

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและการระบุชนิดย่อยด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด
ของผักแว่นต้น (*Crotalaria medicaginea* Lam.)

STUDY OF BIOLOGICAL ACTIVITIES AND VARIETY
IDENTIFICATION USING DNA BARCODES OF PHAK WAN TON
(*Crotalaria medicaginea* Lam.)



วิทยานิพนธ์นี้สำหรับการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2567

KMITL-2024-SC-M-020-015

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

STUDY OF BIOLOGICAL ACTIVITIES AND VARIETY
IDENTIFICATION USING DNA BARCODES OF PHAK WAN TON
(*Crotalaria medicaginea* Lam.)



A THESIS SUBMITTED IN 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
2024

KMITL-2024-SC-M-020-015

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2024

SCHOOL OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|-----------------------------|--|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์ | การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและการระบุชนิดย่อยด้วย ดีเอ็นเอบาร์โค้ดของผักแว่นต้น (<i>Crotalaria medicaginea</i> Lam.) |
| ชื่อนักศึกษา | นางสาวธรรรณสรณ์ ทุ้ยอ้น |
| รหัสประจำตัว | 64605138 |
| ปริญญา | วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) |
| ภาควิชา | ชีววิทยา |
| พ.ศ. | 2567 |
| อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ | รองศาสตราจารย์ ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม |

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยเพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ และการระบุชนิดย่อยของผักแว่นต้น (*Crotalaria medicaginea* Lam.) โดยศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดเมทานอลจากราก กิ่ง และใบของผักแว่นต้นที่มีลักษณะพุ่มสูง ทั้งที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์และกำจัดคลอโรฟิลล์ด้วยน้ำมันปาล์ม พบว่าสารสกัดเมทานอลจากรากและใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี เมื่อนำมาแยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction พบว่าสารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DL) และเอทิลอะซิเตท (EL) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส นอกจากนี้สารสกัดแยกส่วน DL มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งบางชนิด เมื่อนำมาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี column chromatography สามารถแยกสารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DLF) ได้จำนวน 13 สารสกัด (DLF1-13) และสารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ELF) จำนวน 6 สารสกัด (ELF1-6) โดยแสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Propionibacterium acne* และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เมื่อนำสารสกัดส่วนย่อย DLF มาศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 และเซลล์เยื่อบุไตลิงชนิด Vero ตรวจพบความเป็นพิษต่อเซลล์ทั้ง 2 ชนิด และจากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) ตรวจพบสารสำคัญที่น่าสนใจหลายชนิด ได้แก่ Salicylic acid, medicarpin, pulegone, succinimide, lauric acid, benzoic acid และสารกลุ่ม phthalate ดังนั้นสารสกัดของผักแว่นต้นจึงมีแนวโน้มนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นยารักษาโรค และพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เวชสำอางได้ในอนาคต นอกจากนี้การศึกษาลักษณะสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและการใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการระบุชนิดย่อยของผักแว่นต้น โดยใช้บริเวณยีนตำแหน่ง Ribulose-bisphosphate carboxylase (*rbcl*), *trnL-trnF* intergenic spacer (*trnL-trnF*) และ Internal transcribed

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

spacer (ITS) พบความผันแปรทางพันธุกรรมระหว่างผักแว่นต้นที่มีลักษณะพุ่มเตี้ย และพุ่มสูง แต่ยังไม่สามารถระบุชนิดย่อยของผักแว่นต้นได้ ดังนั้นควรมีการศึกษาในบริเวณอื่นตำแหน่งอื่น ๆ เพิ่มเติม

คำสำคัญ : *Crotalaria medicaginea* ผักแว่นต้น กำจัดคลอโรฟิลล์ ดีเอ็นเอบาร์โค้ด
ฤทธิ์ทางชีวภาพ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|-----------------------|--|
| Thesis Title | Study of biological activities and variety identification using DNA barcodes of Phak Wan Ton (<i>Crotalaria medicaginea</i> Lam.) |
| Student Name | Thanthanasorn Thuion |
| Student ID | 64605138 |
| Degree | Master of Science (Biotechnology) |
| Department | Biology |
| Year | 2024 |
| Thesis Advisor | Assoc. Prof. Dr. Supattra Poeaim |

Abstract

The objectives of this study were to investigate the biological activities and to identify the subspecies of Phak Wan Ton (*Crotalaria medicaginea* Lam.). The methanolic extracts from roots, stems and leaves of Phak Wan Ton with ascending characteristics, both with and without chlorophyll removal using palm oil, were evaluated for biological activities. It was found that the methanolic extracts from the roots and leaves, without chlorophyll removal, exhibited higher biological activities. They were subsequently separated using the liquid-liquid extraction method. The results showed that the dichloromethane leaf extract (DL) and ethyl acetate leaf extract (EL) exhibited significant antibacterial and anti-tyrosinase activities. Moreover, the dichloromethane leaf extract (DL) demonstrated cytotoxicity against some cancer cell lines. The extracts underwent purification through column chromatography, resulting in thirteen fractions obtained from the dichloromethane extract (DLF1-13) and six fractions from the ethyl acetate extract (ELF1-6). These fractions exhibited potent antibacterial activity against *Propionibacterium acne* and demonstrated anti-tyrosinase activity. The dichloromethane extract (DLF1-13) was evaluated for its cytotoxicity against the human hepatoma cell line (HepG2) and African green monkey kidney cell line (Vero), and toxicity was observed in both cell lines. Furthermore, analysis of the chemical components using Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) revealed several significant bioactive compounds such as salicylic acid, medicarpin, pulegone,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

succinimide, lauric acid, benzoic acid and phthalate. These bioactive compounds could potentially be utilized for medicinal and cosmeceutical purposes. Moreover, the morphology characteristics and DNA barcodes were used to identify Phak Wan Ton subspecies. Three regions, including Ribulose-bisphosphate carboxylase (*rbcL*), *trnL-trnF* intergenic spacer (*trnL-trnF*) and Internal transcribed spacer (*ITS*), were used for identification. The results showed genetic variation between prostrate and ascending characteristics of Phak Wan Ton. Those three regions could not classify the subspecies. Therefore, additional other regions should be studied.

Keywords : *Crotalaria medicaginea*, Phak Wan Ton, Chlorophyll removal, DNA barcodes, Biological activity



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จัดขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ โดยมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อสนองพระราชดำริในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ-สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ซึ่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และให้การสนับสนุนช่วยเหลือเป็นอย่างดี รวมถึงให้ความอนุเคราะห์ในเรื่องการเก็บตัวอย่างพืช และการลงพื้นที่เก็บตัวอย่างในจังหวัดสุพรรณบุรี ตลอดจนสนับสนุนงบประมาณในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดผักแว่นต้น

ขอขอบพระคุณ ดร. ปิรัชฎ์ ปริญาพงษ์ เจริญทรัพย์ ประธานกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ จากภายนอกสถาบันฯ และรองศาสตราจารย์ ดร. ศรีัญญา พันธุ์พฤษ์ อาจารย์ประจำบัณฑิต ที่กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจทานรูปเล่มวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้อง และสมบูรณ์มากยิ่งขึ้นขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนการศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษาของคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปีการศึกษา 2564 (grant number: A 118-0261-010)

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัว ที่ให้ความสนับสนุนทุนทรัพย์ในการศึกษาให้กำลังใจ และเป็นแรงผลักดันในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา ที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีต่าง ๆ ตลอดจนขอขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง คุณนพวงค์ ทรัพย์าคม คุณ Thi Thu Huong Luong คุณชนาภรณ์ จาดตานิม และคุณเพชรรุ่ง นาดสกุลมงคล ที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา เป็นมิตรภาพที่ดี ตลอดจนให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์นี้เสมอมา

ฐรรธณสรร์ ทุ้ยอัน

16 พฤษภาคม 2567

สารบัญ

| | หน้า |
|---|----------|
| บทคัดย่อภาษาไทย..... | ก |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... | ค |
| กิตติกรรมประกาศ..... | จ |
| สารบัญ..... | ฉ |
| สารบัญตาราง..... | ฎ |
| สารบัญรูป..... | ฏ |
| คำย่อ/สัญลักษณ์..... | ต |
| บทที่ 1 บทนำ..... | 1 |
| 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย..... | 1 |
| 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย..... | 2 |
| 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย..... | 2 |
| 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... | 3 |
| บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... | 4 |
| 2.1 ผักแว่นต้น..... | 4 |
| 2.1.1 ข้อมูลทั่วไปและการกระจายพันธุ์..... | 4 |
| 2.1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์..... | 4 |
| 2.1.3 ประโยชน์ของผักแว่นต้น..... | 7 |
| 2.2 การกำจัดคลอโรฟิลล์..... | 7 |
| 2.3 วิธีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ..... | 9 |
| 2.3.1 สารพฤษเคมีเบื้องต้น..... | 9 |
| 2.3.2 สารประกอบฟีนอลิก..... | 10 |
| 2.3.3 ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ..... | 11 |
| 2.3.3.1 วิธี DPPH..... | 11 |
| 2.3.3.2 วิธี ABTS..... | 12 |
| 2.3.3.3 วิธี FRAP..... | 13 |
| 2.3.4 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย..... | 14 |
| 2.3.5 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส..... | 16 |
| 2.3.6 ฤทธิ์ต้านการอักเสบ..... | 17 |
| 2.3.7 ความเป็นพิษต่อเซลล์..... | 18 |
| 2.4 องค์ประกอบทางเคมีของพืช..... | 20 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

| | หน้า |
|---|-----------|
| 2.5 ดีเอ็นเอบาร์โค้ด..... | 24 |
| บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย..... | 26 |
| 3.1 ตัวอย่างพืช..... | 26 |
| 3.2 แบคทีเรีย..... | 26 |
| 3.3 เซลล์ไลน์..... | 26 |
| 3.4 อุปกรณ์และเครื่องมือ..... | 27 |
| 3.5 สารเคมี..... | 28 |
| 3.5.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดสาร..... | 28 |
| 3.5.2 สารเคมีที่ใช้กำจัดคลอโรฟิลล์..... | 28 |
| 3.5.3 สารเคมีที่ใช้ตรวจสอบสารพฤษเคมีเบื้องต้น..... | 28 |
| 3.5.4 สารเคมีที่ใช้ตรวจหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด..... | 29 |
| 3.5.5 สารเคมีที่ใช้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ..... | 29 |
| 3.5.6 สารเคมีที่ใช้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์..... | 30 |
| 3.5.7 สารเคมีที่ใช้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย..... | 30 |
| 3.5.8 สารเคมีที่ใช้ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส..... | 30 |
| 3.5.9 สารเคมีที่ใช้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์..... | 30 |
| 3.5.10 สารที่ใช้สกัดดีเอ็นเอ..... | 31 |
| 3.5.11 สารเคมีที่ใช้ในเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส..... | 31 |
| 3.5.12 สารเคมีที่ใช้ทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์..... | 31 |
| 3.5.13 สารเคมีที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส..... | 31 |
| 3.6 วิธีการทดลอง..... | 32 |
| 3.6.1 การสกัดสารและการแยกสารให้บริสุทธิ์..... | 32 |
| 3.6.1.1 การสกัดสารเมทานอลด้วยวิธีการแช่หมัก..... | 32 |
| 3.6.1.2 การกำจัดคลอโรฟิลล์โดยใช้น้ำมันปาล์ม..... | 32 |
| 3.6.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์..... | 33 |
| 3.6.1.4 การแยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction..... | 33 |
| 3.6.1.5 การแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี column chromatography... .. | 33 |
| 3.6.2 การตรวจสอบสารพฤษเคมีเบื้องต้น..... | 35 |
| 3.6.3 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด..... | 36 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

| | หน้า |
|---|-----------|
| 3.6.4 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ..... | 37 |
| 3.6.4.1 วิธี DPPH..... | 37 |
| 3.6.4.2 วิธี ABTS..... | 37 |
| 3.6.4.3 วิธี FRAP..... | 38 |
| 3.6.5 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย..... | 38 |
| 3.6.6 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส..... | 40 |
| 3.6.7 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์..... | 40 |
| 3.6.8 ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์..... | 41 |
| 3.6.9 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC-MS..... | 42 |
| 3.6.10 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ..... | 42 |
| 3.6.11 การระบุชนิดย่อยของผักแว่นต้นด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด..... | 42 |
| 3.6.11.1 การศึกษาสัณฐานวิทยา..... | 42 |
| 3.6.11.2 การสกัดดีเอ็นเอ..... | 43 |
| 3.6.11.3 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ..... | 44 |
| 3.6.11.4 การทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์..... | 45 |
| 3.6.11.5 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน..... | 45 |
| 3.6.11.6 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์..... | 47 |
| บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล..... | 48 |
| 4.1 การสกัดสารสกัดด้วยเมทานอลและการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ..... | 48 |
| 4.1.1 ผลการสกัดสารด้วยเมทานอล..... | 48 |
| 4.1.2 ผลการตรวจสอบสารพิษทุกชนิดเบื้องต้นของสารสกัดเมทานอล..... | 48 |
| 4.1.3 ผลการกำจัดคลอโรฟิลล์ของสารสกัดเมทานอล..... | 50 |
| 4.1.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเมทานอล..... | 51 |
| 4.1.5 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมทานอล..... | 53 |
| 4.1.5.1 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH..... | 53 |
| 4.1.5.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS..... | 55 |
| 4.1.5.3 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP..... | 57 |
| 4.1.6 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเมทานอล..... | 61 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

| | หน้า |
|---|------------|
| 4.1.7 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเมทานอล..... | 65 |
| 4.1.8 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ของสารสกัดเมทานอล..... | 66 |
| 4.1.8.1 ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7..... | 66 |
| 4.1.8.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์..... | 68 |
| 4.1.9 ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดเมทานอล..... | 71 |
| 4.2 ผลของการแยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction และการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ..... | 75 |
| 4.2.1 ผลการแยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction..... | 75 |
| 4.2.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดแยกส่วน..... | 78 |
| 4.2.3 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดแยกส่วน..... | 83 |
| 4.2.4 ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดแยกส่วน..... | 85 |
| 4.3 ผลการแยกสารด้วยวิธี column chromatography และการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ..... | 89 |
| 4.3.1 ผลการแยกสารด้วยวิธี column chromatography..... | 89 |
| 4.3.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดส่วนย่อย..... | 93 |
| 4.3.3 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดส่วนย่อย..... | 97 |
| 4.3.4 ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดส่วนย่อย..... | 99 |
| 4.4 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากผักแว่นต้นด้วยเทคนิค GC-MS..... | 103 |
| 4.4.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดแยกส่วนที่แยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction..... | 103 |
| 4.4.2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดส่วนย่อยที่แยกสารด้วยวิธี column chromatography..... | 106 |
| 4.5 ผลการระบุชนิดย่อยของผักแว่นต้น..... | 113 |
| 4.5.1 ผลการศึกษาสัณฐานวิทยา..... | 113 |
| 4.5.2 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด..... | 119 |
| บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ..... | 132 |
| 5.1 สรุปผลการวิจัย..... | 133 |
| 5.2 ข้อเสนอแนะ..... | 133 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

| | หน้า |
|----------------------|------|
| อ้างอิง..... | 134 |
| ภาคผนวก..... | 145 |
| ภาคผนวก ก..... | 146 |
| ภาคผนวก ข..... | 150 |
| ผลงานทางวิชาการ..... | 163 |
| ประวัติผู้เขียน..... | 178 |



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

| ตารางที่ | | หน้า |
|----------|---|------|
| 3.1 | ปริมาณของสารละลายที่ใช้ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส..... | 40 |
| 3.2 | คูไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนตำแหน่ง <i>rbcl</i> , <i>trnL-trnF</i> และ <i>ITS</i> | 46 |
| 3.3 | สารเคมีที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนตำแหน่ง <i>rbcl</i> , <i>trnL-trnF</i> และ <i>ITS</i> | 46 |
| 3.4 | สภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของบริเวณยีน ตำแหน่ง <i>rbcl</i> , <i>trnL-trnF</i> และ <i>ITS</i> | 46 |
| 4.1 | ข้อมูลน้ำหนัก ร้อยละค่าผลได้ ลักษณะ และรหัสสีของสารสกัดเมทานอลจาก ผักแว่นต้น..... | 48 |
| 4.2 | ผลการตรวจสอบสารพฤษเคมีเบื้องต้นของสารมาตรฐาน และสารสกัด เมทานอลจากผักแว่นต้น..... | 50 |
| 4.3 | ข้อมูลน้ำหนัก ร้อยละค่าผลได้ ลักษณะ และรหัสสีของสารสกัดเมทานอลจากกิ่ง และใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์..... | 51 |
| 4.4 | การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ของสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้น..... | 51 |
| 4.5 | ค่าเฉลี่ยปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้น..... | 53 |
| 4.6 | ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH, ABTS, FRAP และค่า IC_{50} จากสารสกัดเมทานอลของผักแว่นต้น..... | 60 |
| 4.7 | บริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดเมทานอลของผักแว่นต้นที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อดิสก์ และยาปฏิชีวนะเจนตามัยซินที่ความเข้มข้น 2 และ 5 ไมโครกรัมต่อดิสก์..... | 64 |
| 4.8 | ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้น ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร..... | 65 |
| 4.9 | ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 และความเข้มข้น ของสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้นที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ร้อยละ 50..... | 68 |
| 4.10 | ร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์ และค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้ง ไนตริกออกไซด์ ร้อยละ 50 ของสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้น..... | 70 |
| 4.11 | ร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ และค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่เป็นพิษต่อเซลล์ ร้อยละ 50 ของสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้น..... | 73 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

| ตารางที่ | หน้า |
|--|------|
| 4.12 ลักษณะผลึกพอร์มาซานของเซลล์มะเร็งในหลุมชุดควบคุม และหลุมที่ทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้นความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับที่กำลังขยาย 100 เท่า หลังเติมสารละลาย MTT และบ่ม 3-4 ชั่วโมง..... | 74 |
| 4.13 น้ำหนักของสารสกัด ร้อยละผลได้ ลักษณะ รสสีและสีของสารสกัดแยกส่วนจากรากและใบของผักแว่นต้นที่สกัดด้วยวิธี liquid-liquid extraction จำนวน 10 สารสกัด..... | 77 |
| 4.14 บริเวณยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากผักแว่นต้นที่แยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction จำนวน 10 สารสกัดที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อดิสก์ และยาปฏิชีวนะเจนตามัยซินความเข้มข้น 2 และ 5 ไมโครกรัมต่อดิสก์..... | 80 |
| 4.15 ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดแยกส่วนจากผักแว่นต้นที่แยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction จำนวน 10 สารสกัด ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร..... | 85 |
| 4.16 ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่เป็นพิษต่อเซลล์ ร้อยละ 50 ของสารสกัดแยกส่วนจากผักแว่นต้นที่แยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction..... | 89 |
| 4.17 บริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย <i>P. acne</i> ของสารสกัดส่วนย่อยของผักแว่นต้นที่แยกสารด้วยวิธี column chromatography ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อดิสก์ และยาปฏิชีวนะเจนตามัยซินความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อดิสก์..... | 94 |
| 4.18 ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดส่วนย่อยจากผักแว่นต้นที่แยกสารด้วยวิธี column chromatography ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร | 99 |
| 4.19 ร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DLF) ที่แยกสารด้วยวิธี column chromatography ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และยาต้านมะเร็งไมโทมัซิน ซี ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร..... | 102 |
| 4.20 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดแยกส่วนของผักแว่นต้นด้วยเทคนิค GC-MS..... | 105 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

| ตารางที่ | หน้า |
|---|------|
| 4.21 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดส่วนย่อย DLF1-13 ด้วยเทคนิค GC-MS..... | 109 |
| 4.22 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดส่วนย่อย ELF1-6 ด้วยเทคนิค GC-MS..... | 111 |
| 4.23 ขนาดขององค์ประกอบทางสัณฐานวิทยาของฝักแฉ่งต้นพุ่มเตี้ยและฝักแฉ่งต้นพุ่มสูง..... | 116 |
| 4.24 เปรียบเทียบความต่างของดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณยีนตำแหน่ง <i>rbcl</i> ของฝักแฉ่งต้นพุ่มเตี้ย ฝักแฉ่งต้นพุ่มสูง และพืช <i>Crotalaria</i> sp. ในฐานข้อมูล GenBank..... | 121 |
| 4.25 เปรียบเทียบความต่างของดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณยีนตำแหน่ง <i>trnL-trnF</i> ของฝักแฉ่งต้นพุ่มเตี้ย ฝักแฉ่งต้นพุ่มสูง และพืช <i>C. medicaginea</i> var. <i>luxurians</i> ในฐานข้อมูล GenBank..... | 124 |
| 4.26 เปรียบเทียบความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีนตำแหน่ง <i>ITS</i> ของฝักแฉ่งต้นพุ่มเตี้ย ฝักแฉ่งต้นพุ่มสูง และพืช <i>C. medicaginea</i> ในฐานข้อมูล GenBank..... | 129 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

| รูปที่ | หน้า |
|---|------|
| 2.1 ลักษณะองค์ประกอบของผักแว่นต้นแต่ละชนิดย่อย โดย (ก) ลำต้นของพืช <i>C. medicaginea</i> var. <i>neglecta</i> (ข) ดอกของพืช <i>C. medicaginea</i> var. <i>neglecta</i> และ (ค) เมล็ดของพืช <i>C. medicaginea</i> var. <i>luxurians</i> | 6 |
| 2.2 การทำปฏิกิริยาระหว่างสารอนุมูลอิสระ DPPH กับสารต้านอนุมูลอิสระ (AH)..... | 12 |
| 2.3 การทำปฏิกิริยาระหว่างสาร ABTS ที่มีความเสถียรกับสาร manganese dioxide หรือ potassium persulfate และสารต้านอนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับ ABTS ^{•+} | 13 |
| 2.4 การทำปฏิกิริยาของสารต้านอนุมูลอิสระถ่ายเทอิเล็กตรอนจึงทำให้สารประกอบเชิงซ้อน Fe ³⁺ -TPTZ เปลี่ยนรูปเป็น Fe ²⁺ -TPTZ..... | 14 |
| 2.5 การเกิดปฏิกิริยาของ MTT ที่ถูกเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ฟอร์มาซานด้วยเอนไซม์ succinate dehydrogenase ของเซลล์ที่รอดชีวิต..... | 19 |
| 2.6 ตัวอย่างลักษณะของเซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ชนิด HepG2 โดย ก คือลักษณะเซลล์ที่มีชีวิตรอด ข คือลักษณะเซลล์ที่ตาย เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับที่กำลังขยาย 100 เท่า หลังหยดสารละลาย MTT และบ่มไว้ 3-4 ชั่วโมง..... | 19 |
| 4.1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้นกับค่าเฉลี่ยร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH..... | 55 |
| 4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้นกับค่าเฉลี่ยร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS..... | 56 |
| 4.3 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้น โดย (ก) <i>B. cereus</i> (ข) <i>B. subtilis</i> (ค) <i>M. luteus</i> (ง) <i>S. aureus</i> (จ) <i>S. epidermidis</i> และ (ฉ) <i>P. acne</i> ตัวอักษร P คือชุดควบคุมเชิงบวก หรือยาปฏิชีวนะเจนตามัยซิน และ N คือชุดควบคุมเชิงลบ โดย N1 คือ เมทานอล และ N2 คือ DMSO..... | 63 |
| 4.4 ลักษณะของสารสกัดแยกส่วนรากและใบของผักแว่นต้นที่สกัดด้วยวิธี liquid-liquid extraction..... | 76 |

สารบัญรูป (ต่อ)

| รูปที่ | | หน้า |
|--------|--|------|
| 4.5 | ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดแยกส่วนจากรากของผักแว่นต้นที่แยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction โดย (ก) <i>B. cereus</i> (ข) <i>B. subtilis</i> (ค) <i>M. luteus</i> (ง) <i>S. aureus</i> (จ) <i>S. epidermidis</i> และ (ฉ) <i>P. acne</i> ตัวอักษร P คือชุดควบคุมเชิงบวก หรือยาปฏิชีวนะเจนตามัยซิน และ N คือชุดควบคุมเชิงลบ หรือเมทานอล..... | 81 |
| 4.6 | ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดแยกส่วนจากใบของผักแว่นต้นที่แยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction โดย (ก) <i>B. cereus</i> (ข) <i>B. subtilis</i> (ค) <i>M. luteus</i> (ง) <i>S. aureus</i> (จ) <i>S. epidermidis</i> และ (ฉ) <i>P. acne</i> ตัวอักษร P คือชุดควบคุมเชิงบวก หรือยาปฏิชีวนะเจนตามัยซิน และ N คือชุดควบคุมเชิงลบ หรือเมทานอล..... | 82 |
| 4.7 | การเคลื่อนที่และองค์ประกอบของสารที่แยกบนแผ่น TLC แบบบางของสารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DL) โดยใช้ระบบตัวทำละลายเฮกเซนต่อเอทิลอะซิเตท อัตราส่วน 1 : 9 และ 0 : 10 ตามลำดับ โดย (ก) หลังสเปรย์ด้วย <i>p</i> -anisaldehyde reagent (ข) ส่องภายใต้ UV ความยาวคลื่น 254 และ (ค) ส่องภายใต้ UV ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร..... | 90 |
| 4.8 | การเคลื่อนที่และองค์ประกอบของสารที่แยกบนแผ่น TLC แบบบางของสารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (EL) โดยใช้ระบบตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอล อัตราส่วน 9 : 1, 8 : 2 และ 7 : 3 ตามลำดับ โดย (ก) หลังสเปรย์ด้วย <i>p</i> -anisaldehyde reagent (ข) ส่องภายใต้ UV ความยาวคลื่น 254 และ (ค) ส่องภายใต้ UV ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร..... | 91 |
| 4.9 | ตัวอย่างการเคลื่อนที่และองค์ประกอบของสารที่แยกบนแผ่น TLC แบบบางของสารสกัดส่วนย่อยจากผักแว่นต้น โดยตัวเลข 1-10 คือสารที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ของแต่ละหลอดทดลอง โดย (ก) หลังสเปรย์ด้วย <i>p</i> -anisaldehyde reagent (ข) ส่องภายใต้ UV ความยาวคลื่น 254 และ (ค) ส่องภายใต้ UV ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร..... | 92 |
| 4.10 | ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย <i>P. acne</i> ของสารสกัดส่วนย่อยจากผักแว่นต้นที่แยกสารด้วยวิธี column chromatography ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อดิสก์ โดยตัวอักษร P คือชุดควบคุมเชิงบวก หรือยาปฏิชีวนะเจนตามัยซิน และ N คือชุดควบคุมเชิงลบ หรือเมทานอล..... | 95 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

| รูปที่ | หน้า |
|---|------|
| 4.11 ลักษณะและองค์ประกอบทางสัณฐานวิทยาของฝักแวนต้นพุ่มเตี้ย ถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอประกอบด้วย (ก) ลักษณะของพุ่มต้น (ข) ใบ (ค) ช่อฝัก (ง) ฝัก (จ-ฉ) เมล็ด (ช) ดอก (ซ) กลีบดอกส่วนกลางด้านหน้า (ณ) กลีบดอกส่วนกลางด้านหลัง (ญ) กลีบดอกคู่ล่าง และ (ฎ) กลีบดอกคู่ข้าง..... | 117 |
| 4.12 ลักษณะและองค์ประกอบทางสัณฐานวิทยาของฝักแวนต้นพุ่มสูง ถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอประกอบด้วย (ก) ลักษณะของพุ่มต้น (ข) ใบ (ค) ช่อฝัก (ง) ฝัก (จ-ฉ) เมล็ด (ช) ดอก (ซ) กลีบดอกส่วนกลางด้านหน้า (ณ) กลีบดอกส่วนกลางด้านหลัง (ญ) กลีบดอกคู่ล่าง และ (ฎ) กลีบดอกคู่ข้าง..... | 118 |
| 4.13 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสับริเวณยีนตำแหน่ง <i>rbcl</i> มีขนาด 800 คู่เบส และใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส..... | 119 |
| 4.14 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสับริเวณยีนตำแหน่ง <i>trnL-trnF</i> มีขนาด 1050 คู่เบส และใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส..... | 120 |
| 4.15 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสับริเวณยีนตำแหน่ง <i>ITS</i> มีขนาด 650 คู่เบส และใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส..... | 120 |
| 4.16 เปรียบเทียบความต่างของดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณยีนตำแหน่ง <i>rbcl</i> ด้วยโปรแกรม Bio edit โดยตัวอักษร AB586312 คือพืช <i>Crotalaria</i> sp., C01 คือฝักแวนต้นพุ่มเตี้ย และ C02 คือฝักแวนต้นพุ่มสูง..... | 122 |
| 4.17 เปรียบเทียบความต่างของดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณยีนตำแหน่ง <i>trnL-trnF</i> ด้วยโปรแกรม Bio edit โดยตัวอักษร KP691153 และ KP691155 คือพืช <i>C. medicaginea</i> var. <i>luxurians</i> , C01 คือฝักแวนต้นพุ่มเตี้ย และ C02 คือฝักแวนต้นพุ่มสูง..... | 125 |
| 4.18 เปรียบเทียบความต่างของดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณยีนตำแหน่ง <i>trnL-trnF</i> ด้วยโปรแกรม Bio edit โดยตัวอักษร KP691154 คือพืช <i>C. medicaginea</i> var. <i>hernarioides</i> , C01 คือฝักแวนต้นพุ่มเตี้ย และ C02 คือฝักแวนต้นพุ่มสูง..... | 126 |

สารบัญญรูป (ต่อ)

| รูปที่ | | หน้า |
|--------|---|------|
| 4.19 | เปรียบเทียบความต่างของดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณยีนตำแหน่ง ITS ด้วยโปรแกรม Bio edit โดยตัวอักษร JN990115 และ JQ067334 คือพืช <i>C. medicaginea</i> , KP698667 คือพืช <i>C. medicaginea</i> var. <i>luxurians</i> , C01 คือผักแว่นต้นพุ่มเตี้ย และ C02 คือผักแว่นต้นพุ่มสูง..... | 130 |
| 4.20 | เปรียบเทียบความต่างของดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณยีนตำแหน่ง ITS ด้วยโปรแกรม Bio edit โดยตัวอักษร KX371730 คือพืช <i>C. medicaginea</i> var. <i>neglecta</i> , C01 คือผักแว่นต้นพุ่มเตี้ย และ C02 คือผักแว่นต้นพุ่มสูง..... | 131 |



คำย่อ/สัญลักษณ์

| คำย่อ/สัญลักษณ์ | คำอธิบาย |
|------------------|---|
| ABTS | 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) |
| CTAB | Cetyltrimethylammonium bromide |
| DPPH | 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazl |
| dNTP | Deoxynucleotide triphosphate |
| dATP | Deoxyadenosine triphosphate |
| dCTP | Deoxycytidine triphosphate |
| dGTP | Deoxyguanosine triphosphate |
| dTTP | Deoxythymidine triphosphate |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide |
| DNA | Deoxyribonucleic acid |
| EDTA | Ethylenediaminetetraacetic acid |
| FBS | Fetal Bovine Serum |
| GC-MS | Gas Chromatography-Mass Spectrometry |
| IC ₅₀ | 50% inhibitory concentration |
| L-dopa | L-3,4-dihydroxyphenylalanine |
| Mg AAE | Milligram ascorbic acid equivalent |
| mg GAE | Milligram gallic acid equivalent |
| mg TE | Milligram Trolox equivalent |
| MTT | 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide |
| PBMI 1640 | Roswell park memorial institute 1640 medium |
| PBS | Phosphate buffer saline |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| SNP | Sodium nitroprusside |
| TE buffer | Tris-EDTA buffer |
| TPTZ | 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazin |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

พืชสกุล *Crotalaria* เป็นพืชวงศ์ถั่ว (Fabaceae หรือ Leguminosae) เป็นสกุลที่มีจำนวนสมาชิกมากเป็นอันดับ 3 รองจากสกุล *Astragalus* และ *Indigofera* ซึ่งมีประมาณ 700 ชนิด (species) (Rockinger และคณะ, 2017) โดยพบกระจายอยู่ทั่วไปในภูมิภาคเขตร้อนและกึ่งเขตร้อนของโลก ซึ่งถือว่าเป็นพืชที่สามารถปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมและสภาพภูมิอากาศที่หลากหลายได้ มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและบทบาททางเภสัชวิทยาของพืชสกุล *Crotalaria* พบว่าดอกและเมล็ดของปอเทือง (*C. juncea*) ตรวจพบสารสำคัญกลุ่มไฟโตสเตอรอล (phytosterols) ที่สามารถลดปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือดได้ (Pimratch และคณะ, 2022) เมล็ดของหังเม่น (*C. pallida*) ตรวจพบสารสำคัญกลุ่ม homoisoflavonoids ที่มีสรรพคุณด้านการอักเสบ ต้านมะเร็ง ต้านภูมิ และต้านมะเร็งเยื่อลำไส้ (Hu และคณะ, 2017) เป็นต้น นอกจากนี้ตรวจพบสารฟลักซ์เคมีเบื้องต้น ได้แก่ แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ คูมาริน แทนนิน ฟลาโวนอยด์ เทอร์ปีน สเตียรอยด์ กลูโคไซด์ รวมถึงสารประกอบฟีนอลหรือพอลิฟีนอล ที่มีความสัมพันธ์ต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชสกุล *Crotalaria* (Saba, 2019)

Crotalaria medicaginea Lam. มีชื่อพื้นเมืองว่า “ผักแว่นต้น” (เนตรดาว, 2545) เป็นไม้ล้มลุกที่พบกระจายอยู่ทั่วโลก เช่น ประเทศอินเดีย (Yadava และ Vishwakarma, 2014) อเมริกาเหนือ ตอนเหนือของทวีปออสเตรเลีย และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ ประเทศลาว พม่า เวียดนาม และประเทศไทย เป็นต้น (Ninkaew และคณะ, 2017a) มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดของพืช *C. medicaginea* ตรวจพบสารฟลักซ์เคมีเบื้องต้น ได้แก่ แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ และสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดี (Devendra และคณะ, 2012) ตรวจพบสารสำคัญ acacetin, isorhamnetin และ quercitrin รวมถึงสารกลุ่ม allelochemical จำนวน 2 ชนิด ซึ่งเป็นสารชนิดใหม่ที่พบในสารสกัดเมทานอลจากกิ่งของพืช *C. medicaginea* ประกอบด้วยสารชนิด 3, 5, 7, 3', 4'-pentahydroxy-6-methoxyflavone-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-7-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-xylopyranoside และสารชนิด 3, 5, 7-trihydroxy-8, 4'-dimethoxyflavone-5-O- β -D-galactopyranosyl-7-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-O- α -L-arabinopyranoside พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* และ *Escherichia coli* และมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรค ได้แก่ *Aspergillus niger*, *Candida albican*, และ *Mucor indicus* (Yadava และ Vishwakarma, 2014) นอกจากนี้มียังตรวจพบสารกลุ่ม otonecine alkaloids จากพืช *C. medicaginea* ที่มีความเป็นพิษต่อตับของม้า (Fletcher และคณะ, 2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในปัจจุบันมีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของพืช *C. medicaginea* ค่อนข้างน้อย และยังไม่พบการศึกษาด้านความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยที่ผ่านมามีชาวบ้านในพื้นที่ตำบลองค์พระ อำเภอด่านช้าง จังหวัดสุพรรณบุรี นิยมนำมาต้มหรือดองเพื่อรับประทานเป็นยาสมุนไพรแก้อาการปวดเมื่อย โดยไม่ทราบว่าพืชชนิดนี้มีความปลอดภัยต่อร่างกายหรือไม่ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของผักแว่นต้น ได้แก่ ตรวจสอบสารฟลักซ์เคมีเบื้องต้น วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ และความเป็นพิษต่อเซลล์ ทั้งนี้สารสกัดของผักแว่นต้นปรากฏสีเขียวที่เกิดจากสารคลอโรฟิลล์ ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อการวิเคราะห์ฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเฉพาะในการทดลองที่วิเคราะห์ผลด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสง ดังนั้นจึงกำจัดคลอโรฟิลล์ออกจากสารสกัดที่มีสีเขียวของผักแว่นต้นเพื่อลดปัญหาดังกล่าว

จากการลงพื้นที่สำรวจพืชวงศ์ถั่วในตำบลองค์พระ ตรวจสอบพบพืชจำนวนสองลักษณะ คือ ลักษณะพุ่มเตี้ย (C01) มีลักษณะเป็นพุ่มระนาบกับพื้นดินสูงประมาณ 15-30 เซนติเมตร และลักษณะพุ่มสูง (C02) เป็นพุ่มใหญ่ตั้งตรงสูงจากพื้นดินประมาณ 30-50 เซนติเมตร ซึ่งคาดว่าพืชชนิด (species) เดียวกัน ดังนั้นการศึกษานี้จึงสนใจระบุชนิดย่อย (variety) ของพืชทั้งสองลักษณะ เพื่อยืนยันชนิดและชนิดย่อยที่ถูกต้องด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 เพื่อสนองพระราชดำริในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี
- 1.2.2 ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดของผักแว่นต้น
- 1.2.3 ใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการระบุชนิดย่อยของผักแว่นต้น

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1.3.1 ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดผักแว่นต้น

สกัดสารจากส่วนต่าง ๆ ของผักแว่นต้นประกอบด้วยราก กิ่ง และใบ ที่เก็บตัวอย่างจากพื้นที่ตำบลองค์พระ อำเภอด่านช้าง จังหวัดสุพรรณบุรี ประเทศไทย มาสกัดด้วยวิธีการหมัก (maceration) โดยใช้ตัวทำละลายเมทานอล และนำมาตรวจสอบสารฟลักซ์เคมีเบื้องต้น ประกอบด้วยสารแอลคาลอยด์ แทนนิน คูมาริน และซาโปนิน จากการสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล พบว่าสารสกัดกิ่งและใบมีสีเขียวเข้ม จึงกำจัดคลอโรฟิลล์โดยใช้น้ำมันปาล์ม และนำสารสกัดเมทานอลมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังนี้ วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-cioalteu colorimetric ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) วิธี 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) และวิธี ferric เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

reducing antioxidant power (FRAP) ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี paper disk diffusion ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopa chrome ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธี การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ และศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) จากนั้นคัดเลือกสารสกัด เมทานอลที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง มาแยกสารโดยใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกันด้วยวิธี liquid-liquid extraction ให้ชื่อว่า สารสกัดแยกส่วน และแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี column chromatography ให้ชื่อว่า สารสกัดส่วนย่อย โดยนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพข้างต้นอีกครั้ง จากนั้นคัดเลือกสารสกัด แยกส่วนและสารสกัดส่วนย่อย มาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

1.3.2 การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการระบุชนิดย่อยของผักแว่นต้น

