกผลเป็นสีชมพูแตกต่างจากลำไยต้น ในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาทั้งความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในกลุ่มของลำไยเถาด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ และสารสำคัญของสารสกัดจากเปลือกผลลำไยเถา เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ หรือพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ในอนาคตต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 เพื่อสนองพระราชดำริในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี
- 1.2.2 เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของลำไยเถาด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ (ISSR)
- 1.2.3 เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ และสารสำคัญจากสารสกัดเปลือกผลลำไยเถา

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 ศึกษาคุณภาพผลเบื้องต้น

สำรวจแหล่งการปลูกลำไยเถาในจังหวัดต่าง ๆ ของประเทศไทย และเก็บตัวอย่างผลของลำไยเถาจำนวน 23 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับลำไยต้นจำนวน 4 ตัวอย่าง เพื่อเป็นข้อมูลในการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างลำไยทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยข้อมูลคุณภาพผลที่ศึกษาประกอบไปด้วย ข้อมูลน้ำหนักผลและเมล็ด ข้อมูลความกว้างและความสูงของผล ข้อมูลความกว้างและความสูงของเมล็ด ข้อมูลความหนาของเนื้อผล และข้อมูลความหวานของเนื้อผล ($^{\circ}$ Brix)

1.3.2 ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

เก็บตัวอย่างใบของลำไยเถาจำนวน 32 ตัวอย่าง จากแหล่งปลูกที่สำรวจพบ และลำไยต้นจำนวน 4 ตัวอย่าง มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB วิเคราะห์คุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และคัดเลือกคู่มือไพรเมอร์เพื่อนำมาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของลำไยเถาด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ (ISSR)

1.3.3 ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเปลือกผลลำไยเถา

สกัดสารจากเปลือกผลลำไยเถาจำนวน 2 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับลำไยต้นสายพันธุ์อื่น 1 ตัวอย่าง นำมาหมัก (maceration) ด้วยเมทานอลได้เป็นสารสกัดหยาบ (crude extract) และนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านต่าง ๆ ได้แก่ การทดสอบพิษเฉียบพลัน การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด จำนวน 3 วิธี คือ วิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) วิธี 2,2-azino-bis[3-ethylbenzothiazolone-6-sulfonic acid] (ABTS) และวิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP) ฤทธิ์ การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี DOPA-chrome ฤทธิ์ การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี paper disk-diffusion ฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ และศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ ด้วยวิธี 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) และคัดเลือกสารสกัดจากเปลือกผลลำไยเถา และเปลือกผลลำไยต้นสายพันธุ์อื่น ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพดีที่สุดมาสกัดสารต่อด้วยวิธี Liquid-liquid extraction แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพตั้งข้างต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น มิใช่เพื่อเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต การนำเอกสารนี้ไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาตถือว่าผิดกฎหมาย และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก่อนจะคัดเลือกสารสกัดในชั้นตัวทำละลายที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพไปสกัดสารให้บริสุทธิ์มากขึ้นด้วยเทคนิค Column chromatography และนำสารสกัดที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีที่สุดไปศึกษาต่อโดยการแยกสารให้มีความบริสุทธิ์เป็นสารสกัดส่วนย่อยด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin layer chromatography: TLC) และสกัดส่วนย่อยไปหาสารสำคัญด้วยวิธี GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 ทราบถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของลำไยเถาเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการอนุรักษ์พันธุกรรมของลำไยเถา
- 1.4.2 ทราบถึงสารสำคัญ และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเปลือกผลลำไยเถา เพื่อประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพในการพัฒนาสารสกัดจากเปลือกผลลำไยเถามาเป็นองค์ประกอบของยาหรือผลิตภัณฑ์อื่น ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เดิมลำไยมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Euphoria longana* Lamk. และต่อมาได้รับการเปลี่ยนเป็น *Dimocarpus longan* Lour. (นิพนธ์, 2549) จากประวัติความเป็นมาลำไยเป็นไม้ที่มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อน และกึ่งร้อนของเอเชีย มีถิ่นกำเนิดเดิมในศรีลังกา อินเดีย พม่า และจีน ลำไยเริ่มแพร่หลายในไทยในช่วงของปี พ.ศ. 2439 มีการนำลำไยเข้ามาถวายเจ้าดารารัศมี ซึ่งเป็นพระชายาของพระบาทสมเด็จพระจุลจอมเกล้าเจ้าอยู่หัว รัชกาลที่ 5 ในเวลาต่อมาเจ้าดารารัศมี ได้นำลำไยไปแบ่งปลูกในพื้นที่กรุงเทพฯ เชียงใหม่ ส่งผลให้ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันทำให้สายพันธุ์ลำไยที่นำมาตั้งแต่ดั้งเดิมเกิดแพร่กระจายไปจังหวัดใกล้เคียง และเกิดการกลายพันธุ์เป็นสายพันธุ์อื่น ๆ ในเวลาต่อมา (พาวิณ, 2543) ซึ่งสายพันธุ์ลำไยที่พบในประเทศไทยสามารถแบ่งเป็นจำนวน 3 สายพันธุ์ (Variety) (Flora of Thailand, 1999) ตามลักษณะกายภาพและสัณฐานวิทยา ได้แก่ (1) *Dimocarpus longan* spp. *longan* var. *longan* หรือลำไยต้น พบได้มากในเขตภาคเหนือของประเทศไทย มีลักษณะเป็นไม้ยืนต้นทรงพุ่ม ผลมีเมล็ดเล็ก มีเนื้อหนา รสชาติหวานกรอบ ส่งผลให้เป็นสายพันธุ์ลำไยที่นิยมเพาะปลูก บริโภค และมีมูลค่าทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน (2) *Dimocarpus longan* spp. *longan* var. *obtusus* ลำไยเถาหรือลำไยเครือ มีลักษณะลำต้นเป็นไม้เลื้อย มีผลและเมล็ดใหญ่ มีรสหวานจัด พบมากตามเขตภาคตะวันออกเฉียงของประเทศไทย เช่น ตราด ระยอง และชลบุรี เป็นต้น และ (3) *Dimocarpus longan* spp. *malesianus* leenh. var. *malesianus* ลำไยป่าหรือเงาะติเรก พบว่ามีต้นกำเนิดมาจากแถบคาบสมุทรมอินโดจีน และพบมากที่เกาะบอร์เนียวในประเทศมาเลเซีย ในประเทศไทยส่วนใหญ่พบในเขตภาคใต้ เช่น จังหวัดสุราษฎร์ธานี และจังหวัดระนอง เนื่องจากลำไยสายพันธุ์นี้พบได้น้อยในประเทศไทย ในการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นในการศึกษาลำไยเพียงสองชนิดคือ ลำไยเถา และลำไยต้น โดยใช้สายพันธุ์คือเป็นตัวแทนในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

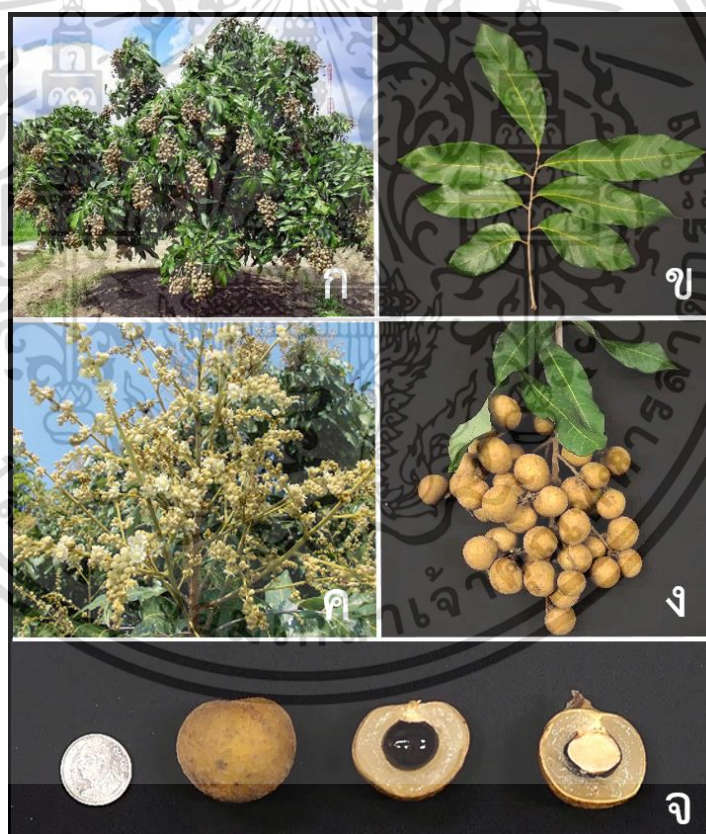
2.1 ลำไย

2.1.1 ลำไยต้น ชื่อวิทยาศาสตร์ *Dimocarpus longan* spp. *longan* var. *longan* มีลักษณะเป็นไม้ยืนต้นทรงพุ่มแผ่กว้าง (ภาพที่ 2.1 ก) มีลำต้นขนาดใหญ่ต้นสูงประมาณ 30-40 ฟุต มีเปลือกลำต้นขรุขระมีสีน้ำตาลหรือสีเทา มีลักษณะเป็นใบรวมที่มีใบย่อยอยู่บนก้านใบเดียวกัน โดยมีลักษณะใบย่อยเป็นรูปรี หรือ รูปหอก ใบย่อยจะจัดเรียงตัวในลักษณะตรงข้ามหรือแบบสลับ ปลายใบมีลักษณะค่อนข้างป้าน (ภาพที่ 2.1 ข) มีลักษณะดอกสีขาวอมเหลืองหรือสีน้ำตาล ช่อดอกเกิดจากปลายยอด

(ภาพที่ 2.1 ค) ออกผลลำไยเป็นผลเดี่ยว มีลักษณะผลเป็นทรงกลมหรือทรงกลมแป้น ผลสุกมีสีเหลือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หรือสีน้ำตาลอมแดง ผิวเปลือกเรียบ (ภาพที่ 2.1 ง) เนื้อมีสีขาว มีลักษณะเหนียว มีรสชาติหวานกรอบ เมล็ดมีลักษณะกลม มีสีดำหรือน้ำตาล (ภาพที่ 2.1 จ) โดยลำไยต้นสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด (พาวิณ และคณะ, 2547) คือ (1) ลำไยดั้งเดิม มีลักษณะลำต้นขนาดใหญ่ เปลือกลำต้นและกิ่ง มีผิวขรุขระมาก ผลมีขนาดเล็ก ความหนาเนื้อน้อย มักนำมาใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์ลำไย (2) ลำไยพื้นเมือง หรือลำไยกระดุก โดยลำไยกระดุก มีลำต้นเป็นทรงพุ่มกว้าง มีใบหนาทึบ ผลมีขนาดเล็ก รูปร่างค่อนข้างกลม สีน้ำตาล เนื้อผลบางสีขาวใสเป็นพันธุ์ที่สามารถพบได้ง่ายตามป่า บริเวณภาคเหนือของประเทศไทย เช่น จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และลำพูน เป็นต้น แต่ไม่นิยมปลูก เนื่องจากผลที่ขนาดเล็ก มีเนื้อน้อยมีรสชาติไม่หวาน และ (3) ลำไยกระโหลก มีลักษณะลำต้นใหญ่ มีขนาดผลใหญ่ เนื้อหนา มีรสหวาน เป็นที่ต้องการของตลาดจึงเป็นที่นิยมปลูกกันมากที่สุด โดยลำไยกระโหลกแบ่งเป็นสายพันธุ์ย่อยได้อีกหลายสายพันธุ์ เช่น สายพันธุ์อีตอ เปี้ยวเขียว และสีชมพู อีแดง อีเปี้ยว และอีเหลือง เป็นต้น โดยแต่ละสายพันธุ์จะมีความแตกต่างเฉพาะตัวต่างกันไป (พาวิณ, 2543)



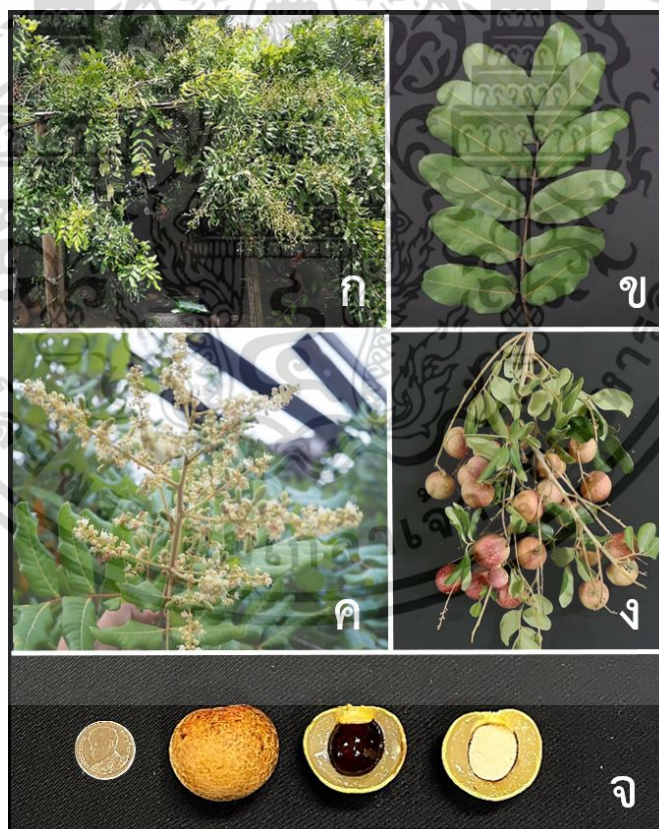
ภาพที่ 2.1 ลักษณะส่วนต่าง ๆ ของลำไยต้น (*Dimocarpus longan* spp. *longan* var. *longan*)

(ก) ลำต้น (ข) ใบ (ค) ช่อดอก (ง) ผล และ (จ) เนื้อผลและเมล็ด

(ที่มา: ภาพ ก จาก NanaGarden.com (2018), ภาพรูปถ่าย ข-จ โดยสุวิชญา จันทร์สาขา)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 ลำไยเถาหรือลำไยเครือ ชื่อวิทยาศาสตร์ *Dimocarpus longan* spp. *longan* var. *obtusus* ลำไยเถาถือเป็นลำไยสายพันธุ์หนึ่งในปัจจุบันเกิดความสับสนทางด้านสายพันธุ์ การเรียกชื่อสายพันธุ์ ถึงแม้ว่าลำไยเถาจะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างจากลำไยสายพันธุ์อื่น ๆ อย่างชัดเจน (สายสุนีย์, 2554) คือ เป็นไม้พุ่มไม้เลื้อย (ภาพที่ 2.2 ก) ใบย่อยมีลักษณะการเรียงตัว เป็นแบบขนนก มีใบย่อย 2-4 คู่ ลักษณะใบเล็ก ปลายใบมน หรือเว้าเล็กน้อย โคนใบมน ด้านท้องใบมีขน (ภาพที่ 2.2 ข) มีลักษณะดอกออกเป็นช่อที่ปลายยอด ดอกเป็นสีขาวอมเหลือง (ภาพที่ 2.2 ค) ผลเป็นทรงกลม ผิวเปลือกผลบางมีสีชมพูหรือสีเหลืองอ่อน มีผลขนาดใหญ่ ออกผลเป็นพวง (ภาพที่ 2.2 ง) มีลักษณะเนื้อบาง มีกลิ่นหอม และรสชาติหวานมากกว่าลำไยต้น เมล็ดมีขนาดใหญ่ มีสีน้ำตาลเข้ม (ภาพที่ 2.2 จ) (พิชัย, 2531) มีดอกและติดผล ปีละ 2 ครั้ง โดยลำไยเถาสามารถพบได้ เฉพาะบริเวณแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย เช่น จังหวัดชลบุรี ระยอง และตราด เป็นต้น เนื่องจากลำไยชนิดนี้ยังไม่เป็นที่รู้จักอย่างแพร่หลาย ทำให้มีความสับสนทางด้านสายพันธุ์ จึงเป็นที่มา ของการศึกษาในเรื่องความหลากหลายทางพันธุกรรมของลำไยเถาในงานวิจัยนี้



ภาพที่ 2.2 ลักษณะส่วนต่าง ๆ ของลำไยเถา (*Dimocarpus longan* spp. *longan* var. *obtusus*)

(ก) ลำต้น (ข) ใบ (ค) ช่อดอก (ง) ผล และ (จ) เนื้อผลและเมล็ด

(ที่มา: ภาพถ่ายโดย สุวิษฐา จันทรสาขา)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ในเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 เครื่องหมายทางโมเลกุล (Molecular markers)

เครื่องหมายทางโมเลกุลเป็นเครื่องหมายที่มีประสิทธิภาพในการใช้คัดเลือก บ่งชี้ความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรม ตรวจสอบสายพันธุ์ หรือศึกษาความหลากหลายทางด้านพันธุกรรม ซึ่งเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงสายพันธุ์พืช และสัตว์ ในปัจจุบันมีการศึกษาพัฒนาเครื่องหมายทางโมเลกุลอย่างหลากหลาย สามารถแบ่งเป็น 2 ระดับ ดังนี้ (สุรินทร์, 2545)

2.2.1 เครื่องหมายโมเลกุลระดับโปรตีน หรือเครื่องหมายโปรตีน (Protein marker) เป็นการตรวจสอบสิ่งมีชีวิตโดยใช้ความแตกต่างของโมเลกุลโปรตีน โดยใช้วิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) เพื่อย้อมดูแถบของโปรตีนจำเพาะด้วยสารเคมี เช่น การตรวจสอบโปรตีนในเลือด การตรวจสอบโปรตีนที่สะสมในเมล็ดพืช โดยเครื่องหมายโมเลกุลระดับโปรตีนมีข้อดี คือ สามารถตรวจสอบได้หลายตำแหน่ง มีค่าใช้จ่ายไม่สูงมาก และแถบของโปรตีนมีลักษณะแบบข่มร่วมกัน (co-dominance) ทำให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซกัสยีน (homologous gene) และเฮเทอโรไซกัสยีน (heterozygous gene) ได้ แต่มีข้อจำกัดคือ จำนวนยีนที่ตรวจสอบได้มีไม่มาก และจำเป็นต้องเลือกเฉพาะเนื้อเยื่อที่มีการแสดงออกของยีนมาทำการศึกษาเท่านั้น อีกทั้งโปรตีนเป็นสารที่สูญเสียสภาพได้ง่าย ทำให้มีโอกาสที่พบความแตกต่างได้ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับการตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอ (ไพศาล, 2546)

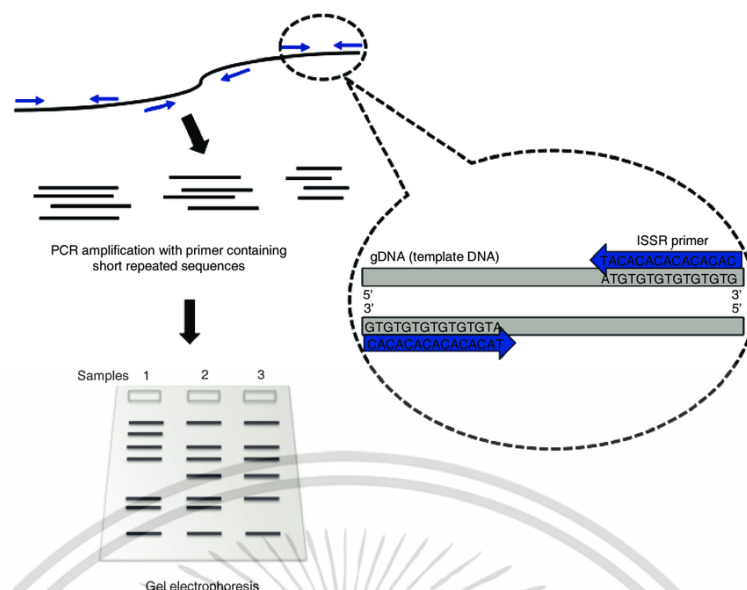
2.2.2 เครื่องหมายโมเลกุลระดับดีเอ็นเอ (DNA markers) เป็นเครื่องหมายทางโมเลกุลที่ใช้บ่งชี้ถึงความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตในระดับสายพันธุ์ สปีชีส์ หรือในระดับสปีชีส์ต่างกัน ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอจะอยู่บริเวณตำแหน่งเฉพาะจีโนม (genome) โดยไม่จำเป็นต้องเป็นส่วนหนึ่งของยีน เนื่องจากดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตแต่ละหน่วยอาจมีความแตกต่างกันของลำดับเบส จากการแทนที่ของเบส (base substitution) การขาดหายของดีเอ็นเอ (deletion) การเพิ่มขึ้นของดีเอ็นเอ (insertion) การเปลี่ยนแปลงกลับทิศทางของดีเอ็นเอ (inversion) หรือการย้ายสลับที่ของดีเอ็นเอระหว่างโครโมโซมที่ต่างคู่กัน (translocation) จึงทำให้เกิดความหลากหลายหรือความแตกต่าง (polymorphism) (Tira-umphon และคณะ, 2015) ข้อดีของเครื่องหมายโมเลกุลระดับดีเอ็นเอ คือ มีความเสถียรมีมากกว่าจึงเก็บไว้ได้นาน สามารถวิเคราะห์จากตัวอย่างที่ถูกเก็บไว้เป็นเวลานานได้ และดีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในเซลล์เกือบทุกเซลล์ในปริมาณเท่ากัน จึงสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อต่างๆ ได้จากในทุกระยะการเจริญเติบโต หรือในสภาพทางสัณฐานวิทยาใดก็ได้ โดยไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม และสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจากส่วนที่เป็นยีนหรือไม่ใช่ยีนก็ได้ ทำให้เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอทำได้อย่างกว้างขวาง สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในต่าง ๆ ได้ (สุรินทร์, 2552)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากการจัดจำแนกกลุ่มต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิตทำได้ค่อนข้างยาก โดยเฉพาะการจำแนกพืชในอดีตต้องอาศัยความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา เช่น ความสูงของต้น ลักษณะทรงพุ่ม ขนาดใบ รูปร่างของเมล็ด ลักษณะผล สีส้ม สีดอก เป็นต้น เป็นลักษณะที่ใช้แยกความแตกต่าง แต่เนื่องความแตกต่างเหล่านี้ไม่เพียงพอที่จะแยกความแตกต่างของพืชได้อย่างสมบูรณ์ การศึกษาลักษณะทางสัณฐานเพียงอย่างเดียวนั้นทำให้เกิดความผิดพลาดได้ง่าย เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานบางอย่างไม่สามารถแยกได้ออกจากกันอย่างชัดเจน อีกทั้งลักษณะสัณฐานหรือลักษณะทางกายภาพอาจเป็นผลมาจากสภาพแวดล้อมภายนอกที่แตกต่างกันทำให้การจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธีดังกล่าวเกิดความคลาดเคลื่อน โดยเฉพาะในงานปรับปรุงพันธุ์พืช ซึ่งต้องอาศัยข้อมูลที่สามารถระบุความใกล้ชิดทางพันธุกรรมอีกด้วย เพื่อคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่เหมาะสม หากมีข้อมูลความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอมาใช้เป็นข้อมูลประกอบหรือสนับสนุนข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ทำให้การจำแนกพันธุ์มีความรวดเร็วแม่นยำ มีประสิทธิภาพ และมีความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น

โดยในงานวิจัยสนใจเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ (inter-simple sequence repeat: ISSR) ที่ปรับปรุงมาจากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ หรือเครื่องหมายเอสเอสอาร์ (simple sequence repeat : SSR marker) (Bao และ Jonathan, 2002) เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างหรือความหลากหลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่อยู่บริเวณระหว่างไมโครแซทเทลไลท์ 2 ตำแหน่ง ซึ่งเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR มีหลักลักษณะการเข้าจับของไพรเมอร์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ แสดงดังภาพที่ 2.3 ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์มีบริเวณไมโครแซทเทลไลท์จึงใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสซ้ำ ๆ แบบไมโครแซทเทลไลท์ โดยส่วนใหญ่จะมีความยาวประมาณ 16-25 นิวคลีโอไทด์ มีอยู่ 2 แบบ คือ แบบ unanchored (Gupta และคณะ, 1999) เป็นไพรเมอร์ที่มีเฉพาะชุดลำดับเบสซ้ำ ๆ กัน โดยในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้ไพรเมอร์ชนิดนี้ เช่น $(CT)_8$, $(GT)_8$, $(CGT)_4$, $(ATTA)_2$, $(CGTTG)_7$ (Innark และคณะ, 2014) เป็นต้น อีกแบบคือ anchored เป็นไพรเมอร์ที่ถูกเติมด้วยเบส 1-4 นิวคลีโอไทด์ที่ปลาย 3' เรียกว่า 3'-anchored เช่น $(CTT)_7GC$, $(AG)_6AT$ หรือที่ปลาย 5' เรียกว่า 5'-anchored เช่น $CA(CGTTG)_7$, $GC(ATA)_2$ ซึ่งหากเติมเบสที่ปลาย 5' ของไพรเมอร์ จะทำให้เกิดจำนวนแถบดีเอ็นเอได้มากขึ้น และเกิดความแตกต่างมากขึ้นอีกด้วย (highly polymorphic) หากเติมเบสที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์จะทำให้แถบดีเอ็นเอที่เกิดมีความคมชัดขึ้นเมื่อเทียบกับ 5'-anchored primer (Predeep และคณะ, 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.3 หลักการพื้นฐานในการเข้าจับของไพรเมอร์ในเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ (Inter simple sequence repeat: ISSR) (ที่มา: Ng และ Tan, 2015)

เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์เป็นเครื่องหมายที่แสดงเฉพาะลักษณะเด่น โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความยาวของลำดับเบสมาก จึงทำให้อุณหภูมิ annealing ที่ใช้สูง เพราะอุณหภูมิขึ้นอยู่กับจำนวน GC content ซึ่งโดยทั่วไปอยู่ในช่วง 45-65 องศาเซลเซียส (Predeep และคณะ, 2002) จึงสามารถจำแนกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ดี มีความหลากหลายมากกว่า เนื่องจากมีความแปรปรวนของจำนวนซ้ำสูง หรือมีความหลากหลายของจำนวนอัลลีลที่มีอยู่บนจีโนมมากมายหลายตำแหน่ง จึงมีความสามารถในการทำซ้ำได้ดีกว่า (Reddy และคณะ, 2002) นอกจากนี้ข้อดีของเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ ยังพบว่าไม่จำเป็นต้องทราบถึงลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการศึกษา ไม่ต้องใช้สารกัมมันตรังสีเพื่อติดฉลาก (probe) ก็สามารถเกิดความแตกต่างสูงได้ (Bao และ Jonathan, 2001) ใช้เวลาในการตรวจสอบผลสั้น สามารถตรวจสอบได้ทั้งอะกาโรสเจล และโพลีอะคริลามิเดเจล มีราคาถูกประหยัดต้นทุนในการทดลอง ซึ่งความสามารถของเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์จะขึ้นอยู่กับความหลากหลาย และความถี่ของไมโครแซทเทลไลท์โดยจะแตกต่างกันไปตามแต่ละชนิดของตัวอย่างที่ต้องการศึกษา จากข้อมูลรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่างานวิจัยเกี่ยวกับด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมของลำไยเถาโดยใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลนั้นยังไม่มีการศึกษาอย่างแพร่หลาย มีเพียงการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในลำไยต้นสายพันธุ์ต่าง ๆ และพืชในวงศ์เดียวกัน โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลดังรายงานวิจัยต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lin และคณะ (1998) ศึกษาเครื่องหมายทางโมเลกุลอาร์เอพีดี เพื่อจำแนกความสัมพันธ์ของลำไยต้นจำนวน 23 สายพันธุ์ จำนวน 35 ตัวอย่าง จากประเทศจีน พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดีสามารถแบ่งตัวอย่างเป็น 6 กลุ่ม ซึ่งสามารถแยกสายพันธุ์ *Lizhiben* และ *Lizhi Longyan* ที่คาดว่าเป็นสายพันธุ์ลูกผสมระหว่างลิ้นจี่และลำไยต้นได้ แต่มีข้อแนะนำจากผู้วิจัยให้ศึกษาด้วยเครื่องหมายโมเลกุลอื่นร่วมด้วยเนื่องจากไม่สามารถระบุความแตกต่างทางสายพันธุ์ได้อย่างชัดเจน

Yonemoto และคณะ (2006) ศึกษาความสัมพันธ์ของลำไยต้นที่มีลักษณะสัณฐานที่แตกต่างกัน 18 สายพันธุ์ จำนวน 22 ตัวอย่าง ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี มีจำนวนแถบแบนที่มีความแตกต่างกัน (Polymorphic band) เท่ากับ 53.70 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ในช่วง 0.55-0.93 สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างดังกล่าว ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ตามแหล่งที่เก็บตัวอย่าง ซึ่งในงานวิจัยนี้มีสายพันธุ์ลำไยต้นที่มาจากประเทศไทย 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์สีชมพู สายพันธุ์อีตอ และสายพันธุ์เบี้ยวเขียวจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน

Mei และคณะ (2014) ศึกษาตัวอย่างลำไยต้น 5 ตัวอย่าง จากตอนใต้ของประเทศจีนด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุลอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 17 ไพรเมอร์ แต่มีเพียง 6 ไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างของ 5 ตัวอย่างได้ คือ SBS-A5, SBS-A13, SBS-I9, SBS-I20, SBS-M1, และ SBS-Q12 และพบว่าสามารถแบ่งตัวอย่างทั้ง 5 ตัวอย่างออกได้เป็น 3 กลุ่ม ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ในช่วง 0.69-0.76

แสงทอง และคณะ (2559) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของลำไยต้นจำนวน 25 สายพันธุ์ และลิ้นจี่จำนวน 4 สายพันธุ์ ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล Intron derived random amplified polymorphic DNA (ID- RAPD) จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์จำนวน 10 ไพรเมอร์ พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 50 แถบ โดยมีแถบแบนที่แตกต่างกัน (polymorphic band) ระหว่างสายพันธุ์ของลำไยต่าง ๆ จำนวน 45 แถบ คิดเป็น 90 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนที่ 0.74 สามารถแบ่งลำไยต้นจำนวน 25 สายพันธุ์ ออกเป็น 3 กลุ่ม โดยสามารถแยกสายพันธุ์อีตอจากลำไยสายพันธุ์อื่น ๆ ได้

Lin และคณะ (2005) ศึกษาตัวอย่างลำไย *D. longan* จำนวน 41 และตัวอย่าง *D. confinis* จำนวน 1 ตัวอย่าง และลิ้นจี่จำนวน 2 ตัวอย่าง ด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุลเอเอฟแอลพีสามารถจำแนกถึงความแตกต่างกันทางพันธุกรรมของพืชทั้ง 3 ชนิดได้ โดยพบว่าลิ้นจี่ และ *D. confinis* มีลำดับพันธุกรรมที่ห่างจากตัวอย่าง *D. longan*

Chemda และคณะ (2003) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ลินจี้ทั้งหมด 66 ตัวอย่าง จากประเทศจีน ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ โดยได้ศึกษาไพรเมอร์จำนวน 32 คู่ พบว่าเมื่อคัดเลือกไพรเมอร์เพียง 6 ไพรเมอร์ คือ UBC 807, UBC 808, UBC 845, UBC 849, UBC 888 และ UBC 891 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ลินจี้ได้ โดยสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 194 แลบ และมีจำนวนดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง (polymorphic band) จำนวน 124 แลบ หรือคิดเป็น 64 เปอร์เซ็นต์

Mariana และคณะ (2013) ศึกษาตัวอย่างลำไยต้นจำนวน 8 ตัวอย่าง จากประเทศอินโดนีเซีย ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ จากการวิเคราะห์ไพรเมอร์จำนวน 5 ไพรเมอร์ มีเพียงไพรเมอร์ ISSRa (HVH(CA)₇) ที่สามารถแยกความแตกต่างของตัวอย่างลำไยต้นได้ โดยมีดีเอ็นเอที่ไม่แสดงความแตกต่าง (monomorphic band) จำนวน 4 แลบ และดีเอ็นเอที่แตกต่าง (polymorphic bands) จำนวน 2 แลบ มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ในช่วง 0.34-0.86 โดยตัวอย่าง KL I ที่มาจาก Temanggung และ KL II ที่มาจาก Poncokusumo ในประเทศอินโดนีเซีย มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนที่ใกล้เคียงกันที่สุด คือ 0.86 จึงกล่าวได้ว่าเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์มีความสามารถในการจำแนกความหลากหลายภายในกลุ่มของลำไยต้นได้

Kung และคณะ (2010) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของลำไย 24 สายพันธุ์ โดยมีลำไยต้นที่มาจากประเทศไทย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์เบี้ยวเขียว สายพันธุ์สีดำ และสายพันธุ์อีหวายเปรียบเทียบกับตัวอย่างลินจี้ 1 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ จำนวน 17 ไพรเมอร์ มีจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 149 แลบ มีดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง 137 แลบ คิดเป็นร้อยละดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง 92.5 เปอร์เซ็นต์ และสามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างลำไยต้นสายพันธุ์ต่าง ๆ เป็น 4 กลุ่ม โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ในช่วง 0.44-0.91 ซึ่งลำไยจากประเทศไทยทั้ง 3 สายพันธุ์ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน และตัวอย่างลินจี้ถูกแยกออกจากกลุ่มของลำไยต้นทั้ง 24 สายพันธุ์ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ที่ 0.44

สิริมา และคณะ (2562) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของลินจี้จำนวน 23 สายพันธุ์ และลำไยต้น 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์จัมโบ้ และสายพันธุ์เพชรสาคร ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* และยีน *trnL-trnF* พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ จำนวน 18 ไพรเมอร์ สามารถแยกกลุ่มของลินจี้ออกจากลำไยทั้ง 2 สายพันธุ์ได้ โดยแถบที่แตกต่าง (polymorphic band) จำนวน 79 แลบ คิดเป็น 86.81 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อศึกษาด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* และยีน *trnL-trnF* สามารถแยกลินจี้สายพันธุ์จีนแดง ออกจากลินจี้สายพันธุ์อื่น ๆ โดยมีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างลินจี้จำนวน 23 สายพันธุ์อยู่ในช่วง

0.0000-0.0035 ซึ่งกล่าวได้ว่าลีนจีสายพันธุ์จีนแดงมีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากสายพันธุ์อื่น ๆ ในขณะที่ลีนจีอีก 22 สายพันธุ์ ไม่สามารถแยกออกจากกันได้

นอกจากนี้ยังพบว่าเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ ได้นำมาใช้ในการศึกษาแยกความแตกต่างของพืชที่อยู่ในปีชีส์เดียวกันได้ โดยงานวิจัยของ Tira-umphon และคณะ (2015) ได้ศึกษาสายพันธุ์แดงไทย และแดงเทศจำนวน 25 สายพันธุ์ ที่มีสายพันธุ์แตกต่างกันแต่อยู่ในปีชีส์เดียวกันมาศึกษาด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ พบว่าสามารถแยกความแตกต่างของแดงไทย และแดงเทศโดยจัดได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ และเมื่อนำข้อมูลจากเครื่องหมายทางโมเลกุลไปเปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้ว พบว่ามีความสอดคล้องกัน อย่างไรก็ตามมีความแตกต่างเล็กน้อยในเรื่องของสถานที่ สภาพแวดล้อมของแหล่งที่เก็บ ทำให้มีอิทธิพลกับลักษณะทางสัณฐานของแดงทั้งสองชนิด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของจาตุรงค์ และคณะ (2557) ที่ตรวจสอบข้าวมีสีจำนวน 10 สายพันธุ์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ 10 ไพรเมอร์ พบว่าสามารถแยกความแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ได้ ดังนั้นเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์จึงสามารถใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ในปีชีส์เดียวกันได้

จากรายงานที่ได้กล่าวไปในข้างต้นพบว่าในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของลำไยต้นและลีนจี แต่รายงานการศึกษาความหลากหลายของลำไยเถามีเพียงการศึกษาการในระดับนิวคลีโอไทด์ และการศึกษาด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี (sequence related amplified polymorphism: SRAP) ดังรายงานวิจัยต่อไปนี้

Chaowasku และคณะ (2017) ศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของที่อยู่ในวงศ์ Sapindaceae ระหว่างลีนจี (*L. chinensis*) จำนวน 2 สายพันธุ์ และพืชในสกุล *Dimocarpus* ได้แก่ *D. malesianus*, *D. fumatus* และ *D. longan* จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ ลำไยต้น (*D. longan* var. *longan*) และลำไยเถา (*D. longan* var. *obtusus*) รวมจำนวน 26 ตัวอย่าง โดยศึกษาในระดับนิวคลีโอไทด์ 6 ตำแหน่ง คือ *ITS2*, *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA*, *trnL-I* และ *trnL-trnF* พบว่าสามารถแบ่งตัวอย่างในสกุล *Dimocarpus* ออกจากสายพันธุ์ลีนจีได้ และสามารถแบ่งตัวอย่างในสกุล *Dimocarpus* ได้เป็น 4 กลุ่ม โดยสามารถแยกลำไยเถาออกจากลำไยต้นได้ จึงอาจกล่าวได้ว่า ลำไยเถามีความแตกต่างจากลำไยต้น *D. malesianus*, *D. fumatus* และลีนจีที่เป็นพืชในวงศ์เดียวกัน

กฤษญา (2562) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 6 คู่ คือ Me1/Em1, Me2/Em3, Me2/Em4, Me2/Em5, Me5/Em1 และ Me5/Em5 พบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างทั้งหมดจำนวน 37 แถบ คิดเป็นร้อยละของแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง (polymorphic band) เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เท่ากับ 52.11 เปอร์เซนต์ ที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 0.580 สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่เป็นลำไยเถา และกลุ่มที่เป็นลำไยต้นสายพันธุ์อู๊ดอ ซึ่งภายในกลุ่มของลำไยเถาค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (similarity index) ที่ 0.930 สามารถแบ่งกลุ่มลำไยเถาเป็นได้ 2 กลุ่ม ซึ่งการแบ่งเป็น 2 กลุ่มภายในกลุ่มของลำไยเถานั้นสอดคล้องกับสถานที่เก็บตัวอย่าง หากเก็บตัวอย่างมาจากสถานที่ใกล้เคียงกันจะมีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมสูง

2.3 สารออกฤทธิ์และฤทธิ์ทางชีวภาพของลำไย

ลำไยจัดเป็นผลไม้ที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง พบว่าในเนื้อของของลำไยประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน เส้นใย แคลเซียม ฟอสฟอรัส เหล็ก และวิตามินต่างๆ เช่น วิตามินเอ วิตามินบี วิตามินบีสอง ไนอาซิน วิตามินซี กรดอะมิโน เป็นต้น นอกจากนี้ลำไยมีรสหวานยังให้พลังงานแก่ผู้บริโภค มีน้ำตาลสำคัญ 3 ชนิด ได้แก่ กลูโคส ซูโครส และฟรุกโตส เป็นต้น (อรัญญา, 2555) โดยลำไยมีสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิก (phenolics) และโพลีฟีนอล (polyphenol) โดยฟีนอลิกเป็นสารที่พบได้ในพืชทั่วไป มีคุณสมบัติเป็นสารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวนอะโรมาติก (aromatic ring) ซึ่งเชื่อมต่ออยู่กับหมู่ไฮดรอกซิล 1 หมู่ หรือมากกว่า 1 หมู่ที่เข้ามาแทนที่ โดยอาจมีรูปแบบเป็นโมเลกุลฟีนอลิกอย่างง่าย (simple phenolic molecules) จนถึงสารประกอบโพลีเมอร์ที่มีขนาดใหญ่ (highly polymerized compounds) (Liu และคณะ, 2018) สามารถจำแนกได้ตามจำนวนของวงแหวนฟีนอล และธาตุที่มาจับกับวงแหวนนั้นๆ เช่น กรดฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ สตีลบิน และลิกแนน เป็นต้น

จากงานวิจัยของวิริยา และคณะ (2561) พบว่าในลำไยต้นมีสารฟีนอลิกที่สำคัญ 3 ชนิด ได้แก่ กรดแกลลิก (gallic acid) ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยป้องกันเซลล์จากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation reaction) ช่วยป้องกันเซลล์จากความเครียดเมื่ออายุมากขึ้น ช่วยลดโรคหัวใจและโรคมะเร็งในผู้สูงอายุได้ (Ikhlas และคณะ, 2009) กรดเอลลาจิก (ellagic acid) สามารถต้านฤทธิ์ของสารก่อมะเร็งได้ และเป็นสารยับยั้งมะเร็งที่ทำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) และกรดคอร์ลาจिन (corilagin) เป็นสารแทนนิน (tannin) ชนิดหนึ่ง มีฤทธิ์ต้านความเจ็บปวดที่สัมพันธ์กับขบวนการอักเสบได้ โดยอาจจะมีผลผ่านการกระตุ้น glutamatergic system (Rangkadilok และคณะ, 2005) โดยกรดแทนนินมีโครงสร้างประกอบด้วยกรดเอลลาจิก 9 โมเลกุล และน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล โดยกรดแทนนินเป็นสารที่มีรสฝาดและขม กรดแทนนินสามารถพบได้ทั้งในใบของพืชหลายชนิด ผลไม้ดิบ เมล็ดผลไม้ และเปลือกผลของผลไม้ โดยกรดแทนนินมีฤทธิ์ในการตกตะกอนโปรตีน ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อรา ใช้เป็นยาแก้ท้องร่วง สมานแผล นอกจากนี้สารสกัดที่มีปริมาณกรดแทนนินสูงมีประโยชน์ในการช่วยลดการผลิตกรดไนตริกออกไซด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(nitric oxide) ได้ ซึ่งกรดแกลลิก กรดเอลลาจิก และกรดคอร์ลาจिन มีปริมาณที่แตกต่างกันกันไปตามส่วนต่างๆ ของลำต้น และขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของลำไย แต่หากการผลิตกรดดังกล่าวมากเกินไปจะสามารถทำให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang และคณะ (2012) พบว่าเปลือกผลของลำไยมีสารจำพวกฟลาโวนอยด์ (flavonoid) หลายชนิด ซึ่งสารฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบของฟีนอลิก ที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง โรคหัวใจ และระบบไหลเวียนเลือด ป้องกันการเกิดโรคเบาหวาน จัดว่าฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบฟีนอลิกที่มีความสำคัญมากที่สุด สามารถแบ่งชนิดของฟลาโวนอยด์ย่อย ๆ ตามลักษณะโครงสร้างซึ่งประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติก 2 วง จับกับคาร์บอน 3 อะตอม ที่อยู่ในโมเลกุลของวงแหวนนั้น ๆ ที่ได้แก่ ฟลาโวนอล ฟลาโวน ไอโซฟลาโวน และแอนโทไซยานิน เป็นต้น จากงานวิจัยของ Udomlak และคณะ (2010) ศึกษาสารสกัดเอทานอลจากเปลือกผลไม้ 7 ชนิด ได้แก่ กล้วย ส้มโอ ลิ้นจี่ ลำไย มังคุด ทับทิม และเงาะ เพื่อทดสอบปริมาณฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลลำไยต้น มีปริมาณฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์เท่ากับ 132.14 mg GAE/g extract และ 62.92 mg CE/g extract ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Tang และคณะ (2019) กล่าวถึงปริมาณฟีนอลิก และปริมาณฟลาโวนอยด์ที่พบในเปลือกผลของลำไยมีค่าเท่ากับ 4.59 ± 0.25 และ 2.08 ± 0.04 ไมโครกรัมต่อกรัม ซึ่งมีปริมาณที่สูงกว่าเมล็ดลำไยที่มีค่าเท่ากับ 3.77 ± 0.08 และ 1.94 ± 0.01 mg GAE/g ซึ่งส่วนประกอบโพลีฟีนอลิกเหล่านี้ พบว่ามีสารคอร์ลาจिन (corilagin) เป็นส่วนประกอบหลักที่พบได้ทั้งในส่วนที่เป็นเปลือกผลและเมล็ด โดยสารสกัดจากเมล็ดมีปริมาณอัลคาลอยด์ในปริมาณสูงกว่าเมื่อเทียบกับสารสกัดจากเปลือกผลลำไยมีค่าเท่ากับ 7.40 ± 1.04 และ 6.44 ± 0.23 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ มีฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดี เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH โดยแบ่งการทดสอบเป็นสารสกัดจากเมล็ด และเปลือกผลได้ ดังนี้ สารสกัดฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และอัลคาลอยด์จากเมล็ด มีค่า IC_{50} (50% Inhibitory concentration) เท่ากับ 1007.89 ± 23.22 , 427.66 ± 3.01 และ 22.90 ± 1.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และอัลคาลอยด์จากเปลือกผล มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1827.11 ± 16.64 , 451.96 ± 3.62 และ 29.17 ± 0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Jaitrong และคณะ (2006) ที่ศึกษาปริมาณฟีนอลิก และสารสำคัญของเปลือกผลลำไย 2 สายพันธุ์ คือ อีตอ และเปี้ยวเขียว จากการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิก และวิเคราะห์สารสำคัญภายในเปลือกผลลำไยทั้ง 2 สายพันธุ์ พบสารประกอบฟีนอลิกจำพวกกรดเอลลาจิก อัลคาลอยด์ และฟลาโวนอยด์ เป็นต้น ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกชนิดต่าง ๆ ที่พบในลำไยทั้งสองสายพันธุ์มีปริมาณที่แตกต่างกันตามสายพันธุ์

จากรายงานวิจัยของ He และคณะ (2009) ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในส่วนเมล็ดเปลือกผล และเนื้อผล ของลำไยต้น 12 สายพันธุ์ พบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดเอทธานอลนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากเมล็ด เปลือกผล และเนื้อผลอยู่ในช่วง 30.09-63.00 และ 21.60-55.60 และ 1.7-6.5 mg/g extract ตามลำดับ จากรายงานวิจัย Kringkasemsri (2012) ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากเมล็ด และเปลือกผลของผลไม้ไทย 16 ชนิด พบว่าสารสกัดจากเปลือกผล และเมล็ดของลำไยกะโหลก มีปริมาณฟีนอลิกเท่ากับ 1925.39 และ 1157.28 mgGAE/g extract ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณฟีนอลิกสูงที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดจากผลไม้ชนิดอื่น แต่ในรายงานวิจัยของ Sriwattana และ Chindaluang (2014) ศึกษาการสกัดเมล็ดลำไยต้น 3 แบบ คือ สกัดด้วยเมทานอล สกัดด้วยน้ำร้อน และการสกัดด้วยวิธี Ultrasonic-Assisted (UAE) พบว่าสารสกัดเมล็ดลำไยที่สกัดด้วยเมทานอลมีปริมาณฟีนอลิกสูงสุดอยู่ในช่วง 11.71-41.25 mgGAE/ml

2.3.1 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity)

การเกิดอนุมูลอิสระ (free radical) เป็นกลไกการเกิดขึ้นทางธรรมชาติของสารที่มีการดึงอิเล็กตรอนจากสารอื่นในบริเวณรอบข้างของโมเลกุลหรืออะตอม ทำให้เกิดความเสถียรต่ำ และมีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลของสารอื่นที่อยู่บริเวณรอบ ๆ ของสาร โดยที่โมเลกุลข้างเคียงจะสูญเสีย หรือรับอิเล็กตรอนกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดการทำงานที่ผิดปกติของเซลล์ (Li และคณะ, 2015) และลูกหลานจนเกิดความผิดปกติของเนื้อเยื่อ หรืออวัยวะก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคข้ออักเสบ โรคสมองเสื่อม เป็นต้น ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระมีทั้งจากธรรมชาติและจากการสังเคราะห์ ในปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยเพื่อหาสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสมุนไพร ผัก ผลไม้ หรือผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติมากขึ้น เพื่อนำมาใช้ในการบริโภคแล้วเกิดความปลอดภัยต่อสุขภาพ หรือสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการต้านอนุมูลอิสระได้มากขึ้น ซึ่งการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีหลากหลายวิธีด้วยกัน แต่ละวิธีมีความจำเพาะแตกต่างกัน ปกติมักใช้หลายวิธีร่วมกันในการทดสอบ โดยวิธีการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ ได้แก่ การตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) การฟอกสีอนุมูลอิสระ 2,2-azino-bis[3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid] (ABTS) และศึกษาความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระหรือ Ferric reducing antioxidant power (FRAP) (Singthong และคณะ, 2011)

จากงานวิจัยของสายสุนีย์ (2554) ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ในส่วนของใบ ผล และเปลือกผลลำไยต้น 3 สายพันธุ์ คือ ลำไยสายพันธุ์อีดอ สายพันธุ์ชมพู และสายพันธุ์แห้ว โดยใช้สกัดจากจากตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล คลอโรฟอร์ม และเอทิลอะซิเตท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่าสารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายเมทานอลจากเมล็ดของลำไยสายพันธุ์แห้ว มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุด รองลงมาคือ สายพันธุ์อีดอ และสายพันธุ์ชมพู โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.98, 2.08 และ 2.46 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะนี้ที่สารสกัดจากเปลือกผลลำไยต้นมีประสิทธิภาพในการต้านสารอนุมูลอิสระที่ต่ำกว่าสารสกัดจากเมล็ด โดยสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลลำไยสายพันธุ์ชมพูมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุด รองลงมาคือ สายพันธุ์อีดอ และสายพันธุ์แห้ว โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.65, 1.98 และ 22.78 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และงานวิจัยของ Udomlak และคณะ (2010) ศึกษาสารสกัดเอทานอลจากเปลือกผลไม้ 7 ชนิด ได้แก่ กัลยัม ส้มโอ ลิ้นจี่ ลำไย มังคุด ทับทิม และเงาะ เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลลำไยต้นมีค่า IC_{50} เท่ากับ 20.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากเปลือกผลลิ้นจี่ที่เป็นพืชที่อยู่วงศ์เดียวกัน พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลลำไยต้นมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้น้อยกว่า โดยสารสกัดจากเปลือกผลลิ้นจี่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และจากงานวิจัยของ Prasad และคณะ (2010) ศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดจากผล เปลือกผล และเมล็ดลำไย โดยเปรียบเทียบวิธีการสกัดสารด้วยแรงดันสูง (ultra-high-pressure assisted extraction: UHPE) และวิธีการสกัดด้วยวิธีธรรมดา (conventional extractions: CE) พบว่ามีสารสกัดจากลำไยในทุกวิธีการสกัดให้ปริมาณฟีนอลิก และมีสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณที่สูง โดยสารสกัดจากลำไยที่สกัดด้วยแรงดันสูงมีค่าการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 73.53 ± 0.20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดลำไยที่สกัดด้วยวิธีธรรมดามีค่าการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 50.6 ± 1.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งถือว่าการสกัดสารจากลำไยโดยใช้แรงดันสูงให้ผลการต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่า และงานวิจัยของ Rerk-am และคณะ (2016) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารโพลีฟีนอลิกจากสารสกัดหยาบจากเปลือกผลและเมล็ดลำไยต้น ที่สารสกัดด้วย 20 และ 95 เปอร์เซ็นต์เอทานอล พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลและเมล็ดลำไย มีค่า IC_{50} ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอยู่ในช่วง 0.68-1.73 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงเมื่อเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.37 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และจากการศึกษาในงานวิจัยนี้ ได้นำสารสกัดหยาบของเปลือกผลลำไย และเมล็ดลำไยทดสอบด้วยวิธี HPLC พบว่า สารสกัดมีองค์ประกอบของสารประกอบโพลีฟีนอลิก ได้แก่ กรดแกลลิก คอริลาจिन และกรดเอลลาจิก ซึ่งผลสอดคล้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงของสารสกัดทั้งสองชนิด

ซึ่งจากรายงานที่กล่าวไปข้างต้นเป็นรายงานวิจัยในการศึกษาสารสกัดจากเปลือกผลลำไยต้น ในปัจจุบันไม่พบการศึกษาในส่วนของสารสกัดจากเปลือกผลลำไยเถา มีเพียงงานวิจัยของ กฤษณา (2562) ที่ศึกษาสารสกัดเมทานอลจากเมล็ดลำไยเถาและเมล็ดลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP พบว่าสารสกัดจากเมล็ดเอกลำไยนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลำไยเถา มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระทั้ง 3 วิธี ที่น้อยกว่าสารสกัดจากเมล็ดลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ โดยสารสกัดจากเมล็ดลำไยเถามีค่า IC_{50} ในวิธี DPPH และ ABTS อยู่ในช่วง 87.37-173.68 และ 199-354.88 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ และในวิธี FRAP มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอยู่ในช่วง 36.13-69.68 mg AAE/ g extract ในขณะที่สารสกัดจากเมล็ดลำไยต้นสายพันธุ์อีดอมี IC_{50} ในวิธี DPPH และ ABTS เท่ากับ 29.36 และ 139.49 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ และในวิธี FRAP มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 81.42 mg AAE/ g extract

2.3.2 ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Antibacterial activity)

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากพืชมี 3 วิธี คือ diffusion, dilution และ bioautography (Choma และ Grzelak, 2011) ซึ่งการจะเลือกใช้วิธีการใดนั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ชนิดของเชื้อ ปริมาณของเชื้อเริ่มต้น ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ และคุณสมบัติของสารสกัด เช่น ความเป็นกรด-เบส หรือความสามารถในการละลาย ในงานวิจัยนี้เลือกใช้วิธี paper disk diffusion เป็นวิธีที่ใช้แผ่นดิสก์หรือกระดาษกรองปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ซึ่งอ้อมตัวด้วยสารสกัดที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน นำมาวางบนผิวหน้าของอาหารแข็งชนิด Muller Hinton Agar (MHA) ที่ผ่านการกระจายเชื้อ (spread) หรือกวาดเชื้อ (swab) ของจุลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบลงไปในงานเพาะเลี้ยง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือมากกว่านั้นขึ้นอยู่กับชนิดเชื้อที่ทำการทดสอบ เพื่อตรวจสอบผลการทดลองโดยการวัดบริเวณที่เกิดการยับยั้งเชื้อ (inhibition zone) บริเวณรอบแผ่นดิสก์ของสารสกัดที่ใช้ทดสอบเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะที่ใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control)

จากงานวิจัยที่ผ่านมายังไม่พบการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียจากสารสกัดจากเปลือกผลลำไยเถา มีเพียงการศึกษาสารสกัดจากลำไยต้น โดยงานวิจัยของสุภัค (2542) ได้ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์จากสารสกัดเมล็ด และเปลือกผลลำไยต้น โดยทดสอบกับเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. *Colletorichum* sp. และแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* ซึ่งสารสกัดหยาบเมทานอลจากเมล็ด และเปลือกผลลำไยสามารถยับยั้งการเจริญเชื้อทั้ง 3 ชนิดได้ โดยมีค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ในสารสกัดเมล็ด คือ 15.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า MIC ในสารสกัดเปลือกผลลำไย คือ 35.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ Sudjaroen (2013) ศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรียก่อโรค 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* และยีสต์ก่อโรค 1 สายพันธุ์ คือ

Candida albicans โดยใช้วิธี agar diffusion และ broth macrodilution พบว่าสารสกัดเมล็ด

เอกสารนี้เป็นเอกสารทบทวนเวลาหรือบริการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ในเชิงการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลำไยที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* โดยมีค่าวงใสในการยับยั้งเท่ากับ 17, 12 และ 11 มิลลิเมตร และมีค่า MIC เท่ากับ 3.19, 1.59 และ 1.59 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และงานวิจัยของ Udomlak และคณะ (2010) ศึกษาสารสกัดเอทานอลจากเปลือกผลไม้ 7 ชนิด ได้แก่ กัลยัม ส้มโอ ลิ้นจี่ ลำไย มังคุด ทับทิม และเงาะ เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ *S. aureus*, *S. epidermidis* และ *P. aeruginosa* พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลลำไยต้นสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดได้ โดยมีค่าวงใสในการยับยั้งเท่ากับ 9.00, 11.83 และ 9.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อเทียบกับสารสกัดจากเปลือกผลลิ้นจี่ที่เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์เดียวกันแล้ว พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลลิ้นจี่มีค่าวงใสในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *P. aeruginosa* เท่ากับ 7.00 และ 7.50 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งสารสกัดจากเปลือกผลลิ้นจี่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* ได้ กล่าวได้ว่าสารสกัดจากเปลือกผลลำไยมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียได้ดีกว่าสารสกัดจากเปลือกผลลิ้นจี่ และงานวิจัยของ Siri และคณะ (2020) ศึกษาต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้ และผิวหนังของสารสกัดจากพืช 12 ตัวอย่าง ได้แก่ เนื้อกล้วยเทพพนม เนื้อกล้วยส้ม เนื้อกล้วยหักมุก เนื้อกล้วยป่า เปลือกผลทับทิม เปลือกผลกระท้อน เปลือกผลและเมล็ดลำไย ใบกาแพ ใบยางพารา ใบหูกวาง และใบฝรั่ง ซึ่งสกัดด้วยน้ำและเอทานอล 95 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ทดสอบกับแบคทีเรีย 7 สายพันธุ์ ได้แก่ *Aeromonas hydrophila* TISTR 1321, *Escherichia coli* TISTR 117, *Salmonella Typhimurium* TISTR 2519, *Vibrio parahaemolyticus* TISTR 1596, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR2370, *Staphylococcus aureus* TISTR 518 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 2329 พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลลำไยต้นที่สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* TISTR 2370, *V. parahaemolyticus* TISTR 1596, *S. aureus* TISTR 518 และ *S. aureus* TISTR 2329 สูงสุด โดยมีค่าบริเวณการยับยั้ง เท่ากับ 15.6 ± 2.8 , 15.0 ± 1.9 , 11.3 ± 0.9 และ 11.1 ± 0.8 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดจากเมล็ดลำไยต้นที่สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* TISTR 2370 และ *V. parahaemolyticus* TISTR 1596 ที่สูงกว่าสารสกัดจากเปลือกผลลำไยต้น โดยมีค่าบริเวณการยับยั้ง เท่ากับ 19.5 ± 2.4 และ 18.4 ± 2.1 มิลลิเมตร ตามลำดับ ยกเว้นเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* TISTR 518 และ *S. aureus* TISTR 2329 ที่สารสกัดจากเมล็ดลำไยต้นมีความสามารถในการยับยั้งน้อยกว่าเปลือกผลลำไยต้น มีค่าบริเวณการยับยั้ง เท่ากับ 9.1 ± 1.1 และ 13.7 ± 0.3 มิลลิเมตร ตามลำดับ

ในการปัจจุบันไม่พบการศึกษาในส่วนของสารสกัดจากเปลือกผลลำไยเถา มีเพียงงานวิจัยของกฤษฎา (2562) ที่ศึกษาสารสกัดจากเมล็ดลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อีดอที่สกัดด้วยเอทธานนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลายเมทานอล ที่ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. subtilis*, *M. luteus*, *S. aureus*, *S. epidermidis* และ *E. coli* พบว่าสารสกัดจากเมล็ดลำไยเถาและลำไยต้นสายพันธุ์อู๊ดอ มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ คือ *B. subtilis*, *M. luteus* และ *S. aureus* โดยสารสกัดจากเมล็ดลำไยเถามีบริเวณยับยั้ง เท่ากับ 13.52 ± 0.71 , 11.30 ± 0.59 และ 10.28 ± 0.81 มิลลิเมตร ตามลำดับ และสารสกัดจากเมล็ดลำไยต้นสายพันธุ์อู๊ดอมีค่าบริเวณการยับยั้ง เท่ากับ 14.50 ± 0.77 , 11.46 ± 2.76 และ 13.80 ± 1.10 มิลลิเมตร ตามลำดับ

2.3.3 ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Anti-tyrosinase activity)

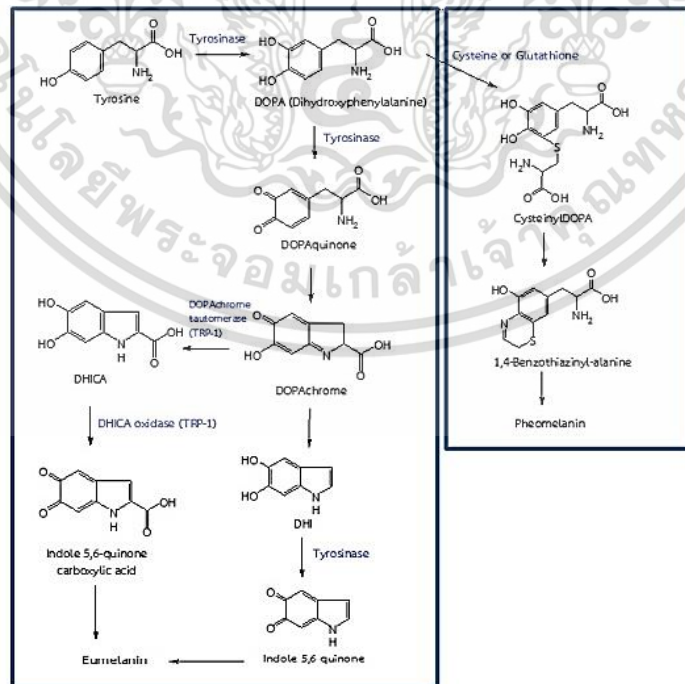
เอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินในสัตว์เลี้ยง ลูกด้วยนม ซึ่งเมลานินไซต์ (melanocytes) จะทำหน้าที่สร้างเม็ดสีเมลานินเก็บไว้ในเมลานินโซมแล้ว ส่งต่อไปยังเคราติโนไซต์ (keratinocytes) ที่ชั้นล่างสุดของเอพิเดอร์มิส (epidermis) หรือชั้นหนัง กำพำรกระบวนการสร้างเมลานินเกิดจากแสงแดดหรือรังสียูวีเป็นตัวกระตุ้น ทำให้โฟโบริลาสต์หลั่ง สารต่าง ๆ ออกมา ได้แก่ ไซโตไคน์ (cytokines) โกรทแฟคเตอร์ (growth factors) สารที่ก่อให้เกิด การอักเสบ (inflammatory factors) รวมถึงการกระตุ้นให้เซลล์เมลานินไซต์สร้างไนตริกออกไซด์มากขึ้น ก่อให้เกิดการสร้างเม็ดสีเมลานินโดยการส่งสัญญาณภายในเซลล์ต่อกันเป็นทอด ๆ ผ่านเอนไซม์ ไทโรซิเนส (Pillaiyar และคณะ, 2017) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มออกซิเดสที่มีคอปเปอร์เป็น องค์ประกอบภายในโครงสร้างของโปรตีนที่บริเวณเร่ง และทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ ดังกล่าว เอนไซม์ไทโรซิเนสสังเคราะห์มาจากไโรโบโซมที่พบบนเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมชนิดหยาบ เมื่อสังเคราะห์ได้เมลานินจะส่งไปกักเก็บไว้ในเมลานินโซม ซึ่งมีลักษณะเป็นถุงในทางชีวเคมี (Wickett และ Boissy, 2009)

โดยกระบวนการสังเคราะห์เมลานินจะเริ่มจากกรดอะมิโนไทโรซีนเป็นสารตั้งต้น และเร่ง ปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันเปลี่ยนแอล-ไทโรซีน (L-tyrosine) ไปเป็น 3,4-ไดไฮดรอกซีฟีนิลอะลานีน หรือแอล-โดปา (3,4-dihydroxyphenylalanine, L-DOPA) หลังจากนั้นแอล-โดปา (L-DOPA) ถูกออกซิไดซ์ไปเป็นโดปาควิโนน (DOP Aquinone) จากนั้นจึงสังเคราะห์ต่อเป็นเมลานิน ซึ่งมีด้วยกัน สองชนิด ได้แก่ ยูเมลานิน (eumelanin) และฟีโอเมลานิน (pheomelanin) ทั้งนี้เม็ดสีเมลานิน ทั้งสองชนิดมีวิถีการสังเคราะห์ที่แตกต่างกันโดยการสังเคราะห์ยูเมลานิน ซึ่งเป็นเม็ดสีเมลานิน สีน้ำตาล หรือสีคล้ำจะอาศัยโปรตีนที่เรียกว่า tyrosinase-related protein 1 (TRP-1) และเอนไซม์ DOPA chrome tautomerase (DCT หรือ TRP-2) ซึ่งเม็ดสีเมลานินจะถูกส่งไปเก็บไว้ยังเมลานินโซม จากนั้นจะถูกขนส่งไปตามเดนไดรต์เพื่อส่งเม็ดสีเหล่านี้ไปที่เคราติโนไซต์ (Pillaiyar และคณะ, 2017)

ดังภาพที่ 2.4 ซึ่งอยู่ใต้ชั้นผิวหนัง โดยปกติผิวหนังของคนเราจะมีการผลิตเซลล์ผิวประมาณ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

28-39 วัน จากนั้นจะเกิดสร้างเซลล์ผิวหนังขึ้นมาใหม่ เพื่อให้เกิดความกระจ่างใสของผิว ถ้าหากไม่เป็นไปตามนั้นจะทำให้ผิวหนังมีสีคล้ำขึ้น หรือเมื่อผิวหนังต้องเจอกับปัจจัยภายนอกร่างกาย เช่น แสงแดด และรังสียูวีจะส่งผลให้ผิวหนังเกิดความผิดปกติของการสร้างเม็ดสีเมลานินเกิดขึ้น เนื่องจากปัจจัยดังกล่าวจะเป็นตัวกระตุ้นให้เซลล์เมลาโนไซตได้ขึ้นผิวหนังผลิตเม็ดสีเมลานินมากขึ้นกว่าปกติ เป็นสาเหตุทำให้เซลล์ผิวหนังมีสีเข้มขึ้น ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดฝ้า กระ โดยวิธีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่นิยมใช้คือ วิธี DOPA chrome เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว และสามารถทดสอบได้หลายตัวอย่างพร้อมกัน ซึ่งหลักการของวิธี DOPA chrome คือ การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเปลี่ยน DOPA ไปเป็น DOPA chrome ในกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน

จากงานวิจัยที่ผ่านมา Rangkadilok และคณะ (2007) ได้ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในลำไยต้นสายพันธุ์อู๊ด โดยสารสกัดจากเมล็ดลำไยสดที่สกัดด้วยน้ำร้อนสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีกว่าสารสกัดจากเมล็ดลำไยที่ผ่านการอบแห้ง โดยมีค่า IC₅₀ ของสารสกัดจากเมล็ดลำไยสด และเมล็ดลำไยอบแห้งเท่ากับ 2.9 และ 3.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และจากงานวิจัยของ Wei และคณะ (2016) ในการศึกษาสารสกัดจากเปลือกผลลำไยต้นในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสต่อการสร้างสารเม็ดสี ใน B₁₆ Mouse Melanoma Cells จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเปลือกผลลำไยที่มีสารแทนนินเป็นองค์ประกอบมีผลทำให้เกิดการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 11.5±0.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 2.4 กระบวนการชีวสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน

(ที่มา: ประไพพิศ, 2561)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษานี้ เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากงานวิจัยของ Prasad และคณะ (2010) ศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จากสารสกัดเมล็ดลำไยต้น ที่สกัดด้วยเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ จากงานวิจัยพบว่าสารสกัดลำไยที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า IC_{50} เท่ากับ 23.6 ± 1.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานกรดคอร์ราจินที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.9 กรัมต่อมิลลิลิตร

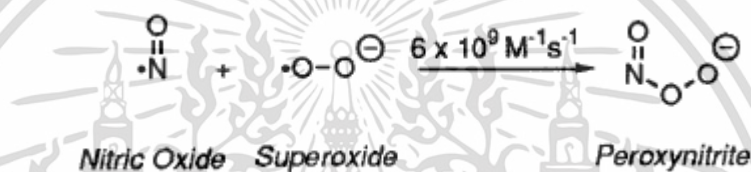
ซึ่งจากรายงานข้างต้นเป็นการศึกษาในส่วนของสารสกัดจากเปลือกผลและเมล็ดของลำไยต้น ซึ่งในปัจจุบันรายงานการศึกษาสารสกัดจากลำไยเถา มีเพียงงานวิจัยจากเมล็ดลำไยเถาเท่านั้น จากรายงานวิจัยของกฤษฏา (2562) ศึกษาสารสกัดเมทานอลจากเมล็ดลำไยเถาเปรียบเทียบกับสารสกัดจากเมล็ดลำไยต้นสายพันธุ์อีตอ ที่ความเข้มข้น 5-15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดจากเมล็ดลำไยเถามีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 504.82-776.57 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเมื่อเทียบกับกรดแอสคอร์บิกอยู่ในช่วง 161.29-182.00 mg AAE/ g extract และสารสกัดจากเมล็ดลำไยต้นมีค่า IC_{50} เท่ากับ 527.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเมื่อเทียบกับกรดแอสคอร์บิกเท่ากับ 181.09 mg AAE/ g extract

2.3.4 ฤทธิ์ด้านการอักเสบ (Anti-inflammatory activity)

การอักเสบเป็นกระบวนการที่ร่างกายตอบสนองต่อการติดเชื้อจุลินทรีย์ และสิ่งที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย อาการที่ปรากฏของการอักเสบ คือ ปวด บวม แดง และร้อน (Mequanint และคณะ, 2011) โดยสามารถแบ่งชนิดการอักเสบได้ 2 ชนิด คือ 1. การอักเสบเฉียบพลัน (acute inflammation) ซึ่งจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วภายในระยะเวลาเป็นวินาทีหรือนาที โดยการอักเสบแบบเฉียบพลันช่วยในการกำจัดเชื้อโรคซึ่งเป็นผลดีแก่ร่างกาย 2. การอักเสบเรื้อรัง (chronic inflammation) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ร่างกายมีการอักเสบเป็นระยะเวลาหลายสัปดาห์ หรือหลายเดือน ลักษณะสำคัญของการอักเสบเรื้อรัง คือ มีการสร้างเนื้อเยื่อพังผืดขึ้น มีการสร้างหลอดเลือดขึ้นจำนวนมาก และพบเซลล์อักเสบจำพวกเซลล์แมคโครฟาจ (macrophages) และเซลล์ลิมโฟไซต์ (lymphocytes) ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีความสำคัญในการกระบวนการอักเสบ และเกี่ยวข้องกับการปล่อยสารสื่อกลางทางเคมี (chemical mediators) ที่สำคัญ ได้แก่ ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide), prostaglandins และ cytokine เพื่อเป็นการช่วยในการกำจัดสิ่งรุกรานภายในร่างกาย (Hseu และคณะ, 2005) ไนตริกออกไซด์เป็นอนุมูลอิสระที่ถูกผลิตจากกระบวนการเปลี่ยน L-arginine ได้เป็น L-citrulline โดยเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) ซึ่งมีทั้งหมด 3 isoforms ได้แก่ neuronal NOS (nNOS) endothelial NOS (eNOS) และ inducible NOS (iNOS) ในสภาวะปกติไนตริกออกไซด์ถูกผลิตจากการทำงานของเอนไซม์ nNOS และ eNOS ซึ่งจะมีปริมาณไม่มาก แต่หากเกิดการ

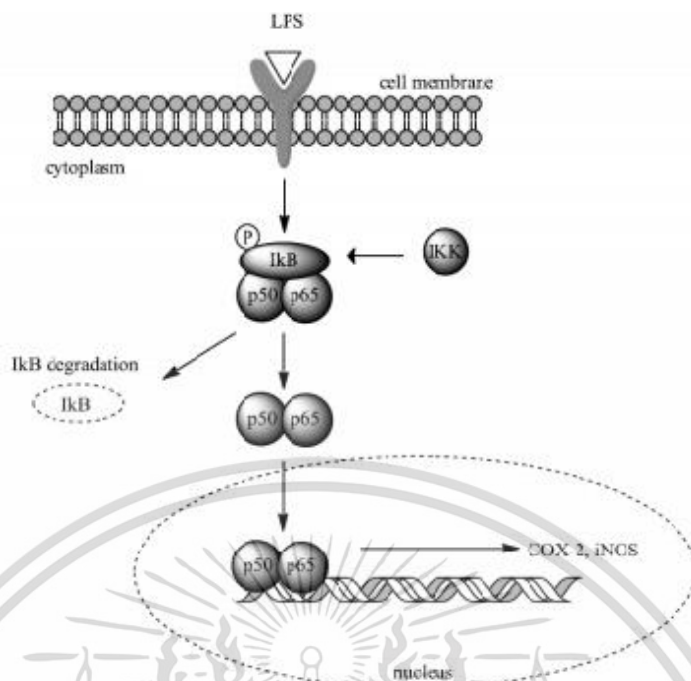
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อีกเสบจากการกระตุ้นของสิ่งแปลกปลอม เช่น แบคทีเรีย รา และไวรัส ไนตริกออกไซด์จะถูกผลิตออกมาอย่างมาก โดยการทำงานของเอนไซม์ iNOS อย่างไรก็ตามการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบต่าง ๆ ในปริมาณมากเกินไปจะทำให้มีการทำลายเนื้อเยื่อ ปัจจุบันพบว่าการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบที่มากเกินไปหรือหลังเป็นระยะเวลาานาน อาจเกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิวิทยาของโรคต่างๆ เช่น โรคกระเพาะและลำไส้อักเสบ โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis) โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) และโรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) นอกจากนี้ปริมาณไนตริกออกไซด์ที่มากขึ้นสามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ superoxide anion เกิดเป็น peroxynitrite (ONOO-) ดังภาพที่ 2.5 ที่สามารถก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ได้อย่างรุนแรง โดยทำลายสารพันธุกรรม (DNA) และโปรตีน (Sautebin, 2000)



ภาพที่ 2.5 ปฏิกิริยาระหว่างไนตริกออกไซด์ (NO) และอนุมูลอิสระ superoxide anion (ที่มา: Huie และ Padmaja, 1993)

ซึ่ง transcription factor ที่สำคัญ และทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของ iNOS เมื่อถูกกระตุ้นด้วย cytokines หรือ LPS ในเซลล์ คือ NF-KB (ประกอบด้วยโปรตีน p50 และ p65) ในสภาวะปกติที่เซลล์ไม่ถูกกระตุ้น NF-KB จะถูกจับโดย IKB และอยู่ใน cytosol เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นจะมีการส่งสัญญาณให้มีการสลาย IKB ส่งผลให้ NF-KB เกิดกระบวนการ translocation เข้าสู่นิวเคลียสเพื่อกระตุ้นการแสดงออกของยีน iNOS และส่งผลต่อกระบวนการอักเสบในร่างกาย ดังภาพที่ 2.6



ภาพที่ 2.6 NF-κB signaling pathway

(ที่มา: Pande และคณะ, 2009)

ในปัจจุบันมีความพยายามในการค้นหาโมเลกุลสารจากธรรมชาติที่สามารถลดอาการ หรือต้านการอักเสบได้ เพื่อนำไปสู่การผลิตยาต้านการอักเสบที่มีประสิทธิภาพสูง แต่มีผลข้างเคียงที่เป็นอันตรายต่ำ ซึ่งมีรายงานว่าพืชสมุนไพรเป็นแหล่งสำคัญของสารต้านการอักเสบจากธรรมชาติ เพราะมีสารประกอบฟีนอลที่แสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Huang และคณะ, 2006) สารที่ได้จากธรรมชาติจึงมีความปลอดภัย และมีผลข้างเคียงน้อยกว่าสารสังเคราะห์ ในปัจจุบันได้มีงานวิจัยค้นพบสารพฤกษเคมี (phytochemicals) ในพืช ผัก ผลไม้ และสมุนไพรหลายชนิดที่มีความสามารถในการต้านการอักเสบ (Cheung และคณะ, 2009) เช่น ในขมิ้นชันมีสารสำคัญที่ชื่อว่า curcumin และสาร quercetin จากหัวหอมที่สามารถลดการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจด้วยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ iNOS (Raso และคณะ, 2001) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kunworarath และคณะ (2016) ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบในลำไส้ต้นสายพันธุ์อีตอพบว่าสารสกัดด้วยน้ำร้อนจากส่วนของดอก เมล็ด และเนื้อมีความสามารถในการยับยั้งการเกิดไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ (RAW 264.7) โดยสารสกัดจากดอกมีความสามารถในการยับยั้งสูงสุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1260.2 รองลงมาคือสารสกัดจากเมล็ด และสารสกัดจากเนื้อผลมีความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์น้อยที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 128.2 และ 1127.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งสารสกัดจากลำไยเหล่านี้มีความสามารถในการลดการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS และยังพบว่า ส่วนของดอกลำไยประกอบไปด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

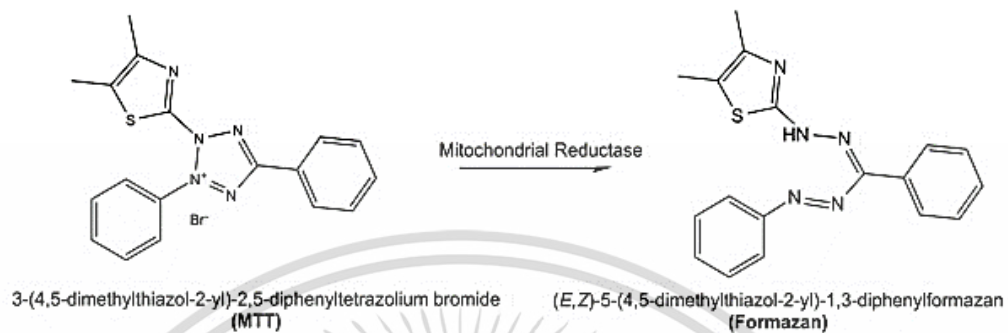
สารประกอบฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ กรดคอร์ริลาจिनและกรดเอลลาจิก สูงที่สุด เมื่อเทียบกับส่วนอื่น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Huang และคณะ (2012) ศึกษาสารสกัดจากเปลือกผลลำไยต้นที่สกัดด้วย น้ำเปรียบเทียบกับกรดแกลลิก แคทีชิน และกรดแอลลาจिन เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบภายใน เซลล์แมคโครฟาจ (RAW 264.7) พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลลำไยต้นมีความสามารถในการต้านการ อักเสบที่น้อยกว่ากรดแกลลิก และกรดเอลลาจิก โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 179.8 ± 1.4 , 18.8 ± 0.3 และ 5.2 ± 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้วีรียา (2560) ทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบจาก สารสกัดเมล็ดลำไยเถาจากเอทิลอะซิเตท เอทานอล และน้ำ ไปทดสอบกับเซลล์แมคโครฟาจ (RAW 264.7) ที่เหนี่ยวนำด้วยสาร lipopolysaccharide (LPS) เพื่อทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นให้มีการหลั่ง สารสื่อกลางการอักเสบต่าง ๆ พบว่าสารสกัดเมล็ดลำไยเถาที่สกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ต้านการอักเสบสูงสุด และสามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 465.94 ± 15.67 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร รองลงมา คือ สารสกัดเมล็ดลำไยเถาจากตัวทำละลายเอทานอล และเอทิลอะซิเตท ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 638.20 ± 15.73 และ 957.84 ± 49.88 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

2.3.5 ความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity activity)

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ เป็นการทดสอบสารเคมี สารสกัดจากพืชหรือสมุนไพร หรือยาที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ ถือว่าเป็นกระบวนการทดสอบในเบื้องต้น (primary screening) โดยวิธีการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์จะแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ 1. การตรวจสอบ เซลล์ที่มีชีวิตจากการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการยอมให้สารบางอย่างผ่านเข้าออกเยื่อหุ้มเซลล์ หรือการเปลี่ยนแปลงกระบวนการเมตาบอลิซึม 2. การตรวจสอบการรอดชีวิตแบบ long term survival จากความสามารถในการเพิ่มจำนวน และ 3. การตรวจสอบการรอดชีวิตของเซลล์จากการ กลายพันธุ์ หรือการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์มะเร็ง (อุ่นเรือน, 2555) การตรวจสอบความเป็นพิษต่อ เซลล์เป็นการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์จากการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการเมตาบอลิซึม การตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์โดยนิยมใช้ MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ซึ่งมีสีเหลืองละลายน้ำได้ หลักการของวิธี MTT assay คือ การวัดสภาวะ reduction environment (mitochondria reductase) ของไมโทคอนเดรียใน เซลล์ คือการวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่โดยวัดจากกิจกรรมของ mitochondrial succinic dehydrogenase ซึ่งเซลล์ที่มีชีวิตจะมี mitochondrial function ในเซลล์ krebs cycle ที่เกิดใน ไมโทคอนเดรียเป็นวิถีเมตาบอลิซึม (metabolic pathway) ที่สำคัญในการสังเคราะห์ adenosine triphosphate จากคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน โดยสาร MTT เปลี่ยนจาก succinate ไปเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

fumarate โดยถูกรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์ succinic dehydrogenase ส่วน FAD เป็นตัวที่ทำให้ปฏิกิริยารีดักชันสมบูรณ์โดยผ่าน $FADH_2$ และ $FADH_2$ สามารถเปลี่ยน tetrazolium salt ไปเป็น formazan ที่ในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิตให้อยู่ในรูปของผลึก formazan (Issa, 2004) ดังภาพที่ 2.7



ภาพที่ 2.7 การเปลี่ยนแปลงของสาร MTT ที่ถูกรีดิวซ์เป็นผลึกของ formazan (ที่มา: Brescia และ Banks 2009)

โดยการทดสอบนี้เมื่อปฏิกิริยาสมบูรณ์จะส่งผลทำให้มีการเปลี่ยนจากสีเหลืองไปเป็นสีม่วง ซึ่งเป็นผลึกสีม่วงไม่ละลายน้ำอยู่ภายในเซลล์ที่มีชีวิต ดังนั้น จึงต้องละลายผลึกของ formazan ออกมาด้วยสารผสมระหว่าง dimethyl sulfoxide (DMSO) กับเอทานอลแล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microtiter plate reader ค่าที่อ่านได้จะบอก mitochondrial activity และเซลล์ที่มีชีวิต (Levitz และ Diamond, 1985)

จากงานวิจัยของสายสุณี (2554) ศึกษาสารสกัดใบลำไยแห้งของลำไยสายพันธุ์อีตอแดงกลม และอีแห้งที่สกัดด้วยสารละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านม MCF-7 และมะเร็งปอด A-549 พบว่าสารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน ของลำไยสายพันธุ์อีตอ มีฤทธิ์ในการยับยั้งมะเร็งปอดดีที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 36.76 และ 27.28 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สารสกัดของลำไยสายพันธุ์อีแห้งมีเพียงสารสกัดในตัวทำละลายเฮกเซน และเมทานอลที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งมะเร็งเต้านมมะเร็งปอด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 49.92 และ 30.54 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดเฮกเซน และไดคลอโรมีเทนของลำไยสายพันธุ์แดงกลมมีฤทธิ์ในการยับยั้งมะเร็งปอด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 36.19 และ 24.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสารสกัดเมทานอลของลำไยสายพันธุ์อีตอ และสารสกัดลำไยสายพันธุ์แดงกลมไม่ผลต่อเซลล์มะเร็งเต้านม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานวิจัยของอรัญญา (2555) นำสารสกัดจากเปลือกผลลำไยต้นทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธี MTT โดยทดสอบกับเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร SGC-7901 เซลล์มะเร็งตับ HepG2 และเซลล์มะเร็งปอด A-549 พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลลำไยต้นที่ความเข้มข้น 500-1500 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร SGC-7901 และเซลล์มะเร็งปอด A-549 ได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษของเซลล์อยู่ในช่วง 75 และ 79 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ได้

จากงานวิจัยของ Huang และคณะ (2012) ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ (RAW 264.7) ด้วยวิธี MTT ของสารสกัดจากเปลือกผลลำไยต้นที่สกัดด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 50-400 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลลำไยต้นไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ และมีร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์แมคโครฟาจมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์

นอกจากนี้งานวิจัยของวิริยา (2560) ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยใช้เซลล์แมคโครฟาจ (RAW 264.7) ด้วยวิธี MTT พบว่าสารสกัดของเมล็ดลำไยเถาที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท เอทานอล และน้ำที่ความเข้มข้น 62.5-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ไม่มีผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยพบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดของเซลล์ มีค่าเกินกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นสารสกัดเมล็ดลำไยเถาจากน้ำที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลงเหลือ 83 เปอร์เซ็นต์ และจากรายงานวิจัยของกฤษฎา (2562) ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังของหนูชนิด L929 โดยทดสอบกับสารสกัดเมทานอลจากเมล็ดลำไยเถา และเมล็ดลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร พบว่าสารสกัดจากเมล็ดลำไยเถามีค่าการรอดชีวิตของเซลล์สูงกว่าชุดควบคุมซึ่งสามารถส่งเสริมการแบ่งตัวของเซลล์ผิวหนังของหนูได้ ในขณะที่สารสกัดจากเมล็ดลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ มีค่าร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ เท่ากับ 87.57

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ตัวอย่างพืช

ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมพืชของลำไยเถา และลำไยต้นด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ (inter simple sequence repeat: ISSR) ได้เก็บตัวอย่างใบของลำไยทั้งสองชนิดจำนวน 36 ตัวอย่าง ได้แก่ ใบของตัวอย่างลำไยเถา (DLO-01 ถึง DLO-36) และใบของลำไยต้น (DLL-37 ถึง DLL-40) โดยแสดงรหัส และแหล่งที่มาของตัวอย่างดังตารางที่ 3.1 โดยนำตัวอย่างใบของลำไยทั้งสองชนิดมาสกัดดีเอ็นเอ และเก็บตัวอย่างผลของลำไยทั้งสองชนิดเพื่อนำวัตถุดิบไปแปรรูปเป็นเบืองต้น และในส่วนของเปลือกผลลำไยที่ใช้ในการสกัดสารเพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพมีจำนวน 3 ตัวอย่าง ได้แก่ สารสกัดตัวอย่างลำไยเถา 2 ตัวอย่าง (Thao1 และ Thao2) โดยสารสกัด Thao1 เป็นตัวอย่างเปลือกผลลำไยเถาในอำเภอบ้านฉาง จังหวัดระยอง (DLO-07) และสารสกัด Thao2 เป็นตัวอย่างเปลือกผลลำไยเถาที่รวบรวมจากหลากหลายสถานที่ ส่วนสารสกัดลำไยต้นสายพันธุ์อีดอมีจำนวน 1 ตัวอย่าง (Edor) เป็นตัวอย่างลำไยต้นสายพันธุ์อีดอจากอำเภอบ้านฉาง จังหวัดลำพูน (DLL-40)

3.2 เชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม และภาคชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.2.1 *Bacillus subtilis* ATCC 6633

3.2.2 *Escherichia coli* ATCC 25922

3.2.3 *Kocuria rhizophila* ATCC 9341

3.2.4 *Propionibacterium acnes* DMST14916

3.2.5 *Staphylococcus aureus* TISTR 1466

3.2.6 *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

ตารางที่ 3.1 รหัส และแหล่งที่มาของตัวอย่างลำไยเถาและลำไยต้นที่ใช้ในการศึกษาคุณภาพผลเบื้องต้น และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วย เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์

รหัส	สถานที่เก็บ	ศึกษาคุณภาพ ผลเบื้องต้น	ศึกษาความ หลากหลายทาง พันธุกรรม	รหัส	สถานที่เก็บ	ศึกษาคุณภาพ ผลเบื้องต้น	ศึกษาความ หลากหลายทาง พันธุกรรม
DLO-01	อำเภอหนองจอก จังหวัดกรุงเทพฯ	✓	✓	DLO-13	อำเภอบางละมุง จังหวัดชลบุรี	✓	✓
DLO-02	อำเภอลำลูกกา จังหวัดปทุมธานี		✓	DLO-14	อำเภอบางละมุง จังหวัดชลบุรี	✓	✓
DLO-03	อำเภอลำลูกกา จังหวัดปทุมธานี	✓	✓	DLO-15	อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี	✓	✓
DLO-04	อำเภอลำลูกกา จังหวัดปทุมธานี		✓	DLO-16	อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี	✓	✓
DLO-05	อำเภอลำลูกกา จังหวัดปทุมธานี	✓	✓	DLO-17	อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี		✓
DLO-06	อำเภอลำลูกกา จังหวัดปทุมธานี	✓	✓	DLO-18	อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี	✓	✓
DLO-07	อำเภอบ้านฉาง จังหวัดระยอง	✓	✓	DLO-19	อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี	✓	
DLO-08	อำเภอบ้านฉาง จังหวัดระยอง	✓	✓	DLO-20	อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี	✓	✓
DLO-09	อำเภอบ้านฉาง จังหวัดระยอง	✓		DLO-21	อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี		✓
DLO-10	อำเภอบ้านฉาง จังหวัดระยอง	✓	✓	DLO-22	อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี		✓
DLO-11	อำเภอบ้านฉาง จังหวัดระยอง	✓	✓	DLO-23	อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี		✓
DLO-12	อำเภอบางละมุง จังหวัดชลบุรี	✓	✓	DLO-24	อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี		✓

หมายเหตุ เครื่องหมาย ✓ แสดงการนำตัวอย่างไปศึกษา

ตารางที่ 3.1 รหัส และแหล่งที่มาของตัวอย่างลำไยเถาและลำไยต้นที่ใช้ในการศึกษาคุณภาพผลเบื้องต้น และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ (ต่อ)

รหัส	สถานที่เก็บ	ศึกษาคุณภาพ ผลเบื้องต้น	ศึกษาความ หลากหลายทาง พันธุกรรม	รหัส	สถานที่เก็บ	ศึกษาคุณภาพ ผลเบื้องต้น	ศึกษาความ หลากหลายทาง พันธุกรรม
DLO-25	อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี	✓	✓	DLO-34	เกาะยวน้อย จังหวัดพังงา		✓
DLO-26	อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา	✓		DLO-35	เกาะยาว จังหวัดพังงา		✓
DLO-27	อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา	✓	✓	DLO-36	เกาะยาว จังหวัดพังงา		✓
DLO-28	อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา	✓	✓	DLL-37	อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา	✓	✓
DLO-30	อำเภอสนทราย จังหวัดเชียงใหม่		✓	DLL-38	อำเภอสนทราย จังหวัดเชียงใหม่	✓	✓
DLO-31	เกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี	✓	✓	DLL-39	อำเภอประตูป่า จังหวัดลำพูน	✓	✓
DLO-32	เกาะกูด จังหวัดตราด		✓	DLL-40	อำเภอป่าซาง จังหวัดลำพูน	✓	✓
DLO-33	เกาะยวน้อย จังหวัดพังงา	✓	✓				

หมายเหตุ เครื่องหมาย ✓ แสดงการนำตัวอย่างไปศึกษา

3.3 เซลล์ไลน์

เซลล์ไลน์ที่ใช้ในการศึกษามีทั้งหมด 3 ชนิด ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.สุพัตรา โปธิ์เยี่ยม ดังนี้

- 3.3.1 เซลล์เม็ดเลือดขาวแมคโครฟาจ (RAW 264.7 cell)
- 3.3.2 เซลล์ผิวหนังของหนู (Mouse fibroblast cell line) ชนิด L929 cell
- 3.3.3 เซลล์เคอราติโนไซท์มนุษย์ (Human keratinocyte cell) ชนิด HaCaT cell

3.4 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 3.4.1 กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงเชิงประกอบ (Compound light microscope)
- 3.4.2 กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (Inverted microscope)
- 3.4.3 กรวยแยก (Separating funnel)
- 3.4.4 กรวยกรองบูชเนอร์ (Buchner funnel)
- 3.4.5 กระบอกตวง (Cylinder)
- 3.4.6 กระดาษกรองวอทแมน เบอร์ 1 (Whatman No. 1 filter paper)
- 3.4.7 โกร่งและที่บด (Mortar and Pestle)
- 3.4.8 ขวดแก้ว (Duran bottle)
- 3.4.9 ขวดปริมาตร (Volumetric flask)
- 3.4.10 คิวเวตควอตซ์ (Semi-micro Quartz cuvettes)
- 3.4.11 คิวเวตพลาสติก (Plastic cuvettes)
- 3.4.12 เครื่องกวนสารพร้อมให้ความร้อน (Hot plate magnetic stirrer)
- 3.4.13 เครื่องชั่ง (Balance)
- 3.4.14 เครื่องนับจำนวน (Counter)
- 3.4.15 เครื่องปั่นไฟฟ้า (Electric grinder)
- 3.4.16 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
- 3.4.17 เครื่องปั่นเหวี่ยงสารขนาดเล็ก (Spin down)
- 3.4.18 เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)
- 3.4.19 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (Thermal cycler)
- 3.4.20 เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (Microplate reader)
- 3.4.21 เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (Rotary evaporator)
- 3.4.22 เครื่องวัดความหวาน (Refractometer)
- 3.4.23 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.4.24 คอลัมน์โครมาโตกราฟี (Chromatography column)
- 3.4.25 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dishes)
- 3.4.26 ชุดถ่ายภาพเจล (Gel document system)
- 3.4.27 ชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis system)
- 3.4.28 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Burner)
- 3.4.29 ตู้แช่แข็ง (Deep freezer)
- 3.4.30 ตู้เย็น (Refrigerator)
- 3.4.31 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow hood)
- 3.4.32 ตู้บ่ม (Incubator)
- 3.4.33 ตู้ดูดควัน (Deep freezer)
- 3.4.34 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
- 3.4.35 โถดูดความชื้น (Desiccator)
- 3.4.36 แท่งแก้ว (Glass rod)
- 3.4.37 แท่งแม่เหล็กกวนสาร (Magnetic bar)
- 3.4.38 ทิป (Micropipette tips)
- 3.4.39 บีกเกอร์ (Beaker)
- 3.4.40 ปัมสุญญากาศ (Vacuum pump)
- 3.4.41 ปากคีบ (Forceps)
- 3.4.42 ผ้าขาวบาง (White cloth)
- 3.4.43 สำลี (Cotton balls)
- 3.4.44 พาราฟิล์ม (Parafilm)
- 3.4.45 พาสเจอร์ปิเปต (Pasteur pipettes)
- 3.4.46 ฟลาสก์รูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
- 3.4.47 ไมโครปิเปต (Micropipettes)
- 3.4.48 ไมโครเพลทชนิด 96 หลุม (96-well plates)
- 3.4.49 ไมโครเวฟ (Microwave oven)
- 3.4.50 ไม้พันสำลี (Cotton buds)
- 3.4.51 เวอร์เนียดิจิตอล (Digital vernier caliper)
- 3.4.52 หลอดทดลอง (Test tubes)
- 3.4.53 หลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge tubes)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.4.54 ห่วงเย็บเชือก (loop)
- 3.4.55 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
- 3.4.56 ซีมาไซโตมิเตอร์ (Hemocytometer)
- 3.4.57 TLC Aluminium Sheets 20×20 cm
- 3.4.58 TLC tank
- 3.4.59 UV box

3.5 สารเคมี

3.5.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

- 3.5.1.1 Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)
- 3.5.1.2 Chloroform
- 3.5.1.3 Distillated water
- 3.5.1.4 Ethanol
- 3.5.1.5 Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)
- 3.5.1.6 Liquid nitrogen
- 3.5.1.7 Isoamyl alcohol
- 3.5.1.8 Isopropanol
- 3.5.1.9 β -mercaptoethanol
- 3.5.1.10 Polyvinylpyrrolidone (PVP)
- 3.5.1.11 Rnase A
- 3.5.1.11 Sodium chloride
- 3.5.1.12 Tris-Base

3.5.2 สารเคมีในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์

- 3.5.2.1 10X Standard taq reaction buffer
- 3.5.2.2 Deoxyadenosine triphosphate (dATP)
- 3.5.2.3 Deoxycytidine triphosphate (dCTP)
- 3.5.2.4 Deoxyguanosine triphosphate (dGTP)
- 3.5.2.5 Deoxythymidine triphosphate (dTTP)
- 3.5.2.6 GF-1 AmbiClean Kit (Gel & PCR) (Vivantis)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.2.7 Magnesium chloride 50 mM

3.5.2.8 Nuclease-free water

3.5.2.9 ISSR Primer ชนิดแบบ unanchored

ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.โองการ วาณิชชิวะ

3.5.2.10 *Taq* DNA polymerase 5000 U/ml (Vivantis)

3.5.3 สารเคมีที่ใช้ในเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

3.5.3.1 1kb DNA ladder (Vivantis)

3.5.3.2 3X Loading dye (Vivantis)

3.5.3.3 Agarose

3.5.3.4 Boric acid

3.5.3.5 Deionized water

3.5.3.6 Ethidium bromide

3.5.3.7 Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)

3.5.3.8 Tris-HCl

3.5.3.9 VC 100 bp DNA ladder (Vivantis)

3.5.4 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดและแยกสาร

3.5.4.1 p-Anisaldehyde

3.5.4.2 n-Butanol

3.5.4.3 Dichloromethane

3.5.4.4 Ethanol

3.5.4.5 Ethyl acetate

3.5.4.6 Hexane

3.5.4.7 Iodized table salt

3.5.4.8 Methanol commercial reagent grade

3.5.4.9 Sodium sulfate anhydrous

3.5.4.10 Sulfuric acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.5 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาสารพิษเคมีเบื้องต้น

- 3.5.5.1 Acetic acid
- 3.5.5.2 Aescin
- 3.5.5.3 Coloroform
- 3.5.5.4 Colchicine
- 3.5.5.5 Ethanol
- 3.5.5.6 Ethyl acetate
- 3.5.5.7 Gelatin
- 3.5.5.8 Methanol
- 3.5.5.9 α -Naphthol
- 3.5.5.10 Phosphate buffer saline (PBS)
- 3.5.5.11 Sodium bicarbonate
- 3.5.5.12 Sodium carbonate
- 3.5.5.13 Sodium chloride
- 3.5.5.14 Sodium citrate dehydrate
- 3.5.5.15 Sodium hydroxide
- 3.5.5.16 Sulfuric acid
- 3.5.5.17 Tannic acid

3.5.6 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

- 3.5.6.1 2,2-azino-bis[3-ethylbenzothiazoneline-6-sulfonicacid] (ABTS)
- 3.5.6.2 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
- 3.5.6.3 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ)
- 3.5.6.4 Acetic acid
- 3.5.6.5 Ascorbic acid
- 3.5.6.6 Ferric chloride hexahydrate
- 3.5.6.7 Hydrochloric acid
- 3.5.6.8 Methanol
- 3.5.6.9 Potassium persulfate
- 3.5.6.10 Sodium acetate trihydrate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.6.11 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox)

3.5.7 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์

3.5.7.1 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)

3.5.7.2 Dimethyl sulfoxide (DMSO)

3.5.7.3 Ethanol

3.5.7.4 Fetal bovine serum (FBS)

3.5.7.5 Gentamicin

3.5.7.6 Mitomycin C

3.5.7.7 Phosphate buffer saline (PBS)

3.5.7.8 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium

3.5.7.9 Sodium bicarbonate

3.5.7.10 Trypan blue solution

3.5.7.11 Trypsin-EDTA

3.5.8 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย

3.5.8.1 Brain Heart Infusion agar (BHI Agar)

3.5.8.2 Gentamicin

3.5.8.3 Methanol

3.5.8.4 Mueller Hinton agar (MHA)

3.5.8.5 Normal saline solution (NSS)

3.5.8.6 Nutrient agar (NA)

3.5.9 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ และฤทธิ์

การต้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ในเซลล์เพาะเลี้ยง

3.5.9.1 Dimethylsulfoxide (DMSO)

3.5.9.2 Indomethacin

3.5.9.3 Phosphate buffer saline (PBS)

3.5.9.4 Lipopolysaccharide (LPS)

3.5.9.5 Griess reagent

3.5.9.6 Sodium nitroprusside

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการเรียนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.10 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

3.5.10.1 Ascorbic acid

3.5.10.2 L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-Dopa)

3.5.10.3 Phosphate buffer pH 6.8

3.5.10.4 Tyrosinase

3.6 โปรแกรม

3.6.1 GraphPad Prism 8.0

3.6.2 IBM SPSS Statistic 23

3.6.3 Microsoft Excel 2013

3.6.4 NTSYSpc version 2.10 m

3.6.5 R-studio 8.0

3.7 วิธีการทดลอง

3.7.1 การศึกษาคุณภาพผลเบื้องต้นของลำไยเถาและลำไยต้น

การศึกษาครั้งนี้ได้เก็บข้อมูลของลักษณะและคุณภาพผลเบื้องต้นของลำไยเถาและลำไยต้น เพื่อศึกษาข้อมูลเปรียบเทียบลักษณะความแตกต่างของลำไยทั้งสองชนิด โดยข้อมูลที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วย ข้อมูลน้ำหนักของผลและเมล็ด วัดและบันทึกข้อมูลด้วยการชั่งด้วยเครื่องชั่งดิจิตอลรายงานผลในหน่วยกรัม ข้อมูลความกว้างความยาวของผลและเมล็ด ข้อมูลความหนาของเนื้อผล วัดและบันทึกผลด้วยเวอร์เนียร์แบบดิจิตอลรายงานผลในหน่วยเซนติเมตร สำหรับข้อมูลความหวานของเนื้อผลลำไยบันทึกผลด้วยเครื่องวัดความหวาน (refractometer) รายงานผลเป็น °Brix และนำข้อมูลในทุกส่วนวิเคราะห์จัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม R-studio

3.7.2 การสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างใบลำไยเถา และลำไยต้นมาล้างทำความสะอาด แล้วตากให้แห้ง จากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอตัดแปลงวิธีจาก Doyle และ Doyle (1987) โดยการนำตัวอย่างใบลำไยตัดเป็นชิ้นเล็กๆพอประมาณ ใส่ลงไปในโถงที่ผ่านการแช่เย็น เติมนิโตรเจนเหลวให้ท่วมตัวอย่างใบ แล้วบดตัวอย่างใบให้เป็นผงละเอียด จากนั้นเติม 2XCTAB (แสดงวิธีเตรียมสารดังกล่าวภาคผนวก ก) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไมโครลิตร และเติม β -mercaptoethanol ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วตัดตัวอย่างใบที่บดไว้ใส่ลงไป ในหลอดทดลอง พันหลอดด้วยพาราฟิล์ม และกลับหลอดไปมา แล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง โดยกลับหลอดไปมาเบาๆ ทุกๆ 10-15 นาที เมื่อครบเวลาบ่มจึงเติม คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24 : 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร พร้อมกับกลับหลอดไปมาเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดทดลองใหม่ขนาด 2 มิลลิลิตร เติม RNase A ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติมสารละลาย CTAB 10 เปอร์เซ็นต์ ในโซเดียมคลอไรด์ 0.7 โมลาร์ (แสดงวิธีเตรียมสารดังกล่าวภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติม คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24 : 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร พร้อมกับกลับหลอดไปมาเบา ๆ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมไอโซโพรพานอลที่เย็นจัดลงในหลอดโดยใช้ปริมาตร 1 : 2 ของส่วนใสที่ดูดได้ เช่น ตัวอย่าง 500 ไมโครลิตร : ไอโซโพรพานอล 1000 ไมโครลิตร เป็นต้น แล้วกลับหลอดไปมาเบาๆ นำไปแช่ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หรือ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เมื่อครบเวลา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นเทส่วนใสทิ้ง เก็บตะกอนดีเอ็นเอด้านล่างไว้ และคว่ำหลอดลงเพื่อซับน้ำ จากนั้นเติม เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดเพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ แล้วนำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง และล้างตะกอนอีกครั้งด้วยเอทานอล 99.5 เปอร์เซ็นต์ นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นเทส่วนใสทิ้ง พร้อมคว่ำหลอดซับบนกระดาษทิชชูให้แห้ง แล้วนำหลอดที่มีตะกอนดีเอ็นเอไปบ่มในตู้ 37 องศาเซลเซียส จนตะกอนแห้ง และนำมาละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยการเติม Tris-EDTA (TE) buffer ที่ผ่านการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่ตู้ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืนเพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ เมื่อครบเวลานำหลอดดีเอ็นเอไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7.3 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ

การตรวจสอบคุณภาพ และการวัดปริมาณดีเอ็นเอ สามารถทำได้ 2 วิธี คือ การตรวจสอบปริมาณของดีเอ็นเอด้วยวิธีอเล็กโทรโฟรีซิส และการคำนวณหาความเข้มข้นดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ในการวิเคราะห์ด้วยวิธีอเล็กโทรโฟรีซิส จะเตรียมอะกาโรสเจลให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ เช่น การเตรียมอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ด้วยการชั่งอะกาโรสเจล 0.4 กรัม ละลายด้วย 1XTBE buffer ปริมาตร 40 มิลลิลิตร แล้วนำไปหลอมละลายให้เป็นสารละลายใสในเครื่องไมโครเวฟ จากนั้นนำมาเทลงในถาดเจล (gel tray) พร้อมหัว (combs) ที่จี่ไว้จนเจลแข็ง และนำมาใส่ใน chamber ของเครื่องเจลอเล็กโทรโฟรีซิสที่เติม 0.5X TBE buffer จนท่วม แล้วนำตัวอย่างดีเอ็นเอมาหยอดลงไปในหลุมเจล โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอปริมาตร 3 ไมโครลิตร ผสมกับสีย้อม 3X loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เทียบกับ DNA marker ขนาด 1 kb ปริมาตร 2 ไมโครลิตร จากนั้นเปิดเครื่องอเล็กโทรโฟรีซิส โดยตั้งกระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำแผ่นเจลแช่ในเอธิเดียมโบรไมด์ในที่มืด 10 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่น 10 นาที นำเจลไปส่องไฟแสงอัลตราไวโอเล็ต และถ่ายภาพด้วยชุดถ่ายภาพเจล พร้อมบันทึกผล

สำหรับการคำนวณความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ทำได้โดยการนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบปริมาตร 3 ไมโครลิตร เจือจางด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 297 ไมโครลิตร (dilution factor คือ 100) จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร การคำนวณความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอจะใช้อัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 ซึ่งจะคำนวณความเข้มข้นดีเอ็นเอในหน่วยนาโนกรัมต่อไมโครลิตร หรือไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังสมการที่ 3.1

สมการที่ 3.1

$$\text{ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \text{OD}_{260} \times 50 \text{ ng/ml} \times \text{dilution factor}$$

3.7.4 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์

(inter simple sequence repeat : ISSR)

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์เริ่มต้นจากการคัดเลือกเพื่อหาคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างลำไยเถา และลำไยต้น โดยไพรเมอร์ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. โองการ วนิชาชีวะ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร โดยไพรเมอร์ที่ศึกษาเป็นไพรเมอร์ unanchored ที่เป็นไพรเมอร์ที่มีเฉพาะชุดลำดับเบสซ้ำ ๆ โดยอ้างอิงมาจาก Innark และคณะ (2014) ได้แก่ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

UBC801, UBC809, UBC811, UBC815, UBC817, UBC820, UBC824, UBC825, UBC826 และ UBC827 เป็นต้น โดยมีจำนวนคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัยมี 38 ไพรเมอร์ ซึ่งแสดงรหัส และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แต่ละเส้น ดังตารางที่ 3.2 โดยการคัดเลือกเพื่อหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมนั้น ใช้วิธีการสุ่มตัวอย่างลำไยเถาที่มีลักษณะสดฐานเบื้องต้น และแหล่งที่แตกต่างกันมาสกัดดีเอ็นเอ โดยเจือจางความเข้มข้นดีเอ็นเอให้เท่ากับ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร แล้วนำตัวอย่างดีเอ็นเอทั้งหมดมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย GF-1 AmbiClean Kit (Gel & PCR) (วิธีการเตรียมในภาคผนวก ก) หลังจากนั้น นำเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ทั้ง 38 ไพรเมอร์ ในหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตร ซึ่งใช้อองค์ประกอบต่างๆ ความเข้มข้นของสาร และปริมาตรสาร ในขั้นตอนเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (polymerase chain reaction : PCR) ที่ดัดแปลงมาจากรายงานของ Innark และคณะ (2014) ดังตารางที่ 3.3 นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้เครื่อง Eppendorf Mastercycler ep. Gradient S ที่ใช้เวลา อุณหภูมิ และจำนวนรอบในแต่ละขั้นตอน ดังตารางที่ 3.4 หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ผลิตภัณฑ์ PCR ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับสีย้อม 3X loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ใช้ความเข้มข้นของเจลอะกาโรส 2 เปอร์เซ็นต์ และใช้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นระยะเวลา 45-50 นาที เทียบกับ VC 100 bp DNA ladder จากนั้นนำแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ทั้ง 38 ไพรเมอร์ มาวิเคราะห์ผล โดยไพรเมอร์ที่จะคัดเลือกต้องมีคุณสมบัติ คือ ต้องสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในทุกตัวอย่างแถบดีเอ็นเอที่ได้ต้องมีความคมชัด มีจำนวนแถบไม่มากไม่น้อยจนเกินไป และต้องให้ความแตกต่าง (polymorphic band) ของแถบดีเอ็นเอที่แสดงในแต่ละตัวอย่างได้ เมื่อได้คู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมแล้วจะนำคู่ไพรเมอร์ดังกล่าวมาใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกับตัวอย่างทั้งหมดเพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของลำไยต่อไป

การวิเคราะห์การแปลผลแถบดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่างที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์แต่ละคู่ผ่านการให้คะแนนแบบ binary data matrix โดยให้คะแนนเป็น 1 เมื่อมีการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ และให้คะแนนเป็น 0 เมื่อไม่มีการปรากฏของแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งเดียวกันของแต่ละตัวอย่าง จากนั้นนำคะแนนที่ได้มาคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (Jaccard's similarity coefficients) และนำมาคำนวณค่า polymorphism information content (PIC) ซึ่งเป็นค่าที่ใช้บอกความสามารถในการจำแนกความแตกต่างของไพรเมอร์แต่ละชนิด โดยมีสูตรคำนวณดังสมการที่ 3.2 และวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยวิธี Unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) โดยใช้การวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (Jaccard's similarity coefficient) แสดงผลในรูปแบบเดนโดรแกรม (Dendrogram) โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมการ 3.2

n

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$$

โดย $i = 1$

Pi = ความถี่ของอัลลีล

ตารางที่ 3.2 ชนิดและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ (Innark และคณะ, 2014)

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
UBC801	5'-ATATATATATATATATT-3'	UBC828	5'-TGTGTGTGTGTGTGTGA-3'
UBC807	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGT-3'	UBC834	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGYT-3'
UBC808	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGC-3'	UBC835	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGYC-3'
UBC809	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGG-3'	UBC836	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGYA-3'
UBC810	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAT-3'	UBC842	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAYG-3'
UBC811	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAC-3'	UBC844	5'-CTCTCTCTCTCTCTCTRC-3'
UBC813	5'-CTCTCTCTCTCTCTCTT-3'	UBC847	5'-CACACACACACACACARC-3'
UBC814	5'-CTCTCTCTCTCTCTCTA-3'	UBC849	5'-GTGTGTGTGTGTGTGTYA-3'
UBC815	5'-CTCTCTCTCTCTCTCTG-3'	UBC855	5'-ACACACACACACACACYT-3'
UBC817	5'-CACACACACACACACAA-3'	UBC856	5'-ACACACACACACACACCTA-3'
UBC818	5'-CACACACACACACACAG-3'	UBC861	5'-ACCACCACCACCACCACC-3'
UBC819	5'-GTGTGTGTGTGTGTGTA-3'	UBC862	5'-AGCAGCAGCAGCAGCAGC-3'
UBC820	5'-GTGTGTGTGTGTGTGTC-3'	UBC863	5'-AGTAGTAGTAGTAGTAGT-3'
UBC821	5'-GTGTGTGTGTGTGTGTT-3'	UBC866	5'-CTCCTCCTCCTCCTCCTC-3'
UBC822	5'-TCTCTC TCTCTCTCTCA-3'	UBC868	5'-GAAGAAGAAGAAGAAGAA-3'
UBC824	5'-TCTCTCTCTCTCTCTCG-3'	UBC870	5'-TGCTGCTGCTGCTGCTGC-3'
UBC825	5'-ACACACACACACACACT-3'	UBC873	5'-GACAGACAGACAGACA-3'
UBC826	5'-ACACACACACACACACC-3'	UBC880	5'-GGAGAGGAGAGGAGA-3'
UBC827	5'-ACACACACACACACACG-3'	UBC881	5'-GGGTGGGGTGGGGTG-3'

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.3 องค์ประกอบของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ สำหรับ 1 ตัวอย่าง (Innark และคณะ, 2014)

สารเคมี	ความเข้มข้นเริ่มต้น	ปริมาตร (μ L)	ความเข้มข้นสุดท้าย
Standard Taq	10x	2	1X
dNTPs	1.25 mM	4	250 mM
MgCl ₂	50 mM	0.6	1.5 mM
Primer ISSR	25 pmol	2	50 pmol
Taq DNA polymerase	5000 U/ml	0.2	1 U
DNA	25 ng/ μ l	2	50 ng
Pure water		9.2	
ปริมาตรรวม		20	

ตารางที่ 3.4 เวลา อุณหภูมิ และจำนวนรอบในแต่ละขั้นตอนที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ (Degani และคณะ, 2003)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	จำนวน (รอบ)
Pre-denaturation	95 °C	3 นาที	1 รอบ
Denaturation	95 °C	15 วินาที	
Annealing	55 °C	15 วินาที	40 รอบ
Extension	72 °C	45 วินาที	
Final extension	72 °C	5 นาที	1 รอบ

3.7.5 การสกัดสารและแยกสาร

3.7.5.1 การสกัดสารสกัดหยาบด้วยเมทานอล

การศึกษาการสกัดสาร นำเปลือกผลลำไยเถาและลำไยต้นสายพันธุ์อีตอรวม 3 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วยเปลือกผลลำไยเถา 2 ตัวอย่าง เปรียบเทียบสารสกัดจากเปลือกผลลำไยต้นสายพันธุ์อีตอ 1 ตัวอย่าง โดยรหัส และแหล่งที่มาของตัวอย่างเปลือกผลลำไยแสดงดังตารางที่ 3.5 นำตัวอย่างของเปลือกผลลำไยทั้ง 3 ตัวอย่าง มาล้างน้ำให้สะอาด ตากให้แห้ง แล้วนำไปอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน จนแห้งสนิท ซึ่งวัดได้จากน้ำหนักคงที่ จากนั้นนำเปลือกผลของแต่ละตัวอย่างมาบั่นหยาบด้วยเครื่องบั่น และนำตัวอย่าง 20 กรัม ห่อด้วยผ้าขาวบาง เพื่อนำไปสกัดสารด้วยตัวทำละลายเมทานอลด้วยวิธีการหมักแช่ (maceration) ในขวดแก้วที่ผ่านการเอกซเรย์เป็นเอกซเรย์ที่สแกนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห่อกระดาษเพื่อป้องกันแสง เป็นระยะเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง โดยเปลี่ยนเมทานอลใหม่ทุกๆ 3 วัน จำนวน 2 ครั้ง นำสารละลายที่ได้แต่ละครั้งรวมกันแล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1 โดยใช้กรวยกรองบุชเนอร์ แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบสูญญากาศ (rotary evaporator) จนได้เป็นสารสกัดหยาบเมทานอล นำเก็บไว้ในขวดแก้วที่ป้องกันแสงใน โถดูดความชื้น จนสารสกัดแห้ง และมีน้ำหนักคงที่ โดยสังเกตลักษณะ และสีของสารสกัดเปรียบเทียบกับ รหัสสีจาก RHS mini color chart หลังจากนั้นนำสารสกัดหยาบเมทานอลไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ในด้านการทดสอบพิษเฉียบพลัน การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ทดสอบความเป็นพิษต่อ เซลล์ ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และฤทธิ์การต้านการอักเสบ

ตารางที่ 3.5 รหัสตัวอย่างและแหล่งที่มาของเปลือกผลลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อีดอที่นำมา สกัดสารสกัดหยาบด้วยเมทานอล

ตัวอย่างเปลือกผลลำไย	รหัสตัวอย่าง	แหล่งที่มา
เปลือกผลลำไยเถา ตัวอย่างที่ 1	Thao1	อำเภอบ้านฉาง จังหวัดระยอง
เปลือกผลลำไยเถา ตัวอย่างที่ 2	Thao2	รวบรวมตัวอย่างจากหลากหลายสถานที่
เปลือกผลลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ	Edor	อำเภอบางบาล จังหวัดลพบุรี

3.7.5.2 การสกัดสารด้วยเทคนิค Liquid-liquid extraction

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเมทานอล พบว่าสารสกัดจากเปลือกผล ลำไยเถา มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย และฤทธิ์การยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์สูงใกล้เคียงกับสารสกัด ลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ โดยสารสกัดเมทานอลจากลำไยเถาตัวอย่างที่ 1 (Thao1) และตัวอย่างที่ 2 (Thao2) มีฤทธิ์ต่าง ๆ ที่ไม่แตกต่างกัน ในการศึกษาขั้นต่อไปจึงนำสารสกัดเมทานอลของเปลือกผล ลำไยเถาทั้ง 2 ตัวอย่าง รวมกันเพื่อใช้เป็นตัวแทนของสารสกัดเมทานอลของเปลือกผลลำไยเถา (Thao) เปรียบเทียบกับสารสกัดเมทานอลของลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ โดยนำมาสกัดด้วยเทคนิค Liquid-liquid extraction โดยนำสารสกัดหยาบเมทานอล จำนวน 60 กรัม มาละลายด้วยน้ำกลั่นที่ ผ่านการฆ่าเชื้อ ปั่นกวนด้วยแท่งแม่เหล็กกวนสาร (magnetic bar) บนเครื่องกวนสารละลาย (stirrer) จนกระทั่งสารสกัดทั้งหมดละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติมตัวทำละลายที่มีลำดับความมีขั้วจากขั้ว ต่ำไปยังตัวทำละลายที่มีขั้วสูง มีลำดับดังนี้ คือ เฮกเซน (H) ไดคลอโรมีเทน (D) เอทิลอะซิเตท (E) บิวทานอล (B) และน้ำ (W) ลงไปผสมกับสารสกัดจนละลายเป็นเนื้อเดียวกันในอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร โดยจะใส่สารละลายลงในกรวยแยก เขย่าให้เข้ากัน แล้วทิ้งไว้จนกว่าสารละลายแยกเป็น