นำตัวอย่างผักแว่นต้นจำนวน 2 ลักษณะประกอบด้วยผักแว่นต้นพุ่มเตี้ย (C01) และ ผักแว่นต้นพุ่มสูง (C02) ที่เก็บตัวอย่างจากตำบลดงเค็ง อำเภอด่านช้าง จังหวัดสุพรรณบุรี ประเทศไทย มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (Polymerase chain reaction; PCR) และระบุชนิดย่อย (variety) ของผักแว่นต้นด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดโดยใช้บริเวณยีนตำแหน่ง *trnL-trnF* intergenic spacer (*trnL-trnF*), Internal transcribed spacer (*ITS*) และ Ribulose-bisphosphate carboxylase (*rbcl*)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 ทราบถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากผักแว่นต้น ได้แก่ สารพฤษเคมีเบื้องต้น ปริมาณ ฟีนอลิกทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ยับยั้ง เอนไซม์ไทโรซิเนส ฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ ความเป็นพิษต่อเซลล์ และองค์ประกอบทางเคมี
- 1.4.2 ทราบถึงชนิดและชนิดย่อยของผักแว่นต้นที่พบในประเทศไทย เพื่อเป็นข้อมูลการอนุรักษ์พันธุ์พืช และสามารถนำไปใช้งานได้อย่างเหมาะสม
- 1.4.3 เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ และยารักษาโรคในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ผักแว่นต้น

2.1.1 ข้อมูลทั่วไปและการกระจายพันธุ์

ผักแว่นต้น มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Crotalaria medicaginea* Lam. เป็นพืชที่จัดอยู่ในวงศ์ถั่ว (Fabaceae หรือ Leguminosae) ซึ่งอยู่ในวงศ์ย่อยประดู่ (Papilionoideae) เป็นพืชที่พบได้ตลอดทั้งปีในระบบนิเวศป่าดิบแล้ง โดยเจริญเติบโตมากในช่วงปลายเดือนตุลาคมถึงกลางเดือนกุมภาพันธ์ ออกดอกและผลช่วงเดือนกันยายนถึงตุลาคม (เนตรดาว, 2545) มีชื่อประจำถิ่นแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ เช่น Gulabi (ประเทศอินเดีย) (Yadava และ Vishwakarma, 2014) และผักแว่นต้น (ประเทศไทย) เป็นต้น โดยพบการแพร่กระจายพันธุ์ในอเมริกาเหนือ แอฟริกา ตอนเหนือของทวีปออสเตรเลีย และเอเชีย เช่น อินเดีย ศรีลังกา พม่า จีน ลาว เวียดนาม รวมถึงประเทศไทย (Ninkaew และคณะ, 2017a)

2.1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ปัจจุบันตรวจพบลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพืช *C. medicaginea* ที่ต่างแตกต่างกัน และสามารถจำแนกเป็นชนิดย่อยได้จำนวน 5 ชนิดย่อย คือ *C. medicaginea* var. *medicaginea*, *C. medicaginea* var. *linearis*, *C. medicaginea* var. *neglecta* (Wight and Arn.) Baker, *C. medicaginea* var. *luxurians* (Benth.) Baker และ *C. medicaginea* var. *herniarioides* (Wight and Arn.) Baker โดยงานวิจัยของ Holland (2002) ได้รวบรวมข้อมูลลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพืช *C. medicaginea* แต่ละชนิดย่อย ดังนี้

C. medicaginea var. *medicaginea* ว่าเป็นสมุนไพรที่มีลำต้นตั้งตรงสูง 30 เซนติเมตร มีกิ่งแตกแขนงจำนวนมากจากฐานลำต้น ใบเป็นแผ่นใบรูปไข่กลับ ปลายมน (obtuse) และเว้าตรงกลางใบ (emarginate) ยาว 5-20 มิลลิเมตร กว้าง 2-8 มิลลิเมตร มีหูใบยาว 1-2 มิลลิเมตร ใบประดับยาว 1-2 มิลลิเมตร ใบประดับย่อยยาว 0.5-1 มิลลิเมตร ก้านใบยาว 1-2 มิลลิเมตร กลีบเลี้ยงยาว 2-3 มิลลิเมตร กลีบดอกส่วนกลาง มีลักษณะปลายมนเป็นรูปไข่ยาว 3-4.5 มิลลิเมตร กว้าง 2.5-3.5 มิลลิเมตร กลีบดอกคู่ล่างยาว 3-4.5 มิลลิเมตร และมีขนาดของฝักยาว 3-4 มิลลิเมตร พบว่ามักออกดอกและผลในเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนตุลาคม (Niyomdham, 1978)

C. medicaginea var. *linearis* เป็นสมุนไพรที่มีลำต้นตั้งตรง 1 เมตร แตกกิ่งก้านแบบเดี่ยวจากฐานลำต้นต้น ใบเป็นแผ่นเรียวยาว (linear) ยาวประมาณ 15-60 มิลลิเมตร กว้าง 0.5-3 มิลลิเมตร หูใบยาว 0.5-2 มิลลิเมตร ใบประดับยาว 1-2 มิลลิเมตร ใบประดับย่อยยาว 0.3-0.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิเมตร ก้านใบยาว 1.5-3 มิลลิเมตร กลีบเลี้ยงยาว 2-3 มิลลิเมตร กลีบดอกส่วนกลางมีลักษณะปลายมนเป็นรูปไข่ยาว 5-7 มิลลิเมตร กว้าง 5 มิลลิเมตร กลีบดอกคู่ล่างยาว 5-7 มิลลิเมตร และมีขนาดของฝักยาว 3.5-4.5 มิลลิเมตร มักออกดอกและผลในเดือนมีนาคมถึงเดือนสิงหาคม

C. medicaginea var. *neglecta* เป็นสมุนไพรที่มีลำต้นตั้งตรง 1 เมตร แตกกิ่งก้านแบบเดี่ยวจากฐานลำต้น ใบเป็นแผ่นใบปลายมนรูปไข่กลับ ใบทรงรูปไข่ (obovate) จนถึงเป็นใบปลายมนทรงรี (oblanceolate) และเว้าตรงกลางใบ ยาว 5-40 มิลลิเมตร กว้าง 1-10 มิลลิเมตร หูใบยาว 1-5 มิลลิเมตร ใบประดับยาว 1-2.5 มิลลิเมตร ใบประดับย่อยยาว 0.5-1.5 มิลลิเมตร ก้านใบยาว 1.5-5 มิลลิเมตร กลีบเลี้ยงยาว 2.5-4 มิลลิเมตร กลีบดอกส่วนกลางมีลักษณะปลายมนเป็นรูปไข่และโค้งมนยาว 5-8 มิลลิเมตร กว้าง 4-6 มิลลิเมตร กลีบดอกคู่ล่างยาว 4-8 มิลลิเมตร และมีขนาดของฝักยาว 4-5.5 มิลลิเมตร (Wight และ Arnott, 1834) นอกจากนี้งานวิจัยของ เนตรดาว (2545) ตรวจพบพืช *C. medicaginea* var. *neglecta* ในพื้นที่เขตอุทยานแห่งชาติภูพาน ประเทศไทย โดยบรรยายลักษณะว่าเป็นไม้ล้มลุก ลำต้นทรงกระบอกมีขน ใบประกอบเป็นแบบฝ่ามือเรียงสลับกัน ใบย่อยเป็นรูปหัวใจกลับยาว 13 มิลลิเมตร กว้าง 9 มิลลิเมตร ปลายใบเว้า ฐานใบแหลม แผ่นใบมีขน ก้านใบยาว 10 มิลลิเมตร หูใบยาว 2 มิลลิเมตร มีช่อดอกแบบช่อกระจุก กลีบเลี้ยงเป็นรูปประฆังยาว 3 มิลลิเมตร กลีบดอกมีสีเหลืองรูปไข่ปลายมน โดยกลีบดอกส่วนกลางมีสีเหลือง และด้านหลังดอกเป็นสีแดงยาวประมาณ 5 มิลลิเมตร กว้าง 5 มิลลิเมตร กลีบดอกคู่ข้างรูปขอบขนานปลายมนยาว 5 มิลลิเมตร กลีบดอกล่างรูปรียาว 5 มิลลิเมตร เกสรเพศผู้มีก้านชูอับเรณูยาว 3 มิลลิเมตร เกสรเพศเมียมีรังไข่รูปรียาว 2.5 มิลลิเมตร กว้าง 2 มิลลิเมตร ก้านเกสรเพศเมียยาว 4.5 มิลลิเมตร ลักษณะของฝักเกือบกลมยาว 5 มิลลิเมตร กว้าง 4.5 มิลลิเมตร มีขนเล็กน้อย ด้านในผลมีเมล็ด 2 เมล็ด เป็นรูปหัวใจเบี้ยยาว 2.5 มิลลิเมตร กว้าง 2 มิลลิเมตร มักออกดอกและผลเดือนกันยายนถึงเดือนตุลาคม

ต่อมา Mastakar และคณะ (2023) ได้ตรวจพบพืช *C. medicaginea* var. *neglecta* พบว่ามีลักษณะเป็นสมุนไพรที่แตกกิ่งแขนงระนาบไปกับพื้นดิน (ดังรูปที่ 2.1 ก) ใบมี 3 ใบ รูปไข่กลับ มีลักษณะเป็นรูปลิ้มที่โคน ด้านบนเป็นมันเงา ด้านล่างเป็นมันเงา และมีขน ใบมีขนาดความยาว 2-8 มิลลิเมตร และกว้าง 0.5-1 มิลลิเมตร ก้านใบยาวไม่เกิน 5 มิลลิเมตร ก้านใบย่อยยาว 0.4-0.8 มิลลิเมตร มีช่อดอกเป็นช่อกระจุก มีดอกจำนวน 6-12 ดอก มีดอกสีเหลือง (ดังรูปที่ 2.1 ข) ก้านช่อดอกยาวได้ถึง 15 มิลลิเมตร ฝักมีลักษณะเกือบกลม มีขน มีร่อง และจะงอยปากสั้นๆ ในฝักมี 2 เมล็ด

C. medicaginea var. *luxurians* เป็นสมุนไพรไม้ล้มลุกตั้งตรงที่มีความสูงประมาณ 15-50 เซนติเมตร จัดเป็นพืชที่มีใบประกอบแบบฝ่ามือ 3 ใบย่อย เรียกกลุ่มนี้ว่า trifoliolatae dispermae ขอบใบเรียบ แผ่นใบด้านบนมีขน ใบย่อยรูปไข่หัวใจกลับ ซึ่งเรียงสลับกันยาวประมาณ 3-15 มิลลิเมตร กว้าง 2-10 มิลลิเมตร

ก้านใบยาว 10-15 มิลลิเมตร หูใบยาว 1-2 มิลลิเมตร มีช่อดอกแบบช่อกระจุกยาวประมาณ 10-35 มิลลิเมตร ก้านดอกยาวประมาณ 0.8-2 มิลลิเมตร มีกลีบเลี้ยงคล้ายระฆังยาวประมาณ 3 มิลลิเมตร กลีบดอกและกลีบกลางมีสีเหลืองรูปไข่ปลายมน กลีบดอกส่วนกลางรูปไข่ ขอบ

เรียวยาว 2.3-2.5 มิลลิเมตร กว้าง 1.7-1.8 มิลลิเมตร มีขนที่กลีบดอกด้านหลัง กลีบดอกคู่ข้างรูป
ขนานยาว 1.3-1.5 มิลลิเมตร กว้าง 0.7-1 มิลลิเมตร ดอกคู่ล่างมียาว 2.8-3 มิลลิเมตร กว้าง 0.8-1
มิลลิเมตร และมีจะงอยปากบริเวณปลายดอกคู่ล่างเล็กน้อย มีอับเรณูยาว 0.3-0.5 มิลลิเมตร ก้าน
เกสรเพศผู้ยาว 1-2.5 มิลลิเมตร กว้าง 0.6-0.7 มิลลิเมตร มีรังไข่ลักษณะรูปรีกว้าง 1-1.2 มิลลิเมตร
และมีก้านชูเกสรเพศเมียยาว 2.8-3.5 มิลลิเมตร รูปร่างของเมล็ดเป็นรูปหัวใจเบี้ยวสีน้ำตาลเข้ม มี
ลักษณะมันวาวยาว 1.7-2 มิลลิเมตร กว้าง 1.5-17 มิลลิเมตร ฝักมีลักษณะกลมคล้ายไข่มีสีน้ำตาลดำ
ดังรูปที่ 2.1 (ค) โดยมีความยาว 3-5 มิลลิเมตร กว้าง 2-4 มิลลิเมตร และมีขนเล็กน้อย โดยส่วนใหญ่
จะพบว่ามีขนในส่วนต่าง ๆ ของพืช (Ninkaew และคณะ, 2017a)

แต่ชนิดย่อย *C. medicaginea* var. *herniarioides* มีข้อมูลลักษณะทางพฤกษศาสตร์
ค่อนข้างน้อย พบว่าเป็นสมุนไพรที่มีลักษณะลำต้นเป็นพุ่มเตี้ย (prostrate) มีใบขนาดเล็ก อัตราส่วน
ความยาวและกว้าง 1 : 1 ออกดอกเป็นช่อกระจุกสั้นจำนวน 1-3 ดอก (Baker, 1879) ในประเทศไทย
มีรายงานการค้นพบพืช *C. medicaginea* จำนวน 3 ชนิดย่อย ได้แก่ *C. medicaginea* var.
medicaginea (Niyomdham, 1978) และ *C. medicaginea* var. *neglecta* (Niyomdham, 1978;
จรัล, 2542; เนตรดาว, 2545) และ *C. medicaginea* var. *luxurians* (Ninkaew และคณะ, 2017a)



รูปที่ 2.1 ลักษณะองค์ประกอบของฝักแวนต้นแต่ละชนิดย่อย โดย (ก) ลำต้นของพืช

C. medicaginea var. *neglecta* (ข) ดอกของพืช *C. medicaginea* var. *neglecta*

และ (ค) เมล็ดของพืช *C. medicaginea* var. *luxurians* (ที่มา: รูป ก-ข Mastakar และ

คณะ, 2023; รูป ค Ninkaew และคณะ, 2017b)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 ประโยชน์ของผักแว่นต้น

สามารถใช้รักษาโรคหิด บาดแผลพุพอง ตลอดจนใช้เป็นยาบำรุงเลือดในคนที่ เป็นโรคโลหิตจาง (Jain และคณะ, 2009) บางพื้นที่นำไปและเมล็ดมาต้มผสมกับน้ำตาลเพื่อนำมารับประทาน เป็นของหวาน (Sharma และ Khandelwal, 2010) เมล็ดถูกนำมาปรุงรส และใช้เป็นอาหารโคนม และอูฐ (Yadava และ Vishwakarma, 2014)

2.2 การกำจัดคลอโรฟิลล์ (Chlorophyll removal)

คลอโรฟิลล์ (chlorophyll) เป็นรงควัตถุที่มีสารประกอบสีเขียวสามารถพบในคลอโรพลาสต์ (chloroplast) ของพืชสีเขียว สาหร่ายทุกชนิด รวมถึงแบคทีเรียบางชนิดประกอบด้วย คลอโรฟิลล์ เอ จะมีสีเขียวเข้ม เป็นสารโมเลกุลที่ไม่มีขั้ว จึงสามารถละลายในตัวทำละลายหรือสารละลายที่ไม่มีขั้วได้ และคลอโรฟิลล์ บี จะมีสีเขียวอ่อน เป็นสารโมเลกุลที่มีขั้ว จึงสามารถละลายในตัวทำละลายหรือสารละลายที่มีขั้วได้ดีกว่า (Hojnik และคณะ, 2007) โดยพบว่าคลอโรฟิลล์สามารถดูดกลืนแสงได้ดี ในช่วงคลื่นแสงสีฟ้าและสีแดง แต่ดูดกลืนแสงสีเหลืองและสีเขียวได้น้อย คลอโรฟิลล์สามารถดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่นระหว่าง 400-700 นาโนเมตร ซึ่งถือว่าเป็นช่วงที่ส่งผลกระทบต่อการทำงานของผล การทดลองโดยเฉพาะอย่างยิ่งในการทดลองที่ต้องวัดค่าการดูดกลืนแสง เนื่องจากสีเขียวของสารสกัด อาจไปรบกวนการอ่านผล และทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์ข้อมูลได้ (Rosaria และ คณะ, 2017) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องกำจัดคลอโรฟิลล์ออกจากตัวอย่างพืช

ในปัจจุบันมีวิธีการกำจัดคลอโรฟิลล์จากสารสกัดหลายวิธี ได้แก่ การกำจัดด้วยวิธีตกตะกอน คลอโรฟิลล์ (Tagrida และ Benjakul, 2020) การกำจัดด้วยวิธีใช้ตัวดูดซับ (Tzima และคณะ, 2019) และการกำจัดโดยใช้น้ำมัน (Phaisan และคณะ, 2020) เป็นต้น การกำจัดคลอโรฟิลล์ด้วยน้ำมันเป็นวิธีที่ง่าย หาซื้อง่าย ราคาถูก และปลอดภัยต่อผู้ใช้งานและสิ่งแวดล้อม

มีงานวิจัยที่ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชที่กำจัดคลอโรฟิลล์ด้วยวิธีต่าง ๆ ได้แก่ งานวิจัยของ Olatunde และคณะ (2018) ได้ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ และการกำจัดคลอโรฟิลล์ของสารสกัดจากใบฝรั่ง (*Psidium guajava*) ด้วยตัวทำละลายเมทานอล อะซิโตน โพรพานอล และคลอโรฟอร์ม เมื่อเปรียบเทียบปริมาณคลอโรฟิลล์รวม และฤทธิ์ทางชีวภาพระหว่างสารสกัดที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์และกำจัดคลอโรฟิลล์ พบว่าสารสกัดที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์มีปริมาณคลอโรฟิลล์รวมเท่ากับ 0.97 ± 0.04 มิลลิกรัมต่อกรัม มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 46.98 ± 4.89 mg GEA/g extract มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH, ABTS และ FRAP เท่ากับ 233.61, 2129.68 และ 2450.10 $\mu\text{mol TE/g extract}$ ตามลำดับ และเมื่อนำมาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจำนวน 5 สายพันธุ์ คือ *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes* และ *S. aureus* มีค่า minimum inhibitory concentration (MIC) อยู่ในช่วง 0.5-2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อนำมากำจัดคลอโรฟิลล์ด้วยตัวทำละลายข้างต้น พบว่ามีปริมาณคลอโรฟิลล์รวมลดลงเหลือเพียง

0.37 \pm 0.02, 0.04 \pm 0.02, 0.35 \pm 0.05 และ 0.05 \pm 0.01 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ และมีปริมาณ

ไม่ต่ำกว่าเกณฑ์ใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฟีนอลิกทั้งหมดลดลงเช่นกันเท่ากับ 2.43 ± 0.05 , 1.04 ± 0.14 , 2.43 ± 0.05 และ 36.78 ± 1.07 mg GEA/g extract ตามลำดับ ทุกตัวทำละลายมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ไกล่เคียงกับสารสกัดที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ โดยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอยู่ในช่วง 231.36 - 240.78 $\mu\text{mol TE/g extract}$ แต่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS และ FRAP น้อยกว่าสารสกัดที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์อยู่ในช่วง 609.10 - 1062.48 และ 658.89 - 869.52 $\mu\text{mol TE/g extract}$ ยกเว้นตัวทำละลายคลอโรฟอร์มที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS และ FRAP ที่ใกล้เคียงกับสารสกัดที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์เท่ากับ 2327.42 และ 2598.41 $\mu\text{mol TE/g extract}$ ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าสารสกัดที่กำจัดคลอโรฟิลล์มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียน้อยกว่าสารสกัดที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.51 - 2.5 , 0.51 - 2.5 , 1.25 - 5.0 , 1.25 - 2.5 และ 1.25 - 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าการกำจัดคลอโรฟิลล์ส่งผลให้มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดใบฝรั่งลดลง ยกเว้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ขึ้นอยู่กับการใช้ตัวทำละลายในการกำจัดคลอโรฟิลล์ จึงส่งผลให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน โดยสอดคล้องกับงานวิจัยของ Phaisan และคณะ (2020) ที่ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ และการกำจัดคลอโรฟิลล์ของสารสกัดเอทานอลจากใบสาบเสือ (*Chromolaena odorata*) โดยใช้น้ำมันมะพร้าว น้ำมันปาล์ม น้ำมันรำข้าว น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันข้าวโพด น้ำมันดอกทานตะวัน และน้ำมันคาโนลา พบว่าน้ำมันข้าวโพด น้ำมันมะพร้าว และน้ำมันปาล์มมีประสิทธิภาพในการกำจัดคลอโรฟิลล์สูงเท่ากับ 86.46 ± 0.89 , 85.59 ± 0.42 และ 85.35 ± 0.44 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับฤทธิ์ทางชีวภาพระหว่างสารสกัดใบสาบเสือที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์และกำจัดคลอโรฟิลล์ด้วยน้ำมันพบว่า สารสกัดที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์มีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 20.86 ± 0.30 mg rutin equivalent (RU)/0.5 g extract มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 33.44 ± 1.37 mg gallic equivalent (GAE)/0.5 g extract และมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 528.64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำสารสกัดมากำจัดคลอโรฟิลล์ด้วยน้ำมัน พบว่าสารสกัดที่กำจัดคลอโรฟิลล์ด้วยน้ำมันปาล์มและน้ำมันคาโนลา มีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดใกล้เคียงกันเท่ากับ 21.47 ± 0.08 และ 22.08 ± 0.11 mg RU/0.5 g extract ตามลำดับ แต่เมื่อกำจัดคลอโรฟิลล์ด้วยน้ำมันชนิดอื่น พบว่ามีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดลดลงอยู่ระหว่าง 7.13 ± 0.05 - 20.87 ± 0.15 mg RU/0.5 g extract และการกำจัดคลอโรฟิลล์ด้วยน้ำมันทุกชนิดส่งผลให้มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดลดลงเช่นกันอยู่ในช่วง 4.43 ± 0.19 - 14.89 ± 0.41 mg GAE/0.5 g extract เมื่อนำมาศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าสารสกัดที่กำจัดคลอโรฟิลล์ด้วยน้ำมันปาล์มมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 409.20 ถึง 445.71 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH มากกว่าสารสกัดที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ แสดงให้เห็นว่าการกำจัดคลอโรฟิลล์ด้วยน้ำมันทุกชนิดส่งผลให้ปริมาณฟลาโวนอยด์ และปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดลดลง ยกเว้นการกำจัดคลอโรฟิลล์ด้วยน้ำมันปาล์มที่มีปริมาณฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH มากกว่าสารสกัดที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ ดังนั้นปริมาณคลอโรฟิลล์ที่ลดลงอาจไม่ส่งผลโดยตรงต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชบางชนิด

เนื่องจากพืชแต่ละชนิดอาจมีสารสำคัญที่แตกต่างกัน
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตั้งงานวิจัยของ Wangcharoen และ phimphilia (2016) ได้ศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์รวม ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS และ FRAP ของเครื่องดื่มแปรรูปจากใบอ่อน ของข้าว 5 ชนิด ได้แก่ ข้าวหอมมะลิ ข้าวพันธุ์สุโขทัย 1 ข้าวพันธุ์สุโขทัย 2 ข้าวสาลี และข้าวบาร์เลย์ พบว่ามีปริมาณคลอโรฟิลล์รวมสูงเท่ากับ 286 ± 8 , 82 ± 2 , 128 ± 8 , 90 ± 2 และ 958 ± 4 ไมโครกรัมต่อ 200 มิลลิกรัม ตามลำดับ แต่มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดน้อย 10.50 ± 1.06 , 18.92 ± 0.38 , 23.04 ± 0.46 , 5.60 ± 0.44 และ 26.14 ± 0.52 mg GEA/g extract ตามลำดับ และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS และ FRAP ต่ำเช่นกัน โดยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS เท่ากับ 35.18 ± 0.74 , 25.44 ± 0.64 , 34.87 ± 0.08 , 22.15 ± 0.54 และ 17.88 ± 0.62 mg vitamin C equivalent (VCE)/200 ml มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ FRAP เท่ากับ 22.62 ± 0.62 , 16.00 ± 0.40 , 23.70 ± 0.50 , 10.26 ± 0.16 และ 5.66 ± 0.22 mg FeSo₄ equivalent/200 ml ตามลำดับ โดยข้าวบาร์เลย์มีปริมาณคลอโรฟิลล์รวมและปริมาณฟีนอลิก ทั้งหมดมากที่สุด แต่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุด แสดงให้เห็นว่าปริมาณคลอโรฟิลล์อาจไม่มีผลต่อ การส่งเสริมฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชบางชนิด

2.3 วิธีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ

2.3.1 สารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical compounds)

สารพฤกษเคมี หมายถึง สารเคมีที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในพืชชนิดต่าง ๆ ซึ่งแต่ละ ชนิดจะมีสารพฤกษเคมีที่แตกต่างกัน สารกลุ่มนี้อาจทำให้พืชแต่ละชนิดมีลักษณะต่างกันไป เช่น สี กลิ่นหรือรสชาติที่มีลักษณะเฉพาะตัว ส่วนใหญ่ตรวจพบสารพฤกษเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ ซ่อนอยู่ในพืชสมุนไพรหลากหลายชนิด ได้แก่ สารกลุ่มแอลคาลอยด์ สเตียรอยด์ เทอร์ปีน ฟลาโวนอยด์ และสารประกอบพวกฟีนอลิก สารเหล่านี้จัดอยู่ในสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) (Bourgaud และคณะ, 2001) ซึ่งเป็นสารที่พืชสังเคราะห์ขึ้นมาเพื่อการป้องกันตัวจาก สภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม โดยสารทุติยภูมิที่เกิดจากพืชสามารถนำมาใช้เพื่อจุดประสงค์ทางเภสัช วิทยา เช่น ต้านอนุมูลอิสระ (Nithitanakool, 2009) ต้านการอักเสบ (Nithitanakool, 2009; Sharma และคณะ, 2011) และยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เป็นต้น (Jiamboonsri, 2011; Idris และคณะ, 2020)

มีรายงานการตรวจสอบสารพฤกษเคมีของพืชสกุล *Crotalaria* และผักแว่นต้น ได้แก่ งานวิจัยของ Devendra และคณะ (2012) ได้ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และสารพฤกษเคมี เบื้องต้น จากใบของพืชสกุล *Crotalaria* จำนวน 3 ชนิด คือ *C. medicaginea*, *C. retusa* และ *C. prostrate* โดยสกัดสารด้วยตัวทำละลายปิโตรเลียมเอสเตอร์ คลอโรฟอร์ม เอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ และน้ำ พบว่าสารสกัดคลอโรฟอร์มและเอทานอลของพืชทุกชนิด ตรวจพบสารแอลคา ลอยด์และฟลาโวนอยด์ แต่ไม่พบสารแทนนิน สารสกัดคลอโรฟอร์มของพืช *C. medicaginea* และ *C. prostrate* ตรวจพบสารประกอบฟีนอลิก มีเพียงสารสกัดน้ำของพืช *C. retusa* ที่ตรวจพบสาร เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซาโปนิน สอดคล้องกับงานวิจัยของ เพชรรุ่ง และวนิดา (2564) ได้ตรวจสอบสารฟลักซ์เคมีเบื้องต้นของสารสกัดเมทานอลจากใบและกิ่งรวมกันของพืช *C. medicaginea* โดยเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดเมทานอลที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ และกำจัดคลอโรฟิลล์ด้วยน้ำมันปาล์ม พบว่ามีผลการทดลองที่ไม่แตกต่างกัน โดยตรวจพบสารแอลคาลอยด์ คูมาริน และสารประกอบฟีนอลิก แต่ไม่พบสารซาโปนิน และแทนนินเช่นเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าปริมาณของคลอโรฟิลล์ไม่มีผลต่อสารฟลักซ์เคมีของพืช *C. medicaginea*

2.3.2 สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds)

สารประกอบฟีนอลิก เป็นสารทุติยภูมิที่พบมากในพืชประกอบด้วยสารจำพวกฟีนอล (phenol group) ซึ่งในโมเลกุลประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิลรวมกับวงแหวนอะโรมาติก (aromatic ring) ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกที่พบมากที่สุดคือ สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (วรพร, 2011; นงลักษณ์, 2559) ในปัจจุบันมีการศึกษาด้านเภสัชวิทยา และฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารประกอบฟีนอลิกอย่างแพร่หลาย จากการศึกษาพบว่าสารจำพวกฟีนอลิกสามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคที่ติดเชื้อบริเวณบาดแผล (Pagare และคณะ, 2015) และต้านการอักเสบ (ลือชัย, 2012) เป็นต้น

สุธีรา และประสพอร (2016) ศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลจากดอกชงโค (*Bauhinia purpurea*) อัญชัน (*Clitoria ternatea*) พุ่มจอมพล (*Calliandra haematocephala*) เป็นพืชวงศ์ Fabaceae และเข็มฝรั่ง (*Ixora coccinea*) เป็นพืชวงศ์ Rubiaceae พบว่ามีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 37.51 ± 0.44 , 24.59 ± 0.90 , 104.41 ± 3.89 และ 74.58 ± 1.49 mg GAE/ g extract ตามลำดับ โดยสารสกัดดอกพุ่มจอมพลมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด รองลงมาคือสารสกัดดอกเข็มฝรั่ง และพบว่าสารสกัดจากดอกพุ่มจอมพลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS มากที่สุดเช่นกัน โดยมีค่า IC_{50} ต่ำเท่ากับ 30.74 ± 0.38 และ 25.31 ± 0.35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ รองลงมาคือสารสกัดดอกเข็มฝรั่ง ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 67.73 ± 4.12 และ 53.73 ± 2.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดดอกชงโคและอัญชัน ตรวจพบปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดน้อยจึงทำให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยลง โดยมีค่า IC_{50} มากกว่า 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมีความสัมพันธ์ต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ หากมีปริมาณฟีนอลิกมากจะส่งผลให้เกิดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีด้วยเช่นกัน

มีงานวิจัยที่วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของพืชสกุล *Crotalaria* ตรวจพบปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในแต่ละส่วนของพืชแตกต่างกัน โคนส่วนใหญ่มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดปานกลาง ได้แก่ งานวิจัยของ Anim และคณะ (2016) ได้ศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเอทานอลจากเมล็ด ดอก กิ่ง ฝัก และใบของพืช *C. retusa* พบว่ามีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 34.70 ± 0.57 , 37.15 ± 0.87 , 50.62 ± 0.29 , 61.22 ± 0.00 และ 67.35 ± 1.15 mg GEA/g extract ตามลำดับ โดยสารสกัดใบมีปริมาณฟีนอลิกมากที่สุด และรวมทั้งงานวิจัยของ Sinan และคณะ (2020) วิเคราะห์

ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกของลำต้น ดอก และผลของพืช *C. retusa* ที่สกัดด้วยวิธีการหมัก พบว่ามีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 35.09 ± 0.32 , 24.52 ± 0.26 และ 22.47 ± 0.20 mg GAE/g extract ซึ่งสารสกัดเปลือกของลำต้นตรวจพบปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด ในปัจจุบันการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของพืช *C. medicaginea* ยังไม่เคยแพร่มากนัก มีเพียงงานวิจัยของ เพชรรุ่ง และวนิดา (2564) ได้วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเมทานอลจากใบและกิ่งรวมกันของพืช *C. medicaginea* โดยเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ และกำจัดคลอโรฟิลล์ด้วยน้ำมันปาล์ม พบว่ามีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดลดลง 17.76 เปอร์เซ็นต์ โดยลดลงจาก 56.36 ± 0.68 เหลือเพียง 46.35 ± 1.10 mg GAE/g extract ตามลำดับ ซึ่งปริมาณคลอโรฟิลล์ที่ลดลงทำให้มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดลดลงด้วยเช่นกัน

2.3.3 ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity)

สารอนุมูลอิสระ (free radical) คือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (unpaired electron) ซึ่งเป็นอิเล็กตรอนที่ไม่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดพันธะของปฏิกิริยา อนุมูลอิสระเป็นสารที่ไม่เสถียร และไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลข้างเคียงเพื่อให้ตัวเองเสถียรขึ้น โดยทั่วไปสามารถพบได้ทั้งในร่างกายและได้รับจากปัจจัยภายนอก โดยปัจจัยภายในร่างกายเกิดจากการเผาผลาญอาหารเพื่อส่งเคราะห์พลังงานแก่เซลล์ การหายใจระดับเซลล์ ตลอดจนเกิดจากกลไกการป้องกันตัวของร่างกาย ส่วนปัจจัยภายนอกนั้นส่งผลกระทบต่อการศึกษาการเกิดสารอนุมูลอิสระ เช่น การได้รับรังสียูวี รังสีอัลตราไวโอเล็ต รังสีเอกซ์ รังสีแกมมา หรือมลภาวะทางเคมีก็สามารถกระตุ้นการเกิดภาวะ oxidative stress ได้ ซึ่งจะส่งผลให้เกิดโรคต่าง ๆ ตามมา (อชิป, 2559) สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) คือสารที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งพบได้ทั่วไปในแหล่งธรรมชาติ เช่น ผักใบเขียว อาหารที่มีสีเหลือง ผลไม้รสเปรี้ยว เนื้อสัตว์ และเอนไซม์ ซึ่งมีส่วนช่วยควบคุมปริมาณสารอนุมูลอิสระภายในร่างกายให้อยู่ในสภาวะสมดุล (บุหริน, 2556)

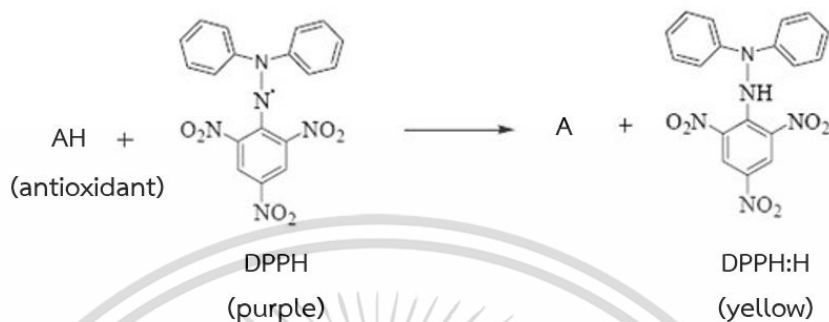
การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสามารถวิเคราะห์ได้หลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธีมีความจำเพาะที่แตกต่างกัน โดยวิธีที่นิยมใช้ ได้แก่ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) การวิเคราะห์ด้วยวิธี 2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) และการวิเคราะห์ด้วยวิธี ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) ซึ่งวิธีการวิเคราะห์ข้างต้น สามารถวิเคราะห์ความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดหรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบได้

2.3.3.1 วิธี DPPH

เป็นวิธีการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้น โดยใช้สารอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งเป็นสารละลายสีม่วง เมื่อสารต้านอนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ DPPH[•] โดยให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระ DPPH[•] เพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน จึงเกิดการเปลี่ยนสี

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

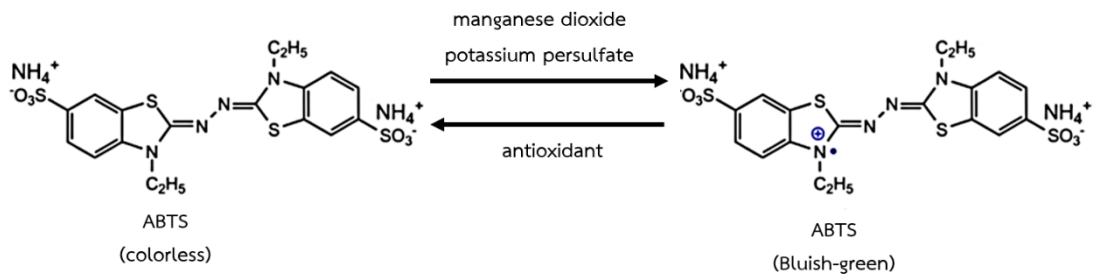
จากสีม่วงเป็นสีเหลือง ดังรูปที่ 2.2 และค่าการดูดกลืนแสงจะลดลงเมื่อวัดที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีนี้ เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว และมีขั้นตอนการวิเคราะห์ที่ไม่ซับซ้อน (บุหริน, 2556; พิซชาภรณ์, 2564)



รูปที่ 2.2 การทำปฏิกิริยาระหว่างสารอนุมูลอิสระ DPPH กับสารต้านอนุมูลอิสระ (AH)
(ที่มา: Adekunle และคณะ, 2012)

2.3.3.2 วิธี ABTS

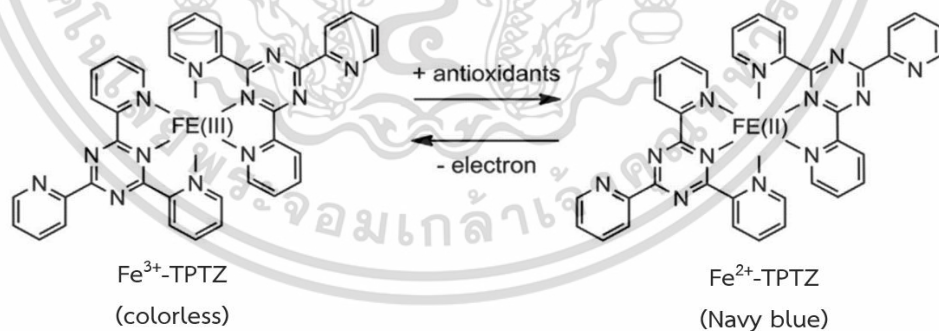
เป็นการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้สาร ABTS cation radical ($ABTS^{\bullet+}$) เป็นสารอนุมูลอิสระ โดย $ABTS^{\bullet+}$ เป็นสารสังเคราะห์สีเขียวปนน้ำเงินที่ไม่พบในร่างกายหรือในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อนเพื่อให้เป็นสารอนุมูลอิสระ สารเคมีที่นิยมนำมาทำปฏิกิริยากับ $ABTS^{\bullet+}$ ได้แก่ manganese dioxide หรือ potassium persulfate เป็นต้น (ดังรูปที่ 2.3) เพื่อให้สาร $ABTS^{\bullet+}$ ทำปฏิกิริยากับสารเคมีต้องตั้งไว้ในที่มืดอย่างน้อย 12-16 ชั่วโมง ก่อนนำมาวิเคราะห์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร หากสารสกัดมีความสามารถเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ โดยสามารถให้อิเล็กตรอนแก่สารอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ จะสังเกตได้จากสีของสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ ที่จางลง ซึ่งจะสัมพันธ์กับค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงเช่นกัน (บุหริน, 2556)



รูปที่ 2.3 การทำปฏิกิริยาระหว่างสาร ABTS ที่มีความเสถียรกับสาร manganese dioxide หรือ potassium persulfate และสารต้านอนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับ $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (ที่มา: Xiao และคณะ, 2020)