2 ชั้น โดยส่วนใหญ่แล้วชั้นบน คือ สารละลายชั้นตัวทำละลาย ส่วนชั้นล่าง คือ สารละลายชั้นน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยกเว้นส่วนของชั้นตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนที่ตัวทำละลายจะอยู่ด้านล่าง ซึ่งในการสกัดจะนำสารสกัดหยาบเมทานอลมาสกัดด้วยตัวทำละลายเดิม 3 ครั้ง แล้วสกัดด้วยตัวทำละลายอื่นต่อไป โดยรวมสารสกัดที่สกัดได้จากตัวทำละลายชนิดเดียวกันมารวมเข้าด้วยกัน แล้วนำสารสกัดแต่ละชั้น มาทำการดึงน้ำออกยกเว้นสารสกัดในชั้นน้ำ โดยการเติมสารละลายน้ำเกลืออิ่มตัวในอัตราส่วน 1 : 1 ใส่ลงในกรวยแยก เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น โดยตัวทำละลายจะอยู่ด้านบน ส่วนของน้ำจะอยู่ด้านล่าง จากนั้นไขเอาเฉพาะสารละลายในชั้นตัวทำละลายมากำจัดน้ำออกอีกครั้ง โดยการเติมผงโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (Sodium sulfate anhydrous) ก่อนจะนำมากรอง และนำไปประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ ซึ่งในส่วนของสารสกัดชั้นน้ำ นำมาทำแห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็ง (Freeze drying) จากนั้นนำสารสกัดชั้นตัวทำละลายต่าง ๆ ที่ได้จากเปลือกผลลำไยเถา รหัสคือ TH, TD, TE, TB และ TW และสารสกัดที่ได้จากเปลือกผลลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ รหัสคือ EH, ED, EE, EB และ EW ดังแผนภาพที่ 3.1 และนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย และฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการสกัดสารโดยเทคนิค Liquid-liquid extraction ของสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถาและลำไยต้นสายพันธุ์อีตอ

3.7.5.3 การแยกสารด้วยเทคนิค Column chromatography

การแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Column chromatography โดยอาศัยคุณสมบัติเฉพาะตัวที่แตกต่างของสารแต่ละชนิด เช่น คุณสมบัติการละลายของสารในตัวทำละลาย หรือคุณสมบัติด้านความมีขั้วหรือขนาดโมเลกุลของสารที่ต่างกัน โดยอาศัยการทำงานของเฟส 2 ชนิด ในการแยกสารคือ เฟสคงที่ (stationary phase) และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งชนิดเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของ Column chromatography มีหลากหลายชนิด เช่น โครมาโตกราฟีแบบดูดซับ (adsorption chromatography) โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange chromatography) หรือ โครมาโตกราฟีแบบแยกส่วน (partition chromatography) แต่ในการแยกสารให้บริสุทธิ์ในครั้งนี้ใช้คุณสมบัติในด้านการแยกขนาดโมเลกุลมาใช้ในการแยกสารด้วยเทคนิค size exclusion chromatography (SEC) โดยมีหลักการคือ สารผสมที่มีขนาดอนุภาคแตกต่างกันจะเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ในเวลาที่แตกต่างกัน เนื่องจากสารที่มีอนุภาคขนาดใหญ่ไม่สามารถเคลื่อนที่ผ่านรูพรุนของเฟสคงที่ได้จะถูกเฟสเคลื่อนที่ชะออกมาจากคอลัมน์ก่อน ส่วนสารที่มีอนุภาคขนาดเล็กสามารถเคลื่อนที่ผ่านรูพรุนของเฟสคงที่ได้ทำให้ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ช้าเร็วขึ้นอยู่กับความแตกต่างกันไป ตามขนาดอนุภาคของสารนั้น ๆ (Carr และคณะ, 1971) โดยในการศึกษาครั้งนี้ใช้เฟสคงที่เป็น Sephadex LH-20 และเฟสเคลื่อนที่เป็นระบบตัวทำละลายที่มีความสามารถในการชะสารในเฟสคงที่ได้ โดยดัดแปลงตามวิธีของ Panyathep และคณะ (2013) โดยมีขั้นตอน คือ เลือกขนาดคอลัมน์แก้วที่ใช้แยกสารให้เหมาะสมกับปริมาณสารสกัด ติดตั้งคอลัมน์ไว้ให้วางยึดกับฐานขาตั้ง (stand) ให้อยู่ในแนวตั้งตรงขนานกับพื้น นำ Sephadex ผสมกับตัวทำละลายเมทานอล บั่นกวนจนเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเทลงในคอลัมน์ที่เตรียมไว้พร้อมกับไขตัวทำละลายออกมาเป็นระยะ ๆ และใช้ลูกยางเคาะบริเวณรอบข้างคอลัมน์ให้ทั่วเพื่อให้เฟสคงที่บรรจุกันแน่น และไม่มีฟองอากาศ เคลือบผิวหน้าของ Sephadex ให้เรียบ เตรียมสารสกัดอย่างน้อย 5 กรัม ละลายด้วยตัวทำละลายเมทานอลจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำสารสกัดใส่ลงไปในคอลัมน์ โดยให้สารละลายสารสกัดกระจายทั่วผิวหน้าของคอลัมน์เป็นระนาบเดียวกัน พร้อมทั้งไขคอลัมน์ให้สารสกัดไหลลงมายังเฟสคงที่ แล้วจึงเติมสารละลายเมทานอลที่เป็นตัวทำละลายที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ลงไปเพื่อชะสารสกัดให้เคลื่อนที่ผ่าน Sephadex ลงมาด้านล่างของคอลัมน์ โดยให้สารละลายในคอลัมน์สูงประมาณ 20 เซนติเมตร หลังจากนั้นเก็บสารสกัดที่ไหลออกจากคอลัมน์ด้วยหลอดทดลอง หลอดละ 10 มิลลิลิตร และนำสารแต่ละหลอดมาตรวจสอบด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin layer chromatography : TLC) ต่อไป

การตรวจสอบด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin layer chromatography : TLC) นำสารสกัดส่วนย่อยแต่ละหลอดที่เก็บได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟี ปริมาตร 1-5 ไมโครลิตร มาสปอตลงบนแผ่น TLC บริเวณ base line ที่มีความสูง 0.8-1 เซนติเมตร ปล่อยให้สารแห้ง และนำไปใส่ใน chamber ที่อิมด้วยตัวทำละลายเมทานอลเพื่อให้ตัวทำละลายชะพาสารสกัดขึ้นไปด้านบนจนถึง front line ที่มีความสูง 0.2-0.4 เซนติเมตร (Li, 2014) จากนั้นนำมาวัดผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร เนื่องจากแผ่น TLC เมื่อกระทบกับแสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร จะสะท้อนแสงเป็นแสงสีเขียว ดังนั้นเมื่อสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สกัดมีความสามารถในการดูดซับแสง UV ได้ที่บริเวณจุดใดจุดหนึ่งบนแผ่น TLC จะเกิดการเรืองแสงของแผ่น TLC เกิดเป็นจุดสีม่วงที่บริเวณนั้น ๆ ทำให้สามารถสังเกตการเคลื่อนของสาร และเห็นจุดของสารที่สปอตได้ และที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร จะเกิดการสะท้อนแสงเป็นสีน้ำเงิน ซึ่งหากสารสกัดมีความสามารถในการเรืองแสงจะเกิดการสะท้อนแสงที่บริเวณจุดใดจุดหนึ่งบนแผ่น TLC เป็นสารเรืองแสงสีต่าง ๆ หลังจากนั้นสเปรย์ด้วย Anisaldehyde reagent ให้ทั่วแผ่น TLC หลังจากนั้นให้ความร้อนบน hot plate และสังเกตแถบที่ปรากฏบนแผ่น TLC เพื่อที่จะรวมสารแต่ละหลอดที่มีลักษณะแบนเหมือนกันเป็นสารสกัดส่วนย่อย (fraction) เดียวกัน หลังจากรวมสารสกัดส่วนย่อยแล้ว จึงนำไปประเหตด้วยตัวทำละลายเพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย และฤทธิ์ต้านอักเสบต่อไป

3.7.6 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเปลือกผลลำไยเถา และลำไยต้น

สายพันธุ์อีตอ

3.7.6.1 การทดสอบสารพิษจากเคมีเบื้องต้น

1. การทดสอบสารกลุ่มอัลคาลอยด์ (Alkaloids)

นำสารสกัด 0.3 กรัม ละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 3 นาที กรองแยกส่วนที่ไม่ละลายออกด้วยกระดาษวอชแมนเบอร์ 1 แบ่งสารละลายใส่หลอดทดลอง 3 หลอด แล้วหยดน้ำยาทดสอบ Dragendorff's reagent, Wagner's reagent และ Mayer's reagent (วิธีการเตรียมสารดังกล่าวตามภาคผนวก ก) ลงในหลอดทดลองหลอดละ 2-3 หยด และเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโคชิซิน (colchicine) โดยการนำโคชิซินบดเป็นผงละเอียด 0.3 กรัม นำมาละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 เปอร์เซ็นต์ นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำมาแบ่งใส่หลอดและทดสอบกับน้ำยาทดสอบปริมาณเท่ากับตัวอย่างสารสกัด โดยสารตัวอย่างเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแล้ว สังเกตผลการทดลองหากเกิดตะกอนแสดงว่ามีสารประกอบประเภทอัลคาลอยด์ (Evans, 2002)

2. การทดสอบสารกลุ่มแทนนิน (Tannin)

นำสารสกัด 0.1 กรัม นำมาละลายด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษวอชแมนเบอร์ 1 นำของเหลวที่ได้จากการกรองมาเติมด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ 3-4 หยด แล้วแบ่งสารละลายออกเป็น 3 หลอด จากนั้นหยดสารทดสอบ Gelatin solution, Gelatin salt solution และสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) 1 เปอร์เซ็นต์ โดยหยดน้ำยาทดสอบ 2-3 หยด เขย่าให้เข้ากัน สังเกตผลการทดลอง เมื่อหยดสาร Gelatin solution

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ Gelatin salt solution ถ้าสารละลายเกิดตะกอนสีขาว และเมื่อหยดสาร $FeCl_3$ แล้วสารละลายเกิดตะกอนสีน้ำเงินเขียว แสดงว่าพบสารประกอบแทนนินและสารประกอบฟีนอลิก แต่หากเมื่อหยดสาร Gelatin solution และ Gelatin salt solution แล้วไม่เกิดตะกอนสีขาว แต่เมื่อหยดสาร $FeCl_3$ แล้วสารละลายเกิดตะกอนสีเขียวดำหรือสีน้ำเงินเขียว แสดงว่าพบเฉพาะสารประกอบฟีนอลิก ไม่พบสารประกอบประเภทแทนนิน โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแทนนิก โดยเตรียมกรดแทนนิก 0.1 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร โดยนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงเติมสารละลาย โซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ และแบ่งให้หลอดทดลองเพื่อทดสอบกับน้ำยาทดสอบเช่นเดียวกับสารสกัด (Evans, 2002; ชีรยุทธ และคณะ, 2563)

3. การทดสอบสารกลุ่มซาโปนิน (Saponin)

3.1 การทดสอบการเกิดฟอง (Froth test)

เตรียมสารสกัดความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำกลั่น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเขย่าให้เกิดฟองนาน 5 นาที หากสารละลายเกิดฟองคงตัวเป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที แสดงว่าพบสารประกอบในกลุ่มซาโปนิน แต่ถ้าเกิดฟองขนาดเล็ก และไม่เกิดความคงตัวแสดงว่าอาจพบสารประเภทโปรตีนหรือกรดบางชนิดในพืช (ชีรยุทธ และคณะ, 2563)

3.2 การทดสอบการแตกตัวของเลือด (Hemolysis test)

เตรียมสารสกัดให้มีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยนำสารสกัด 10 มิลลิกรัม มาละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (phosphate buffer saline: PBS) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร สำหรับการเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดง นำน้ำเลือด 1 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนใสทิ้ง แล้วทำการล้างเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วย PBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง ทำการเจือจางเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วย PBS ให้มีความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร

ทดสอบการแตกตัวของเม็ดเลือดแดง โดยการนำสารสกัดที่เตรียมไว้ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมกับเซลล์เม็ดเลือดแดงความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาแล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วสังเกตผล โดยนำไปเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแอสซีน (Ascein) ที่เตรียมโดยการนำสารมาตรฐานแอสซีนที่บดละเอียด 10 มิลลิกรัม มาละลายในสารละลาย PBS 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาทดสอบการแตกตัวเช่นเดียวกับ

สารสกัด โดยหากเกิดสีแดงของฮีโมโกลบินในสารละลายส่วนใสของสารสกัด แสดงว่าเกิดการแตกตัวของเม็ดเลือดแดง (Santos และคณะ, 1997)

4. การทดสอบสารในกลุ่มคูมาริน (Coumarin)

นำสารสกัด 0.6 กรัม มาละลายด้วยเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษวอทแมนเบอร์ 1 แล้วนำของเหลวที่ได้มาแบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละ 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปทดสอบโดยการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 6 โมลาร์ เขย่าให้เข้ากันและสังเกตผลการทดลอง โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานวาฟาริน (Warfarin) โดยการเตรียมวาฟาริน 0.6 กรัม นำมาละลายด้วยเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำมาทดสอบเช่นเดียวกับสารสกัด โดยถ้าสารละลายของสารสกัดเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้ม แสดงว่าพบสารกลุ่มในคูมาริน (Wagner และ Blatt, 1996)

5. การทดสอบสารในกลุ่มแอนโทไซยานิน (Anthocyanin) และเบตาไซยานิน (Betacyanin)

นำสารสกัด 0.6 กรัม มาละลายด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 นอร์มอล ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษวอทแมนเบอร์ 1 แล้วนำส่วนใสที่เหลือมาแบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละ 1 มิลลิลิตร ทดสอบการเปลี่ยนสี นำไปให้ความร้อน 100 องศาเซลเซียส โดยการต้มน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที แล้วสังเกตผล โดยการเปรียบเทียบกับสารสกัดจากดอกอัญชัน โดยการเตรียมดอกอัญชันบด 2 กรัม ละลายด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 นอร์มอล 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปด้วยกรองกระดาษวอทแมนเบอร์ 1 ทำการทดสอบเช่นเดียวกับสารสกัด โดยถ้าสารสกัดเกิดการเปลี่ยนสีเป็นสีเขียวอมฟ้า แสดงว่ามีสารประกอบในกลุ่มแอนโทไซยานิน และถ้าหากสารละลายเปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองแสดงว่ามีสารประกอบในกลุ่มเบตาไซยานิน (Evans, 2002)

3.7.6.2 การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ดัดแปลงวิธีจาก Armania และคณะ (2013) โดยละลายสารสกัดด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารสกัดปริมาตร 50 ไมโครลิตร และสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (วิธีการเตรียมดังภาคผนวก ก) หยดลงใน 96-well plate และเขย่าให้เข้ากันเบา ๆ บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 6 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วบ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microtiter plate reader ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร เทียบกับชุดควบคุม โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐานเพื่อเทียบผลการทดลองจากกราฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มาตรฐานกรดแกลลิก (ภาคผนวก ข-1) โดยแสดงผลในหน่วย mg Gallic acid equivalent (mgGAE)/g extract โดยทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ

3.7.6.3 การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

1. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ดัดแปลงตามวิธีของ Armania และคณะ (2013) โดยเตรียมสารสกัดที่นำมาละลายด้วย เมทานอลให้มีความเข้มข้น 31.25-500 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ (วิธีการเตรียมดังภาคผนวก ก) หยดลงใน 96-well plate มีปริมาตร รวมของสารละลายทั้งหมด 200 ไมโครลิตร บ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการ ดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microtiter plate reader ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เทียบกับค่าการ ดูดกลืนแสงของ blank (สารละลายเมทานอล) และชุดควบคุม (สารละลายเมทานอลและ DPPH อัตราส่วน 1:1) โดยใช้สารละลาย Trolox เป็นสารมาตรฐาน (Trolox equivalent antioxidant capacity) ทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ แล้วนำค่าเฉลี่ยที่ได้มาคำนวณร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดังสมการ 3.3 จากนั้นนำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 50 (50 % Inhibitory concentration : IC₅₀) ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 8.0 และความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox (ภาคผนวกข-3) โดยแสดงผลในหน่วย mg Trolox Equivalent (mgTE)/g extract

สมการที่ 3.3

$$\% \text{ DPPH radical scavenging activity} = \left[\frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}) - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}})}{(A_{\text{control}} - A_{\text{blank}})} \right] \times 100$$

โดย A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม (สารละลายเมทานอล และ DPPH)

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง (สารตัวอย่าง และ DPPH)

A_{blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของเมทานอล

2. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี 2,2-azino-bis[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid] (ABTS) ดัดแปลงตามวิธีของ Kim และ Uyama (2005) โดยการเตรียมสารละลาย ABTS⁺ ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ด้วยการเติมโปแตสเซียมเปอร์ซัลเฟต ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร (v/v) บ่มในมืด (วิธีการเตรียมดัง ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาอย่างน้อย 16 ชั่วโมง จนได้เป็น ABTS⁺ ที่มีสีฟ้าเขียว โดยก่อน นำมาใช้งานต้องนำ ABTS⁺ เจือจางด้วยเมทานอล ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นาโนเมตร วัดด้วยเครื่อง microtiter plate reader โดยค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.7-0.75 และเตรียมสารสกัดโดยนำมาละลายด้วยเมทานอลให้มีความเข้มข้น 200-1000 มิลลิกรัม จากนั้นผสมสารสกัดกับสารละลาย ABTS⁺ ในอัตราส่วน 1 : 10 โดยปริมาตร ในขวดสีชา และตั้งทิ้งไว้ 6 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยเปรียบเทียบกับ blank (ไม่มีการเติม ABTS⁺) และชุดควบคุม (สารละลายเมทานอลและ ABTS⁺) ซึ่งใช้สารละลายโทรล็อกซ์เป็นสารมาตรฐาน ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย จากนั้นนำค่ามาคำนวณ ดังสมการ 3.4 เพื่อหาร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ ABTS⁺ ของสารสกัด วิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้ร้อยละ 50 (50 % Inhibitory concentration : IC₅₀) ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 8.0 และความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS⁺ ของสารสกัดเทียบกับสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ (ภาคผนวกข-5) และแสดงผลในหน่วย mg Trolox Equivalent (mgTE)/g extract

สมการที่ 3.4

$$\% \text{ ABTS radical scavenging activity} = \left[\frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}) - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}})}{(A_{\text{control}} - A_{\text{blank}})} \right] \times 100$$

โดย A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม (สารละลายเมทานอล และ ABTS⁺)

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง (สารตัวอย่าง และ ABTS⁺)

A_{blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของเมทานอล

3. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) ดัดแปลงวิธีจาก Benzie และ Strain (1996) โดยเตรียมสารละลาย FRAP reagent ด้วยการผสมสารละลาย acetate buffer ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ pH 3.6 : สารละลาย TPTZ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ในกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ : สารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วน 10 : 1 : 1 (วิธีการเตรียมดังภาคผนวก ก) โดยเตรียมสารใหม่ทุกครั้งก่อนใช้งาน จากนั้นนำไปทดสอบโดยการเตรียมสารสกัดที่ละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม นำไปผสมกับสารละลาย FRAP reagent หยอดลงใน 96-well plate มีปริมาตรรวมของสารละลายทั้งหมด 200 ไมโครลิตร นำบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microtiter plate reader แล้วทำการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแอสคอร์บิก (ภาคผนวก ข-7) โดยการทำการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ และเทียบความสามารถในการรีดิวซ์ Fe³⁺-TPTZ โดยแสดงผลในหน่วย mg Ascorbic Aid Equivalent (mgAAE)/g extract

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7.6.4 การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี paper disk diffusion (CLSI, 2012) มีขั้นตอนคือ เตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบโดยการนำมา streak บนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient-agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อเจริญเป็นโคโลนีเดี่ยว เมื่อต้องการใช้แบคทีเรียในการทดสอบจะเตรียมหัวเชื้อ *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Kocuria rhizophila*, *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis* โดยการใช้ห้วงเปียเชื้อเชื้อโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วให้เชื้อมีการเจริญจนมีอายุประมาณ 18-24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อที่ได้ลงใน Normal saline solution ปรับความขุ่นให้เท่ากับ McFarland 0.5 หรือวัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.08-0.13 แต่หากเป็นเชื้อแบคทีเรีย *Propionibacterium acnes* จะเตรียมเชื้อที่จะใช้ในการทดสอบโดยการเขี่ยเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion agar (BHI Agar) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อต้องการใช้แบคทีเรียในการทดสอบ ทำการเตรียมหัวเชื้อโดยการใช้ห้วงเปียเชื้อเชื้อโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI Broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วให้เชื้อมีการเจริญจนมีอายุประมาณ 48 ชั่วโมง แล้วนำไปปรับความขุ่นให้มีค่าการดูดกลืนแสงดังที่กล่าวมาข้างต้น จากนั้นเตรียมสารสกัดจากเปลือกผลลำไยที่จะใช้การทดสอบ เตรียมแผ่นดิสก์โดยใช้กระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1 เจาะให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร นำไปผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วหยดสารสกัดที่ต้องการทดสอบที่ทำการละลายด้วยเมทานอลลงในแผ่นดิสก์ โดยให้สารสกัดมีความเข้มข้น 1-5 มิลลิกรัมต่อดิสก์ และใช้ชุดควบคุมเชิงบวก คือ เจนตามัยซิน (Gentamicin) ที่ใช้ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ และชุดควบคุมเชิงลบ คือ เมทานอล

จากนั้นทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยนำไม้พันสำลีที่ปลอดเชื้อจุ่มลงในเชื้อที่เตรียมไว้ บิดพอหมาด กวาดเชื้อ (swab) ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar (MHA) และอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion agar (BHI Agar) ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารแห้งประมาณ 3-5 นาที แล้วนำแผ่นดิสก์ที่เตรียมไว้วางลงบนผิวหน้าอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง (ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อที่ใช้การทดสอบ) ทำการบันทึกผลการฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยวัดบริเวณยับยั้งเชื้อ (Inhibition zone) ที่เกิดขึ้นรอบแผ่นดิสก์ด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์ โดยทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ รายงานผลเป็นค่าเฉลี่ยในหน่วยมิลลิเมตร

3.7.6.5 การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจะใช้วิธี DOPA-chrome ดัดแปลงวิธี จาก Saewan และคณะ (2011) โดยการทดลองแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มการทดลอง คือ กลุ่ม A, B, C และ D โดยแต่ละกลุ่มมีองค์ประกอบ คือ กลุ่ม (A) กลุ่มควบคุม ประกอบด้วย phosphate buffer pH 6.8 และเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีความเข้มข้น 25 ยูนิตต่อมิลลิลิตร กลุ่ม (B) คือ กลุ่ม Blank เป็นตัวควบคุมประกอบด้วย phosphate buffer pH 6.8 กลุ่ม (C) คือ กลุ่มทดลอง ประกอบด้วย phosphate buffer pH 6.8 เอนไซม์ไทโรซิเนส ความเข้มข้น 25 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และสารสกัด กลุ่ม (D) คือ Blank เป็นชุดทดลอง ประกอบด้วย phosphate buffer pH 6.8 และสารสกัด โดยองค์ประกอบของสารเคมี และปริมาตรของแต่ละกลุ่มการทดลอง แสดงดังตารางที่ 3.6 เมื่อเติมแต่ละองค์ประกอบครบตามตารางแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติม L-DOPA ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ลงไปในแต่ละกลุ่มการทดลองปริมาตร 40 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microtiter plate reader ที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร สามารถคำนวณค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ดังสมการที่ 3.5 ทำการทดลองอย่างน้อย 6 ซ้ำ โดยใช้สารมาตรฐานเป็นกรดแอสคอร์บิกแสดงผลในหน่วย mgAscorbic acid equivalent (mgAAE)/g extract (ภาคผนวก ข-9) และวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 8.0

สมการที่ 3.5

$$\% \text{ Tyrosinase inhibition} = \left[\frac{(A-B) - (C-D)}{(A-B)} \right] \times 100$$

โดยที่ค่า A, B, C และ D แสดงในสมการ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตรของจากกลุ่มการทดลอง A, B, C และ D ที่วัดได้

ตารางที่ 3.6 องค์ประกอบและปริมาตรของสารที่ใช้ในแต่ละกลุ่มการทดลองของการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี DOPA-chrome

กลุ่มการทดลอง	ปริมาตร (ไมโครลิตร)		
	Phosphate buffer (pH 6.8)	เอนไซม์ไทโรซิเนส 25 ยูนิตต่อมิลลิลิตร	สารสกัด
(A) กลุ่มควบคุม	140	20	-
(B) กลุ่ม Blank	160	-	-
(C) กลุ่มทดลอง	80	20	60
(D) กลุ่ม Blank ชุดทดลอง	100	-	60

3.7.6.6 การศึกษาฤทธิ์ความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์

การศึกษาฤทธิ์ความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ (nitric oxide scavenging assay) : NOA เป็นวิธีการตรวจวัดความสามารถในการยับยั้งปริมาณไนตริกออกไซด์จากสารสกัดตัดแปลงจากวิธีของ Aktas และคณะ (2013) โดยใช้สารละลาย sodium nitroprusside (SNP) ที่มีความสามารถทำปฏิกิริยากับออกซิเจนเกิดเป็นไนไตรท์ ซึ่งสามารถตรวจวัดปริมาณไนตริกออกไซด์ได้ในสารละลาย Griess reagent สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบจะมีความสามารถลดปริมาณไนไตรท์ได้ วิธีการทดสอบโดยนำชุดควบคุม (A) ใส่ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.4) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ในส่วนของชุดทดลอง (B) ใช้สารสกัดที่ความเข้มข้น 25-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ blank ของชุดทดลอง (C) ใส่สารสกัดปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate เติมสารละลาย sodium nitroprusside 10 มิลลิโมลาร์ (ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในชุดควบคุม (A) และชุดทดลอง (B) ดังตารางที่ 3.7 แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที และเติมสารละลาย Griess reagent ลงไปหลุมละ 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มเป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 546 นาโนเมตร โดยใช้กรวดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐาน ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ แล้วนำไปคำนวณค่าร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์ (% nitric oxide inhibition) (ภาคผนวกข-11) ดังสมการที่ 3.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.7 องค์ประกอบและปริมาตรของสารที่ใช้ในแต่ละชุดการทดลองของการศึกษาฤทธิ์การต้านอักเสบ

ชุดควบคุม/สารสกัด	SNP 10 mM	สารสกัด	DI water/PBS (pH 7.4)	Griess Reagent
(A) ชุดควบคุม	50	-	50	100
(B) ชุดทดลอง	50	50	-	100
(C) Blank ชุดทดลอง	-	50	50	100

สมการที่ 3.6

$$\% \text{ nitric oxide inhibition} = \frac{A - (B - C)}{A} \times 100$$

โดย A คือ ชุดควบคุม ค่าการดูดกลืนแสงของ SNP ที่ไม่เติมสารสกัด

B คือ ชุดทดลอง ค่าการดูดกลืนแสงของ SNP ที่เติมสารสกัด

C คือ blank ชุดทดลอง ค่าการดูดกลืนแสงสารสกัดที่ไม่เติม SNP

3.7.6.7 การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ในเซลล์ชนิดแมคโครฟาจ (RAW 264.7)

การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ดัดแปลงวิธีจาก Srisook และคณะ (2011) โดยเฉพาะเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ (RAW 264.7) ในอาหาร RPMI1640 เตรียมความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยทำการทดสอบ และเพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงแบบ 96 well plate นำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะติดกับจานเพาะเลี้ยง

หลังจากนั้นเตรียมสารสกัดจากเปลือกผลลำไยเถาที่ละลายด้วย DMSO ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเข้มข้นของ DMSO ต้องไม่เกิน 2 เปอร์เซ็นต์ เพื่อป้องกันความเป็นพิษต่อเซลล์ พร้อมกับเติม Lipopolysaccharide (LPS) ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ของชุดควบคุม (A) และชุดสารสกัด (B) เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดสภาวะการอักเสบ เปรียบเทียบกับ blank ตัวควบคุมที่ไม่ใส่ LPS หลังจากนั้นบ่มเซลล์ต่อไปอีก 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ดูอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากจานเพาะเลี้ยง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ 100 ไมโครลิตร พร้อมกับเติมสารละลาย Indomethacin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ใช้เป็นชุดควบคุมเชิงบวก (C) และ blank ของชุดควบคุมเชิงบวก (D) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ส่วนในชุดทดลอง และชุด blank สารสกัด จะทำการเติมสารสกัด

ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หลังจากนั้นผสมให้เข้ากัน และเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง และดูส่วนใสของสารสกัดใส่ใน 96 well plate อันใหม่ และเติม Griess reagent โดยใช้อัตราส่วน 1 : 1 ของส่วนสารสกัดและ Griess reagent นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงประเมินผลการเปลี่ยนแปลงโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microtiter plate reader ที่ความยาวคลื่น 542 นาโนเมตร หลังจากนั้นคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของสารสกัด โดยเทียบกับเซลล์ควบคุมที่เหนี่ยวนำด้วย LPS เพียงอย่างเดียว และใช้สาร Indomethacin เป็นชุดควบคุมเชิงบวก ในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ มีวิธีการคำนวณดังสมการที่ 3.6 และวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 8.0

สมการที่ 3.6

$$\% \text{ nitric oxide inhibition} = \frac{A - (B - C)}{A} \times 100$$

โดย A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุมที่เติมสารละลาย LPS เพียงอย่างเดียว

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดลองที่เติมสารสกัดและ LPS

C คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ blank ชุดทดลองที่ไม่เติม LPS

3.7.6.8 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์จะใช้วิธี MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ดัดแปลงตามวิธีของ Mahavorasirikul และคณะ (2010) โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ผิวหนังของหนู (Mouse fibroblast cell line) ชนิด L929 เซลล์เคอราติโนไซต์มนุษย์ (Human Keratinocyte Cell) ชนิด HaCaT และเซลล์เม็ดเลือดขาวแมคโครฟาจ (RAW 264.7) ในฟลาสเพาะเลี้ยงให้เซลล์มีการเจริญเต็มที่ โดยเซลล์ L929 และ HaCaT จะมีการเก็บเกี่ยวเซลล์ด้วยการ Trypsinization นำเซลล์มานับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ผ่านกล้องจุลทรรศน์ หลังจากนั้นเจือจางเซลล์ด้วยอาหาร RPMI1640 (Roswell park memorial institute 1640) ที่เสริมด้วย FBS 5 เปอร์เซ็นต์ ให้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1.5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วเพาะเลี้ยงเซลล์ลงใน 96-well plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ มาเตรียม Stock สารสกัด โดยนำสารสกัดมาละลายด้วย DMSO ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และนำมาเจือจางด้วยอาหาร RPMI ปริมาตร 9 มิลลิลิตร นำสารสกัดที่ได้ไปกรองด้วยแผ่นกรองขนาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปทูน 0.45 ไมโครเมตร ก่อนจะนำมาเจือจางด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เสริมด้วย FBS 5 เปอร์เซ็นต์ ให้ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดที่ต้องการ

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดทำได้โดยใช้สารสกัดความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไปในหลุมของเซลล์ที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งใช้ไมโทมายซินซีเป็นตัวควบคุมเชิงบวก และใช้ DMSO เป็นตัวควบคุมเชิงลบ โดยมีความเข้มข้นหลังลงหลุมไม่เกิน 2 เปอร์เซ็นต์ บ่มเซลล์กับสารสกัดหยาบเมทานอลจากเปลือกผลลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ ในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา เติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม (วิธีการเตรียมในภาคผนวก ก) และบ่มต่อเป็นระยะเวลาอีก 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดสารละลายออกในแต่ละหลุมแล้วเติมสารละลาย DMSO ในอัตราส่วน 1 : 1 ของ DMSO ต่อสารละลายสารสกัด ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม เพื่อละลายผลึก formazan นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microtiter plate reader แล้วคำนวณร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) ของเซลล์ต่าง ๆ หลังจากทดสอบด้วยสารสกัดจากเปลือกผลลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ ดังสมการที่ 3.7

สมการที่ 3.7

$$\% \text{ Cell Viability} = \left[\frac{(A \text{ treated})}{(A \text{ control})} \right] \times 100$$

โดย A_{control} = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม (เซลล์ และอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์)

A_{treated} = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมหลังจากเติมสารสกัด (เซลล์ และสารสกัด)

โดย A และ B จะต้องหักลบค่าการดูดกลืนแสงของ blank ออกก่อนนำมาใช้คำนวณในสมการ

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการศึกษาคุณภาพผลเบื้องต้นของลำไยเถาและลำไยต้น

ลำไยเถาที่จัดอยู่ในสปีชีส์เดียวกับลำไยต้น แต่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างจากลำไยต้นอย่างชัดเจนหลายประการ เช่น ลำไยเถาเป็นไม้พุ่มเลื้อย ใบย่อยมีลักษณะการเรียงตัวเป็นแบบขนนกปลายใบมน มีลักษณะใบเล็กกว่าลำไยต้น ผลเป็นทรงกลมหรือแป้น ผิวเปลือกของผลบาง ผลมีสีตั้งแต่สีชมพูเข้มจนถึงสีเหลืองอ่อนในบางตัวอย่าง มีผลและเมล็ดขนาดใหญ่ ดังภาพ 4.1 ก แต่มีลักษณะเนื้อผลบาง ฉ่ำน้ำ มีความนิ่มของเนื้อมาก และมีกลิ่นของเนื้อผลหอมหวานมาก ซึ่งลำไยต้นมีลักษณะของผลเป็นทรงกลม มีสีเปลือกผลต่างจากลำไยเถาเนื่องจากมีเปลือกผลเป็นสีเหลืองน้ำตาล มีเมล็ดใหญ่ และเนื้อผลหนา และเนื้อผลแน่นกรอบ ดังภาพที่ 4.1 ข



ภาพที่ 4.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของดอกและผล (ก) ของลำไยเถา และ (ข) ลำไยต้น

ในการศึกษาคุณภาพผลในลักษณะที่เกี่ยวข้องทางเศรษฐกิจ เช่น น้ำหนักผลและเมล็ด ความกว้าง ความสูงของผลและเมล็ด ความหนาของเนื้อผล ความหวาน และลักษณะรูปทรงของผลและเมล็ด จากตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 27 ตัวอย่าง ที่เก็บมาจากสถานที่ และสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน โดยเปรียบเทียบกับลำไยเถาจำนวน 23 ตัวอย่าง กับลำไยต้น จำนวน 4 ตัวอย่าง แสดงข้อมูลคุณภาพผลลักษณะต่าง ๆ ของแต่ละตัวอย่างดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ข้อมูลคุณภาพผลเบื้องต้นของลำไยเถาและลำไยต้น จำนวน 27 ตัวอย่าง

ตัวอย่าง		องค์ประกอบของผล									
		ผล				เมล็ด			เนื้อ		
รหัส	สถานที่	น้ำหนัก (g)	ความกว้าง (cm)	ความสูง (cm)	ทรง ผล	น้ำหนัก (g)	ความกว้าง (cm)	ความสูง (cm)	ทรง เมล็ด	ความหนา (cm)	ความหวาน (°Brix)
DLO-01	เขตหนองจอก จ.กรุงเทพฯ	20.44±5.39	3.38±0.33	3.05±0.34	แป้น	2.80±1.65	1.53±0.44	1.83±0.42	แป้น	0.85±0.12	22.00
DLO-03	อ.ลำลูกกา จ.ปทุมธานี	9.71±0.56	2.65±0.06	2.49±0.07	แป้น	1.76±0.18	1.37±0.12	1.75±0.08	แป้น	0.41±0.02	24.40
DLO-05	อ.ลำลูกกา จ.ปทุมธานี	17.02±1.03	2.90±0.09	2.82±0.06	กลม	3.77±0.20	1.79±0.08	2.00±0.05	แป้น	0.55±0.06	22.40
DLO-06	อ.ลำลูกกา จ.ปทุมธานี	20.58±1.27	3.10±0.06	2.73±0.09	แป้น	4.24±0.34	1.83±0.09	2.09±0.08	แป้น	0.61±0.08	22.00
DLO-07	อ.บ้านฉาง จ.ระยอง	12.25±1.04	2.84±0.12	2.36±0.09	แป้น	3.91±0.57	2.84±0.13	2.36±0.09	แป้น	0.29±0.05	27.00
DLO-08	อ.บ้านฉาง จ.ระยอง	20.41±1.54	3.02±0.06	3.43±0.19	แป้น	4.48±0.34	1.85±0.05	2.18±0.06	แป้น	0.64±0.05	28.00
DLO-09	อ.บ้านฉาง จ.ระยอง	9.93±0.86	2.61±0.07	2.37±0.08	แป้น	3.49±0.31	1.78±0.06	1.77±0.32	กลม	0.12±0.03	22.00
DLO-10	อ.บ้านฉาง จ.ระยอง	12.36±0.71	2.37±0.13	2.81±0.08	แป้น	3.49±0.13	1.81±0.07	1.84±0.02	กลม	0.29±0.04	24.20
DLO-11	อ.บ้านฉาง จ.ระยอง	14.02±1.51	2.61±0.05	2.92±0.13	แป้น	3.52±0.22	1.87±0.04	1.82±0.04	กลม	0.42±0.07	19.20
DLO-12	อ.ละมุง จ.ชลบุรี	10.29±0.99	2.57±0.33	2.43±0.08	แป้น	3.74±0.39	1.87±0.09	1.98±0.07	แป้น	0.21±0.05	22.00
DLO-13	อ.ละมุง จ.ชลบุรี	17.06±2.11	3.14±0.12	2.86±0.13	แป้น	3.64±0.43	1.75±0.11	1.98±0.13	แป้น	0.37±0.06	23.80
DLO-14	อ.บางละมุง จ.ชลบุรี	8.54±0.93	2.55±0.13	2.28±0.93	แป้น	0.46±0.26	0.78±0.13	1.05±0.13	แป้น	0.59±0.11	25.60
DLO-15	อ.เมือง จ.ชลบุรี	6.70±0.39	4.43± 0.17	3.75± 0.58	แป้น	2.56±0.25	2.78 ±0.06	2.91±0.05	แป้น	0.28±0.04	23.40
DLO-16	อ.เมือง จ.ชลบุรี	8.01±1.59	2.38±0.13	2.29±0.09	แป้น	3.53±0.40	1.83±0.08	1.94±0.09	แป้น	0.16±0.06	16.00

หมายเหตุ ตัวอย่าง DLO-01 ถึง DLO-36 คือ ลำไยเถา และตัวอย่าง DLL-37 ถึง DLL-40 คือ ลำไยต้น
ค่าที่วัดได้จากตารางแสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=10)

ตารางที่ 4.1 ข้อมูลคุณภาพผลเบ้องต้นของลำไยเถา และลำไยต้น จำนวน 27 ตัวอย่าง (ต่อ)

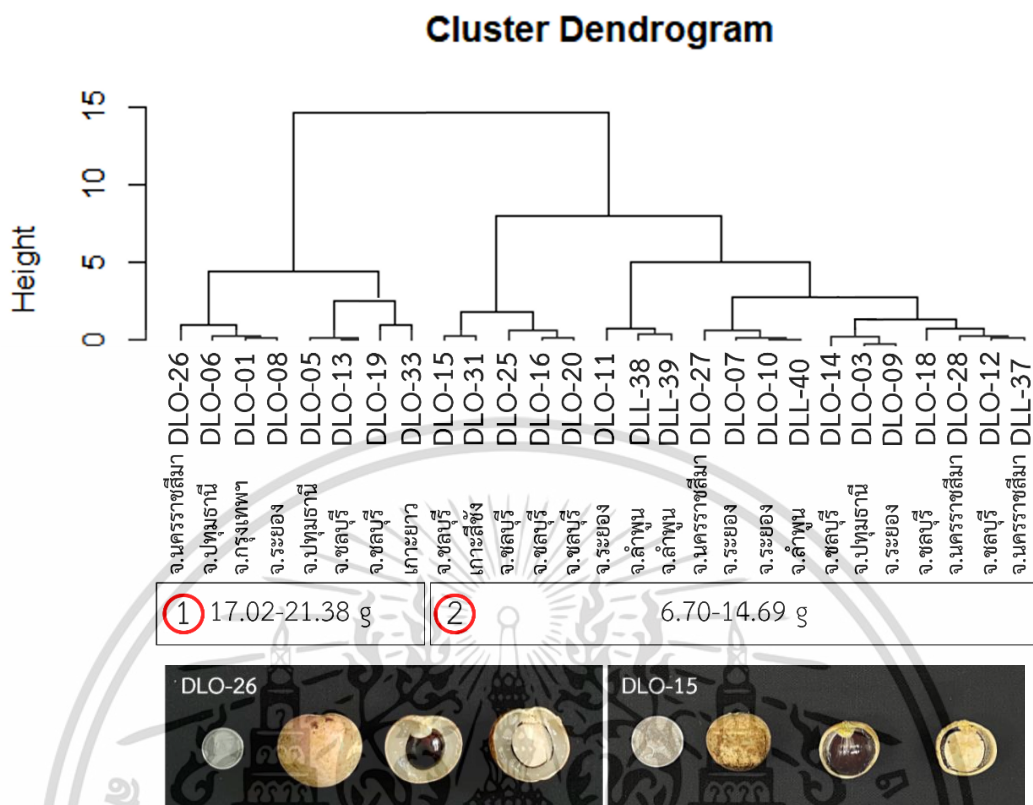
ตัวอย่าง		องค์ประกอบผล									
		ผล				เมล็ด			เนื้อ		
รหัส	สถานที่	น้ำหนัก (g)	ความกว้าง (cm)	ความสูง (cm)	ทรง ผล	น้ำหนัก (g)	ความกว้าง (cm)	ความสูง (cm)	ทรง เมล็ด	ความหนา (cm)	ความหวาน °Brix
DLO-18	อ.เมือง จ.ชลบุรี	10.97±1.69	2.60±0.22	2.53±0.09	แป้น	4.05±0.29	1.82±0.08	2.01±0.06	แป้น	0.22±0.03	15.40
DLO-19	อ.สัตหีบ จ.ชลบุรี	19.44±1.84	3.36±0.15	3.02±0.08	แป้น	3.31±0.45	1.57±0.39	1.99±0.11	แป้น	0.53±0.06	24.20
DLO-20	อ.สัตหีบ จ.ชลบุรี	7.97±0.77	2.41±0.09	2.30±0.10	แป้น	2.76±0.33	1.59±0.06	1.84±0.08	แป้น	0.37±0.07	19.00
DLO-25	อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี	8.50±1.53	2.56±0.18	2.20±0.12	แป้น	1.85±0.35	1.30±0.08	1.43±0.10	แป้น	0.35±0.11	18.00
DLO-26	อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา	21.38±2.73	3.47±0.14	3.07±0.13	แป้น	3.76±0.39	1.74±0.12	2.06±0.05	แป้น	0.45±0.10	22.00
DLO-27	อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา	11.82±4.67	3.02±0.15	2.76±0.15	แป้น	3.63±0.26	1.72±0.09	2.03±0.06	แป้น	0.29±0.02	26.00
DLO-28	อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา	10.53±1.06	2.60±0.13	2.28±0.10	แป้น	2.60±0.29	1.65±0.07	1.59±0.07	แป้น	0.25±0.07	17.20
DLO-31	เกาะสีชัง	6.89±0.94	2.21±0.05	2.03±0.07	แป้น	2.54±0.17	1.52±0.07	1.68±0.06	แป้น	0.11±0.03	22.00
DLO-33	เกาะยาวน้อย	18.53±1.18	3.41±0.18	3.38±0.17	แป้น	3.89±0.17	1.55±0.24	1.22±0.14	แป้น	0.55±0.06	22.00
DLL-37	อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา	10.33±1.54	2.62±0.17	2.25±0.13	แป้น	3.04±1.39	1.53±0.32	1.46±0.45	แป้น	0.29±0.03	22.00
DLL-38	อ.สันทราย จ.เชียงใหม่	14.43±1.70	3.12±0.18	2.75±0.08	แป้น	1.51±0.18	1.36±0.06	1.31±0.11	กลม	0.74±0.06	16.60
DLL-39	อ.เมือง จ.ลำพูน	14.69±0.83	3.11±0.08	2.71±0.08	แป้น	1.41±0.17	1.36±0.06	1.33±0.06	กลม	0.62±0.02	19.20
DLL-40	อ.ป่าซาง จ.ลำพูน	12.35±0.82	2.95±0.09	2.58±0.04	แป้น	1.81±0.11	1.45±0.08	1.40±0.08	กลม	0.53±0.02	18.00

หมายเหตุ ตัวอย่าง DLO-01 ถึง DLO-36 คือ ลำไยเถา และตัวอย่าง DLL-37 ถึง DLL-40 คือ ลำไยต้น
ค่าที่วัดได้จากตารางแสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=10)

จากผลการศึกษาคุณภาพผลของลำไยเถาทั้ง 23 ตัวอย่าง พบว่ามีค่าน้ำหนักผลอยู่ในช่วง 6.70-21.38 กรัม ความกว้างผลอยู่ในช่วง 2.21-4.43 เซนติเมตร ความสูงของผลอยู่ในช่วง 2.03-3.38 เซนติเมตร น้ำหนักเมล็ดอยู่ในช่วง 0.46-3.89 กรัม ความกว้างเมล็ดอยู่ในช่วง 0.78-2.84 เซนติเมตร ความสูงของเมล็ดอยู่ในช่วง 1.05-2.91 เซนติเมตร ความหนาเนื้ออยู่ในช่วง 0.11-0.85 และค่าความหวานอยู่ในช่วง 15.40-28.00 °Brix ซึ่งจากการวิเคราะห์รูปทรงของผล และเมล็ดของลำไยเถาเมื่อคำนวณอัตราส่วนระหว่างความกว้าง ความสูงของผล และเมล็ดพบว่ามีความมากกว่า 1.00 หมายถึงด้านกว้างมีค่ามากกว่าด้านสูงจึงทำให้มีลักษณะของผลและเมล็ดเป็นทรงแป้น

โดยตัวอย่างลำไยต้นในการศึกษาลักษณะคุณภาพผล มีจำนวน 4 ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่างลำไยเปลือกผลสีขาวที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์ 1 ตัวอย่าง คือ DLL-37 และตัวอย่างลำไยต้นสายพันธุ์อีตอ 3 ตัวอย่าง คือ DLL-38 ถึง DLL-40 ซึ่งในศึกษาคุณภาพผลของลำไยต้นทั้ง 4 ตัวอย่าง มีค่าน้ำหนักผลอยู่ในช่วง 10.33-14.69 กรัม ความกว้างผลอยู่ในช่วง 2.62-3.12 เซนติเมตร ความสูงของผลอยู่ในช่วง 2.25-2.75 เซนติเมตร น้ำหนักเมล็ดอยู่ในช่วง 1.41-3.04 กรัม ความกว้างเมล็ดอยู่ในช่วง 1.36-1.53 เซนติเมตร ความสูงของเมล็ดอยู่ในช่วง 1.31-1.46 เซนติเมตร ความหนาเนื้ออยู่ในช่วง 0.29-0.74 และค่าความหวานอยู่ในช่วง 16-22 °Brix ซึ่งจากการวิเคราะห์ผลรูปทรงของผลและเมล็ดของลำไยต้นพบว่า ลำไยต้นในทุกตัวอย่างมีลักษณะผลเป็นทรงแป้น มีลักษณะเมล็ดส่วนใหญ่เป็นทรงกลมเนื่องจากเมื่อคำนวณอัตราส่วนระหว่างความกว้าง ความสูงของเมล็ดพบว่ามีความน้อยกว่าหรือเท่ากับ 1.00 หมายถึง ด้านกว้างมีค่าเท่ากับด้านสูง ยกเว้นตัวอย่าง DLL-37 ที่มีลักษณะเมล็ดเป็นทรงแป้น

ในการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของน้ำหนักผลลำไยเถาและลำไยต้นด้วยโปรแกรม R studio พบว่าสามารถแบ่งได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่หนึ่งมีลักษณะผลเล็ก มีค่าน้ำหนักอยู่ในช่วง 17.02-21.38 กรัม ดังภาพที่ 4.2 มีตัวอย่างลำไยต้นทั้ง 4 ตัวอย่าง และมีลำไยเถาส่วนหนึ่งที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ และกลุ่มที่สอง มีลักษณะผลใหญ่ มีค่าน้ำหนักอยู่ในช่วง 6.70-14.69 กรัม ส่วนใหญ่เป็นตัวอย่างลำไยเถา และมีตัวอย่างลำไยต้น DLL-37 1 ตัวอย่างรวมอยู่ด้วย ยกตัวอย่างรูปลำไยเถาที่จัดอยู่ในกลุ่มแรก คือ DLO-26 จากอำเภopakช่อง จังหวัดนครราชสีมา และตัวอย่างลำไยเถาในกลุ่มที่สอง คือ DLO-15 จากอำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี โดยสามารถคิดค่าเฉลี่ยความสัมพันธ์การจัดกลุ่มของน้ำหนักผล

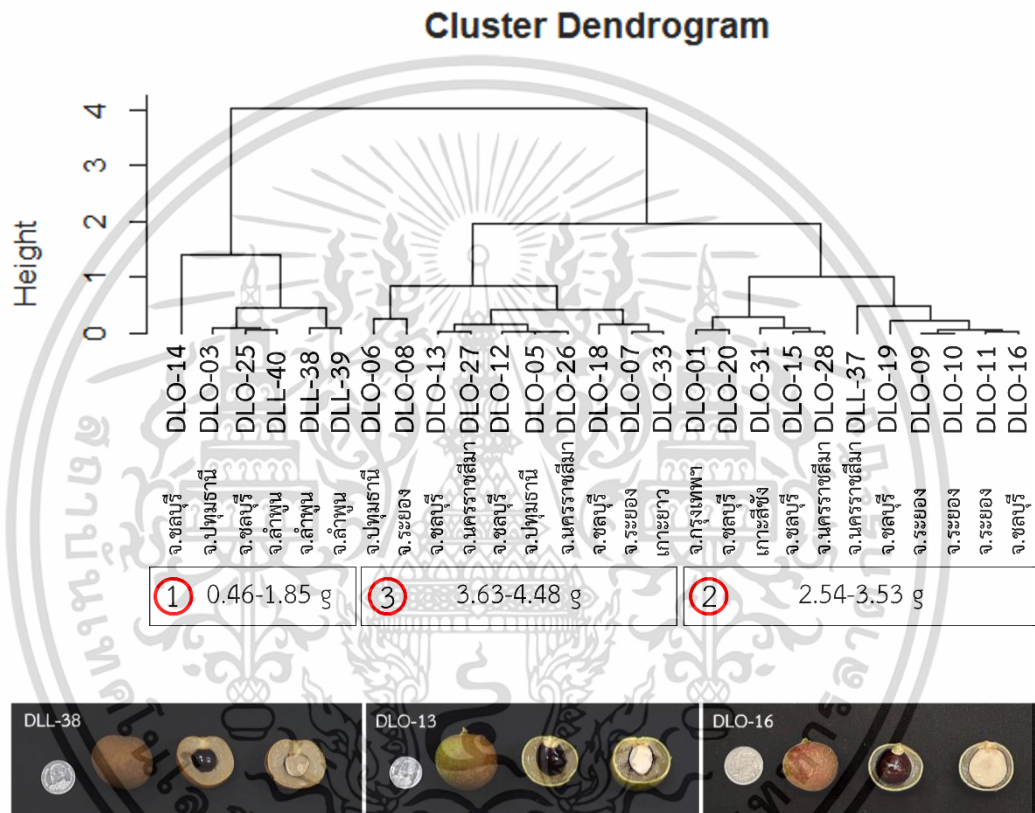


ภาพที่ 4.2 การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของน้ำหนักผลลำไยเถาและลำไยต้นด้วยโปรแกรม R studio

จากภาพที่ 4.2 แสดงความสัมพันธ์ของน้ำหนักผลลำไยเถา และลำไยต้นด้วยโปรแกรม R studio สามารถแบ่งกลุ่มตามลักษณะน้ำหนักผลพบว่าแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ พบว่าถึงแม้ว่าจะแบ่งความแตกต่างของน้ำหนักผลของลำไยเถา และลำไยต้นจากกันได้ในระดับหนึ่ง แต่ตัวอย่างผลที่เก็บมาจากแหล่งเดียวกันพบว่ามีลักษณะน้ำหนักผลอยู่ในช่วงใกล้เคียงกัน และถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ยกตัวอย่างเช่น DLO-05 และ DLO-06 จากจังหวัดปทุมธานี ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของผลที่มีลักษณะผลใหญ่ มีน้ำหนักผลมาก และตัวอย่าง DLO-07, DLO-09 และ DLO-10 จากจังหวัดระยอง ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของตัวอย่างที่มีลักษณะผลเล็ก มีน้ำหนักผลน้อย

ในการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของน้ำหนักเมล็ดลำไยเถาและลำไยต้น พบว่าน้ำหนักเมล็ดของลำไยเถาส่วนใหญ่ มีลักษณะเมล็ดใหญ่ มีน้ำหนักมาก ส่วนน้ำหนักเมล็ดของลำไยต้น มีลักษณะเมล็ดเล็ก น้ำหนักเบา จากการวิเคราะห์ผลสามารถจัดกลุ่มได้ 2 กลุ่มหลัก คือ กลุ่มที่หนึ่งมีน้ำหนักอยู่ในช่วง 0.46-1.85 ดังภาพที่ 4.3 ประกอบไปด้วยตัวอย่างลำไยต้นสายพันธุ์อีดอทั้ง 3 ตัวอย่าง (DLL-38 ถึง DLL-40) และมีตัวอย่างลำไยเถา DLO-03, DLO-14 และ DLO-25 จากอำเภอลำลูกกา อำเภอบางละมุง และอำเภอสรีราชา กลุ่มที่สองแบ่งสองกลุ่มย่อย คือ กลุ่มของน้ำหนักของเมล็ดขนาดเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลาง และขนาดใหญ่ โดยแบ่งตามช่วงค่าน้ำหนักพบว่า เมล็ดขนาดกลางมีน้ำหนักอยู่ในช่วง 2.54-3.53 กรัม และน้ำหนักเมล็ดขนาดใหญ่มีน้ำหนักอยู่ในช่วง 3.63-4.48 กรัม ยกตัวอย่างรูปลำไยที่จัดอยู่ในกลุ่มเมล็ดขนาดเล็ก คือ ลำไยต้น DLL-38 ส่วนลำไยเถาที่จัดอยู่ในกลุ่มของเมล็ดขนาดกลาง คือ DLO-16 จากอำเภอมือง และลำไยเถาที่จัดอยู่ในกลุ่มของเมล็ดขนาดใหญ่ คือ DLO-13 จากอำเภอบางละมุง ดังแสดงความสัมพันธ์การจัดกลุ่มของน้ำหนักเมล็ดดังภาพที่ 4.3

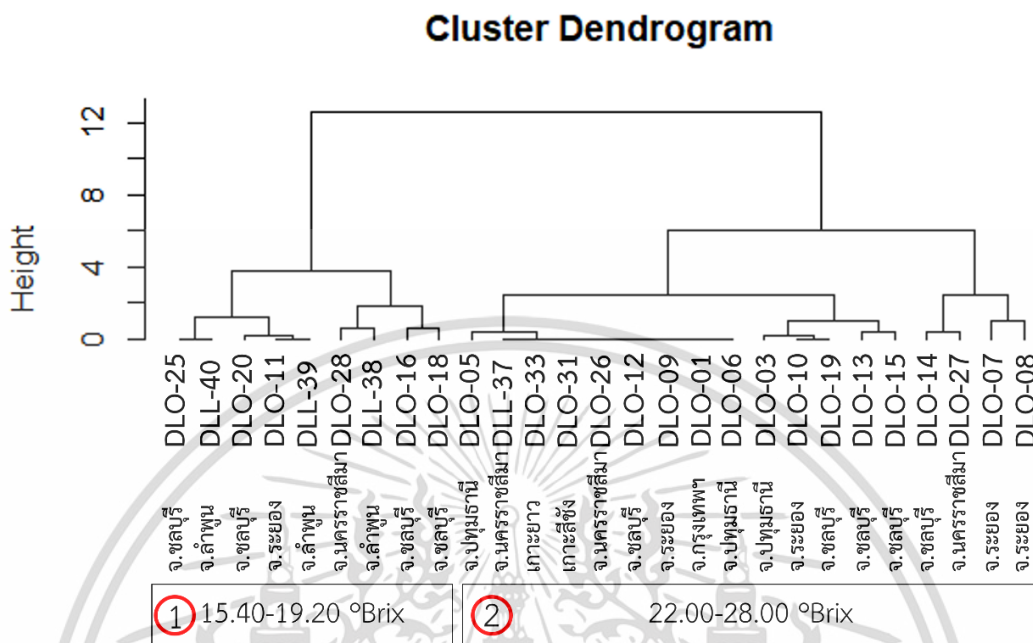


ภาพที่ 4.3 แสดงการจัดกลุ่มของความสัมพันธ์ของน้ำหนักเมล็ดลำไยเถาและลำไยต้นด้วยโปรแกรม R studio

และการจัดกลุ่มความสัมพันธ์รสชาติความหวานของลำไยเถาและลำไยต้น สามารถแบ่งกลุ่มความหวานของผลลำไยเถาได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่หนึ่ง คือ ตัวอย่างที่มีความหวานอยู่ในช่วง 15.40-19.20 °Brix โดยภายในกลุ่มมีตัวอย่างลำไยเถาจำนวน 6 ตัวอย่าง ได้แก่ DLO-11, DLO-16, DLO-18, DLO-20, DLO-25 และ DLO-28 ดังภาพที่ 4.4 และตัวอย่างลำไยต้น จำนวน 3 ตัวอย่าง (DLL-38 ถึง DLL-40) กลุ่มที่สอง คือ มีความหวานอยู่ในช่วง 22.00-28.00 °Brix ซึ่งส่วนใหญ่เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างลำไยเถา กล่าวได้ว่าตัวอย่างลำไยเถาส่วนใหญ่มีความหวานมากกว่าลำไยต้นในทุกตัวอย่าง ดังแสดงความสัมพันธ์การจัดกลุ่มของความหวานดังภาพที่ 4.4



ภาพที่ 4.4 การจัดกลุ่มของความสัมพันธ์ของความหวานของลำไยเถาและลำไยต้นด้วยโปรแกรม R studio

จากข้อมูลคุณภาพผลของลำไยเถา และลำไยต้นทั้ง 27 ตัวอย่าง สามารถสรุปความแตกต่างของข้อมูลลักษณะคุณภาพผลด้านลำไยทั้งสองชนิดดังนี้ ลำไยเถาและลำไยต้น มีลักษณะผลเป็นทรงแป้นทั้งหมดในทุกตัวอย่างคิดเป็น 100% ในขณะที่น้ำหนักผลเฉลี่ยของลำไยต้น เท่ากับ 12.95 กรัม ซึ่งมีน้ำหนักผลเฉลี่ยที่ใกล้เคียงกับลำไยเถา เท่ากับ 13.48 กรัม ดังตารางที่ 4.2 ในส่วนของทรงเมล็ดของลำไยต้นตัวอย่าง DLL-38 ถึง DLL-40 มีลักษณะเมล็ดเป็นทรงกลมคิดเป็น 75% และมีเพียงตัวอย่าง DLL-37 ที่เมล็ดเป็นทรงแป้น ส่วนลำไยเถามีลักษณะทรงเมล็ดที่หลากหลาย คือ ทรงแป้นคิดเป็น 82.60% และมีทรงกลมคิดเป็น 17.39% โดยน้ำหนักเมล็ดเฉลี่ยของลำไยต้น เท่ากับ 1.94 กรัม ซึ่งน้อยกว่าน้ำหนักเฉลี่ยของเมล็ดลำไยเถาที่มีน้ำหนักเมล็ดเฉลี่ยเท่ากับ 3.20 กรัม ในส่วนของความหนาเนื้อพบว่าลำไยต้นมีค่าเฉลี่ยของความหนาเนื้อ เท่ากับ 0.54 เซนติเมตร ซึ่งมีค่ามากกว่าลำไยเถาที่มีค่าความหนาเฉลี่ยเท่ากับ 0.38 เซนติเมตร และข้อมูลความหวานพบว่า ลำไยเถาส่วนใหญ่มีความหวานที่สูงแตกต่างจากลำไยต้นอย่างชัดเจน มีค่าเฉลี่ยความหวานเท่ากับ 22.08 °Brix และลำไยต้นมีค่าเฉลี่ยความหวานเท่ากับ 18.95 °Brix จากแผนภาพการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของคุณภาพผลกับ

ตัวอย่างลำไยทั้งสองชนิดจากแหล่งสถานที่ต่าง ๆ พบว่าสามารถยืนยันความแตกต่างของลักษณะเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คุณภาพผลของลำไยต้นที่มีความแตกต่างจากลำไยเถาได้ในระดับหนึ่ง เนื่องจากการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ในบางลักษณะยังพบว่าตัวอย่างลำไยเถา และลำไยต้นยังถูกจัดกลุ่มปะปนกันอยู่นอกจากนี้กลุ่มตัวอย่างลำไยเถาที่เก็บมาจากสถานที่ภายในจังหวัดเดียวกันมีลักษณะคุณภาพผลที่ใกล้เคียงกันถูกจัดจำแนกให้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน และในตัวอย่างลำไยต้น DLL-37 ซึ่งเป็นลำไยต้นที่ผ่านการปรับปรุงพันธุกรรมมาแล้วพบว่า มีลักษณะคุณภาพผลในด้านต่าง ๆ ที่มีความใกล้เคียงกับตัวอย่างลำไยเถา ดังนั้นควรทำการศึกษาต่อเพื่อแยกความแตกต่างในด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในกลุ่มของลำไยต้น แยกความแตกต่างของลำไยต้นกับลำไยเถา และเพื่อแยกความแตกต่างภายในกลุ่มของลำไยเถา

ตารางที่ 4.2 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักผล เมล็ด ความหนาเนื้อ และความหวานของเนื้อ ของลำไยเถา และลำไยต้น

	ค่าเฉลี่ย	ตัวอย่าง	
		ลำไยเถา	ลำไยต้น
ผล	น้ำหนัก (กรัม)	13.48±4.89	12.95±1.76
	ความกว้าง (เซนติเมตร)	3.41±0.28	2.95±0.02
	ความสูง (เซนติเมตร)	2.70±0.04	2.57±0.01
เมล็ด	น้ำหนัก (กรัม)	3.20±0.91	1.94±0.65
	ความกว้าง (เซนติเมตร)	1.74±0.04	1.42±0.07
	ความสูง (เซนติเมตร)	1.88±0.03	1.37±0.05
เนื้อ	ความหนา (เซนติเมตร)	0.38±0.01	0.54±0.01
	ความหวาน (°Brix)	22.08±3.22	18.95±1.98

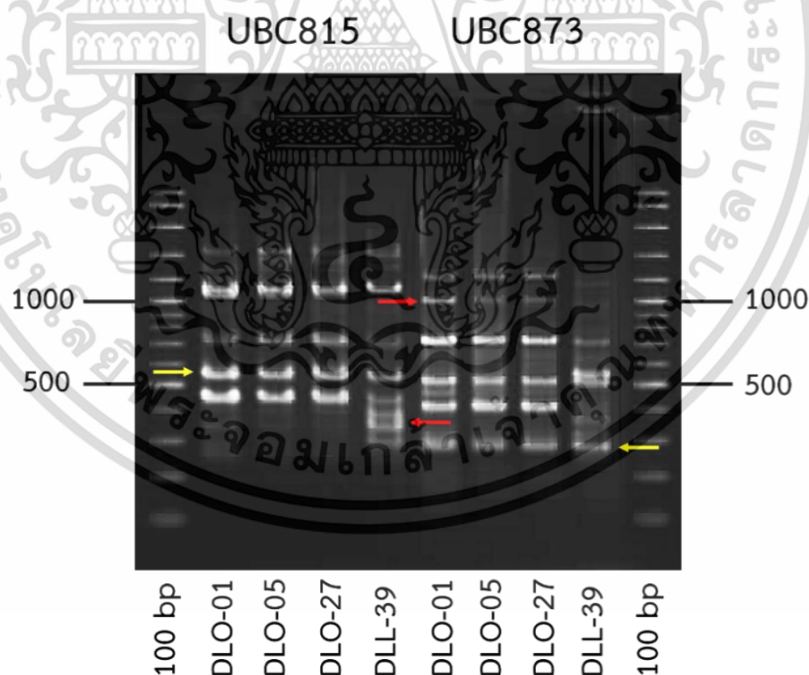
4.2 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ (inter simple sequence repeat : ISSR)

4.2.1 ผลการคัดเลือกคู่ไพเมอร์ที่เหมาะสม

การศึกษาเบื้องต้นในการคัดเลือกตัวอย่างเพื่อนำมาทดสอบชนิดของไพเมอร์ที่เหมาะสมในเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ โดยสุ่มตัวอย่างลำไยเถา และลำไยต้นจากสถานที่แตกต่างกันรวม 4 ตัวอย่าง แบ่งเป็นลำไยเถาจำนวน 3 ตัวอย่าง ได้แก่ DLO-01 จากจังหวัดกรุงเทพฯ DLO-05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากจังหวัดปทุมธานี และ DLO-27 จากจังหวัดนครราชสีมา และลำไยต้น 1 ตัวอย่าง DLL-39 จากจังหวัดลำพูน ซึ่งจากการศึกษาคุณภาพผลเบื้องต้นพบว่า ตัวอย่างลำไยเถา DLO-01, DLO-27 และตัวอย่างลำไยต้น DLL-37 มีลักษณะคุณภาพผลในส่วนของน้ำหนักรส และน้ำหนักเมล็ดที่แตกต่างกัน อาจเป็นไปได้ว่าลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันเช่นเดียวกัน จึงนำตัวอย่างทั้ง 4 ตัวอย่างมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกับไพรเมอร์ ทั้งหมดจำนวน 38 ไพรเมอร์ ซึ่งในการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมพิจารณาจากไพรเมอร์ที่ทำให้แถบดีเอ็นเอมีความคมชัด มีจำนวนของแถบดีเอ็นเอไม่มากหรือน้อยจนเกินไป และให้ความแตกต่างในตำแหน่งเดียวกัน (polymorphic band) ของดีเอ็นเอในแต่ละตัวอย่างได้ จากผลการทดลองพบว่ามี 6 ไพรเมอร์ สามารถให้ความแตกต่างของดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างได้ คือ UBC815, UBC824, UBC834, UBC849, UBC855 และ UBC873 ที่มีความเหมาะสมในการนำไปศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมกับตัวอย่างทั้งหมด ตัวอย่างแถบดีเอ็นเอที่นำมาศึกษาหาชนิดของไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ UBC815 และ UBC873 ดังภาพที่ 4.5 ที่แสดงแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏขึ้นมีทั้งแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันในตำแหน่งเดียวกัน (monomorphic band) ลูกศรสีเหลือง และแถบดีเอ็นเอที่ต่างกันตำแหน่งเดียวกันในแต่ละตัวอย่าง (polymorphic band) ลูกศรสีแดง



ภาพที่ 4.5 แถบดีเอ็นเอของลำไยเถาและลำไยต้น จำนวน 4 ตัวอย่าง จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ ด้วยไพรเมอร์ UBC815 และ UBC873 เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน VC 100 bp

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

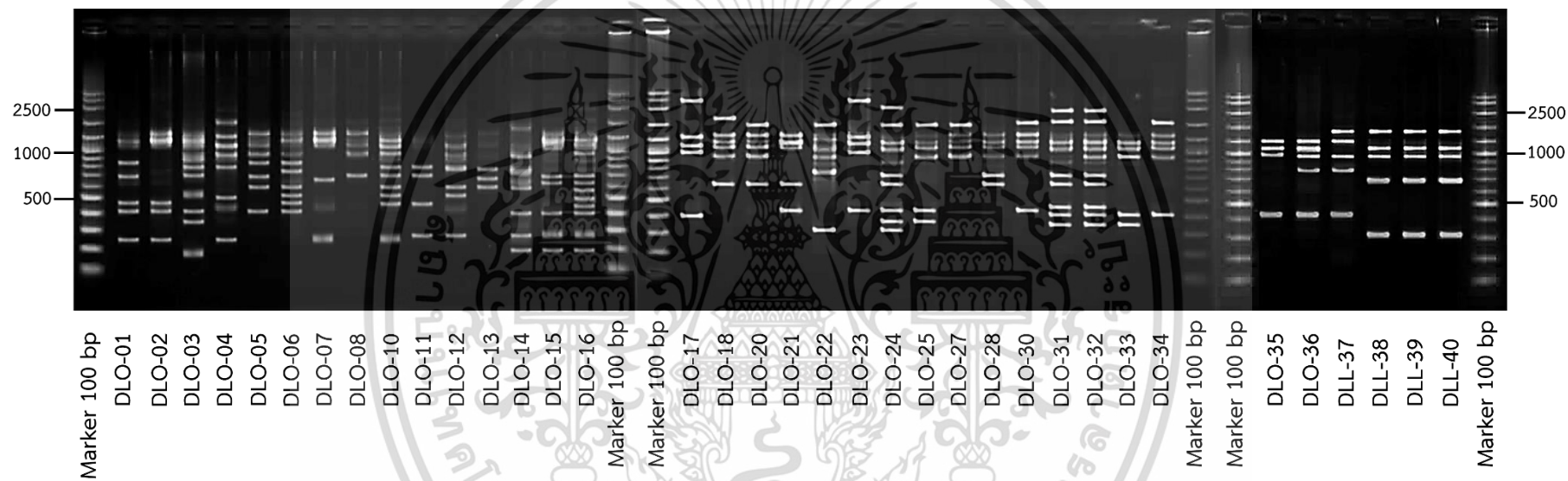
4.2.2 ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของลำไยเถาและลำไยต้น ด้วยคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมจำนวน 6 ไพรเมอร์ คือ UBC815, UBC824, UBC834, UBC849, UBC855 และ UBC873 กับตัวอย่างลำไยเถา 32 ตัวอย่าง (DLO-01 ถึง DLO-36) และลำไยต้น 4 ตัวอย่าง (DLL-37 ถึง DLL-40) ซึ่งเป็นรหัสที่กำหนดรวมกับตัวอย่างที่วิเคราะห์คุณภาพผลเบื้องต้น แต่ไม่ได้นำมาทดลองในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DLO-09, DLO-19, DLO-26) โดยจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่เหมาะสมจำนวน 6 ไพรเมอร์ พบว่ามีแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 156 แถบ มีขนาดของดีเอ็นเออยู่ในช่วง 180-2400 คู่เบส โดยมีแถบดีเอ็นเอที่แสดง polymorphic band เป็นจำนวน 154 แถบ คิดเป็นร้อยละ 98.71 โดยแสดงจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ในเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ ดังตารางที่ 4.3 ซึ่งมีความใกล้เคียงกับการศึกษาของ Kung และคณะ (2010) ที่ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของลำไยต้นสายพันธุ์ต่าง ๆ 24 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับตัวอย่างลินจี 1 ตัวอย่าง ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 15 ไพรเมอร์ พบว่ามีจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 149 แถบ คิดเป็นร้อยละดีเอ็นเอที่แสดงความต่าง 92.5% และจากงานวิจัยของ Wanvisait และคณะ (2019) ที่นำเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ที่ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของกล้วย 12 สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 20 ไพรเมอร์ มีจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 54 แถบ และมีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างทั้งหมด 53 แถบ ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 96.43 มีค่า polymorphism information content (PIC) อยู่ในช่วง 0.17-0.36 ซึ่งในงานวิจัยนี้มีไพรเมอร์ที่ให้ร้อยละความแตกต่างดีเอ็นเอของลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อื่น มีค่าสูงสุดคิดเป็นร้อยละ 100 มีจำนวน 4 ไพรเมอร์คือ UBC824, UBC834, UBC849 และ UBC855 และคำนวณค่า PIC เป็นค่าที่ใช้ออกความสามารถในการจำแนกความแตกต่างของไพรเมอร์แต่ละชนิดพบว่า ไพรเมอร์ที่ให้ค่า PIC สูงสุดคือ UBC824 มีค่าเท่ากับ 0.95 และไพรเมอร์ที่ให้ค่า PIC ต่ำสุดคือ UBC873 มีค่าเท่ากับ 0.81 จากผลการทดลอง และจากงานวิจัยข้างต้นพบว่าเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์มีความสามารถในการจำแนกความแตกต่างของตัวอย่างในสายพันธุ์เดียวกันได้ดี มีค่าร้อยละความแตกต่างของดีเอ็นเอสูง ซึ่งยกตัวอย่างภาพแถบดีเอ็นเอของลำไยเถาและลำไยต้นรวมจำนวน 36 ตัวอย่าง (DLO-01 ถึง DLL-40) ที่เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ UBC824 ที่ให้ความต่างของแถบดีเอ็นเอ และมีค่า PIC มากที่สุด ดังภาพที่ 4.6

ตารางที่ 4.3 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไพรเมอร์จำนวน 6 ไพรเมอร์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์

ไพรเมอร์	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง	ร้อยละของแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง	Polymorphism Information Content (PIC)
UBC815	300-3200	17	94.44	0.82
UBC824	180-2500	40	100	0.95
UBC834	180-1700	29	100	0.86
UBC849	200-2000	29	100	0.92
UBC855	200-1800	23	100	0.88
UBC873	230-1200	16	94.11	0.81
รวม		154	98.71	

เมื่อวิเคราะห์ผลของแถบดีเอ็นเอตัวอย่างลำไยเถา และลำไยต้นที่ปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์จากเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ ทั้ง 6 ไพรเมอร์ ซึ่งจากการแปลผลของแถบดีเอ็นเอเพื่อวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (Jaccard's similarity coefficient) พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของตัวอย่างทั้งหมดอยู่ในช่วง 0.64-0.97 โดยค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของตัวอย่าง DLL-39 และ DLL-40 มีค่าเท่ากับ 0.97 ซึ่งตัวอย่างดังกล่าวเป็นตัวอย่างลำไยต้นสายพันธุ์อีตอที่เก็บมาจากสวนจังหวัดลำพูน เป็นได้ว่าเกษตรกรเพาะพันธุ์ และขยายพันธุ์พืชแบบไม่อาศัยเพศ ทำให้ต้นพืชมีลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางพันธุกรรมที่เหมือนกับต้นที่คัดเลือกให้เป็นแม่พันธุ์ทุกประการ (นันทิยา, 2553) ในขณะที่ตัวอย่าง DLL-37 เป็นตัวอย่างลำไยต้นที่เก็บมาจากสวนในจังหวัดนครราชสีมา มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างลำไยต้นสายพันธุ์อีตอตัวอย่างอื่น ๆ พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.81 ซึ่งเป็นค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนที่น้อยเมื่อเทียบกับลำไยต้นตัวอย่างอื่น ทั้งนี้เพราะว่าเกษตรกรได้ทำการตัดต่อปรับปรุงพันธุ์ ทำให้ตัวอย่าง DLL-37 มีความแตกต่างจากลำไยต้นสายพันธุ์อีตอ



ภาพที่ 4.6 ลักษณะแถบดีเอ็นเอของลำไยเถา และลำไยต้น จำนวน 36 ตัวอย่าง (DLO-01 ถึง DLL-40) จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุล ไอเอสเอสอาร์ของไพรเมอร์ UBC824 เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน VC 100 bp

เมื่อนำมาสร้างแผนผังต้นไม้ด้วยโปรแกรม NTSYSpc เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่าที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนที่ 0.64 สามารถแบ่งกลุ่มลำไยได้ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่ม CladeA และ CladeB โดยในกลุ่ม CladeA เป็นตัวอย่างลำไยเถาจำนวน 30 ตัวอย่าง (DLO-01 ถึง DLO-34) และลำไยที่จัดอยู่ในกลุ่ม CladeB มีจำนวน 6 ตัวอย่าง (DLO-35 ถึง DLL-40) ซึ่งเป็นตัวอย่างลำไยเถา 2 ตัวอย่าง (DLO-35, DLO-36) และลำไยต้นจำนวน 4 ตัวอย่าง (DLL-37 ถึง DLL-40) เมื่อพิจารณาลักษณะทางพันธุกรรมของลำไยเถา และลำไยต้น ตามภาพแผนผังต้นไม้ที่ 4.7 แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางด้านพันธุกรรมของลำไยทั้งสองชนิด สอดคล้องกับรายงานของ Lithanatudom และคณะ (2017) ที่ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชในวงศ์ Sapindaceae ได้แก่ ลิ้นจี่ ลำไยต้นสายพันธุ์ต่าง ๆ และลำไยเถา โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง *ITS2*, *matK*, *rbcl*, *trnH-psbA*, *trnL-l* และ *trnL-trnF* จากผลการวิเคราะห์พบว่าตัวอย่างของลำไยเถา และลำไยต้น มีค่าสัมประสิทธิ์ความต่างอยู่ที่ 0.87 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างในทุกตำแหน่ง และสามารถแยกออกจากกันอย่างชัดเจน และรายงานวิจัยของกฤษฏา (2562) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของลำไยเถาและลำไยต้นสายพันธุ์อึดอ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SRAP พบว่าที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน 0.58 สามารถแบ่งเป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มของลำไยเถา และกลุ่มลำไยต้นสายพันธุ์อึดอออกจากกันได้อย่างชัดเจน จากงานวิจัยที่ผ่านมาแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมของลำไยเถา และลำไยต้น แต่ในปัจจุบันลำไยทั้งสองชนิดมีชื่อวิทยาศาสตร์ที่เหมือนกัน และถูกจัดอยู่ในกลุ่มพันธุ์ย่อย (subspecies) เดียวกัน จากรายงานข้างต้นพบว่ามีเครื่องหมายทางโมเลกุลหลายชนิดที่สามารถแยกความแตกต่างในระดับ variety ของลำไยทั้งสองชนิดนี้ได้ เช่นเดียวกับการศึกษาในครั้งนี้ที่เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์สามารถแยก และจำแนกความต่างทางพันธุกรรมของลำไยทั้งสองสายพันธุ์ได้ แต่ไม่สามารถกล่าวได้ว่าสามารถแยกลำไยเถาเป็นลำไยสายพันธุ์ใหม่ (species) ที่แยกออกมาจากกลุ่มพันธุ์ย่อย (subspecies) เดียวกับลำไยต้นได้ เนื่องจากผลการทดลองที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน 0.64 สามารถแยกกลุ่มลำไยเถา และลำไยต้นออกจากกันได้ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่น ๆ พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนจากการทดลองมีความใกล้ชิดพันธุกรรมที่สูงกว่างานวิจัยของสิริมา และคณะ (2019) ที่ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของลิ้นจี่สายพันธุ์ต่าง ๆ 23 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับตัวอย่างลำไยต้น 2 สายพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ พบว่าที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนที่ 0.52 สามารถแยกตัวอย่างลำไยต้น 2 สายพันธุ์ ออกจากตัวอย่างลิ้นจี่ได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kung และคณะ (2010) ที่ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของลำไยต้นสายพันธุ์ต่าง ๆ 24 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับตัวอย่างลิ้นจี่ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ พบว่าที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน 0.44 สามารถแยกตัวอย่างลิ้นจี่ออกจากตัวอย่างของลำไยต้นสายพันธุ์ต่าง ๆ ได้ แม้ว่าเครื่องหมายโมเลกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอเอสเอสอาร์สามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของตัวอย่างในสายพันธุ์ได้ดี แต่ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยการคัดเลือกลำไยสายพันธุ์อื่น ๆ เป็นตัวเป็นเปรียบ และยืนยันความแตกต่างระหว่างลำไยต้น และลำไยเถาให้ตีมากยิ่งขึ้น

เมื่อพิจารณาความหลากหลายทางพันธุกรรมของลำไยแต่ละกลุ่มพบว่าภายในกลุ่ม CladeB ตัวอย่างลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ (DLL-38 ถึง DLL-40) มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเฉลี่ยเท่ากับ 0.87 โดยตัวอย่าง DLL-38 และ DLL-39 ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนใกล้เคียงกันมากที่สุด คือ 0.97 เนื่องจากมาจากแหล่งที่เก็บจังหวัดเดียวกัน อาจมาจากการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศทำให้มีลักษณะทางพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกัน นอกจากนี้พบว่าตัวอย่างลำไยเถา DLO-35 และ DLO-36 จากอำเภอเกาะยาว จังหวัดพังงา ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม CladeB เนื่องจากที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน 0.87 ตัวอย่างลำไยเถามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนที่ใกล้เคียงกับตัวอย่างลำไยต้น DLL-37 และเนื่องจากลำไยต้น DLL-37 เป็นลำไยต้นที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งเมื่อพิจารณาจากลักษณะคุณภาพผลเบื้องต้นที่ผ่านมา พบว่าลำไยต้น DLL-37 มีลักษณะคุณภาพผลที่ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกับลำไยเถาในทุกด้าน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ลำไยต้น DLL-37 มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับลำไยเถามากกว่าลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ โดยที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน 0.82 สามารถแยกลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ ออกจากลำไยต้น DLL-37 และลำไยเถา (DLO-35, DLO-36) ได้ในระดับหนึ่ง ดังภาพที่ 4.8 ทั้งนี้ควรคัดเลือกตัวอย่างลำไยสายพันธุ์อื่น ๆ มาศึกษาเป็นตัวอย่าง outgroup เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของลำไยแต่ละสายพันธุ์ เนื่องจากตัวอย่างลำไยเถา DLO-35 และ DLO-36 มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมือนกับลำไยเถาตัวอย่างอื่น ๆ แต่ผลทางความหลากหลายทางพันธุกรรมแสดงให้เห็นถึงความแตกต่าง อาจกล่าวได้ว่าลำไยเถาสองตัวอย่างนี้อาจมีการเพาะพันธุ์ที่ทำให้เกิดการแปรผันของทางพันธุกรรม มีลักษณะทางพันธุกรรมที่เปลี่ยนไป

ในขณะเดียวกันเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ภายในกลุ่มของลำไยเถา ดังภาพเดนโดรแกรมที่ 4.9 มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ในช่วง 0.72-0.97 ซึ่งถือว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบกับงานวิจัยอื่น ๆ โดยที่ค่าสัมประสิทธิ์ 0.72 สามารถแบ่งกลุ่มของลำไยเถาได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ CladeA1 และ CladeA2 ซึ่งในกลุ่มของ CladeA1 มีตัวอย่างลำไยเถา 15 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นกลุ่มตัวอย่างจากจังหวัดที่ใกล้เคียงกันในภาคกลาง และภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดกรุงเทพฯ จังหวัดปทุมธานี จังหวัดระยอง และจังหวัดชลบุรีในอำเภอบางละมุง และในกลุ่มของ CladeA2 มี 15 ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่างในจังหวัดต่าง ๆ ได้แก่ อำเภอเมือง อำเภอสัตหีบ อำเภอศรีราชาในจังหวัดชลบุรี จังหวัดนครราชสีมา จังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดตราด และจังหวัดพังงา เป็นต้น

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ภายในกลุ่มของลำไยเถาในแต่ละกลุ่มย่อยพบว่า ลำไยเถาที่เก็บมาจากสถานที่ใกล้เคียงกันสามารถจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ยกตัวอย่างเช่น ตัวอย่างจากอำเภอลำลูกกา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

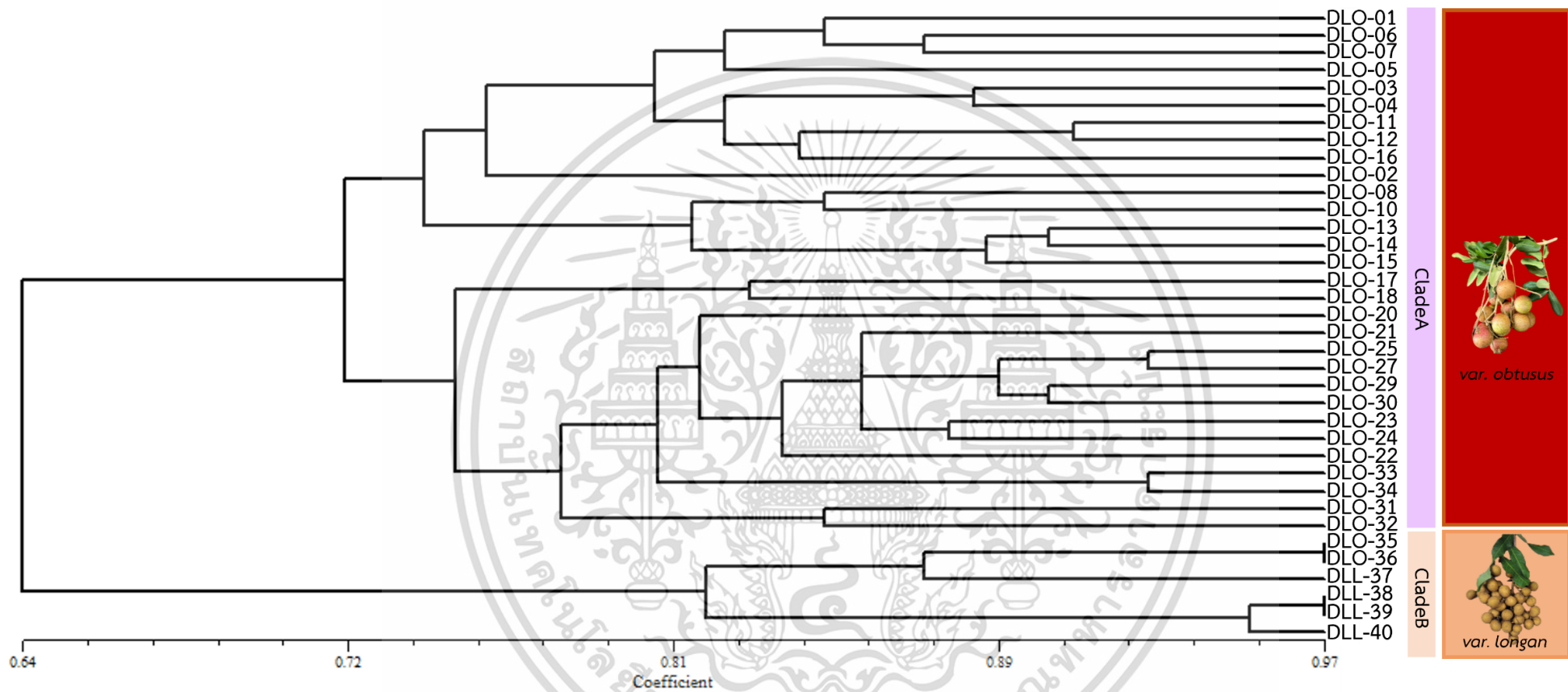
จังหวัดปทุมธานี (DLO-02 ถึง DLO-06) ตัวอย่างจากอำเภอบางละมุง จังหวัดชลบุรี (DLO-12 ถึง DLO-14) และตัวอย่างอำเภอบ้านฉาง จังหวัดระยอง (DLO-08 ถึง DLO-10) จัดอยู่ในกลุ่ม CladeA1 และตัวอย่างจากอำเภอสตึก จังหวัดชลบุรี (DL20-DL24) ตัวอย่างจากอำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา (DLO-22 และ DLO-27) และตัวอย่างจากอำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ (DLO-29 และ DLO-30) จัดอยู่ในกลุ่ม CladeA2 โดยกลุ่ม CladeA1 และกลุ่ม CladeA2 มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเฉลี่ยอยู่ที่ 0.78 และ 0.80 ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าสามารถแยกความแตกต่างของตัวอย่างที่มีแหล่งที่เก็บจากเกาะต่าง ๆ ออกจากแหล่งที่เก็บตัวอย่างบนบก โดยในตัวอย่างลำไยเถา DLO-33 และ DLO-34 จากเกาะยาวน้อย จังหวัดพังงา มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนภายในกลุ่ม CladeA2 อยู่ที่ 0.80 และตัวอย่าง DLO-31 และ DLO-32 จากเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี และเกาะกูด จังหวัดตราด ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนภายในกลุ่ม CladeA2 อยู่ที่ 0.78 ซึ่งกล่าวได้ว่าสามารถแยกความแตกต่างของตัวอย่างจากบนบก และตัวอย่างที่อยู่บนเกาะได้ในระดับหนึ่ง

จากข้อมูลข้างต้นชี้ให้เห็นว่าเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ มีความสามารถในการแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ดี เพราะนอกจากสามารถแยกความแตกต่างของลำไยต้นออกจากกลุ่มของลำไยเถาแล้ว สามารถแยกและจัดจำแนกความแตกต่างภายในกลุ่มของลำไยเถาได้ด้วย ซึ่งจากรายงานวิจัยของกฤษณา (2562) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของลำไยเถา จำนวน 33 ตัวอย่าง และลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ จำนวน 3 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี พบว่าที่สัมประสิทธิ์ความเหมือนที่ 0.58 สามารถแบ่งกลุ่มลำไยได้เป็น 2 กลุ่มอย่างชัดเจนคือ กลุ่มของลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ และเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ภายในกลุ่มของลำไยเถาพบว่าที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนที่ 0.93 สามารถแบ่งกลุ่มลำไยเถาได้ 2 กลุ่มหลัก ซึ่งตัวอย่างที่เก็บมาจากสถานที่เดียวกันพบว่ามี ความใกล้ชิดทางพันธุกรรมสูง จึงอาจกล่าวได้ว่า เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี ยังไม่สามารถแยกความแตกต่างของความสัมพันธ์ภายในกลุ่มของลำไยเถาได้ และเนื่องจากการศึกษาครั้งนี้ได้รวบรวมตัวอย่างลำไยเถาจากหลากหลายสถานที่ต่าง ๆ ในประเทศไทย ทำให้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่มากกว่ารายงานวิจัยข้างต้นที่เก็บตัวอย่างลำไยเถาเฉพาะภาคตะวันออกจากจังหวัดชลบุรีเท่านั้น และจากรายงานวิจัยของสิริมา และคณะ (2562) ศึกษาความหลากหลายของลินจีด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* และบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* โดยศึกษาลินจีจำนวน 23 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับลำไยต้นสายพันธุ์จัมโบ้ และสายพันธุ์เพชรสาคร จำนวน 2 ตัวอย่าง ใช้ไพรเมอร์ในเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ จำนวน 20 ไพรเมอร์ พบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่แสดงความต่าง 71 แถบ คิดเป็นร้อยละ 86.81% มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของตัวอย่างภายในกลุ่มลินจีอยู่ในช่วง 0.53-1.00 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.76 สามารถแบ่งกลุ่มของลินจีได้ออกเป็น 3 กลุ่ม ตามแหล่งสถานที่เก็บ และที่ค่าสัมประสิทธิ์ที่ <math><0.53</math> เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถแบ่งแยกตัวอย่างลำไยต้นออกจากตัวอย่างลินจีได้อย่างชัดเจน ซึ่งเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ภายในกลุ่มของลินจีจากค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนพบว่า เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ให้ความหลากหลายของสายพันธุ์ลินจีสูง เมื่อเทียบกับระดับนิวคลีโอไทด์บริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* พบว่ามีค่าความแตกต่างของลินจี 23 สายพันธุ์ อยู่ในช่วง 0.0000-0.0035 โดยสามารถแยกลินจีสายพันธุ์จินแดงที่มีค่าความต่างทางพันธุกรรมได้สายพันธุ์เดียว และตัวอย่างลินจี 22 สายพันธุ์ไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรม จากการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีประสิทธิภาพสูง เนื่องจากมีความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) ทำให้เกิดความต่าง (polymorphism) ของดีเอ็นเอสูง สามารถแยกความแตกต่างในทางพันธุกรรมในระดับของสปีชีส์ได้แม่นยำกว่าเครื่องหมายโมเลกุลชนิดอื่น และมีความแม่นยำในการจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมพืชมากกว่า



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.7 เดนโดแกรมแสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมของลำไยเถา และลำไยต้น จำนวน 36 ตัวอย่าง ที่ศึกษาด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ โดยการจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYSpc



ภาพที่ 4.8 เดนโดแกรมแสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในกลุ่มลำไยเถา จำนวน 30 ตัวอย่าง ที่ศึกษาด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ โดยการจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYSpC

4.3 ผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถา และเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีโด

4.3.1 ผลการสกัดเปลือกผลลำไยด้วยเมทานอล

การศึกษานี้เลือกศึกษาสารสกัดในส่วนเปลือกผลของลำไยสองชนิด คือ เปลือกผลลำไยเถา (*D. longan* spp. *longan* var. *obtusus*) และเปลือกผลลำไยต้นสายพันธุ์อีโด (*D. longan* spp. *longan* var. *lonagn*) มีจำนวนตัวอย่างลำไยที่ใช้ในการศึกษา 3 ตัวอย่าง ได้แก่ ลำไยเถา 2 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างเปลือกผลของลำไยเถาตัวอย่างที่ 1 (Thao1) เป็นตัวอย่างที่มาจากแหล่งสถานที่เดียว คือ อำเภอบ้านฉาง จังหวัดระยอง ส่วนเปลือกผลของลำไยเถาตัวอย่างที่ 2 (Thao2) เป็นการรวบรวมเปลือกของผลลำไยเถาจากหลายสถานที่ และลำไยต้นสายพันธุ์อีโด 1 ตัวอย่าง จากจังหวัดลำพูน โดยมีรหัส และข้อมูลของตัวอย่างแสดงดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ข้อมูลรหัสตัวอย่าง และแหล่งที่มาของตัวอย่างจากเปลือกผลลำไยเถาและลำไยต้นสายพันธุ์อีโด

ตัวอย่างเปลือกผลของลำไย	รหัสตัวอย่าง	แหล่งที่มา
เปลือกลำไยเถา ตัวอย่างที่ 1	Thao1	อำเภอบ้านฉาง จังหวัดระยอง
เปลือกลำไยเถา ตัวอย่างที่ 2	Thao2	รวบรวมตัวอย่างจากหลากหลายสถานที่
เปลือกลำไยต้นสายพันธุ์อีโด	Edor	อำเภอป่าซาง จังหวัดลำพูน

โดยการนำเปลือกผลของลำไยมาอบแห้ง พร้อมบั่นหยาบ และนำมาสกัดด้วยวิธีการหมักแช่ด้วยเมทานอลเป็นระยะเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง โดยสีของสารสกัดหลังหมักด้วยเมทานอลมีความแตกต่างกันเล็กน้อย โดยสารสกัดจากตัวอย่าง Thao1 มีสีเหลืองสว่าง และสารสกัดจาก Thao2 มีสีเหลืองเข้ม และสารสกัดเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีโด มีสีเหลืองทองสว่าง เมื่อนำสีของสารสกัดไปเปรียบเทียบกับรหัสสีจาก RHS mini color chart แสดงดังตารางที่ 4.5 หลังจากการระเหยเมทานอลด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศจนได้สารสกัดหยาบเมทานอล และเก็บในโถดูดความชื้น เมื่อนำหนักของสารสกัดคงที่พบว่า สารสกัดทั้ง 3 ตัวอย่าง มีสี และลักษณะของสารสกัดแตกต่างกัน โดยสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถาทั้งสองตัวอย่างมีลักษณะสารสกัดเป็นผงหยาบสีน้ำตาล และสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีโดมีลักษณะสารสกัดเป็นสารเหนียวมีลักษณะหนืดข้น มีสีน้ำตาลเข้ม และมีน้ำหนักของสารสกัดหยาบเมทานอลจาก Thao1,

Thao2 และ Edor เท่ากับ 56.89, 58.96 และ 60.75 กรัม ตามลำดับ คิดเป็นค่าผลได้ของสารสกัด เท่ากับ 14.22, 14.74 และ 15.18 ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 น้ำหนักของสารสกัดหยาบ ร้อยละของผลได้ ลักษณะของสารสกัดหยาบ และรหัสสีของสารสกัดหยาบเมทานอลจากเปลือกผลลำไย

ตัวอย่าง	น้ำหนัก (กรัม)	ร้อยละของผลได้	ลักษณะของสารสกัดหยาบ	รหัสสีสารสกัดหลังการหมัก	รหัสสีสารสกัดหลังระเหยตัวทำละลาย
Thao1	56.89	14.22	สารผงสีน้ำตาล	RHS163B	RHS200A
Thao2	58.96	14.74	สารผงสีน้ำตาล	RHSN167A	RHS200A
Edor	60.75	15.18	สารเหนียวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	RHS163A	RHS200B

4.3.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลลำไย

4.3.2.1 การตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้น

ในการตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลของตัวอย่าง Thao1 และ Thao2 และลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ พบสารในกลุ่มอัลคาลอยด์ คูมาริน แทนนิน และสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งในการทดสอบแทนนินเมื่อหยดสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ หากเกิดตะกอนสีขาวแสดงว่า มีสารประกอบแทนนิน และหากเกิดตะกอนสีน้ำเงินเขียวแสดงว่า มีสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งสารสกัดทั้ง 3 ตัวอย่าง มีทั้งสารประกอบแทนนิน และสารประกอบฟีนอลิก ดังตารางที่ 4.6

จากรายงานวิจัยของ Li และคณะ (2015) ศึกษาพิษเคมีของสารสกัดเมทานอลเปลือกผลของลำไยต้น พบสารประกอบฟีนอลิก แทนนิน และฟลาโวนอยด์บางชนิด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang และคณะ (2020) ที่ศึกษาสารสำคัญและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนต่าง ๆ ของลำไยต้น ได้แก่ เมล็ด เปลือกผล และเยื่อของเปลือกผล เป็นต้น ในการศึกษาพบว่าส่วนของเปลือกผลลำไยมีปริมาณอัลคาลอยด์ โพลีฟีนอล เทอร์ปีน ลิพิด ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) และกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ที่สูงกว่าส่วนของเมล็ดและเยื่อเปลือก และจากรายงานของ Rakariyatham และคณะ (2020) ศึกษาสารสำคัญในเปลือกผลลำไยต้นด้วยวิธี HPLC พบว่า สารสกัดในชั้นเมทานอลมีปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และแคทีชิน นอกจากนี้พบสารในกลุ่มเอกลินนี้เป็นเอกลินที่ส่งวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารประกอบฟีนอล ได้แก่ อัลคาลอยด์ กรดแกลลิก กรดแอลลาจิก และคอร์ลาจิน เป็นต้น ซึ่งจากรายงานวิจัยข้างต้นพบว่ามีความสอดคล้องกับการศึกษาพฤษเคมีเบื้องต้นที่พบสารในกลุ่มอัลคาลอยด์ คูมาริน แทนนิน ที่เป็นสารประกอบจำพวกฟีนอลิก ซึ่งสารในกลุ่มฟีนอลิกมีความสามารถต้านสารอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย (วิริยา และคณะ 2561; Wang และคณะ, 2012) จึงทำการศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ต่อไป

ตารางที่ 4.6 ผลการตรวจสอบพฤษเคมีเบื้องต้นจากสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลลำไยเถาและลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ

กลุ่มสารทดสอบ	วิธีการทดสอบ	สารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลของลำไย		
		Thao1	Thao2	Edor
อัลคาลอยด์ (Alkaloid)		+	+	+
แทนนิน (Tannin)	Gelatin solution	+	+	+
	Gelatin salt solution	+	+	+
	FeCl ₃	+	+	+
ซาโปนิน (Saponin)	Froth test	-	-	-
	Hemolysis test	-	-	-
คูมาริน (Coumarin)		+	+	+
แอนโทไซยานิน (Anthocyanin)		-	-	-
เบต้าไซยานิน (Batacyanin)		-	-	-

หมายเหตุ + คือ ตรวจพบ - คือ ตรวจไม่พบ

4.3.2.2 ผลการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

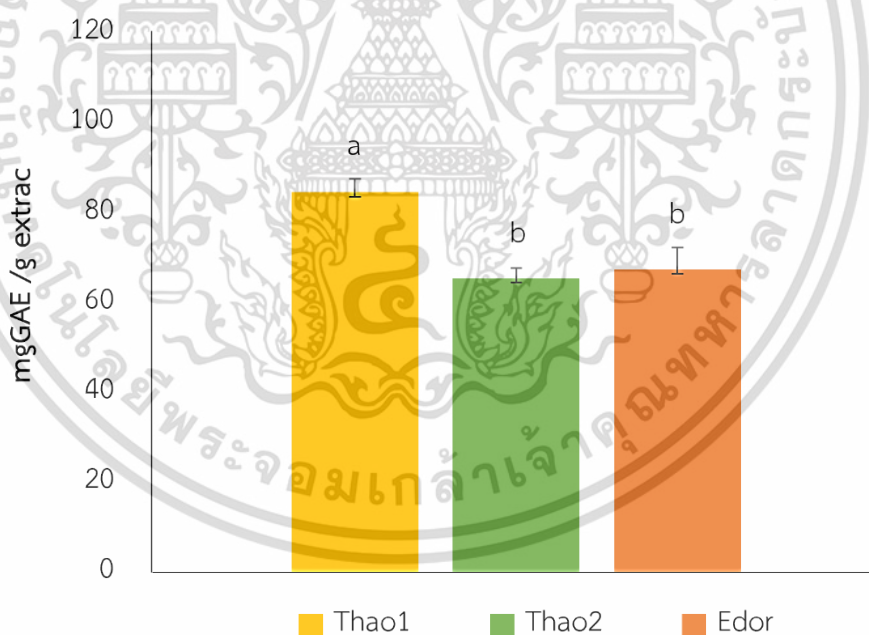
จากการศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลของลำไย โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 20-120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาสร้างกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (ภาพภาคผนวกที่ ข-1) ได้สมการที่ใช้คำนวณคือ $Y = 0.0098X$ ผลการทดลองพบว่า สารสกัดเมทานอลจากลำไยเถา Thao1 และ Thao2 มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 84.73 ± 3.00 และ 67.56 ± 4.93 mgGAE/g extract ดังตารางที่ 4.7 และสารสกัดเมทานอลจากลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 65.57 ± 2.31 mgGAE/g extract (ตารางภาคผนวกที่ ข-2) และสามารถสร้างกราฟแท่งแสดงความสัมพันธ์ได้ดังภาพ 4.9 เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลลำไยทั้งสองชนิดพบว่า สารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถา Thao1 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด

ตารางที่ 4.7 ค่าเฉลี่ยปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลลำไยทั้ง 3 ตัวอย่าง

สารสกัดหยาบเมทานอลจาก เปลือกผลลำไย	ค่าเฉลี่ยปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด mgGAE/g extract
Thao1	84.73 ± 3.00
Thao2	67.56 ± 4.93
Edor	65.57 ± 2.31



ภาพที่ 4.9 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลลำไยจำนวน 3 ตัวอย่าง โดยตัวอักษร a-b แสดงความแตกต่างทางค่าสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ $p < 0.05$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลของลำไยเถาอยู่ในช่วง 67.56-84.73 mgGAE/g extract ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองพฤษเคมีเบื้องต้นพบว่าสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลลำไยทั้ง 3 ตัวอย่าง พบอัลคาลอยด์ แทนนิน ซึ่งเป็นสารดังกล่าวเป็นสารประกอบฟีนอลิก จึงส่งผลให้ในการศึกษาครั้งนี้สารสกัดจากเปลือกผลของทั้ง 3 ตัวอย่าง ให้ปริมาณฟีนอลิกที่สูงกว่า งานวิจัยของ He และคณะ (2009) ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในส่วนเมล็ด เปลือกผล และเนื้อของลำไยต้นจำนวน 12 สายพันธุ์ พบว่าสารสกัดจากเมล็ด และเปลือกผล มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สูงกว่าสารสกัดจากเนื้อผลของลำไย ที่อยู่ในช่วง 30.09-63.00 และ 21.60-55.60 mg/g extract จากงานวิจัยของ Kringkasemsri (2012) ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากเมล็ดและเปลือกผลของผลไม้ไทย 16 ชนิด จากการศึกษาพบว่าสารสกัดจากเปลือกผลลำไยกะโหลกมีปริมาณฟีนอลิกสูงที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดจากเมล็ดลำไยมีค่าเท่ากับ 1925.39 และ 1157.28 mgGAE/g extract ซึ่งจากงานวิจัยดังกล่าวพบว่าการศึกษาในครั้งนี้สารสกัดจากเปลือกผลของสายพันธุ์อีดอมีปริมาณฟีนอลิกที่น้อยกว่าสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยกะโหลก แต่ในรายงานวิจัยของ Sriwattana และ Chindaluang (2014) ที่ศึกษาวิธีการสกัดสารจากเมล็ดลำไยต้น 3 แบบ คือ สกัดด้วยเมทานอล สกัดด้วยน้ำร้อน และการสกัดด้วย Ultrasonic-Assisted (UAE) พบว่าสารสกัดเมล็ดลำไยที่สกัดด้วยเมทานอลมีปริมาณฟีนอลิกสูงสุดเท่ากับ 41.25 mgGAE/ml ซึ่งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดลำไยต้นที่น้อยกว่างานวิจัยข้างต้น อาจเป็นผลจากความแตกต่างของสายพันธุ์ของลำไย สอดคล้องกับงานวิจัยของ Jaitrong และคณะ (2006) ที่ศึกษาปริมาณฟีนอลิก และสารสำคัญของเปลือกผลลำไย 2 สายพันธุ์ คือ อีดอ และเปี้ยวเขียว จากการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิก และวิเคราะห์สารสำคัญภายในเปลือกผลของลำไยทั้ง 2 สายพันธุ์ด้วยวิธี HPLC-PAD-MS พบว่ามีชนิดและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกแตกต่างกัน และจากงานวิจัยของ Tang และคณะ (2019) ศึกษาสารสำคัญด้วยวิธี HPLC พบว่ามีปริมาณฟีนอลิก และปริมาณฟลาโวนอยด์พบในเปลือกผลของลำไยมีค่าเท่ากับ 4.59 ± 0.25 และ 2.08 ± 0.04 mg GAE/g ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณที่สูงกว่าเมล็ดลำไยเล็กน้อยมีค่าเท่ากับ 3.77 ± 0.08 และ 1.94 ± 0.01 mg GAE/g ส่วนประกอบโพลีฟีนอลิกเหล่านี้ พบว่ามีสารคอร์ริลาจिनเป็นส่วนประกอบหลักที่พบได้ทั้งในส่วนที่เป็นเปลือกผล และเมล็ด โดยสารสกัดจากเมล็ดมีปริมาณอัลคาลอยด์ในปริมาณสูงกว่าเมื่อเทียบกับสารสกัดจากเปลือกผลลำไยมีค่าเท่ากับ 7.40 ± 1.04 และ 6.44 ± 0.23 mg GAE/g ทั้งนี้ปริมาณสารสำคัญในเปลือกผลลำไยแต่ละสายพันธุ์มีปริมาณที่แตกต่างกันไป จึงเป็นผลทำให้สารสกัดจากเปลือกผลลำไยเถามีปริมาณที่สูงกว่าสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยต้น แต่ทั้งนี้ในงานวิจัยดังกล่าวเป็นการศึกษาองค์ประกอบและปริมาณของสารสำคัญด้วยวิธี HPLC จึงทำให้ทราบชนิดและปริมาณของสารอัลคาลอยด์ สารคอร์ริลาจिन และกรดแกลลิก ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ทราบเพียงชนิดของกลุ่มสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเบื้องต้นเท่านั้น จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของการวิเคราะห์สารสำคัญด้วยเทคนิคอื่น ๆ เพื่อให้ทราบถึงชนิดและปริมาณของสารสำคัญชนิดอื่น ๆ

จากรายงานข้างต้นเป็นการวิเคราะห์ผลจากเปลือกผลของลำไยต้นเพียงเท่านั้น หากพิจารณาเปรียบเทียบสารสกัดจากลำไยเถาแล้วพบว่า ยังไม่พบรายงานวิจัยที่ทำการศึกษาศาสตรสกัดจากเปลือกผลลำไยเถา พบเพียงงานวิจัยของสารสกัดจากเมล็ดลำไยเถาของ วิริยา และจตุพร (2561) ที่ศึกษาศาสตรสกัดจากเมล็ดลำไยเถาที่สกัดจากเอทานอล และน้ำ พบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 93.12 และ 554.16 mgGAE/g extract ตามลำดับ ซึ่งสารสกัดลำไยเถาที่สกัดด้วยน้ำให้ปริมาณฟีนอลิกที่สูงกว่า สอดคล้องกับงานวิจัยของกฤษฎา (2562) ที่ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดเมทานอลของเมล็ดลำไยเถาและลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ พบว่าสารสกัดจากลำไยเถามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกอยู่ในช่วง 61.15-103.96 mgGAE/g extract และสารสกัดจากสายพันธุ์อีดอมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 140.06-6.84 mgGAE/g extract ซึ่งให้เห็นว่าสารสกัดจากเมล็ดลำไยเถาในงานวิจัยดังกล่าวข้างต้นให้ผลปริมาณฟีนอลิกที่สูงกว่าเปลือกผลของลำไยเถา เป็นไปได้ว่าภายในเมล็ดของลำไยเถามีองค์ประกอบของสารฟีนอลิกที่สำคัญในปริมาณสูงกว่าส่วนของเปลือกผลลำไยเถา ทั้งนี้ควรมีการศึกษาองค์ประกอบของสารฟีนอลิกจากเปลือกผลและเมล็ดของลำไยเถาเพิ่มเติมด้วยเทคนิคต่าง ๆ

4.3.2.3 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

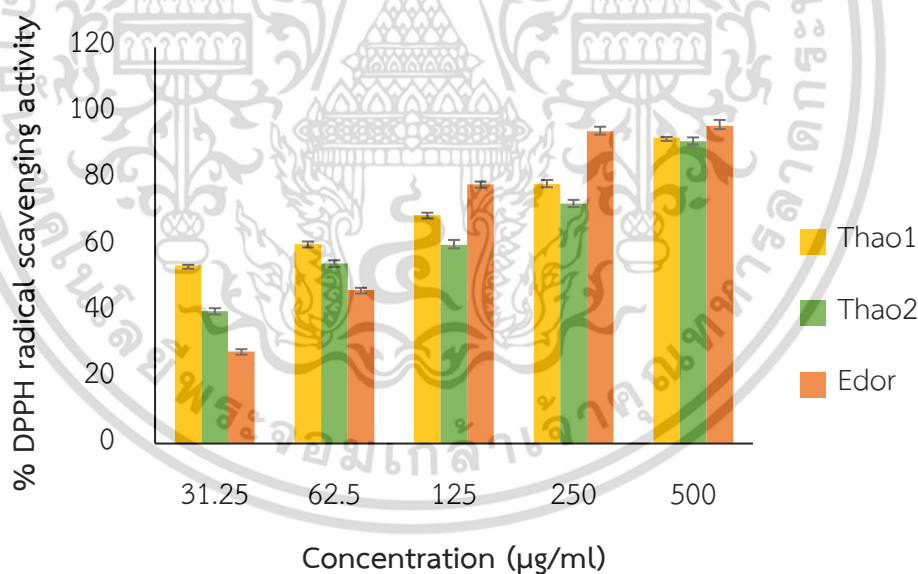
ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลของ Thao1 และ Thao2 และสารสกัดลำไยต้นสายพันธุ์อีดอด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP มีฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระในแต่ละวิธีดังนี้

4.3.2.3.1 ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

การศึกษาฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH โดยใช้สารละลายโทรลล็อกซ์เป็นสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 5-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเมื่อนำค่ามาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรลล็อกซ์กับร้อยละการต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH จะได้กราฟมาตรฐานของสารโทรลล็อกซ์ (ภาพภาคผนวกที่ ข-2) และได้สมการที่ใช้ในการคำนวณคือ $Y = 4.5896X$ แล้วนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารโทรลล็อกซ์ที่สามารถต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH ที่ร้อยละ 50 หรือ IC_{50} ด้วยโปรแกรม GraphPadPrism 8.0 พบว่าสารมาตรฐานโทรลล็อกซ์มีค่า IC_{50} เท่ากับ 10.55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางภาคผนวกที่ ข-3) เมื่อทดสอบสาร

สกัดที่ความเข้มข้น 31.25-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดเปลือกผลของลำไยเถา Thao1 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

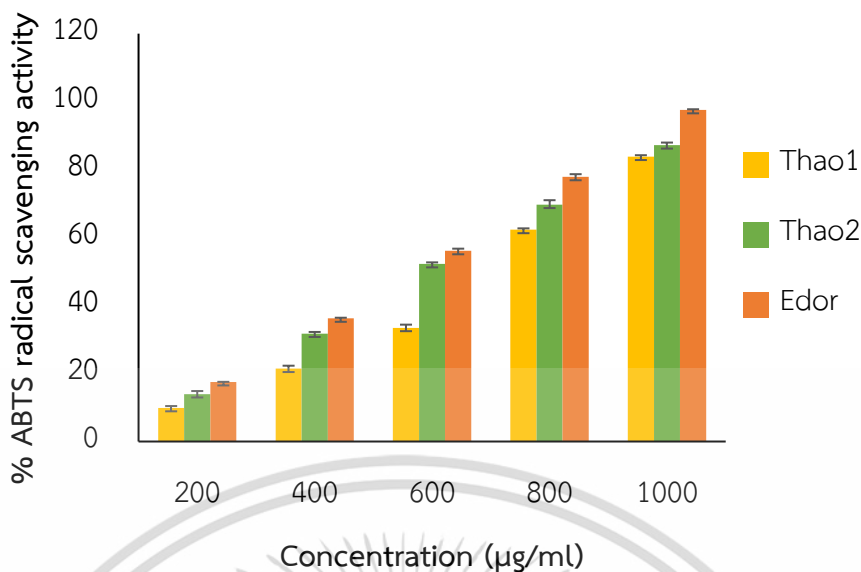
และ Thao2 มีค่าร้อยละการต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุดที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 92.65 ± 0.87 และ 91.60 ± 0.17 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีตอ มีค่าร้อยละการต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 96.22 ± 0.66 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางภาคผนวกที่ ข-4) ซึ่งสามารถนำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลของลำไยกับค่าร้อยละการต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดังภาพที่ 4.10 และสามารถวิเคราะห์หาค่า IC_{50} พบว่าสารสกัดเมทานอลจาก Thao1 และ Thao2 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 23.54 และ 23.28 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.8 และเมื่อเทียบความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดเปลือกผลของลำไยเถาทั้งสองตัวอย่างกับสารมาตรฐานโทร็อกซ์ พบว่ามีค่าเฉลี่ยความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระเท่ากับ 163.21 ± 1.14 และ 135.57 ± 0.62 mgTE/g extract ซึ่งในตัวอย่างสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีตอ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 69.04 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่าความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระเท่ากับ 123.60 ± 1.08 mgTE/g extract จากผลการทดลองพบว่าสารสกัด Thao2 มีความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัด Thao1 และสารสกัด Edor



ภาพที่ 4.10 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลของลำไยทั้ง 3 ตัวอย่างกับค่าร้อยละการต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH

4.3.2.3.2 ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

การศึกษาฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS โดยใช้สารละลาย Trolox เป็นสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 20-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการทดลองสามารถคำนวณร้อยละการต้านสารอนุมูลอิสระ ABTS ของสารมาตรฐาน Trolox ได้ ซึ่งเมื่อนำค่ามาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Trolox กับร้อยละการต้านสารอนุมูลอิสระ ABTS จะได้กราฟมาตรฐานของสาร Trolox (ภาพภาคผนวกที่ ข-3) และได้สมการที่ใช้ในการคำนวณคือ $Y = 1.0374X$ แล้วนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสาร Trolox ที่สามารถต้านสารอนุมูลอิสระ ABTS ที่ร้อยละ 50 หรือ IC_{50} ด้วยโปรแกรม GraphPadPrism 8.0 พบว่าสารมาตรฐาน Trolox มีค่า IC_{50} เท่ากับ 45.44 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางภาคผนวกที่ ข-5) เมื่อนำสารสกัด เมทานอลจากเปลือกผลของลำไย ที่ความเข้มข้น 200-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ ABTS ผลการทดลองที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถา Thao1 และ Thao2 มีค่าร้อยละการต้านสารอนุมูลอิสระ ABTS เท่ากับ 83.81 ± 0.54 และ 87.18 ± 0.89 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ มีค่าร้อยละการต้านสารอนุมูลอิสระ ABTS เท่ากับ 97.55 ± 0.06 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางภาคผนวกที่ ข-6) ซึ่งสามารถนำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลกับค่าร้อยละการต้านสารอนุมูลอิสระ ABTS ได้ดังภาพที่ 4.11 และสามารถวิเคราะห์หาค่า IC_{50} พบว่าสารสกัด Thao1 และ Thao2 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 741.65 และ 521.34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.8 และเมื่อเทียบความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัด Thao1 และ Thao2 กับสารมาตรฐาน Trolox พบว่า มีค่าเฉลี่ยความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระเท่ากับ 61.73 ± 0.63 และ 79.10 ± 0.78 mgTE/g extract ซึ่งในตัวอย่างสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 556.65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่าเฉลี่ยความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระเท่ากับ 89.64 ± 0.38 mgTE/g extract ดังตารางที่ 4.8 จากผลการทดลองแม้ว่าสารสกัด Thao2 จะมีความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระ ABTS สูงกว่าสารสกัด Thao1 แต่สารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถาทั้งสองตัวอย่างมีความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระน้อยกว่าสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ ดังตารางที่ 4.8