2.3.3.2 วิธี FRAP

เป็นวิธีที่วิเคราะห์ความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการให้อิเล็กตรอน หรือการรีดิวซ์อิเล็กตรอนให้กับสารประกอบเชิงซ้อน Fe^{3+} -TPTZ (2,4,6-tri (2-pyridyl)-1,3,5-triazine) ที่มีสีใสให้เป็น Fe^{2+} -TPTZ ที่มีสีน้ำเงินเข้ม (ดังรูปที่ 2.4) สามารถวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีนี้ เป็นวิธีที่ง่าย ใช้เวลาน้อย และสามารถทำซ้ำแล้วให้ผลเช่นเดิม (บุหรัน, 2556)



รูปที่ 2.4 การทำปฏิกิริยาของสารต้านอนุมูลอิสระถ่ายเทอิเล็กตรอนจึงทำให้สารประกอบเชิงซ้อน Fe^{3+} -TPTZ เปลี่ยนรูปเป็น Fe^{2+} -TPTZ (ที่มา: Xiao และคณะ, 2020)

ในปัจจุบันมีงานวิจัยที่การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชสกุล *Crotalaria* เช่นงานวิจัยของ Devendra และคณะ (2012) ได้เปรียบเทียบผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ใช้ความเข้มข้นของสารสกัดช่วง 20-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทดสอบกับสารสกัดเอกสารถนี้เป็นเอกสารถีสวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมทานอลจากใบของพืชสกุล *Crotalaria* จำนวน 3 ชนิด ที่เก็บจากแหล่งเพาะปลูกตามธรรมชาติ (field grown) ใน Rushikonda ประเทศอินเดีย และจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดทดลอง (*in vitro propagated*) บนอาหารสังเคราะห์ Murashige and Skoog (MS medium) จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดของพืช *C. medicaginea* จากทั้งสองแหล่งมีค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH อยู่ในช่วง 18.30 ± 0.63 - 63.10 ± 0.81 และ 22.20 ± 0.64 - 60.20 ± 0.46 ตามลำดับ และมีค่า IC_{50} ใกล้เคียงกันอยู่ที่ 76.00 และ 74.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สารสกัดของพืช *C. retusa* มีค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH อยู่ในช่วง 16.20 ± 0.63 - 67.40 ± 0.45 และ 21.30 ± 0.88 - 77.20 ± 0.66 ตามลำดับ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 74.6 และ 57.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดของพืช *C. prostrate* มีค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH อยู่ในช่วง 8.40 ± 0.35 - 50.40 ± 0.76 และ 10.70 ± 0.81 - 53.30 ± 0.98 ตามลำดับ และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 99.2 และ 93.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยพบว่าสารสกัดจากทั้งสองแหล่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ใกล้เคียงกัน และสารสกัดของพืช *C. retusa* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Sinan และคณะ (2020) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP ของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกของลำต้น ดอก และผลของพืช *C. retusa* ที่สกัดด้วยวิธีการหมัก พบว่าสารสกัดแต่ละส่วนมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 33.25 ± 1.90 , 6.04 ± 0.92 และ 6.18 ± 0.41 mg TE/ g extract ตามลำดับ เมื่อทดสอบด้วยวิธี ABTS พบว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 62.70 ± 3.08 , 17.70 ± 2.20 และ 16.27 ± 3.14 mg TE/g extract ตามลำดับ และทดสอบด้วยวิธี FRAP พบว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 83.91 ± 1.51 , 34.79 ± 0.70 และ 40.03 ± 0.30 mg TE/ g extract ตามลำดับ โดยสารสกัดจากเปลือกของลำต้นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้ง 3 วิธีสูงสุด จะเห็นได้ว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระขึ้นอยู่กับชนิดของพืช และส่วนของพืชที่นำมาศึกษา ดังงานวิจัยของ Anim และคณะ (2016) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดเมทานอลจากใบ กิ่ง ฝัก เมล็ด และดอกของพืช *C. burhia* พบว่าสารสกัดจากใบมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด โดยมีค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ร้อยละ 50 (Half-maximal effective concentration: EC_{50}) เท่ากับ 222, 525, 543, 710 และ 1029 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

2.3.4 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Antibacterial activity)

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียมีวิธีการทดลองหลายวิธี เช่น วิธี paper disk diffusion และวิธี broth dilution เป็นต้น ขึ้นอยู่กับรูปแบบของการทดลอง หรือปัจจัยการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย สำหรับการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี paper disk diffusion เป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากสะดวก ใช้สารสกัดปริมาณน้อย และใช้เวลาสั้นกว่าวิธีอื่น ๆ สามารถบ่งบอกความไวต่อการทดสอบของเชื้อแบคทีเรียได้ (ประสาทพร และคณะ, 2551) โดยเป็นวิธีการทดสอบที่วิเคราะห์ผลจากบริเวณยับยั้งหรือวงใสที่เกิดขึ้นบนอาหารแข็ง (zone of inhibition) โดย

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะหยดสารทดสอบ เช่น สารสกัดจากสมุนไพรหรือยาปฏิชีวนะ ลงกระดาษกรอง (paper disk) เพื่อเป็นตัวกลางในการแพร่กระจายของสารละลาย โดยวางกระดาษกรองลงบนอาหารแข็งที่มีเชื้อแบคทีเรียในความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม และประเมินผลจากบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น โดยขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งจะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ขนาดโมเลกุลของสารต้านจุลชีพ ความสามารถในการละลายหรือซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ อัตราการเจริญของเชื้อ ส่วนประกอบ และภาวะความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น (ณัฐธินิ และคณะ, 2561)

โดยมีการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของพืช *C. medicaginea* โดยงานวิจัยของ Devendra และคณะ (2012) ได้เปรียบเทียบผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากใบของพืช *C. medicaginea* ที่เก็บจากแหล่งเพาะปลูกตามธรรมชาติ และจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดทดลองที่ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์ โดยใช้วิธี paper disk diffusion ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *Proteus vulgaris* และ *E. coli*

เมื่อพิจารณาจากสารสกัดจากใบที่เก็บจากแหล่งเพาะปลูกตามธรรมชาติ นำมาที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล คลอโรฟอร์ม ปิโตรเลียมอีเทอร์ และน้ำ สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยพบว่าสารสกัดเอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดีที่สุด มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 15, 20, 15, 17 และ 17 มิลลิเมตร ตามลำดับ สารสกัดคลอโรฟอร์มมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 10, 12, 12, 13 และ 6.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ สารสกัดปิโตรเลียมอีเทอร์มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 6.5, 6.2, 9, 6.5 และ 9 มิลลิเมตร ตามลำดับ ยกเว้นสารสกัดน้ำที่ไม่พบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทุกชนิด และเมื่อพิจารณาจากสารสกัดจากใบที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดทดลอง พบว่าสารสกัดเอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดีที่สุดเช่นกัน โดยมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 15, 22, 20, 25 และ 20 มิลลิเมตร ตามลำดับ สารสกัดคลอโรฟอร์มมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 24, 14, 12, 15 และ 8 มิลลิเมตร ตามลำดับ สารสกัดปิโตรเลียมอีเทอร์มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 9, 6.2, 7, 8 และ 12 มิลลิเมตร ตามลำดับ ยกเว้นสารสกัดน้ำที่ไม่พบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทุกชนิด โดยสารสกัดจากใบที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดทดลองมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียสูงกว่าสารสกัดจากใบที่เก็บจากแหล่งเพาะปลูกตามธรรมชาติเล็กน้อย ซึ่งมีบริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแตกต่างจากงานวิจัยของ Yadava และ Vishwakarma (2014) ได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี paper disk diffusion โดยทดสอบกับสารบริสุทธิ์ในกลุ่ม allelochemicals ชนิดใหม่ที่ตรวจพบในสารสกัดเมทานอลจากกิ่งของพืช *C. medicaginea* ที่ความเข้มข้น 40-100 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ชนิด คือสาร 3, 5, 7, 3', 4'-pentahydroxy-6-methoxyflavone-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-7-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-xylopyranoside (C₃₃H₄₀O₂₁) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *M. luteus* โดยมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 4.66 มิลลิเมตร และสาร 3, 5, 7-trihydroxy-8,4'-dimethoxyflavone-5-O- β -D-galactopyranosyl-7-O- α -L-rhamnopyranosyl -(1 \rightarrow 3)-O- α -L-arabinopyranoside (C₃₄H₄₂O₂₀) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรีย *B. subtilis* และ *E. coli* โดยมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 9.51 และ 6.54 มิลลิเมตร ตามลำดับ และพบว่าสารทั้ง 2 ชนิด ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ได้

2.3.5 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Anti-tyrosinase)

เอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอล สามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิต เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา พืช รวมถึงในสัตว์ เอนไซม์ไทโรซิเนสในมนุษย์ สามารถสังเคราะห์จากโรโบโซม และถูกขนส่งไปยังเมลานोโซมเพื่อสังเคราะห์เมลานิน ซึ่งเกี่ยวข้องกับการบวนการสร้างเม็ดสีในมนุษย์ (melanogenesis) ทำให้ผิวหนังมีสีหมองคล้ำลง เอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นกุญแจสำคัญที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการสร้างเม็ดสีเมลานิน เนื่องจากภายในโครงสร้างของเอนไซม์ประกอบด้วยคอปเปอร์ (Cu) โดยทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาให้เกิดเมลานินเร็วขึ้น โดยเติมหมู่ไฮดรอกซิลให้แก่ไทโรซีน เช่น ออกซิเจนอะตอม เพื่อสังเคราะห์เป็น L-dopa (3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine) และเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันให้เป็น Dopa quinone จึงส่งผลให้เกิดเม็ดสีเมลานินในที่สุด ซึ่งเม็ดสีเมลานินประกอบด้วย 2 ชนิด คือ ชนิดสีดำ หรือ สีน้ำตาล เรียกว่า ยูเมลานิน (eumelanin) และชนิดสีเหลือง หรือ สีแดง เรียกว่า ฟีโอเมลานิน (phaeomelanin) (ณพัธูร, 2563) ดังนั้นสารที่สามารถจับกับโลหะคอปเปอร์ที่เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีกว่า L-dopa จะทำให้คอปเปอร์ไม่สามารถไปจับกับ L-dopa ได้ จึงส่งผลให้เกิดการสร้างเมลานินลดลง (ณพัธูร, 2563; Ramsden และ Riley, 2014) ซึ่งเรียกสารเหล่านี้ว่า สารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เป็นสารที่สามารถพบได้ทั้งในธรรมชาติ และเกิดจากการสังเคราะห์ เช่น สารกลุ่มโพลีฟีนอล ฟลาโวนอยด์ สเตียรอยด์ กรดไขมัน คูมาริน สารที่อยู่ในรูปวิตามินซี และวิตามินอี (ประไพพิศ, 2561)

ในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของพืช *C. medicaginea* แต่มีเพียงการศึกษาของพืชสกุลและวงศ์เดียวกัน ได้แก่ งานวิจัยของ Ketprayoon และ Chaicharoenpong (2018) ได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเมทานอลและสารสกัดชั้นน้ำของพืชกินได้จำนวน 20 ชนิด ด้วยวิธี Dopa chrome โดยทดสอบกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดของปอเทือง (*C. juncea*) พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสต่ำ มีค่าร้อยละการยับยั้งเท่ากับ 16.12 ± 1.96 และ 22.45 ± 0.27 ตามลำดับ นอกจากนี้งานวิจัยข้างต้นได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของพืชวงศ์ Fabaceae โดยพบว่าสารสกัดเมทานอลจากเปลือกของฝักสะตอ (*Parkia speciosa*) ดีกว่าสารสกัดชั้นน้ำ โดยมีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเท่ากับ 66.22 ± 1.96 และ 14.69 ± 0.60 ตามลำดับ แต่สารสกัดเมทานอลและสารสกัดชั้นน้ำจากเมล็ดสะตอ มีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสต่ำเท่ากับ 14.08 ± 0.71 และ 18.10 ± 1.56 ตามลำดับ โดยฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสขึ้นอยู่กับชนิดของพืช และส่วนของพืชที่นำมาศึกษา ดังงานวิจัยของ Muddathir และคณะ (2016) ได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเมทานอลจากพืชจำนวน 39 ชนิด โดยมีพืชวงศ์ Fabaceae จำนวน 6 ชนิด

ด้วยวิธี Dopa chrome ทดสอบกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดที่มีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากกว่า 80 ได้แก่ สารสกัดจากฝักและเปลือกของลำต้นพืช *Acacia nilotica* สารสกัดเปลือกของลำต้นพืช *Acacia seyal* var. *seyal* Del. *nilotica* และ สารสกัดจากเปลือกของลำต้นของพืช *Acacia seyal* var. *fistula* โดยมีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเท่ากับ 81.90, 84.50, 83.06 และ 81.80 ตามลำดับ ส่วนสารสกัดที่มีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสต่ำกว่า 80 ได้แก่ สารสกัดจากเนื้อไม้ของพืช *Acacia tortilis* สารสกัดจากใบของพืช *Parkinsonia aculeata* สารสกัดเนื้อไม้ของพืช *Acacia seyal* var. *seyal* Del. *nilotica* สารสกัดเนื้อไม้ของพืช *Acacia seyal* var. *fistula* และ สารสกัดจากเมล็ดของพืช *Abrus precatorius* โดยมีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเท่ากับ 33.65, 12.20, 48.91, 4.40 และ 69.40 ตามลำดับ

2.3.6 ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory)

การอักเสบ (inflammation) เป็นปฏิกิริยาตอบสนองของเซลล์ภายในร่างกายต่อสิ่งแปลกปลอมที่เป็นอันตรายต่อเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่เสียหาย โดยเม็ดเลือดขาวจะเริ่มกระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยอาศัยไลโซโซมปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยเซลล์ที่เสียหาย และเซลล์บริเวณใกล้เคียงทำให้เกิดอาการแดง บวม ปวด และร้อนบริเวณบาดแผล

ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) จัดเป็นสารสื่อกลางที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบชนิดหนึ่ง (inflammatory mediator) ที่ถูกสร้างขึ้นจากเม็ดเลือดขาว เช่น neutrophil และ macrophage โดยไนตริกออกไซด์จะทำให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือด (vasodilation) หลังร่างกายได้รับบาดแผลหรือเนื้อเยื่อเกิดความเสียหาย เพื่อเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านของผนังหลอดเลือดจนทำให้เกิดอาการบวมบริเวณที่มีการอักเสบ ดังนั้นไนตริกออกไซด์จึงเป็นสารสื่อกลางที่สำคัญในการเกิดการอักเสบเพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมออกจากร่างกาย (สันติ และคณะ, ม.ป.ป.) อย่างไรก็ตามหากมีปริมาณไนตริกออกไซด์อยู่ในร่างกายสูงเกินไป อาจก่อให้เกิดโทษต่อร่างกายได้ เช่น เป็นสารก่อมะเร็ง ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ และเกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อด้วยการออกซิเดชัน (เบ็ญจมาศ, 2559) ในการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบสามารถทดสอบได้หลายวิธี เช่น การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ และการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจชนิด Raw 264.7 เป็นต้น สำหรับการศึกษาศักยภาพต้านการอักเสบด้วยวิธียับยั้งไนตริกออกไซด์สามารถใช้สารละลาย sodium nitroprusside (SNP) เป็นสารกระตุ้นให้เกิดการอักเสบ เมื่อสารละลาย SNP ทำปฏิกิริยากับออกซิเจนจะเปลี่ยนสารไนตริกออกไซด์ให้เป็นสารไนไตรท์ ซึ่งเป็นสารที่พบได้เมื่อเกิดการบาดเจ็บหรือการอักเสบในเซลล์และเนื้อเยื่อ โดยสารไนไตรท์นี้สามารถตรวจวัดปริมาณการอักเสบได้ โดยใช้สารละลาย Griess reagent ซึ่งเป็นสารละลายสีใส หากตรวจพบการหลั่งไนตริกออกไซด์หรือเกิดการอักเสบ จะสังเกตเห็นสารละลายเป็นสีชมพู และสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540

นาโนเมตร หากสารตัวอย่างมีฤทธิ์ต้านการอักเสบได้ดี สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีเหลืองหรือสีใส ซึ่งแสดงถึงปริมาณของการหลั่งไนตริกออกไซด์ที่ลดลง (จุฑาภรณ์, 2563)

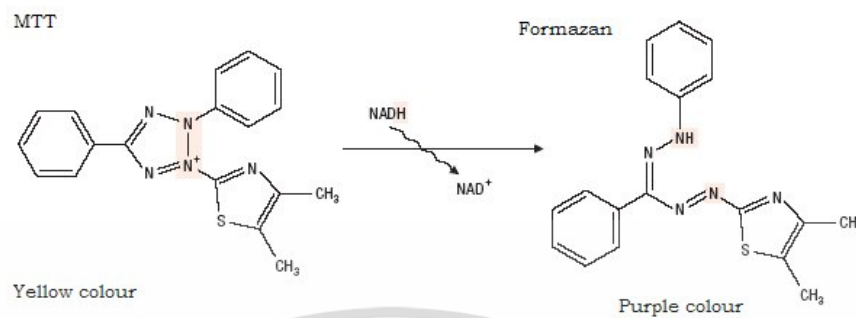
ในปัจจุบันยังไม่มีงานวิจัยที่ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ และฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจของพืช *C. medicaginea* โดยมีงานวิจัยที่ศึกษาในพืชวงศ์ Fabaceae พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ที่แตกต่างกัน ดังงานวิจัยของ Venkatachalam และ Muthukrishnan (2012) ได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ของสารสกัดเอทานอลจากใบนางเหนียว (*Desmodium gangeticum*) โดยใช้สารละลาย SNP เป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ และใช้สารสกัดความเข้มข้น 200-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีค่าร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์อยู่ในช่วง 30.18-67.30 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 815.52 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่งานวิจัยของ Srinivasan และคณะ (2016) ได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์จากสารสกัดน้ำของใบคราม (*Indigofera tinctoria* Linn.) โดยใช้สารละลาย SNP ทดสอบกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 50-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์สูงกว่า โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 540.65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่าร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 23.12 จะเห็นได้ว่าพืชแต่ละชนิดมีฤทธิ์ฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์แตกต่างกัน นอกจากนี้งานวิจัยของ Kumar และคณะ (2021) ที่ทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ของสารสกัดจากทุกส่วนของพืช *C. biflora* รวมกัน ที่สกัดด้วยตัวทำปิวโตรเลียมเอสเทอร์ คลอโรฟอร์ม เอทิลอะซิเตท และเมทานอล โดยใช้ตัวทำละลาย SNP ทดสอบกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 100-800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดเมทานอลสามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้ดีที่สุด โดยมีค่าร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์อยู่ในช่วง $40.58 \pm 0.08 - 65.60 \pm 0.54$ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 260 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่สารสกัดเอทิลอะซิเตท คลอโรฟอร์ม และปิวโตรเลียมเอสเทอร์ มีฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์น้อย โดยมีค่าร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์ ช่วง $18.69 \pm 0.13 - 37.63 \pm 0.26$, $16.58 \pm 0.60 - 32.80 \pm 0.63$ และ $12.35 \pm 1.10 - 25.53 \pm 0.72$ ตามลำดับ และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1160, 1270 และ 1310 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

2.3.7 ความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity)

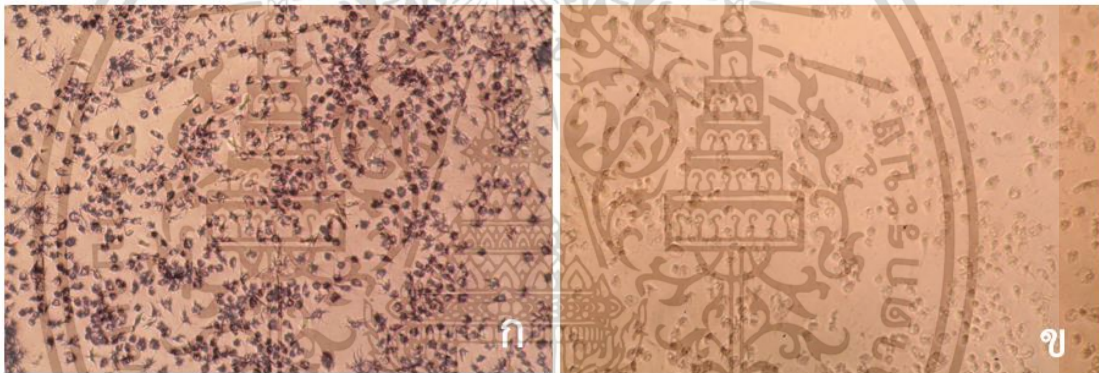
การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยใช้วิธี MTT หรือ 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide เป็นวิธีที่นิยมใช้ตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในหลอดทดลอง โดยทดสอบความอยู่รอดของเซลล์ในระดับไมโตรคอนเดรีย สาร MTT เป็นสีสังเคราะห์ประเภทเกลือเตตราโซเลียม (tetrazolium salt) ที่มีสีเหลือง ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็นผลึกฟอร์มาซานที่มีสีม่วงน้ำเงิน โดยปฏิกิริยา reduction จากเอนไซม์ succinate dehydrogenase ที่พบในเซลล์ที่มีชีวิตรอดเท่านั้น แสดงดังรูปที่ 2.5 และ 2.6 ก ขณะเดียวกันเซลล์ที่ตายจะมีลักษณะใสไม่มีผลึกฟอร์มาซาน แสดงดังรูปที่ 2.6 ข ซึ่งผลึกฟอร์มาซานจำเป็นต้องละลายด้วยตัวทำละลาย เช่น DMSO (สุพัตรา, 2555) เพื่อให้ได้เป็นสารละลายสามารถดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวช่วงคลื่นประมาณ

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

550-600 nm ซึ่งหากสีม่วงที่ปรากฏมีความเข้มมาก หมายความว่ามีความเข้มข้นของเซลล์ที่รอดชีวิตสูงซึ่งจะแปรผันตรงกับปริมาณของ succinate dehydrogenase



รูปที่ 2.5 การเกิดปฏิกิริยาของ MTT ที่ถูกเปลี่ยนเป็นผลึกฟอร์มาซานด้วยเอนไซม์ succinate dehydrogenase ของเซลล์ที่รอดชีวิต (ที่มา: Sukhrmani และคณะ, 2011)



รูปที่ 2.6 ตัวอย่างลักษณะของเซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ชนิด HepG2 โดย ก คือลักษณะเซลล์ที่มีชีวิตรอด ข คือลักษณะเซลล์ที่ตาย เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับที่ กำลังขยาย 100 เท่า หลังหยดสารละลาย MTT และบ่มไว้ 3-4 ชั่วโมง

จากงานวิจัยที่ผ่านมายังไม่พบการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์จากสารสกัดของพืช *C. medicaginea* มีเพียงงานวิจัยของ Fletcher และคณะ (2011) ที่ได้ตรวจวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของพืช *C. medicaginea* ที่มีพิษต่อตับของม้า โดยได้เก็บตัวอย่างพืชจากทุ่งเลี้ยงสัตว์ในรัฐ Queensland ประเทศออสเตรเลีย ซึ่งสันนิษฐานว่าพืชชนิดนี้เป็นสาเหตุที่ทำให้ม้าตายมากกว่า 35 ตัว ด้วยอาการอาหารเป็นพิษ ในปี 2010 จากผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS) และ Nuclear magnetic resonance (NMR) Spectroscopy ทำให้ตรวจพบสารไพโรลิซิดีนแอลคาลอยด์ (pyrrolizidine alkaloids) ชนิดใหม่กลุ่ม otonecine alkaloids ซึ่งเป็นสารพิษตามธรรมชาติที่ส่งผลเสียต่อตับมนุษย์และสัตว์ โดยให้ชื่อว่า

“Cromedine” โดยมีรายงานการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ในพืชสกุลเดียวกัน พบว่ามี

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสามารถในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งได้ดี ดังงานวิจัยของ Le Roux (2011) ได้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี XTT Kit (sodium 3'-[1-[(phenylamino)-carbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzene-sulfonic acid hydrate) โดยทดสอบกับสารสกัดเอทานอลและสารสกัดชั้นน้ำของพืช *C. agatiflora* ที่ความเข้มข้น 3.125-400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบกับเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด U-937 มะเร็งเยื่อบุหลอดอาหารชนิด (SNO) มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 และเซลล์ปกติเยื่อบุไตชนิด Vero ซึ่งพบว่าสารสกัดเอทานอลมีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีกว่าสารสกัดชั้นน้ำ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 73.9 ± 1.06 , 113.2 ± 2.43 , 153.9 ± 0.75 และ 233.1 ± 6.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติเยื่อบุไตชนิด Vero ปานกลาง โดยมีค่า IC_{50} และ 352.4 ± 5.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดชั้นน้ำพบว่าไม่สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติได้ทุกชนิดได้ โดยมีค่า IC_{50} มากกว่า 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Hu และคณะ (2017) ได้นำสารสกัดเอทานอลจากเมล็ดของหิงเม่น (*C. pallida*) มาแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี column chromatography และวิเคราะห์หาสารประกอบฟลาโวนอยด์ และแอลคาลอยด์ ด้วยวิธี NMR สามารถตรวจวิเคราะห์สารได้ทั้งหมด 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม Homoisflavonoids จำนวน 2 ชนิด กลุ่มฟลาโวนอยด์ จำนวน 1 ชนิด และกลุ่มแอลคาลอยด์ จำนวน 3 ชนิด จากนั้นนำสารสำคัญมาศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยพบว่าสารกลุ่ม Homoisflavonoids ชนิดที่ 2 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 เซลล์มะเร็งเยื่อบุลำไส้ชนิด CaCo2 สูง โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.77 ± 0.11 ไมโครโมลาร์ และ 45.63 ± 1.31 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิดได้ดี สอดคล้องกับงานวิจัยของ Rajesh และคณะ (2019) ที่ได้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ ด้วยวิธี MTT โดยทดสอบกับสารสกัดเมทานอลของพืช *C. longipes* ที่ความเข้มข้น 50-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีความสามารถในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7, MDA-MB 468 และ MDA-MB 231 โดยมีร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์อยู่ในช่วง 22.92-86.34, 20.63-79.56 และ 21.63-81.31 ตามลำดับ โดยที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 40.51, 35.19 และ 39.12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูง โดยสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งได้ดีทั้ง 3 ชนิด

2.4 องค์ประกอบทางเคมีของพืช (Bioactive compounds)

สารสำคัญในพืชสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ สารปฐมภูมิ (primary metabolite) ซึ่งเป็นสารเคมีพื้นฐานที่พบในพืชทั่วไป เกิดจากการทำงานของเมทาบอลิซึมของเซลล์ ส่วนสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) เกิดจากการกระบวนการชีวสังเคราะห์ (biosynthesis) ที่พบในพืชแต่ละชนิดไม่เหมือนกัน ซึ่งเป็นสารที่แสดงออกถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอย่างชัดเจน (สมฤทัย, 2560) โดยสารทุติยภูมิที่มีความสำคัญต่อฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านต่าง ๆ ยกตัวอย่างเช่น สารสำคัญที่มีฤทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสำคัญไว้ ดังนี้

สาร lolioliide

ดั่งงานวิจัยของ Saad (2009) รายงานว่าในสารสกัดเอทานอลจากรากของผักกาดภูหิน (*Sonchus oleraceus*) ได้แยกสาร lolioliide มาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus* และ *Neisseria gonorrhoeae* ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี agar plate diffusion พบว่าที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีบริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเท่ากับ 9.5, 10, 10.5 และ 12 มิลลิเมตร ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีบริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเท่ากับ 12, 13, 14 และ 15 มิลลิเมตร ตามลำดับ

สาร Pulegone

งานวิจัยของ Elansary และคณะ (2018) รายงานว่าในน้ำมันหอมระเหยของพืช *Origanum vulgare* ตรวจพบสาร Pulegone ปริมาณ 77.45 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus*, *Dickeya solani*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Mariniluteicoccus flavus*, *P. aeruginosa* และ *S. aureus* มีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.11 ± 0.01 - 0.76 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังพบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Jurkat เซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29 และเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะชนิด T24 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.11 ± 1.0 , 13.41 ± 1.1 , 27.05 ± 2.1 , 12.18 ± 1.4 และ 105.5 ± 2.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

สาร salicylic acid หรือ β -hydroxy acid (BHA)

เป็นสารที่นิยมนำมาเป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง และครีมบำรุงผิวเพื่อใช้รักษาสิว และรักษาโรคเกี่ยวกับผิวหนังได้ เนื่องจากมีคุณสมบัติในการสลายไขมัน และมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Kwon และคณะ, 2023) ดั่งงานวิจัยของ Adamczak และคณะ (2019) ได้นำสารสำคัญที่ได้จากการวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการทางเคมีของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์จำนวน 13 สาร ได้แก่ apigenin, flavone, isoorientin, isovitexin, kaempferol, luteolin, naringin, orientin, quercetin, rutin, vitexin และ vitexin 2'-*o*-rhamnoside และกรดอินทรีย์จำนวน 6 สาร ได้แก่ chlorogenic acid, citric acid, malic acid, quinic acid, rosmarinic acid และ salicylic acid ตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี High-performance liquid chromatography (HPLC) โดยนำมาได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจำนวน 4 ชนิด คือ *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* และ *S. aureus* พบว่า salicylic acid มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทุกชนิดดีกว่าสารสำคัญอื่น โดยมีค่า MIC อยู่ระหว่าง 250-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่สารสำคัญชนิดอื่น มีค่า MIC ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย มากกว่า 500-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาร Medicarpin

งานวิจัยของ Cuellar และคณะ (2020) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดไคคอลลอโรมีเทนของพืชวงศ์ Fabaceae ชนิด *Platymiscium gracile* ตรวจพบสารสำคัญที่น่าสนใจ ได้แก่ Medicarpin พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ คือ *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* และ *Enterobacter faecalis* โดยมีบริเวณไฮโดรฟิลิกในช่วง 7-10 มิลลิเมตร และมีค่า MIC อยู่ระหว่าง 500-4000 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร

สาร Phytosterol

งานวิจัยของ Ayele และคณะ (2022) ตรวจพบสาร stigmasterol ในสารสกัดเมทานอลจากเปลือกของลำต้นของพืช *Albizia gummifera* พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* (ATCC25923), *E. coli* (ATCC25922), *P. aeruginosa* (ATCC27853), *Salmonella typhimurium* (ATCC13311) และ *Shigella flexneri* (ATCC29903) โดยมีบริเวณยับยั้งอยู่ระหว่าง 7-13.2 มิลลิเมตร

สาร 1-Butanol, 3-methyl, formate หรือ Isoamyl alcohol

งานวิจัยของ Irshad และคณะ (2024) รายงานว่าสารสกัดเอทานอลจากใบมะขามแขก (*Cassia angustifolia*) ตรวจพบสารประกอบ 1-Butanol, 3-methyl, formate หรือ Isoamyl alcohol ปริมาณ 12.8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* โดยมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 7.5 และ 9.6 มิลลิเมตร ตามลำดับ และตรวจพบสารกลุ่มฟีนอล ได้แก่ Phenol-2,4-bis(1,1-dimethylethyl) ปริมาณ 1.16 เปอร์เซ็นต์ และสาร Phenol, 3-pentadecyl ปริมาณ 6.6 เปอร์เซ็นต์ ในสารสกัดเอทานอลจากใบพืช *Pistacia vera* ที่พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* โดยมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 10.7 และ 8.4 มิลลิเมตร ตามลำดับ

สารกลุ่ม Phthalate

นอกจากนี้ยังพบว่าสารกลุ่ม Phthalate มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ดังงานวิจัยของ Al-Shehri และคณะ (2019) ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC3 และมะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 กับสารสกัดเมทานอลจากใบของพืช *Aerva javanica* พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์สูง โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 14.51 และ 4.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร เมื่อนำไปตรวจวิเคราะห์สารสำคัญ พบว่ามีปริมาณสาร diethyl phthalate มากที่สุดถึง 86.197 เปอร์เซ็นต์

และสารทุติยภูมิที่มีความสำคัญต่อฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสำคัญไว้ ดังนี้

สาร Benzoic acid

งานวิจัยของ Khan และคณะ (2010) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของอนุพันธ์ของกรดเบนโซอิก (benzoic acid derivatives) ที่มีผลต่อฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยศึกษากับอนุพันธ์ของกรดเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เบนโซอิกจำนวน 10 ชนิด พบว่าสารชนิดที่ 1, 2, 6, 7, 8, 9 และ 10 มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 83.39 ± 2.58 , 14.83 ± 1.01 , 29.72 ± 1.83 , 1.09 ± 0.19 , 3.08 ± 0.73 , 2.09 ± 0.63 และ 11.83 ± 1.01 ไมโครโมลาร์ ซึ่งพบว่าสารชนิดที่ 2, 7, 8, 9 และ 10 มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีกว่าสารมาตรฐานกรดโคจิก (Kojic acid) ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 16.67 ± 0.51 ไมโครโมลาร์ จะเห็นได้ว่าสารเหล่านี้ มีความสัมพันธ์ต่อฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกิดขึ้น

สาร kaempferol

งานวิจัยของ Rho และคณะ (2011) ได้แยกสารสำคัญกลุ่ม kaempferol และ rhamnosides จากใบของปอแก้ว (*Hibiscus cannabinus* L.) ด้วยวิธีฉายรังสี Far-infrared (FIR) irradiation โดยสามารถแยกสารได้จำนวน 4 ชนิด คือสาร kaempferol, α -rhamnoisorobin, afzelin และ kaempferitrin ซึ่งเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ซึ่งพบว่าสาร kaempferol มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 171.4 ± 0.9 มิลลิโมลาร์ และยังสามารถลดการเกิดเม็ดสีเมลานินได้ดีที่สุดเช่นกัน โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 37.66 ± 0.1 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้ในปัจจุบันนิยมนำสาร kaempferol ไปใช้เป็นสารมาตรฐานสำหรับทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสอีกด้วย

สาร pluchidiol

โดยงานวิจัยของ Kallassy (2017) ได้ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพจากใบของพืช *Crataegus azarolus* และตรวจหาสารประกอบทางเคมีด้วยวิธี GC-MS พบว่าสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำมีสาร pluchidiol ในปริมาณมากที่สุดเท่ากับ 33.62 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 60 ± 2.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สาร 13-Docosenamide

งานวิจัยของ Khan และคณะ (2019) ตรวจพบสาร 13-Docosenamide, 9-Octadecenamide และ Cis-11-Eicosenamide ปริมาณ 32.75 เปอร์เซ็นต์ ในสารสกัดเมทานอลจากใบของพืช *Achillea filipendulina* ที่พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และสามารถต้านการเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ดี (Hydrogen Peroxide inhibition) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 62.23 ± 1.25 และ 69.07 ± 2.97 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่ายับยั้งได้ดีกว่าสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 158.31 ± 3.12 และ 149.96 ± 2.87 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

สาร Daidzein

งานวิจัยของ Kuswanto และคณะ (2020) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเอทานอลจากเมล็ดถั่วดำ (*Glycine max* (L.) Merr.) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Daidzein พบว่าสารมาตรฐาน Daidzein มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีกว่า โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 109.34 ± 2.80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดเอทานอลจากเมล็ดถั่วดำ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 116.52 ± 2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และยังพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ใกล้เคียง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กัน โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 72.65 ± 2.81 และ 70.71 ± 1.83 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าสารสกัดเอทานอลจากเมล็ดถั่วดำ อาจมีสารสำคัญที่มีฤทธิ์ยับยั้งได้ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน

2.5 ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcodes)

ปัจจุบันมีการรายงานการศึกษาที่ใช้ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ หรือลักษณะสัณฐานวิทยาที่ต่างแตกต่างกันในการจำแนกชนิดย่อยของพืช *C. medicaginea* โดยศึกษาลักษณะพุ่มต้น ส่วนประกอบของ ใบ ดอก เมล็ด และฝัก ซึ่งสามารถจำแนกเป็นชนิดย่อยได้จำนวน 5 ชนิดย่อย (variety) ดังนี้ *C. medicaginea* var. *medicaginea*, *C. medicaginea* var. *neglecta* (Wight and Arn.) Baker, *C. medicaginea* var. *linearis*, *C. medicaginea* var. *luxurians* (Benth.) Baker และ *C. medicaginea* var. *herniarioides* (Wight and Arn.) Baker แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาเพียงลักษณะสัณฐานวิทยาอาจไม่เพียงพอต่อการจำแนกหรือระบุชนิดย่อยที่ถูกต้อง เนื่องจากพืช *C. medicaginea* บางชนิดย่อยมีความคล้ายคลึงกันมาก จึงทำให้ยากต่อการจำแนก รวมถึงปัจจัยด้านสภาพแวดล้อมในการเจริญเติบโตของพืช อาจส่งผลให้มีลักษณะสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนไป (เชิดศักดิ์ และ มลิวรรณ (2558) ดังนั้นควรมีการศึกษาทั้งสัณฐานวิทยาควบคู่กับด้านอณูพันธุศาสตร์ (molecular genetic) เพื่อสามารถจำแนกหรือระบุชนิดย่อยได้อย่างถูกต้อง

สารพันธุกรรมหรือกรดนิวคลีอิกของสิ่งมีชีวิตประกอบด้วยดีเอ็นเอ (Deoxyribonucleic acid, DNA) และอาร์เอ็นเอ (Ribonucleic acid, RNA) สารพันธุกรรมประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด คือ อะดีนีน (adenine, A) ไทมีน (thymine, T) ไซโทซีน (cytosine, C) และกวานีน (guanine, G) ที่มีการเรียงตัวอย่างสลับซับซ้อนและแตกต่างกัน (สิรินารถ และคณะ, 2561) ส่งผลให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมของลำดับดีเอ็นเอที่มีเอกลักษณ์เฉพาะตัว และมีความจำเพาะต่อสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นข้อมูลที่กำหนดลักษณะของสิ่งมีชีวิต รวมถึงยังสามารถบ่งบอกความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการตั้งแต่นักวิทยาศาสตร์จึงได้นำแนวคิดเกี่ยวกับดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาประยุกต์ใช้ในการระบุและจำแนกสิ่งมีชีวิตด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด (จันทร์แรม, ม.ป.ป.)