ภาพที่ 4.11 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลของลำไย ทั้ง 3 ตัวอย่างกับค่าร้อยละการต้านสารอนุมูลอิสระ ABTS

4.3.2.3.3 ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

ในการศึกษาฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP เป็นวิธีการทดสอบความสามารถในการต้านสารออกซิเดชันโดยอาศัยความสามารถในการรีดิวซ์ไอเล็กตรอนให้แก่ต้านอนุมูลอิสระ ในวิธีนี้จะใช้มาตรฐานคือ แอสคอร์บิก หรือวิตามินซี โดยใช้สารมาตรฐานแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น 20-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนำค่าการดูดกลืนแสงมาสร้างกราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (ภาพภาคผนวกที่ ข-4) โดยมีสมการที่ใช้ในการคำนวณคือ $Y = 0.0127X$ เมื่อนำสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลของลำไย ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ FRAP ซึ่งสามารถนำมาคำนวณหาค่าความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระ FRAP เทียบกับสารมาตรฐานแอสคอร์บิก พบว่าสารสกัดเมทานอล Thao1 และ Thao2 มีค่าความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระ FRAP เท่ากับ 85.59 ± 0.75 และ 93.64 ± 0.71 mgAAE/g extract ตามลำดับ (ตารางภาคผนวกที่ ข-8) มีค่าความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระ FRAP น้อยกว่าสารสกัดจากเปลือกผลลำไยต้นสายพันธุ์อีตอ คือ 200.78 ± 2.36 mgAAE/g extract ดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และค่า IC₅₀ ของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผล ลำไยเถาและลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ

สารสกัด เมทานอล	ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ			IC ₅₀ (µg/ml)	
	DPPH	ABTS	FRAP	DPPH	ABTS
	(mgTE/g extract)	(mgTE/g extract)	(mgAAE/g extract)		
Thao1	163.21 ^a ±1.14	61.73 ^c ±0.63	85.59 ^c ±0.75	23.54	741.65
Thao2	135.57 ^b ±0.62	79.10 ^b ±0.78	93.64 ^b ±0.71	23.28	521.34
Edor	123.60 ^c ±1.08	89.64 ^a ±0.38	200.78 ^a ±2.36	69.04	556.65

หมายเหตุ ตัวอักษร a-c ในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT), p<0.05

จากการศึกษาการต้านอนุมูลอิสระทั้ง 3 วิธีของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลของลำไยเถาทั้งสองตัวอย่างให้ผลสอดคล้องกัน เนื่องจากมีความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระที่ใกล้เคียงกัน โดยสารสกัด Thao2 มีความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระ ABTS และ FRAP สูงกว่าสารสกัด Thao1 เล็กน้อย ซึ่งเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของสารประกอบฟีนอลิกกับฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระพบว่า สารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถามีปริมาณสูงกว่าสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีดอเล็กน้อย ซึ่งในการทดสอบฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระพบว่ามีเพียงวิธี DPPH ที่สารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถา Thao1 และ Thao2 มีค่าความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระที่สูงกว่าสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ ในขณะที่วิธี ABTS และ FRAP สารสกัดจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ มีความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระที่สูงกว่าจากรายงานวิจัยที่ผ่านมาไม่พบการทดสอบฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระจากเปลือกผลของลำไยเถา แต่มีรายงานวิจัยจากสารสกัดเปลือกผลของลำไยต้น ซึ่งจากงานวิจัยของ Kringkasemsri (2012) ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของสารสกัดจากเปลือกผล และเมล็ดของผลไม้ไทย 16 ชนิด ซึ่งพบว่าสารสกัดของลำไยกะโหลกมีปริมาณฟีนอลิก และความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP มีความสอดคล้องกันเนื่องจากเปลือกผลของลำไยกะโหลกมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุดทำให้มีความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระสูงเช่นเดียวกัน มีค่าเท่ากับ 1021.36 umolesTE/g ในขณะที่เมล็ดลำไยมีค่าเท่ากับ 711.44 umolesTE/g และจากงานวิจัยของ สายสุนีย์ (2554) ศึกษาความสามารถในการต้าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

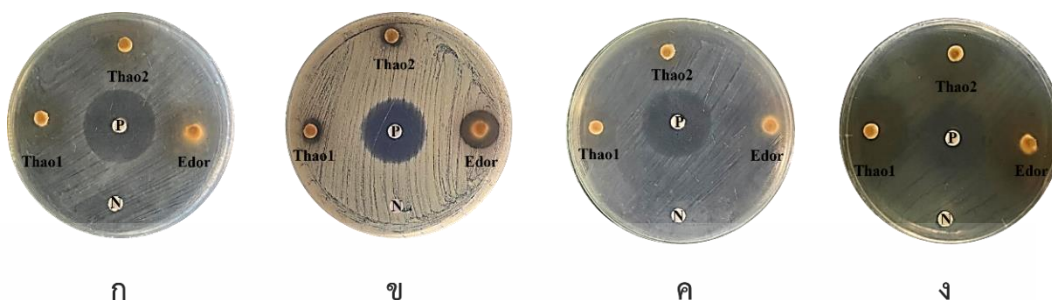
สารอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดจากเปลือกผลและเมล็ดของลำไย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ชมพู แห้ว และอีดอ พบว่าสารสกัดเมทานอลของเมล็ดลำไยสายพันธุ์แห้วมีความสามารถในการยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.40 รองลงมาคือ สารสกัดลำไยสายพันธุ์ชมพู และอีดอ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.43 และ 0.69 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลของลำไยสายพันธุ์ชมพู มีความสามารถในการยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระสูงเมื่อเทียบกับสารสกัดจากเปลือกผลลำไยสายพันธุ์อีดอ และแห้ว มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.20, 1.90 และ 5.16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และจากรายงานวิจัยของกฤษฎา (2562) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมทานอลของเมล็ดลำไยเถา และเมล็ดลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ ด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP พบว่าสารสกัดจากเมล็ดลำไยเถามีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระทั้ง 3 วิธี น้อยกว่าสารสกัดจากเมล็ดลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ โดยสารสกัดจากเมล็ดลำไยเถามีค่า IC_{50} ในวิธี DPPH และ ABTS อยู่ในช่วง 87.37-173.68 และ 199-354.88 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ และในวิธี FRAP มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอยู่ในช่วง 36.13-69.68 mg AAE/ g extract ในขณะที่สารสกัดจากเมล็ดลำไยต้นสายพันธุ์อีดอมี IC_{50} ในวิธี DPPH และ ABTS เท่ากับ 29.36 และ 139.49 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ และในวิธี FRAP มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 81.42 mg AAE/ g extract ซึ่งจากรายงานวิจัยข้างต้นพบว่าสารสกัดจากเมล็ดลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ และเมล็ดลำไยเถามีความสามารถในการยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าสารสกัดจากเปลือกผลลำไยเถา ในขณะที่สารสกัดจากเปลือกผลลำไยต้นสายพันธุ์อีดอมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ที่สูงกว่าสารสกัดจากเมล็ดลำไยเถา และลำต้นสายพันธุ์อีดอ ทั้งนี้พบว่าสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของพืช มีความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต่างกัน และสายพันธุ์ที่แตกต่างกันของลำไยต่างสายพันธุ์มีผลต่อสารสำคัญในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้านต่าง ๆ

4.3.2.4 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

สารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลของ Thao1, Thao2 และเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ โดยใช้ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อดิสก์ ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี paper disk diffusion ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกจำนวน 5 สายพันธุ์ คือ *B. subtilis*, *K. rhizophila*, *S. aureus*, *S. epidermidis* และ *P. acnes* และแบคทีเรียแกรมลบจำนวน 1 สายพันธุ์ คือ *E. coli* และใช้เงินตามยจีนความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ เป็นตัวควบคุมเชิงบวก จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดเมทานอลจาก Thao1 และ Thao 2 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้จำนวน 4 สายพันธุ์ คือ *B. subtilis*, *K. rhizophila*, *S. aureus* และ *P. acnes*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* และ *E. coli* ได้ ดังภาพที่ 4.12 ก-ง โดยสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถาทั้งสองตัวอย่างให้ผลการยับยั้งที่ไม่ต่างกันทางค่าสถิติ ดังตารางที่ 4.9



ภาพที่ 4.12 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (ก) *B. subtilis* (ข) *K. rhizophila* (ค) *S. aureus* และ (ง) *P. acnes* ของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลลำไยทั้ง 3 ตัวอย่าง โดยตัวอักษร N คือ ตัวควบคุมเชิงลบ หรือเมทานอล และ P คือ ตัวควบคุมเชิงบวก หรือยาปฏิชีวนะเจนตามัยซินที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์

นอกจากนี้พบว่าสารสกัดเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีดอสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้จำนวน 4 สายพันธุ์ คือ *B. subtilis*, *K. rhizophila*, *S. aureus* และ *P. acnes* ได้เช่นเดียวกัน ดังรูป 4.12 ก-ง แต่สารสกัดจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *B. subtilis*, *K. rhizophila* และ *S. aureus* ได้ดีกว่าสารสกัดจาก Thao1 และ Thao2 ในขณะที่เชื้อ *P. acnes* สารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถา Thao1 และ Thao2 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้ดีกว่า โดยมีค่าบริเวณการยับยั้ง เท่ากับ 25.95, 24.99 และ 22.97 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเทียบความสามารถของสารสกัดจากจากเปลือกผลของลำไยเถา Thao1 และ Thao2 กับเจนตามัยซินความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ ที่เป็นตัวควบคุมเชิงบวกพบว่าสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถามีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* ได้ใกล้เคียงกัน ดังตารางที่ 4.9

จากงานวิจัยที่ผ่านมายังไม่พบการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียจากสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถา มีเพียงการศึกษาสารสกัดจากลำไยต้น โดยงานวิจัยของ Udomlak และคณะ (2010) ศึกษาสารสกัดจากเปลือกผลไม้ 7 ชนิด เพื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย โดยใช้สารสกัดเอทานอลจากเปลือกผลไม้ต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ 3 ชนิด คือ *S. aureus*, *S. epidermidis* และ *P. acnes* พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยต้นสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดได้ โดยมีค่าวงใสในการยับยั้งเท่ากับ 9.00, 11.83

และ 9.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ มีค่าบริเวณยับยั้งวงใสของเชื้อ *S. aureus* ที่ใกล้เคียงกับสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ แม้ว่าในการทดลองในครั้งนี้ใช้ความเข้มข้นของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลของลำไยทั้ง 2 สายพันธุ์ เพียง 5 มิลลิกรัมต่อดิสก์ แต่มีบริเวณการยับยั้งเชื้อ *P. acnes* มากกว่างานวิจัยข้างต้นที่ใช้สารสกัดความเข้มข้นที่ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร และงานวิจัยของ Siri และคณะ (2020) ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้และผิวหนังจากสารสกัดจากพืช 12 ชนิด โดยใช้สารสกัดน้ำ และเอทานอล 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์ ที่ใช้ความเข้มข้นของสารสกัดที่ 40 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลลำไยต้นที่สกัดด้วยน้ำ และเอทานอล 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* TISTR 518 มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 13.4 ± 0.2 , 13.3 ± 0.1 และ 11.3 ± 0.9 มิลลิเมตร ตามลำดับ และ *S. aureus* TISTR 2329 เท่ากับ 13.4 ± 0.4 , 13.1 ± 0.1 และ 11.1 ± 0.8 มิลลิเมตร ตามลำดับ รายงานวิจัยข้างต้นมีค่าบริเวณการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่สูงกว่าในการศึกษาครั้งนี้ มีบริเวณการยับยั้งของเปลือกผลของลำไยเถา Thao1 และ Thao2 เท่ากับ 7.34 และ 7.29 มิลลิเมตร และสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีดอมีบริเวณการยับยั้ง 9.54 มิลลิเมตร เนื่องจากงานวิจัยดังกล่าวใช้ความเข้มข้นของสารสกัดที่สูงกว่า และในงานศึกษาครั้งนี้เลือกใช้เชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* TISTR 1466 เป็นสายพันธุ์ที่แตกต่างกับกับงานวิจัยดังกล่าว

งานวิจัยของกฤษฎา (2562) ที่ศึกษาสารสกัดจากเมล็ดลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อีดอที่สกัดด้วยเมทานอล พบว่ามีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ คือ *B. subtilis*, *M. luteus* และ *S. aureus* โดยสารสกัดจากเมล็ดลำไยเถามีบริเวณยับยั้ง เท่ากับ 13.52 ± 0.71 , 11.30 ± 0.59 และ 10.28 ± 0.81 มิลลิเมตร ตามลำดับ และสารสกัดจากเมล็ดลำไยต้นสายพันธุ์อีดอมีค่าบริเวณการยับยั้ง เท่ากับ 14.50 ± 0.77 , 11.46 ± 2.76 และ 13.80 ± 1.10 มิลลิเมตร ซึ่งจากผลทดลองพบว่าสารสกัดจากเปลือกผลลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อีดอที่ใช้ความเข้มข้นสารสกัดสาร 5 มิลลิกรัมต่อดิสก์ มีค่าบริเวณการยับยั้งแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่สูงกว่าสารสกัดจากเมล็ดลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ โดยมีบริเวณการยับยั้ง เท่ากับ 16.98-16.76 และ 17.43 แต่ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *M. luteus* และ *S. aureus* พบว่าสารสกัดจากเมล็ดลำไยทั้งสองสายพันธุ์ มีความสามารถในการยับยั้งได้ดีกว่าสารสกัดจากเปลือกผลลำไยเถาและลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ

ตารางที่ 4.9 บริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลของลำไยทั้ง 3 ตัวอย่างที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อดิสก์

สารสกัดเมทานอลจาก เปลือกผลของลำไย	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)					
	<i>B. subtilis</i>	<i>K. rhizophila</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. acnes</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>
Thao1	16.76 ^a ±0.25	9.27 ^b ±0.72	7.34 ^b ±0.19	25.95 ^a ±0.71	0	0
Thao2	16.98 ^a ±0.62	9.35 ^b ±0.82	7.29 ^b ±0.13	24.99 ^a ±1.88	0	0
Edor	17.43 ^a ±1.25	15.09 ^a ±0.86	9.54 ^a ±0.05	22.97 ^b ±1.08	0	0
เจนตามัยซิน	27.37±0.38	26.60±0.52	22.31±0.12	27.44±2.79	25.54	26.21

หมายเหตุ ตัวเลขในตารางแสดงค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของบริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (เส้นผ่านศูนย์กลางดิสก์ 6 มิลลิเมตร) โดยตัวอักษร a-b ในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยทดสอบด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT), p<0.05

4.3.2.5 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี DOPA-chrome โดยเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น 62.5-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถคำนวณร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก และสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก และค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (ภาพภาคผนวกที่ ข-9) โดยมีสมการที่ในการคำนวณคือ $Y = 0.1898X$ ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกได้เท่ากับ 236.73 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลของลำไยเถา Thao1 และ Thao2 และลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ ที่ความเข้มข้น 500-1500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลคำนวณร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถา Thao1 และ Thao2 พบว่าสารสกัด Thao2 ที่ความเข้มข้น 1500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่สูงกว่าสารสกัด Thao1 มีค่าเท่ากับ 73.99 และ 81.12 ตามลำดับ (ตารางภาคผนวกที่ ข-10) ซึ่งนำค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสไปวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติพบว่าสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถา Thao2 มีค่าไม่แตกต่างกับสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีดอที่มีค่าเท่ากับ 82.85 ดังตารางที่ 4.10

จากผลการทดลองพบว่าสารสกัด Thao1 และ Thao2 มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 901.39-927.79 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 236.73 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเมื่อเทียบกับกรดแอสคอร์บิกอยู่ในช่วง 264.75-278.90 mgAAE/g extract ดังตารางที่ 4.10 ในส่วนของสารสกัดเมทานอลของสารสกัดเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 412.49 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เมื่อเทียบกับกรดแอสคอร์บิกเท่ากับ 381.92 mgAAE/g extract ซึ่งเมื่อพิจารณาค่า IC_{50} ของสารสกัดเมทานอลของสารสกัดเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ พบว่ามีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีกว่าสารสกัดจากเปลือกผลลำไยเถาทั้งสองตัวอย่าง แต่ถึงอย่างไรก็ตามสารสกัดจากเปลือกผลลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อีดอมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่น้อยกว่าสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 236.73 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากข้อมูลงานวิจัยที่ผ่านมายังไม่พบการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดจากเปลือกผลลำไยเถา มีเพียงการศึกษาสารสกัดจากลำไยต้น โดยงานวิจัยของ Wei และคณะ (2016) ศึกษาสารสกัดจากเปลือกผลลำไยต้นในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสต่อการสร้างสารเม็ดสี ใน B_{16} Mouse Melanoma Cells พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลลำไยต้นที่มีสารแทน

นินเป็นองค์ประกอบส่งผลทำให้เกิดการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมีค่า IC_{50} เท่ากับ 11.5 ± 0.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากสารในกลุ่มโพลีฟีนอลจำพวกแทนนิน กรดแกลลิก คูมาริน สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ โกลโคไซด์ กรดไขมันต่าง ๆ รวมถึงสารต้านอนุมูลอิสระที่อยู่ในรูปวิตามินซีและวิตามินอี สารเหล่านี้มีความสามารถในการยับยั้งที่เป็นได้ทั้งตัวยับยั้งเอนไซม์แบบผันกลับได้ ชนิดแข่งขัน (competitive inhibition) และชนิดไม่แข่งขัน (non-competitive inhibition) ขึ้นกับลักษณะโครงสร้างของสารยับยั้งชนิดนั้น และยังอาจยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสทั้งชนิด monophenolase และdiphenolase จึงทำให้สารเหล่านี้ถูกนำมาใช้เป็นสารช่วยให้ผิวขาวในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์สุขภาพ (Sarkar และคณะ 2016) และจากรายงานวิจัยของ กฤษณา (2562) ศึกษาสารสกัดเมทานอลจากเมล็ดลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ ที่ความเข้มข้น 5-15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดจากเมล็ดลำไยเถามีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 504.82-776.57 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเมื่อเทียบกับกรดแอสคอร์บิกอยู่ในช่วง 161.29-182.00 mg AAE/ g extract และสารสกัดจากเมล็ดลำไยต้นมีค่า IC_{50} เท่ากับ 527.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเมื่อเทียบกับกรดแอสคอร์บิกเท่ากับ 181.09 mg AAE/ g extract ซึ่งเมื่อพิจารณาผลการทดลองกับงานวิจัยข้างต้น พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลและเมล็ดของลำไยทั้งสองสายพันธุ์ มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่น้อยกว่างานวิจัยดังกล่าว และสารสกัดจากเปลือกผลลำไยทั้งสองสายพันธุ์อาจไม่เหมาะในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสต่อไปเนื่องจากมีความสามารถในการยับยั้งที่น้อยกว่าสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ค่อนข้างสูง

ตารางที่ 4.10 ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และค่า IC₅₀ ของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลของลำไยทั้ง 3 ตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 500-1500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลของลำไย	ความเข้มข้น (µg/ml)	ค่าเฉลี่ยของร้อยละการยับยั้ง	ความสามารถในการยับยั้ง	IC ₅₀ (µg/ml)
		เอนไซม์ไทโรซิเนส	เอนไซม์ไทโรซิเนส (mg AAE/g extract)	
Thao1	500	22.20 ^b ±0.13	264.75 ^b	927.79
	1000	54.21 ^b ±0.18		
	1500	73.99 ^b ±0.13		
Thao2	500	20.67 ^b ±0.14	278.90 ^b	901.39
	1000	56.87 ^b ±0.14		
	1500	81.12 ^a ±0.14		
Edor	500	57.60 ^a ±0.13	381.92 ^a	412.49
	1000	76.67 ^a ±0.27		
	1500	82.85 ^a ±0.35		

หมายเหตุ ตัวอักษร a-b ในความเข้มข้นเดียวกันแสดงความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT), p<0.05

4.3.2.6 ผลการศึกษาความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์

การศึกษาฤทธิ์ความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์หรือ nitric oxide scavenging assay (NOA) โดยใช้ Sodium nitroprusside (SNP) ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ในการทดสอบกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 62.5-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น 12.5-125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการทดลอง สามารถคำนวณร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์ของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก และสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก และค่าร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์ (ตารางภาคผนวกที่ ข-11) โดยมีสมการที่ในการคำนวณคือ $Y = 0.732X$ ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกได้เท่ากับ 68.46 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการทดลองสามารถคำนวณร้อยละความสามารถในยับยั้งไนตริกออกไซด์ของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลของลำไยเถา Thao1 และ Thao2 พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 45.89-83.57 และ 49.27-78.98 ตามลำดับ (ตารางภาคผนวกที่ ข-12) และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 82.30 และ 92.70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีดอมีค่าร้อยละความสามารถในยับยั้งไนตริกออกไซด์อยู่ในช่วง 42.51-87.83 และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 116.73 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อพิจารณาค่าร้อยละความสามารถการยับยั้งไนตริกออกไซด์ของสารสกัด Thao1 และ Thao2 กับสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ พบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันเมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติ แสดงดังตารางที่ 4.11 แต่เมื่อพิจารณาจากค่า IC_{50} พบว่าทุกตัวอย่างของสารสกัด Thao 1 มีความสามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้ดีกว่าสารสกัด Thao2 และสารสกัดลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ ถึงอย่างไรก็ตามสารสกัดจาก Thao1, Thao2 และ Edor มีความสามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้น้อยกว่าสารมาตรฐานแอสคอร์บิกที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 68.46 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.11 ร้อยละความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ และค่า IC₅₀ ของสารสกัด
เมทานอลจากเปลือกผลของลำไยทั้ง 3 ตัวอย่าง

สารสกัดเมทานอลจาก เปลือกผลของลำไย	ความเข้มข้น (µg/ml)	ร้อยละความสามารถในการ ยับยั้งไนตริกออกไซด์	IC ₅₀ (µg/ml)
Thao1	62.5	45.89 ^{ab} ±1.80	82.30
	125	57.48 ^a ±4.78	
	250	62.80 ^b ±4.15	
	500	66.18 ^b ±1.80	
	1000	83.57 ^a ±4.92	
Thao2	62.5	49.27 ^a ±2.57	92.70
	125	51.69 ^b ±2.04	
	250	60.86 ^b ±1.18	
	500	72.46 ^{ab} ±0.68	
	1000	78.98 ^b ±1.18	
Edor	62.5	42.51 ^b ±1.80	116.73
	125	51.20 ^b ±1.80	
	250	69.08 ^a ±1.80	
	500	75.84 ^a ±3.80	
	1000	87.83 ^a ±3.64	

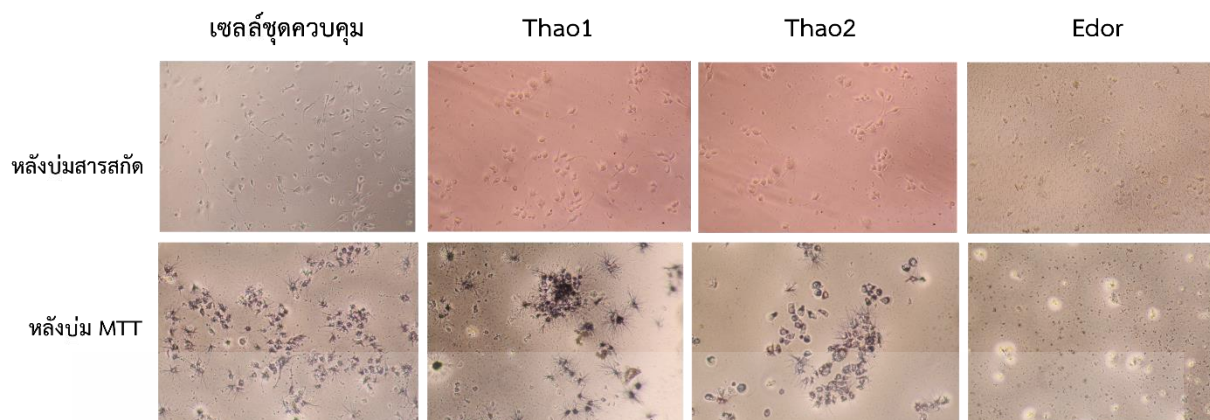
หมายเหตุ ตัวอักษร a-b ในความเข้มข้นเดียวกันแสดงความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี
Duncan's Multiple Range Test (DMRT), p<0.05

จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถา Thao1 Thao2 และสารสกัดจากเปลือกผลลำไยต้นสายพันธุ์อีโด Edor มีความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์จากการใช้สาร Sodium nitroprusside (SNP) ได้ ซึ่งเป็นสารที่มีความสามารถทำปฏิกิริยากับออกซิเจนกลายเป็นสารไนไตรท์ ซึ่งเป็นสารที่สื่อสารที่พบได้เมื่อเซลล์หรือเนื้อเยื่อเกิดการบาดเจ็บ หรืออักเสบทำให้เซลล์แมคโครฟาจหรือเซลล์เม็ดเลือดขาวเกิดการหลั่งไนตริกออกไซด์ออกมา ดังนั้นนำจึงสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยทั้งสองสายพันธุ์ไปทดสอบการอักเสบกับเซลล์แมคโครฟาจ (RAW 264.7) ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วยสาร lipopolysaccharides (LPS) ต่อไป

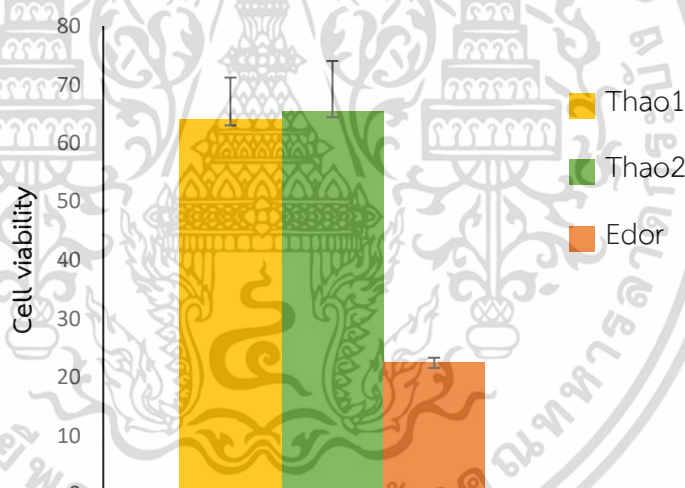
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ RAW 264.7

ในการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ในเซลล์ชนิดแมคโครฟาจ (Raw 264.7) ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบโดยใช้สาร lipopolysaccharides (LPS) ต้องทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ชนิดแมคโครฟาจ RAW cell 264.7 ก่อนทำการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ เพื่อเป็นการยืนยันว่าสารสกัดที่นำมาทดสอบไม่ได้มีผลเซลล์ โดยทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT รายงานผลเป็นร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ (cell viability) โดยใช้สารสกัดที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการทดลองพบว่าหลังจากการบ่มสารสกัดที่เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถา Thao1 และ Thao2 มีลักษณะเซลล์ RAW เป็นลักษณะปกติ ในขณะที่สารสกัดจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีโด มีลักษณะเซลล์ RAW ที่มีลักษณะเปลี่ยนไปจากปกติ สังเกตจากเซลล์มีลักษณะกลมและหลุดลอยจากพื้นผิวของหลุม ดังภาพที่ 4.13 และเมื่อสังเกตลักษณะของเซลล์หลังบ่มด้วยสารละลาย MTT เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ในหลุมของตัวอย่างสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถาพบผลึกฟอสฟอรัสในหลุมการทดลอง หมายถึง พบเซลล์มีชีวิต ส่วนของหลุมสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีโดพบผลึกฟอสฟอรัสมากขึ้น ในปริมาณน้อย หมายถึง พบเซลล์มีชีวิตจำนวนน้อย และจากคำนวณค่าร้อยละการมีชีวิตพบว่า สารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถา Thao1 มีค่าร้อยละการมีชีวิตรอดของ RAW cell เท่ากับ 64.07 ± 7.18 และสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถา Thao2 มีค่าร้อยละการมีชีวิตรอดของ RAW cell เท่ากับ 65.54 ± 8.60 โดยสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถา Thao1 และ Thao2 มีร้อยละการมีชีวิตรอดต่อเซลล์มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ มีค่าใกล้เคียงกับชุดควบคุม แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถาไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ในส่วนของสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีโด Edo มีค่าร้อยละการมีชีวิตรอดของ RAW cell เท่ากับ 22.69 ± 0.73 มีค่าร้อยละการมีชีวิตรอดต่อเซลล์น้อยกว่าชุดควบคุม แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยต้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับสูง แสดงดังภาพกราฟแห่งที่ 4.14



ภาพที่ 4.13 ลักษณะ RAW 264.7 cell เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ Inverted Microscope ที่กำลังขยาย 100 เท่า เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ชุดควบคุมที่ไม่ใส่สารสกัดกับเซลล์ที่ทดสอบสารสกัดจากเปลือกผลลำไยทั้ง 3 ตัวอย่าง หลังการบ่มกับสารสกัดครบ 24 ชั่วโมง และหลังการบ่ม MTT 4 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.14 ร้อยละการมีชีวิตของ RAW 264.7 cell หลังจากทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลลำไยทั้ง 3 ตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี MTT

ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ วิริยา และคณะ (2561) ศึกษาการทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์แมคโครฟาจ (RAW 264.7) ของสารสกัดจากเมล็ดลำไยเถาที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท เอทานอล และน้ำ ที่ความเข้มข้น 62.5-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าไม่มีผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ มีเปอร์เซ็นต์เซลล์การรอดชีวิตของเซลล์เกิน 90 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นสารสกัดจากเมล็ดลำไยเถาที่สกัดด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีการรอดชีวิตลดลงเหลือ 83 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปอร์เซ็นต์ และงานวิจัยของ Huang (2012) ศึกษาการการทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์แมโครฟาจ (RAW 264.7) ของสารสกัดจากเปลือกผลลำไยต้นที่สกัดด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้น 50-400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าไม่มีผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์เกิน 80 เปอร์เซ็นต์ หากพิจารณาจากในส่วนของสารสกัดลำไยจากสายพันธุ์เดียวกัน พบว่าสารสกัดจากเมล็ดลำไยเถาในงานวิจัยข้างต้นกับผลการทดลองสารสกัดจากเปลือกผลลำไยเถาในครั้งนี้มีความสอดคล้องกัน แต่ในส่วนของสารสกัดจากเปลือกผลลำไยต้นที่สกัดด้วยน้ำในรายงานก่อนหน้านี้พบว่าผลร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ที่สูง ในขณะที่สารสกัดจากเปลือกผลลำไยต้นสายพันธุ์อีดอมีร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์น้อยกว่าอาจเป็นผลเนื่องจากชนิดของตัวทำลายที่ใช้ในการสกัดสารแตกต่างกันมีผลต่อความสามารถในการสกัดสารสำคัญต่าง ๆ ที่แตกต่างกันเช่นเดียวกัน

4.3.2.6 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์

หลังจากการศึกษาฤทธิ์ความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลของลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อีดอด้วยวิธี nitric oxide scavenging assay (NOA) และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ชนิดแมโครฟาจ (RAW 264.7) แล้วพบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัม สารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถามีร้อยละการมีชีวิตรอดต่อเซลล์มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีดอมีร้อยละการมีชีวิตรอดต่อเซลล์มากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ จึงนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ในเซลล์ชนิดแมโครฟาจ (RAW 264.7) ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบโดยใช้สาร lipopolysaccharides (LPS) ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้สารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลของลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อีดอที่ความเข้มข้น 62.5-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับ Indomethacin ที่เป็นตัวควบคุมเชิงบวก ที่ความเข้มข้น 62.5-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดจาก Thao1 และThao2 มีค่าร้อยละการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์อยู่ในช่วง 47.65-89.48 และ 45.33-89.68 ตามลำดับ จากค่าร้อยละการความสามารถต้านการอักเสบพบว่าสารสกัด Thao1 และ Thao2 มีความสามารถในการยับยั้งที่ไม่ต่างกันเมื่อวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติ และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.60 และ 8.77 ตามลำดับ ในส่วนของสารสกัดจากลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ Edo1 มีค่าร้อยละการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์เทียบเท่ากับสารสกัดจาก Thao1 และ Thao2 โดยมีค่าร้อยละการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์อยู่ในช่วง 41.76-89.76 และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 9.74 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 4.12 เมื่อเปรียบเทียบร้อยละความสามารถในการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ของสารสกัดกับตัวควบคุมเชิง

บวพบพบว่า สารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อู่โตมีความสามารถเทียบเท่ากับตัวควบคุมเชิงบวกที่เป็นยาต้านอักเสบ Indomethacin

ตารางที่ 4.12 ค่าร้อยละความสามารถในการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ในเซลล์ RAW 264.7 และค่า IC₅₀ ของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลของลำไยทั้ง 3 ตัวอย่าง

สารสกัด	ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าร้อยละการยับยั้งการ หลั่งไนตริกออกไซด์	IC ₅₀ (µg/ml)
Thao1	6.25	47.65 ^b ±1.49	7.60
	12.5	59.14 ^a ±1.91	
	25	67.30 ^a ±4.16	
	50	78.27 ^a ±2.00	
	100	84.94 ^a ±2.14	
	200	89.48 ^a ±3.44	
	Thao2	6.25	
12.5		57.17 ^a ±3.33	
25		65.27 ^a ±2.78	
50		76.65 ^a ±1.99	
100		84.02 ^a ±2.47	
200		89.68 ^a ±3.27	
Edor		6.25	41.76 ^c ±1.49
	12.5	56.94 ^a ±1.23	
	25	65.77 ^a ±2.72	
	50	75.56 ^a ±2.49	
	100	82.63 ^a ±1.91	
	200	89.76 ^a ±1.69	

หมายเหตุ ตัวอักษร a-c ในความเข้มข้นเดียวกันแสดงความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT), $p < 0.05$ และเครื่องหมาย < แสดงค่า IC₅₀ ที่น้อยกว่า 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.12 ค่าร้อยละความสามารถในการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ในเซลล์ (RAW 264.7) และค่า IC₅₀ ของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลของลำไยทั้ง 3 ตัวอย่าง (ต่อ)

สารสกัด	ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าร้อยละการยับยั้งการ หลั่งไนตริกออกไซด์	IC ₅₀ (µg/ml)
Indomethacin	6.25	54.76 ^a ±1.68	<6.25
	12.5	59.22 ^a ±0.42	
	25	68.15 ^a ±1.26	
	50	78.86 ^a ±1.26	
	100	83.03 ^a ±0.42	
	200	88.98 ^a ±0.42	

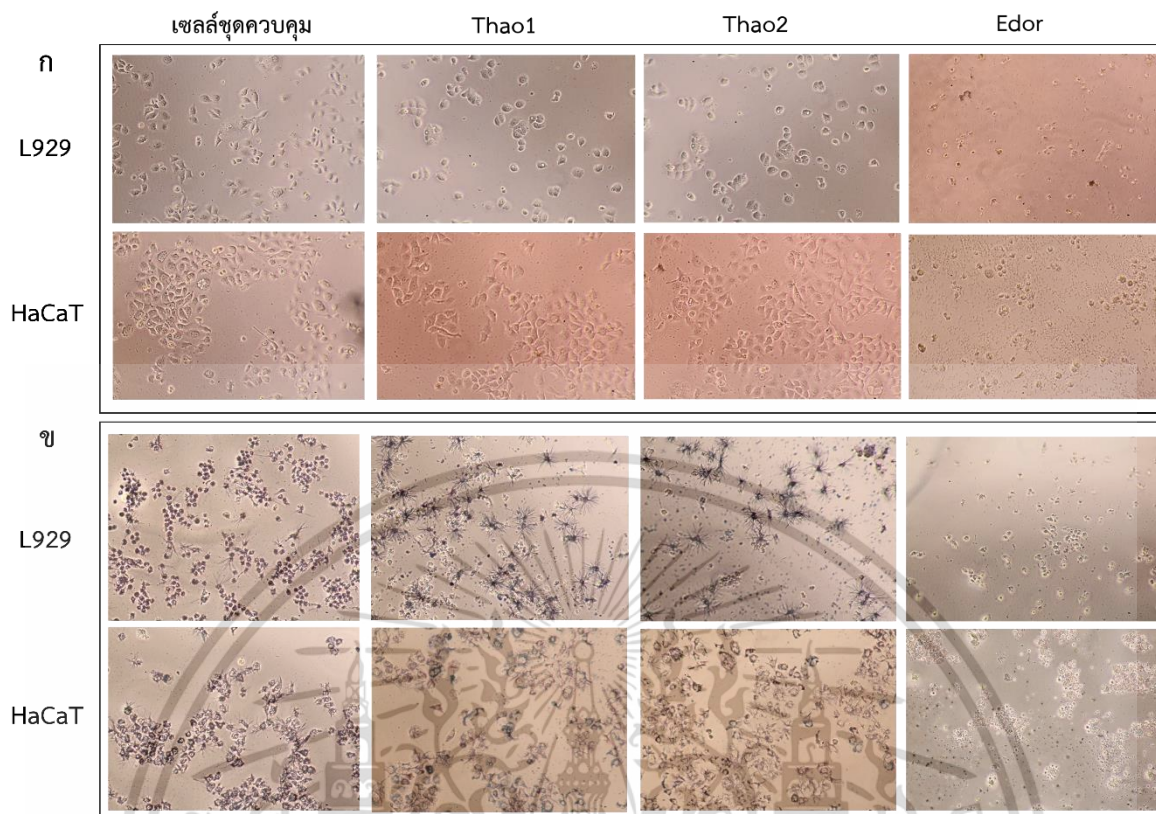
หมายเหตุ ตัวอักษร a-c ในความเข้มข้นเดียวกันแสดงความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT), $p < 0.05$ และเครื่องหมาย < แสดงค่า IC₅₀ ที่น้อยกว่า 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากงานวิจัยที่ผ่านมายังไม่พบการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ในเซลล์ชนิดแมคโครฟาจในสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถา มีเพียงการศึกษาสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยต้น โดยงานวิจัยของงานวิจัยของ Huang และคณะ (2012) ศึกษาฤทธิ์การต้านไนตริกออกไซด์ในเซลล์ชนิดแมคโครฟาจ (RAW 264.7) ของสารสกัดเปลือกผลลำไยต้นที่สกัดด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้น 50-400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสามารถในการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 179.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับกรดแกลลิก และคอร์ลาจิก ที่มีความสามารถในการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ พบว่ามีค่า IC₅₀ เท่ากับ 18.8 และ 5.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และรายงานวิจัยของวิริยา (2560) ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ภายในเซลล์ชนิดแมคโครฟาจ (RAW 264.7) ของสารสกัดจากดอกลำไยต้น เมล็ดลำไยต้น เนื้อผลลำไยต้น และเมล็ดลำไยเถา ที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท เอทานอล และน้ำ พบว่าสารสกัดจากเมล็ดลำไยเถาที่สกัดด้วยน้ำมีความสามารถในการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ได้สูงสุด รองลงมาคือสารสกัดเมล็ดลำไยเถาที่สกัดด้วยเอทานอล และเอทิลอะซิเตท โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 465.94, 628.20 และ 957.84 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลของลำไยเถา Thao1 Thao2 และเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีโด E Dor มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 7.60, 8.77 และ 9.74 ซึ่งน้อยกว่าสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยต้นและเมล็ดลำไยเถาในรายงานข้างต้น หมายถึง มีความสามารถในการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ที่สูงกว่า

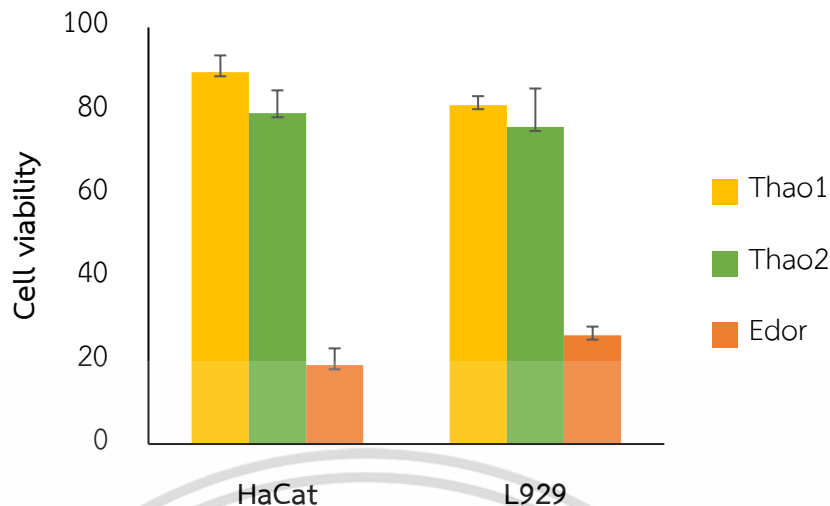
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2.7 ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์

ในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 2 ชนิด คือ เซลล์เคอราติโนไซท์มนุษย์ (Human Keratinocyte Cell) ชนิด HaCaT และเซลล์ผิวหนังของหน้ของหนู (Mouse fibroblast cell line) ชนิด L929 ด้วยวิธี MTT โดยรายงานผลเป็นร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ (cell viability) จากผลการทดลองพบว่าหลังจากการบ่มสารสกัดที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถา Thao1 และ Thao2 มีลักษณะเซลล์ทั้ง 2 ชนิด เป็นลักษณะปกติ ในขณะที่สารสกัดจากเปลือกผลของลำไยต้นมีลักษณะเซลล์ทั้ง 2 ชนิด มีลักษณะเปลี่ยนไปจากปกติ สังเกตจากเซลล์มีลักษณะกลม ผิดรูป และหลุดลอยจากพื้นผิวของหลุม ดังภาพที่ 4.15 และเมื่อสังเกตลักษณะของเซลล์ทั้ง 2 ชนิด หลังบ่มด้วยสารละลาย MTT เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ในหลุมของตัวอย่างสารสกัดจากเปลือกผลลำไยเถาพบผลึกฟอรัมมาซานในทุกหลุมการผลทดลอง หมายถึง พบเซลล์มีชีวิต ส่วนของหลุมสารสกัดจากเปลือกผลลำไยต้นสายพันธุ์อีโดไม่พบผลึกฟอรัมมาซานเกิดขึ้น หมายถึง ไม่พบเซลล์มีชีวิต ดังภาพที่ 4.15 และจากคำนวณค่าร้อยละการมีชีวิตรอดพบว่า สารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถา Thao1 มีค่าร้อยละการมีชีวิตรอดต่อเซลล์ L929 และ HaCaT เท่ากับ 81.36 ± 2.62 และ 89.25 ± 2.37 ตามลำดับ และสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถา Thao2 มีค่าร้อยละการมีชีวิตรอดต่อเซลล์ L929, HaCaT เท่ากับ 76.11 ± 9.21 และ 79.41 ± 5.46 ตามลำดับ โดยสารสกัดจากเปลือกผลลำไยเถา Thao1 และ Thao2 จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถาทั้ง 2 ตัวอย่าง มีร้อยละการมีชีวิตรอดต่อเซลล์มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ มีค่าใกล้เคียงกับชุดควบคุม แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถาไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ทั้ง 2 ชนิด ในส่วนของสารสกัดจากเปลือกผลลำไยต้นสายพันธุ์อีโด Edo ค่าร้อยละการมีชีวิตรอดต่อเซลล์ L929 และ HaCaT เท่ากับ 26.07 ± 2.12 และ 18.94 ± 4.01 ตามลำดับ มีค่าร้อยละการมีชีวิตรอดต่อเซลล์น้อยกว่าชุดควบคุม แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเปลือกผลลำไยต้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับสูง แสดงดังภาพที่ 4.16



ภาพที่ 4.15 ลักษณะเซลล์เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ Inverted microscope ที่กำลังขยาย 100 เท่า เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ชุดควบคุม กับเซลล์ที่ทดสอบสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยทั้ง 3 ตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยภาพ (ก) หลังการบ่มเซลล์กับสารสกัดครบ 24 ชั่วโมง และภาพ (ข) หลังจากเติม MTT เป็นเวลา 4 ชั่วโมงของเซลล์ L929 และ HaCaT



ภาพที่ 4.16 ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ L929 และ HaCaT หลังจากทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลลำไยทั้ง 3 ตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี MTT

นอกจากนี้จากรายงานวิจัยของกฤษฎา (2562) ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังของหนูชนิด L929 ของสารสกัดจากเมล็ดลำไยเถา และเมล็ดลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ ที่สกัดด้วยเมทานอล โดยใช้ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการทดสอบ พบว่าสารสกัดจากเมล็ดลำไยเถามีค่าร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์สูงกว่าชุดควบคุม และสามารถส่งเสริมการแบ่งตัวของเซลล์ผิวหนังได้ ในขณะที่สารสกัดจากเมล็ดลำไยต้นสายพันธุ์อีดอมีร้อยละการรอดชีวิตที่น้อยกว่าสารสกัดจากเมล็ดลำไยเถา และไม่สามารถส่งเสริมการแบ่งตัวของเซลล์ได้ และจากงานวิจัยของอรุณญา (2555) นำสารสกัดจากเปลือกผลลำไยต้นทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธี MTT โดยทดสอบกับเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร SGC-7901 เซลล์มะเร็งตับ HepG2 และเซลล์มะเร็งปอด A-549 พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลลำไยต้นที่ความเข้มข้น 500-1500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ทั้ง 2 ชนิด มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลงเหลือ 79 และ 75 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีผลกับเซลล์มะเร็งตับ HepG2

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพด้านต่าง ๆ ของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลลำไยทั้งสองสายพันธุ์ รวม 3 ตัวอย่าง พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถา Thao1 และ Thao2 ทั้ง 2 ตัวอย่าง มีฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านต่าง ๆ สอดคล้องไปในทางทิศเดียวกัน โดยสารสกัดเปลือกผลของลำไยเถา Thao 2 มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงกว่าสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถา Thao1 เล็กน้อย อาจเป็นเพราะว่าสารสกัดเปลือกผลของลำไยเถา Thao2 เป็นตัวอย่างเปลือกผลของลำไยเถาที่

รวบรวมจากหลายสถานที่ส่งผลให้มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สูงกว่า ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจะรวมสารสกัดเมทานอลของเปลือกผลของลำไยเถาทั้งสองตัวอย่าง เป็นตัวแทนของสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถา และจากการพิจารณาเปรียบเทียบสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถาทั้งสองชนิดกับสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีตอพบว่าสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถามีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น้อยกว่าสกัดจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีตอ ยกเว้นฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *P. acnes* และฤทธิ์ต้านไนตริกออกไซด์ที่สารสกัดทั้งสองสายพันธุ์ให้ผลไม่ต่างกัน ในการศึกษาต่อไปจึงนำสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถา Thao และสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีตอ Edor ไปแยกความบริสุทธิ์โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายชั้นต่าง ๆ ในเทคนิค liquid-liquid extraction และศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *P. acnes* และฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์ต่อไป

4.3.3 ผลการสกัดสารจากเปลือกผลของลำไยด้วยเทคนิค Liquid-liquid extraction

นำสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อีตอมาสกัดต่อด้วยวิธี Liquid-liquid extraction ที่ใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน โดยใช้หลักการแยกสารต่าง ๆ ตามคุณสมบัติความมีขั้ว โดยหากสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพอยู่ในกลุ่มที่มีขั้วเหมือนกันจะถูกสารสกัดออกมาในตัวทำละลายชนิดเดียวกัน ในการสกัดครั้งนี้ใช้ตัวทำละลาย 5 ชนิด โดยเรียงจากความมีขั้วจากสารที่มีขั้วต่ำไปสารที่มีขั้วสูงคือ เฮกเซน (H) ไดคลอโดมีเทน (D) เอทิลอะซิเตท (E) บิวทานอล (B) และน้ำ (W) ทำให้ได้สารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถา และเปลือกผลของลำไยอีตอรวม 10 สารสกัด โดยแบ่งเป็นสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถา 5 สารสกัด และสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีตอ 5 สารสกัดคือ สารสกัดชั้นเฮกเซนของเปลือกผลของลำไยเถา (TH) สารสกัดชั้นไดคลอโดมีเทนของเปลือกผลของลำไยเถา (TD) สารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตทของเปลือกผลของลำไยเถา (TE) สารสกัดชั้นบิวทานอลของเปลือกผลของลำไยเถา (TB) สารสกัดชั้นน้ำของเปลือกผลของลำไยเถา (TW) สารสกัดชั้นเฮกเซนของเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีตอ (TE) สารสกัดชั้นไดคลอโดมีเทนของเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีตอ (ED) สารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตทของเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีตอ (EE) สารสกัดชั้นบิวทานอลของเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีตอ (EB) และสารสกัดชั้นน้ำของเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีตอ (EW) เมื่อนำสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลของลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อีตอจำนวนอย่างน้อย 50 กรัม มาสกัดด้วยตัวทำละลาย 5 ชนิดดังข้างต้น พบว่ามีน้ำหนักของสารสกัด ร้อยละผลได้ ลักษณะ และสีของสารสกัดในแต่ละชั้นตัวทำละลาย ดังตารางที่ 4.13

จากการสกัดสารด้วยวิธี Liquid-liquid extraction พบว่าน้ำหนักทั้งหมดของสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถาในชั้นตัวทำละลายต่าง ๆ มีค่าเท่ากับ 45.75 กรัม คิดเป็นค่าผลได้ร้อยละ 76.25 ในส่วนของสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อิตอมมีค่าเท่ากับ 38.68 กรัม คิดเป็นค่าผลได้ร้อยละ 64.46 โดยเมื่อพิจารณาค่าร้อยละผลได้ของสารสกัดในชั้นตัวทำละลายต่าง ๆ พบว่าสารตัวทำละลายส่วนใหญ่ที่อยู่ในเปลือกผลของลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อิตอม จะเป็นสารที่มีขั้วสูง คือ ชั้นน้ำ เนื่องจากมีค่าร้อยละผลได้ของสารสกัดสูงสุดอยู่ที่ 49.96 และ 44.26 ตามลำดับ รองลงมา ในส่วนของสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถาเป็นสารขั้วต่ำคือ เฮกเซน บิวทานอล เอทิลอะซิเตท และไดคลอโรมีเทน ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างในค่าผลร้อยละของสารสกัดของเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อิตอม ที่เป็นสารขั้วต่ำ คือ บิวทานอล เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และไดคลอโรมีเทน ตามลำดับ หลังจากนั้นนำสารสกัดในชั้นตัวทำละลายต่าง ๆ จำนวน 10 สาร ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้านการยับยั้งแบคทีเรีย *P. acnes* และต้านอักเสบโดยการการยับยั้งไนตริกออกไซด์

ตารางที่ 4.13 น้ำหนัก ร้อยละผลได้ ลักษณะ และสีของสารสกัดในชั้นตัวทำละลายต่าง ๆ ของสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อิตอมด้วยวิธี Liquid-liquid extraction

สารสกัด	น้ำหนัก (กรัม)	ผลได้ (ร้อยละ)	ลักษณะของสารสกัด	สีของสารสกัดหลังระเหยตัวทำละลาย	รหัสสีสกัด
TH	7.53	15.06	เป็นก้อนแข็ง		RHS165A
TD	3.62	7.24	เป็นก้อนแข็ง		RHS166A
TE	4.24	8.48	เป็นผง		RHSN167A
TB	5.38	10.76	เป็นก้อนเหนียว		RHSN199C
TW	24.98	49.96	เป็นของเหลวหนืดข้น		RHS166A
รวม	45.75	76.25			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.13 น้ำหนัก ร้อยละผลได้ ลักษณะ และสีของสารสกัดในชั้นตัวทำละลายต่าง ๆ ของสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อีดอด้วยวิธี Liquid-liquid extraction (ต่อ)

สารสกัด	น้ำหนัก (กรัม)	ผลได้ (ร้อยละ)	ลักษณะของสารสกัด	สีของสารสกัดหลังระเหยตัวทำละลาย	รหัสสีสกัด
EH	4.11	8.22	เป็นของเหลวหนืด		RHSN199A
ED	3.15	6.30	เป็นก้อนเหนียว		RHS200B
EE	4.19	8.38	เป็นผง		RHS166A
EB	5.10	10.20	เป็นของเหลวหนืดข้น		RHS166A
EW	22.13	44.26	เป็นของเหลวหนืดข้น		RHS166A
รวม	38.68	64.46			

4.3.4 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยที่สกัดด้วยเทคนิค Liquid-liquid extraction

จากผลการทดลองนำสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อีดอที่สกัดสารจากตัวทำละลายชั้นต่าง ๆ ด้วยเทคนิค Liquid-liquid extraction ได้สารสกัดจากเปลือกผลของลำไยทั้งสองตัวอย่างรวมจำนวนทั้งหมด 10 สาร ทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย *P. acnes* ด้วยวิธี paper disk diffusion โดยใช้สารสกัดความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อดิสก์ และใช้ยาปฏิชีวนะเจนตามัยซินที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ จากผลการทดลองสารสกัดจากเปลือกผลลำไยเถา มี 4 สารสกัด ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. acnes* ได้ คือ TH, TD, TE และ TB โดยมีค่าบริเวณการยับยั้งเท่ากับ 13.48 ± 1.29 , 23.63 ± 2.92 , 24.55 ± 1.85 และ 23.21 ± 2.02 มิลลิเมตร ตามลำดับ ดังภาพที่ 4.17 (ก) ในขณะที่สารสกัดจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีดอมีเพียง 3 สารสกัดที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. acnes* ได้ คือ ED, EE และ EB

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยมีค่าบริเวณการยับยั้งเท่ากับ 21.94 ± 3.46 , 21.25 ± 5.71 และ 14.63 ± 1.60 ดังภาพที่ 4.17 (ข) จากภาพที่ 4.17 ก และ ข แสดงเฉพาะสารสกัดที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes*



ภาพที่ 4.17 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* (ก) สารสกัดชั้นตัวทำละลายบิวทานอลของสารสกัดจากเปลือกผลลำไยเถา และ (ข) สารสกัดชั้นตัวทำละลายบิวทานอลของสารสกัดจากเปลือกผลลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ โดยตัวอักษรในภาพ (ก) สารสกัดจากเปลือกผลลำไยเถา (TH, TD, TE และ TB) และตัวอักษรในภาพ (ข) สารสกัดจากเปลือกผลลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ (ED, EE และ EB) ส่วน N คือ ตัวควบคุมเชิงลบ หรือเมทานอล และ P คือ ตัวควบคุมเชิงบวก หรือยาปฏิชีวนะเจนตามัยซินที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อดิสก์

จากการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) สารสกัดตัวทำละลายชั้นต่าง ๆ จากเปลือกผลของลำไยเถาจากจำนวนทั้งหมด 5 สาร พบว่ามี 4 สารสกัด ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* ได้ดีกว่าสารสกัดชั้นตัวทำละลายจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ และมีค่าบริเวณการยับยั้งใกล้เคียงกับยาปฏิชีวนะเจนตามัยซิน คือ TH, TD, TE และ TB ส่วนสารสกัดชั้นตัวทำละลายต่าง ๆ ของสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีดอจากจำนวนทั้งหมด 5 สาร พบว่ามี 3 สารสกัด ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* คือ ED, EE และ EB โดยสารสกัดในชั้นตัวทำละลาย EE ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้สูงเทียบเท่าสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถาในตัวอย่าง TE และ TB และหากพิจารณาค่าบริเวณวงใสในการยับยั้งของสารสกัดที่แยกชั้นด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ของสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถา (Thao1, Thao2) ดังตารางที่ 4.14 เปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบเมทานอล ที่ความเข้มข้นสารสกัด 5 มิลลิกรัมต่อดิสก์ มีค่าบริเวณวงใสเฉลี่ย 25.47 มิลลิเมตร พบว่าฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดเปลือกผลของลำไยเถาในชั้นตัวทำละลายต่าง ๆ มีค่าสูงกว่าสารสกัดเมทานอล อาจเป็นผลมาจากสารสกัดเมทานอลเป็นสารทำตัวละลายที่มีขี้สูงจึงสามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สกัดสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต่าง ๆ ออกได้ในจำนวนมาก ซึ่งสารออกฤทธิ์บางชนิดออกจะออกฤทธิ์ลดทอนฤทธิ์กัน ในขณะที่การสกัดด้วยเทคนิค liquid-liquid extraction เป็นการแยกสารสกัดตัวทำสารละลายชนิดต่าง ๆ ตามความมีขั้วโดยแบ่งเป็นสารมีขั้วต่ำ ขั้วกลาง และขั้วสูง โดยสารออกฤทธิ์ที่ขั้วต่างกันจะถูกแยกออกจากกันในแต่ละชั้นของตัวทำละลาย ส่งผลให้สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในสารสกัดแต่ละชั้นตัวทำละลายมีความบริสุทธิ์ของสารมากขึ้น ทำให้สารสามารถออกฤทธิ์สูงกว่าสารสกัดเมทานอล

ตารางที่ 4.14 บริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* ของสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยที่สกัดด้วยเทคนิค Liquid-liquid extraction ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อดิสก์ และยาปฏิชีวนะเจนตามัยซินที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์

สารสกัด	บริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (มิลลิเมตร)	สารสกัด	บริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (มิลลิเมตร)
TH	13.48 ^c ±1.29	EH	0
TD	23.63 ^{ab} ±2.92	ED	21.94 ^b ±3.46
TE	24.55 ^a ±1.85	EE	21.25 ^b ±5.71
TB	23.21 ^{ab} ±2.02	EB	14.63 ^c ±1.60
TW	0	EW	0
เจนตามัยซิน	25.05±0.267		

หมายเหตุ ตัวอักษร a-c ในตารางแสดงความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT), $p < 0.05$

4.3.5 ผลการศึกษาฤทธิ์ความสามารถการยับยั้งไนตริกออกไซด์ และฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ของสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยที่สกัดด้วยเทคนิค Liquid-liquid extraction

จากผลการทดลองสารสกัดจากเปลือกผลลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ จำนวน 10 สาร ทดสอบฤทธิ์การต้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งไนตริกออกไซด์ nitric oxide scavenging assay (NOA) โดยใช้ Sodium nitroprusside (SNP) ในการทดสอบกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 12.5-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น 12.5-125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการทดลองสามารถคำนวณค่าร้อยละการยับยั้ง