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเป็นการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตโดยใช้ลำดับดีเอ็นเอ หรือบริเวณยีนที่มีความจำเพาะเจาะจง และเป็นมาตรฐานมาจำแนกสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด โดยที่ผ่านมามีการใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตจำนวนมาก ซึ่งใช้ตำแหน่งยีนที่จำเพาะเจาะจง ในปัจจุบันการระบุชนิดของพืชนิยมใช้บริเวณยีนในคลอโรพลาสต์ เช่น *maturaseK* (*matK*), *trnH-psbA* intergenic spacer, *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit* (*rbcL*), *ndhF*, *atpB*, *psbA-trnH*, *trnL-Leucine*, *trnL-trnF* และไรโบโซมนิวเคลียร์ในส่วนของยีน *ITS* (internal transcribed spacer) คือ *ITS1* และ *ITS2* (Creedy และคณะ, 2020)

ปัจจุบันมีการรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืช *C. medicaginea* ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้บริเวณยีนดังนี้ ตำแหน่ง *ITS* รายงานลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 2 ชนิดย่อย คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

C. medicaginea var. *luxurians* (Subramaniam และคณะ, 2015a) และ *C. medicaginea* var. *neglecta* (Rockinger และคณะ, 2017) โดยมีขนาดของดีเอ็นเอเท่ากับ 652 และ 402 คู่เบส ตามลำดับ และตำแหน่ง *trnL-trnF* รายงานลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 2 ชนิดย่อย คือ *C. medicaginea* var. *luxurians* และ *C. medicaginea* var. *hernarioides* มีขนาดของดีเอ็นเอเท่ากับ 1035-1047 และ 467 คู่เบส ตามลำดับ (Subramaniam และคณะ, 2015a)

งานวิจัยของ Wang และคณะ (2022) ได้จำแนกพืชวงศ์หญ้า (Gramineae) ประกอบด้วยสกุล *Agropyron*, *Bromus*, *Elymus*, *Elytrigia*, *Festuca*, *Leymus*, และ *Lolium* ด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดโดยใช้บริเวณยีนตำแหน่ง *rbcl*, *matK*, *trnL-F* และ *ITS* เมื่อพิจารณาการจำแนกในระดับพันธุ์ปลูก (cultivated variety: cultivar) และชนิดย่อย (variety) พบว่าบริเวณยีนทั้ง 4 ตำแหน่ง ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของหญ้าไรย์ (*Lolium perenne*) พันธุ์ปลูก Medalist Gold, Pickwick, Taya และ Ascend และหญ้าสาเลียงอนชนิดย่อย *Agropyron cristatum* var. *cristatum* และ *Agropyron cristatum* var. *pectiniforme* ได้ แต่มีเพียงบริเวณยีนตำแหน่ง *trnL-F* ที่พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกันเพียง 5 ตำแหน่ง ที่มีขนาดของดีเอ็นเอเท่ากับ 463 และ 458 คู่เบส ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าบริเวณยีนบางตำแหน่งอาจจะยังไม่เหมาะสมต่อการจำแนกความแตกต่างของพันธุ์ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Litanatudom และคณะ (2017) ได้ศึกษาการจำแนกลำไย (*Dimocarpus longan*) จำนวน 26 พันธุ์ปลูก โดยใช้ตำแหน่ง *ITS2*, *matK*, *rbcl*, *trnH-psbA*, *trnL-l* และ *trnL-trnF* พบว่าบริเวณยีนตำแหน่ง *ITS2*, *matK*, *rbcl*, *trnL-l* และ *trnL-trnF* ไม่สามารถจำแนกชนิดย่อยและพันธุ์ปลูกของลำไยได้ ซึ่งมีเพียงบริเวณยีนตำแหน่ง *trnH-psbA* ที่พบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของลำไยชนิดย่อย *D. longan* spp. *longan* var. *obtusus* ได้จำนวน 4 พันธุ์ปลูก ได้แก่ ลำไยเถา ลำไยแก้วยี่ ลำไยบ้านโฮ้ง 60 และลำไยพื้นเมือง โดยพบว่าสามารถจำแนกความแตกต่างของลำไยเถาได้ดีที่สุด มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่างจากพันธุ์ปลูกอื่นถึงจำนวน 70 ตำแหน่ง แต่ลำไยแก้วยี่ ลำไยบ้านโฮ้ง 60 และลำไยพื้นเมือง มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่างจากพันธุ์ปลูกอื่นเพียง 7 ตำแหน่ง ซึ่งบริเวณยีนตำแหน่ง *trnH-psbA* ยังไม่สามารถแยกลำไยแก้วยี่ ลำไยบ้านโฮ้ง 60 และลำไยพื้นเมืองออกจากกันได้ แต่สามารถจำแนกความแตกต่างของลำไยเถาออกจากชนิดย่อยได้ ดังนั้นลำไยเถาอาจจะสามารถแยกออกมาเป็นชนิดย่อยใหม่ได้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างผักแว่นต้น (*C. medicaginea*) ตำบลองค์พระ อำเภอด่านช้าง จังหวัดสุพรรณบุรี ประเทศไทย โดยตรวจพบพืชจำนวน 2 ลักษณะ ที่มีลักษณะและขนาดของพุ่มต้นต่างกัน คือผักแว่นต้นพุ่มเตี้ยและพุ่มสูง โดยนำมาเพาะขุนิตย่อยด้วยวิธีดิเอ็นเอบาร์โค้ด สำหรับการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ ใช้พืชที่มีลักษณะพุ่มสูงโดยแยกออกเป็น 3 ส่วน ประกอบด้วย ราก กิ่ง และใบ

3.2 แบคทีเรีย

- 3.2.1 *Bacillus cereus* DMST 5040
- 3.2.2 *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- 3.2.3 *Escherichia coli* ATCC 25922
- 3.2.4 *Micrococcus luteus* TISTR 1918
- 3.2.5 *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 2370
- 3.2.6 *Propionibacterium acnes* DMST 14916
- 3.2.7 *Staphylococcus aureus* TISTR 1466
- 3.2.8 *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

3.3 เซลล์ไลน์

เซลล์ไลน์ที่ใช้ในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มีทั้งหมด 6 ชนิด ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากรศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ดังนี้

- 3.3.1 เซลล์เม็ดเลือดขาวแมคโครฟาจ (Murine macrophage cell line) ชนิด Raw 264.7
- 3.3.2 เซลล์เคอราติโนไซต์ (Human keratinocyte cell line) ชนิด HaCaT
- 3.3.3 เซลล์มะเร็งตับ (Human hepatoma cell line) ชนิด HepG2
- 3.3.4 เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก (Human colorectal adenocarcinoma cell line) ชนิด HT-29
- 3.3.5 เซลล์มะเร็งเต้านม (Human breast cancer cell line) ชนิด MCF-7
- 3.3.6 เซลล์เยื่อไตลิง (African green monkey kidney cell line) ชนิด Vero

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 3.4.1 กระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1 (Whatman No. 1 filter paper)
- 3.4.2 กระดาษทิชชู (Tissue paper)
- 3.4.3 กรวยกรองบุชเนอร์ (Buchner funnel)
- 3.4.4 กรวยแยกสาร (Separating funnel)
- 3.4.5 โกร่ง (Mortar) และที่บด (Pestle)
- 3.4.6 กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (Inverted microscope)
- 3.4.7 กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบเชิงประกอบ (Compound light microscope)
- 3.4.8 ระบายน้ำแข็ง (Cooling box)
- 3.4.9 ขวดแก้วดูแรน (Duran bottle)
- 3.4.10 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
- 3.4.11 คิวเวตท์ควอตซ์ (Cuvette quartz)
- 3.4.12 เครื่องปั่น (Blender)
- 3.4.13 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
- 3.4.14 เครื่องปั่นเหวี่ยงสารขนาดเล็ก (Spin down)
- 3.4.15 เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)
- 3.4.16 เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (Microplate reader)
- 3.4.17 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Thermal cycler)
- 3.4.18 เครื่องให้ความร้อนหลอดทดลอง (Heat box)
- 3.4.19 เครื่องถ่ายภาพเจล (Gel documentation system)
- 3.4.20 เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator)
- 3.4.21 เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส (Gel electrophoresis)
- 3.4.22 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)
- 3.4.23 เครื่องอบแห้งแบบสุญญากาศ (Vacuum drier)
- 3.4.24 จานเพาะเชื้อ (Petri dishes) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร
- 3.4.25 ตู้บ่ม (Incubator)
- 3.4.26 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)
- 3.4.27 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
- 3.4.28 กล้องเพาะเชื้อแบคทีเรียแบบไร้ออกซิเจน (Anaerobic jar)
- 3.4.29 ปีกเกอร์ (Beaker)
- 3.4.30 แผ่นดิสก์ (Paper disk) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร
- 3.4.31 ไมโครปิเปต (Micropipette)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.4.32 ไมโครเพลท 96 หลุม (96-well plates)
- 3.4.33 หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ (Micro centrifuge tube) ขนาด 1.5 และ 2 มิลลิลิตร
- 3.4.34 หลอดเซนตริฟิวก์ (Centrifuge tube) ขนาด 50 มิลลิลิตร
- 3.4.35 ท่วงเชี่ยเชื้อ (Loop)
- 3.4.36 สำลีก้าน (Cotton swab)
- 3.4.37 แผ่น TLC แบบบาง (Thin layer chromatography)
- 3.4.38 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
- 3.4.39 อุปกรณ์บรรจุคอลัมน์ (Column chromatography)
- 3.4.40 ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Hemocytometer)
- 3.4.41 กล่องยูวีใช้สำหรับส่องแผ่น TLC (UV box)

3.5 สารเคมี

3.5.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดสาร

- 3.5.1.1 เมทานอล (Methanol)
- 3.5.1.2 เฮกเซน (Hexane)
- 3.5.1.3 ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane)
- 3.5.1.4 เอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate)
- 3.5.1.5 บิวทานอล (Butanol)
- 3.5.1.6 น้ำ (Water)
- 3.5.1.7 โซเดียมซัลเฟต แอนไฮดรัส (Sodium sulphate anhydrous : Na_2SO_4)
- 3.5.1.8 *p*-anisaldehyde reagent

3.5.2 สารเคมีที่ใช้กำจัดคลอโรฟิลล์

- 3.5.2.1 เมทานอล (Methanol)
- 3.5.2.2 น้ำมันปาล์ม (Palm oil)

3.5.3 สารเคมีที่ใช้ตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้น

- 3.5.3.1 โคลชิซิน (Colchicine)
- 3.5.3.2 เฟอริกคลอไรด์ (Ferric chloride : FeCl_3)
- 3.5.3.3 ผงซาโปนิน (Saponin powder)
- 3.5.3.4 โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride : NaCl)
- 3.5.3.5 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide : NaOH)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.5.3.6 กรดแทนนิก (Tannic acid)
- 3.5.3.7 น้ำกลั่น (Distilled water)
- 3.5.3.8 วาร์ฟาริน (Warfarin)
- 3.5.3.9 เอทานอล (Ethanol)
- 3.5.3.10 แอสซีน (Aescin)
- 3.5.3.11 Dragendorff's reagent
- 3.5.3.12 Gelatin salt solution
- 3.5.3.13 Gelatin solution
- 3.5.3.14 Mayer's reagent
- 3.5.3.15 Phosphate Buffered saline (PBS)
- 3.5.3.16 Wagner's reagent

3.5.4 สารเคมีที่ใช้ตรวจหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

- 3.5.4.1 น้ำกลั่น (Distilled water)
- 3.5.4.2 Folin-ciocalteu reagent
- 3.5.4.3 กรดแกลลิก (Gallic acid)
- 3.5.4.4 เมทานอล (Methanol)
- 3.5.4.5 โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate : Na_2CO_3)

3.5.5 สารเคมีที่ใช้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

- 3.5.5.1 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
- 3.5.5.2 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox)
- 3.5.5.3 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)
- 3.5.5.4 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ)
- 3.5.5.5 เมทานอล (Methanol)
- 3.5.5.6 โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (Potassium persulfate : $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$)
- 3.5.5.7 กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid : HCl)
- 3.5.5.8 เฟอร์ริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรท (ferric chloride hexahydrate : $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
- 3.5.5.9 อะซิเตทบัฟเฟอร์ (Acetate buffer)
- 3.5.5.10 กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid)
- 3.5.5.11 น้ำกลั่น (Distillated water)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.6 สารเคมีที่ใช้ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์

- 3.5.6.1 กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid)
- 3.5.6.2 น้ำกลั่น (Distillated water)
- 3.5.6.3 Griess reagent
- 3.5.6.4 Phosphate Buffered saline (PBS)
- 3.5.6.5 โซเดียมไนโตรพรัสไซด์ (Sodium nitroprusside: SNP)

3.5.7 สารเคมีที่ใช้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

- 3.5.7.1 Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- 3.5.7.2 เจนตามัยซิน (Gentamicin)
- 3.5.7.3 เมทานอล (Methanol)
- 3.5.7.4 Mueller Hinton agar (MHA)
- 3.5.7.5 Mueller Hinton broth (MHB)
- 3.5.7.6 น้ำเกลือ (Normal saline solution 0.85%)
- 3.5.7.7 Nutrient agar (NA)
- 3.5.7.8 Tryptic soy agar (TSA)
- 3.5.7.9 Tryptic soy broth (TSB)

3.5.8 สารเคมีที่ใช้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

- 3.5.8.1 กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid)
- 3.5.8.2 น้ำกลั่น (Distillated water)
- 3.5.8.3 L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-dopa)
- 3.5.8.4 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer pH 6.8)
- 3.5.8.5 เอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase enzyme)

3.5.9 สารเคมีที่ใช้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์

- 3.5.9.1 3-(4,5-dimethyl-2-thiazoly)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)
- 3.5.9.2 Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- 3.5.9.3 ยาต้านมะเร็งไมโทมายซิน ซี (Mitomycin C)
- 3.5.9.4 Fetal bovine serum (FBS)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.10 สารที่ใช้สกัดดีเอ็นเอ

- 3.5.10.1 2X CTAB buffer
- 3.5.10.2 CTAB buffer ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์
- 3.5.10.3 Chloroform
- 3.5.10.4 เอทานอล (Ethanol) ความเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์
- 3.5.10.5 เอทานอล (Ethanol) ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์
- 3.5.10.6 ไนโตรเจนเหลว (Liquid nitrogen)
- 3.5.10.7 β -mercaptonethanol
- 3.5.10.8 Isoamyl alcohol
- 3.5.10.9 Isopropanol
- 3.5.10.10 Proteinase K
- 3.5.10.11 RNase A
- 3.5.10.12 Tris-EDTA buffer (TE buffer)

3.5.11 สารเคมีที่ใช้ในวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

- 3.5.11.1 DNA marker ขนาด 1 Kb
- 3.5.11.2 DNA marker ขนาด 100 bp
- 3.5.11.3 6x Loading dye
- 3.5.11.4 1X TBE buffer
- 3.5.11.5 ฐุ่นอะกาโรส (Agarose gel)
- 3.5.11.6 เอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide)

3.5.12 สารเคมีที่ใช้ทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์

- 3.5.12.1 น้ำกลั่น (Distilled water)
- 3.5.12.2 เอทานอล (Ethanol) ความเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์
- 3.5.12.3 Buffer DB
- 3.5.12.4 Wash buffer
- 3.5.12.5 Elution buffer

3.5.13 สารเคมีที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน

- 3.5.13.1 น้ำกลั่น (Distilled water)
- 3.5.13.2 Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs)
- 3.5.13.3 ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ประกอบการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.13.4 Magnesium chloride ($MgCl_2$)

3.5.13.5 *Taq* DNA polymerase

3.5.13.6 10X Standard *Taq* reaction buffer (PCR buffer)

3.6 วิธีการทดลอง

3.6.1 การสกัดสารและการแยกสารให้บริสุทธิ์

3.6.1.1 การสกัดสารเมทานอลด้วยวิธีการหมัก (maceration)

ทำการสกัดสารจากผักแว่นต้นด้วยวิธีการหมัก ซึ่งดัดแปลงวิธีการจากงานวิจัยของ Chantarasaka และคณะ (2022) นำตัวอย่างส่วนราก กิ่ง และใบ มาอบที่ตู้อบลมร้อนด้วยอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาบดให้เป็นชิ้นขนาดเล็ก และหมักด้วยตัวทำละลายเมทานอลในอัตราส่วน 1 : 10 (w/v) เป็นเวลา 7 วัน แบบเขย่าตลอดเวลา โดยใช้ความเร็วรอบที่ 110 รอบต่อนาที จากนั้นนำมากรองด้วยกรวยกรองบุชเนอร์ ผ่านกระดาษวอทแมนเบอร์ 1 และนำสารสกัดที่ได้ไประเหยด้วยเครื่องอบแห้งสุญญากาศแบบหมุน รวมไปถึงทำการระเหยสารสกัดจนแห้งสนิทด้วยเครื่องอบแห้งแบบสุญญากาศ ภายใต้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารสกัดทั้งหมดมาคำนวณปริมาณที่ได้เป็นร้อยละ (% Yield) โดยใช้สมการที่ 1

สมการที่ 1

ร้อยละผลที่ได้ (%) = $\left(\frac{\text{น้ำหนักของสารสกัด}}{\text{น้ำหนักของพืชก่อนการหมัก}} \right) \times 100$

3.6.1.2 การกำจัดคลอโรฟิลล์โดยใช้น้ำมันปาล์ม

เนื่องจากสารสกัดกิ่งและใบของผักแว่นต้นมีสีเขียวเข้ม จึงนำมากำจัดคลอโรฟิลล์โดยใช้น้ำมันปาล์มด้วยวิธี liquid-liquid extraction มีหลักการคือ สารประกอบที่มีขั้วเดียวกันจะถูกดึงมาอยู่ในสารละลายเดียวกัน โดยคลอโรฟิลล์ที่เป็นสารที่ไม่มีขั้วหรือมีขั้วต่ำจะถูกดึงมารวมกับน้ำมันปาล์มที่เป็นสารไม่มีขั้ว ซึ่งดัดแปลงวิธีการจากงานวิจัยของ Phaisan และคณะ (2020) โดยเตรียมสารสกัดกิ่งและใบของผักแว่นต้น ละลายในตัวทำละลายเมทานอลในอัตราส่วน 1 : 20 (w/v) คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำส่วนผสมที่ได้มาผสมกับน้ำมันปาล์มในอัตราส่วน 1 : 3 (v/v) และแบ่งใส่หลอดเซนติฟิกขนาด 50 มิลลิลิตร ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที จากนั้นดูดส่วนบนลงในหลอดเซนติฟิกขนาด 50 มิลลิลิตร และปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง หลังจากนั้นดูดส่วนบนนำไประเหยจนแห้งสนิทด้วยเครื่องอบแห้งแบบสุญญากาศ ภายใต้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และนำสารสกัดทั้งหมดมาคำนวณปริมาณผลที่ได้เป็นร้อยละ (% Yield) โดยใช้สมการที่ 1 ตามข้อ 3.6.1.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

ทำการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ในสารสกัดกิ่งและใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ และกำจัดคลอโรฟิลล์ โดยอ้างอิงวิธีการจากงานวิจัยของ Olatunde และคณะ (2018) เตรียมสารสกัดละลายในตัวทำละลายเมทานอลให้มีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 645 และ 663 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ จากนั้นคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และคลอโรฟิลล์รวม โดยใช้สมการที่ 2

สมการที่ 2

$$\text{Chlorophyll a (mg/ml)} = 12.7 (A_{663}) - 2.69 (A_{645})$$

$$\text{Chlorophyll b (mg/ml)} = 22.9 (A_{645}) - 4.68 (A_{663})$$

$$\text{Total chlorophyll (mg/ml)} = 20.2 (A_{645}) + 8.02 (A_{663})$$

3.6.1.4 การแยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction

ซึ่งสารสกัดหยาบเมทานอลจากรากและใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ของผักแว่น ตัน นำมาละลายด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นนำมาผสมให้เข้ากันกับตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วต่างกัน แล้วนำมาแยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction มีหลักการคือ สารประกอบที่มีขั้วเดียวกันจะถูกดึงมาอยู่ในตัวทำละลายเดียวกัน โดยจะแยกสารด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำไปยังขั้วสูง ได้แก่ ตัวทำละลายเฮกเซน (H) ไดคลอโรมีเทน (D) เอทิลอะซิเตท (E) บิวทานอล (B) และน้ำ (W) ตามลำดับ แล้วเทลงในกรวยแยกสาร ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่ากรวยในแนวนอน และตั้งกรวยแยกสารไว้ในห้องเหล็กจนกว่าสารละลายจะแยกเป็นสองชั้นอย่างชัดเจน จากนั้นนำสารละลายชั้นล่างไปกำจัดน้ำที่ปนอยู่ออกด้วยวิธีการใช้เกลืออิ่มตัว และกำจัดน้ำออกจากสารละลายอีกครั้งด้วยเกลืออินทรีย์โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส ยกเว้นตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนที่ต้องเลือกส่วนล่างไปกำจัดน้ำออก เนื่องจากตัวทำละลายมีความหนาแน่นมากกว่าน้ำกลั่น จากนั้นนำสารละลายที่ได้จากการแยกในตัวทำละลายแต่ละชนิดไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน ทำการระเหยสารสกัดจนแห้งสนิทด้วยเครื่องอบแห้งแบบสุญญากาศ ภายใต้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และนำสารสกัดทั้งหมดมาคำนวณปริมาณที่ได้เป็นร้อยละ (% Yield) โดยใช้สมการที่ 1 ตามข้อ 3.6.1.1

3.6.1.5 การแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี column chromatography

การแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี column chromatography มีหลักการแยกสารโดยอาศัยการเคลื่อนที่ ความมีขั้วของสาร และการดูดซับของเฟสนิ่ง (stationary phase) กล่าวคือสารผสมต่าง ๆ ที่พบในสารสกัดจะถูกละลายอยู่ในตัวทำละลายที่ใช้เป็นระบบสาร เมื่อนำสารละลายดังกล่าวเทลงในคอลัมน์ที่มีซิลิกาเจลที่เป็นเฟสนิ่ง และถูกชะล้างด้วยตัวทำละลายที่เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระบบสารซึ่งเป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ทำให้สารแต่ละชนิดเคลื่อนที่ลงสู่คอลัมน์ด้วยความเร็วที่แตกต่างกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายของสารในระบบตัวทำละลาย ความเข้มข้นของสาร และความสามารถในการดูดซับของเฟสนิ่ง

สำหรับการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี column chromatography ดัดแปลงวิธีการจากจุฬารัตน์ (2563) โดยมีขั้นตอนดังนี้ ต้องตรวจหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม เพื่อใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ โดยคัดเลือกสารสกัดแยกส่วนที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีมาละลายด้วยระบบตัวทำละลายที่แตกต่างกัน โดยหยดสารสกัดลงบนแผ่น TLC แบบบาง (thin layer chromatography) ห่างจากขอบ 1 เซนติเมตร หลังจากนั้นวางลงบนภาชนะที่บรรจุระบบตัวทำละลาย แล้วปล่อยให้ตัวทำละลายนำพาสารเคลื่อนที่ขึ้นไปตามแนวแผ่น TLC จนถึงเส้นที่ขีดไว้ตรงปลายแผ่นประมาณ 0.5 เซนติเมตร จากนั้นนำไปสเปรย์ด้วย *p*-anisaldehyde reagent จะสังเกตเห็นการแยกสารเกิดขึ้น และนำไปส่องด้วยแสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร ภายใต้กล่องยูวี (UV box) ซึ่งระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม ควรเป็นระบบตัวทำละลายที่สามารถแยกสารออกจากกันอย่างชัดเจน รวมถึงแยกกลุ่มสารได้หลายจุดโดยสังเกตสีที่ปรากฏบนแผ่น TLC จากนั้นจึงนำระบบตัวทำละลายดังกล่าวไปใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ในการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี column chromatography ต่อไป

เมื่อทราบถึงระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับแยกสารแล้ว จึงนำระบบตัวทำละลายดังกล่าวมาผสมกับผงซิลิกาเจลให้มีลักษณะเหลว จากนั้นเทลงคอลัมน์แก้วอย่างระมัดระวัง พร้อมกับไขตัวทำละลายออกเป็นระยะ ๆ และเคาะคอลัมน์เบา ๆ เพื่อให้การจับตัวของซิลิกาเจล หรือเฟสนิ่งแน่นขึ้น และคอยเติมตัวทำละลายลงไปเรื่อย ๆ พร้อมกับไขตัวทำละลายออกทำเช่นนี้จนกว่าผิวหน้าของซิลิกาเจลเรียบเนียน จากนั้นเติมสารสกัดที่ละลายด้วยระบบตัวทำละลายลงในคอลัมน์ที่เตรียมไว้ โดยหยดเป็นวงรอบบริเวณปากคอลัมน์ในปริมาณที่เล็กน้อย ๆ เปิดก๊อกเพื่อให้สารสกัดอยู่ในระดับเดียวกับผิวหน้าซิลิกาเจล และเติมตัวทำละลายในคอลัมน์เพื่อชะล้างสารสกัด และป้องกันไม่ให้เจลแห้ง ทำการเติมตัวทำละลายลงไปอย่างสม่ำเสมอ ทำเช่นนี้ 3-4 ครั้ง จนสังเกตว่าสีของตัวทำละลายเปลี่ยนเป็นสีใส เมื่อสังเกตเห็นสารภายในคอลัมน์เคลื่อนที่ และมีการแยกส่วนเป็นแถบสีอย่างชัดเจน ทำการเก็บตัวทำละลายแต่ละส่วน (fraction) ลงในหลอดทดลอง ก่อนนำไปจำแนกกลุ่มของสารบนแผ่น TLC อีกครั้ง เพื่อตรวจสอบความแตกต่างของสาร และเก็บรวบรวมสารที่เหมือนกันไว้เป็น fractions เดียวกัน ซึ่งจะเรียกว่าสารสกัดส่วนย่อย

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากผักแว่นต้น ได้แก่ สารสกัดเมทานอล สารสกัดแยกส่วนที่แยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction และสารสกัดส่วนย่อยที่แยกสารสกัดให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี column chromatography นำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพด้านต่าง ๆ ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.2 การตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้น

คัดเลือกสารสกัดเมทานอลจากราก กิ่ง และใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ของผักแว่น ต้น มาตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้น โดยใช้วิธีการตรวจสอบซึ่งอ้างอิงวิธีการจากงานวิจัยของ จุฑารัตน์ (2559)

3.6.2.1 การตรวจสอบแอลคาลอยด์

ชั่งสารสกัด 0.3 กรัม ละลายในกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 3 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1 จากนั้นแบ่งสารละลายเป็น 3 ชุดการทดสอบ โดยแบ่งสารละลายลงในหลอดทดลอง หลอดละ 1 มิลลิลิตร และทดสอบกับน้ำยาทดสอบ 3 ชนิด ประกอบด้วย Dragendorff's, Mayer's และ Wagner's (การเตรียมสารตั้งภาคผนวก ก) ซึ่งหยดน้ำยาทดสอบลงในแต่ละหลอดทดลอง 2-3 หยด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และสังเกตการเกิดตะกอนของสารละลาย ซึ่งเทียบกับสารมาตรฐานโคลชิซิน

3.6.2.2 การตรวจสอบแทนนิน

ชั่งสารสกัด 0.3 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 30 มิลลิลิตร จากนั้น ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยการแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 5 นาที และหยดสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 3-4 หยด และกรองด้วยกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1 จากนั้นแบ่งสารละลายเป็น 3 ชุดการทดสอบ เพื่อทำการทดลองกับน้ำยาทดสอบ 3 ชนิด ประกอบด้วย Gelatin solution, Gelatin salt solution เพื่อตรวจหาแทนนิน และสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อตรวจหาสารประกอบฟีนอลิก (การเตรียมสารตั้งภาคผนวก ก) จากนั้นสังเกตการเกิดตะกอนสีขาวเมื่อหยดสารละลาย Gelatin solution และ Gelatin salt solution และจะเป็นตะกอนสีน้ำเงินหรือสีเขียวอมน้ำเงิน เมื่อหยดสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ ซึ่งเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแทนนิก โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยแปลผลการทดสอบดังนี้ หากไม่เกิดตะกอนเมื่อหยดน้ำยาทดสอบทั้ง 3 ชนิด แสดงว่าไม่พบแทนนิน หากเกิดตะกอนเมื่อหยดน้ำยาทดสอบทั้ง 3 ชนิด แสดงว่าพบแทนนิน หากไม่เกิดตะกอนเมื่อหยดน้ำยาทดสอบ Gelatin solution และ Gelatin salt solution แต่เกิดตะกอนสีน้ำเงินหรือสีเขียวอมน้ำเงิน เมื่อหยดสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ แสดงว่ามีสารประกอบฟีนอลิก

3.6.2.3 การตรวจสอบคูมาริน

ชั่งสารสกัด 0.3 กรัม ละลายในเอทานอลที่มีความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และกรองด้วยกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1 แบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 6 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และสังเกตการเปลี่ยนสีหลังจากการหยดน้ำยาทดสอบ หากมีคูมารินสีของสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้มหรือสีเหลืองเข้ม โดยเทียบกับสารมาตรฐานวารฟาริน

3.6.2.4 การตรวจสอบซาโปนิน

3.6.2.4.1 การคงตัวของฟองซาโปนิน (froth test)

ซึ่งสารสกัด 0.3 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 15 มิลลิลิตร จากนั้นให้ความร้อน 45 องศาเซลเซียส โดยแช่อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 5 นาที และกรองด้วยกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1 นำมาแบ่งใส่หลอดทดลองจำนวน 3 หลอด หลอดละ 2 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าให้เกิดฟอง เป็นเวลา 10 นาที และสังเกตความคงตัวของฟองที่เกิดขึ้นหลังตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที หากฟองคงตัวแสดงว่าพบสารซาโปนินที่เป็นกลุ่มที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ ซึ่งทำการทดลองดังกล่าวเช่นเดียวกันในสารมาตรฐานผงซาโปนิน

3.6.2.4.2 การแตกตัวของเม็ดเลือดแดง (hemolysis test)

การทดสอบการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงในการทดลองนี้ ใช้เลือดของมนุษย์ โดยการเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดงปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง และเติม PBS (pH 7.2) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อล้างเซลล์เม็ดเลือดแดง ทำการปั่นเหวี่ยง และล้างด้วย PBS จำนวน 2 ครั้ง ก่อนนำเซลล์เม็ดเลือดแดงมาเจือจางด้วย PBS ให้มีความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งขั้นตอนการทดสอบทำการซึ่งสารสกัด 5 มิลลิกรัม ละลายใน PBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารสกัด ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมกับเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ทำการเจือจางให้มีความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที สังเกตการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง หากผลที่เกิดขึ้นไม่แสดงการแยกหรือการตกตะกอนของเซลล์เม็ดเลือดออกจากตัวอย่างของสารสกัด แสดงว่าตรวจพบการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยทำการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแอสซิน

3.6.3 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-ciocalteu colorimetric ตัดแปลงวิธีการจากงานวิจัยของ Chantarasaka และคณะ (2022) โดยเตรียมสารสกัดความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารสกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตร และสาร Folin-ciocalteu ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate เขย่าเบาๆ แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7.5

เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ลงไปผสมแล้วบ่มในที่มืดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ก่อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้เขียนได้เห็นใบแจ้งประโยชน์ทางวิชาการ
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง ในการทดลองนี้ใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน แล้วนำผลที่ได้มาวิเคราะห์กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก โดยปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจะแสดงผลในหน่วย mg of gallic acid equivalent (GAE)/g extract

3.6.4 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.6.4.1 วิธี DPPH

ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ดัดแปลงวิธีการจากงานวิจัยของ Chantarasaka และคณะ (2022) เตรียมสารสกัดความเข้มข้น 125-2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายในตัวทำละลายเมทานอล เติมสารสกัดปริมาตร 40 ไมโครลิตร และสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 160 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate บ่มทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้ตัวทำละลายเมทานอลผสมกับสารละลาย DPPH เป็นชุดควบคุม และสารละลายโทร็อกซ์เป็นสารมาตรฐาน จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงมาวิเคราะห์หาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH จากสมการที่ 3 รวมไปถึงวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ร้อยละ 50 (50 % Inhibitory concentration : IC₅₀) โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 5.0 และคำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดเทียบกับมาตรฐานโทร็อกซ์ โดยแสดงผลในหน่วย mg trolox equivalent (TE)/g extract

สมการที่ 3

% การต้านอนุมูลอิสระ DPPH = $(A \text{ control} - (A \text{ sample} - A \text{ blank sample})) / A \text{ control} \times 100$

โดย A control คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

A sample คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหรือสารมาตรฐานหลังการเติมสารอนุมูลอิสระ DPPH

A blank sample คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่ไม่เติมสารอนุมูลอิสระ DPPH

3.6.4.2 วิธี ABTS

ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ดัดแปลงวิธีการจากงานวิจัยของ Chantarasaka และคณะ (2022) โดยผสมสารละลาย ABTS ที่มีความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ กับสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟตที่มีความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วน 1 : 0.5 (v/v) เพื่อให้ได้สารละลายอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ที่มีสีน้ำเงินเข้ม โดยทำการบ่มในที่มืดเป็นเวลาอย่างน้อย 12-16 ชั่วโมง ซึ่งก่อนนำมาใช้งานจะทำการเจือจางสารละลายอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ด้วยตัวทำละลายเมทานอล และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ที่ 0.70 (±0.02) เตรียมสารสกัดความเข้มข้น 125-2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายในตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใดเห็นประโยชน์หรือต้องการนำเอกสารนี้ไปใช้ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำละลายเมทานอล เติมสารสกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตร และสารละลายอนุมูลอิสระ ABTS⁺ ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate จากนั้นบ่มในที่มืด เป็นเวลา 6 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยใช้ตัวทำละลายเมทานอลผสมกับสารละลายอนุมูลอิสระ ABTS⁺ เป็นชุดควบคุม และใช้โทรล็อกเป็นสารมาตรฐาน นำค่าการดูดกลืนแสงมาวิเคราะห์หาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS จากสมการที่ 4 รวมไปถึงวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS ร้อยละ 50 (50 % Inhibitory concentration : IC₅₀) โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 5.0 และคำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดเทียบกับสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ โดยแสดงผลในหน่วย mg trolox equivalent (TE)/g extract

สมการที่ 4

% การต้านอนุมูลอิสระ ABTS = $(A_{\text{control}} - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank sample}})) / A_{\text{control}} \times 100$
โดย A control คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

A sample คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหรือสารมาตรฐานหลังการเติมสารอนุมูลอิสระ ABTS

A blank sample คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่ไม่เติมสารอนุมูลอิสระ ABTS

3.6.4.3 วิธี FRAP

ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ดัดแปลงวิธีการจากงานวิจัยของ Chantarasaka และคณะ (2022) ซึ่งการเตรียมสารละลาย FRAP ประกอบด้วยสารละลาย TPTZ ที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ละลายในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ : สารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต (FeCl₃·6H₂O) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ : อะซิเตทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ (pH 3.6) ในอัตราส่วน 10 : 1 : 1 เตรียมสารสกัดความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นเติมสารสกัดและสารละลาย FRAP ลงใน 96-well plate บ่มในที่มืดเป็นเวลา 6 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่นผสมกับสารละลายอนุมูลอิสระ FRAP เป็นชุดควบคุม และใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐาน และคำนวณค่า FRAP value ในหน่วย mg ascorbic acid equivalents (AAE)/g extract

3.6.5 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

3.6.5.1 การเตรียมสารสกัดสำหรับทดสอบ

เตรียมแผ่นดิสก์โดยเจาะกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1 ให้เป็นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำมาอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จนแห้งสนิท

ไม่ทราบว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เตรียมสารสกัดโดยการละลายด้วยตัวทำละลายเมทานอลผสมกับ DMSO ในอัตราส่วน 1 : 1 (v/v) และเตรียมยาปฏิชีวนะเจือเจือตามยี่สิบความเข้มข้น 2 และ 5 ไมโครกรัมต่อดิสก์ เป็นชุดควบคุมเชิงบวก ตัวทำละลายเมทานอลและ DMSO เป็นชุดควบคุมเชิงลบ โดยหยดลงบนแผ่นดิสก์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้จนแห้งในสภาวะปลอดเชื้อก่อนนำไปทดลอง

3.6.5.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียสำหรับทดสอบ

เตรียมเชื้อแบคทีเรียจำนวน 8 สายพันธุ์ ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. cereus* DMST 5040, *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* TISTR 1918, *P. acnes* DMST 14916, *S. aureus* TISTR 1466, *S. epidermidis* ATCC 12228 และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* TISTR 2370 โดยนำแบคทีเรียทั้ง 7 สายพันธุ์ ยกเว้น *P. acnes* มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar (TSA) ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในกล่องเพาะเชื้อแบคทีเรียแบบไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว เพื่อใช้ในการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียสำหรับการทดสอบ โดยเชื้อโคโลนีเดี่ยวจากจานเพาะเชื้ออาหารแข็ง NA จำนวน 4-5 โคโลนี ลงในอาหารเหลว Mueller-Hinton broth (MHB) สำหรับเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* เชื้อโคโลนีเดี่ยวจากจานเพาะเชื้ออาหารแข็ง TSA ลงในอาหารเหลว Tryptic soy broth (TSB) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* จะบ่มในกล่องเพาะเชื้อแบคทีเรียแบบไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.6.5.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีการ paper disk diffusion ดัดแปลงจากวิธีการของ CLSI (2020) นำแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่เตรียมไว้ มาเจือจางด้วยน้ำเกลือที่มีความเข้มข้น 0.85% นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสง ในช่วง 0.08-0.13 จากนั้นนำมา swab ลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง MHA และ TSA สำหรับเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* ด้วยสำลีก้าน แล้ววางแผ่นดิสก์ที่มีสารสกัดที่มีความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อดิสก์ ลงบนหน้าอาหารแข็งที่มีเชื้อแบคทีเรีย จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ สำหรับเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* จะบ่มในกล่องเพาะเชื้อแบคทีเรียแบบไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำมาวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น และบันทึกผลการทดลองในหน่วยมิลลิเมตร

3.6.6 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากผักแว่นต้นด้วยวิธี Dopa chrome ดัดแปลงวิธีการจากงานวิจัยของ Nithitanakool และคณะ (2009) ทำโดยเติมสารสกัด ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 200 ไมโครลิตร ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.8) และเอนไซม์ไทโรซิเนสความเข้มข้น 48 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (การเตรียมสารดังภาคผนวก ก) ลงหลุม 96-well plate บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย L-dopa ที่มีความเข้มข้น 1.7 มิลลิโมลาร์ บ่มในที่มืด เป็นเวลา 20 นาที ซึ่งปริมาตรของสารละลายที่ใช้สำหรับทดสอบแสดงในตารางที่ 3.1 ก่อนนำไปวัดค่า การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์หาร้อยละการยับยั้ง เอนไซม์ไทโรซิเนส (% Tyrosinase inhibition) ดังสมการที่ 5 โดยใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสาร มาตรฐาน

สมการที่ 5

$$\% \text{ การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส} = ((A-B) - (C-D)) / (A-B) \times 100$$

โดย A คือ control เป็นค่าการดูดกลืนแสงของเอนไซม์และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

B คือ blank control เป็นค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

C คือ sample เป็นค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหรือสารมาตรฐาน

D คือ blank sample เป็นค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่ไม่เติมเอนไซม์ไทโรซิเนส