ไนตริกออกไซด์ของสารสกัดชั้นตัวทำละลายจากเปลือกผลของลำไยเถา (TH, TD, TE, TB, TW) มีค่าเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ร้อยละอยู่ในช่วง 19.44-53.88 (ตารางภาคผนวก ข-13) โดยสารสกัดจากชั้นตัวทำละลายบิวทานอล (TB) มีค่าร้อยละการยับยั้งสูงสุด คือ 53.88 ± 1.56 ดังตารางที่ 4.14 ในส่วนของสารสกัดชั้นตัวทำละลายจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีตอ (EH, ED, EE, EB, EW) มีค่าร้อยละอยู่ในช่วง 18.33-52.77 โดยสารสกัดจากชั้นตัวทำละลายเฮกเซน (EH) มีค่าร้อยละการยับยั้งสูงสุด คือ 52.77 ± 1.46 ดังตารางที่ 4.15 นอกจากนี้ผลการคำนวณความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) ของสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถามีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 79.06-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีตอ มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 86.94-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้พบว่าสารสกัดของเปลือกผลลำไยเถา TD, TE และ TW มีค่า $IC_{50} < 100$ ในขณะที่สารสกัดเปลือกผลของลำไยเถาจากชั้นบิวทานอล (TB) มีค่า IC_{50} น้อยที่สุดคือ 79.06 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กล่าวคือ สารสกัดจากในชั้นบิวทานอลของเปลือกผลลำไยเถา (TB) มีความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้สูงที่สุดโดยใช้ความเข้มข้นสารสกัดน้อย นอกจากนี้พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีตอ ED และ EW มีค่า $IC_{50} > 100$ และสารสกัดในชั้นเฮกเซนของสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีตอ (EH) มีค่า IC_{50} น้อยที่สุดคือ 86.94 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์จากสารสกัดจำนวน 10 พบว่า สารสกัดจากเปลือกผลลำไยเถาในชั้นบิวทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแอสคอร์บิก ที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 68.46 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าทุกตัวอย่างของสารสกัดมีความสามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้น้อยกว่าสารมาตรฐานแอสคอร์บิกได้

ตารางที่ 4.15 ผลค่าร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์และค่า IC_{50} ของสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถาและลำไยต้นสายพันธุ์อีตอที่สกัดด้วยเทคนิค Liquid-liquid extraction

สารสกัดจาก เปลือกผลลำไย	ร้อยละความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์					IC_{50}
	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)					
	12.5	25	50	100		
TH	$29.83^b \pm 1.78$	$35.00^a \pm 0.84$	$41.66^a \pm 2.54$	$52.61^a \pm 1.46$	88.17	
TD	$25.55^b \pm 2.77$	$29.11^b \pm 2.50$	$35.00^b \pm 1.15$	$44.66^b \pm 0.84$	>100	
TE	$29.27^b \pm 1.46$	$35.22^a \pm 1.95$	$37.22^b \pm 1.66$	$43.33^b \pm 1.69$	>100	
TB	$33.33^a \pm 0.84$	$36.66^a \pm 2.22$	$43.55^a \pm 1.15$	$53.88^a \pm 1.56$	79.06	
TW	$19.44^c \pm 2.62$	$25.00^b \pm 1.15$	$29.83^c \pm 2.10$	$42.77^b \pm 2.31$	>100	

หมายเหตุ ตัวอักษร a-d ในตารางแสดงความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT), $p < 0.05$ และเครื่องหมาย > แสดงค่า IC_{50} ที่มีค่ามากกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.15 ผลค่าร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์และค่า IC_{50} ของสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถาและลำไยต้นสายพันธุ์อีดอที่สกัดด้วยเทคนิค Liquid-liquid extraction (ต่อ)

สารสกัดจากเปลือกผลลำไย	ร้อยละความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์				IC_{50}
	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)				
	12.5	25	50	100	
EH	30.00 ^a ±2.54	38.72 ^a ±0.84	44.11 ^a ±0.64	52.77 ^a ±1.46	86.94
ED	23.33 ^b ±2.77	25.55 ^c ±2.50	33.88 ^b ±0.64	40.94 ^b ±0.84	>100
EE	31.66 ^a ±1.46	36.88 ^b ±1.91	41.11 ^a ±1.46	50.94 ^a ±0.84	96.05
EB	35.55 ^a ±0.84	40.55 ^a ±2.00	43.88 ^a ±0.64	52.22 ^a ±1.46	89.31
EW	18.33 ^c ±1.39	23.22 ^c ±0.72	32.05 ^b ±1.11	41.33 ^b ±2.74	>100

หมายเหตุ ตัวอักษร a-d ในตารางแสดงความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT), $p < 0.05$ และเครื่องหมาย > แสดงค่า IC_{50} ที่มีค่ามากกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

หลังจากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์ของสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยที่สกัดด้วยเทคนิค Liquid-liquid extraction ด้วยวิธี NOA แล้วจึงนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ในเซลล์ชนิดแมคโครฟาจ (RAW 264.7) โดยใช้สารสกัดจากเปลือกผลของลำไยทั้งสองสายพันธุ์ที่ความเข้มข้น 12.5-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับ Indomethacin เป็นตัวควบคุมเชิงบวก ที่ความเข้มข้น 12.5-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถา (TH, TD, TE, TB, TW) มีค่าร้อยละความสามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์อยู่ในช่วง 39.66-51.87 (ตารางภาคผนวก ข-14) และมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 82.92-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงดังตารางที่ 4.16 ส่วนสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ (EH, ED, EE, EB, EW) มีค่าร้อยละความสามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์อยู่ในช่วง 38.89-51.87 และมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 71.79-100.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 4.17 ทั้งนี้พบว่าสารสกัดของเปลือกผลของลำไยเถา TD, TE, TW และสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ ED, EE และ EW มีค่า $IC_{50} > 100$ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการทดสอบการยับยั้งไนตริกออกไซด์ด้วยวิธี nitric oxide scavenging assay (NOA) ที่ใช้สาร SNP ในการทดสอบ โดยที่สารสกัดเปลือกผลลำไยเถาจากชั้นบิวทานอล (TB) มีความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ที่ดีที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 82.92 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดในชั้นเฮกเซนของสารสกัดจากเปลือกผลลำไยต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สายพันธุ์อีตอ (EH) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 71.79 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์จากสารสกัดจำนวน 10 สาร กับตัวควบคุมเชิงบวก Indomethacin ที่เป็นยาต้านอักเสบ ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 13.28 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อีตอมีค่าน้อยกว่าตัวควบคุมเชิงบวก Indomethacin ซึ่งเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเปลือกผลลำไยในชั้นตัวทำละลายต่าง ๆ กับสารสกัดหยาบเมทานอลจากเปลือกผลของลำไยเถา Thao1 และ Thao2 และลำไยต้นสายพันธุ์อีตอ Eдор ที่มีความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์มีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.60-9.24 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าฤทธิ์ในการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ของสารสกัดเปลือกผลลำไยเถาในชั้นตัวทำละลายต่าง ๆ จะมีค่าต่ำกว่าสารสกัดเมทานอลอาจเป็นผลมาจากการแยกสารสกัดตัวทำละลายละลายชนิดต่าง ๆ ซึ่งสารออกฤทธิ์ที่ขั้วต่างกันจะถูกแยกออกจากกันในแต่ละชั้นของตัวทำละลาย จึงเป็นผลทำให้สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในสารสกัดแต่ละชั้นตัวทำละลายมีฤทธิ์ต่ำกว่าสารสกัดเมทานอลตามที่ได้กล่าวไปในข้างต้น

ตารางที่ 4.16 ค่าร้อยละความสามารถในการต้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ในเซลล์ RAW 264.7 และค่า IC_{50} ของสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถาที่สกัดด้วยเทคนิค Liquid-liquid extraction

สารสกัดจากเปลือก ผลลำไยเถา	ร้อยละความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์				IC_{50}
	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)				
	12.5	25	50	100	
TH	39.73 ^b ±5.17	45.51 ^a ±0.21	47.60 ^b ±0.98	51.17 ^a ±0.20	89.40
TD	41.56 ^a ±1.97	45.13 ^a ±0.32	47.10 ^b ±0.44	48.75 ^b ±0.74	>100
TE	41.30 ^a ±0.82	45.13 ^a ±0.41	47.41 ^b ±0.71	48.94 ^b ±0.69	>100
TB	42.07 ^a ±0.26	46.79 ^a ±1.16	49.62 ^a ±1.98	51.87 ^a ±0.25	82.92
TW	39.66 ^b ±1.42	44.36 ^b ±0.77	47.94 ^b ±2.17	49.33 ^b ±0.93	>100
Indomethacin	48.97±0.32	64.85±2.07	70.56±0.61	81.13±0.61	13.28

หมายเหตุ ตัวอักษร a-c ในตารางแสดงความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT), $p < 0.05$ และเครื่องหมาย > แสดงค่า IC_{50} ที่มีค่ามากกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.17 ค่าร้อยละความสามารถในการต้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ ในเซลล์ RAW 264.7 และค่า IC₅₀ ของสารสกัดจากเปลือกผลลำไยต้นสายพันธุ์ อีตอที่สกัดด้วยเทคนิค Liquid-liquid extraction

สารสกัดจากเปลือกผล ลำไยต้นสายพันธุ์อีตอ	ร้อยละความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์				IC ₅₀
	ความเข้มข้น (µg/ml)				
	12.5	25	50	100	
EH	41.32 ^a ±1.33	46.61 ^a ±1.09	49.22 ^a ±1.09	51.87 ^a ±0.25	71.79
ED	41.81 ^a ±0.09	45.01 ^a ±1.22	46.91 ^b ±0.74	49.33 ^a ±0.93	>100
EE	40.30 ^a ±1.59	43.44 ^b ±2.38	48.18 ^a ±0.37	49.54 ^a ±0.80	>100
EB	40.29 ^a ±0.12	47.17 ^a ±1.07	49.20 ^a ±0.32	51.34 ^a ±2.63	83.27
EW	38.89 ^b ±2.52	43.75 ^b ±0.08	46.28 ^b ±0.88	48.44 ^a ±0.73	>100
Indomethacin	48.97±0.32	64.85±2.07	70.56±0.61	81.13±0.61	13.28

หมายเหตุ ตัวอักษร a-c ในตารางแสดงความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT), p<0.05 และเครื่องหมาย > แสดงค่า IC₅₀ ที่มีค่ามากกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการทดลองพบว่าสารสกัดในแต่ละชั้นตัวทำละลายมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกัน อาจขึ้นอยู่กับชนิดของสาร และปริมาณของสารสกัดในแต่ละชั้นตัวทำละลาย เนื่องจากสารสกัดในแต่ละชั้นตัวทำละลายมีคุณสมบัติความมีขั้วต่างกัน จากงานวิจัยของชนิกา และคณะ (2555) ตัวทำละลายเฮกเซนเป็นสารขั้วต่ำ เป็นของเหลวใส ไม่มีสี สามารถสกัดสารจำพวกน้ำมัน ไขมัน ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน เป็นสารขั้วกลาง ใสไม่มีสี ไม่ละลายน้ำ สามารถถูกออกซิไดซ์โดยอนุมูลอิสระ ไฮดรอกซิลได้ สามารถสกัดสารจำพวกอัลคาลอยด์ แอนไซยานินดิน หรืออะไกลโคโคน และสารในกลุ่มน้ำมันหอมระเหย ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทเป็นสารขั้วกลางที่มีขั้วสูงกว่าไดคลอโรมีเทน ใสไม่มีสี สามารถละลายในไดเอทิลอีเทอร์ หรือกลีเซอริน สามารถสกัดสารจำพวกฟีนอลิก อัลคาลอยด์ และไกลโคไซด์ ตัวทำละลายบิทานอลเป็นสารขั้วสูง ไม่ละลายน้ำ นิยมใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมยาปฏิชีวนะ และวิตามิน และน้ำเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูงสุดสามารถสกัดสารจำพวกน้ำตาล กรดอะมิโน และไกลโคไซด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

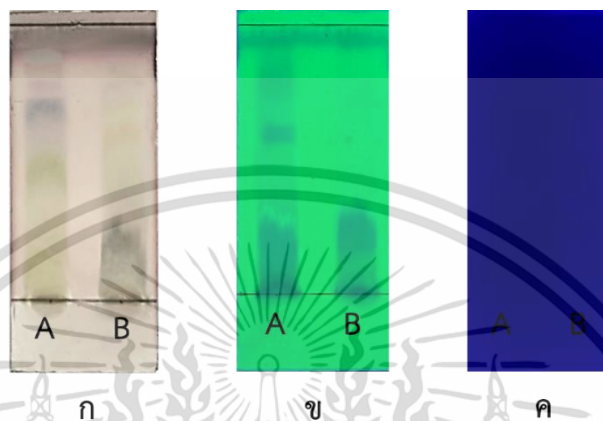
ในการศึกษาสารสกัดจากเปลือกผลลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อีดอที่สกัดด้วยเทคนิค Liquid-liquid extraction ในการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ พบว่าสารสกัดตัวทำละลายชั้นบิวทานอล เป็นสารที่มีชีวสูงของสารสกัดจากเปลือกผลลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อีดอมีฤทธิ์ทางชีวภาพในทั้งสองการทดลองที่สูงกว่า สารสกัดในตัวทำละลายอื่น ๆ ซึ่งสารสกัดในชั้นบิวทานอลยังไม่สามารถระบุ จำแนก ชนิดของสารสำคัญภายในตัวทำละลายบิวทานอลได้ว่ามีองค์ประกอบสารสำคัญ และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพตัวใดบ้าง ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจึงคัดเลือกสารสกัดในชั้นตัวทำละลายบิวทานอลของสารสกัดเปลือกผลลำไยเถา (TB) และเปลือกผลลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ (EB) มาทำการศึกษาโดยการทำให้สารสกัดบริสุทธิ์มากขึ้นด้วยวิธี Column chromatography และนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งไนตริกออกไซด์ของสารสกัดส่วนย่อยที่แยกได้จากเปลือกผลลำไยในแต่ละชนิดต่อไป

4.3.6 ผลการแยกสารจากเปลือกผลลำไยด้วยเทคนิค Column chromatography

จากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย และและฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งไนตริกออกไซด์จากการสกัดด้วยเทคนิค Liquid-liquid extraction พบว่าสารสกัดชั้นตัวทำละลายบิวทานอลของเปลือกผลลำไยเถา (TB) และสารสกัดชั้นตัวทำละลายบิวทานอลของเปลือกผลลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ (EB) มีฤทธิ์ทางชีวภาพโดดเด่นจึงนำมาศึกษาต่อโดยการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Column chromatography เป็นการแยกสารผสมออกจากกันด้วยคุณสมบัติโดยอาศัยเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่ โดยเฟสคงที่ที่เป็นสารอนุภาคเล็กที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ และเฟสเคลื่อนที่ที่เป็นตัวทำละลาย หรือของเหลวที่ใช้ชะสารออกจากคอลัมน์ โดยหลักการแยกสารจะขึ้นอยู่กับความจำเพาะของสารนั้น ๆ เช่น คุณสมบัติด้านความมีขี้ หรือขนาดของอนุภาคสารที่ต่างกัน ในการศึกษาเบื้องต้นทดลองใช้คุณสมบัติด้านความมีขี้ในการแยกสารตัวทำละลายชั้นบิวทานอล โดยมีซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็นระบบตัวทำละลายที่สามารถแยกองค์ประกอบของสารได้ ในการทดลองได้ลองใช้ระบบตัวทำละลายหลายชนิดได้แก่ คลอโรฟอร์ม เอทิลอะซิเตท เฮกเซน และเมทานอลในอัตราส่วนที่แตกต่างกันไป พบว่าระบบตัวทำละลายที่สามารถแยกองค์ประกอบสารสกัดเปลือกผลลำไยได้ดีที่สุดคือ คลอโรฟอร์มต่อเมทานอลในอัตราส่วน 9 : 1 ที่ให้การแยกองค์ประกอบของสารสกัดบางชนิดได้ หลังจากการหดยุทธศาสตร์บน Normal phase TLC พบว่าองค์ประกอบส่วนใหญ่ของสารสกัดยังคงติดอยู่ด้านล่างของ basc line ของแผ่น TLC ไม่สามารถแยกสารขึ้นไปด้านบนได้ อาจเป็นเพราะว่าองค์ประกอบของสารดังกล่าวเป็นสารที่มีขี้สูงจึงทำให้เกิดการจับกันได้ดีกับซิลิกาเจลที่เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เฟสคงที่บนแผ่น TLC ทำให้ไม่สามารถแยกสารองค์ประกอบต่าง ๆ ใหญ่ขึ้นไปด้านบนได้ ดังภาพที่ 4.18 ซึ่งจากการศึกษาได้เพิ่มอัตราส่วนของสารละลายมีขั้วสูงในระบบตัวทำละลายเพิ่มขึ้น แต่พบว่า สารสกัดเกิดการแยกองค์ประกอบเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ซึ่งองค์ประกอบส่วนใหญ่ยังไม่สามารถแยก ขึ้นมาด้านบนได้ ยังคงติดอยู่ด้านล่างของ base line



ภาพที่ 4.18 องค์ประกอบ และการเคลื่อนที่ของสารผ่านการแยกบน normal phase TLC ในระบบ ตัวทำละลายคลอโรฟอร์มต่อเมทานอลในอัตราส่วน 9:1 โดย (ก) หลังจากสเปรย์ด้วย Anisaldehyde reagent (ข) เมื่อส่องภายใต้ UV ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (ค) เมื่อส่องภายใต้ UV ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร โดย A และ B คือ สารสกัดในชั้นตัว ทำละลายบิวทานอลจากเปลือกผลลำไยเถา (TB) และลำไยต้นสายพันธุ์อีตอ (EB) ตามลำดับ

จากระบบตัวทำละลายดังกล่าวจึงไม่เหมาะกับการแยกสารสกัดในคุณสมบัติด้านความมี ขั้ว เนื่องจากหากใช้ระบบตัวทำละลายดังกล่าวอาจเกิดปัญหาสารสกัดตกค้างอยู่ด้านบนของคอลัมน์ ได้ และอาจส่งผลทำให้ได้องค์ประกอบของสารเพียงบางส่วน เนื่องจากว่าสารส่วนใหญ่ไม่สามารถชะ ผ่านตัวทำละลายดังกล่าวได้ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้คุณสมบัติด้านขนาดของอนุภาคสาร มาใช้ในการแยกองค์ประกอบของสารสกัด โดยเป็นการแยกสารที่มีอนุภาคขนาดแตกต่างกันออกกัน โดยใช้ตัวทำละลายเมทานอลที่เป็นสารขั้วสูง สามารถละลายสารสกัดทั้งขั้วต่ำ และขั้วสูงได้มาใช้เป็น เฟสเคลื่อนที่เพื่อใช้ในการชะสารสกัดภายในคอลัมน์ลงมายังรูพรุนของพอลิเมอร์ชนิด Sephadex LH-20 ซึ่งสารสารสกัดที่เป็นองค์ประกอบต่าง ๆ จะแยกออกจากกันโดยที่สารอนุภาคใหญ่จะไม่สามารถเคลื่อนที่ผ่านรูพรุนได้ ดังนั้นจึงถูกชะออกมาจากคอลัมน์ก่อน ส่วนสารที่มีอนุภาคเล็กจะ เคลื่อนที่ผ่านภายในรูพรุนทำให้ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ได้ช้ากว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองเมื่อนำสารสกัดชั้นตัวทำละลายบิวทานอลของเปลือกผลลำไยเถา (TB) และสารสกัดชั้นตัวทำละลายบิวทานอลของเปลือกผลลำไยต้นสายพันธุ์อีตอ (EB) ปริมาตรอย่างน้อย 3 กรัม มาละลายด้วยสารละลายเมทานอล แล้วแยกด้วย Sephadex LH-20 Column chromatography พบว่าสารสกัดเก็บสารจากคอลัมน์สารสกัดจากเปลือกผลลำไยเถาได้จำนวน 120 หลอด และสารสกัดจากเปลือกผลลำไยต้นสายพันธุ์อีตอจำนวน 130 หลอด หลังจากนั้นเมื่อเก็บสารที่ชะมาจากคอลัมน์แล้วนำสารดังกล่าวไปตรวจสอบองค์ประกอบของสาร เนื่องจากสารที่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ผ่าน Sephadex LH-20 Column chromatography เป็นการแยกสารตามอนุภาคของสารสกัด ทำให้สารที่มีอนุภาคใกล้เคียงกันถูกชะออกมาในระยะเวลาใกล้เคียงกันได้ อาจทำให้เกิดการรวมตัวกันของสาร ดังนั้นจึงตรวจสอบองค์ประกอบของสารสกัดด้วยเทคนิค TLC ที่มีความสามารถในการแยกสารที่ต่างชนิดกัน แต่มีขนาดหรือโครงสร้างหรือองค์ประกอบที่ใกล้เคียงกันออกจากกันได้ ตามคุณสมบัติความมีขั้วที่แตกต่างกัน โดยการทดสอบสารสกัดที่ได้แต่ละหลอดด้วยแผ่น reverse phase TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็นเมทานอล แล้วนำมาสเปรย์ด้วย Anisaldehyde reagent เพื่อสังเกตลักษณะองค์ประกอบของสารควบคู่กับการส่องภายใต้ UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตรเพื่อรวมสารสกัดที่มีองค์ประกอบของสารชนิดเดียวกันเป็นสารสกัดย่อยชนิดเดียวกัน โดยจากภาพที่ 4.19 (ก) สารสกัดหลอด A-G ที่ผ่านการแยกด้วยระบบตัวทำละลายเมทานอล และนำมาส่องภายใต้ UV ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร จะพบจุดการเคลื่อนที่ของสารที่ไม่เหมือนกัน สามารถแยกความแตกต่างได้ (ข) นำมาส่องภายใต้ UV ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร จะพบสารบางชนิดที่สามารถเรืองแสงได้ และ (ค) เมื่อสเปรย์ด้วย Anisaldehyde reagent โดยจะพบว่าสารในหลอดที่ A-D มีลักษณะแถบของสารเหมือนกันจึงรวมเป็นสารสกัดส่วนย่อยเดียวกัน



ภาพที่ 4.19 ตัวอย่างองค์ประกอบ และการเคลื่อนที่ของสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลลำไยเถาแต่หลอดที่ตรวจสอบด้วยแผ่น reverse phase TLC โดย (ก) หลังจากสเปรย์ด้วย Anisaldehyde reagent (ข) เมื่อส่องภายใต้ UV ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (ค) เมื่อส่องภายใต้ UV ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยจากการตรวจสอบแยกองค์ประกอบของสารสกัดส่วนย่อย พบว่าสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลของลำไยเถา (Thao Fraction : TF) มีจำนวน 8 สาร คือ TF1-TF8 และสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีตอ (Edor Fraction : ET) มีจำนวน 8 สาร คือ EF1-EF8 ซึ่งจากการรวบรวมสารสกัดส่วนย่อยต่าง ๆ และนำไปประเหยตัวทำละลาย โดยน้ำหนัก ร้อยละ ลักษณะ และสีของสารสกัดส่วนย่อย ซึ่งสามารถเทียบแถบรหัสสีจาก RHS mini color chart แสดงดังตารางที่ 4.18 โดยสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลลำไยเถา (TF1-TF8) มีน้ำหนักของรวม 2.18 กรัม คิดเป็นร้อยละผลได้รวมเท่ากับ 72.66 และสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลลำไยต้นสายพันธุ์อีตอ (EF1-EF8) มีน้ำหนักรวม 1.96 คิดเป็นร้อยละผลได้รวมเท่ากับ 65.33

จากการแยกสารสกัดส่วนย่อยจากชิ้นตัวทำละลายบิวทานอลของสารสกัดจากเปลือกผลลำไยเถา และเปลือกผลลำไยต้นสายพันธุ์อีตอ ได้สารสกัดส่วนย่อยรวม 16 สารสกัด นำไปศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย ฤทธิ์ความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ และฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ต่อไป

ตารางที่ 4.18 น้ำหนัก ร้อยละ และลักษณะ สีของสารสกัดส่วนย่อยที่แยกด้วยเทคนิค Column chromatography ของสารสกัดชิ้นตัวทำละลายบิวทานอลจากเปลือกผลของลำไยเถาและลำไยต้นสายพันธุ์อีตอ

สารสกัดส่วนย่อย	หลอดที่	น้ำหนัก (กรัม)	ร้อยละผลได้	ลักษณะของสารสกัด	รหัสสีสารสกัดหลังละลายด้วยทำละลาย
TF1	1-18	0.29	9.83	สารผง	RHSN170A
TF2	19-26	0.21	7.30	สารผง	RHS165A
TF3	27-35	0.15	5.26	สารผง	RHS200B
TF4	36-47	0.29	9.90	สารก้อน	RHS167B
TF5	48-60	0.38	12.80	สารผง	RHS163A
TF6	61-80	0.42	14.16	สารผง	RHS163A
TF7	81-91	0.27	9.16	สารผง	RHS15D
TF8	92-120	0.17	5.66	สารผง	RHS163A
รวม	1-120	2.18	72.66		

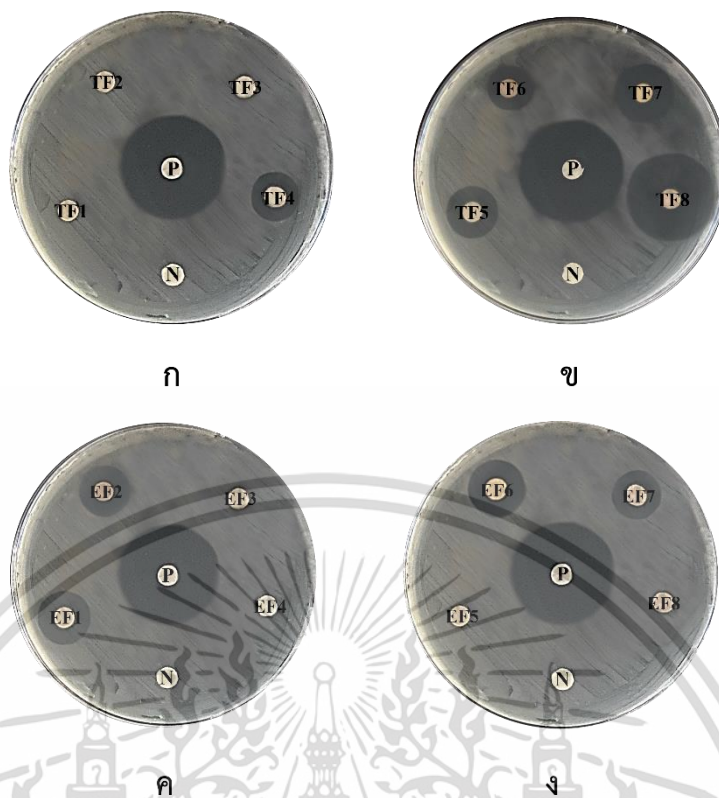
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.18 น้ำหนัก ร้อยละ และลักษณะ สีของสารสกัดส่วนย่อยที่แยกด้วยเทคนิค Column chromatography ของสารสกัดชั้นตัวทำละลายบิวทานอลจากเปลือกผลของ ลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ (ต่อ)

สารสกัด ส่วนย่อย	หลอดที่	น้ำหนัก (กรัม)	ร้อยละผลได้	ลักษณะของ สารสกัด	รหัสสีสารสกัดหลัง ละลายด้วยทำละลาย
EF1	1-16	0.27	9.2	สารก้อน	RHS163A
EF2	17-37	0.39	13.13	สารก้อน	RHS163A
EF3	38-50	0.46	15.56	สารผง	RHS15D
EF4	51-60	0.19	6.33	สารผง	RHS4D
EF5	60-72	0.20	6.66	สารผง	RHS4D
EF6	73-90	0.21	7.3	สารผง	RHS163A
EF7	91-115	0.13	4.33	สารผง	RHSN18C
EF8	116-130	0.11	3.66	สารผง	RHS163A
รวม	1-130	1.96	65.33		

4.3.7 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลของลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อีดอที่แยกด้วยเทคนิค Column chromatography

จากการทดลองนำสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลของลำไยเถา (TF1-TF8) และลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ (EF1-EF8) ที่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค Column chromatography มาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *P. acnes* โดยใช้สารสกัดที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อดิस्क และใช้ยาปฏิชีวนะ เจนตามัยซินที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อดิस्क จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลของลำไยเถาจากจำนวนทั้งหมด 8 สาร พบว่ามี 5 สารสกัด ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. acnes* ได้ คือ TF4, TF5, TF6, TF7 และ TF8 ดังภาพ 4.20 ก-ข โดยมีค่าบริเวณการยับยั้งเท่ากับ 13.10 ± 3.00 , 17.04 ± 1.32 , 14.81 ± 1.77 , 18.91 ± 3.58 และ 24.61 ± 1.73 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดจากเปลือกผลลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ มีสารสกัดส่วนย่อยจากจำนวนทั้งหมด 8 สาร พบว่ามี 5 สารสกัดที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. acnes* คือ EF1, EF2, EF6 และ EF7 ดังภาพที่ 4.20 ค-ง โดยมีค่าบริเวณการยับยั้งเท่ากับ 11.11 ± 1.21 , 11.51 ± 1.10 , 17.44 ± 3.26 และ 12.26 ± 1.30 มิลลิเมตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.19



ภาพที่ 4.20 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* (ก) และ (ข) สารสกัดส่วนย่อยของสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถา และ (ค) และ (ง) สารสกัดส่วนย่อยของสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีตอ โดยตัวอักษรในภาพ N คือ ตัวควบคุมเชิงลบ หรือเมทานอล และ P คือ ตัวควบคุมเชิงบวก หรือยาปฏิชีวนะเจนตามัยซินที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์

จากการทดลองพบว่าสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลของลำไยเถา TF8 มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย *P. acnes* สูงที่สุด รองลงมาคือสารสกัดส่วนย่อย TF7, TF5, TF6 และ TF4 มีบริเวณยับยั้งน้อยที่สุด ส่วนสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีตอ EF6 มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียสูงสุด รองลงมาคือสารส่วนย่อย EF7, EF2 และ EF1 ซึ่งการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ พบว่าสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลของลำไยเถาให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสูงกว่าสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลลำไยต้นสายพันธุ์อีตอ และเมื่อเปรียบเทียบบริเวณการยับยั้งกับยาปฏิชีวนะเจนตามัยซิน พบว่าสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลของลำไยเถา TF8 ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อดิสก์ มีค่าบริเวณการยับยั้งได้เทียบเท่ายาปฏิชีวนะเจนตามัยซินที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อดิสก์ เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดชิ้นตัวทำละลายบิวทานอลของสารสกัดจากเปลือกผลลำไยเถา และลำไยต้นพันธุ์อีตอ ที่มีค่าบริเวณการยับยั้งเท่ากับ

23.21±2.02 14.63±1.60 มิลลิเมตร ตามลำดับ พบว่าสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลของลำไยเถา

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ มีค่าบริเวณการยับยั้งที่สูงใกล้เคียงกันอาจเป็นเพราะว่าสารสกัดส่วนย่อยต่าง ๆ ที่เป็นองค์ประกอบหลักของสารออกฤทธิ์ในชั้นตัวทำละลายดังกล่าวถูกแยกตามขนาดของโมเลกุลออกมาเป็นสารสกัดส่วนย่อยต่าง ๆ เมื่อสารสกัดส่วนย่อยเหล่านี้ถูกแยกให้บริสุทธิ์มากขึ้นอาจเป็นผลทำให้มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงขึ้นเช่นเดียวกัน

ตารางที่ 4.19 บริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* ของสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลลำไยที่สกัดด้วยเทคนิค Column chromatography ที่ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อดิस्क และยาปฏิชีวนะเจนตามัยซินที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิस्क

สารสกัดส่วนย่อย	บริเวณการยับยั้ง (มิลลิเมตร)	สารสกัดส่วนย่อย	บริเวณการยับยั้ง (มิลลิเมตร)
TF1	0	EF1	11.11 ^c ±1.21
TF2	0	EF2	11.51 ^c ±1.10
TF3	0	EF3	0
TF4	13.10 ^d ±3.00	EF4	0
TF5	17.04 ^{bc} ±1.32	EF5	0
TF6	14.81 ^c ±1.77	EF6	17.44 ^b ±3.26
TF7	18.91 ^b ±3.58	EF7	12.26 ^{de} ±1.30
TF8	24.61 ^a ±1.73	EF8	0
เจนตามัยซิน	26.57±1.01		

หมายเหตุ ตัวอักษร a-e ในตารางแสดงความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT), $p < 0.05$

4.3.8 ผลการศึกษาฤทธิ์ความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ และฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ของสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลของลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อีดอที่แยกด้วยเทคนิค Column chromatography

จากการทดลองนำสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลของลำไยเถา (TF1-TF8) และลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ (EF1-EF8) ที่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค Column chromatography นอกจากการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งไนตริกออกไซด์ด้วย

nitric oxide scavenging assay (NOA) โดยใช้ Sodium nitroprusside (SNP) ในการทดสอบกับเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารสกัดส่วนย่อยที่ความเข้มข้น 31.25-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น 12.5-125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการทดลองสามารถคำนวณความสามารถร้อยละยับยั้งไนตริกออกไซด์ของสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลลำไยเถา (TF1-TF8) พบว่ามีค่าร้อยละอยู่ในช่วง 40.59-69.80 (ตารางภาคผนวกที่ ข-15) และมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 39.69-92.24 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดจากเปลือกผลลำไยผลต้นสายพันธุ์อีดอ (EF1-EF8) มีค่าร้อยละความสามารถในยับยั้งไนตริกออกไซด์อยู่ในช่วง 20.38-61.96 และมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 58.23-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 4.20

จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลลำไยเถามีฤทธิ์ในการยับยั้งไนตริกออกไซด์สูงสุดคือ TF4 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 39.69 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลลำไยเถาที่ออกฤทธิ์น้อยที่สุดคือ TF8 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 93.24 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดจากเปลือกผลลำไยสายพันธุ์อีดอที่มีฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์สูงสุดคือ EF3 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 58.23 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลลำไยต้นสายพันธุ์อีดอที่ออกฤทธิ์น้อยที่สุดคือ EF6-EF8 เนื่องจากมีค่า $IC_{50} > 500$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น 12.5-125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า IC_{50} เท่ากับ 68.46 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าตัวอย่างของสารสกัดส่วนย่อย TF3-TF7 จากเปลือกผลลำไยเถามีสามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้ดีกว่าสารมาตรฐานแอสคอร์บิก ในขณะที่สารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลลำไยต้นสายพันธุ์อีดอมีเพียง EF1-EF4 เท่านั้นที่มีความสามารถในการยับยั้งได้ใกล้เคียงกับสารมาตรฐานแอสคอร์บิก

ตารางที่ 4.20 ความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ที่ค่า IC_{50} ของสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลของลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อีตอที่ แยกด้วยเทคนิค Column chromatography

สารสกัดส่วนย่อย	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	สารสกัดส่วนย่อย	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
TF1	92.24	EF1	62.50
TF2	91.77	EF2	60.57
TF3	49.54	EF3	58.23
TF4	39.69	EF4	60.57
TF5	43.91	EF5	73.70
TF6	62.68	EF6	>500
TF7	60.34	EF7	>500
TF8	93.24	EF8	>500

หมายเหตุ เครื่องหมาย > แสดงค่า IC_{50} ที่มีค่ามากกว่า 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

หลังจากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์ของสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลของลำไยที่สกัดโดยเทคนิค Column chromatography ด้วยวิธี NOA แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ในเซลล์ชนิดแมคโครฟาจ (RAW 264.7) ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบโดยใช้สาร LPS ด้วยการใส่สารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลของลำไยเถา (TF1-TF8) และลำไยต้นสายพันธุ์อีตอ (EF1-EF8) ที่ความเข้มข้น 125-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับ Indomethacin ที่เป็นตัวควบคุมเชิงบวก ที่ความเข้มข้น 125-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถา (TF1-TF8) มีค่าร้อยละความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์อยู่ในช่วง 33.80-57.34 (ตารางภาคผนวกที่ ข-16) และมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 500.75-900.15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 4.21 ในส่วนสารสกัดส่วนย่อยจากลำไยต้นสายพันธุ์อีตอ (EF1-EF8) ค่าร้อยละความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์อยู่ในช่วง 20.00-53.34 และมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 688.61-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 4.21 เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์จากสารสกัดส่วนย่อยทั้งหมดจำนวน 16 ตัวอย่าง กับตัวควบคุมเชิงบวก Indomethacin ที่เป็นยาต้านอักเสบ ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 13.28 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลของลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อีตอ มีค่าน้อยกว่าตัวควบคุมเชิงบวก Indomethacin หากพิจารณาความสามารถในการต้านการอักเสบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยการยับยั้งไนตริกออกไซด์ภายในเซลล์แล้ว พบว่าสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลของลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อีดอมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น้อยลงเป็นไปได้ว่าสารออกฤทธิ์ในสารสกัดส่วนย่อยเหล่านี้ หลังจากการแยกสารสกัดให้บริสุทธิ์มากขึ้นตามขนาด และความเข้มข้น สารสกัดส่วนย่อยที่แยกออกมานั้นมีความสามารถในการออกฤทธิ์ได้น้อยหากเป็นสารสกัดเดี่ยว หรือสารสกัดส่วนย่อย เนื่องจากในบางกรณีเกิดการรวมตัวของสารที่มีขั้ว หรือสารที่มีขนาดเหมือนกันหลาย ๆ ชนิด จนเกิดการส่งเสริมในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งกันและกัน แต่ในทางกลับกันหากเกิดการรวมตัวของสารบางชนิดที่มีขั้วเหมือนกันหลาย ๆ ชนิด อาจทำให้เกิดการตัดทอนฤทธิ์ทางชีวภาพได้เช่นเดียวกัน และอาจกล่าวได้ว่าสารออกฤทธิ์บางชนิดเมื่อเป็นสารสกัดเดี่ยวทำให้ประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ได้ไม่ดีเท่ากับตอนเป็นสารผสม

ตารางที่ 4.21 ความสามารถในการต้านการอักเสบด้วยวิธียับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ค่า IC_{50} ของสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลของลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อีดอที่แยกด้วยเทคนิค Column chromatography

สารสกัดส่วนย่อย	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	สารสกัดส่วนย่อย	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
TF1	845.84	EF1	771.39
TF2	796.79	EF2	688.61
TF3	853.78	EF3	791.54
TF4	500.75	EF4	900.15
TF5	610.23	EF5	989.48
TF6	621.62	EF6	>1000
TF7	572.00	EF7	>1000
TF8	900.15	EF8	>1000
Indomethacin	13.28		

หมายเหตุ เครื่องหมาย > แสดงค่า IC_{50} ที่มีค่ามากกว่า 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ในการทดสอบสารสกัดส่วนย่อยที่แยกด้วยเทคนิค Column chromatography จากผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย และฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ พบว่าสารสกัดส่วนย่อยแต่ละสารมีความสามารถในการยับยั้งฤทธิ์ทางชีวภาพด้านต่าง ๆ ได้แตกต่างกัน ทั้งในสารสกัดจากเปลือกผลลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ สารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลเอกลำไยนี้เป็นเอกลำไยที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลำไยเถาส่วนใหญ่ออกฤทธิ์ได้ดีกว่าสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ แต่เนื่องด้วยในการทดลองนี้ทำการทดสอบฤทธิ์ด้านแบคทีเรีย และฤทธิ์ด้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ จากผลการทดลองสารสกัดส่วนย่อยบางชนิดที่ออกฤทธิ์ได้ดีในการทดลองฤทธิ์ด้านแบคทีเรีย แต่ในการทดลองฤทธิ์ด้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์กลับออกฤทธิ์ได้น้อย อาจเป็นเพราะสารสำคัญที่อยู่ภายในสารสกัดย่อยมีองค์ประกอบทางด้านการออกฤทธิ์ที่ต่างกันไป จึงนำสารสกัดส่วนย่อยดังกล่าวมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC-MS ต่อไป

4.3.9 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC-MS

นำสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลของลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ จำนวนทั้งหมด 16 ตัวอย่าง มาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC-MS ผลการวิเคราะห์พบว่าใน ส่วนสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลของลำไยเถา TF1-TF3 พบองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจำนวน 2 ชนิด คือ Phenol 2,6-bis (1,1-dimethylethyl) และ Phenol 2,4-bis (1,1-dimethylethyl) ซึ่งมีปริมาณมากถึง 100 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดส่วนย่อย TF4 พบองค์ประกอบทางเคมีของสารจำนวน 6 ชนิด ซึ่งพบ Heptanoic acid ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 30.99 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดส่วนย่อย TF5-TF8 พบองค์ประกอบทางเคมีของสารที่ใกล้เคียงกันจำนวน 10 ชนิด ซึ่งพบ Dodecane จำนวน 25.28 และ Tetradecane จำนวน 41.82 เปอร์เซ็นต์ ที่มีปริมาณสูงใกล้เคียงกัน ในส่วนของจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ พบองค์ประกอบทางเคมีของสารที่ใกล้เคียงกันจำนวน 10 ชนิด ซึ่งพบสาร Mome inositol มีปริมาณสูงสุด 71.17 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดส่วนย่อย EF3-EF5 พบองค์ประกอบทางเคมีของสารที่ใกล้เคียงกันจำนวน 14 ชนิด ซึ่งพบสาร Mome inositol และ Decene มีปริมาณสูงสุด ดังตารางที่ 4.22 และในสารสกัดส่วนย่อย EF6-EF8 ไม่สามารถตรวจพบองค์ประกอบของสารสำคัญได้ อาจเป็นผลเนื่องมาจากเทคนิค GC-MS ไม่มีสารมาตรฐานที่ตรงกับสารสกัดส่วนย่อยดังกล่าว ดังนั้นควรทำการศึกษาองค์ประกอบสารด้วยเทคนิคอื่นเพิ่มเติม

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบสารพบว่า สาร Pyridinecarboxamide สามารถพบได้เพียงในสารสกัดจากเปลือกผลลำไยเถาเท่านั้น เช่นเดียวกับสาร Mome inositol ที่สามารถพบได้เฉพาะในสารสกัดจากเปลือกผลลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ และองค์ประกอบสารดังกล่าวแสดงถึงความแตกต่างของการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เมื่อพิจารณาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดส่วนย่อยทั้งหมดพบว่า ฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดส่วนย่อย TF8 จากเปลือกผลของลำไยเถา มีฤทธิ์ในการ

ยับยั้งที่ดีที่สุด เนื่องจากพบองค์ประกอบของสาร Phenol 2,6-bis (1,1-dimethylethyl), Teteadecane, Docosane และ Heptadecane ที่มีปริมาณองค์ประกอบสารเฉลี่ยเท่ากับ 8.28, 36.28, 13.93 และ 34.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.22 ซึ่งในสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลลำไยต้นสายพันธุ์อีตอ EF7 ไม่มีองค์ประกอบสารดังกล่าว จากการผลการวิเคราะห์องค์ประกอบสาร สอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Adeyemi และคณะ (2017) ศึกษาสารสกัดจากผลไม้ *Lagenaria breviflora* R. ที่สกัดด้วยเมทานอล เมื่อนำวิเคราะห์หาองค์ประกอบของสารสกัดพบว่า มีองค์ประกอบของสารมากกว่า 30 ชนิด ส่วนประกอบหลักคือ Hexacosane (10.9%), Docosane (9.15%), Heptadecane (8.18%) และ Teteadecane (3.38%) ที่มีฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย ด้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง และเมื่อพิจารณาฤทธิ์การต้านการอักเสบโดยการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ภายในเซลล์ (RAW 264.7) พบว่าสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลของลำไยเถา TF4 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ดีที่สุด เนื่องจากพบองค์ประกอบของสาร Phenol 2,6-bis (1,1-dimethylethyl, Docosane, Dodecan, Pyridinecarboxamide, Tetradecane และ Heptanoic acid ที่มีปริมาณองค์ประกอบสารเท่ากับ 5.76, 5.62, 8.42, 8.37, 8.67 และ 30.99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งไม่พบสาร Pyridinecarboxamide และ Heptanoic acid ในสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีตอ แต่พบองค์ประกอบสาร Propanoic acid ที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย ลดการอักเสบจากมดลูก และลดการอักเสบในหลอดเลือดหัวใจ (Bartolomaeus และคณะ, 2019) โดยรายงานวิจัยของ Mohammed และคณะ (2016) ศึกษาองค์ประกอบของสารสกัดเมทานอลของ *Nigella sativa* ด้วยวิธี GC-MS พบองค์ประกอบของสารหลัก 28 ชนิด เช่น Phenol 2,6-bis (1,1-dimethylethyl) และ Heptatriacotanol ซึ่งสารดังกล่าวมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อรา ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และต้านการอักเสบ และในงานวิจัยของ Chi และคณะ (2013) ทดสอบสาร Pyridinecarboxamide ในหนูทดลองพบว่า มีการเผาผลาญไขมันในหนูลดลง ช่วยลดความเสี่ยงของโรคเบาหวาน เนื่องจากสาร Pyridinecarboxamide สามารถทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของสารป้องกันระบบประสาทและสมอง และมีฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์ ดังนั้นฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย และฤทธิ์ต้านการอักเสบ ด้วยวิธีการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ จากสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลลำไยเถาอาจออกฤทธิ์มาจากสารประกอบดังกล่าวที่ได้กล่าวไปในข้างต้น ซึ่งสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลลำไยต้นสายพันธุ์อีตอพบเพียงสารในกลุ่มของ Mome inositol ซึ่งเป็นองค์ประกอบของสารที่พบได้ในสรรพคุณทางยา เช่น ยาลดไขมันและคลอเลสเตอรอล ยาโรคตับแข็ง และยาขับปัสสาวะ เป็นต้น เพราะเหตุดังกล่าวอาจเป็นผลทำให้สารสกัดจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีตอออกฤทธิ์ในด้านต้านการอักเสบได้ไม่ดี ซึ่งจากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบสารของสารสกัดจากเปลือกผลลำไยต้นสายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อีตอ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sarah และคณะ (2020) ศึกษาสารสกัดเอทานอลจากเปลือกผลลำไย ต้นสายพันธุ์อีตอ นำมาวิเคราะห์องค์ประกอบด้วยวิธี GC-MS พบสาร Phenol, 2,4-bis (1, 1-dimethylethyl), Benzaldehyde, Cyclododecane, Dodecyl acrylate และ Dodecene ซึ่งเป็นสารจำพวกเดียวกันกับที่พบในสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลลำไยต้นสายพันธุ์อีตอ

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบสารด้วยเทคนิค GC-MS ในสารสกัดจากเปลือกผลลำไย ทั้งสองชนิด พบองค์ประกอบสารที่น่าสนใจเพิ่มเติมดังนี้

Heptanoic acid หรือ Enanthic acid

เป็นสารประกอบอินทรีย์ เป็นของเหลวใสไม่มีสี ทำให้เกิดกลิ่นเหม็นในน้ำในบางชนิด มีความสามารถในการละลายน้ำได้น้อย ส่วนใหญ่พบมากในน้ำมัน นิยมใช้เป็นสารตั้งต้นในการเตรียม เอสเทอร์ เอทิลอะซิเตท ปัจจุบันนิยมนำมาทำเป็นน้ำหอมแต่งกลิ่นสังเคราะห์ สเตียรอยด์ และอาหารเสริม ยาฮอร์โมนเพศชาย (David และคณะ, 2006)

Mome Inositol

เป็นสารในกลุ่ม polysaccharide โดย inositol ส่วนใหญ่พบได้ในรูปของน้ำตาลธรรมชาติจากพืช จำพวกต้นปาล์มมะพร้าว โดย inositol พบได้ในหลากหลายรูปแบบ เช่น ฟอสโฟลิปิด ไกลโบโปรตีน ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารฟอสเฟตภายในเซลล์ โดยสาร inositol สามารถกระตุ้นการสร้างสารยับยั้งการเกิดเนื้องอกภายในเซลล์ นอกจากนี้ยังพบมีสรรพคุณทางยาเป็นสารองค์ประกอบในยาเวชภัณฑ์หลายชนิด เช่น ยาลดไขมัน ความดัน ยาลดผมร่วง และยาเกี่ยวกับโรคประสาท เป็นต้น (Neda GD, 2013; Das และคณะ, 2014; Sunita และ Manju, 2017)

Pyridinecarboxamide

เป็นสารที่มีรูปแบบการทำงานของวิตามินบี 3 เป็นส่วนประกอบของโคเอ็นไซม์ nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) โดยสาร Pyridinecarboxamide ทำหน้าที่ช่วยเพิ่มการไหลเวียนของเลือด ลดภาวะการขาดออกซิเจน และเป็นสารการยับยั้ง poly ADP-ribose ไม่ให้เกิดการกลายพันธุ์ของสายดีเอ็นเอขณะฉายรังสี นอกจากนี้ยังเป็นสารเมตาบอไลต์ภายในเซลล์ โดยจากงานวิจัยของ Chi และคณะ (2013) ทดลองศึกษาการใช้สาร Pyridinecarboxamide ในความเข้มข้นต่าง ๆ กับหนูทดลอง พบว่าสารดังกล่าวสามารถเพิ่มความเข้มข้นของ NAD⁺ ในเนื้อเยื่อ และสมองของหนูทดลอง เป็นผลให้สามารถป้องกันการเกิดโรคอัลไซเมอร์ ช่วยส่งเสริมการฟื้นฟูระบบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประสาท นอกจากนี้ Pyridinecarboxamide ยังพบในอาหารเสริมเนื่องจากช่วยป้องกันไขมัน เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ

จากผลการทดลองทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพจากเปลือกผลของลำไยทั้งสองชนิด ถึงแม้ว่าสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถาจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพส่วนใหญ่ที่น้อยกว่าสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีตอ แต่ในการศึกษาสารสกัดส่วนย่อยที่แยกด้วยเทคนิค Column chromatography พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถามีฤทธิ์ทางชีวภาพที่โดดเด่นมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *P. acnes* ที่เป็นแบคทีเรียก่อโรคสิวได้ดี และยังสามารถออกฤทธิ์ต้านอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ได้ในปริมาณที่สูงกว่าสารสกัดจากเปลือกผลลำไยต้นสายพันธุ์อีตอ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการวิเคราะห์องค์ประกอบสารด้วยวิธี GC-MS เนื่องจากสารสกัดจากเปลือกผลลำไยเถาและลำไยต้นสายพันธุ์อีตอ มีองค์ประกอบของสารสำคัญแตกต่างกัน ซึ่งสารสกัดจากเปลือกผลลำไยเถามีองค์ประกอบสารที่น่าสนใจหลายชนิด เช่น docosane, heptanoic acid, teteadecane และ pyridinecarboxamide ดังนั้น ควรพัฒนานำสารสกัดจากเปลือกผลลำไยที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรไปพัฒนาต่อยอดให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ที่ออกฤทธิ์ได้ดีในด้านดังกล่าวต่อไปในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.22 ผลวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลของลำไยเถา (TF1-TF8) และลำไยต้นสายพันธุ์อู๊ดอ (EF1-EF8)

สารสกัดส่วนย่อย	ชนิดขององค์ประกอบสาร	%of total
TF1	Phenol 2,6-bis (1,1-di smethylethyl)	100
TF2	Phenol 2,4-bis (1,1-dismethylethyl)	100
TF3	Phenol 2,4-bis (1,1-dismethylethyl)	100
TF4	Docosane	5.62
	Dodecan	8.42
	Tetradecane	8.67
	Pyridinecarboxamide หรือ Nicotinamide	8.37
	Heptanoic acid หรือ Enanthic acid	30.99
TF5	Methyl alpha-D-Glucopyranoside	12.62
	P-Deutero ethyl benzene	8.16
	3,7-dimethyl-3,7-Dimethylnonane	14.5
	Tetradecane	21.72
	Dodecane	25.28
TF6	Phenol,2, 6-bis (1,1-dimethylethyl)	21.35
	Cyclobutanone oxime	12.01
	2-Decyloxyethanol, TMS	11.40
	2, 6-Dimethylheptane	25.47
	Tetradecane	24.03
TF7	Phenol,2, 6-bis (1, 1-dimethylethyl)	24.33
	Docosane	14.75
	Decane	12.91
	Tetradecane	30.74
	Heptadecane	34.11
TF8	Phenol, 2, 6-bis (1, 1-dimethylethyl)	8.28
	Docosane	13.93
	Decane,2,3,7-trimethyl	14.62
	Tetradecane	41.82
	Undecane	43.54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.22 แสดงผลวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลของลำไยเถา (TF1-TF8) และลำไยต้นสายพันธุ์อีตอ (EF1-EF8) (ต่อ)

สารสกัดส่วนย่อย	ชนิดขององค์ประกอบสาร	%of total
EF1	Xanthosine-D-Ribofuranoside	5.23
	Decene	12.95
	Mome Inositol	72.17
	Cyclododecane	24.14
EF2	Mome Inositol	62.12
EF3	Decene	45.36
	Phenol,2,4-bis (1, 1-dimethylethyl)	5.45
	2-Ethylthiolane	34.26
EF4	Cyclododecane	26.12
	Phenol, 2, 4-bis(1,1-dimethylethyl)	5.56
	Mome Inositol	61.96
EF5	Benzaldehyde	5.58
	Decene	62.96
	Phenol,2,4-bis (1, 1-dimethylethyl)	9.43
	Mome Inositol	14.05
EF6	-	-
EF7	-	-
EF8	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และฤทธิ์ทางชีวภาพของลำไยเถา (*D. longan* ssp. *longan* var. *obtusus*) โดยเปรียบเทียบกับลำไยต้น (*D. longan* ssp. *longan* var. *longan*) ในการศึกษาคุณภาพผลเบ้องต้นจำนวน 27 ตัวอย่าง พบว่ามีลักษณะคุณภาพผลที่แตกต่างกัน โดยลำไยต้นมีน้ำหนักผล น้ำหนักเมล็ด และความหวานที่น้อยกว่าลำไยเถา แต่มีลำไยเถาในบางตัวอย่างที่อยู่ในกลุ่มเดียวกับลำไยต้นเช่นกัน เมื่อศึกษาด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ในการคัดเลือกไพรมอร์เบ้องต้นจากจำนวน 38 ไพรมอร์ พบว่ามีไพรมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 6 ไพรมอร์ คือ UBC815, UBC824, UBC834, UBC849, UBC855 และ UBC873 เมื่อนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 36 ตัวอย่าง พบว่ามีจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 156 แถบ มีขนาดของดีเอ็นเออยู่ในช่วง 180-3200 คู่เบส มีแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างคิดเป็นร้อยละ 98.71 ไพรมอร์ที่ให้ความต่างของแถบดีเอ็นเอสูงสุดคือ UBC824, UBC834, UBC849 และ UBC873 โดยมีค่า PIC อยู่ในช่วง 0.81-0.95 เมื่อนำมาวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (Jaccard's similarity coefficient) มีค่าอยู่ในช่วง 0.64-0.97 โดยที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน 0.64 สามารถแบ่งกลุ่มลำไยเถาออกจากกลุ่มของลำไยต้นได้ ยกเว้นตัวอย่าง DLO-35 และ DLO-36 ที่จัดอยู่กลุ่มเดียวกับลำไยต้น และเมื่อพิจารณาภายในกลุ่มลำไยเถาพบว่า ที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน 0.72 สามารถแยกลำไยเถาได้เป็นสองกลุ่ม โดยตัวอย่างลำไยเถาที่เก็บมาจากแหล่งพื้นที่ใกล้เคียงกันถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน

ในการศึกษาฤทธิ์ทางด้านชีวภาพของสารสกัดหยาบเมทานอลจากเปลือกผลของลำไยเถา จำนวน 2 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับลำไยต้นสายพันธุ์อีดอจำนวน 1 ตัวอย่าง จากผลการทดลองพบคุณสมบัติ พบว่าสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลของลำไยเถาและลำไยต้นสายพันธุ์อีดอพบสารประกอบในกลุ่มเดียวกัน คือ อัลคาลอยด์ แทนนิน และคูมาริน โดยสารสกัดหยาบจากเปลือกผลลำไยต้นสายพันธุ์อีดอมีฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดีกว่าสารสกัดหยาบจากเปลือกผลลำไยเถา ซึ่งสารสกัดหยาบจากเปลือกผลของลำไยทั้งสองสายพันธุ์มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* และมีฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ในเซลล์ชนิดแมคโครฟาจ (RAW 264.7)

ได้ในระดับสูง แต่ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลลำไยเถามีค่าการรอดชีวิตของเซลล์ L929, HaCaT และ RAW ที่สูงกว่าสารสกัดจากเปลือกผลลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ

และจากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นพบว่าสารสกัดหยาบจากเปลือกผลลำไยเถาทั้งสองตัวอย่างให้ผลไม่แตกต่างกัน จึงนำสารสกัดทั้งสองตัวอย่างรวมกัน และนำไปสกัดแยกให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นด้วยวิธี Liquid-liquid extraction โดยใช้ตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ รวม 10 ตัวอย่าง แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *P. acnes* และทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบต่อไป โดยพบว่าสารสกัดในชั้นตัวทำละลายบิวทานอลจากเปลือกผลของลำไยเถา มีบริเวณยับยั้งที่สูงที่สุดคือ 23.21 มิลลิเมตร ในขณะที่สารสกัดจากเปลือกผลของลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 14.63 มิลลิเมตร และสารสกัดจากเปลือกผลของลำไยเถาในชั้นตัวทำละลายบิวทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ได้ดีที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 82.92 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และลำไยต้นสายพันธุ์อีดอมีฤทธิ์ในการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ที่ใกล้เคียงกัน มีค่า IC_{50} เท่ากับ 83.27 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำสารสกัดจากชั้นตัวทำละลายบิวทานอลจากเปลือกผลลำไยทั้งสองชนิดมาแยกด้วยเทคนิค Column chromatography พบว่าสามารถแยกสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลของลำไยเถาและลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ ได้แก่ TF1-TF8 และ EF1-EF8 ตามลำดับ และเมื่อนำสารสกัดดังกล่าวไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *P. acnes* พบว่าสารสกัดส่วนย่อย TF8 มีความสามารถยับยั้งแบคทีเรีย *P. acnes* ได้สูงสุด และในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ภายในเซลล์ (RAW 264.7) พบว่าสารสกัดส่วนย่อย TF4 มีความสามารถในการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ได้ดีที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 500.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำสารสกัดส่วนย่อยจากเปลือกผลของลำไยทั้งสองชนิดไปวิเคราะห์องค์ประกอบสารด้วยวิธี GC-MS พบว่า มีสารสำคัญหลายชนิดที่น่าสนใจ ได้แก่ docosane, heptanoic acid, teteadecane และ pyridinecarboxamide เป็นต้น ควรค่าแก่การพัฒนาต่อยอดเพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับเปลือกผลลำไยที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งจากการบริโภค และทางการเกษตรให้นำมาใช้ประโยชน์ด้านยาเวชภัณฑ์ต่อไป

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาความหลากหลายด้านพันธุกรรมของลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อีดอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ในครั้งนี้ พบว่าสามารถแยกความแตกต่างภายในกลุ่มของลำไยเถาที่อยู่ใน variety เดียวกันได้ในระดับหนึ่งเท่านั้น ควรคัดเลือกลำไยสายพันธุ์อื่น ๆ มาศึกษาเป็น outgroup เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของลำไยแต่ละสายพันธุ์ และเพื่อยืนยันความแตกต่างทาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พันธกรรมของลำไยเท่ากับลำไยสายพันธุ์อื่น ๆ และควรศึกษาเพิ่มเติมด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุลชนิดอื่นเพื่อเป็นข้อมูลเปรียบเทียบในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของลำไยเถาในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเปลือกผลลำไยเถาและลำไยต้นสายพันธุ์อีตอ พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลลำไยเถามีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *P. acnes* และมีฤทธิ์ต้านการอักเสบจึงควรทำการศึกษาต่อโดยการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ด้านยาเวชภัณฑ์ชนิดใหม่ต่อไป และในการศึกษาสารสกัดส่วนย่อยพบว่าเทคนิค GC-MS ไม่สามารถวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดส่วนย่อยบางชนิดได้ ควรมีการศึกษาองค์ประกอบของชนิดสารสกัดส่วนย่อยด้วยเทคนิควิธีการอื่น ๆ เช่น HPLC



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- กฤษฎา นาพุงนุ้ย. 2562. “ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอฟพี และฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของลำไยเถา.” *วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันพระเจ้าจอมเจ้าคุณทหารลาดกระบัง*
- จาทรงค์ สัมฤทธิ์ และธีระชัย ธนानันต์. 2557. “การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวมีสีด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอฟพีดี และไอเอสเอสอาร์.” *วารสารเกษตร*. 32(1) : 113-122.
- จุฑามาศ จิโนบัว, ไฉน ตาคำแสน, ตะวัน ณ ลำพูน, ปิยวัฒน์ ศรีวิรัช, วรณศิริ สมควร และนพพล เล็กสวัสดิ์. 2555. “กรดแกลลิก กรดเอลลาจิก กรดแทนนิก ในพืชและผลไม้เศรษฐกิจของภาคเหนือ.” *วิทยานิพนธ์สาขาวิชาวิศวกรรมกระบวนการอาหาร สำนักวิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่*
- จุฑาทิพย์ พันธุ์รูปท้าว. 2561. “การจำแนกพันธุ์และการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายหมู่ไนโกรเฮอร์ซูเรและลูกผสมด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอไอเอสเอสอาร์.” *วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ภาควิชาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์*
- ชนิกา อ้อพานิช, ชมภูณช วิรุณานนท์ และ วรวิทย์ จุฬาลักษณ์านุกูล. 2555. “ไปโอบิวทานอล: เชื้อเพลิงเหลวที่กำลังจะมาทดแทนเอทานอล.” *วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ*. 22(3) : 703-703.
- นันทิยา วรธนะภูติ. 2553. “การขยายพันธุ์พืช” *กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์*
- บุหรัน พันธุ์สุวรรณ. 2556. “อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ.” *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*. 21(3) : 276-286.
- ประไพพิศ อินเสน. 2561. “การยับยั้งกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินจากพืชกลุ่มเบอร์รี่ไทย.” *วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเชีย*. 12(2) : 69-81.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- ธีรยุทธ์ ศรียาเทพ, ขนิษฐา ศรีภูมิราช, ชณันญา กัลยาภาณูจน์, และรุวิดา หมิ่นนพราน. 2563. “องค์ประกอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้นและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากพลับพลา.” *การประชุมวิชาการระดับชาติ ด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเครือข่ายสถาบันอุดมศึกษา ภาคใต้ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย*. 5 : 1-11.
- พาวิน มะโนชัย, ยุทธนา เขาสุเมรุ, ชิติ ศรีตันทิพย์ และสันติ ช่างเจรจา. 2547. “เทคโนโลยีการผลิตลำไย.” *กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์ฟิลิกส์เซ็นเตอร์*
- พิชัย สราญรมณ. 2531. “ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับลำไย.” *วิทยาลัยครูรำไพพรรณี*. 8(122) : 271.
- ไพศาล เหล่าสุวรรณ, อารีย์วรัญญวัฒน์ และปิยะดา ทิพย์ผ่อง. 2546. “หลักการปรับปรุงพันธุ์พีช.” *กรุงเทพฯ : ศูนย์หนังสือเกษตร สำนักพิมพ์ฟิลิกส์เซ็นเตอร์*
- วิริยา นิตยธีรานนท์ และจตุพร อรุณกมลศรี. 2561. “ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเมล็ดลำไยเถาและการนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์แยมลำไยเถา.” *วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น*. 46(2) : 219-227.
- วิริยา นิตยธีรานนท์. 2560. “การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบจากสารสกัดเมล็ดลำไยเถา.” *วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก*
- สายสุณี เหลี่ยมเรืองรัตน์. 2554. “ฤทธิ์ทางชีวภาพ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การวิเคราะห์ทางเคมีของสารประกอบสำคัญ และการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพ จากใบ เนื้อผล เปลือกผลและเมล็ดลำไย.” *Thailand Science Research and Innovation (TSRI)*. 54(5) : 477.
- สิริมา สุวรรรัตน์, แสงทอง พงษ์เจริญกิต และยุพเยาว์ คบพิมาย. 2562. “ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของลิ้นจี่จากเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF*.” *Thai Journal of Science and Technolog.* 8(3) : 272-286.
- แสงทอง พงษ์เจริญกิต, จันทรเพ็ญ สระระ และธีรนุช เจริญกิจ. 2559. “การจำแนกลักษณะประจำพันธุ์ และการปรับปรุงพันธุ์ลำไย.” *สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้*
- แสงทอง พงษ์เจริญกิต, จันทรเพ็ญ สระระ, ธีรนุช เจริญกิจ และฉันทนา วิษรัตน์. 2559. “Study on genetic relationship of *Dimocarpus longan* using ID-RAPD technique.” *วารสารเกษตร*. 32(1) : 1-8.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- สุภัค มัทธนพรค. 2542. “ประสิทธิภาพของสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดในผลลำไยต่อการต้านทานเชื้อโรคหลังการเก็บเกี่ยว.” *วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาวิชาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่*
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. “เครื่องหมายดีเอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์.” *สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.*
- อรัญญา ศรีบุศราคม. 2555. “คุณค่าของลำไย”. *จุลสารข้อมูลสมุนไพร*. 30(1) : 1-2.
- อุ้นเรื่อน เพชรวัลย์ และ สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม. 2555. “การเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ Animal Cell Culture.” *กรุงเทพฯ : โครงการตำรา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง*
- Adeyemi, M., Ekunseitan, D., Abiola, S., Dipeolu, M., Egbeyate, L. and Sogunle, O. 2017. “Phytochemical analysis and GC-MS determination of *Lagenaria breviflora* R. Fruit.” *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 9(7) : 1045-1050.
- Aktas, N., Genc, Y., Gozcelioglu, B., Konuklugil, B. and Harput, U.S. 2013. “Radical scavenging effect of different marine sponges from mediterranean coasts.” *Records of Natural Products*. 7(2) : 96-104
- Ali, B. N., Mohsen, V., Zohreh, D., Zohreh, D. and Bahareh, H. 2019. “The antioxidant and physicochemical properties of microencapsulated bioactive compounds in *Securigera securidaca* (L.) seed extract by co-crystallization.” *Food Quality and Safety*. 3(4) : 243-250.
- Ana, E., Luis, A. and Sigbritt, K. 2005. “Emission of possible odourous low molecular weight compounds in recycled biofibre/polypropylene composites monitored by head-space SPME-GC-MS.” *Polymer Degradation and Stability*. 90(3) : 555-562.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Armania, N., Yazan, L.S., Musa, S.N., Ismail, I.S., Foo, J.B., Chan, K.W., Noreen, H., Hisyam, A.H., Zulfahumi, S. and Lsmail, M. 2013. “*Dillenia suffruticosa* exhibited antioxidant and cytotoxic activity through induction of apoptosis and G₂/M cell cycle arrest.” *Journal Ethnopharmacology*. 146(2) : 525-535.
- Bao, L. and Jonathan, W. 2002. “Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton.” *Molecular Ecology Resources*. 1(3) : 205-208
- Barth, S., Melchinger, A.E. and Lubberstedt, T. 2002. “Genetic diversity in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. investigated by cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers.” *Molecular Ecology*. 11 : 495-505.
- Bartolomaeus, H., Balogh, A., Yakoub, M., Homann, S., Markó, L., Höges, S., Tsvetkov, D., Krannich, A., Wundersitz, S., Avery, E., Haase, N., Kräker, Kristin; Hering, Lydia; Maase, Martina; Kusche-Vihrog, Kristina; Grandoch, M., Fielitz, J., Kempa, S., Gollasch, M., Zhumadilov, Z., Kozhakhmetov, S., Kushugulova, A., Eckardt, K., Dechend, R., Forslund, S K., Stegbauer, J. and Wilck, N. 2019. “Short-chain fatty acid propionate protects from hypertensive cardiovascular damage.” *Circulation*. 139 : 1407–1421.
- Benzie, I.F.F. and Strain, J.J. 1996. “The ferric reducing ability of plasma as a measure of antioxidant power : The FRAP assay.” *Journal of Analytical Biochemistry*. 296 : 70-76.
- Boerma, T. and Shibuya, K. 2007. “Ten statistical highlights in global public health.” *World Health Statistic. France: World Health Organization*. 56835 : 8347-9473.
- Brescia, P. and Banks, P. 2009. “Quantifying cytotoxicity of thiostrepton on mesothelioma cells using Mtt assay and the epoch™ microplate spectrophotometer.” *Application Notes*.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Carr, P.W. Brinkman, T.H., Griese, A.W., Hakaen, J.K., Maceck. and Snyder, L.R. 1971. "Liquid Column Chromatography." *Journal of Chromatography*. 610(2) : 182-185.
- Chai, W.H., Huang, Q., Lin, M.Z., Ou-Yang, C., Huang, W.Y., Wang, Z.X., Xu, K.L. and Feng, H.L. 2018. "Condensed tannins from longan bark as inhibitor of tyrosinase: structure, activity, and mechanism." *Journal Agric Food Chemistry*. 66(4) : 908-917.
- Changjiang G., Jijun Y., Jingyu, W., Yunfeng, L., Jing, X. and Yugang J. 2003. "Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay." *Nutrition Research*. 23 : 1719-1726.
- Chaowasku, T., Lithanatudom, S.K, Nantarat, N., Jaroenkit, T., Smith, T.R. and Lithanatudom, P. 2017. "A first phylogeny of the genus *Dimocarpus* and suggestions for revision of some taxa based on molecular and morphological evidence." *Scientific Report*. 1 : 1-11.
- Chemda, D., Jiusheng, D., Avigdor, B. and Ruth, E.B. 2003. "Identifying lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) cultivars and their genetic relationships using intersimple sequence repeat (ISSR) markers." *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 128(6) : 838-845.
- Cheung, K.L., Khor, T.O. and Kong, A.N. 2009. "Synergistic effect of combination of phenethyl isothiocyanate and sulforaphane or curcumin and sulforaphane in the inhibition of inflammation." *Pharmaceutical Research*. 26(1) : 224-231.
- Chi, F., Wu, R., Zeng, YC., Xing, R., Liu, Y. and Xu, ZG. 2013. "Post-diagnosis soy food intake and breast cancer survival: a meta-analysis of cohort studies." *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 14(4): 2407-2412.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2012. "M02-A11-Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests ; approved standard." 11th ed. Wayne, Pennsylvania : Clinical and Laboratory Standards Institute. David, L N., Albert, L L. and Michael M C. 2008. "Lehninger principles of biochemistry." New York: W.H. Freeman. 13 : 488-520.
- Choma, I. and Grzelak, E. 2011. "Bioautography detection in thin-layer chromatography." *Journal of Chromatography A*. 1218(19) : 2684-2691.
- Das, S., Vasudeva, N. and Sharma, S. 2014. "Chemical composition of ethanol extract of *Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc. using GC-MS spectroscopy." *Organic and Medicinal Chemistry Letters*. 4 (13) : 1-4.
- David, J. A., Sabine, B., Ralf C., Georg F., Udo S and Alfred, W. 2006. "Fatty Acids." *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley- VCH, Weinheim*. 14 : 73-116.
- Degani, C., Deng, J., Beiles, A., El-Batsri, R., Goren, M. and Gazit, S. 2003. "Identifying lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) cultivars and their genetic relationships using intersimple sequence repeat (ISSR) markers." *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 128(6) : 838-845.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987. "A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue." *Phytochemical Bulletin*. 19 : 11-15.
- Eric, J.K. and Mark, J.K. 2000. "Expansion to seven-membered rings." *Tetrahedron*. 56(26) : 4317-4353.
- Evans, W.C. 2009. "Cytotoxic and antibacterial constituents from roots of *Sonchus oleraceus* L. growing in Egypt." *Pharmacognosy Magazine*. 5(20) : 324-328.
- Farnsworth, N.R. 1966. "Biological and phytochemical screening of plants." *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 55(3) : 225-276.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Guoxiang, J., Yueming, J., Bao, Y., Chunyan, Y., Rong, T., Haiyan, Z. and Feng, C. 2009. "Structural characteristics and antioxidant activities of oligosaccharides from Longan Fruit pericarp." *Journal Agricultural Food Chemistry*. 57(19) : 9293–9298.
- Gupta, P. K., Varshney, R. K., Sharma, P. C. and Ramesh, B. 1999. "Molecular markers and their applications in wheat breeding." *Plant Breeding Journal*. 118: 369-390.
- He, N., Wang, Z., Yang, C., Lu, Y. and Sun, D. 2009. "Isolation and identification of polyphenolic aompounds in longan pericarp." *Separation and Purification Technology*. 70(2) : 219-224.
- Hseu, Y.C., Wu, F.Y., Wu, J.J., Chen, J.Y., Chang, W.H., Lu, F.J., Lai, Y.C. and Yang, H.L. 2005. "Anti-inflammatory potential of *Antrodia camphorata* through inhibition of iNOS, COX-2 and cytokines via the NF-kappaB pathway." *International Immunopharmacology*. 5(14) : 1914-1925.
- Hsu, M., Bhatt, M., Adolphs, R., Tranel, D. and Camerer, C.F. 2005. "Neural systems responding to degrees of uncertainty in human decision-making." *Science*. 310(5754) : 1680-1683.
- Huang, W.H., Lee, A.R. and Yang, C.H. 2006. "Antioxidative and anti-inflammatory activities of polyhydroxyflavonoids of *Scutellariabaicalensis* Georgi." *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. 70 (10): 2371–2380.
- Huang, G.J., Wang, B.S., Lin, W.C., Huang, S.S., Lee, C.Y., Yen, M.T. and Huang, M.H. 2012. "Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of Longan (*Dimocarpus longan* Lour.) Pericarp." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 6 : 1-10
- Ikhlas, A. K. and Ehab A. A. 2009. "Leung's encyclopedia of common natural ingredients: used in food, drugs and cosmetics." Wiley. 3(1) : 1-848.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Innark, P., Ratanachan, T., Khanobdee, C. and Samipak, A. Jantasuriyarat, C. 2014. “Downy mildew resistant/susceptible cucumber germplasm (*Cucumis sativus* L.) genetic diversity assessment using ISSR markers.” *Crop Protection*. 60 : 56-61.
- Issa, Y., Watts, DC., Brunton, P.A., Waters, CM. and Duxbury, AJ. 2004. “Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblasts in vitro.” *Academy of Dental Materials Journal*. 20(1) : 12-20.
- Jaitrong, S., Rattanapanone, N. and Manthey, J.A. 2006. “Analysis of the phenolic compounds in longan (*Dimocarpus Longan* Lour.) peel.” *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*. 119 : 371-375.
- Jing W., Dongliang, G., Dongmei, H., Xuwen, P. and Jianguang, L. 2020. “A comprehensive insight into the metabolic landscape of fruit pulp, peel, and seed in two longan (*Dimocarpus longan* Lour.) varieties.” *International Journal of Food Properties*. 23(1) : 1527-1539.
- Jung, ME., Lal, H. and Gatch, MB. 2002. “The discriminative stimulus effects of pentylenetetrazol as a model of anxiety: recent developments.” *Neuroscience and Biobehavioral*. 26 (4) : 429-39.
- Kanyasiri, R., Dayong, Z., Nuansri, R. and Fereidoon, S. 2020. “Sapindaceae (*Dimocarpus longan* and *Nephelium lappaceum*) seed and peel by products: Potential sources for phenolic compounds and use as functional.” *Journal of Functional Foods*. 67 : 103846.
- Kim, Y.J. and Uyama, H. 2005. “Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future.” *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 62 : 1707-1723.
- Kringkasemsri, A. 2012. “Polyphenol contents and antioxidant activities of peel and seed of Thai fruits.” *Environmental Science Graduate School, Silpakorn University*.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Kung, K.C. and Len, C.W. 2010. "Genetic diversity analysis using ISSR marker on longan (*Dimocarpus longan* Lour.) germplasm." *Journal of Taiwan Agricultural Research*. 59(3) : 185-196.
- Kunworarath, N., Rangkadilok, N., Suriyo, T., Thiantanawat, A. and Satayavivad, J. 2016. "Longan (*Dimocarpus longan* Lour.) inhibits lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production in macrophages by suppressing NF-kappaB and AP-1 signaling pathways." *Journal Ethnopharmacol.* 179 : 156-161.
- Levitz, S.M. and Diamond, R.D. 1985. "A rapid colorimetric assay of fungal viability with the tetrazolium salt MTT." *Journal of Infection Disease*. 152 : 938-945.
- Li, C. 2014. "Thin Layer Chromatography." *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. 8 : 631-638.
- Li, G. and Quiros, C.F. 2001. "Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica." *Theoretical and Applied Genetics*. 103 : 455-461.
- Li, L., Xu, Jialin., Mu, Y., Han, Li., L, R., Yaping, C. and Xueshi, H. 2015. "Chemical characterization and anti-hyperglycaemic effects of polyphenol enriched longan (*Dimocarpus longan* Lour.) pericarp extracts." *Journal of Functional Foods*. 13 : 314-322.
- Lin, T.X., Chen, Z.G., Dai, S.L. and Wu, N.H. 1998. "Taxonomic study of *Dimocarpus longan* by random amplified polymorphic dna technique." *Journal of Integrative Plant Biology*. 40(12) : 1159-1165
- Lin, T., Lin, Y. and Ishiki, K. 2005. "Genetic diversity of *Dimocarpus longan* in China revealed by AFLP markers and partial rbcl gene sequences." *Scientia Horticulturae*. 103 : 489-498.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Liu, J. C., Jiao, Z. G., Zhang, C. L., Yang, W. B., Lv, Z. Z. and Lv, Z. 2018. "Effects of different drying methods on phenolic contents, antioxidant, and tyrosinase inhibitory activity of peach blossoms." *Journal of Food Measurement and Characterization*. 12(4) : 2339–2348.
- Long, Y., Cheng, J., Mei, Z., Zhao, Y., Wei, C., Fu, S., Khan, M.A. and Fu, J. 2014. "Genetic analysis of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) in southern China by improved random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter-simple sequence repeat (ISSR)." *Molecular Biology*. 42 : 159–166.
- Mahavorasirikul, W., Viyanant, V., Chaijaroenkul, W. and Na-Bangchang, K. 2010. "Activity of Thai medicinal plants against human cholangiocarcinoma, laryngeal and hepatocarcinoma cells in vitro." *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 10 : 55-62.
- Mariana, B.D., Sugiyatno, A. and Supriyant, A. 2013. "Genetic diversity of local cultivars of *Dimocarpus longan* in Indonesia: preliminary study based on ISSR markers." *Acta Horticulturae*. 975(5) : 97-101.
- Mei, Z.Q., Fu, S.Y., Yu, H.Q., Yang, L.Q., Duan, C.G., Liu, X.Y., Gong, S. and Fu, J.J. 2014. "Genetic characterization and authentication of *Dimocarpus longan* Lour. using an improved RAPD technique." *Genetics and Molecular Research*. 13(1) : 1447-1455.
- Mequanint, W., Makonnen, E. and Urga, K. 2011. "In vivo anti-inflammatory activities of leaf extracts of *Ocimum lamifolium* in mice model." *Journal of Ethnopharmacology*. 134 (1) : 32-36.
- Mohammad, G., Omran, A.M. and Hussein, H. 2016. "Antibacterial and phytochemical analysis of *Piper nigrum* using gas chromatography mass spectrum and Fourier-transform infrared spectroscopy." *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 8(6) : 977–996.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Natungnuy, K., Poeaim, S. and Chareonsap, P. 2018. "Biological activities of the methanolic extracts from two varieties of *Dimocarpus longan* seeds." *International Journal of Agricultural Technology*. 14(7) : 1505-1514.
- Neda, G. D., Rabeta, M. S. and Ong, M. T. 2013. "Chemical composition and anti-proliferative properties of flowers of *Clitoria Ternatea*." *International Food Research Journal*. 20 (3) : 1229-1234.
- Ng, W. and Tan, S.G. 2015. "Inter-Simple sequence repeat (ISSR) markers : are we doing it right?." *ASM Science Journal*. 9(1) : 30-39.
- Nuengchamnong, N. and Ingkaninan, K. 2010. "On-line HPLC-MS-DPPH assay for the analysis of phenolic antioxidant compounds in fruit wine." *Food Chemistry*. 118(1) : 147-152.
- Pande, V., Sousa, S.F. and Ramos, M.J. 2009. "Direct covalent modification as a strategy to inhibit nuclear factor-kappa B." *Current Medicinal Chemistry*. 16 : 4261-4273.
- Panyathep, A., Chewonarin, T., Taneyhill, K. and Vinitketkumnuena, U. 2013. "Antioxidant and anti-matrix metalloproteinases activities of dried longan (*Euphoria longana*) seed." *Science Asia*. 39 : 12-18.
- Pientaweeratch, S., Panapisal, V. and Tansirikongkol, A. 2016. "Antioxidant, anti-collagenase and anti-elastase activities of *Phyllanthus emblica*, *manilkara zapota* and silymarin." *An in vitro comparative study for anti-aging applications. Pharmaceutical Biology*. 54(9) : 1865-1872.
- Pillaiyar, T., Manoj, M. and Vigneshwaran, N. 2017. "Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors." *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 32(1) : 403-425.
- Prasad, K.N., Hao, J., Shi, J., Liu, T., Li, J., Wei, X., Qiu, S., Xue, S. and Jiang, Y., 2009. "Antioxidant and anticancer activities of high pressure-assisted extract of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) fruit pericarp." *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 10 : 413-419.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Prasad, K.N., Yanga, B., Shi, J., Yua, C., Zhao, M., Xue, S., Jiang, J. 2010. “Enhanced antioxidant and antityrosinase activities of longan fruit pericarp by ultra-high-pressure-assisted extraction.” *Jiang Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 51 : 471–477.
- Ramzan, M., Sarwar, S., Kauser, N., Saba, R., Hussain, L., Shah, A., Aslam, M.N., Alkahtani, J. and Alwahibi, M.S. 2020. “Assessment of Inter simple sequence repeat (ISSR) and simple sequence repeat (SSR) markers to reveal genetic diversity among Tamarix ecotypes.” *Journal of King Saud University – Science*. 32(8) : 3437-3446.
- Rangkadilok, N., Worasuttayangkurn, L., Bennettand, R.N. and Satayavivad, N. 2005. “Identification and quantification of polyphenolic compounds in longan (*Euphoria longana* Lam.) fruit.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53 : 1387-1392.
- Rangkadilok, N., Sitthimonchai, S., Worasuttayangkurn, L., Mahidol, C., Ruchirawat, M., and Satayavivad, J. 2007. “Evaluation of free radical scavenging and antityrosinase activities of standardized longan fruit extract.” *Food and Chemical Toxicology*. 45 : 328-336.
- Rangkadilok, N., Tongchusak, S., Boonhok, R., Chaiyaroj, S.C., Junyaprasert, V.B., Buajeeb, W., Akanimanee, J., Raksasuk, T., Suddhasthira, T. and Satayavivad, J. 2012. “In vitro antifungal activities of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed extract.” *Fitoterapia*. 83 : 545-553.
- Raso, G.M., Meli, R., Carlo, G. Di., Pacilio, M. and Carlo, R. Di. 2001. “Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1” *Life Sciences Journal*. 68 (8) : 921-931.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Rerk-am, U., Kanabordee, R., Jirawat, E. and Kongsombat, B. 2016. "Anti-oxidant activities and polyphenolic compounds of longan (*Dimocarpus longan* Lour) peel and seed extracts." *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences (TJPS)*. 40: 120-122.
- Reddy, M. P., Sarla, N. and Siddiq, E. A. 2002. "Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plan breeding." *Euphytica : International Journal of Plant Breeding*. 128 : 9-17.
- Ruhoff, R.J. 1936. "N-Heptanoic Acid." *Organic Syntheses*. 16(39) : 394-399.
- Saewan, N., Koysoomboon, S., and Chantrapromma, K. 2011. "Anti-tyrosinase and anti-cancer activities of flavonoids from *Blumea balsamifera* DC." *Journal of Medicinal Plants Research*. 5(6) : 1018-1025.
- Santos, W.R. Bernado, R.R., Pecanha, L.M.T., Palatnik, M., Parente, J.P. and De, S. 1997. "Haemolytic activities of plant saponins and adjuvants. Effect of *Periandra mediterranea* saponin on the humoral response to the FML antigen of *Leishmania donovani*." *Vaccine*. 15(9) : 1024-1029.
- Salem, N., Jazia, S., Olfa, B., Kamel, M., Saber, K., Emna, S., Marwa, B., Nesrine, O., Manef, H., Brahim, A., Ferid, M., Jouda, L. M. and Ben, J. 2018. "Phenological stage effect on phenolic composition and repellent potential of *Mentha pulegium* Against *Tribolium castaneum* and *Lasioderma serricorne*." *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 8(4) : 207-216.
- Sarkar, R., Chugh, S. and Garg, V.K. 2012. "Newer and upcoming therapies for melasma." *Indian Journal of Dermatology*. 78(4) : 417.
- Sarah, J.M., Alfia, B., Sheila, J. and Priyadarshini, S. 2020. "In vitro antioxidant activity and gc-ms analysis of peel and pulp extracts of *dimocarpus longan*." *International Journal of Biology, Pharmacy and Allied Sciences (IJBPAS)*. 9(6) : 1269-1283.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Sautebin, L. 2000. "Prostaglandins and nitric oxide as molecular targets for anti-inflammatory therapy." *Fitoterapia*. 1 : S48-57.
- Scolaro, M J., Gunnill, L B., Pope, L E., Khalil, M H., Katz, D H., and Berg, J E. 2001. "The antiviral drug docosanol as a treatment for Kaposi's sarcoma lesions in HIV type 1-infected patients: a pilot clinical study." *AIDS Res and Human Retroviruses*. 17(1) : 35-43.
- Singthong, J., Suwayd, N., Steve, W., Cui, H, and Douglas, G. 2005. "Extraction and physicochemical characterization of Krueo Ma Noy pectin." *Food Hydrocolloids*. 19(5) : 793-801.
- Squires, R.F., Saederup, E., Crawley, J.N., Skolnick, P. and Paul, S.M. 1984. "Convulsant potencies of tetrazoles are highly correlated with actions on GABA/benzodiazepine/picrotoxin receptor complexes in brain." *Life Science Journal*. 35(14) : 1439-44.
- Srisook, K., Srisook, E., Mullika, P., Nadtaya, M. and Songklod, S. 2011. "Anti-inflammatory effect of ethyl acetate extract from *Cissus quadrangularis* Linn maybe involved with induction of heme oxygenase-1 and suppression of NF-B activation." *Journal of Ethnopharmacology*. 133 : 1008-1014.
- Srivastava, R., Akthar, S., Sharma, R. and Mishra, S. 2015. "Identification of ellagic acid analogues as potent inhibitor of protein Kinase CK2 : A chemopreventive role in oral Cancer." *Bioinformation*. 11 : 21-26.
- Sriwattana, S. and Chindaluang, Y. 2014. "Comparison of ultrasonic extraction with conventional extraction methods of phenolic compounds in longan (*Euphoria longana* Lamk.) seed." *Chiang Mai University Journal of Natural Sciences*. 13(1) : 439-448.
- Sudjaroen, Y. 2013. "Screening for antimicrobial and antimalarial activities of longan (*Dimocarpus longan* Lour) seeds." *Academic Journal*. 8(8) : 718-721.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Sunita, A. and Manju, S. 2017. "Gas chromatography mass spectrometry profiling in methanolic and ethyl-acetate root and stem extract of *Corbichonia decumbens* (Forssk.) exell from thar desert of rajasthan, India." *Pharmacognosy Research*. 1 : S48-S52.
- Tang, Y.Y., He, X.M., Sun, J., Li, C.B., Li, L., Sheng, J.F., Xin, M., Li, Z.C., Zheng, F.J., Liu, G.M., Li, J.M. and Ling, D.N. 2019. "Polyphenols and alkaloids in byproducts of longan fruits (*Dimocarpus Longan* Lour.) and their bioactivities." *Molecules Journal*. 24 (6) : 1186.
- Tira-umphon, A. 2015. "Genetic variation and morphological traits in melon and pickling melon from ISSR." *Burapha Science Journal*. 10(1) : 197-205.
- Udomlak, S., Prapassorn, R., Methiga, L. and Potechaman, P. 2010. "Bioactive compounds content, free radical scavenging and anti-acne inducing bacteria activities of some fruit peels extract." *Proceedings of 48th Kasetsart University Annual Conference: Agro-Industry*. 48 : 364-373.
- Wagner, H. and Bladt, S. 1996. "Plant drug analysis : A thin layer chromatography atlas." 2th ed. Berlin : Springer-Verlag. 4-26.
- Wang, X., Yuan, S., Wang, J., Lin, P., Liu, G., Lu, Y., Zhang, J., Wang, W. and Wei, Y. 2006. "Anticancer activity of litchi fruit pericarp extract against human breast cancer in vitro and in vivo." *Toxicology and Applied Pharmacology*. 15 (2) : 168-178.
- Wang, J., Dongliang, G., Dongmei, H., Xuwen, P. and Li, J. 2020. "A comprehensive insight into the metabolic landscape of fruit pulp, peel, and seed in two longan (*Dimocarpus longan* Lour.) varieties." *International Journal of Food Properties*. 23 (1) : 1527-1539.
- Wanvisait, P., Pinthong, K., Tankrathok, A., Sukkapan, P. and Srisamoot, N. 2019. "Assessing genetic diversity of some banana cultivars using inter simple sequence repeats (ISSR) markers." *Khon Kaen Agriculture Journal*. 47(1) : 1449-1458.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Wei, H., Zhu, J.J., Liu, X.Q., Feng, W.H., Wang, Z.M. and Yan, L.H. 2016. "Review of bioactive compounds from root barks of *Morus* plants (Sang-Bai-Pi) and their pharmacological effect." *Cogent Chemistry*. 2(1) : 1-16.
- Xiang, L.T., Guang, C.Z., Lan, D.S. and Hu, W.N. 1998. "Taxonomic study of *Dimocarpus longan* by random amplified polymorphic DNA technique." *Journal Integr Plant Biology* . 40(12) : 1159-1165.
- Wickett, R.R., Ebanks, J.P. and Boissy, R.E. 2009. "Mechanisms regulating skin pigmentation: the rise and fall of complexion coloration." *Internation Journal of Molecular Sciences*. 10(9) : 4066-4087
- Yang, L., Khan, A., Mei, Z and Manman, Y. 2014. "Development of RAPD-SCAR markers for *Lonicera japonica* Thunb. (Caprifoliaceae) variety authentication by improved RAPD and DNA cloning." *Revista de biologia tropical*. 62(4) : 1649-1657.
- Yamuna, P., Abirami, P., Vijayashalini, P. and M, Sharmila. 2017. "GC-MS analysis of bioactive compounds in the entire plant parts of ethanolic extract of *Gomphrena decumbens* Jacq." *Journal of Medicinal Plants Studies*. 5(3) : 31-37.
- Yi, Y., Huang, F., Zhang, M.W., Zhang, R.F., Deng, Y.Y., Wei, Z.C. and He, J.R. 2013. "Solution properties and in vitro anti-tumor activities of polysaccharides from longan pulp." *Molecules*. 18 (9) : 11601-11613.
- Yi, Y., Wang, H., Zhang, R., Min, T., Huang, F., Liu, L. and Zhang, M. 2015. "Characterization of polysaccharide from longan pulp as the macrophage stimulator." *RSC Advances*. 5 : 97163-97170.
- Yonemoto, Y., Chowdhury, A., Kato, H. and Macha, M.M. 2006. "Cultivars identification and their genetic relationships in *Dimocarpus longan* subspecies based on RAPD markers." *Scientia Horticulturae*. 109(2) : 147-152.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Yuling, C. and Anthony, A.S. 2013. "Nicotinamide riboside, a trace nutrient in foods, is a vitamin B₃ with effects on energy metabolism and neuroprotection." *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 16(6) : 657-61.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียม 10% CTAB buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย 10% CTAB buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยชั่งสาร CTAB ปริมาณ 10 กรัม ละลายด้วย NaCl ความเข้มข้น 0.7 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวน และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2. การเตรียม 2X CTAB buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย 2X CTAB buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เตรียม Tris-HCl 1 โมลาร์ pH 8.0 NaCl 5 โมลาร์ และสารละลาย EDTA 0.5 โมลาร์ (pH 8.0) ละลายในน้ำ จากนั้นผสมสาร CTAB ปริมาตร 2 กรัม Polyvinylpyrrolidone (PVP) 1 กรัม ละลายด้วย Tris-Base 1 โมลาร์ (pH 8.0) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร สารละลาย NaCl 5 โมลาร์ ปริมาตร 28 มิลลิลิตร และสารละลาย EDTA 0.5 โมลาร์ (pH 8.0) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องกวนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อจนครบ 100 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3. การเตรียมสารละลาย Tris-EDTA (TE) buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

การเตรียมสารละลาย TE buffer ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยการผสมสารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (pH 8.0) ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร กับสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (pH 8.0) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

4. การเตรียมสารละลาย 10X Tris-borate-EDTA (TBE) buffer

การเตรียมสารละลาย 10X TBE buffer ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร โดยชั่งสาร Tris-base ปริมาณ 108 กรัม Boric acid ปริมาณ 61.83 กรัม และ EDTA ปริมาณ 9.305 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน 900 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 8.0 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนให้ได้ ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

5. การเตรียมสารละลาย dNTPs ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

การเตรียมสารละลาย dNTPs ความเข้มข้น 1.25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยผสมสารละลาย dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ โดยใช้สารปริมาตรละ 1.25 ไมโครลิตร กับน้ำกลั่นปราศจากไอออน ปริมาตร 95 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสาร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

6. วิธีทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วย GF-1 AmbiClean Kit (Gel & PCR)

นำตัวอย่างดีเอ็นเอมาปรับปริมาตรให้ได้ 100 ไมโครลิตร ด้วยน้ำ sterile distilled water แล้วเติม buffer DB 1 เท่าของดีเอ็นเอ เช่น มีตัวอย่างดีเอ็นเอ 100 ไมโครลิตร ให้เติม buffer DB 100 ไมโครลิตร เป็นต้น ผสมให้เข้ากันเบา ๆ ด้วยไมโครปิเปต แล้วย้ายสารละลายดีเอ็นเอลงใน column tube และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นเทส่วนใสทิ้ง เติม wash buffer (ที่ผสมเอทานอลแล้ว) 650 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อกำจัดเอทานอลออกให้หมด และเติม elution buffer ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร (ก่อนเติม elution buffer ต้องนำไป pre heat ที่ 65 องศาเซลเซียสก่อน) แล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที

7. เตรียมสารละลาย Dragendroff's reagent ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย Dragendroff's reagent ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยละลายบิสมาท์ไนเตรท 8 กรัม ลงในกรดไนตริก 30 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ 27.2 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร แล้วเติมละลายบิสมาท์ไนเตรทอย่างช้าๆ ลงในสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร

8. เตรียมสารละลาย Galstin solution ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย Galstin solution ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยละลายเจลาติน 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ใช้ความร้อนในการละลายสารละลายเจลาติน

9. เตรียมสารละลาย Galstin salt solution

เตรียมสารละลาย Galstin salt solution โดยผสม Galstin solution กับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1:1

10. เตรียมสารละลาย Mayer' reagent ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย Mayer' reagent ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.136 กรัม ในน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร และละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ 0.5 กรัม ในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์อย่างช้าๆ ลงในสารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์ แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร

11. การเตรียมอาหาร Nutrient broth (NB)

ชั่งอาหารสำเร็จ Nutrient broth 0.78 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 60 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวน นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

12. การเตรียมอาหาร Nutrient agar (NA)

ชั่งอาหารสำเร็จ Nutrient broth 2.6 กรัม และผงวุ้น 3 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวน นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที การเตรียมอาหาร Brain heart infusion agar (BHI agar)

13. การเตรียมอาหาร Mueller hinton broth (MHB)

ชั่งอาหาร Mueller hinton 1.26 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 60 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวน นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

14. การเตรียมอาหาร Mueller hinton agar (MHA)

ชั่งอาหาร Mueller hinton 4.2 กรัม และผงวุ้น 3.6 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวน นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

15. การเตรียมอาหาร Brain heart infusion Broth (BHI Broth)

ชั่งอาหาร Brain heart infusion 2.2 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 60 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวน นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

16. การเตรียมอาหาร Brain heart infusion agar (BHI agar)

ชั่งอาหาร Brain heart infusion 7.4 กรัม และผงวุ้น 3 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

17. การเตรียมสาร FolinCiocalteu ร้อยละ 20 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำกลั่นที่ปราศเชื้อ ปรับ ปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ใส่ขวดปราศจากแสง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

18. การเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ร้อยละ 7.5 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่งสารโซเดียมคาร์บอเนต 7.50 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวน ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

19. การเตรียมสารอนุมูลอิสระ DPPH ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร

ชั่งสาร DPPH 2.364 มิลลิกรัม และละลายด้วยเมทานอล และปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรให้ได้ 30 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดที่ปราศจากแสง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

20. การเตรียมสารอนุมูลอิสระ ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ชั่งสาร ABTS 90 มิลลิกรัม ละลายด้วยเมทานอลปริมาตร 25 มิลลิลิตร จากนั้นเตรียมสาร Potassium persulfate ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ ชั่งสาร 16.55 มิลลิกรัม ละลายด้วยเมทานอลปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลาย ABTS ผสมกับสารละลาย Potassium persulfate บ่มไว้เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ในขวดที่ปราศจากแสงอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ต้องเจือจางด้วยเมทานอล วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร ให้ค่าอยู่ในช่วง 0.7

21. การเตรียมสารละลาย FRAP reagent ปริมาตร 12 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย FRAP reagent จากการผสมสารละลาย acetate buffer ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ pH 3.6 : สารละลาย TPTZ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ในกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ : สารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วน 10:1:1 เก็บไว้ในขวดแก้วที่ปราศจากแสง และเตรียมสารใหม่ทุกครั้งก่อนใช้งาน

22. การเตรียมสารละลายในการทดสอบเอนไซม์ไทโรซิเนส

การเตรียมสารละลาย phosphate buffer ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย phosphate buffer pH6.8 โดยเตรียมสาร ก คือ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้น 7.8 กรัมต่อลิตร และสาร ข คือ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้น 8.9 กรัมต่อลิตร แล้วผสมสาร ก ปริมาตร 24.5 มิลลิลิตร กับสาร ข ปริมาตร 25.5 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 6.8 จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารละลาย L-DOPA ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ชั่งสาร L-DOPA (L-6,4 dihydroxyphenylalanine) ปริมาตร 4.93 มิลลิกรัม ละลายด้วยสารละลาย phosphate buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวน และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียมเอนไซม์ไทโรซิเนส ความเข้มข้น 25 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

การเตรียมเอนไซม์ไทโรซิเนส ความเข้มข้น 25 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยเจือจางสารละลายจาก Stock ของเอนไซม์ไทโรซิเนสจากความเข้มข้น 1000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยดูสารละลายจาก Stock มาปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย Phosphate buffer pH 6.8 ปริมาตร 900 ไมโครลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

23. การเตรียมสารละลายในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์

การเตรียม Phosphate buffer saline (PBS) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

การเตรียม Phosphate buffer saline (PBS) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยนำ PBS สำเร็จรูป 1 เม็ด ใส่ลงในบีกเกอร์ จากนั้นเติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากันด้วยเครื่องกวน และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

การเตรียม Sodium nitroprusside (SNP) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

การเตรียม Sodium nitroprusside (SNP) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยชั่ง SNP 2.9795 มิลลิกรัม ละลายด้วย Phosphate buffer saline (PBS)

การเตรียม lipopolysaccharide (LPS) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

การเตรียม lipopolysaccharide (LPS) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่ง LPS 1 มิลลิกรัม ละลายด้วย Phosphate buffer saline (PBS) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร และเจือจางจาก Stock ของ LPS ให้ได้ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640

การเตรียม Indomethacin

การเตรียม stock ของ Indomethacin ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายด้วย Phosphate buffer saline (PBS) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นกรองด้วยตัวกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร และเจือจางจาก Stock ของ Indomethacin ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640

24. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

เตรียมอาหาร RPMI 1640 โดยนำอาหาร RPMI 1640 ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 900 มิลลิลิตร เติม NaHCO_3 2 กรัม แล้วผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวน จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 6.8-7.0 และกรองผ่านกระดาษ

กรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร ทำการเตรียมอาหารภายในตู้ laminar air flow เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

25. การเตรียม Fetal Bovine Serum (FBS)

นำ Fetal brovine serum มาทำการ inactivate ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาแบ่งใส่ขวดที่ปราศจากเชื้อขนาด 100 มิลลิลิตร ทำการแบ่งใส่ขวดภายในตู้ laminar air flow แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

26. การเตรียม complete media

ผสมอาหาร RPMI 1640 ปริมาตร กับ FBS แล้วเติมยาปฏิชีวนะเจนนตามยซินที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กรองด้วยตัวกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร ใส่ขวดที่ผ่านการฆ่าเชื้อภายในตู้ Laminar air flow และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

27. การเตรียมสารละลาย Anisaldehyde reagent ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลาย Anisaldehyde reagent ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยผสมสารละลาย Absolute ethanol ปริมาตร 90 มิลลิลิตร p-Anisaldehyde ปริมาตร 2 มิลลิลิตร กรดซัลฟิวริก ปริมาตร 6 มิลลิลิตร และน้ำปราศจากเชื้อ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมเข้าด้วยกัน เก็บใส่ขวดสีชาหรือห่อฟรอยด์เพื่อป้องกันแสง

ภาคผนวก ข

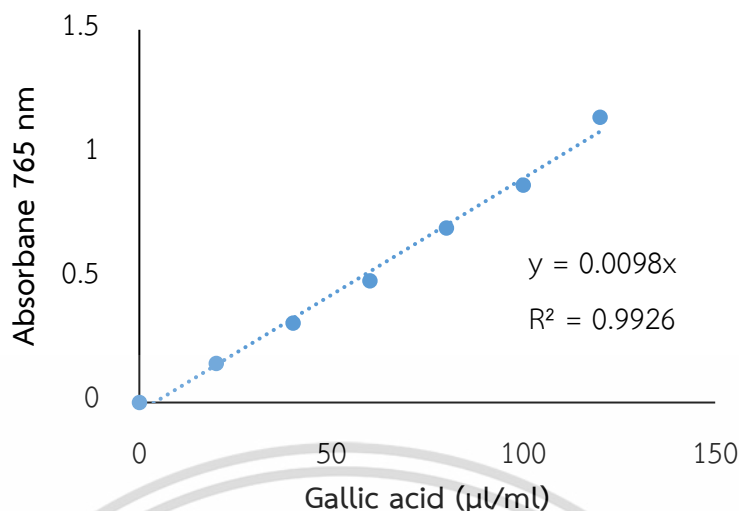
1. การคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

นำค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้นต่างๆ ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร จากการวิเคราะห์ตามวิธี Folin-Ciocalteu แสดงดังตารางภาคผนวกที่ ข-1 มาสร้างกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก ดังภาพภาคผนวกที่ ข-1

ตารางภาคผนวกที่ ข-1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้น 20-120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของ สารมาตรฐานกรดแกลลิก ($\mu\text{g/ml}$)	ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	1	2	3		
20	0.14	0.15	0.16	0.15	0.008
40	0.35	0.31	0.29	0.31	0.029
60	0.48	0.49	0.49	0.48	0.003
80	0.66	0.72	0.71	0.70	0.028
100	0.87	0.86	0.87	0.87	0.005
120	1.14	1.14	1.15	1.14	0.005

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพภาคผนวกที่ ข-1 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu

จากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (รูปภาคผนวกที่ ข-1) ได้สมการมาตรฐานดังนี้

$$Y = 0.0098X \quad (\text{ข-1})$$

โดยที่ y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

X คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

ตารางภาคผนวกที่ ข-2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลลำไยเถาและลำไยต้นสายพันธุ์ฮือดอ

สารสกัดเปลือกผลลำไย	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mgGAE/g extract)			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	1	2	3		
Thao1	83.26	88.19	82.75	84.73	3.00
Thao2	64.55	68.22	63.93	65.57	4.93
Edor	63.31	68.26	72.10	67.56	2.31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

โดยการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร ของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลลำไยเถา Tho1 ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการทดลอง 3 ซ้ำ ได้เท่ากับ 0.816, 0.864 และ 0.811 ตามลำดับ มาคำนวณหาค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยแทนในสมการ ข-2

$$\text{จากสมการ ข-1 เมื่อหาค่า } x \text{ จะได้} \quad x = y/0.0098 \quad (\text{ข-2})$$

หลังจากนำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเมทานอล Tho1 แทนลงในสมการที่ ข-2 แล้ว จะได้ค่าในการคำนวณในแต่ละซ้ำเท่ากับ 83.26, 88.19 และ 88.27 $\mu\text{gGAE/ml}$ หลังจากนั้นนำจากการคำนวณได้มาหารด้วยความเข้มข้นของสารสกัดที่ทดสอบ คือ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าที่ได้จะอยู่ในหน่วย $\mu\text{gGAE}/\mu\text{g extract}$ และนำไปคูณด้วย 1000 เพื่อเปลี่ยนหน่วยเป็น mgGAE/g extract ดังนั้น สารสกัดเมทานอล Tho1 ในแต่ละซ้ำจะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 83.26, 88.19 และ 88.27 mgGAE/g extract ตามลำดับ และนำค่าในแต่ละซ้ำมาหาค่าเฉลี่ยของสารสกัด Tho1 มีค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานได้เท่ากับ $84.73 \pm 3.00 \text{ mgGAE/g extract}$

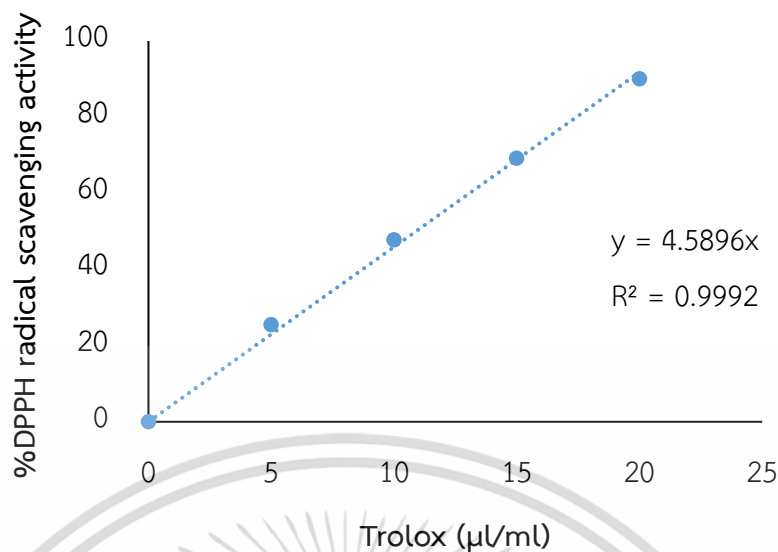
2. การคำนวณความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH

นำค่าการดูดกลืนแสงของสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH ความเข้มข้นต่างๆ ดังตารางภาคผนวกที่ ข-3 มาสร้างกราฟมาตรฐานโทรล็อกซ์ระหว่างความเข้มข้นของสารโทรล็อกซ์กับค่าเฉลี่ยร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ดังภาพภาคผนวกที่ ข-2

ตารางภาคผนวกที่ ข-3 สารมาตรฐานโทรล็อกซ์ที่ความเข้มข้นต่าง 5-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าร้อยละการต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH

ความเข้มข้นของ สารมาตรฐานโทรล็อกซ์ ($\mu\text{g/ml}$)	ค่าเฉลี่ยร้อยละของการต้าน สารอนุมูลอิสระ DPPH			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	1	2	3		
5	26.79	29.17	20.42	25.46	4.52
10	49.86	42.61	50.66	47.71	4.43
15	73.82	68.16	65.51	69.17	4.24
20	91.86	91.51	86.64	90.00	2.91

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพภาคผนวกที่ ข-2 กราฟมาตรฐานโทรล็อกซ์ในการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH

จากกราฟมาตรฐานโทรล็อกซ์ (รูปภาคผนวกที่ ข-2) ได้สมการมาตรฐานดังนี้

$$Y = 4.5896X \quad (\text{ข-3})$$

โดยที่ y คือ ค่าร้อยละการต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH

X คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

จากสมการที่ ข-3 หาค่า x จะได้ $x = y/4.5896$ (ข-4)

จากสมการ ข-4 สามารถหาค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ได้ โดยแทนค่า y เท่ากับร้อยละ 50 ในสมการที่ ข-4 ได้ดังนี้

$$x = 50/4.5896$$

$$x = 10.90$$

ค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ที่ได้จากการคำนวณ เท่ากับ 10.90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ที่ได้จากโปรแกรม GraphPad Prism 8.0 เท่ากับ 10.55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งพบว่าค่าไม่แตกต่างกันมาก โดยในบทที่ 4 ผลของการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ได้รายงานค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ที่ได้จากโปรแกรม GraphPad Prism 8.0

ตารางภาคผนวกที่ ข-4 ค่าเฉลี่ยร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดเมทานอล
จากเปลือกผลลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อีตอ

ความเข้มข้นสารสกัดจากเปลือกผลลำไย ($\mu\text{g/ml}$)	ค่าเฉลี่ยร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ DPPH		
	Thao1	Thao2	Edor
31.25	53.93 \pm 1.11	40.11 \pm 0.20	27.91 \pm 1.77
62.50	60.38 \pm 1.18	54.49 \pm 1.20	46.44 \pm 1.38
125	69.16 \pm 1.53	60.12 \pm 0.75	78.45 \pm 0.89
250	78.61 \pm 1.01	72.62 \pm 0.80	94.56 \pm 0.71
500	92.65 \pm 0.87	91.60 \pm 0.17	96.22 \pm 0.66

การคำนวณความสามารถในด้านสารอนุมูลอิสระ DPPH

นำค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างสารสกัดเมทานอล Thao1 ที่ความเข้มข้น 31.25, 62.50, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 53.93, 60.38, 69.16, 78.61 และ 92.65 ตามลำดับ มาคำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH

สารสกัดเมทานอล Thao1 (31.25 $\mu\text{g/ml}$)

แทนค่า y ในสมการ ข-4

$$x = 53.93/4.5896$$

$$x = 11.75 \mu\text{gTE/ml}$$

สารสกัดเมทานอล Thao1 (62.50 $\mu\text{g/ml}$)

แทนค่า y ในสมการ ข-4

$$x = 60.38/4.5896$$

$$x = 13.16 \mu\text{gTE/ml}$$

สารสกัดเมทานอล Thao1 (125 $\mu\text{g/ml}$)

แทนค่า y ในสมการ ข-4

$$x = 69.16/4.5896$$

$$x = 15.07 \mu\text{gTE/ml}$$

สารสกัดเมทานอล Thao1 (250 $\mu\text{g/ml}$)

แทนค่า y ในสมการ ข-4

$$x = 78.61/4.5896$$

$$x = 17.13 \mu\text{gTE/ml}$$

สารสกัดเมทานอล Thao1 (500 $\mu\text{g/ml}$)

แทนค่า y ในสมการ ข-4

$$x = 92.65/4.5896$$

$$x = 20.20 \mu\text{gTE/ml}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำค่าที่ได้จากการคำนวณข้างต้นของสารสกัด Thao1 คือ 11.75, 13.16, 15.07, 17.13 และ 20.20 หาดด้วยความเข้มข้นของสารสกัดที่ทดสอบ คือ 31.25, 62.50, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จะมีค่าเท่ากับ 0.37, 0.21, 0.12, 0.06 และ 0.04 จากนั้นคูณด้วย 1000 จะได้ค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอยู่ในหน่วย mgTE/g extract และเมื่อนำมาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารสกัด Thao 1 ได้เท่ากับ 163.21 ± 1.14 mgTE/g extract ส่วนสารสกัดเมทานอลตัวอย่างอื่นๆ คำนวณเช่นเดียวกัน

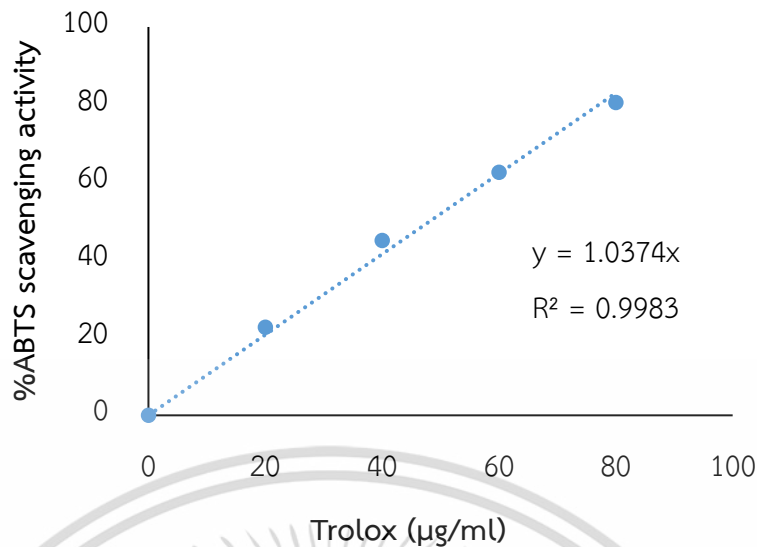
2. การคำนวณความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระ ABTS

นำค่าการดูดกลืนแสงของสารต้านอนุมูลอิสระ ABTS ความเข้มข้นต่างๆ ดังตารางภาคผนวกที่ ข-5 มาสร้างกราฟมาตรฐานโทรล็อกซ์ระหว่างความเข้มข้นของสารโทรล็อกซ์กับค่าเฉลี่ยร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ดังภาพภาคผนวกที่ ข-3

ตารางภาคผนวกที่ ข-5 สารมาตรฐานโทรล็อกซ์ที่ความเข้มข้นต่าง 20-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าร้อยละการต้านสารอนุมูลอิสระ ABTS

ความเข้มข้นของ สารมาตรฐานโทรล็อกซ์ ($\mu\text{g/ml}$)	ค่าเฉลี่ยร้อยละของการต้านสาร อนุมูลอิสระ ABTS			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	1	2	3		
20	21.42	23.29	23.29	22.66	1.08
40	44.34	41.72	49.01	45.02	3.69
60	62.58	64.35	60.71	62.55	1.82
80	80.44	81.19	79.88	80.51	0.65
100	81.10	79.88	95.69	85.56	8.79

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพภาคผนวกที่ ข-3 กราฟมาตรฐาน Trolox ในการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระ ABTS

จากกราฟมาตรฐาน Trolox (รูปภาคผนวกที่ ข-5) ได้สมการมาตรฐานดังนี้

$$Y = 1.0374X \quad (\text{ข-5})$$

โดยที่ y คือ ค่าร้อยละการต้านสารอนุมูลอิสระ ABTS

X คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Trolox (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

จากสมการที่ ข-5 หากค่า x จะได้ $x = y/1.0374$ (ข-6)

จากสมการ ข-6 สามารถหาค่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน Trolox ได้ โดยแทนค่า y เท่ากับร้อยละ 50 ในสมการที่ ข-6 ได้ดังนี้

$$x = 50/1.0374$$

$$x = 48.19$$

ค่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน Trolox ที่ได้จากการคำนวณ เท่ากับ 48.19 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน Trolox ที่ได้จากโปรแกรม GraphPad Prism 8.0 เท่ากับ 45.44 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งพบว่าค่าไม่แตกต่างกันมาก โดยในบทที่ 4 ผลของการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ได้รายงานค่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน Trolox ที่ได้จากโปรแกรม GraphPad Prism 8.0

ตารางภาคผนวกที่ ข-6 ค่าเฉลี่ยร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดเมทานอล จากเปลือกผลลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ

ความเข้มข้นสารสกัด จากเปลือกผลลำไย ($\mu\text{g/ml}$)	ค่าเฉลี่ยร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ ABTS		
	Thao1	Thao2	Edor
200	9.88 \pm 0.42	13.95 \pm 0.76	17.49 \pm 0.20
400	21.43 \pm 0.42	31.78 \pm 1.31	36.22 \pm 0.78
600	33.46 \pm 0.91	52.23 \pm 0.47	56.08 \pm 0.66
800	62.29 \pm 0.87	69.68 \pm 0.47	77.86 \pm 0.20
1000	83.81 \pm 0.54	87.18 \pm 0.83	97.55 \pm 0.06

การคำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS

นำค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของตัวอย่างสารสกัดเมทานอล Thao1 ที่ความเข้มข้น 200, 400, 600, 800 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 9.88, 21.43, 33.46, 62.29 และ 83.81 ตามลำดับ มาคำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS

สารสกัดเมทานอล Thao1 (200 $\mu\text{g/ml}$)

แทนค่า y ในสมการ ข-6

$$x = 9.88/1.0374$$

$$x = 9.52 \mu\text{gTE/ml}$$

สารสกัดเมทานอล Thao1 (400 $\mu\text{g/ml}$)

แทนค่า y ในสมการ ข-6

$$x = 21.43/1.0374$$

$$x = 20.66 \mu\text{gTE/ml}$$

สารสกัดเมทานอล Thao1 (600 $\mu\text{g/ml}$)

แทนค่า y ในสมการ ข-6

$$x = 33.46/1.0374$$

$$x = 32.25 \mu\text{gTE/ml}$$

สารสกัดเมทานอล Thao1 (800 $\mu\text{g/ml}$)

แทนค่า y ในสมการ ข-6

$$x = 62.22/1.0374$$

$$x = 60.04 \mu\text{gTE/ml}$$

สารสกัดเมทานอล Thao1 (1000 $\mu\text{g/ml}$)