ตารางที่ 3.1 ปริมาตรของสารละลายที่ใช้ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

| ชุดควบคุม/ สารสกัด | ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (μl) | เอนไซม์ไทโรซิเนส (μl) | สารสกัด (μl) | L-dopa (μl) |
|-----------------------|-------------------------|--------------------------|-----------------|----------------|
| Control | 160 | 20 | - | 20 |
| Blank control | 180 | - | - | 20 |
| Sample | 120 | 20 | 40 | 20 |
| Blank sample | 140 | - | 40 | 20 |

หมายเหตุ : เครื่องหมาย - คือ ไม่ได้เติมสารละลายลงในหลุม 96-well plate

3.6.7 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์

การทดลองนี้ดัดแปลงวิธีการจากงานวิจัยของจุฑาภรณ์ (2563) เตรียมสารสกัด ความเข้มข้น 200-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายใน PBS (pH 7.4) และเตรียมสารละลาย Sodium nitroprusside (SNP) ที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (การเตรียมสารดังภาคผนวก ก) โดย เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เติมสารละลาย SNP ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลุม 96-well plate ตามด้วยสารสกัดปริมาตร 50 ไมโครลิตร และบ่มเป็นเวลา 30 นาที เพื่อสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ จากนั้นเติมสารละลาย Griess reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดอีก 10 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร หากสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์จะสังเกตเห็นการเปลี่ยนสีของสารละลายจากสีชมพูเป็นสีเหลือง ในการทดลองนี้ใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐาน และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาวิเคราะห์หาร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์ดังสมการที่ 6 และวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้ ร้อยละ 50 (50 % Inhibitory concentration : IC₅₀)

สมการที่ 6

% การยับยั้งไนตริกออกไซด์ = $(A \text{ control} - (A \text{ sample} - A \text{ blank sample}) / A \text{ control}) \times 100$

โดย A control คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

A sample คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหรือสารมาตรฐานที่ทดสอบ

A blank sample คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่ไม่เติมสารละลาย SNP

3.6.8 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์

วิธีการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT อ้างอิงจากงานวิจัยของสุพัตรา และคณะ (2555) โดยนำเซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร RPMI-1640 ที่ประกอบด้วย Fetal Bovine Serum (FBS) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ มาเจือจางให้มีความเข้มข้นที่ต้องการคือ 1.0×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยเติมเซลล์ลงหลุม 96-well plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเก่าออกจนหมด แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ลงในหลุมที่เป็นชุดควบคุม (มีเพียงเซลล์เท่านั้น) และหลุม Blank (มีเพียงอาหารเลี้ยงเซลล์เท่านั้น) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเติมสารสกัดแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่เป็นชุดทดสอบสารสกัด และเติมสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมชุดควบคุมเชิงลบ ส่วนชุดควบคุมเชิงบวกใช้ยาต้านมะเร็งไมโทมายซิน ซี ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงเติมสารละลาย MTT ปริมาตร 25 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง จากนั้นละลายผลึกฟออร์มาซานด้วยสารผสม DMSO ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ : SDS ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 9 : 1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปวิเคราะห์หาร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ (% cytotoxicity) โดยใช้คำนวณร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ในการทดสอบความเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พิษต่อเซลล์ ดังสมการที่ 7 หรือวิเคราะห์หาร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ (% cell viability) โดยใช้คำนวณร้อยละการรอดของเซลล์ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ ดังสมการที่ 8 และคำนวณหาความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถฆ่าเซลล์ได้ร้อยละ 50 (Cytotoxicity concentration : CC₅₀) โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 5.0

สมการที่ 7 และ 8

% ความเป็นพิษต่อเซลล์ = $((A \text{ control} - A \text{ sample}) / A \text{ control}) \times 100$

% การรอดชีวิตของเซลล์ = $(A \text{ sample} / A \text{ control}) \times 100$

โดย A control คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

A sample คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหรือชุดทดสอบ

3.6.9 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC-MS

เป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการตรวจหาองค์ประกอบของสารสำคัญ และวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของสารอินทรีย์ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ ในการศึกษาการทำการสังเคราะห์ โดยละลายในตัวทำละลายเมทานอล เพื่อวิเคราะห์และระบุชนิดของสารประกอบ ชื่อ มวล โมเลกุล และโครงสร้างของสารประกอบอินทรีย์ ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC-MS ด้วยเครื่องมือ GC: agilent technologies รุ่น 6890n และ MS: agilent technologies รุ่น 5973 inert

3.6.10 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากผลการทดลองด้วยวิธี one-way analysis of variance (ANOVA) โดยใช้โปรแกรม SPSS. 26 (SPSS Inc., USA) และตรวจสอบความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี Duncan's multiple range test ($p < 0.05$)

3.6.11 การระบุชนิดย่อยของผักแว่นต้นด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด

3.6.11.1 การศึกษาสัณฐานวิทยา

นำพืชที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน แต่มีความแตกต่างของพุ่มต้น โดยแบ่งออกเป็น 2 ลักษณะ ซึ่งอ้างอิงการแบ่งกลุ่มของพุ่มต้นจากงานวิจัยของ Esler (1988) ประกอบด้วยผักแว่นต้นพุ่มเตี้ย รหัส C01 และผักแว่นต้นพุ่มสูง รหัส C02 ที่เก็บจากตำบลองค์พระ อำเภอด่านช้าง จังหวัดสุพรรณบุรี นำมาเปรียบเทียบความแตกต่างของลักษณะสัณฐานวิทยา ได้แก่

ขนาดพุ่มต้น ใบ ช่อฝัก เมล็ด และส่วนประกอบของดอก โดยสังเกตลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ เนื่องจากฝักแวนต์มีขนาดเล็ก

3.6.11.2 การสกัดดีเอ็นเอ

นำใบสดของพืชทั้ง 2 ลักษณะ จำนวน 3-4 ใบ มาตัดเป็นชิ้นเล็ก โดยเลือกใบที่สมบูรณ์ไม่เหี่ยวและช้ำ นำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) ดัดแปลงจาก Doyle และ Doyle (1987) โดยนำใบที่ถูกตัดใส่โกร่ง แล้วบดด้วยไนโตรเจนเหลวจนละเอียดเป็นผง เติม 2X CTAB ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แล้วบดจนเป็นเนื้อเดียวกันเพื่อทำลายผนังเซลล์ของพืช และทำให้เซลล์แตก จากนั้นใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 2 มิลลิลิตร เติมสาร β -mercaptonethanol ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ Proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ก่อนนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยกลับหลอดไปมาทุก ๆ 15 นาที เมื่อครบเวลานำมาบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที และเติมสารละลาย Chloroform : Isoamyl alcohol (24 : 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร โดยกลับหลอดไปมาเบา ๆ ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนใสลงหลอดทดลองใหม่ขนาด 2 มิลลิลิตร เติม RNase A ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติม CTAB ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ กลับหลอดไปมาเบา ๆ จากนั้นเติมสารละลาย Chloroform : Isoamyl alcohol (24 : 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสอีกครั้ง ดูดส่วนใสลงหลอดทดลองใหม่ และเติม Isopropanol ที่มีความเข้มข้นที่ถูกเก็บไว้ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส อัตราส่วน 1:1 ของส่วนใสที่ดูดได้ กลับหลอดไปมาแล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง เติมเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเทสารละลายที่เป็นเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ทิ้ง แล้วจึงเติม Absolute ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนบนทิ้ง และคว่ำหลอดให้แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาตร 30 ไมโครลิตร จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบปริมาณและคุณภาพด้วยวิธีอเล็กโทรโฟรีซิส และวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วเก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.11.3 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ

การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอสามารถทำได้ 2 วิธี ได้แก่ วิธีการใช้อิเล็กโตรโฟรีซิส ซึ่งเป็นการตรวจสอบปริมาณของดีเอ็นเอ และวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์เพื่อหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ และการปนเปื้อนของตัวอย่างดีเอ็นเอ

3.6.11.3.1 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส

เป็นการแยกดีเอ็นเอโดยอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุล และปริมาณของประจุของตัวอย่างแต่ละชนิด ซึ่งวิธีนี้สามารถบอกคุณภาพของดีเอ็นเอได้ว่ามีขนาดเท่าไร เพื่อบ่งชี้ปริมาณของดีเอ็นเอได้ รวมถึงสามารถบอกการปนเปื้อนจากโปรตีนในดีเอ็นเอของตัวอย่างได้ โดยจะสังเกตเห็นปื้นอยู่บริเวณด้านล่างของวุ้นอะกาโรส ในการตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส สามารถทำได้โดยผสมตัวอย่างดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร กับ 3X Loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร แล้วเติมลงหลุมในแผ่นวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยเปรียบเทียบขนาดของตัวอย่างดีเอ็นเอกับ DNA marker (ดีเอ็นเอมาตรฐาน) ขนาด 1 Kb เติมลงในแผ่นวุ้นอะกาโรสปริมาตร 2 ไมโครลิตร โดยใช้กระแสไฟฟ้าของเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำแผ่นวุ้นอะกาโรสแช่ด้วยสารละลายเอทีเดียมโบรไมด์ เป็นเวลา 10 นาที และนำไปแช่ด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 10 นาที เพื่อล้างสารละลายเอทีเดียมโบรไมด์ออก ก่อนจะนำแผ่นวุ้นอะกาโรสไปส่องภายใต้แสง UV ด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล (Gel documentation system) จะสังเกตเห็นลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น

3.6.11.3.2 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสง

เป็นวิธีการตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอโดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร โดยดีเอ็นเอสามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ส่วนโปรตีนสามารถดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ซึ่งค่าอัตราส่วนของ 260/280 ควรอยู่ในช่วง 1.8-2.0 เป็นช่วงที่บ่งชี้ถึงความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอว่ามีคุณภาพดี หากพบว่าค่าต่ำกว่า 1.8 แสดงว่าดีเอ็นเอปนเปื้อนด้วยโปรตีน การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสง ทำโดยเตรียมดีเอ็นเอ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 495 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ และนำมาคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอดังสมการที่ 9

สมการที่ 9

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = $A_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{ค่าการเจือจาง}$

3.6.11.4 การทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์

การทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยใช้ GF-AmbiClean Kit (Gel & PCR) โดยนำดีเอ็นเอมาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้มีปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติม buffer DB ในอัตราส่วน 1 : 1 (v/v) ของสารละลายดีเอ็นเอ จากนั้นเติมสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และดูดสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ใส่ในคอลัมน์ที่มีหลอดรองรับ ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000 x g เป็นเวลา 1 นาที ที่มีส่วนใสด้านล่าง แล้วชะล้างคอลัมน์ด้วย wash buffer ปริมาตร 650 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000 x g เป็นเวลา 1 นาที ที่มีส่วนใสและกำจัดเอทานอล โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000 x g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติมสารละลาย elution buffer ปริมาตร 40 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที แล้วเก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปศึกษาในขั้นต่อไป

3.6.11.5 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

(Polymerase chain reaction : PCR)

การศึกษาการใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการระบุชนิดย่อยของผักแว่นต้น ได้คัดเลือกบริเวณยีนที่เป็นยีนอนุรักษ์ในพืชทั่วไป และบริเวณยีนที่อ้างอิงจากฐานข้อมูล GenBank ที่ปรากฏลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืช *C. medicaginea* และดัดแปลงวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากงานวิจัยของ Subramaniam และคณะ (2015a) ทำโดยนำดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดและทำให้บริสุทธิ์ นำมาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณยีน 3 ตำแหน่ง ได้แก่ *rbcl*, *tmL-trnF* และ *ITS* แสดงในตารางที่ 3.2 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนผสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แสดงในตารางที่ 3.3 และสภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส แสดงในตารางที่ 3.4 จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product) ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตร-โฟรีซิสในแผ่นวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยเปรียบเทียบขนาดของตัวอย่างดีเอ็นเอกับ DNA marker ขนาด 100 kb จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ส่งวิเคราะห์เพื่อตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ตารางที่ 3.2 คู่มือไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนตำแหน่ง *rbcl*, *trnL-trnF* และ *ITS*

| บริเวณยีน | ไพรเมอร์ | ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3') | อ้างอิง/ตัดแปลง |
|------------------|-------------------|---------------------------|---------------------|
| <i>rbcl</i> | <i>rbcl</i> -N | ATGTCACCACAAACAGAAACT | Singtonat และ |
| | <i>rbcl</i> -840R | TTGTGCGGGCAATAATGAGCC | Osathanunkul (2015) |
| <i>trnL-trnF</i> | C | CGAAATCGGTAGACGCTACG | Taberlet และคณะ |
| | F | ATTTGAACTGGTGACACGAG | (1991) |
| <i>ITS</i> | <i>ITS</i> 1 | TCCGTAGGTGAACCTGCGG | White และคณะ (1990) |
| | <i>ITS</i> 2 | TATGCTTAAACTCAGCGGG | |

ตารางที่ 3.3 สารเคมีที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนตำแหน่ง *rbcl*, *trnL-trnF* และ *ITS* ซึ่งตัดแปลงจากงานวิจัยของ Subramaniam และคณะ (2015a)

| สารเคมี | ความเข้มข้นเริ่มต้น | ปริมาตร (ไมโครลิตร) | ความเข้มข้นสุดท้าย |
|-------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| PCR buffer | 10X | 2.5 μ l | 1X |
| dNTPs mix | 1.25 mM | 4 μ l | 0.2 mM |
| Taq polymerase | 5000 U/ml | 0.2 μ l | 1 U |
| MgCl ₂ | 25 mM | 0.2 μ l | 25 mM |
| Primer Forward | 20 pmol | 1 μ l | 0.8 pmol |
| Primer Reverse | 20 pmol | 1 μ l | 0.8 pmol |
| DNA template | | 2 μ l | 50 ng/ μ l |
| Water | | 14.1 μ l | - |
| ปริมาตรรวม | | 25 μ l | |

ตารางที่ 3.4 สภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของบริเวณยีนตำแหน่ง *rbcl*, *trnL-trnF* และ *ITS* ซึ่งตัดแปลงจากงานวิจัยของ Subramaniam และคณะ (2015a)

| สภาวะ | อุณหภูมิ (°C) | เวลา (นาที) | จำนวนรอบ |
|----------------------|---------------|-------------|----------|
| Initial denaturation | 94 | 4 | 1 |
| Denaturation | 94 | 1 | |
| Annealing | 50-67 | 1 | 40 |
| Extension | 72 | 1 | |
| Final extension | 72 | 5 | 1 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.11.6 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างพืชที่วิเคราะห์ด้วยวิธี BTSeq™ (Barcode-Tagged Sequencing) จากบริษัท U2Bio ประเทศเกาหลีใต้ มาวิเคราะห์และเปรียบเทียบ ชนิดย่อยของพืชด้วยโปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) และโปรแกรม Bio edit โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การสกัดสารด้วยเมทานอล และการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ

4.1.1 ผลการสกัดสารด้วยเมทานอล

จากการนำตัวอย่างของผักแว่นต้นจำนวน 3 ส่วน คือ ราก กิ่ง และใบ มาอบแห้ง และนำมาสกัดด้วยวิธีการหมักโดยใช้ตัวทำละลายเมทานอล จากนั้นนำมาระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน พบว่าสารสกัดรากมีลักษณะเป็นผงสีเหลืองเข้ม มีน้ำหนักเท่ากับ 14.28 กรัม คิดเป็นร้อยละค่าผลได้เท่ากับ 5.95 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดกิ่งมีลักษณะหนืดสีเขียวเข้ม มีน้ำหนักเท่ากับ 9.72 กรัม คิดเป็นร้อยละค่าผลได้เท่ากับ 4.05 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดใบมีลักษณะหนืดสีเขียวเข้ม น้ำหนักเท่ากับ 64.00 กรัม คิดเป็นร้อยละค่าผลได้เท่ากับ 17.78 เปอร์เซ็นต์ โดยมีข้อมูลน้ำหนัก ร้อยละค่าผลที่ได้ ลักษณะ และรหัสสีของสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้น แสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ข้อมูลน้ำหนัก ร้อยละค่าผลได้ ลักษณะ และรหัสสีของสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้น

| สารสกัด | น้ำหนัก (g) | ผลได้ (%) | ลักษณะ | รหัสสี |
|---------|-------------|-----------|--------|---------|
| ราก | 14.28 | 5.95 | ผง | RHS6A |
| กิ่ง | 9.72 | 4.05 | หนืด | RHS152B |
| ใบ | 64.00 | 17.78 | หนืด | RHS137A |

4.1.2 ผลการตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดเมทานอล

ตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้นจำนวน 3 สารสกัด คือ ราก กิ่ง และใบ ได้แก่ สารแอลคาลอยด์ แทนนิน คูมาริน และซาโปนิน พบว่าสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้นทั้ง 3 สารสกัด ตรวจสอบสารแอลคาลอยด์ปานกลาง หลังหยดสารทดสอบ Dragendorff's, Mayer's และ Wagner's reagent ซึ่งปรากฏตะกอนปานกลาง แต่สารมาตรฐานโคลชิซินปรากฏตะกอนจำนวนมากทั้ง 3 สารสกัด ตรวจสอบสารคูมารินปริมาณมาก เมื่อหยดสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 6 โมลาร์ แล้วเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มเช่นเดียวกับสารมาตรฐานวารฟาริน เมื่อทดสอบด้วยสารละลาย Gelatin solution และ Gelatin salt solution ปรากฏตะกอนเล็กน้อยในสารสกัดราก แสดงว่ามีสารแทนนินปริมาณน้อย และเมื่อหยดสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดรากปรากฏตะกอนสีเขียวปริมาณน้อย แสดงว่าพบสารประกอบฟีนอลิกปริมาณน้อย ส่วนสารสกัดใบตรวจสอบพบตะกอนสีเขียวอมดำจำนวนมาก

เช่นเดียวกับสารมาตรฐานกรดแทนนิกที่ปรากฏตะกอนจำนวนมาก แสดงว่าพบสารประกอบฟีนอลิก

ไม่ต่ำกว่าเกณฑ์ใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณมาก เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานกรดแทนนิก การตรวจสอบสารซาโปนินด้วยวิธีการแตกตัวของเม็ดเลือดแดง พบว่าทั้ง 3 สารสกัดตรวจพบสารซาโปนิน เนื่องจากเกิดการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงอย่างชัดเจนเช่นเดียวกับสารมาตรฐานแอสซิน แต่เมื่อทดสอบด้วยวิธีการคงตัวของฟองกลับไม่พบสารซาโปนิน เนื่องจากเกิดฟองเล็กน้อย และไม่คงตัวเมื่อเวลาผ่านไป แต่เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานผงซาโปนินยังคงปรากฏฟองจำนวนมากและคงตัวเมื่อเวลาผ่านไป ซึ่งการเกิดฟองซาโปนินที่คงตัวเกิดจากสารซาโปนินที่มีกลุ่มน้ำตาลจะจับกับไตรเทอร์พีน หรือสเตียรอยด์ของสารสกัดจึงทำให้เกิดฟองที่มีความเสถียร เป็นไปได้ว่าในสารสกัดของผักแว่นต้นอาจเป็นสารซาโปนินชนิดที่เป็นสารอินทรีย์อะไกลโคโคน (aglycone) ที่เป็นสารซาโปนินกลุ่มไกลโคไซด์ (glycoside) ที่ไม่มีน้ำตาลจึงทำให้เกิดฟองเล็กน้อยและไม่คงตัว (Hostettmann และ Marston, 1995)

จากผลการทดลองตรวจพบสารแอลคาลอยด์ คูมาริน และซาโปนินในสารสกัดทั้ง 3 สารสกัด ตรวจพบสารแทนนินเฉพาะในสารสกัดราก เมื่อทดสอบด้วยสารละลาย Gelatin solution และ Gelatin salt solution และตรวจพบสารประกอบฟีนอลิกที่ทดสอบด้วยสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์เฉพาะในสารสกัดรากและใบ โดยเปรียบเทียบปริมาณของสารฟลักซ์เคมีเบื้องต้นกับสารมาตรฐาน ดังรายละเอียดในตารางที่ 4.2 ซึ่งส่วนของพืชที่นำมาใช้ในการทดสอบ และตัวทำละลายที่ใช้สกัดสาร มีผลทำให้ตรวจพบสารฟลักซ์เคมีที่แตกต่างกัน ดังงานวิจัยของ Devendra และคณะ (2012) ที่ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และสารฟลักซ์เคมีเบื้องต้นจากใบของพืช *C. medicaginea* พบว่าสารสกัดคลอโรฟอร์มและเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ตรวจพบสารแอลคาลอยด์และฟลาโวนอยด์ สารสกัดคลอโรฟอร์มตรวจพบสารประกอบฟีนอลิก แต่ไม่พบสารซาโปนินและแทนนิน เช่นเดียวกับงานวิจัยของ เพชรรุ่ง และวนิดา (2564) ที่เปรียบเทียบสารฟลักซ์เคมีเบื้องต้นของสารสกัดเมทานอลจากใบและกิ่งรวมกันของพืช *C. medicaginea* ที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์และกำจัดคลอโรฟิลล์ด้วยน้ำมันปาล์ม พบว่าให้ผลการทดลองไม่แตกต่างกัน โดยตรวจพบสารแอลคาลอยด์ คูมาริน และสารประกอบฟีนอลิก แต่ไม่พบสารซาโปนินและแทนนิน ซึ่งงานวิจัยข้างต้นแสดงให้เห็นว่าปริมาณของคลอโรฟิลล์อาจไม่มีผลต่อสารฟลักซ์เคมีของพืช *C. medicaginea*

จากการตรวจพบสารฟลักซ์เคมีกลุ่มต่าง ๆ มีแนวโน้มว่าสารฟลักซ์เคมีที่ตรวจพบ อาจมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารประกอบฟีนอลิกมีความเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Koss-Mikotajczyk และคณะ, 2019) และสารแทนนินถูกจัดเป็นสารโพลีฟีนอลที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ (Serrano และคณะ, 2009) สารซาโปนินสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและมีความเป็นพิษต่อเซลล์ (Biswas และ Dwivedi, 2019) ดังนั้นมีแนวโน้มว่าสารสกัดรากและใบอาจมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี

ตารางที่ 4.2 ผลการตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้นของสารมาตรฐาน และสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้น

| สารพิษเคมี | วิธีการทดสอบ | สารมาตรฐาน | สารสกัดเมทานอล | | |
|------------|-----------------------|------------------|----------------|------|-----|
| | | | ราก | กิ่ง | ใบ |
| แอลคาลอยด์ | Dragendorff's | โคลชิซิน +++ | ++ | ++ | ++ |
| | Mayer's | | ++ | ++ | ++ |
| | Wagner's | | ++ | ++ | ++ |
| แทนนิน | Gelatin solution | กรดแทนนิก +++ | + | - | - |
| | Gelatin salt solution | | + | - | - |
| | 1% FeCl ₃ | | + | - | +++ |
| คูมาริน | 6M NaOH | วาร์ฟาริน +++ | +++ | +++ | +++ |
| | | +++ | +++ | +++ | +++ |
| ซาโปนิน | Froth test | ผงซาโปนิน +++ | - | - | - |
| | Hemolysis | แอลซิน +++ | +++ | +++ | +++ |
| | | +++ | +++ | +++ | +++ |

หมายเหตุ เครื่องหมาย - คือ ไม่พบ เครื่องหมาย + คือ พบน้อย เครื่องหมาย ++ คือ พบปานกลาง และเครื่องหมาย +++ คือ พบมาก

4.1.3 ผลการกำจัดคลอโรฟิลล์ของสารสกัดเมทานอล

จากการสกัดสารด้วยเมทานอลจากกิ่งและใบของผักแว่นต้น พบว่าทั้ง 2 สารสกัดมีสีเขียวเข้ม ซึ่งอาจจะรบกวนการวิเคราะห์ผลการทดลองได้ โดยเฉพาะการวิเคราะห์ผลด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ดังนั้นจึงนำมากำจัดคลอโรฟิลล์ด้วยน้ำมันปาล์ม และนำมาระเหยด้วยเครื่องอบแห้งแบบสุญญากาศ พบว่าสารสกัดกิ่งที่กำจัดคลอโรฟิลล์ มีลักษณะเกาะกันเป็นก้อน สีน้ำตาลอมเหลือง มีน้ำหนักเท่ากับ 0.67 กรัม คิดเป็นร้อยละค่าผลได้เท่ากับ 0.33 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ มีลักษณะเกาะกันเป็นก้อนเช่นกัน มีสีเขียวอ่อนกว่าสารสกัดใบที่ยังไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ โดยมีน้ำหนักเท่ากับ 2.21 กรัม และคิดเป็นร้อยละค่าผลได้เท่ากับ 0.44 เปอร์เซ็นต์ โดยมีข้อมูลน้ำหนัก ร้อยละค่าผลที่ได้ ลักษณะ และรหัสสีของสารสกัดเมทานอลจากกิ่งและใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ แสดงดังตารางที่ 4.3

เมื่อนำสารสกัดกิ่งและใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์มาวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และคลอโรฟิลล์รวมเปรียบเทียบกับสารสกัดกิ่งและใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ พบว่าสารสกัดที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์มีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และคลอโรฟิลล์รวมอยู่ระหว่าง


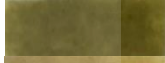
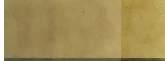
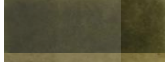

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0.35±0.02-0.78±0.03, 0.15±0.01-0.46±0.03 และ 0.50±0.03-1.24±0.06 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ โดยสารสกัดใบมีปริมาณคลอโรฟิลล์มากกว่าสารสกัดกิ่ง และเมื่อกำจัดคลอโรฟิลล์ พบว่ามีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และคลอโรฟิลล์รวมลดลงอยู่ในช่วง 0.03±0.01-0.08±0.00, 0.06±0.00-0.10±0.00 และ 0.09±0.01-0.18±0.00 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ซึ่งสารสกัดใบมีปริมาณคลอโรฟิลล์ที่ลดลงมากกว่าสารสกัดกิ่ง ดังรายละเอียดในตารางที่ 4.4 และเมื่อวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดคลอโรฟิลล์ของน้ำมันปาล์ม พบว่าสามารถกำจัดคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และคลอโรฟิลล์รวมจากสารสกัดกิ่งได้ 91.43, 60.00 และ 82.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสามารถกำจัดคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และคลอโรฟิลล์รวมจากสารสกัดใบได้ 89.74, 78.26 และ 85.48 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Phaisan และคณะ (2020) ที่ใช้น้ำมันปาล์มในการกำจัดคลอโรฟิลล์ของสารสกัดเอทานอลจากใบสบเสื่อ พบว่าสามารถกำจัดคลอโรฟิลล์รวมได้ 85.35±0.44 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีประสิทธิภาพในการกำจัดคลอโรฟิลล์ได้ดี

ตารางที่ 4.3 ข้อมูลน้ำหนัก ร้อยละค่าผลได้ ลักษณะ และรหัสสีของสารสกัดเมทานอลจากกิ่งและใบ ที่กำจัดคลอโรฟิลล์

| สารสกัด | น้ำหนัก (g) | ผลได้ (%) | ลักษณะ | รหัสสี |
|------------------------|-------------|-----------|-----------------|---------|
| กิ่งที่กำจัดคลอโรฟิลล์ | 0.67 | 0.33 | เกาะกันเป็นก้อน | RHS153C |
| ใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ | 2.21 | 0.44 | เกาะกันเป็นก้อน | RHS152D |

ตารางที่ 4.4 การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ของสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้น

| สารสกัด เมทานอล | คลอโรฟิลล์ เอ (mg/g) | คลอโรฟิลล์ บี (mg/g) | คลอโรฟิลล์รวม (mg/g) | สีของ สารสกัด |
|---------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|---|
| ราก | ND | ND | ND |  |
| กิ่งที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ | 0.35 ^b ±0.02 | 0.15 ^b ±0.01 | 0.50 ^b ±0.03 |  |
| กิ่งที่กำจัดคลอโรฟิลล์ | 0.03 ^d ±0.01 | 0.06 ^d ±0.00 | 0.09 ^d ±0.01 |  |
| ใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ | 0.78 ^a ±0.03 | 0.46 ^a ±0.03 | 1.24 ^a ±0.06 |  |
| ใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ | 0.08 ^c ±0.00 | 0.10 ^c ±0.00 | 0.18 ^c ±0.00 |  |

หมายเหตุ ND คือ not determined และตัวอักษร a-d ในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan's multiple range test ($p < 0.05$)

4.1.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเมทานอล

จากการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้นที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์และกำจัดคลอโรฟิลล์จำนวน 5 สารสกัด คือ ราก กิ่งที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ กิ่งที่กำจัดคลอโรฟิลล์ ใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ และใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ พบว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้นที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์มีค่าเฉลี่ยสูงกว่าสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้นที่กำจัดคลอโรฟิลล์ทั้ง 4 สารสกัด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Phaisan และคณะ (2020) ที่พบว่าการกำจัดคลอโรฟิลล์ด้วยน้ำมันปาล์มสามารถลดปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้นได้

คลอโรฟิลล์ ใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ และใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ มาวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-ciocalteu colorimetric โดยเปรียบเทียบกับสมการของกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (รูปภาคผนวกที่ ข-1) คือสมการ $Y = 0.0176X$ และรายงานผลในหน่วย mg GAE/g extract พบว่า สารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้นมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดอยู่ในช่วง $17.52 \pm 0.75 - 48.33 \pm 0.51$ mg GAE/g extract โดยสารสกัดใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดเท่ากับ 48.33 ± 0.51 mg GAE/g extract สารสกัดใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดปานกลาง และจากการกำจัดคลอโรฟิลล์จึงทำให้มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดลดลงเหลือ 22.78 ± 0.35 mg GAE/g extract ส่วนสารสกัดราก กิ่งที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ และกิ่งที่กำจัดคลอโรฟิลล์ พบว่ามีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดปานกลางและไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 19.62 ± 0.55 , 18.56 ± 0.40 และ 17.52 ± 0.75 mg GAE/g extract ตามลำดับ แสดงรายละเอียดในตารางที่ 4.5

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดระหว่างสารสกัดที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ และกำจัดคลอโรฟิลล์ พบว่าสารสกัดกิ่งที่กำจัดคลอโรฟิลล์มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดลดลงจากที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์เพียง 5.60 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากสารสกัดกิ่งมีปริมาณคลอโรฟิลล์รวมน้อย และมีปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลงจากการกำจัดคลอโรฟิลล์น้อยเช่นกัน จึงทำให้เมื่อกำจัดคลอโรฟิลล์อาจไม่มีผลต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมากนัก แต่เมื่อนำสารสกัดใบมากำจัดคลอโรฟิลล์ พบว่ามีปริมาณคลอโรฟิลล์รวมลดลงมาก จึงส่งผลให้มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดลดลงด้วย โดยมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดลดลง 52.87 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าปริมาณคลอโรฟิลล์ที่ถูกกำจัดออกไปจากสารสกัดส่วนในของผักแว่นต้นมีผลต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด โดยขึ้นอยู่กับส่วนของพืชที่นำมาใช้ในการทดสอบ หรือพืชแต่ละชนิด ดังงานวิจัยของ Wangcharoen และ phimphilia (2016) ได้รายงานปริมาณคลอโรฟิลล์รวมของเครื่องต้มแปรรูปจากใบอ่อนของข้าว พบว่าข้าวบาร์เลย์ ข้าวพันธุ์สุโขทัย 1 และข้าวสาลี มีปริมาณคลอโรฟิลล์รวมเท่ากับ 958 ± 4 , 82 ± 2 และ 90 ± 2 ไมโครกรัมต่อ 200 มิลลิกรัม ตามลำดับ และมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 26.14 ± 0.52 , 18.92 ± 0.38 และ 5.60 ± 0.44 mg GAE/g extract ตามลำดับ ซึ่งพบว่าข้าวบาร์เลย์มีปริมาณคลอโรฟิลล์รวมมากที่สุด และมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุดเช่นกัน ส่วนข้าวสาลีมีปริมาณคลอโรฟิลล์รวมมากกว่าข้าวพันธุ์สุโขทัย 1 แต่มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดน้อยกว่าข้าวพันธุ์สุโขทัย 1 ดังนั้นปริมาณคลอโรฟิลล์อาจมีผลต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของพืชบางชนิด แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า การกำจัดคลอโรฟิลล์ออกจากใบของพืชส่งผลให้มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดลดลง ซึ่งสอดคล้องกับสารสกัดใบของผักแว่นต้นที่มีปริมาณฟีนอลิกลดลง เมื่อนำมากำจัดคลอโรฟิลล์ ดังงานวิจัยของ เพชรรุ่ง และวนิดา (2564) ได้วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจากสารสกัดเมทานอลจากใบและกิ่งรวมกันของพืช *C. medicaginea* โดยเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์และกำจัดคลอโรฟิลล์ด้วยน้ำมันปาล์ม พบว่ามีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดลดลงถึง 17.76 เปอร์เซ็นต์ โดยลดลงจาก 56.36 ± 0.68 เหลือเพียง 46.35 ± 1.10 mg GAE/g extract ตามลำดับ และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Phaisan และคณะ

(2020) ที่รายงานว่าสารสกัดเอทานอลของใบสาบเสือ (*C. odorata*) ที่กำจัดคลอโรฟิลล์มีปริมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ การใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อเผยแพร่ให้คนอื่นโดยไม่ได้รับอนุญาตเป็นการฝ่าฝืน ไม่ว่ากรรมใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฟีนอลิกทั้งหมดลดลงจาก 33.44 ± 1.37 mg GEA/0.5 g extract เหลือเพียง 14.89 ± 0.41 mg GEA/0.5 g extract และเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Olatunde และคณะ (2018) ที่กำจัดคลอโรฟิลล์จากใบฝรั่ง (*P. guajava*) ด้วยตัวทำละลายเมทานอล อะซิโตน โพรพานอล และคลอโรฟอร์ม พบว่ามีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดลดลงเช่นเดียวกัน เนื่องจากในคลอโรพลาสต์สามารถสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกได้ ซึ่งถือว่าเป็นแหล่งสำคัญที่สุดของสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติ (Khoddami และคณะ, 2013) ดังนั้นปริมาณคลอโรฟิลล์รวมของใบที่ลดลงอย่างมาก จึงส่งผลให้สารสกัดจากใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ของผักแว่นต้นมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดลดลง

ตารางที่ 4.5 ค่าเฉลี่ยปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้น

| สารสกัดเมทานอล | ค่าเฉลี่ยปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/g extract) |
|---------------------------|---|
| ราก | $19.62^c \pm 0.55$ |
| กิ่งที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ | $18.56^c \pm 0.40$ |
| กิ่งที่กำจัดคลอโรฟิลล์ | $17.52^c \pm 0.75$ |
| ใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ | $48.33^a \pm 0.51$ |
| ใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ | $22.78^b \pm 0.35$ |

หมายเหตุ ตัวอักษร a-c ในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan's multiple range test ($p < 0.05$)

4.1.5 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมทานอล

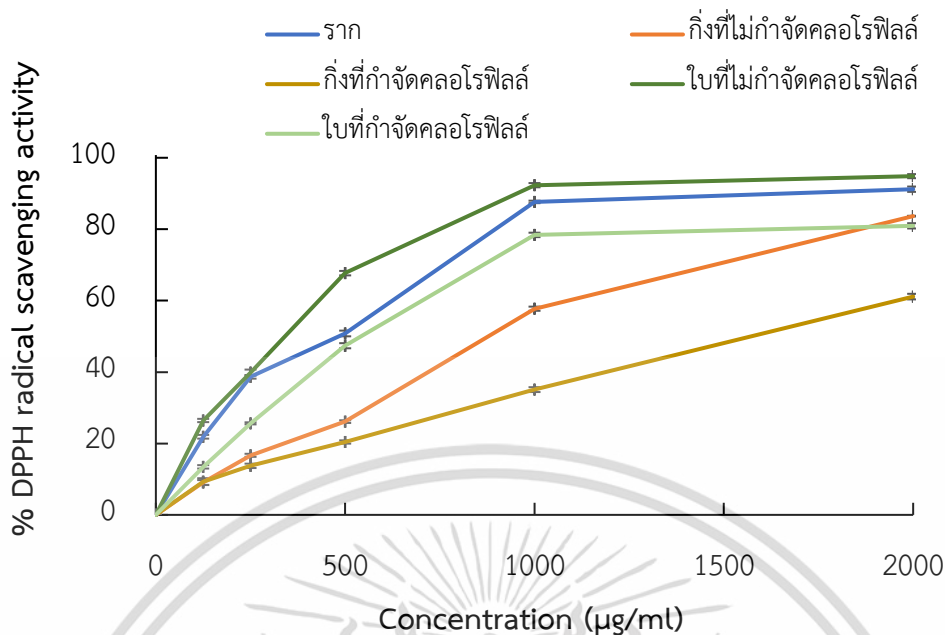
ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้นจำนวน 5 สารสกัด คือ ราก กิ่งที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ กิ่งที่กำจัดคลอโรฟิลล์ ใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ และใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ ทดสอบด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP ซึ่งมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระดังนี้

4.1.5.1 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้นด้วยวิธี DPPH โดยใช้สารละลายโทรล็อกซ์เป็นสารมาตรฐาน และนำสมการจากกราฟมาตรฐานของสารโทรล็อกซ์ (รูปภาคผนวกที่ ข-2) คือสมการ $Y = 2.3805X$ มาวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ จากนั้นหาความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ และสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้นที่สามารถต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH ที่ร้อยละ 50 หรือ IC_{50} ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5.0 พบว่าสารมาตรฐานโทรล็อกซ์มีค่า IC_{50} เท่ากับ 19.27 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้นมาคำนวณหาค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ความเข้มข้น 125-2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงผลการทดลองดังเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ข-4 และนำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดเมทานอลกับค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH อยู่ในช่วง 19.82 ± 0.70 - 54.29 ± 0.31 mg TE/g extract โดยสารสกัดใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีที่สุดเท่ากับ 54.29 ± 0.31 mg TE/g extract และมีค่า IC_{50} ต่ำที่สุดเท่ากับ 344.71 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดราก ใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ กิ่งที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ และกิ่งที่กำจัดคลอโรฟิลล์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ปานกลาง โดยมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน 47.44 ± 0.20 , 35.61 ± 0.19 , 24.46 ± 0.35 และ 19.82 ± 0.70 mg TE/g extract ตามลำดับ และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 479.10, 532.97, 881.46 และ 1552 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังรายละเอียดในตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.1 เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์และกำจัดคลอโรฟิลล์พบว่าสารสกัดกิ่งและใบเมื่อนำมากำจัดคลอโรฟิลล์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ลดลง และเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดเมทานอลกับสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ พบว่าสารมาตรฐานโทรล็อกซ์มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH มากกว่าสารสกัดราก กิ่งที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ กิ่งที่กำจัดคลอโรฟิลล์ ใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ และใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ถึง 17.88, 24.86, 27.6, 45.72 และ 80.54 เท่า ตามลำดับ

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าสารสกัดใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์มีความสามารถในการให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่สารอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีกว่าสารสกัดอื่น และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด พบว่าสารสกัดใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด ซึ่งอาจความสัมพันธ์ที่ส่งผลให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH มากที่สุดเช่นกัน



รูปที่ 4.1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้นกับค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH

4.1.5.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

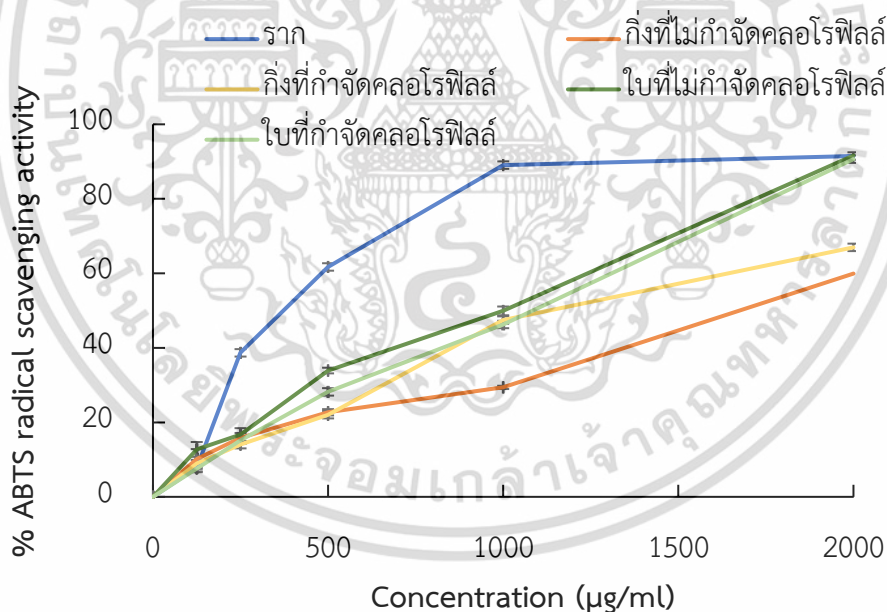
จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้นด้วยวิธี ABTS โดยใช้สารละลายโทรลล็อกซ์เป็นสารมาตรฐาน จากนั้นนำสมการจากกราฟมาตรฐานของสารโทรลล็อกซ์ (รูปภาคผนวกที่ ข-3) คือสมการ $Y = 0.9526X$ มาวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโทรลล็อกซ์ จากนั้นวิเคราะห์หาค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานโทรลล็อกซ์ และสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้นด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5.0 พบว่าสารมาตรฐานโทรลล็อกซ์มีค่า IC_{50} เท่ากับ 55.13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้นความเข้มข้น 125-2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาคำนวณหาค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ซึ่งแสดงผลการทดลองดังตารางภาคผนวก ข-6 และนำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดเมทานอลกับค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS

พบว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS อยู่ในช่วง $52.39 \pm 6.59 - 99.83 \pm 3.40$ mg TE/g extract ตามลำดับ โดยสารสกัดรากมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้ดีที่สุดเท่ากับ 99.83 ± 3.40 mg TE/g extract โดยมีค่า IC_{50} ต่ำที่สุดเท่ากับ 313.15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ปานกลางเท่ากับ 69.75 ± 3.66 mg TE/g extract และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1003.81 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่าสารสกัดใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ กิ่งที่กำจัดคลอโรฟิลล์ และกิ่งที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ปานกลางและไม่แตกต่างกันทางสถิติ อยู่ที่ 56.61 ± 1.77 , เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

53.02±5.18 และ 52.39±6.59 mg TE/g extract ตามลำดับ โดยมีค่า IC_{50} มากกว่า 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ดังรายละเอียดในตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.2 หากพิจารณาเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์และกำจัดคลอโรฟิลล์ พบว่าสารสกัดกึ่งที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์และกำจัดคลอโรฟิลล์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่สารสกัดใบเมื่อนำมากำจัดคลอโรฟิลล์ พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ที่ลดลง และเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดเมทานอลกับสารมาตรฐานโทรลล็อกซ์ พบว่าสารมาตรฐานโทรลล็อกซ์มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS มากกว่าสารสกัดราก กิ่งที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ กิ่งที่กำจัดคลอโรฟิลล์ ใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ และใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ถึง 5.68, 18.20, 19.98, 19.19 และ 31.45 เท่า ตามลำดับ

จากผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS พบว่าสารสกัดรากมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนแก่สารอนุมูลอิสระ $ABTS^{+}$ ได้ดีกว่าสารสกัดอื่น แม้ว่าจะมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดน้อย แต่เป็นไปได้ว่าอาจมีสารประกอบฟีนอลิกกลุ่มฟลาโวนอยด์ ที่มักตรวจพบในพืชที่มีสีเหลืองและสีขาวได้ (Koss-Mikołajczyk และคณะ, 2019) ซึ่งสารสกัดรากของผักแว่นต้นมีสีเหลืองเข้ม



รูปที่ 4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้นกับค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS

4.1.5.3 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้นด้วยวิธี FRAP โดยใช้สารละลายกรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐาน และทดสอบกับสารสกัดความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์หาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก ด้วยสมการจากกราฟมาตรฐานของกรดแอสคอร์บิก (รูปภาคผนวกที่ ข-4) คือสมการ $Y = 0.0186X$ จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดเมทานอลของผักแว่นต้นมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP อยู่ในช่วง $19.84 \pm 0.11 - 50.30 \pm 0.48$ mg AAE/g extract โดยสารสกัดใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP ได้ดีที่สุดเท่ากับ 50.30 ± 0.48 mg AAE/g extract ส่วนสารสกัดใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ ราก กิ่งที่กำจัดคลอโรฟิลล์ และกิ่งที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP ปานกลางและแตกต่างกันดังนี้ 30.72 ± 0.55 , 28.26 ± 0.19 , 23.94 ± 0.24 และ 19.84 ± 0.11 mg AAE/g extract ตามลำดับ ดังรายละเอียดในตารางที่ 4.6 เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ FRAP ของสารสกัดที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์และกำจัดคลอโรฟิลล์ พบว่าสารสกัดกิ่งที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าสารสกัดกิ่งที่กำจัดคลอโรฟิลล์ แต่สารสกัดใบเมื่อนำมากำจัดคลอโรฟิลล์ พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ FRAP ที่ลดลง

จากผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ FRAP พบว่าสารสกัดใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์มีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนหรือรีดิวซ์อิเล็กตรอนให้กับสารประกอบเชิงซ้อน Fe^{3+} -TPTZ ทำให้เปลี่ยนไปเป็นสารประกอบเชิงซ้อน Fe^{2+} -TPTZ ได้ดีกว่าสารสกัดอื่น ซึ่งเป็นไปได้ว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ FRAP อาจมีความสัมพันธ์กับปริมาณฟีนอลิกที่ตรวจพบเช่นเดียวกัน โดยสารสกัดใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด จึงส่งผลให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ FRAP ได้ดี

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้นด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP พบว่าสารสกัดรากและใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารสกัดอื่น โดยสารสกัดรากมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้ดีที่สุด แต่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ FRAP ปานกลาง ส่วนสารสกัดใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ FRAP ได้ดีที่สุดใน แต่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ปานกลาง ซึ่งทั้ง 2 สารสกัด มีความสามารถในการให้ไฮโดรเจนอะตอม หรืออิเล็กตรอนแก่สารอนุมูลอิสระแต่ละชนิดแตกต่างกัน ซึ่งอาจมีผลมาจากสารสกัดแต่ละส่วนของพืชมีสารประกอบฟีนอลิกที่มีโครงสร้างแตกต่างกัน และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์และกำจัดคลอโรฟิลล์ พบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์อาจไม่มีผลโดยตรงต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกิ่ง แต่มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบ ที่พบว่าเมื่อนำใบมากำจัดคลอโรฟิลล์ทำให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระลดลง ซึ่งเป็นไปได้ว่าการกำจัดคลอโรฟิลล์ไม่เพียงแต่กำจัดสีเขียวออกจากสารสกัดเท่านั้น อาจทำให้สารสำคัญบางชนิดถูกกำจัดออกไปด้วยเช่นกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อพิจารณาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดที่ตรวจพบในสารสกัดเมทานอลของผักแว่น ต้น พบว่ามีความสัมพันธ์ต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ สุธิรา และประสพอร (2016) ที่วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลจาก ดอกของพืชวงศ์ Fabaceae จำนวน 3 ชนิด คือ ดอกชงโค (*B. purpurea*) ดอกอัญชัน (*C. ternatea*) และดอกพู่จอมพล (*C. haematocephala*) พบว่ามีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 37.51 ± 0.44 , 24.59 ± 0.90 และ 104.41 ± 3.89 mg GAE/ g extract ตามลำดับ โดยสารสกัดดอกพู่จอมพลมี ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด และเมื่อนำมาศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS พบว่าสาร สกัดจากดอกพู่จอมพลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้ง 2 วิธี ได้ดีที่สุดเช่นเดียวกัน แต่สารสกัดดอกชงโค และอัญชันตรวจพบปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดน้อย จึงทำให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อย

นอกจากนี้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ อาจขึ้นอยู่กับส่วน ของพืชที่นำมาทดสอบ เนื่องจากมีสารประกอบฟีนอลิกที่มีโครงสร้างต่างกัน จึงส่งผลให้เกิดฤทธิ์ทาง ชีวภาพแตกต่างกัน (Rahiman และคณะ, 2012) ดังงานวิจัยของ Anim และคณะ (2016) ที่วิเคราะห์ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเอทานอลจากเมล็ด ดอก กิ่ง ฝัก และใบของพืช *C. retusa* พบว่า สารสกัดใบมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด ส่งผลให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีที่สุด โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 222 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับสารสกัดใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ของผักแว่น ต้น ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 344.71 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รวมทั้งงานวิจัยของ Sinan และคณะ (2020) ที่วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกของลำต้น ดอก และผลของพืช *C. retusa* พบว่าสารสกัดเปลือกของลำต้นปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH, ABTS และ FRAP ได้ดีที่สุดเท่ากับ 33.25 ± 1.90 , 62.70 ± 3.08 และ 83.91 ± 1.51 mg TE/g extract ตามลำดับ

รวมถึงปัจจัยด้านสภาพแวดล้อมในการเจริญเติบโตของพืชที่ต่างกัน อาจส่งผล กระทบต่อการสังเคราะห์สารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ ดังงานวิจัยของ Devendra และคณะ (2012) ที่ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดเอทานอลจากใบของพืชสกุล *Crotalaria* จำนวน 3 ชนิด ที่เก็บจากแหล่งเพาะปลูกตามธรรมชาติ และเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดทดลอง โดย ใช้สารสกัดที่ความเข้มข้น 20-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าพืช *C. medicaginea* จากทั้งสอง แหล่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ใกล้เคียงกัน โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 76.00 และ 74.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีฤทธิ์สูงกว่าสารสกัดเมทานอลจากทุกส่วนของผักแว่นต้นอย่าง มาก

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบสารสกัดที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์และกำจัดคลอโรฟิลล์ ของผักแว่นต้น พบว่าสารสกัดใบมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระลดลง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Olatunde และคณะ (2018) ที่พบว่าเมื่อกำจัดคลอโรฟิลล์จากสารสกัดใบฝรั่ง (*P. guajava*) ที่สกัดด้วยตัวทำ ละลายเมทานอล อะซิโตน และโพรพานอล มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS และ FRAP ที่ลดลง แต่ อย่างไรก็ตามข้อสรุปนี้มีความขัดแย้งกับงานวิจัยของ Phaisan และคณะ (2020) ที่กำจัดคลอโรฟิลล์

จากสารสกัดเอทานอลจากใบสาบเสือ (*C. odorata*) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH มากกว่าสารสกัดที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ ซึ่งจะเห็นได้ว่าปริมาณคลอโรฟิลล์อาจจะส่งผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แต่ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชด้วยเช่นกัน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH, ABTS, FRAP และค่า IC₅₀ จากสารสกัดเมทานอลของผักแว่นต้น

| สารสกัด | ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ | | | IC ₅₀ (µg/ml) | |
|---------------------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|---------|
| | DPPH (mg TE/g extract) | ABTS (mg TE/g extract) | FRAP (mg AAE/g extract) | DPPH | ABTS |
| ราก | 47.44 ^b ±0.20 | 99.83 ^a ±3.40 | 28.26 ^c ±0.19 | 479.10 | 313.15 |
| กิ่งที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ | 24.46 ^d ±0.35 | 52.39 ^c ±6.59 | 19.84 ^e ±0.11 | 881.46 | 1734.89 |
| กิ่งที่กำจัดคลอโรฟิลล์ | 19.82 ^e ±0.70 | 53.02 ^c ±5.18 | 23.94 ^d ±0.24 | 1552.63 | 1057.80 |
| ใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ | 54.29 ^a ±0.31 | 69.75 ^b ±3.66 | 50.30 ^a ±0.48 | 344.71 | 1003.81 |
| ใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ | 35.61 ^c ±0.19 | 56.61 ^c ±1.77 | 30.72 ^b ±0.55 | 532.97 | 1101.40 |

หมายเหตุ ตัวอักษร a-e ในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan's multiple range test ($p < 0.05$)

4.1.6 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเมทานอล

จากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้นจำนวน 5 สารสกัด คือ ราก (R) กิ่งที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ (S) กิ่งที่กำจัดคลอโรฟิลล์ (SD) ใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ (L) และใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ (LD) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อดิสก์ โดยละลายสารสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลผสมกับสารละลาย DMSO อัตราส่วน 1 : 1 จึงใช้ตัวทำละลายเมทานอลและสารละลาย DMSO เป็นชุดควบคุมเชิงลบ และใช้ยาปฏิชีวนะเจนตามัยซินความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อดิสก์ เป็นชุดควบคุมเชิงบวก ส่วนแบคทีเรีย *P. acne* ใช้ยาปฏิชีวนะเจนตามัยซินความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อดิสก์ นำสารสกัดมาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียจำนวน 8 สายพันธุ์ ด้วยวิธี paper disk diffusion ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกจำนวน 6 สายพันธุ์ คือ *B. cereus* DMST 5040, *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* TISTR 1918, *S. aureus* TISTR 1466, *S. epidermidis* ATCC 12228 และ *P. acne* DMST 14916 และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบจำนวน 2 สายพันธุ์ คือ *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* TISTR 2370 โดยแบคทีเรีย *P. acne* DMST 14916 จะทดสอบเฉพาะกับสารสกัดราก กิ่งที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ และใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์

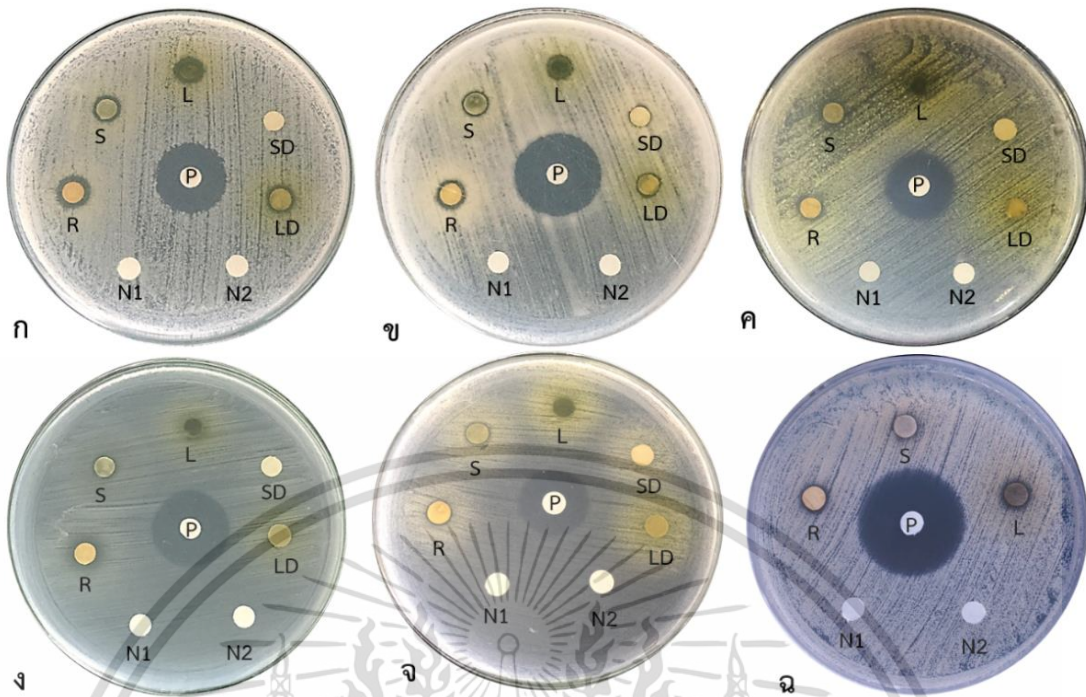
จากการทดลองพบว่าสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้นจำนวน 4 สารสกัด คือ ราก (R) กิ่งที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ (S) ใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ (L) และใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ (LD) สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้แตกต่างกัน แสดงดังตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.3 โดยสารสกัดราก มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีที่สุด สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ทั้งหมด 6 สายพันธุ์ คือ *B. cereus*, *M. luteus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis*, *S. aureus* และ *P. acne* ซึ่งมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 10.03 ± 0.03 , 9.61 ± 0.66 , 9.34 ± 0.80 , 8.93 ± 0.36 , 7.33 ± 0.24 และ 6.74 ± 0.18 มิลลิเมตร ตามลำดับ สารสกัดใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ 3 สายพันธุ์ คือ *B. cereus*, *B. subtilis* และ *P. acne* มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 9.95 ± 0.39 , 8.49 ± 0.73 และ 6.86 ± 0.35 มิลลิเมตร ตามลำดับ สารสกัดกิ่งที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้จำนวน 3 สายพันธุ์เช่นกัน คือ *B. cereus*, *B. subtilis* และ *M. luteus* โดยมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 9.12 ± 0.23 , 7.10 ± 0.15 และ 7.88 ± 0.30 มิลลิเมตร ตามลำดับ และสารสกัดใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้เพียง 2 สายพันธุ์ คือ *B. cereus* และ *B. subtilis* มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 8.38 ± 0.35 และ 7.39 ± 0.22 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดกิ่งที่กำจัดคลอโรฟิลล์พบว่าไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบที่ใช้ทดสอบได้ นอกจากนี้สารสกัดเมทานอลของผักแว่นต้นทั้ง 5 สารสกัดไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบทั้ง 2 สายพันธุ์ได้เช่นกัน คือ *E. coli* และ *P. aeruginosa* ดังนั้นจึงไม่ปรากฏในรูปที่ 4.3

เมื่อพิจารณาในด้านการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus*, *B. subtilis* และ *P. acne* ถูกยับยั้งได้ดีด้วยสารสกัดรากและใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* และ *B. subtilis* ถูกยับยั้งด้วยสารสกัดกิ่งที่ไม่กำจัด

คลอโรฟิลล์ และใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ มีเฉพาะสารสกัดรากเท่านั้นที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *M. luteus*, *S. aureus* และ *S. epidermidis* ได้

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย พบว่าสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้นมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ โดยสารสกัดสามารถเข้าไปทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี เนื่องจากมีเปปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) เป็นส่วนประกอบเพียงชั้นเดียว จึงทำให้ผนังเซลล์แตกได้ง่าย แต่สารสกัดของผักแว่นต้นไม่สามารถทำลายผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากมีผนังเซลล์ 2 ชั้น ที่ประกอบด้วยเปปทิโดไกลแคน และผนังเซลล์ชั้นนอกที่เป็นชั้นไขมัน (outer membrane) ซึ่งเป็นสารประกอบในกลุ่ม lipopolysaccharide ทำให้ผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบมีความแข็งแรงกว่าแบคทีเรียแกรมบวก จึงทำให้สารสกัดแทรกซึมเข้าสู่เซลล์ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ยาก (รัชดา และสุนิดา, 2563)

จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดรากมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีที่สุด เนื่องจากสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ทั้ง 6 สายพันธุ์ ส่วนสารสกัดกิ่งและใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้แตกต่างกัน 3 สายพันธุ์ แต่พบว่าสารสกัดกิ่งที่กำจัดคลอโรฟิลล์ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 8 สายพันธุ์ได้ ส่วนสารสกัดใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้เพียง 2 สายพันธุ์ โดยมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียต่ำกว่าใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ แสดงให้เห็นว่าเมื่อพิจารณาในเรื่องของการกำจัดคลอโรฟิลล์และไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ พบว่าสารสกัดที่ถูกกำจัดคลอโรฟิลล์มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Olatunde และคณะ (2018) ที่พบว่าสารสกัดของใบฝรั่ง (*P. guajava*) ที่กำจัดคลอโรฟิลล์ด้วยตัวทำละลายเมทานอล อะซิโตน โพรพานอล และคลอโรฟอร์ม มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* และ *Listeria monocytogenes* ต่ำกว่าสารสกัดที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ ดังนั้นการศึกษานี้จึงสนใจนำสารสกัดเมทานอลจากราก (R) และใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ (L) ไปแยกสารโดยใช้ตัวทำละลายแตกต่างกันด้วยวิธี liquid-liquid extraction เพื่อนำไปศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียต่อไป โดยทดสอบเฉพาะเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกจำนวน 6 สายพันธุ์



รูปที่ 4.3 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้น โดย (ก) *B. cereus* (ข) *B. subtilis* (ค) *M. luteus* (ง) *S. aureus* (จ) *S. epidermidis* และ (ฉ) *P. acne* ตัวอักษร P คือชุดควบคุมเชิงบวก หรือยาปฏิชีวนะเจนตามัยซิน และ N คือชุดควบคุมเชิงลบ โดย N1 คือ เมทานอล และ N2 คือ DMSO

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 บริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดเมทานอลของผักแว่นต้นที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อดิสก์ และยาปฏิชีวนะเจนตามัยซินความเข้มข้น 2 และ 5 ไมโครกรัมต่อดิสก์

| สารสกัดเมทานอล | บริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (มิลลิเมตร) | | | | | | | |
|-------------------------------------|---|-------------------------|-------------------------|------------------|-----------------------|-------------------------|----------------|----------------------|
| | <i>B. cereus</i> | <i>B. subtilis</i> | <i>M. luteus</i> | <i>S. aureus</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>P. acne</i> | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> |
| ราก (R) | 10.03 ^a ±0.03 | 8.93 ^a ±0.36 | 9.61 ^a ±0.66 | 7.33±0.24 | 9.34±0.80 | 6.74 ^a ±0.18 | 0 | 0 |
| กิ่งที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ (S) | 9.12 ^b ±0.23 | 7.10 ^b ±0.15 | 7.88 ^b ±0.30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| กิ่งที่กำจัดคลอโรฟิลล์ (SD) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ND | 0 | 0 |
| ใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ (L) | 9.95 ^a ±0.39 | 8.49 ^a ±0.73 | 0 | 0 | 0 | 6.86 ^a ±0.35 | 0 | 0 |
| ใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ (LD) | 8.38 ^c ±0.35 | 7.39 ^b ±0.22 | 0 | 0 | 0 | ND | 0 | 0 |
| Gentamicin (2 ไมโครกรัมต่อดิสก์) | 20.00±0.31 | 23.20±0.18 | 21.55±1.44 | 19.90±0.55 | 20.90±0.19 | ND | 15.33±0.69 | 13.437±0.34 |
| Gentamicin (5 ไมโครกรัมต่อดิสก์) | ND | ND | ND | ND | ND | 25.64±0.77 | ND | ND |

หมายเหตุ ND คือ not determined และตัวอักษร a-c ในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan's multiple range test ($p < 0.05$)

4.1.7 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเมทานอล

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopa chrome ทดสอบกับเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ความเข้มข้น 48 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยใช้สารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้นจำนวน 5 สารสกัด คือ สารสกัดราก กิ่งที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ กิ่งที่กำจัดคลอโรฟิลล์ ใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ และใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐาน จากนั้นรายงานเป็นค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้นมีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสอยู่ในช่วง 50.99 ± 2.7 - 80.95 ± 1.18 โดยสารสกัดรากมีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุดเท่ากับ 80.95 ± 1.18 ส่วนสารสกัดกิ่งที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ สารสกัดใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ และสารสกัดใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ มีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสไม่แตกต่างกันทางสถิติเท่ากับ 56.15 ± 3.50 , 55.81 ± 0.90 และ 56.39 ± 1.43 ตามลำดับ และพบว่าสารสกัดกิ่งที่กำจัดคลอโรฟิลล์มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสต่ำที่สุดเท่ากับ 50.99 ± 2.75 เปอร์เซ็นต์ ดังรายละเอียดในตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้นที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

| สารสกัดเมทานอล | ค่าของร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (%) |
|---------------------------|--|
| ราก | $80.95^a \pm 1.18$ |
| กิ่งที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ | $56.15^b \pm 3.50$ |
| กิ่งที่กำจัดคลอโรฟิลล์ | $50.99^c \pm 2.75$ |
| ใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ | $55.81^b \pm 0.90$ |
| ใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ | $56.39^b \pm 1.43$ |

หมายเหตุ ตัวอักษร a-c ในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan's multiple range test ($p < 0.05$)

เมื่อพิจารณาจากค่าความแตกต่างทางสถิติของฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของผักแว่นต้น พบว่าสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้นทั้ง 5 สารสกัด มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูง มีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากกว่าร้อยละ 50 โดยสารสกัดรากมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสดีที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์และกำจัดคลอโรฟิลล์ พบว่าสารสกัดกิ่งที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์มีค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงกว่าสารสกัดกิ่งที่กำจัดคลอโรฟิลล์ ในขณะที่สารสกัดใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์และกำจัดคลอโรฟิลล์ มีค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสไม่แตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งการศึกษานี้พบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์ที่ลดลง อาจไม่มีผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น 100-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสอยู่ในช่วง 10.46 ± 0.35 - 64.20 ± 0.79 ซึ่งจะเห็นได้ว่าสารสกัดเมทานอลของผักแว่นต้นมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่สูงใกล้เคียงกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก แม้ว่าจะใช้ความเข้มข้นของสารสกัดเพียง 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงสนใจนำสารสกัดรากและใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ ไปแยกสารโดยใช้ตัวทำละลายแตกต่างกันด้วยวิธี liquid-liquid extraction เพื่อนำไปศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในสารสกัดแยกส่วนของผักแว่นต้นต่อไป

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านต่าง ๆ ของสารสกัดที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์และกำจัดคลอโรฟิลล์ ได้แก่ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าสารสกัดกิ่งและใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีกว่าสารสกัดที่กำจัดคลอโรฟิลล์ และบางการทดลองพบว่า มีฤทธิ์ทางชีวภาพใกล้เคียงกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณคลอโรฟิลล์ที่ลดลง อาจไม่มีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพในบางการทดลองของสารสกัดกิ่ง แต่มีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดใบ ซึ่งคาดว่าอาจจะไม่ใช่เพียงแค่กำจัดคลอโรฟิลล์เท่านั้น อาจมีสารสำคัญบางชนิดที่มีขั้วเช่นเดียวกันกับคลอโรฟิลล์ถูกแยกออกมาด้วยเนื่องจากน้ำมันปาล์มเป็นสารที่ไม่มีขั้ว ซึ่งสามารถสกัดคลอโรฟิลล์ที่เป็นสารไม่มีขั้วหรือขั้วต่ำได้ และนอกจากนี้สารสำคัญบางชนิดที่ไม่มีขั้วหรือมีขั้วต่ำก็ถูกสกัดออกมาพร้อมกับคลอโรฟิลล์ เช่น แคโรทีนอยด์ และฟลาโวนอยด์ เป็นต้น ซึ่งถือว่าเป็นสารที่มีความสำคัญต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การศึกษานี้จึงสรุปได้ว่าการกำจัดคลอโรฟิลล์ออกจากสารสกัดของผักแว่นต้นส่งผลให้มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ลดลง โดยเฉพาะในสารสกัดใบ ดังนั้นการศึกษานี้จึงคัดเลือกเลือกเฉพาะสารสกัดเมทานอลที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์จำนวน 3 สารสกัด คือ ราก กิ่งที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ และใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ นำมาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ และการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ต่อไป

4.1.8 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ของสารสกัดเมทานอล

การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งไนตริกออกไซด์ ได้นำสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้นจำนวน 3 สารสกัด คือ ราก กิ่งที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ และใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ มาประเมินระดับความเป็นพิษในหลอดทดลองต่อเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 ด้วยวิธี MTT และศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ โดยใช้สารละลาย Sodium nitroprusside (SNP) เป็นสารเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ ในการศึกษาที่ทดสอบเฉพาะสารสกัดที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์เนื่องจากมีฤทธิ์ทางชีวภาพดีกว่าสารสกัดที่กำจัดคลอโรฟิลล์ โดยมีผลการทดลองดังนี้

4.1.8.1 ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7

ในการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งไนตริกออกไซด์ หรือ Nitric oxide scavenging assay (NOA) จำเป็นต้องทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจชนิด เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Raw 264.7 ด้วยวิธี MTT เพื่อให้ทราบถึงความเข้มข้นของสารสกัดเมทานอลที่เหมาะสม รวมถึงเพื่อยืนยันว่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ทดสอบจะไม่ส่งผลกระทบต่อเซลล์แมคโครฟาจ จากนั้นเลือกความเข้มข้นที่ต่ำกว่าระดับความเป็นพิษต่อเซลล์ ไปศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ โดยทดสอบกับสารสกัดเมทานอลที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ที่ความเข้มข้น 250-2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และรายงานเป็นค่าร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability) และความเข้มข้นของสารสกัดเมทานอลที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ร้อยละ 50 (CC_{50}) จากการทดลองพบว่าสารสกัดทั้ง 3 สารสกัด มีความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 ต่ำ โดยมีค่า CC_{50} เท่ากับ 1495.30, 1139.90 และ 1298.59 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีค่าร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์อยู่ในช่วง 21.51 ± 1.85 - 97.75 ± 0.48 ดังรายละเอียดในตารางที่ 4.9

จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดเมทานอลของผักแว่นต้นทั้ง 3 สารสกัด มีค่า CC_{50} ของความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รวมถึงความเข้มข้นของสารสกัดที่ต่ำกว่า 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 สูง ดังนั้นจึงนำสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้นที่ความเข้มข้น 200-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ โดยใช้สารละลาย SNP เป็นสารเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบต่อไป

ตารางที่ 4.9 ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 และความเข้มข้นของสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้นที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ร้อยละ 50

| สารสกัด เมทานอล | ความเข้มข้น ของสารสกัด ($\mu\text{g/ml}$) | การมีชีวิตรอด ของเซลล์ (%) | ความเป็นพิษต่อเซลล์ CC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) |
|-------------------------------|---|----------------------------------|---|
| ราก | 250 | 97.75 ^a ±0.48 | 1495.30 |
| | 500 | 88.60 ^c ±2.47 | |
| | 1000 | 72.23 ^f ±5.23 | |
| | 2000 | 21.51 ^k ±1.85 | |
| กิ่งที่ไม่กำจัด คลอโรฟิลล์ | 250 | 83.36 ^d ±1.37 | 1139.90 |
| | 500 | 77.64 ^e ±3.19 | |
| | 1000 | 55.97 ^h ±2.73 | |
| | 2000 | 28.41 ^j ±0.48 | |
| ใบที่ไม่กำจัด คลอโรฟิลล์ | 250 | 96.47 ^{ab} ±1.85 | 1298.59 |
| | 500 | 92.24 ^{bc} ±1.40 | |
| | 1000 | 63.30 ^g ±4.70 | |
| | 2000 | 38.74 ⁱ ±1.49 | |

หมายเหตุ ตัวอักษร a-k ในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan's multiple range test ($p < 0.05$)

4.1.8.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์

ในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ โดยใช้สารละลาย SNP ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ เป็นสารเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ และตรวจวัดปริมาณสารไนไตรท์ ด้วยสารละลาย Griess reagent ทดสอบกับสารสกัดเมทานอลของผักแว่นต้นที่มีความเข้มข้น 200-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์กับกรดแอสคอร์บิกที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน จากนั้นนำค่ามาวิเคราะห์หาค่าร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์ และค่า IC_{50} จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดทั้ง 3 สารสกัด มีค่าร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์อยู่ในช่วง 10.32 ± 1.69 - 35.56 ± 1.82 โดยสารสกัดใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์มีค่าร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์สูงที่สุดอยู่ในช่วง 24.69 ± 2.21 - 35.56 ± 1.82 ส่วนสารสกัดกิ่งที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์และสารสกัดราก มีค่าร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์อยู่ในช่วง 17.47 ± 1.94 - 20.67 ± 0.48 และ 10.32 ± 1.69 - 17.57 ± 1.92 ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 3 สารสกัด มีค่า IC_{50} มากกว่า 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีความสามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ต่ำกว่าสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 265.08 ไมโครกรัมต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเมทานอลของผักแว่นต้นมีประสิทธิภาพต่ำในการต้านการอักเสบ ดังรายละเอียดในตารางที่ 4.10

งานวิจัยที่ผ่านมายังไม่พบการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ และฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจของสารสกัดจากพืช *C. medicaginea* โดยมีการศึกษาในพืชสกุลเดียวกัน ได้แก่ งานวิจัยของ Kumar และคณะ (2021) ได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ของสารสกัดพืช *C. biflora* ที่สกัดด้วยตัวทำละลายปิโตรเลียมเอสเทอร์ คลอโรฟอร์ม เอทิลอะซิเตท และเมทานอล พบว่าสารสกัดเมทานอลสามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 260 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่สารสกัดเอทิลอะซิเตท คลอโรฟอร์ม และปิโตรเลียมเอสเทอร์ มีฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ต่ำ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1160, 1270 และ 1310 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบสารสกัดเมทานอลพืช *C. biflora* กับสารสกัดเมทานอลของผักแว่นต้น พบว่าสารสกัดเมทานอลพืช *C. biflora* มีฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์สูงกว่าอย่างมาก เนื่องจากเป็นพืชต่างชนิดกัน และงานวิจัยข้างต้นแสดงให้เห็นว่าการสกัดสารด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วที่ต่างกัน แสดงออกถึงฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ที่ต่างกัน

เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์กับพืชที่อยู่ในวงศ์เดียวกัน พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์สูงกว่าสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้นเช่นกัน ดังงานวิจัยของ Venkatachalam และ Muthukrishnan (2012) พบว่าสารสกัดเอทานอลจากใบนางเหนียว (*D. gangeticum*) ที่ความเข้มข้น 200-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์อยู่ในช่วง 30.18-67.30 และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 815.52 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Srinivasan และคณะ (2016) ที่ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์จากสารสกัดน้ำของใบคราม (*I. tinctoria*) พบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 540.65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะเห็นได้ว่าฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์จะมีค่าแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด รวมถึงการสกัดสารด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกันก็มีผลต่อฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ที่ต่างกันได้เช่นกัน เนื่องจากสารสำคัญที่มีขั้วเหมือนกับตัวทำละลายจะถูกสกัดหรือแยกสารไปอยู่รวมกัน จึงทำให้ออกฤทธิ์ได้ดีกว่า

จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้น มีฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ต่ำกว่างานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้น และมีฤทธิ์ยับยั้งต่ำกว่าสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกอย่างมาก ดังนั้นจึงไม่เหมาะสำหรับนำไปศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจชนิด 264.7 และไม่เหมาะที่จะนำไปแยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction ต่อไป

ตารางที่ 4.10 ร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์ และค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ ร้อยละ 50 ของสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้น

| สารสกัด เมทานอล | ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$) | ร้อยละการยับยั้ง ไนตริกออกไซด์ | IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) |
|-------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|--|
| ราก | 200 | 10.32 ^s ±1.69 | >1000 |
| | 400 | 18.83 ^{def} ±0.84 | |
| | 600 | 18.97 ^{def} ±2.72 | |
| | 800 | 16.74 ^f ±0.42 | |
| | 1000 | 17.57 ^{ef} ±1.92 | |
| กิ่งที่ไม่กำจัด คลอโรฟิลล์ | 200 | 17.47 ^{ef} ±1.94 | >1000 |
| | 400 | 19.07 ^{def} ±1.55 | |
| | 600 | 21.15 ^d ±1.44 | |
| | 800 | 20.35 ^{de} ±1.47 | |
| | 1000 | 20.67 ^{de} ±0.48 | |
| ใบที่ไม่กำจัด คลอโรฟิลล์ | 200 | 24.69 ^c ±2.21 | >1000 |
| | 400 | 27.06 ^{bc} ±1.58 | |
| | 600 | 28.31 ^b ±2.06 | |
| | 800 | 29.15 ^b ±2.94 | |
| | 1000 | 35.56 ^a ±1.82 | |
| กรดแอสคอร์บิก | 200 | 41.49±2.71 | 265.08 |
| | 400 | 60.20±2.32 | |
| | 600 | 66.67±1.12 | |
| | 800 | 70.04±1.12 | |
| | 1000 | 72.86±0.49 | |

หมายเหตุ ตัวอักษร a-k ในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan's multiple range test ($p<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.8 ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดเมทานอล

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ได้นำเฉพาะสารสกัดเมทานอลที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ จำนวน 3 สารสกัด คือ ราก กิ่งที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ และใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ นำมาศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เนื่องจากมีฤทธิ์ทางชีวภาพดีกว่าสารสกัดที่กำจัดคลอโรฟิลล์ เบื้องต้นศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์จำนวน 3 ชนิด ประกอบด้วยเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 เซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29 ซึ่งเป็นเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหาร เนื่องจากชาวบ้านนิยมนำมารับประทานเป็นยาสมุนไพร และเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งที่มีอัตราการผู้ป่วยเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นจึงสนใจศึกษากับเซลล์มะเร็งข้างต้นมาทดสอบกับสารสกัดของผักแว่นต้น โดยทดสอบกับสารสกัดเมทานอลที่ความเข้มข้น 500-2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้ยาต้านมะเร็งชนิดไมโทมายซิน ซี ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นชุดควบคุมเชิงบวก แล้วตรวจวัดปริมาตรของผลึกฟอร์มาซานด้วยค่าการดูดกลืนแสง พบว่าสารสกัดรากที่ความเข้มข้น 500-2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 เซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29 และเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 อยู่ในช่วง 72.13 ± 3.64 - 88.73 ± 0.20 , -30.38 ± 2.13 - 86.21 ± 1.37 และ -28.54 ± 1.72 - 84.52 ± 0.55 ตามลำดับ ซึ่งที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าไม่สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29 และเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ได้ โดยไปส่งเสริมการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด จะสังเกตเห็นผลึกฟอร์มาซานของเซลล์ที่รอดชีวิตมากกว่าหลุมชุดควบคุมที่มีเพียงเซลล์เท่านั้น สารสกัดกิ่งที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์มีค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 เซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29 และเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 อยู่ในช่วง 41.25 ± 2.43 - 89.08 ± 0.39 , -9.24 ± 1.28 - 85.37 ± 0.09 และ -29.00 ± 3.08 - 83.24 ± 0.65 ตามลำดับ ซึ่งที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าไม่สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29 และเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ได้เช่นกัน และสารสกัดใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์มีค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 เซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29 และเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 อยู่ในช่วง 85.76 ± 0.73 - 89.98 ± 0.32 , 84.84 ± 0.33 - 85.31 ± 0.40 และ 20.37 ± 4.79 - 81.00 ± 1.37 ตามลำดับ ดังรายละเอียดในตารางที่ 4.11 ซึ่งลักษณะของเซลล์ และผลึกฟอร์มาซานที่ปรากฏในหลุมชุดควบคุมกับหลุมที่ทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอลของผักแว่นต้นที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงดังตารางที่ 4.12