แทนค่า y ในสมการ ข-6

$$x = 83.81/1.0374$$

$$x = 80.78 \mu\text{gTE/ml}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำค่าจากการคำนวณข้างต้นของสารสกัด Thao1 คือ 9.52, 20.66, 32.25, 60.04 และ 80.78 ทหารด้วยความเข้มข้นของสารสกัดที่ทดสอบคือ 200, 400, 600, 800 และ 1000 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จะมีค่าเท่ากับ 0.04, 0.05, 0.05, 0.07 และ 0.08 จากนั้นคูณด้วย 1000 จะได้ค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอยู่ในหน่วย mgTE/g extract และค่าจากการคำนวณในแต่ละซ้ำนำมาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารสกัด Thao1 ได้เท่ากับ 61.73 ± 0.63 mgTE/g extract ส่วนสารสกัดเมทานอลตัวอย่างอื่นๆ คำนวณเช่นเดียวกัน

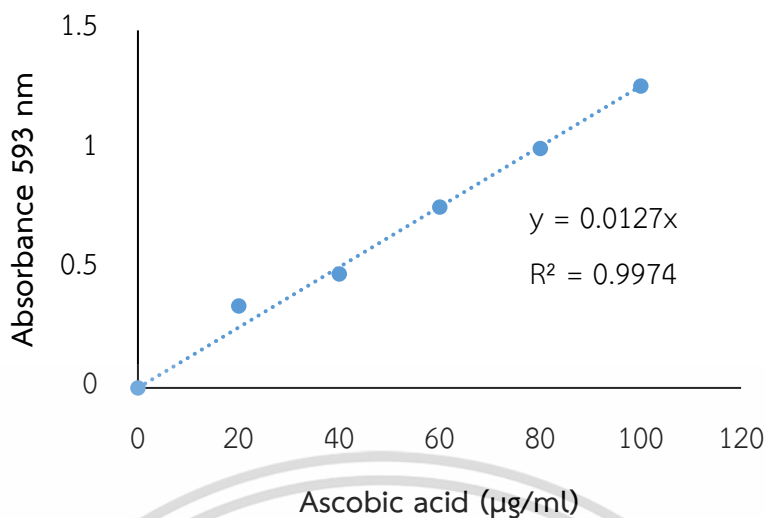
3. การคำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ Fe^{3+} -TPTZ ในวิธี FRAP

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังตารางภาคผนวกที่ ข-7 มาสร้างกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิกกับค่าการดูดกลืนแสง ดังภาพภาคผนวกที่ ข-4

ตารางภาคผนวกที่ ข-7 สารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่างๆ และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 ในการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} -TPTZ ในวิธี FRAP

ความเข้มข้นของ สารมาตรฐานแอสคอร์บิก ($\mu\text{g/ml}$)	ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	1	2	3		
20	0.33	0.35	0.34	0.34	0.01
40	0.44	0.50	0.48	0.47	0.03
60	0.66	0.82	0.78	0.75	0.08
80	0.97	1.01	1.02	1.00	0.02
100	1.15	1.24	1.39	1.26	0.12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพภาคผนวกที่ ข-4 กราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกในการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระ Fe^{3+} -TPTZ ในวิธี FRAP

จากกราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (รูปภาคผนวกที่ ข-7) ได้สมการสารมาตรฐานดังนี้

$$Y = 0.0127X \quad (\text{ข-7})$$

โดยที่ y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร

X คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

ตารางภาคผนวกที่ ข-8 ความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} -TPTZ ในวิธี FRAP ของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อึดอ

ความเข้มข้นของสารมาตรฐานแอสคอร์บิก (µg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	1	2	3		
Thao1	1.08	1.08	1.09	1.08	0.004
Thao2	1.19	1.19	1.18	1.18	0.004
Edor	2.55	2.52	2.58	2.55	0.024

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} -TPTZ ในวิธี FRAP

โดยการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร ของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกลำไยเถา Thao1 ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการทดลอง 3 ซ้ำ ได้เท่ากับ 1.08, 1.08 และ 1.09 ตามลำดับ

จากสมการ ข-7 เมื่อหาค่า x จะได้ $x = y/0.0127$ (ข-8)

สารสกัดเมทานอล Thao1 (ซ้ำที่ 1)

แทนค่า y ในสมการ ข-8

$$x = 1.08/0.0127$$

$$x = 85.27 \mu\text{gAAE/ml}$$

สารสกัดเมทานอล Thao1 (ซ้ำที่ 2)

แทนค่า y ในสมการ ข-8

$$x = 1.08/0.00098$$

$$x = 85.03 \mu\text{gAAE/ml}$$

สารสกัดเมทานอล Thao1 (ซ้ำที่ 3)

แทนค่า y ในสมการ ข-8

$$x = 1.09/0.00098$$

$$x = 86.45 \mu\text{gAAE/ml}$$

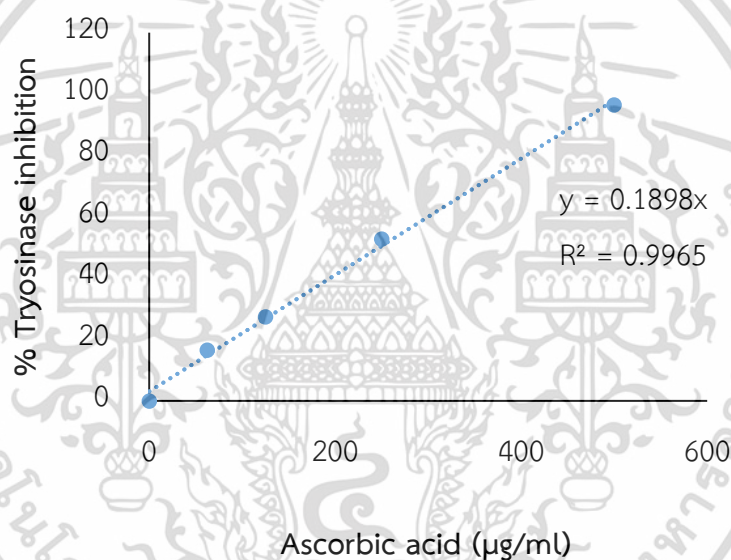
นำค่าที่ได้ คือ 85.27, 85.03 และ 86.45 $\mu\text{gAAE/ml}$ ทหารด้วยความเข้มข้นของสารสกัดที่ทดสอบ คือ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และคูณด้วย 1000 เพื่อเปลี่ยนหน่วยเป็น mgTE/g extract จากนั้นนำค่าจากการคำนวณแต่ละซ้ำมาคำนวณค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ สารสกัดเมทานอลของ Thao1 มีความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} -TPTZ ในวิธี FRAP เท่ากับ $58.59 \pm 0.75 \text{ mgAAE/g extract}$ และคำนวณแบบเดียวกันในสารสกัดอื่น ๆ

4. การคำนวณค่าความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

นำค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น 62.5-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางภาคผนวกที่ ข-9 สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิกกับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ดังภาพภาคผนวกที่ ข-5

ตารางภาคผนวกที่ ข-9 สารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น 62.5-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (µg/ml)	ค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส			ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	1	2	3		
62.5	15.22	16.00	18.43	16.55	1.67
125	26.30	28.67	27.4	27.45	1.18
250	53.00	52.80	52.54	52.78	1.86
500	97.41	96.22	95.67	96.43	1.22



ภาพภาคผนวกที่ ข-5 กราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

จากกราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (รูปภาคผนวกที่ ข-5) ได้สมการสารมาตรฐานดังนี้

$$Y = 0.1898X \quad (\text{ข-8})$$

โดยที่ y คือ ค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

X คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

จากสมการที่ ข-8 หาค่า x จะได้ $x = y/0.1898$ (ข-9)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากสมการ ข-9 สามารถหาค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกได้ โดยแทนค่า y เท่ากับร้อยละ 50 ในสมการที่ ข-9 ได้ดังนี้

$$x = 50/0.1898$$

$$x = 263.43$$

ค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ได้จากการคำนวณ เท่ากับ 263.43 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ได้จากโปรแกรม GraphPad Prism 8.0 เท่ากับ 236.73 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งพบว่าค่าไม่แตกต่างกันมาก โดยในบทที่ 4 ผลของการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลลำไยเถาและลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ

ตารางภาคผนวกที่ ข-10 ค่าเฉลี่ยค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลลำไยเถาและลำไยต้นสายพันธุ์อีดอ

ความเข้มข้นสารสกัด จากเปลือกผลลำไย ($\mu\text{g/ml}$)	ค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ		
	Thao1	Thao2	Edor
500	22.20 \pm 0.13	20.67 \pm 0.14	57.60 \pm 0.13
1000	54.21 \pm 0.18	56.87 \pm 0.14	76.67 \pm 0.27
1500	73.99 \pm 0.13	81.12 \pm 0.14	82.85 \pm 0.35

การคำนวณความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ

นำค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระของตัวอย่างสารสกัดเมทานอล Thao1 ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คำนวณร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระพบว่าค่าเฉลี่ย เท่ากับ 54.21

จากสมการ ข-9 หาค่า x จะได้

$$x = y/0.1898 \quad (\text{ข-10})$$

เมื่อแทนค่า y ในสมการที่ (ข-10)

$$x = 54.12/0.1898$$

$$x = 285.64$$

นำค่าจากการคำนวณ หาดูด้วยความเข้มข้นของสารสกัดที่ทดสอบคือ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าที่ได้จะอยู่ในหน่วยของ mgAAE/g extract พบว่าสารสกัด Thao1 มีค่าความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระเท่ากับ 285.14 mgAAE/g extract แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ส่วนสารสกัดเมทานอลตัวอย่างอื่นๆ คำนวณเช่นเดียวกัน

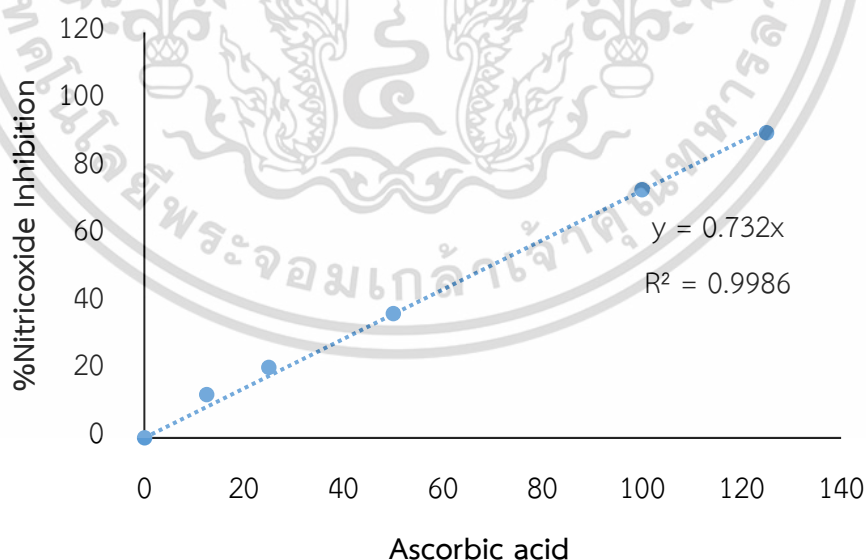
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. การคำนวณความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์

นำค่าร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์ด้วยวิธี NOA ของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังตารางภาคผนวก ข-11 มาสร้างกราฟมาตรฐานแอสคอร์บิกกับค่าร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์ ดังภาพภาคผนวกที่ ข-6

ตารางภาคผนวกที่ ข-11 สารมาตรฐานแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่างๆ กับค่าร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์

ความเข้มข้นของ สารมาตรฐานแอสคอร์บิก ($\mu\text{g/ml}$)	ค่าร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์			ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	1	2	3		
12.5	10.79	14.02	13.66	12.82	0.35
25	24.46	17.26	20.86	20.86	2.39
50	35.25	36.33	38.84	36.81	1.84
100	75.53	74.10	70.86	73.50	3.59
125	89.92	90.28	90.64	90.28	1.77



ภาพภาคผนวกที่ ข-6 กราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับค่าร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์ด้วยวิธี NOA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากกราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (รูปภาคผนวกที่ ข-6) ได้สมการมาตรฐานดังนี้

$$Y = 0.732X \quad (\text{ข-11})$$

โดยที่ Y คือ ค่าร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์

X คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

จากสมการที่ ข-11 หากค่า x จะได้ $x = y/0.732$ (ข-10)

จากสมการ ข-10 สามารถหาค่า IC₅₀ ของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกได้ โดยแทนค่า y เท่ากับร้อยละ 50 ในสมการที่ ข-9 ได้ดังนี้

$$x = 50/0.732$$

$$x = 68.30$$

ค่า IC₅₀ ของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ได้จากการคำนวณ เท่ากับ 68.30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนค่า IC₅₀ ของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ได้โปรแกรม GrapPad Prism 8 เท่ากับ 68.46 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจากผลการคำนวณพบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน โดยในบทที่ 4 ผลของการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ด้วยวิธี NOA ได้รายงานค่า IC₅₀ ของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ได้โปรแกรม GrapPad Prism 8.0

ตารางภาคผนวกที่ ข-12 ค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์ด้วยวิธี NOA ของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลลำไยเถาและลำไยต้นสายพันธุ์อื้อตอ

ความเข้มข้นของสารสกัด จากเปลือกผลลำไย (µg/ml)	ค่าร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์		
	Thao1	Thao2	Edor
62.5	45.89±1.80	49.27±1.18	42.51±1.80
125	57.48±4.78	51.69±0.68	51.20±1.80
250	62.80±4.15	60.86±1.18	69.08±1.80
500	66.18±1.80	72.46±2.04	75.84±3.80
1000	83.57±4.92	78.98±2.57	87.83±3.67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างการคำนวณความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ด้วยวิธี NOA ของสารสกัดจากเปลือกผลลำไยที่สกัดด้วยวิธี Liquid-liquid extraction (ใช้กราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกเดียวกันกับสารสกัดเมทานอล)

ตารางภาคผนวกที่ ข-13 ค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์ด้วยวิธี NOA ของสารสกัดจากเปลือกผลลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อีดอที่สกัดด้วยวิธี Liquid-liquid extraction

สารสกัดจากเปลือก ผลลำไย	ร้อยละความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์			
	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)			
	12.5	25	50	100
TH	29.83 \pm 1.78	35.00 \pm 0.84	41.66 \pm 2.54	52.61 \pm 1.46
TD	25.55 \pm 2.77	29.11 \pm 2.50	35.00 \pm 1.15	44.66 \pm 0.84
TE	29.27 \pm 1.46	35.22 \pm 1.95	37.22 \pm 1.66	43.33 \pm 1.69
TB	33.33 \pm 0.84	36.66 \pm 2.22	43.55 \pm 1.15	53.88 \pm 1.56
TW	19.44 \pm 2.62	25.00 \pm 1.15	29.83 \pm 2.10	42.77 \pm 2.31
EH	30.00 \pm 2.54	38.72 \pm 0.84	44.11 ^a \pm 0.64	52.77 \pm 1.46
ED	23.33 \pm 2.77	25.55 \pm 2.50	33.88 \pm 0.64	40.94 \pm 0.84
EE	31.66 \pm 1.46	36.88 \pm 1.91	41.11 \pm 1.46	50.94 \pm 0.84
EB	35.55 \pm 0.84	40.55 \pm 2.00	43.88 \pm 0.64	52.22 \pm 1.46
EW	18.33 \pm 1.39	23.22 \pm 0.72	32.05 \pm 1.11	41.33 \pm 2.74

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างการคำนวณความสามารถในการต้านการอักเสบด้วยวิธียับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ในเซลล์ (RAW 246.7) ของสารสกัดจากเปลือกผลลำไยที่สกัดด้วยวิธี Liquid-liquid extraction (ใช้กราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกเดียวกันกับสารสกัดเมทานอล)

ตารางภาคผนวกที่ ข-14 ค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ในเซลล์ (RAW 246.7) จากเปลือกผลลำไยเถาและลำไยต้นสายพันธุ์อีดอที่สกัดด้วยวิธี Liquid-liquid extraction

สารสกัดจากเปลือก ผลลำไย	ร้อยละความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์			
	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)			
	12.5	25	50	100
TH	39.73 \pm 5.17	45.51 \pm 0.21	47.60 \pm 0.98	51.17 \pm 0.20
TD	41.56 \pm 1.19	45.13 \pm 0.32	47.10 \pm 0.44	48.75 \pm 0.74
TE	41.30 \pm 0.82	45.13 \pm 0.41	47.41 \pm 0.71	48.94 \pm 0.69
TB	42.07 \pm 0.26	46.79 \pm 1.61	49.62 \pm 1.98	51.87 \pm 0.25
TW	39.66 \pm 1.42	44.36 \pm 0.77	47.94 \pm 2.17	49.33 \pm 0.93
EH	41.32 \pm 1.33	46.61 \pm 1.09	49.22 \pm 1.09	51.87 \pm 0.25
ED	41.81 \pm 0.09	45.01 \pm 1.22	46.91 \pm 0.71	49.33 \pm 0.93
EE	40.30 \pm 1.59	43.44 \pm 2.38	48.18 \pm 0.37	49.54 \pm 0.80
EB	40.29 \pm 0.12	47.17 \pm 1.07	49.20 \pm 0.32	51.34 \pm 2.63
EW	38.89 \pm 2.51	43.75 \pm 0.82	46.28 \pm 0.88	48.44 \pm 0.73

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างการคำนวณความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ด้วยวิธี NOA ของสารสกัด ส่วนย่อยจากเปลือกผลลำไยเถาและลำไยต้นสายพันธุ์อีตอที่แยกด้วยเทคนิค Column chromatography (ใช้กราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกเดียวกันกับสารสกัดเมทานอล)

ตารางภาคผนวกที่ ข-15 ค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์ด้วยวิธี NOA ของสารสกัด จากเปลือกผลลำไยเถา และลำไยต้นสายพันธุ์อีตอแยกด้วยเทคนิค Column chromatography

สารสกัดจาก เปลือกผลลำไย	ร้อยละความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์				
	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)				
	31.25	62.5	125	250	500
TF1	42.30 \pm 0.87	45.72 \pm 1.23	54.70 \pm 1.45	59.82 \pm 0.67	61.53 \pm 0.34
TF2	40.59 \pm 1.57	44.01 \pm 1.12	58.29 \pm 0.28	61.96 \pm 0.72	62.56 \pm 0.28
TF3	45.72 \pm 0.72	52.73 \pm 0.55	59.14 \pm 0.17	62.22 \pm 0.84	69.80 \pm 0.53
TF4	47.00 \pm 1.52	56.83 \pm 1.20	60.00 \pm 0.12	65.81 \pm 0.17	67.39 \pm 0.63
TF5	46.88 \pm 1.41	54.27 \pm 1.64	60.25 \pm 0.34	61.53 \pm 0.17	67.69 \pm 0.17
TF6	44.61 \pm 0.20	50.00 \pm 1.32	57.13 \pm 0.57	59.40 \pm 0.72	63.97 \pm 0.23
TF7	44.44 \pm 0.34	50.42 \pm 0.69	57.69 \pm 1.06	58.97 \pm 0.53	63.11 \pm 0.23
TF8	41.02 \pm 0.67	44.01 \pm 0.20	57.26 \pm 0.72	60.85 \pm 0.95	61.11 \pm 0.72
EF1	49.14 \pm 1.74	50.00 \pm 1.22	54.70 \pm 1.04	57.56 \pm 1.65	60.42 \pm 0.75
EF2	47.86 \pm 0.69	50.17 \pm 0.47	54.27 \pm 1.32	58.97 \pm 1.06	59.82 \pm 0.72
EF3	47.60 \pm 0.72	50.42 \pm 1.06	56.12 \pm 0.03	59.82 \pm 1.41	61.96 \pm 0.87
EF4	48.03 \pm 0.53	50.17 \pm 0.17	56.28 \pm 0.17	58.84 \pm 0.63	60.98 \pm 0.37
EF5	46.58 \pm 0.87	49.01 \pm 1.16	54.70 \pm 1.32	58.71 \pm 0.10	60.12 \pm 0.43
EF6	20.94 \pm 0.60	32.05 \pm 0.92	34.18 \pm 0.69	39.31 \pm 0.87	44.01 \pm 0.53
EF7	20.51 \pm 3.93	31.79 \pm 0.69	33.33 \pm 1.04	37.17 \pm 1.22	42.73 \pm 1.39
EF8	20.38 \pm 2.01	32.22 \pm 0.47	33.76 \pm 0.87	37.60 \pm 1.45	42.30 \pm 0.72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างการความสามารถในการต้านการอักเสบด้วยวิธียับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ในเซลล์ (RAW 246.7) ของสารสกัดจากเปลือกผลลำไยที่แยกด้วยเทคนิค Column chromatography (ใช้กราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกเดียวกันกับสารสกัดเมทานอล)

ตารางภาคผนวกที่ ข-15 ค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ในเซลล์ (RAW 246.7) จากเปลือกผลลำไยเถาและลำไยต้นสายพันธุ์อีดอที่แยกด้วยเทคนิค Column chromatography

สารสกัดจาก เปลือกผลลำไย	ร้อยละความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์			
	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)			
	125	250	500	1000
TF1	33.80 \pm 0.37	42.93 \pm 0.27	46.66 \pm 0.34	52.66 \pm 0.54
TF2	34.66 \pm 0.33	39.80 \pm 0.08	46.00 \pm 0.91	52.00 \pm 0.54
TF3	35.13 \pm 1.30	41.60 \pm 0.43	45.60 \pm 1.48	52.46 \pm 0.58
TF4	36.00 \pm 1.08	43.33 \pm 1.66	50.00 \pm 1.13	57.34 \pm 1.66
TF5	35.60 \pm 0.43	43.13 \pm 0.37	48.67 \pm 1.36	56.00 \pm 1.36
TF6	35.34 \pm 1.36	42.68 \pm 0.83	48.46 \pm 1.30	55.34 \pm 0.54
TF7	34.67 \pm 0.83	40.67 \pm 0.83	49.34 \pm 1.08	56.00 \pm 1.91
TF8	34.00 \pm 1.08	38.00 \pm 1.13	42.66 \pm 0.54	50.66 \pm 1.08
EF1	36.00 \pm 0.83	44.00 \pm 1.13	48.67 \pm 1.44	51.33 \pm 0.83
EF2	36.46 \pm 0.68	44.00 \pm 1.91	46.00 \pm 0.83	50.00 \pm 0.83
EF3	35.33 \pm 0.83	42.00 \pm 0.54	46.46 \pm 0.27	53.34 \pm 0.31
EF4	34.93 \pm 0.43	42.67 \pm 0.53	45.33 \pm 1.14	52.00 \pm 0.78
EF5	34.00 \pm 1.21	39.33 \pm 0.59	43.33 \pm 0.51	50.00 \pm 0.51
EF6	25.34 \pm 2.88	31.33 \pm 1.36	39.33 \pm 0.59	44.67 \pm 0.83
EF7	22.00 \pm 0.83	32.00 \pm 1.08	36.00 \pm 0.41	41.33 \pm 0.55
EF8	20.00 \pm 0.31	28.00 \pm 1.44	34.67 \pm 0.83	40.67 \pm 1.13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Identification of phenolic compounds and evaluation of biological activities of methanolic extracts obtained from two varieties of longan (*Dimocarpus longan*) peels

Chantarasaka, S.¹, Chareonsap, P. P.² and Poeaim, S.^{1*}

¹Department of Biology, School of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL), Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand; ²Plant Genetic Conservation Project under the Royal Initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn, Bangkok 10303, Thailand.

Chantarasaka, S., Chareonsap, P. P. and Poeaim, S. (2022). Identification of phenolic compounds and evaluation of biological activities of methanolic extracts obtained from two varieties of longan (*Dimocarpus longan*) peels. *International Journal of Agricultural Technology* 18(1):63-76.

Abstract *Dimocarpus longan* belongs to the Sapindaceae family, which are revealed as cryptic species. In Thailand, *Dimocarpus longan* spp. *longan* var. *longan* such as Edor is the most cultivated. Another *Dimocarpus longan* spp. *longan* var. *obtusus* (*Dimocarpus obtusus*), called Lum-Yai Thao, is found in Eastern Thailand. However, there is still little information on the biological activity of Thao. Hence, this research was designed to identify phenolic compounds and evaluate the biological activities of methanolic extracts obtained from peels of two longan varieties: Edor VS Thao. For the total phenolic compound, no significant differences were observed between Edor and Thao. For antioxidant activity using DPPH, ABTS, and FRAP assays, the analogs showed Edor had more activity than Thao. The disc diffusion test at 5 mg/disc showed that Edor peels extract effectively inhibited the growth of bacteria, but not Thao extracts which were strong against *Propionibacterium acnes*. However, both of them also did not have activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*. For anti-tyrosinase activity, both variety extracts had less effective anti-tyrosinase activity. In addition, anti-inflammatory activity was evaluated by measuring nitric oxide (NO) generated from SNP and using LPS-stimulated RAW 264.7 cells which showed excellent activity. In cytotoxicity using MTT assay, the results demonstrated that the methanolic extract of longan peel from Thao exhibited low cytotoxicity against both L929 and HaCaT. On the other hand, the extract from Edor exhibited cytotoxic activity. These results suggested that Thao peel extracts are different from Edor peel extract. Thao peel extracts showed excellent anti-inflammatory and little cytotoxic activity for L929 and HaCaT cell lines and antibacterial against *P. acnes*. Therefore, Thao peel extracts could be used in preparing products for anti-inflammatory supplements and cosmetics.

Keywords: *Dimocarpus longan*, Phenolic compound, Biological activity

*Corresponding Author: Poeaim, S.; Email: supattra.poe@kmitl.ac.th

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Introduction

Dimocarpus is a genus belongs to the family of Sapindaceae. There are nine species and six subspecies (spp.) assigned to this genus, of which is the most frequently reported in China. Longan (*Dimocarpus longan*), known as Lam-Yai in Thailand, is subdivided into two subspecies: spp. *malesianus* and spp. *longan*. In addition, there are three varieties (var.): var. *obtusus*, var. *longan*, and var. *longepetiolulatus* from *Dimocarpus longan* spp. *longan* (Santisuk and Larsen, 1999). In Thailand, two varieties (var.); var. *obtusus* and var. *longan* of *Dimocarpus longan* spp. *longan* have been reported. The first variety, *Dimocarpus longan* spp. *longan* var. *longan* has many cultivars such as E Dor, Chompoo, Biew Kiew, and E Wai, which are the most well-known and grown commercially for consumption. Another variety, *Dimocarpus longan* spp. *longan* var. *obtusus*, called Lum-Yai Thao or Thao, is found in Eastern Thailand. Thao is mainly grown as ornamental plants rather than commercial as it is not popular with consumers.

Numerous studies have been only focused on the bioactive compounds and biological activities from *Dimocarpus longan* spp. *longan* var. *longan* which used in fruit and health promotion (Yang *et al.*, 2011). Previous investigations have reported that both edible and nonedible parts of longan extracts contain a higher phenolic compounds such as gallic acid, ellagic acid, and corilagin (Rangkadilok *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012). The previous research has shown excellent correlation between the phenolic compound and the antioxidant potential of the longan aril, peel and seed extracts (Rangkadilok *et al.*, 2007; Prasad *et al.*, 2009; Liawruangrath, 2011; Keawsa-ard *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2014; Rerk-am *et al.*, 2016; Natungnuy *et al.*, 2018). Including some studies by Zhang *et al.*, (2018) and Natungnuy *et al.*, (2018) where the total phenolic content (TPC) between longan varieties were compared. The extract from the longan seed and peel possessed antibacterial activity such as *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Propionibacterium acnes* (Tseng *et al.*, 2014; Natungnuy *et al.*, 2018; Chollakup *et al.*, 2021) and antifungal activity (Rangkadilok *et al.*, 2012). For tyrosinase inhibition, longan seed and pericarp, or peel extracts, also showed moderate tyrosinase inhibitory activity (Rangkadilok *et al.*, 2007; Natungnuy *et al.*, 2018). In addition, longan flower, peel, and seed extracts have more anti-inflammatory activity (Kunworarath *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2012). For cytotoxic activity, longan peel and seed extracts have been reported for both promotion and inhibition of cell proliferation (Natungnuy *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2012). For Thao, the evaluation of biological activities of seed extracts was also reported (Nitteranon, 2018; Natungnuy *et al.*, 2018).

However, biological activities have not been previously reported on extracts from longan peel of Thao (var. *obtusus*). Therefore, this present research aimed to evaluate the TPC and biological activity of methanolic extracts from two varieties (Thao: var. *obtusus* and Edor: var. *longan*) of longan peel.

Materials and methods

Preparation and extraction plant material

There are three groups of mature longan fruits in the experiment.

Group 1: The fruits were harvested from only the longan tree of var. *longan* (cultivar Edor) which were purchased from the main fruit production areas in Lamphun province, Thailand.

Group 2: The sample of mature longan fruits of var. *obtusus* (Thao1) was collected within a single tree from Rayong province, Thailand.

Group 3: The mix of fruit var. *obtusus* (Thao2) were randomly obtained from the local markets in Chonburi and Rayong provinces, Thailand.

After complete drying, the longan peel powder was then extracted with methanol as a solvent for seven days. The methanolic extracts were evaporated using a rotary evaporator at 40°C.

Evaluation of total phenolic content

The TPC of longan peel extracts was evaluated using Folin-Ciocalteu method according to Soong and Barlow (2004) with some modifications. Briefly, 50 microliters (μL) of the sample at 1,000 microgram/milliliter ($\mu\text{g}/\text{mL}$) were mixed with equal volume of 10% Folin-Ciocalteu solution in a 96-well plate and incubated for 6 minutes in the dark. After that, 100 μL of 7.5% sodium carbonate solution was added and incubated for 30 minutes and then measured at 765 nm. The TPC was expressed as mg of gallic acid equivalents per gram extract (mgGAE/g of extract).

Evaluation of antioxidant capacity

For antioxidant activity using DPPH, ABTS and FRAP assays, the method of DPPH and ABTS modified according Shimada *et al.* (1992) and Re *et al.* (1999) with slight modifications. For DDPH and ABTS assays, trolox has been used as a standard, and expressed in milligrams trolox equivalent/g extract (mgTE/g extract). According to Benzie and Strain

(1996), FRAP assay was undertaken with minor modifications. Ascorbic acid was used to generate the standard curve, and the results were reported as milligrams ascorbic acid equivalent/g extract (mgAAE/g extract).

Evaluation of antibacterial activity

The antibacterial activity was evaluated against six different strains of bacteria, including *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* TISTR 1466, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Propionibacterium acnes* and *Escherichia coli* ATCC 25922 using paper disc diffusion method tested by the standard CLSI adapted in 2012. Briefly, the purified bacteria culture was swabbed on the surface of Mueller Hinton Agar (MHA). The disc containing 5 mg of the extract was placed on the surface of inoculated agar and incubated for 18-24 hours. Methanol and gentamicin (10 µg/disc) were used as the negative and positive control, respectively. The zone of inhibition was to be measured.

Evaluation of anti-tyrosinase activity

Tyrosinase inhibitory activity was assessed using L-DOPA as substrate described by Masuda *et al.* (2004) and Saewan *et al.* (2011). The final volume of each sample reaction is 200 µL; the phosphate buffer (pH 6.8) was mixed with 20 µL of mushroom tyrosinase solution (25 U/mL) in a 96-well plate and incubated at 25 °C for 10 minutes in the dark. Then, 40 µL of L-DOPA (2.5 mM) was added to start the reaction (the control, no sample: A). Likewise, 60 µL of extract solution was mixed with all reaction reagents (the test sample: B) and the other reactions without tyrosinase (the blank of the sample, color of the test sample: C). After 15 minutes of incubation at 25 °C, the absorbances were measured at 475 nm. Ascorbic acid was used to generate the standard curve, and the results were expressed anti-tyrosinase capacity (mgAAE/g extract). The IC₅₀ (50% inhibitory concentration) were calculated by GraphPad prism 8 and %tyrosinase inhibition was calculated as follows the below equation.

$$\% \text{Tyrosinase inhibition} = \left[\frac{(A)-(B-C)}{(A)} \right] \times 100$$

A is the absorbance value of the control, without the extract; B is the absorbance value of the test sample with tyrosinase; and C is the absorbance value of the blank of sample, without tyrosinase.

Evaluation of anti-inflammatory activity

Anti-inflammatory activities were evaluated by measuring nitric oxide (NO) both generated from sodium nitroprusside (SNP) and using lipopolysaccharide (LPS) – activated RAW 264.7 cells. For in vitro nitric

oxide radical scavenging assay, nitric oxide radical generated from SNP was measured using the Griess reaction according to Aktas *et al.* (2013). Briefly, the reaction mixture (200 μL) containing SNP (10 mM) in phosphate-buffered saline (pH 7.3), without (the control, no sample: A) or with (the test sample: B) the plant extract at different concentrations (62.5 – 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and treated simultaneously with different concentrations of the samples without SNP (the blank of the sample, color of the test sample: C) were incubated at 25°C for 30 minutes in a 96-well plate. After that, the reaction mixture was mixed with an equal volume of freshly prepared Griess reagent. Gallic acid was used as a positive control. Alternatively, nitric oxide (NO) production by RAW 264.7 macrophages was determined by measuring the accumulation of nitrite, which was slightly modified from Buapool *et al.*, (2013). RAW 264.7 cells were cultured at 37 °C in the 5% CO₂ incubator in RPMI 1640 containing gentamicin and 10% FBS and were sub-cultured weekly using a cell scraper. After that, the cells were seeded at a density of 1.5×10^5 cells per well into a 96-well plate and incubated overnight. The cells were stimulated with 1 mg/mL lipopolysaccharide (LPS) alone (the control: A) and treated simultaneously with different concentrations (62.5-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of the samples dissolved in DMSO (the test sample: B) or 62.5 – 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of indomethacin which used as a positive control as well as the other reactions without LPS (the blank of sample: C). After 24 hours, equal volume of supernatant from each well and Griess reagent were mixed into a new 96-well plate.

The absorbance of the mixture was measured at 540 nm after 10 minutes of incubation. The % nitric oxide inhibition was calculated as follows:

$$\% \text{Nitric oxide inhibition} = \left[\frac{(A)-(B-C)}{(A)} \right] \times 100$$

A is the absorbance value of the control, without the extract; B is the absorbance value of the test sample; and C is the absorbance value of the blank of sample, without SNP or LPS.

Evaluation of cytotoxic activity

The mouse fibroblast cell line (L929) and human epidermal keratinocyte cell line (HaCaT) were cultured and evaluated for cytotoxic activity using MTT assay as described by Poeaim *et al.* (2017). The cells were seeded into a sterile 96-well plate at a density of 1×10^5 cells/well and incubated for 24 hours. Then, the extract was added to the cells (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and further incubated for 48 hours before performing MTT assay. DMSO and mitomycin C were included as a negative and positive controls, respectively. Following incubation, 50 microliters of 2 mg/mL of MTT were added to each well and incubated at 37 °C for 4 hours. The medium

was then gently removed, and 100 μ L of DMSO: ethanol (1:1 v/v) was added to dissolve the formazan crystals. The amount of solubilizing the formazan was determined at 570 nm. For background absorbance, each test should contain control wells (untreated cells) and blank wells (without cells). All values are final after subtraction of background absorbance. The percentage of cell viability was calculated as follows:

$$\% \text{Cell viability} = \frac{\text{Absorbance of treated cells}}{\text{Absorbance of untreated cells}} \times 100$$

Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate; data are expressed as means \pm standard deviation (SD) using SPSS version 25 statistical software for A one-way analysis of variance (ANOVA).

Results

Total phenolic compound

This study revealed both methanolic extracts from two varieties (Thao: var. *obtusus* and Edor: var. *longan*) of longan peels presented of phenolic compound. The TPC of the Thao1 and Thao2 were 84.73 ± 3.01 and 65.57 ± 2.32 mg GAE/g extract, respectively. In comparison, the methanolic extract of Edor had TPC of 67.56 ± 4.93 mg GAE/g extract. The TPC of Thao1 peel extracts was significantly ($p < 0.05$) higher than the Thao2 and Edor extracts. Alternatively, there was no significant difference between Thao2 and Edor peels extract ($p > 0.05$) (Figure 1).

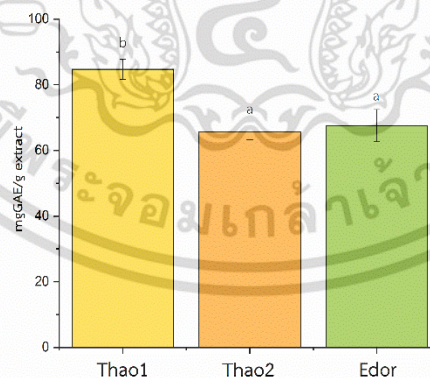


Figure 1. The TPC of the methanolic extracts from longan peels by the Folin-Ciocalteu method

Antioxidant capacity

Antioxidant activities of the methanolic extract from longan peel were evaluated using DPPH, ABTS and FRAP assays. The results showed that longan peel exhibited radical scavenging and reducing activity. The antioxidant capacity of methanolic extract from Edo (*var. longan*) revealed high antioxidant activities than Thao (*var. obtusus*), significantly different for ABTS and FRAP assays ($p < 0.05$). For DPPH assay, Thao1 and Thao2 were 279.83 ± 0.17 and 376.30 ± 0.87 mgTE/g extract, respectively. At the same time, the methanolic extract of Edo had 194.71 ± 0.66 mgTE/g extract. The antioxidant capacity of Thao2 extract was also significantly ($p < 0.05$) higher than the Thao1 extract. On the other hand, it was found that the Thao1, Thao2 and Edo extracts from longan peels have antioxidant activity with the value 85.59 ± 0.75 , 93.64 ± 0.71 and 200.78 ± 2.36 mgAAE/g extract, respectively which presented in Table 1.

Table 1. Antioxidant activity of the methanolic extracts from longan peels

The methanolic extracts from longan peels	Antioxidant capacity		
	DPPH (mgTE/g extract)	ABTS (mgTE/g extract)	FRAP (mgAAE/g extract)
Thao1	$279.83^b \pm 0.17$	$80.79^b \pm 0.54$	$85.59^c \pm 0.75$
Thao2	$376.30^a \pm 0.87$	$84.03^b \pm 0.89$	$93.64^b \pm 0.71$
Edo	$194.71^c \pm 0.66$	$94.04^a \pm 0.06$	$200.78^a \pm 2.36$

The data are expressed as mean \pm SD, the letters a-c within the same column indicate the statistical significant at $p < 0.05$

Antibacterial activity

The antibacterial activity of the methanolic extract from longan peel was evaluated using a disc diffusion method. Two varieties (Thao: *var. obtusus* and Edo: *var. longan*) were tested against 5 gram-positive including *B. subtilis*, *S. aureus*, *M. luteus*, *S. Epidermidis*, and *P. acnes* and only 1 gram-negative bacteria (*E. coli*). At 24 hours, the inhibition zones were measured using a digital caliper and expressed in millimeters (mm.). These extracts were tested at concentrations at 5 mg/disc against *B. subtilis*, *S. aureus*, *M. Luteus*, and *P. acnes* (Figure 2). *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli* were not inhibited by any of the extracts which there were no inhibition zones observed (data not shown). Gentamicin (10 μ g/disc) that used as positive control showed inhibition diameters ranging from 22.31 ± 0.12 to 27.44 ± 2.79 mm. There was no significant difference between the inhibition zone of Thao1, Thao2, and Edo peels extract against *B. subtilis* ($p > 0.05$) (Table 2).

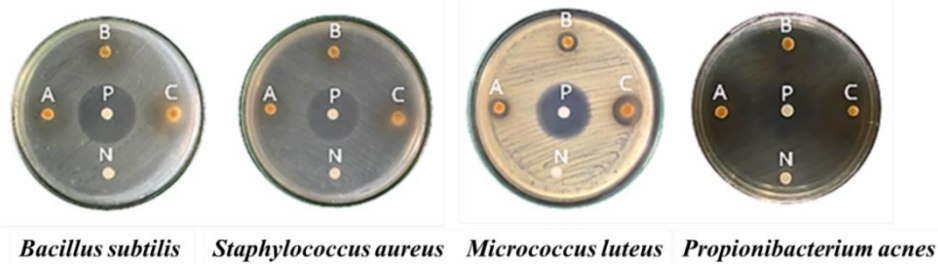


Figure 2. Inhibition zone against *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* and *Propionibacterium acnes* using methanolic extracts from longan peels (A: Thao2, B: Thao1, C: Edor, N: negative control and P: positive control)

Table 2. The inhibition zone of methanolic extracts from longan peels and gentamicin using the disc diffusion method

The methanolic extracts from longan peels (5 mg/disc)	Inhibition zone (mm)			
	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. acnes</i>
Thao1	16.76 ^a ±0.25	9.27 ^b ±0.72	7.34 ^b ±0.19	25.95 ^a ±0.71
Thao2	16.98 ^a ±0.62	9.35 ^b ±0.82	7.29 ^b ±0.13	24.99 ^a ±1.88
Edor	17.43 ^a ±1.25	15.09 ^a ±0.86	9.54 ^a ±0.05	22.97 ^b ±1.08
Gentamicin (10 µg/disc) (positive control)	27.37±0.38	26.60±0.52	22.31±0.12	27.44±2.79

The data are expressed as mean±SD, the letters a-b within the same column indicate the statistical significant at $p < 0.05$

Anti-tyrosinase activity

The anti-tyrosinase activity of the methanolic extracts of longan peel was examined by the dopachrome method at the concentration range of 5 to 15 mg/mL. Anti-tyrosinase capacity and IC₅₀ values of the methanolic extracts from longan peel are presented in Table 3. The methanolic extract from Edor (*var. longan*) revealed high anti-tyrosinase activity than Thao (*var. obtusus*), significantly different for both anti-tyrosinase capacity and IC₅₀ ($p < 0.05$). However, both varieties extracts showed a more excellent IC₅₀ value than the previous report.

Table 3. Anti-tyrosinase capacity and IC₅₀ values of the methanolic extracts from longan peels

The methanolic extracts from longan peels	Anti-tyrosinase capacity (mgAAE/g extract)	IC ₅₀ (µg/mL)
Thao1	264.75 ^b ±0.015	9277.96
Thao2	278.90 ^b ±0.043	9013.96
Edor	381.92 ^a ±0.008	4124.91

The data are expressed as mean±SD, the letters a-b within the same column indicate the statistical significant at $p < 0.05$

Anti-inflammatory

This study evaluated the anti-inflammation activity of the methanolic extracts of longan peel range from 62.5 to 1000 $\mu\text{g/mL}$ concentration. The results expressed in % nitric oxide inhibition and IC_{50} are shown in Table 4. At 1000 $\mu\text{g/mL}$, the longan extracts exhibited intense scavenging activity having a % nitric oxide inhibition values between 78.98 and 89.76, which noticeably showed no significant differences between the two different varieties. The Thao1 and Thao2 extracts were caused by the most potent inhibitory activity having IC_{50} values of 82.30 and 92.70 $\mu\text{g/mL}$, respectively.

For nitric oxide - LPS – activated RAW 264.7 cells, this study evaluated the anti-inflammation activity of the methanolic extracts of longan peel from two varieties in the range of 6.25 - 200.00 $\mu\text{g/mL}$. At 200 $\mu\text{g/mL}$, the results showed that all extracts significantly decreased NO production in RAW 264.7 cells having a % nitric oxide inhibition value of 90.00. The IC_{50} of anti-inflammation activity of Thao1, Thao2, and Edor extracts of longan peels were in the range of 7.60 - 9.74 $\mu\text{g/mL}$ (Table 4).

Table 4. Anti-inflammation by nitric oxide inhibitory assay of the methanolic extracts from longan peels

The methanolic extracts from longan peels	NO - generated from SNP		NO - LPS-activated RAW 264.7 cells	
	%Nitric oxide inhibition	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	%Nitric oxide inhibition	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Thao1	83.57 ^a ±6.03	82.30	89.48 ^a ±3.44	7.60
Thao2	87.83 ^a ±3.15	92.70	89.68 ^a ±3.27	8.77
Edor	78.98 ^a ±4.46	116.73	89.76 ^a ±1.69	9.74

The data are expressed as mean±SD, the letters a within the same column indicate the statistical significant at $p<0.05$

Cytotoxic activity

In this study, the mouse fibroblast cell line (L929) and human epidermal keratinocyte cell line (HaCaT) were used to evaluate the cytotoxicity effect of extracts. The preliminary screening for cytotoxic activity of methanolic extract of longan peel from 2 cultivars at concentration 1,000 $\mu\text{g/mL}$ was estimated by MTT assay. The percentage of cell viability was calculated after exposure to the extracts for 24 hours of incubation. The cytotoxic activity of those extracts on the viability of two

cell lines is presented in Figure 3. The methanolic extract from Eдор exhibited cytotoxic effects in both L929 and HaCaT cell lines with of 28.83 ± 0.01 and 16.57 ± 0.02 % cell viability, respectively. On the other hand, the methanolic extract from peel of Thao1 and Thao2 exhibited low cytotoxicity against L929 cell line that showed cell viability of 81.36 ± 0.01 and 77.86 ± 0.04 %; while in HaCaT cell line, it showed cell viability of 90.95 ± 0.01 and 78.32 ± 0.03 %, respectively. There were no significant differences in percentage cell viability between two samples of Thao as well.

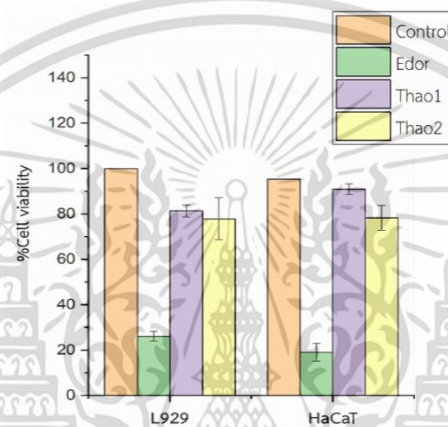


Figure 3. The percentage of cell viability of L929 and HaCaT after exposure to the methanolic extract of longan peels from two cultivars at concentration 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 24 hours of incubation

Discussion

Numerous research have been reported that both edible and nonedible parts of *Dimocarpus longan* spp. *longan* var. *longan* such as extracts of Eдор, Chuliang, and Shixia varieties contain higher phenolic compounds; including those compounds and their derivatives that were shown in many biological activities. For *Dimocarpus longan* spp. *longan* var. *obtusius*, commonly called Lum-Yai Thao or Thao, the evaluation of biological activities of seed extracts has been previously reported in a few studies. On the other hand, the bioactive profile of peel has not yet been reported. Hence, this present research was to evaluate the TPC and biological activity of methanolic extracts of longan peel from Thao and Eдор. For the TPC, no significant differences were observed between Eдор and Thao. Furthermore, previous studies have reported that both edible and nonedible parts of longan extracts contain higher phenolic compounds such as gallic acid, corilagin, and ellagic acid (Rangkadilok et al., 2005; Yang et al., 2011; Huang et al., 2012; Liu et al., 2012). Studies of Zhang et al.

(2018) and Natungnuy *et al.* (2018) had as well compared the TPC between the longan variety. However, TPC has not been previously reported for var. *obtusus* peel extract. This study indicated that peel of var. *obtusus* had the TPC. Several studies have demonstrated that the number of phenolic compounds in plants can be highly affected by intrinsic and external factors such as the growing area of plants, climatic conditions, genetic background, phenological stages, extraction method, and standard of calibration. More previous studies have also concluded that there was a significant linear correlation between total phenolic content and antioxidant potential. For antioxidant activity, evaluated by DPPH, ABTS and FRAP assays, the result of the present study indicated that cultivar Eдор peel extract showed more antioxidant activity comparable to other cultivars such as Thao. However, there were noticeably no significant differences between the two samples of Thao. These results agree with previous reports that the extract from the longan peel, or pericarp, and seed exhibited antioxidant activities (Prasad *et al.*, 2009, 2010; Liawruangrath, 2011; Lin *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2014; Natungnuy *et al.*, 2018). Therefore, longan peel could be good candidate for natural antioxidants.

The disc diffusion test at 5 mg/disc showed that Eдор and Thao peel extracts effectively inhibited bacterial growth for antibacterial activity evaluation. However, both of them also did not have activity against *E. coli* and *S. epidermidis*. Eдор extract was found to be more effective against *S. aureus* and *M. luteus* than Thao peel extracts. Alternatively, Thao peel extracts were more effective than the Eдор extract against *P. acnes*. These results corresponded with previous report that longan seed extract have antibacterial activities against *S. aureus*, *B. cereus*, and *M. luteus* (Tseng *et al.*, 2014; Natungnuy *et al.*, 2018). In addition, the rice straw paper coated with longan peel extracts showed antibacterial activity against *S. aureus* and *B. cereus* (Chollakup *et al.*, 2021). Moreover, *P. acne* was susceptible to longan seed extract (Tseng *et al.*, 2014). Accordingly, this study has been the first to report on the antibacterial activity against *P. acne* of peel methanolic extract from longan.

For anti-tyrosinase activity, tyrosinase is the main enzyme responsible for browning fruits and vegetables and pigmentation of human skin. Therefore, it is in great need of developing novel tyrosinase inhibitors from natural resources. Longan seed and pericarp, or peel extracts, also showed moderate tyrosinase inhibitory activity (Rangkadilok *et al.*, 2007; Natungnuy *et al.*, 2018). In this study, both cultivars extracts had less effective anti-tyrosinase activity with IC₅₀ values of about 4.0 mg/mL for cultivar Eдор, and 9.0 mg/mL for Thao. Consequently, the extracts had less effective anti-tyrosinase activity when compared to the previous report (IC₅₀

values of 2.9 to 3.2 mg/mL) (Rangkadilok *et al.*, 2007) indicating that it affects the storage time, drying methods, and processing conditions of extraction.

In addition, anti-inflammatory activity was evaluated by measuring nitric oxide (NO) generated from SNP and using LPS-activated RAW 264.7 cells. In this study, the methanolic extracts of both Thao and Edor varieties of longan peel have high potential as an anti-inflammatory agent. These results agree with Kunworarath *et al.* (2016) and Nitteranon (2018) who reported that the extract from the longan flower and seed exhibited anti-inflammatory. Huang *et al.* (2012) similarly studied extract from longan peels that displayed the best anti-inflammatory activity. However, the present study revealed that both varieties of longan peel extracts exhibit anti-inflammatory activity with a lower IC₅₀ value than the previous report.

In cytotoxic activity using MTT assay, the results of this study demonstrated that the methanolic extract of longan peel from Thao variety at 1000 µg/mL concentration exhibited low cytotoxicity against both L929 and HaCaT. On the other hand, the extract from Edor exhibited cytotoxic activity. Some research have reported that both ethanol and ethyl acetate extracts from seed of longan showed percentages of cell viability above 90% (Tseng *et al.*, 2014). Those results agree with previously report that the methanolic extracts of both Thao and Edor of longan seed were shown to promote cell division by increasing the percentage of cell viability of the L929 cell line (Natungnuy *et al.*, 2018). On the contrary, the longan flower extract can also induce apoptosis in colorectal cancer cells (Lin *et al.*, 2012). To date, longan peel extract of Thao variety has not been reported for cytotoxic activity. The results demonstrated in this study that the methanolic extract of longan peel from *Thao* variety did not show toxicity on both cell lines after incubation for 24 hours.

These results hence suggested that the variety Thao peel extracts are different from cultivars Edor peel extract. The cultivar Thao peel extracts showed excellent anti-inflammatory and still non-cytotoxic for L929 and HaCaT cell lines with cell viability higher than 80% and antibacterial against *P. acnes*. Furthermore, there were no significant differences in the results obtained with two samples of Thao variety - Thao1 was collected from the same longan tree while Thao2 was collected from different longan trees, in different places. Therefore, the Thao peel extracts should be further studied and developed, as they could be used in preparing products for anti-inflammatory supplements, cosmetics, and pharmaceutical in the future.

Acknowledgements

This work was supported by BEDO (Biodiversity-Based Economy Development Office; Public Organization), Grant number 9/2019.

References

- Aktas, N., Genc, Y., Gozcelioglu, B., Konuklugil, B. and Harput, U. S. (2013). Radical scavenging effect of different marine sponges from Mediterranean coasts. *Records of Natural Products*, 7:96-104.
- Benzie, I. F. F. and Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239:70-76.
- Buapool, D., Mongkol, N., Chantimal, J., Rortrakul, S., Srisook, E. and Srisook, K. (2013). Molecular mechanism of anti-inflammatory activity of *Pluchea indica* leaves in macrophages RAW 264.7 and its action in animal models of inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*, 146:495-504.
- Chollakup, R., Kongtud, W., Sukatta, U., Premchookiat, M., Piriyaatits, K., Nimitkeatkai, H. and Jarerat, A. (2021). Eco-friendly rice straw paper coated with longan (*Dimocarpus longan*) peel extract as bio-based and antibacterial packaging. *Polymers*, 13:3096.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2012). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard. 11th ed. CLSI document M02-A11. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.
- Huang, G., Wang, B., Lin, W., Huang, S., Lee, C., Yen, M. and Huang, M. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory properties of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) pericarp. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-10.
- Keawsa-ard, S., Dadookain, A., Yawootti, A. and Wimonthanasit, P. (2011). Appropriate extraction methods and conditions of antioxidant compounds in longan. *Journal of Information Science and Technology*, 28:2052-2063.
- Kunworarath, N., Rangkadilok, N., Suriyo, T., Thiantanawat, A. and Satayavivad, J. (2016). Longan (*Dimocarpus longan* Lour.) inhibits lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production in macrophages by suppressing NF- κ B and AP-1 signaling pathways. *Journal Ethnopharmacol*, 179:156-161.
- Liawruangrath, S. (2011). Bioactivity antioxidant activity chemical analysis of bioactive compounds and development of products for health supplements from longan leaves pulps kernels and seeds. Thailand Science Research and Innovation (TSRI). 428 pp.
- Liu, Y., Liu, L., Mo, Y., Wei, C., Lv, L. and Luo, P. (2012). Antioxidant activity of longan (*Dimocarpus longan*) barks and leaves. *African Journal of Biotechnology*, 11:7038-7045.
- Lin, C. C., Chung, Y. C. and Hsu, C. P. (2012). Potential roles of longan flower and seed extracts for anti-cancer. *World Journal of Experimental Medicine*, 2:78-85.
- Masuda, T., Yamashita, D., Takeda, Y. and Yonemori, S. (2005). Screening for tyrosinase inhibitors among extracts of seashore plants and identification of potent inhibitors from *Garcinia subelliptica*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 69:197-201.
- Natungnuy, K., Poeaim, S. and Chareonsap, P. (2018). Biological activities of the methanolic extracts from two varieties of *Dimocarpus longan* seeds. *International Journal of Agricultural Technology*, 14:1505-1514.
- Nitteranon, V. (2018). Anti-inflammatory, antioxidant and quinone reductase inducing effects of Lumyai Thao (*Dimocarpus longan* var. *obtusus*) seed extract. *Journal of Food Science and Agricultural Technology*, 4:29-35.

- Tseng, H. C., Wu, W. T., Huang, H. S. and Wu, M. C. (2014). Antimicrobial activities of various fractions of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed extract. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 65:589-593.
- Poeaim, S., Lordkhem, P., Charoenying, P. and Laipas, P. (2017). Evaluation of antioxidant, cytotoxic activities and total phenolic content from leaf extracts of *Phlogacanthus pulcherrimus*. *International Journal of Agricultural Technology*, 12:1657-1667
- Prasad, K. N., Hao, J., Shi, J., Liu, T., Li, J., Wei, X., Qiu, S., Xue, S. and Jiang, J. (2009). Antioxidant and anticancer activities of high pressure-assisted extract of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) fruit pericarp. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10:413-419.
- Prasad, K. N., Yanga, B., Shi, J., Yua, C., Zhao, M., Xue, S. and Jiang, J. (2010). Enhanced antioxidant and antityrosinase activities of longan fruit pericarp by ultra-high-pressure-assisted extraction. *Jiang Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51:471-477.
- Rangkadilok, N., Worasuttayangkurn, L., Bennett, R. N. and Satayavivad, J. (2005). Identification and quantification of polyphenolic compounds in longan (*Euphoria longana* Lam.) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:1387-1392.
- Rangkadilok, N., Sitthimonchai, S., Worasuttayangkurn, L., Mahidol, C., Ruchirawat, M. and Satayavivad, J. (2007). Evaluation of free radical scavenging and antityrosinase activities of standardized longan fruit extract. *Food and Chemical Toxicology*, 45:328-336.
- Rangkadilok, N., Tongchusak, S., Boonhok, R., Chaiyaroj, S. C., Junyaprasert, V. B., Buajeeb, W., Akanimanee, J., Raksasuk, T., Suddhasthira, T. and Satayavivad, J. (2012). In vitro antifungal activities of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed extract. *Fitoterapia*, 83:545-553.
- Rerk-am, U., Runglert, K., Eiamwat, J., Kongsombat, B., Sematong, T., Tangsatirapakde, S. and Thubthimthed, S. (2016). Antioxidant activities and polyphenolic compounds of Longan (*Dimocarpus longan* Lour) peel and seed extracts. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences (TJPS)*, 40:120-122.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Evan, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical action decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26:1231-1237.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. and Nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40:945-948.
- Soong, Y. Y. and Barlow, P. J. (2004). Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry*, 88:411-417.
- Saewan, N., Koysomboon, S., and Chantrapromma, K. (2011). Anti-tyrosinase and anti-cancer activities of flavonoids from *Blumea balsamifera* DC. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5:1018-1025.
- Santisuk, T. and Larsen, K. (1999). *Flora of Thailand vol. 7 part 1*, The Forest Herbarium, National Park, Wildlife and Plant Conservation Department, Bangkok. 153 pp.
- Yang, B., Jiang, Y., Shi, J., Chen, F. and Ashraf, M. (2011). Extraction and pharmacological properties of bioactive compounds from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) fruit-A review. *Food Research International*, 44:1837-1842.
- Yang, X., Yan, F., Huang, S. and Fu, C. (2014). Antioxidant activities of fractions from longan pericarps. *Food Science and Technology*, 34:341-345.
- Zhang, R., Khan, S. A., Lin, Y., Guo, D., Pan, X., Liu, L., Wei, Z., Zhang, Y., Deng, Y. and Zhang, M. (2018). Phenolic profiles and cellular antioxidant activity of longan pulp of 24 representative Chinese cultivars. *International Journal of Food Properties*, 21:746-759.

(Received: 9 September 2021, accepted: 25 December 2021)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวสุวิชญา จันทรสาขา
วันเดือนปีเกิด	1 กรกฎาคม 2538
ที่อยู่ปัจจุบัน	55/760 ต.ลาดสวาย อ.ลำลูกกา จ.ปทุมธานี 12150
ประวัติการศึกษา	(2561) วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ เกรดเฉลี่ย 2.55 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (2565) วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระ จอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผลงานทางวิชาการ	Identification of phenolic compounds and evaluation of biological activities of methanolic extracts obtained from two varieties of longan (<i>Dimocarpus longan</i>) peels.