เมื่อนำมาวิเคราะห์หาระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่เป็นพิษต่อเซลล์ ร้อยละ 50 (cytotoxicity concentration : CC_{50}) พบว่าสารสกัดใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 เซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29 และเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ได้ดีที่สุดในค่า CC_{50} ต่ำที่สุดเท่ากับ 244.09, 246.04 และ 748.74 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สารสกัดรากมีค่า CC_{50} เท่ากับ 309.00, 866.47 และ 1019.88 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสกัดกิ่งที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งทั้ง

3 ชนิดได้น้อยที่สุด ซึ่งต้องใช้ความเข้มข้นของสารสกัดที่สูงขึ้น โดยมีค่า CC_{50} เท่ากับ 588.03, 823.32 และ 1435.45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิดได้ดีที่สุดแม้ว่าจะใช้สารสกัดความเข้มข้นต่ำ สารสกัดรากและกิ่งที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์พบว่าที่ความเข้มข้นสูงสุดสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิดได้เช่นกัน แต่สารสกัดรากและกิ่งที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ที่ทดสอบในระดับความเข้มข้นต่ำ กลับไปส่งเสริมการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29 และเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ซึ่งที่ความเข้มข้นต่ำอาจไม่เหมาะสมต่อการนำไปปรับประทาน เนื่องจากจะไปกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเกิดการแบ่งตัวมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบความเป็นพิษต่อเซลล์ จะเห็นได้ว่าสารสกัดใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์และรากสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิดได้ดีกว่าสารสกัดกิ่งที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ ดังนั้นการศึกษานี้จึงนำเฉพาะสารสกัดเมทานอลจากใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์และราก ไปแยกสารโดยใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกันด้วยวิธี liquid-liquid extraction เพื่อนำไปศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ต่อไป


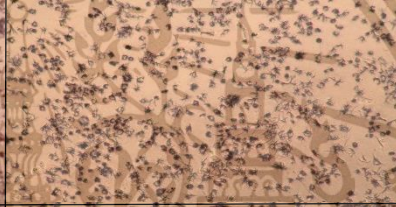
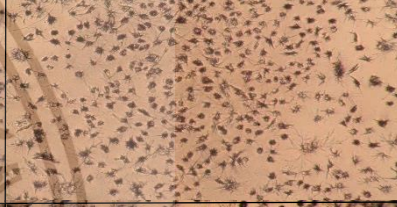


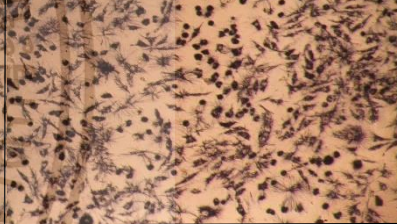
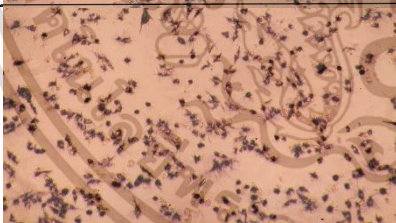
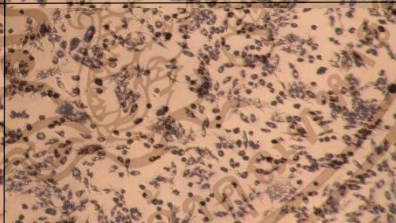
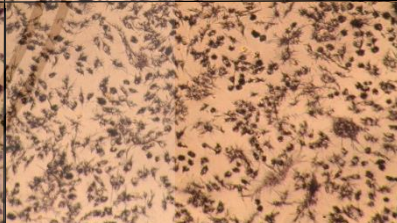

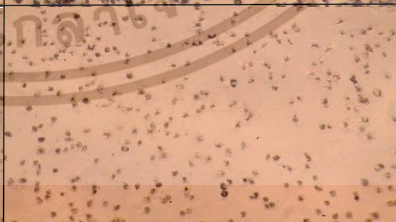

จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านต่าง ๆ ของสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้นจำนวน 5 สารสกัด คือ ราก กิ่งที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ ใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ กิ่งที่กำจัดคลอโรฟิลล์ และใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ พบว่าสารสกัดใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีกว่าสารสกัดส่วนอื่น ยกเว้นฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่พบว่าสารสกัดรากให้ผลดีกว่า ดังนั้นจึงสนใจนำสารสกัดใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์และสารสกัดรากของผักแว่นต้น ไปแยกสารโดยใช้ตัวทำละลายแตกต่างกันด้วยวิธี liquid-liquid extraction เพื่อนำไปศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี ดังนี้ ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และความเป็นพิษต่อเซลล์ต่อไป

ตารางที่ 4.11 ร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ และค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่เป็นพิษต่อเซลล์ ร้อยละ 50 ของสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้น

| สารสกัด เมทานอล | ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$) | ความเป็นพิษต่อเซลล์ | | | | | |
|-------------------------------|-------------------------------------|---------------------------|---------------------------------------|---------------------------|---------------------------------------|---------------------------|---------------------------------------|
| | | HepG2 | | HT-29 | | MCF-7 | |
| | | % | CC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) | % | CC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) | % | CC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) |
| ราก | 500 | 72.13 ^c ±3.64 | | -30.38 ^d ±2.13 | | -28.54 ^e ±1.72 | |
| | 1000 | 87.40 ^{ab} ±0.95 | 309.00 | 81.77 ^b ±0.73 | 866.47 | 47.03 ^b ±6.79 | 1019.88 |
| | 2000 | 88.73 ^a ±0.20 | | 86.21 ^a ±1.37 | | 84.52 ^a ±0.55 | |
| กิ่งที่ไม่กำจัด คลอโรฟิลล์ | 500 | 41.25 ^d ±2.43 | | -9.24 ^c ±1.28 | | -29.00 ^e ±3.08 | |
| | 1000 | 88.13 ^{ab} ±0.34 | 588.03 | 85.10 ^a ±0.42 | 823.32 | 12.83 ^d ±2.59 | 1435.45 |
| | 2000 | 89.08 ^a ±0.39 | | 85.37 ^a ±0.09 | | 83.24 ^a ±0.65 | |
| ใบที่ไม่กำจัด คลอโรฟิลล์ | 500 | 85.76 ^b ±0.73 | | 84.84 ^a ±0.33 | | 20.37 ^c ±4.79 | |
| | 1000 | 87.57 ^{ab} ±0.52 | 244.09 | 84.89 ^a ±0.78 | 246.04 | 80.59 ^a ±0.68 | 748.74 |
| | 2000 | 89.98 ^a ±0.32 | | 85.31 ^a ±0.40 | | 81.00 ^a ±1.37 | |

หมายเหตุ ตัวอักษร a-d ในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan's multiple range test ($p < 0.05$)

ตารางที่ 4.12 ลักษณะผลึกฟอร์มมาซานของเซลล์มะเร็งในหลุมชุดควบคุม และหลุมที่ทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้นความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับที่กำลังขยาย 100 เท่า หลังเติมสารละลาย MTT และบ่ม 3-4 ชั่วโมง

| สารสกัดเมทานอล | ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง | | |
|--|--|---|---|
| | HepG2 | HT-29 | MCF-7 |
| หลุมชุดควบคุม (หลุมที่มีเซลล์และอาหารเลี้ยง เซลล์) |  |  |  |
| ราก (หลุมที่มีเซลล์และสารสกัด) |  |  |  |
| กิ่งที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ (หลุมที่มีเซลล์และสารสกัด) |  |  |  |
| ใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ (หลุมที่มีเซลล์และสารสกัด) |  |  |  |

4.2 ผลของการแยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction และการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ

4.2.1 ผลการแยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction

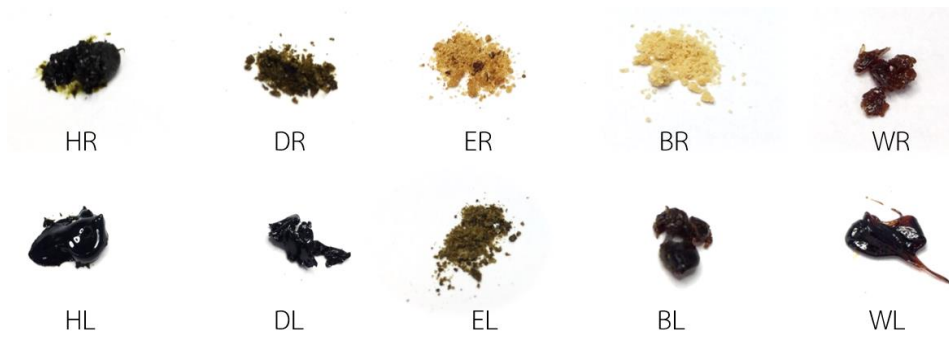
จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้นทั้งหมดจำนวน 5 สารสกัด พบว่ามีสารสกัดเมทานอลจำนวน 2 สารสกัด คือ ราก (R) และใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ (L) มีฤทธิ์ทางชีวภาพด้านการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งได้ดี ดังนั้นจึงนำมาแยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction โดยเรียงจากตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำไปยังขั้วสูง ได้แก่ ตัวทำละลายเฮกเซน (H) ไดคลอโรมีเทน (D) เอทิลอะซิเตท (E) บิวทานอล (B) และน้ำ (W) ตามลำดับ ดังนั้นจะได้สารสกัดแยกส่วนจากราก (R) จากตัวทำละลาย 5 ชนิดดังกล่าว โดยใช้รหัสตัวแรกเป็นชนิดของตัวทำละลาย ตามด้วยรหัสจากส่วนของพืช ยกตัวอย่างเช่น สารสกัดแยกส่วนจากรากที่ใช้ตัวทำละลายเฮกเซนจะมีรหัสเป็น HR เช่นเดียวกับสารสกัดแยกส่วนจากใบ (L) เช่น สารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำละลายเฮกเซนจะมีรหัสเป็น HL เป็นต้น ดังนั้นจะมีสารสกัดแยกส่วนจากราก 5 สารสกัด ได้แก่ HR, DR, ER, BR และ WR และจากใบ 5 สารสกัด ได้แก่ HL, DL, EL, BL และ WL รวมเป็น 10 สารสกัดแยกส่วน จากการแยกสารได้นำสารสกัดเมทานอลจากรากจำนวน 10 กรัม มาสกัดแยกสารด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกันจำนวน 5 ชนิดดังกล่าวไว้ข้างต้น พบว่ามีปริมาณสารส่วนใหญ่เป็นสารที่มีขั้วสูง คือสารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายบิวทานอลมีปริมาณมากที่สุดจำนวน 3.16 กรัม คิดเป็นค่าร้อยละผลได้เท่ากับ 31.58 มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีเหลืองอ่อน ส่วนสารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และน้ำ โดยมีค่าร้อยละผลได้เท่ากับ 17.89, 12.94, 7.01 และ 4.36 ตามลำดับ สารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทมีลักษณะเป็นผงละเอียดสีเหลืองเข้ม สารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายเฮกเซนมีลักษณะหนืดสีเขียวเข้ม สารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนมีลักษณะเป็นผงหยาบสีเขียวเข้ม และสารสกัดน้ำมีลักษณะเหนียวหนืดสีน้ำตาลแดง

เมื่อนำสารสกัดเมทานอลจากใบจำนวน 60 กรัม มาสกัดแยกสาร พบว่าสารส่วนใหญ่เป็นสารที่มีขั้วต่ำ โดยสารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายเฮกเซนมีปริมาณมากที่สุดจำนวน 10.11 กรัม ซึ่งคิดเป็นค่าร้อยละผลได้เท่ากับ 16.85 มีลักษณะหนืดสีเขียวเข้ม รองลงมาคือสารที่มีขั้วสูง ได้แก่ สารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายบิวทานอลและน้ำ โดยมีค่าร้อยละผลได้เท่ากับ 12.47 และ 12.18 ตามลำดับ มีลักษณะเหนียวหนืดสีน้ำตาลแดง ส่วนตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลางตรวจพบว่ามีปริมาณสารสกัดที่ได้น้อย ได้แก่ เอทิลอะซิเตท ที่มีค่าร้อยละผลได้เท่ากับ 9.03 มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีเหลือง และไดคลอโรมีเทนมีค่าร้อยละผลได้เท่ากับ 6.53 มีลักษณะหนืดสีเขียวเข้ม โดยสารสกัดแยกส่วนจากรากและใบมีน้ำหนักรวมเท่ากับ 7.38 และ 34.24 กรัม ตามลำดับ และมีร้อยละค่าผลได้รวมเท่ากับ 73.73 และ 57.06 ตามลำดับ ซึ่งแสดงข้อมูลน้ำหนัก ร้อยละผลได้ ลักษณะ รหัสและสีของสารสกัด

แสดงดังรูปที่ 4.4 และตารางที่ 4.13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้


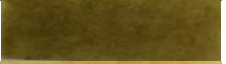
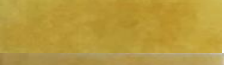
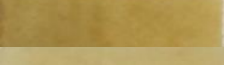


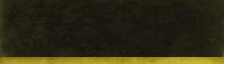
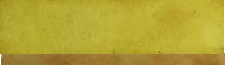

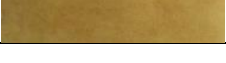


รูปที่ 4.4 ลักษณะของสารสกัดแยกส่วนจากรากและใบของฝักแวนต้นที่แยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.13 น้ำหนักของสารสกัด ร้อยละผลได้ ลักษณะ รหัสสีและสีของสารสกัดแยกส่วนจากรากและใบของผักแว่นต้นที่แยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction จำนวน 10 สารสกัด

| สารสกัด แยกส่วน | ตัวทำละลาย | รหัส สารสกัด | น้ำหนัก (g) | ร้อยละผลได้ (%) | ลักษณะ ของสารสกัด | รหัสสีของ สารสกัด | สีของ สารสกัด |
|--------------------|--------------|-----------------|----------------|--------------------|----------------------|----------------------|---|
| ราก | เฮกเซน | HR | 1.29 | 12.94 | หนืด | RHS152B |  |
| | ไดคลอโรมีเทน | DR | 0.70 | 7.01 | ผงหยาบ | RHS152D |  |
| | เอทิลอะซิเตท | ER | 1.79 | 17.89 | ผงละเอียด | RHS160B |  |
| | บิวทานอล | BR | 3.16 | 31.58 | ผงละเอียด | RHS153C |  |
| | น้ำ | WR | 0.44 | 4.36 | เหนียวหนืด | RHS160B |  |
| | รวม | | 7.38 | 73.73 | | | |
| ใบ | เฮกเซน | HL | 10.11 | 16.85 | หนืด | RHS136A |  |
| | ไดคลอโรมีเทน | DL | 5.42 | 9.03 | หนืด | RHS137A |  |
| | เอทิลอะซิเตท | EL | 3.92 | 6.53 | ผงละเอียด | RHS153C |  |
| | บิวทานอล | BL | 7.48 | 12.47 | เหนียวหนืด | RHS152D |  |
| | น้ำ | WL | 7.31 | 12.18 | เหนียวหนืด | RHS160B |  |
| | รวม | | 34.24 | 57.06 | | | |

4.2.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดแยกส่วน

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดแยกส่วนจากราก (R) และใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ (L) ของผักแว่นต้นที่แยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction จำนวน 10 สารสกัด นำสารสกัดแยกส่วนความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อดิस्क มาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และใช้ยาปฏิชีวนะเจนนตามัยซินความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อดิस्क เป็นชุดควบคุมเชิงบวก ส่วนเชื้อแบคทีเรีย *P. acne* ใช้ยาปฏิชีวนะเจนนตามัยซินความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อดิस्क และใช้ตัวทำละลายเมทานอลเป็นชุดควบคุมเชิงลบ ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกจำนวน 6 สายพันธุ์ คือ *B. cereus*, *B. subtilis*, *M. luteus*, *S. aureus*, *S. epidermidis* และ *P. acne* ด้วยวิธี paper disk diffusion ในการศึกษาไม่ได้ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากสารสกัดเมทานอลไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้

จากผลการทดลองเมื่อพิจารณาจากสารสกัดแยกส่วนจากราก พบว่าสารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DR) สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ทั้ง 6 สายพันธุ์ โดยมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 6.23 ± 0.26 , 7.26 ± 0.31 , 9.28 ± 1.16 , 7.40 ± 0.63 , 7.26 ± 0.46 และ 10.57 ± 0.41 มิลลิเมตร ตามลำดับ สารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายเฮกเซน (HR) สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ 3 สายพันธุ์ คือ *B. cereus*, *M. luteus* และ *P. acne* มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 6.28 ± 0.30 , 6.25 ± 0.81 และ 10.51 ± 0.58 มิลลิเมตร ตามลำดับ แต่สารสกัดแยกส่วนที่ใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ER) บิวทานอล (BR) และน้ำ (WR) ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบได้ ดังรายละเอียดในตารางที่ 4.14 และรูปที่ 4.5

และเมื่อพิจารณาจากสารสกัดแยกส่วนจากใบ พบว่าสารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DL) และเอทิลอะซิเตท (EL) สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ทั้ง 6 สายพันธุ์เช่นกัน โดยสารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DL) มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 8.88 ± 0.22 , 9.57 ± 0.12 , 12.18 ± 1.15 , 10.18 ± 0.64 , 11.66 ± 0.68 และ 10.96 ± 1.29 มิลลิเมตร ตามลำดับ สารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (EL) มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 13.17 ± 1.11 , 8.30 ± 0.16 , 13.36 ± 0.52 , 10.24 ± 0.26 , 12.80 ± 0.54 และ 22.48 ± 1.03 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งพบว่าสารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (EL) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acne* สูงที่สุด ส่วนสารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายเฮกเซน (HL) สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ 3 สายพันธุ์ คือ *B. cereus*, *B. subtilis* และ *M. luteus* มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 6.62 ± 0.23 , 10.89 ± 0.56 และ 6.64 ± 0.82 มิลลิเมตร ตามลำดับ และสารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายบิวทานอล (BL) สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้เพียง 2 สายพันธุ์ คือ *B. cereus* และ *P. acne* มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 6.12 ± 0.21 และ 13.90 ± 0.63 มิลลิเมตร ตามลำดับ แต่สารสกัดแยกส่วนจากน้ำ (WL) ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบได้ ดังรายละเอียดในตารางที่ 4.14 และรูปที่ 4.6

เมื่อพิจารณาจากสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย พบว่าสารสกัดแยกส่วนจากรากที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DR) สารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DL) และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ การใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อรู้เหตุเหตุนั้นโปรดแจ้งคืนเอกสารทุกครั้ง
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอทิลอะซิเตท (EL) สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ทั้ง 6 สายพันธุ์ แต่สารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DL) และเอทิลอะซิเตท (EL) มีบริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสูงกว่า โดยทั้ง 3 สารสกัด มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus*, *S. epidermidis* และ *P. acne* ได้ดี เนื่องจากมีบริเวณยับยั้งสูง โดยเฉพาะสารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (EL) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acne* ได้ดีที่สุด โดยมีค่าบริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acne* ใกล้เคียงกับยาปฏิชีวนะเจนตามัยซินที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อดิสก์ ที่มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 27.74 ± 0.75 มิลลิเมตร

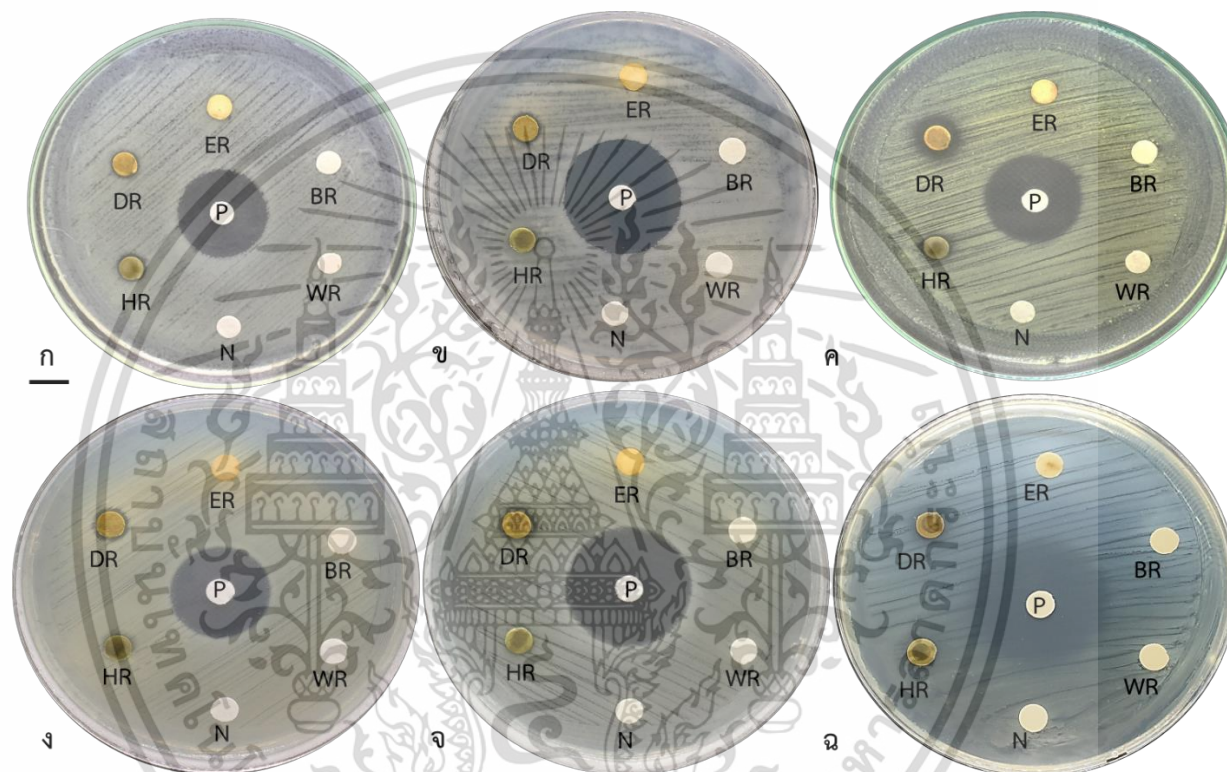
และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเมทานอลกับสารสกัดแยกส่วน พบว่าสารสกัดเมทานอลจากรากมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดี แต่เมื่อนำมาแยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction กลับพบว่าสารสกัดแยกส่วนจากรากมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียต่ำกว่า อาจเป็นเพราะว่าสารสำคัญส่วนใหญ่ที่พบในสารสกัดเมทานอลจากราก อาจทำงานแบบส่งเสริมฤทธิ์ซึ่งกันและกัน ซึ่งเมื่อนำมาแยกสาร โดยใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกันอาจทำให้สารสำคัญบางชนิดถูกแยกออกจากกัน จึงส่งผลให้สารออกฤทธิ์ถูกลดทอนประสิทธิภาพลง แต่ในทางกลับกันเมื่อนำสารสกัดเมทานอลจากใบของผักแว่นต้น มาแยกสารโดยใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกัน ส่งผลให้มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีขึ้น เนื่องจากสารสกัดมีความบริสุทธิ์มากขึ้น และพบว่าสารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลาง คือตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DL) และเอทิลอะซิเตท (EL) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดีกว่าสารสกัดแยกส่วนที่ใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วสูง เป็นไปได้ว่าสารสำคัญที่น่าสนใจที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอาจจะถูกสกัดออกมาด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลาง ดังนั้นจึงนำสารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DL) และเอทิลอะซิเตท (EL) ไปแยกสารให้บริสุทธิ์มากขึ้นด้วยวิธี column chromatography จากนั้นนำไปศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดส่วนย่อยต่อไป

ตารางที่ 4.14 บริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากผักแว่นต้นที่แยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction จำนวน 10 สารสกัด ที่มีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อดิสก์ และยาปฏิชีวนะเจนตามัยซินความเข้มข้น 2 และ 5 ไมโครกรัมต่อดิสก์

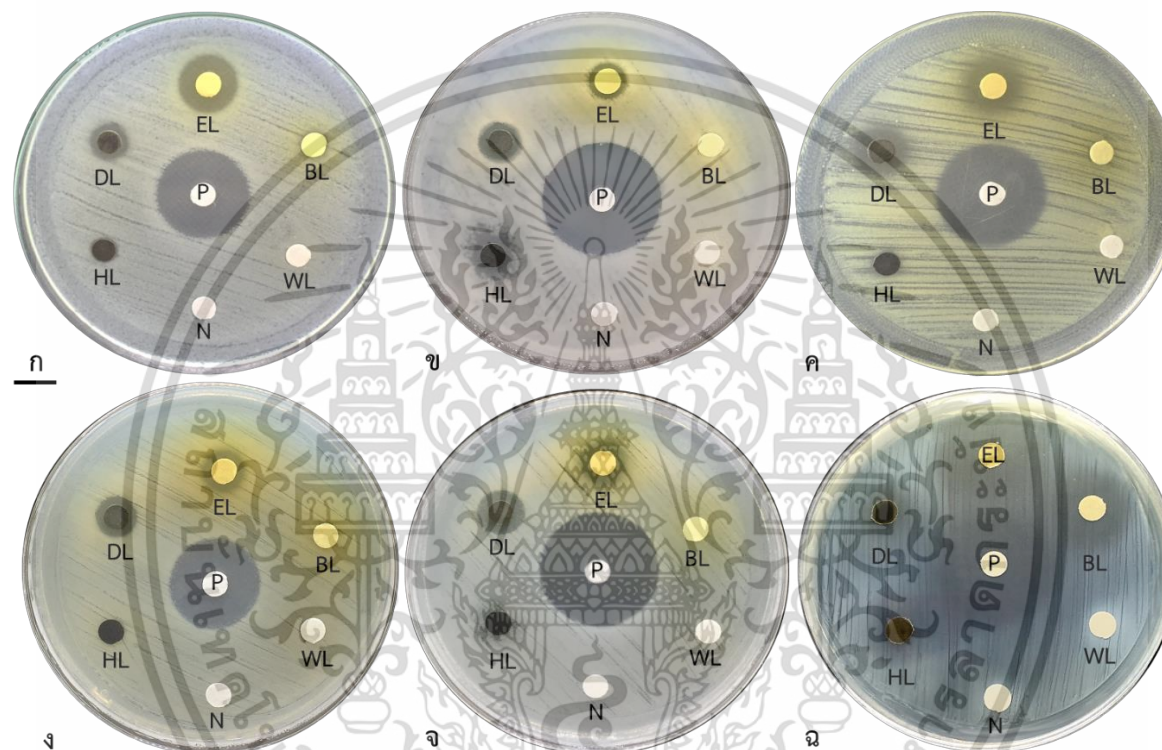
| ส่วนของพืช | สารสกัดแยกส่วน | บริเวณยับยั้งแบคทีเรีย (มิลลิเมตร) | | | | | |
|-------------|----------------|------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | <i>B. cereus</i> | <i>B. subtilis</i> | <i>M. luteus</i> | <i>S. aureus</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>P. acne</i> |
| ราก | HR | 6.28 ^c ±0.30 | 0 | 6.25 ^c ±0.81 | 0 | 0 | 10.51 ^c ±0.58 |
| | DR | 6.23 ^{cd} ±0.26 | 7.26 ^d ±0.31 | 9.28 ^b ±1.16 | 7.40 ^b ±0.63 | 7.26 ^b ±0.46 | 10.57 ^c ±0.41 |
| | ER | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | BR | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | WR | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ใบ | HL | 6.62 ^c ±0.23 | 10.89 ^a ±0.56 | 6.64 ^c ±0.82 | 0 | 0 | 0 |
| | DL | 8.88 ^b ±0.22 | 9.57 ^b ±0.12 | 12.18 ^a ±1.15 | 10.18 ^a ±0.64 | 11.66 ^a ±0.68 | 10.96 ^c ±1.29 |
| | EL | 13.17 ^a ±1.11 | 8.30 ^c ±0.16 | 13.36 ^a ±0.52 | 10.24 ^a ±0.26 | 12.80 ^a ±0.54 | 22.48 ^a ±1.03 |
| | BL | 6.12 ^d ±0.21 | 0 | 0 | 0 | 0 | 13.90 ^b ±0.63 |
| | WL | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| เจนตามัยซิน | | 21.51±0.25 | 26.30±1.02 | 24.11±0.18 | 21.09±0.33 | 27.06±0.52 | 27.74±0.75 |

หมายเหตุ ยาปฏิชีวนะเจนตามัยซินความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อดิสก์ ใช้ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ ยาปฏิชีวนะเจนตามัยซินความเข้มข้น 5

ไมโครกรัมต่อดิสก์ ใช้ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย *P. acne* และตัวอักษร a-d ในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan's multiple range test ($p < 0.05$)



รูปที่ 4.5 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดแยกส่วนจากรากของผักแว่นต้นที่แยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction โดย (ก) *B. cereus* (ข) *B. subtilis* (ค) *M. luteus* (ง) *S. aureus* (จ) *S. epidermidis* และ (ฉ) *P. acne* ตัวอักษร P คือชุดควบคุมเชิงบวก หรือยาปฏิชีวนะเจนตามัยซิน และ N คือชุดควบคุมเชิงลบ หรือเมทานอล (scale bar = 1 cm)



รูปที่ 4.6 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดแยกส่วนจากใบของผักแว่นต้นที่แยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction โดย (ก) *B. cereus* (ข) *B. subtilis* (ค) *M. luteus* (ง) *S. aureus* (จ) *S. epidermidis* และ (ฉ) *P. acne* ตัวอักษร P คือชุดควบคุมควบคุมเชิงบวก หรือยาปฏิชีวนะเจนตามัยซิน และ N คือชุดควบคุมเชิงลบ หรือเมทานอล (scale bar = 1 cm)

4.2.3 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดแยกส่วน

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopa chome ของสารสกัดแยกส่วนจากราก (R) และใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ (L) ของผักแว่นต้นที่แยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction จำนวน 10 สารสกัด โดยใช้สารสกัดความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบกับเอนไซม์ไทโรซิเนสความเข้มข้น 48 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐาน พบว่าสารสกัดแยกส่วนจากรากจำนวน 5 สารสกัด มีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสอยู่ในช่วง 9.64 ± 0.47 - 68.91 ± 2.12 และสารสกัดแยกส่วนจากใบจำนวน 5 สารสกัด มีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสอยู่ในช่วง 7.40 ± 2.06 - 74.50 ± 1.21

เมื่อพิจารณาจากรากสารสกัดแยกส่วนจากราก พบว่าสารสกัดที่มีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากกว่า 50 ได้แก่ สารสกัดแยกส่วนที่ใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ER) และไดคลอโรมีเทน (DR) ที่มีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงเท่ากับ 68.91 ± 2.12 และ 58.71 ± 1.88 ตามลำดับ ส่วนสารสกัดที่มีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสต่ำกว่า 50 ได้แก่ สารสกัดแยกส่วนที่ใช้ตัวทำละลายบิวทานอล (BR) และเฮกเซน (HR) มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสปานกลาง มีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเท่ากับ 49.88 ± 1.35 และ 35.45 ± 1.13 ตามลำดับ ส่วนสารสกัดแยกส่วนจากน้ำ (WR) พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสต่ำ มีค่าร้อยละการยับยั้งเพียง 9.64 ± 0.47

และเมื่อพิจารณาจากสารสกัดแยกส่วนจากใบ พบว่าสารสกัดที่มีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากกว่า 50 ได้แก่ สารสกัดแยกส่วนที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DL) และเอทิลอะซิเตท (EL) มีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเท่ากับ 74.50 ± 1.21 และ 71.64 ± 0.75 ตามลำดับ ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุดและไม่แตกต่างกันทางสถิติ ส่วนสารสกัดที่มีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสต่ำกว่า 50 ได้แก่ สารสกัดแยกส่วนที่ใช้ตัวทำละลายเฮกเซน (HL) และบิวทานอล (BL) มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสปานกลาง มีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเท่ากับ 30.41 ± 2.02 และ 28.98 ± 3.18 ตามลำดับ ส่วนสารสกัดแยกส่วนจากน้ำ (WL) มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสต่ำที่สุด มีค่าร้อยละการยับยั้งเพียง 7.40 ± 2.06 ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 4.15

จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดแยกส่วนจากรากที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DR) และเอทิลอะซิเตท (ER) และสารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DL) และเอทิลอะซิเตท (EL) มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดี มีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากกว่า 50 โดยสารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DL) และเอทิลอะซิเตท (EL) สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีกว่า ส่วนสารสกัดแยกส่วนจากราก และใบที่ใช้ตัวทำละลายเฮกเซนและบิวทานอล (HR, BR, HL และ BL) มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสปานกลาง แต่สารสกัดแยกส่วนจากรากและใบที่แยกสารด้วยน้ำ (WR และ WL) มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์

ไทโรซิเนสต่ำ จะเห็นได้ว่าตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกัน ส่งผลต่อฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของ

ไม่ทราบว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผักแว่นต้น ซึ่งสารสำคัญส่วนใหญ่ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสามารถแยกด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลาง คือตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนและเอทิลอะซิเตท ในขณะที่ตัวทำละลายที่มีขั้วสูงมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสต่ำ

และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเมทานอลกับสารสกัดแยกส่วน พบว่าสารสกัดเมทานอลจากรากมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุด โดยมีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเท่ากับ 80.95 ± 1.18 แต่เมื่อนำมาแยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction กลับพบว่า มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสต่ำกว่าสารสกัดเมทานอล ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดแยกส่วนจากราก เมื่อนำมาแยกสารด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกัน พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียลดลงเช่นเดียวกับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เป็นไปได้ว่าสารสำคัญอาจถูกแยกออกจากกัน จึงส่งผลให้สารออกฤทธิ์ถูกลดทอนประสิทธิภาพลง ในขณะที่สารสกัดแยกส่วนจากใบมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีกว่าสารสกัดเมทานอลจากใบ เนื่องจากสารสกัดมีความบริสุทธิ์มากขึ้น ซึ่งจากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดแยกส่วน พบว่าสารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DL) และเอทิลอะซิเตท (EL) มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีกว่าสารสกัดอื่น ดังนั้นจึงสนใจนำสารสกัดแยกส่วนทั้ง 2 สารสกัด ไปแยกสารให้บริสุทธิ์มากขึ้นด้วยวิธี column chromatography จากนั้นนำไปศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดส่วนย่อยต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.15 ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดแยกส่วนจากผักแว่นต้นที่แยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction จำนวน 10 สารสกัด ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

| ส่วนของพืช | สารสกัดแยกส่วน | รหัสสารสกัด | ค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (%) |
|------------|----------------|-------------|---|
| ราก | เฮกเซน | HR | 35.45 ^e ±1.13 |
| | ไดคลอโรมีเทน | DR | 58.71 ^c ±1.88 |
| | เอทิลอะซิเตท | ER | 68.91 ^b ±2.12 |
| | บิวทานอล | BR | 49.88 ^d ±1.35 |
| | น้ำ | WR | 9.64 ^s ±0.47 |
| ใบ | เฮกเซน | HL | 30.41 ^f ±2.02 |
| | ไดคลอโรมีเทน | DL | 74.50 ^a ±1.21 |
| | เอทิลอะซิเตท | EL | 71.64 ^{ab} ±0.75 |
| | บิวทานอล | BL | 28.98 ^f ±3.18 |
| | น้ำ | WL | 7.40 ^s ±2.06 |

หมายเหตุ ตัวอักษร a-g ในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan's multiple range test ($p < 0.05$)

4.2.4 ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดแยกส่วน

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดแยกส่วนจากราก (R) และใบ (L) ของผักแว่นต้นด้วยวิธี MTT ทดสอบกับสารสกัดแยกส่วนที่ความเข้มข้น 250-2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เบื้องต้นศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์จำนวน 5 ชนิด ประกอบด้วยเซลล์มะเร็งจำนวน 3 ชนิด คือเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 เซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29 และเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 เนื่องจากสารสกัดเมทานอลของผักแว่นต้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิดได้ดีจึงถูกนำมาใช้ทดสอบ รวมถึงการศึกษานี้ได้คัดเลือกเซลล์ปกติจำนวน 2 ชนิด คือเซลล์เยื่อบุไตลิงชนิด Vero ซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการกรองสารพิษของร่างกาย และเซลล์เคอราติโนไซต์ชนิด HaCaT ที่เป็นเซลล์ผิวหนังของมนุษย์ เพื่อให้ทราบว่าสารสกัดของผักแว่นต้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและมีความปลอดภัยต่อร่างกายหรือไม่ หากนำมารับประทาน พัฒนาเป็นยารักษาโรค และผลิตภัณฑ์อื่น ๆ

เมื่อพิจารณาจากสารสกัดแยกส่วนจากราก พบว่าสารสกัดแยกส่วนที่ใช้ตัวทำละลาย ไดคลอโรมีเทน (DR) ความเข้มข้น 250-2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิด อยู่ในช่วง 53.38±2.52-88.32±0.38, -25.34±2.74-89.49±0.90 และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

64.22±2.44-89.63±0.13 ตามลำดับ โดยมีค่า CC_{50} เท่ากับ 232.46, 432.55 และ 442.30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งพบว่าสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 และเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ได้ดี แต่ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าไปกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29 สารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายเฮกเซน (HR) สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 และมะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29 ได้ปานกลาง แต่สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ต่ำ โดยมีค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์อยู่ในช่วง -8.42±1.98-89.09±0.46, -33.76±3.92-90.26±0.34 และ -16.41±2.60-89.27±0.17 ตามลำดับ มีค่า CC_{50} เท่ากับ 729.29, 786.57 และ 1624.49 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และที่ความเข้มข้นต่ำ พบว่าไปกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิด ส่วนสารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ER), บิวทานอล (BR) และน้ำ (WR) พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิดต่ำ โดยมีค่า CC_{50} มากกว่า 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำมาทดสอบกับเซลล์ปกติพบว่าสารสกัดแยกส่วนที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DR) มีความเป็นพิษต่อเซลล์เยื่อปอติลิงชนิด Vero และเซลล์เคอราติโนไซต์ชนิด HaCaT เช่นกัน โดยมีค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์อยู่ในช่วง -5.62±2.26-89.14±0.49 และ 11.09±0.58-90.35±0.18 ตามลำดับ มีค่า CC_{50} เท่ากับ 623.33 และ 648.52 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกับสารสกัดแยกส่วนที่ใช้ตัวทำละลายเฮกเซน (HR) มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติทั้ง 2 ชนิดปานกลาง มีค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์อยู่ในช่วง -7.47±2.41-91.04±0.24 และ 6.11±0.76-91.68±0.55 และมีค่า CC_{50} เท่ากับ 807.38 และ 650.34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดแยกส่วนที่ใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ER) บิวทานอล (BR) และน้ำ (WR) มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติทั้ง 2 ชนิดต่ำ โดยที่ความเข้มข้นต่ำสามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ได้เล็กน้อย โดยมีค่า CC_{50} มากกว่า 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้นสารสกัดแยกส่วนที่ใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ER) ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เคอราติโนไซต์ชนิด HaCaT โดยมีค่า CC_{50} เท่ากับ 1948.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เมื่อพิจารณาจากสารสกัดแยกส่วนจากใบ พบว่าสารสกัดแยกส่วนที่ใช้ตัวทำละลายเฮกเซน (HL) และไดคลอโรมีเทน (DL) สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิดได้ดีและใกล้เคียงกัน โดยสารสกัดแยกส่วนที่ใช้ตัวทำละลายเฮกเซน (HL) สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 และเซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29 ได้ดีที่สุดใน มีค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์อยู่ในช่วง 90.63±0.44-93.46±0.25 และ 86.80±0.98-91.11±0.95 และมีค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 อยู่ในช่วง 10.62±0.81-91.83±0.37 ตามลำดับ มีค่า CC_{50} เท่ากับ 114.66, 121.43 และ 377.51 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดแยกส่วนที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DL) สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิดได้ดีเช่นกัน โดยสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ได้ดีกว่าสารสกัดแยกส่วนอื่น ซึ่งมีค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์อยู่ในช่วง 49.09±1.36-89.28±0.39 มีค่า CC_{50} เท่ากับ

255.58 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 และ

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29 อยู่ในช่วง $74.64 \pm 0.51 - 90.92 \pm 0.14$ และ $64.22 \pm 2.44 - 89.63 \pm 0.13$ และมีค่า CC_{50} เท่ากับ 148.36 และ 183.06 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่สารสกัดแยกส่วนที่ใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (EL) บิวทานอล (BL) และน้ำ (WL) พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำ โดยมีค่า CC_{50} มากกว่า 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำมาทดสอบกับเซลล์ปกติพบว่าแยกส่วนที่ใช้ตัวทำละลายเฮกเซน (HL) และไดคลอโรมีเทน (DL) มีความเป็นพิษต่อเซลล์เยื่อบุไตลิงชนิด Vero ปานกลาง มีค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์อยู่ในช่วง $-15.91 \pm 1.33 - 92.00 \pm 0.22$ และ $21.75 \pm 2.00 - 90.54 \pm 0.14$ ตามลำดับ โดยมีค่า CC_{50} เท่ากับ 433.19 และ 424.61 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีความเป็นพิษต่อเซลล์เคอราติโนไซต์ชนิด HaCaT สูงไม่ต่างกัน โดยมีค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์อยู่ในช่วง $67.80 \pm 0.60 - 90.90 \pm 0.20$ และ $68.20 \pm 0.79 - 91.13 \pm 0.74$ ตามลำดับ มีค่า CC_{50} เท่ากับ 167.15 และ 168.33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดแยกส่วนที่ใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (EL) บิวทานอล (BL) และน้ำ (WL) มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติทั้ง 2 ชนิดต่ำ โดยมีค่า CC_{50} มากกว่า 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้นสารสกัดแยกส่วนที่ใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (EL) มีความเป็นพิษต่อเซลล์เคอราติโนไซต์ชนิด HaCaT ปานกลาง มีค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์อยู่ในช่วง $20.93 \pm 0.69 - 71.84 \pm 0.78$ มีค่า CC_{50} เท่ากับ 734.41 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังรายละเอียดในตารางที่ 4.16 และตารางภาคผนวก ข-10-ข-14

จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดแยกส่วนจากรากและใบที่ใช้ตัวทำละลายเฮกเซน (HR) และ HL) และไดคลอโรมีเทน (DR และ DL) สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิดได้ โดยสารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำละลายเฮกเซน (HL) สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 และเซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29 ได้ดีที่สุดใน และสารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DL) สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ได้ดีที่สุดใน เมื่อเปรียบเทียบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ คือเซลล์เยื่อบุไตลิงชนิด Vero และเซลล์เคอราติโนไซต์ชนิด HaCaT พบว่าสารสกัดทั้ง 4 สารสกัดที่กล่าวไว้ข้างต้น มีความต่อเซลล์เยื่อบุไตลิงชนิด Vero ปานกลาง โดยมีค่า CC_{50} สูงกว่า 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่สารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำละลายเฮกเซน (HL) และไดคลอโรมีเทน (DL) พบว่าเป็นพิษต่อเซลล์เคอราติโนไซต์ชนิด HaCaT สูง ส่วนสารสกัดแยกส่วนจากรากที่ใช้ตัวทำละลายเฮกเซน (HR) ไดคลอโรมีเทน (DR) และสารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (EL) มีความเป็นพิษต่อเซลล์ข้างต้นปานกลาง แต่สารสกัดแยกส่วนจากรากที่ใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ER) บิวทานอล (BR) น้ำ (WR) และสารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำละลายบิวทานอล (BL) และน้ำ (WL) มีความเป็นพิษต่อเซลล์ทั้งเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติต่ำ

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดเมทานอล และสารสกัดแยกส่วนที่ทดสอบกับมะเร็งตับชนิด HepG2 เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด HT-29 และเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 พบว่าสารสกัดเมทานอลจากใบสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใช้ได้เห็นใบเขียวหรือเห็นดอกไม้

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แยกส่วนจากใบที่สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ได้ดีกว่าสารสกัดแยกส่วนจากรากเช่นกัน เมื่อนำมาทดสอบกับเซลล์เยื่อปูดลิงชนิด Vero ซึ่งเป็นเซลล์ปกติที่มีความใกล้เคียงกับไตของมนุษย์ และเซลล์เคอราติโนไซท์ชนิด HaCaT ซึ่งเป็นเซลล์ผิวหนังของมนุษย์ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดแยกส่วนจากรากและใบที่ใช้ตัวทำละลายเฮกเซน (HR และ HL) และไดคลอโรมีเทน (DR และ DL) มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติทั้ง 2 ชนิด ซึ่งหากนำไปรับประทานอาจจะเกิดผลเสียต่อไตได้ และเมื่อนำไปใช้เป็นสมุนไพรพอกบำรุงผิว หรือใช้ในการสมานแผลโดยตรง อาจมีแนวโน้มทำให้เกิดการระคายเคืองผิวได้ โดยเฉพาะสารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำละลายเฮกเซน (HL) และไดคลอโรมีเทน (DL) ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เคอราติโนไซท์ชนิด HaCaT สูง ดังนั้นหากต้องการนำไปใช้ประโยชน์กับผิวหนังของมนุษย์ จำเป็นต้องผ่านกระบวนการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในสัตว์ทดลองต่อไปเพื่อความปลอดภัยในอนาคต

จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์จะเห็นได้ว่าสารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำละลายเฮกเซน (HL) และไดคลอโรมีเทน (DL) มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติที่ใช้ทดสอบในการศึกษานี้สูงและใกล้เคียงกัน แต่เมื่อพิจารณาจากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดแยกส่วนที่ผ่านมา พบว่าสารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DL) มีฤทธิ์ทางชีวภาพของที่ดีกว่า ดังนั้นจึงคัดเลือกนำเฉพาะสารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DL) นำไปแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี column chromatography เพื่อศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดส่วนย่อยต่อไป และเนื่องจากชาวบ้านในตำบลองค์พระ อำเภอด่านช้าง จังหวัดสุพรรณบุรี นิยมนำผักแว่นต้นไปต้มและดอง เพื่อรับประทานเป็นเครื่องดื่มและยาสมุนไพรแก้ปวดเมื่อย ดังนั้นการศึกษานี้จึงคัดเลือกเซลล์ตัวแทนจำนวน 2 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 และเซลล์เยื่อปูดลิงชนิด Vero เพื่อให้ทราบว่าผักแว่นต้นสามารถบริโภคได้ และมีความปลอดภัยต่อร่างกายหรือไม่ อีกทั้งเพื่อศึกษาว่าสารสกัดจากผักแว่นต้นสามารถใช้เป็นสมุนไพรต้านมะเร็งตับได้หรือไม่

จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดแยกส่วนจากรากและใบของผักแว่นต้นจำนวนทั้งหมด 10 สารสกัด พบว่าสารสกัดแยกส่วนจากรากที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DR) สารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DL) และเอทิลอะซิเตท (EL) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ทั้งหมดจำนวน 6 สายพันธุ์ นอกจากนี้สารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DL) และเอทิลอะซิเตท (EL) ยังมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูง และเมื่อศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ พบว่าสารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำละลายเฮกเซน (HL) และไดคลอโรมีเทน (DL) สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 มะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29 และมะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ได้ดีกว่าสารสกัดอื่น และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ คือเซลล์เยื่อปูดลิงชนิด Vero และเซลล์เคอราติโนไซท์ชนิด HaCaT เช่นกัน โดยสารสกัดดังกล่าวเป็นสารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายกลุ่มที่มีความเป็นขั้วปานกลาง ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่สามารถ

สกัดสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ ไตรเทอร์พีน โกลโคไซด์ และสเตียรอยด์ (Akbar และ
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะ, 2021) และนิยมใช้เป็นตัวทำละลายนี้ในการสกัดสารสำคัญที่มีประโยชน์ทางด้านเภสัชภัณฑ์ เช่น วิตามิน ยาปฏิชีวนะ และสเตียรอยด์ (ชนัญชิตา และวรรณิ, 2554) การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดแยกส่วนจากผักแว่นต้นแสดงให้เห็นว่าสารสกัดที่แยกสารด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกัน จะสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกมาไม่เท่ากัน (Azwanida, 2015) จึงส่งผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกิดขึ้น ดังนั้นการศึกษานี้จึงนำสารสกัดแยกส่วนที่แยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction จำนวน 6 สารสกัด ได้แก่ สารสกัดแยกส่วนจากรากและใบที่ใช้ตัวทำละลายเฮกเซน (HR และ HL) ไตคลอโรมีเทน (DR และ DL) และเอทิลอะซิเตท (ER และ EL) ไปตรวจวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีเพื่อระบุชนิดของสารสำคัญต่อไป

ตารางที่ 4.16 ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ร้อยละ 50 ของสารสกัดแยกส่วนจากผักแว่นต้นที่แยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction จำนวน 10 สารสกัด

| ส่วนของพืช | สารสกัดแยกส่วน | ค่า CC ₅₀ (µg/ml) | | | | |
|------------|----------------|------------------------------|---------|---------|-----------|---------|
| | | เซลล์มะเร็ง | | | เซลล์ปกติ | |
| | | HepG2 | HT-29 | MCF-7 | Vero | HaCaT |
| ราก | HR | 729.29 | 786.57 | 1624.49 | 807.38 | 650.34 |
| | DR | 232.46 | 432.55 | 442.30 | 623.33 | 648.52 |
| | ER | >2000 | >2000 | >2000 | >2000 | 1948.50 |
| | BR | >2000 | >2000 | >2000 | >2000 | >2000 |
| | WR | >2000 | >2000 | >2000 | >2000 | >2000 |
| ใบ | HL | 114.66 | 121.43 | 377.51 | 433.19 | 167.15 |
| | DL | 148.36 | 183.06 | 255.58 | 424.61 | 168.33 |
| | EL | 1562.00 | 1459.38 | 1859.60 | 1907.96 | 734.41 |
| | BL | 1801.84 | >2000 | >2000 | >2000 | 1300.71 |
| | WL | >2000 | >2000 | >2000 | >2000 | >2000 |

4.3 ผลการแยกสารด้วยวิธี column chromatography และการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ

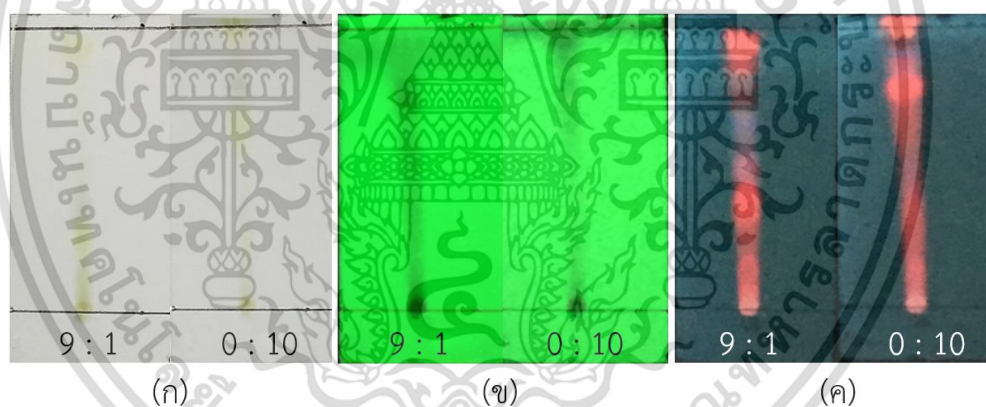
4.3.1 ผลการแยกสารด้วยวิธี column chromatography

จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดแยกส่วน พบว่าสารสกัดแยกส่วนที่ใช้ตัวทำละลายไตคลอโรมีเทน (DL) และเอทิลอะซิเตท (EL) มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี จึงนำมาแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้ตัวทำละลายที่ผ่านการตรวจสอบว่าเป็นระบบตัวทำ

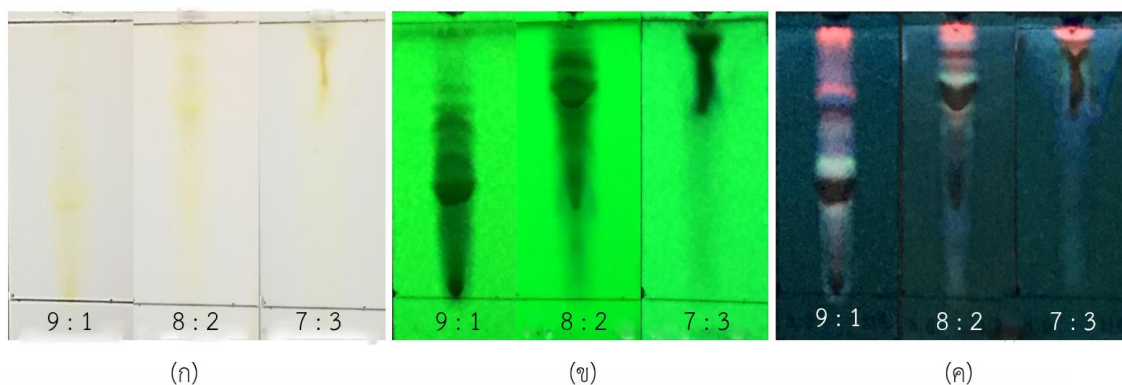
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละลายที่เหมาะสม ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) และใช้ผงซิลิกาเจลเป็นเฟสนิ่ง (stationary phase) ซึ่งการตรวจหาระบบตัวทำละลายที่มีความเหมาะสมต่อการแยกองค์ประกอบของสาร ควรเป็นตัวทำละลายที่สามารถแยกกลุ่มสารออกจากกันได้อย่างชัดเจน รวมถึงแยกกลุ่มสารได้หลายจุด โดยสังเกตสีที่ปรากฏบนแผ่น TLC แบบบาง

จากผลการทดสอบพบว่าระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับแยกองค์ประกอบของสารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DL) คือ ระบบตัวทำละลายเฮกเซนต่อเอทิลอะซิเตท อัตราส่วน 1 : 9 และ 0 : 10 และระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับแยกองค์ประกอบของสารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (EL) คือ ระบบตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอล อัตราส่วน 9 : 1, 8 : 2 และ 7 : 3 ก่อนนำมาสเปรย์ด้วยสารละลาย *p*-anisaldehyde reagent และส่องภายใต้ UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร (แสดงดังรูปที่ 4.7 ก-ค และ 4.8 ก-ค) เพื่อสังเกตการเคลื่อนที่ของสารบนแผ่น TLC แบบบาง สำหรับการปรับระบบตัวทำละลายในอัตราส่วนที่ต่างกัน เป็นการเพิ่มระดับความมีขั้วของระบบตัวทำละลายให้สูงขึ้น เพื่อสามารถแยกสารบนแผ่น TLC แบบบางให้ดียิ่งขึ้น โดยสังเกตจากสารสกัดที่ติดอยู่ที่ Base line จะเคลื่อนที่ไปตามระบบสารได้ดียิ่งขึ้น



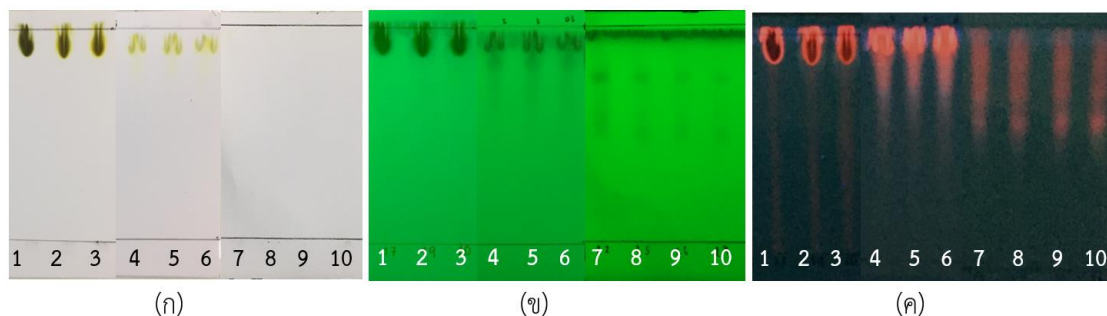
รูปที่ 4.7 การเคลื่อนที่และองค์ประกอบของสารที่แยกบนแผ่น TLC แบบบางของสารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DL) โดยใช้ระบบตัวทำละลายเฮกเซนต่อเอทิลอะซิเตท อัตราส่วน 1 : 9 และ 0 : 10 ตามลำดับ โดย (ก) หลังสเปรย์ด้วย *p*-anisaldehyde reagent (ข) ส่องภายใต้ UV ความยาวคลื่น 254 และ (ค) ส่องภายใต้ UV ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร



รูปที่ 4.8 การเคลื่อนที่และองค์ประกอบของสารที่แยกบนแผ่น TLC แบบบางของสารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (EL) โดยใช้ระบบตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอล อัตราส่วน 9 : 1, 8 : 2 และ 7 : 3 ตามลำดับ โดย (ก) หลังสเปรย์ด้วย *p*-anisaldehyde reagent (ข) ส่องภายใต้ UV ความยาวคลื่น 254 และ (ค) ส่องภายใต้ UV ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร

หลังจากได้ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้ว จึงนำสารสกัดมาแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี column chromatography โดยเก็บสารที่ถูกชะลงมาจากคอลัมน์สู่หลอด หลอดละ 2-3 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารที่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์มาตรวจหาองค์ประกอบของสารโดยใช้แผ่น TLC แบบบาง และนำมาสเปรย์ด้วย *p*-anisaldehyde reagent ส่องภายใต้ UV ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร แสดงดังรูปที่ 4.9 ก-ค เพื่อรวมหลอดที่มีองค์ประกอบของสารเหมือนกันเข้าด้วยกัน ยกตัวอย่างหลอดที่นำมาหยดลงบนแผ่น TLC แบบบางให้ผล ดังนี้ ตัวแทนหลอดที่มีตัวเลข 1-3 และ 7-10 มีองค์ประกอบของสารเหมือนกัน จึงรวมหลอดที่มีตัวเลข 1-3 เป็นสารสกัดส่วนย่อยเดียวกัน (fraction) เป็นสารสกัดส่วนย่อยที่ 1 หลอดที่มีตัวเลข 4-6 เป็นสารสกัดส่วนย่อยที่ 2 และหลอดที่มีตัวเลข 7-10 เป็นสารสกัดส่วนย่อยที่ 3 เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 ตัวอย่างการเคลื่อนที่และองค์ประกอบของสารที่แยกบนแผ่น TLC แบบบางของสารสกัดส่วนย่อยจากผักแว่นต้น โดยตัวเลข 1-10 คือสารที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ของแต่ละหลอดทดลอง โดย (ก) หลังสเปรย์ด้วย *p*-anisaldehyde reagent (ข) ส่องภายใต้ UV ความยาวคลื่น 254 และ (ค) ส่องภายใต้ UV ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร

จากการแยกองค์ประกอบของสารด้วยแผ่น TLC แบบบาง พบว่าสารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DL) สามารถแยกสารด้วยวิธี column chromatography ได้จำนวนทั้งหมด 13 สารสกัดส่วนย่อย คือ DLF1-13 โดยให้รหัสว่า DLF ซึ่งมาจาก Dichloromethane from leave fraction ตามด้วยจำนวนของสารสกัดส่วนย่อยที่แยกได้ (fraction) เช่น สารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนสารที่ 1 จะมีรหัสเป็น DLF1 เช่นเดียวกับสารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (EL) สามารถแยกสารได้จำนวนทั้งหมด 6 สารสกัดส่วนย่อยคือ ELF1-6 โดยให้รหัสว่า ELF ซึ่งมาจาก Ethyl acetate from leave fraction ตามด้วยจำนวนของสารสกัดส่วนย่อยที่แยกได้ เช่น สารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทสารที่ 1 จะมีรหัสเป็น ELF1 เป็นต้น ดังนั้นจึงมีสารสกัดส่วนย่อยรวมเป็น 19 สารสกัด ซึ่งสีของสารสกัดส่วนย่อยปรากฏสีเหลือง สีเหลืองเข้ม สีน้ำตาล ตลอดจนสีเขียวเข้ม มีน้ำหนักรวมของสารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DLF) และเอทิลอะซิเตท (ELF) เท่ากับ 6.98 และ 1.11 กรัม มีร้อยละผลได้รวม 93.78 และ 40.34 ตามลำดับ ซึ่งสารแต่ละส่วนย่อยที่แยกออกมา มีปริมาณน้อย เนื่องจากผักแว่นต้นมีใบขนาดเล็กและบาง เมื่อนำมาสกัดสารจึงทำให้มีปริมาณน้อย ซึ่งถือว่าเป็นข้อจำกัดของการศึกษานี้ ดังนั้นจึงนำสารสกัดส่วนย่อยที่แยกได้ทั้งหมดจำนวน 19 สารสกัด ไปศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acne* ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และนำเฉพาะสารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DLF) จำนวน 13 สารสกัด ไปศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์จำนวน 2 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 และเซลล์เยื่อปอดชนิด Vero ซึ่งเป็นเซลล์ตัวแทนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสะสมและกรองสารพิษ เนื่องจากชาวบ้านนิยมนำไปรับประทาน ดังนั้นการศึกษานี้จึงสนใจศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ทั้ง 2 ชนิด เพื่อให้ทราบว่ามีความปลอดภัยต่อเซลล์ปกติ และสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งตับได้หรือไม่ โดยการศึกษาไม่ได้้นำสารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ELF) มาศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ เนื่องจากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่าสารสกัดแยกส่วนที่ใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (EL) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติต่ำ

4.3.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดส่วนย่อย

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดส่วนย่อยจากใบของผักแว่นต้นที่แยกสารด้วยวิธี column chromatography จำนวน 19 สารสกัด ประกอบด้วยสารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DLF) จำนวน 13 สารสกัด (DLF1-13) และสารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ELF) จำนวน 6 สารสกัด (ELF1-6) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อดิस्क ใช้ยาปฏิชีวนะเจนตามัยซินความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อดิस्क เป็นชุดควบคุมเชิงบวก และใช้ตัวทำละลายเมทานอลเป็นชุดควบคุมเชิงลบ โดยทดสอบเฉพาะกับเชื้อแบคทีเรีย *P. acne* ด้วยวิธี paper disk diffusion เนื่องจากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดแยกส่วน พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acne* ได้ดีที่สุด และเนื่องจากสารสกัดของผักแว่นต้นมีปริมาณน้อย จึงเป็นข้อจำกัดของการศึกษานี้เช่นกัน จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DLF) จำนวน 11 สารสกัด สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acne* ได้ คือ DLF1-10 และ DLF13 โดยมีบริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง $8.20 \pm 0.57 - 10.58 \pm 0.21$ มิลลิเมตร ยกเว้นสารสกัด DLF11 และ DLF12 ที่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acne* ได้ และสารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ELF) จำนวน 5 สารสกัด คือ ELF1-5 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acne* ได้ โดยมีบริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง $15.40 \pm 0.92 - 18.61 \pm 0.69$ มิลลิเมตร ยกเว้นสารสกัด ELF6 ที่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acne* ได้ แสดงรายละเอียดดังตารางที่ 4.17 และรูปที่ 4.10

เมื่อพิจารณาจากสารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DLF) พบว่าสารสกัด DLF 6 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acne* ได้ดี โดยมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 10.58 ± 0.21 มิลลิเมตร และเมื่อพิจารณาจากสารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ELF) พบว่าสารสกัด ELF1, ELF2, ELF4 และ ELF5 มีบริเวณยับยั้งสูงและไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าบริเวณยับยั้งเท่ากับ 18.61 ± 0.69 , 17.90 ± 0.14 , 17.64 ± 0.51 และ 18.51 ± 0.94 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acne* ได้ดีกว่าสารสกัดส่วนย่อยอื่นของผักแว่นต้น แต่เมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณยับยั้งกับยาปฏิชีวนะเจนตามัยซินที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อดิस्क พบว่าสารสกัดส่วนย่อยข้างต้น มีบริเวณยับยั้งต่ำกว่ายาปฏิชีวนะเจนตามัยซินที่มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 29.09 ± 0.12 มิลลิเมตร

จากการพิจารณาเปรียบเทียบผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acne* ของสารสกัดสารสกัดแยกส่วนกับสารสกัดส่วนย่อย พบว่าสารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DL) กับสารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DLF) มีบริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acne* ที่สูงใกล้เคียงกัน โดยสารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DL) มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 10.96 ± 1.29 มิลลิเมตร เป็นไปได้ว่าสารสกัดส่วนย่อยที่ถูกแยกสารให้บริสุทธิ์มากขึ้น ยังคงมีสารสำคัญที่เป็นสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอยู่ จึงทำให้มีฤทธิ์ยับยั้ง

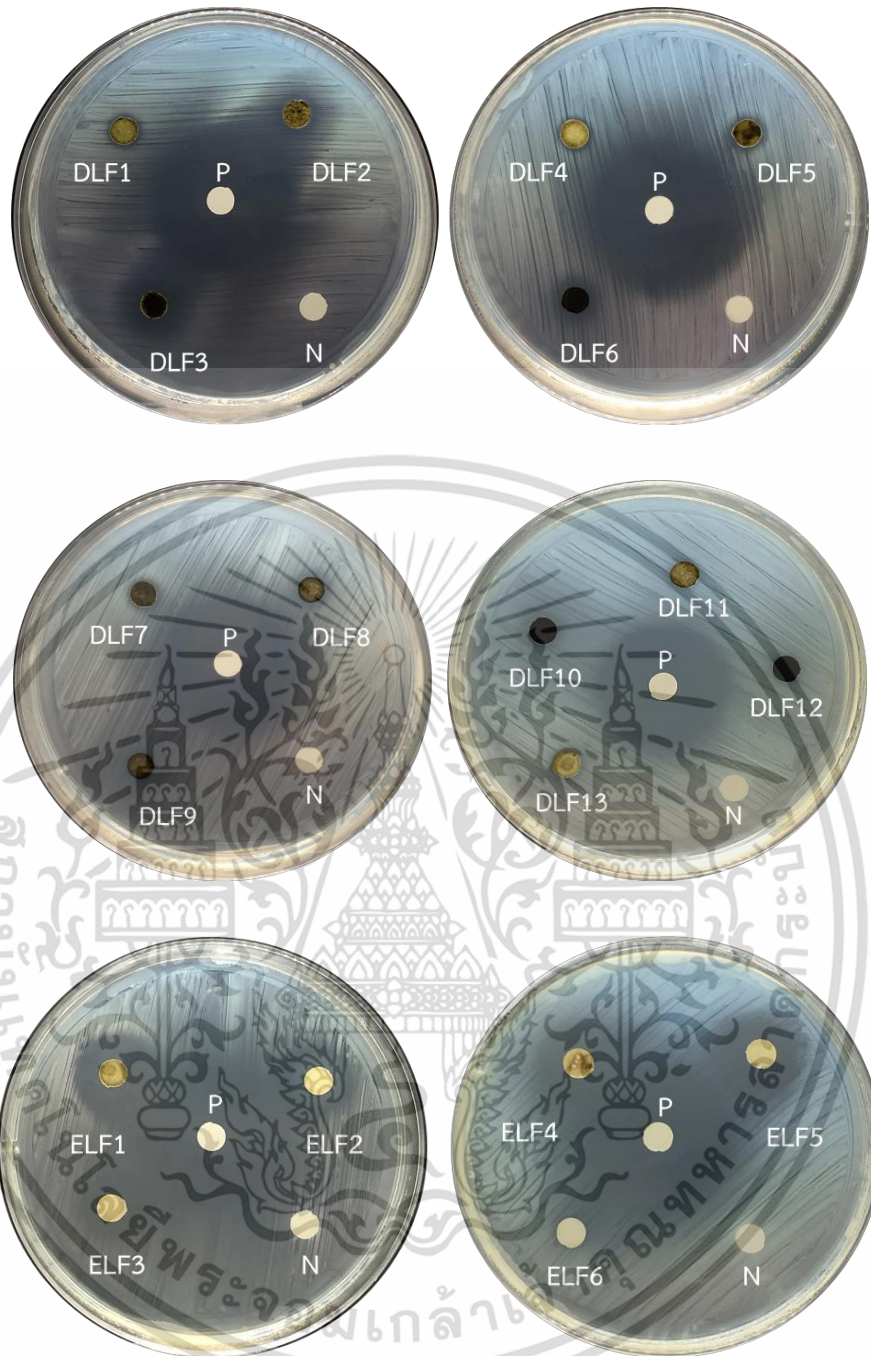
แบคทีเรียสูงเช่นเดิม แต่เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบผลการทดลองของสารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (EL) กับสารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ELF) พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acne* ลดลงเล็กน้อยจากเดิม 22.48 ± 1.03 มิลลิเมตร อาจเป็นเพราะว่าสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียถูกแยกออกจากกัน จึงส่งผลให้สารออกฤทธิ์ถูกลดทอนประสิทธิภาพลง

ตารางที่ 4.17 บริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acne* ของสารสกัดส่วนย่อยของผักแว่นต้นที่แยกด้วยวิธี column chromatography ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อดิสก์ และยาปฏิชีวนะเจนตามัยซินความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อดิสก์

| สารสกัดส่วนย่อย (DLF) | บริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (มิลลิเมตร) | สารสกัดส่วนย่อย (ELF) | บริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (มิลลิเมตร) |
|-----------------------|---|-----------------------|---|
| DLF1 | $8.58^{de} \pm 0.35$ | ELF1 | $18.61^a \pm 0.69$ |
| DLF2 | $8.94^{de} \pm 0.80$ | ELF2 | $17.90^a \pm 0.14$ |
| DLF3 | $9.33^{de} \pm 0.99$ | ELF3 | $15.40^b \pm 0.92$ |
| DLF4 | $8.61^{de} \pm 0.12$ | ELF4 | $17.64^a \pm 0.51$ |
| DLF5 | $8.89^{de} \pm 0.76$ | ELF5 | $18.51^a \pm 0.94$ |
| DLF6 | $10.58^c \pm 0.21$ | ELF6 | 0 |
| DLF7 | $8.41^e \pm 0.58$ | | |
| DLF8 | $9.78^{cd} \pm 0.14$ | | |
| DLF9 | $8.20^e \pm 0.57$ | | |
| DLF10 | $8.64^{de} \pm 0.62$ | | |
| DLF11 | 0 | | |
| DLF12 | 0 | | |
| DLF13 | $8.43^e \pm 0.35$ | | |
| เจนตามัยซิน | | 29.09 ± 0.12 | |

หมายเหตุ DLF คือ สารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ELF คือ สารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท และตัวอักษร a-e ในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan's multiple range test ($p < 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acne* ของสารสกัดส่วนย่อยจากผักแว่นต้นที่แยกสารด้วยวิธี column chromatography ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อดิสก์ โดยตัวอักษร P คือชุดควบคุมเชิงบวก หรือยาปฏิชีวนะเจนตามัยซินความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อดิสก์ และ N คือชุดควบคุมเชิงลบ หรือเมทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งปัจจุบันยังไม่พบการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acne* ในสารสกัดของพืช *C. medicaginea* และพืชสกุล *Crotalaria* โดยการศึกษาชี้ให้เห็นว่าผักแว่นต้นมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุก่อให้เกิดสิวสายพันธุ์ *P. acne* ซึ่งข้อมูลข้างต้นอาจเป็นประโยชน์ในการศึกษาต่อยอดเพื่อเผยแพร่เป็นวารสาร และสามารถใช้พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ได้ในอนาคต

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้นกับงานวิจัยของ Yadava และ Vishwakarma (2014) ได้ตรวจพบสารกลุ่ม allelochemicals ชนิดใหม่ในสารสกัดเมทานอลจากกิ่งของพืช *C. medicaginea* เมื่อนำมาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยใช้ความเข้มข้น 40-100 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสารชนิดที่ 1 ($C_{33}H_{40}O_{21}$) สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *M. luteus* โดยมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 4.66 มิลลิเมตร สารชนิดที่ 2 ($C_{34}H_{42}O_{20}$) สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* และ *E. coli* โดยมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 9.51 และ 6.54 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดเมทานอลจากกิ่งที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ของผักแว่นต้น (S) พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *M. luteus* ได้ดีกว่างานวิจัยข้างต้น โดยมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 7.88 ± 0.30 มิลลิเมตร แต่มีบริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ต่ำกว่าเล็กน้อยเท่ากับ 7.10 ± 0.15 มิลลิเมตร และสารสกัดเมทานอลจากกิ่งที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ของผักแว่นต้น (S) ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ได้ เนื่องจากงานวิจัยข้างต้นเป็นการนำสารกลุ่ม allelochemicals ที่มีความบริสุทธิ์มาทดสอบ ดังนั้นจึงทำให้สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ

นอกจากนี้ปัจจัยด้านสภาพแวดล้อม ความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ และการสกัดสารด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกันก็อาจส่งผลทำให้มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้แตกต่างกัน ดังงานวิจัยของ Devendra และคณะ (2012) ได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากใบของพืช *C. medicaginea* ที่เก็บจากแหล่งเพาะปลูกตามธรรมชาติ และจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดทดลอง โดยใช้สารสกัดที่ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์ พบว่าสารสกัดเอทานอล คลอโรฟอร์ม และปิโตรเลียมอีเทอร์ สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ได้แก่ *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* และ *E. coli* ได้ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสารสกัดของผักแว่นต้น โดยพิจารณาจากความมีขั้วของสารสกัด ได้แก่ ตัวทำละลายเอทานอล เป็นสารที่มีขั้วปานกลาง เช่นเดียวกับตัวทำละลายที่ใช้ในการแยกสารจากใบของผักแว่นต้น (L) คือตัวทำละลายเมทานอล ไดคลอโรมีเทน และเอทิลอะซิเตท ซึ่งพบว่าผลการทดลองที่สอดคล้องกับงานวิจัยข้างต้น โดยมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 7.39 ± 0.22 , 9.57 ± 0.12 และ 8.30 ± 0.16 มิลลิเมตร ตามลำดับ รวมถึงสารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DL) และเอทิลอะซิเตท (EL) ยังมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* โดยมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 10.18 ± 0.64 และ 10.24 ± 0.26 มิลลิเมตร ตามลำดับ แต่มีบริเวณยับยั้งที่ต่ำกว่าสารสกัดเอทานอลของงานวิจัยข้างต้น ที่มีบริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* และ *S. aureus* อยู่ในช่วง 15-20

มิลลิเมตร ตัวทำละลายคลอโรฟอร์มและปิโตรเลียมอีเทอร์ เป็นสารที่ไม่มีขั้ว หรือขั้วต่ำ เช่นเดียวกับ

ไม่ทราบว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวทำละลายที่ใช้ในการแยกสารจากใบของผักแว่นต้น (L) คือตัวทำละลายเฮกเซน พบว่ามีผลการทดลองที่สอดคล้องกับงานวิจัยข้างต้นบางส่วน คือสารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำละลายเฮกเซน (HL) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* โดยมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 10.89 ± 0.56 มิลลิเมตร แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ได้ ซึ่งสารสกัดคลอโรฟอร์มและปิโตรเลียมอีเทอร์ของงานวิจัยข้างต้น มีบริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* และ *S. aureus* อยู่ในช่วง 7-12 และ 6.5-24 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดน้ำของงานวิจัยข้างต้น จากแหล่งเพาะปลูกตามธรรมชาติ และจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดทดลอง พบว่าไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้ โดยสอดคล้องกับสารสกัดแยกส่วนจากน้ำของใบของผักแว่นต้น (WL) ที่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* และ *E. coli* ได้เช่นกัน แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดจากทั้ง 2 แหล่งของงานวิจัยข้างต้นมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งขัดแย้งกับสารสกัดของผักแว่นต้นที่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ อาจเกิดจากงานวิจัยข้างต้นใช้ความเข้มข้นของสารสกัดที่สูงกว่า รวมถึงการแยกสารด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน และสภาพแวดล้อมในการเจริญเติบโตที่ต่างกัน จึงส่งผลทำให้มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่แตกต่างกัน

แม้ว่าสารสกัดจากผักแว่นต้นจะไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ แต่เมื่อพิจารณาผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเมทานอล สารสกัดแยกส่วน และสารสกัดส่วนย่อยของผักแว่นต้น พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายสายพันธุ์ โดยเฉพาะแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ก่อโรคบริเวณผิวหนัง ซึ่งเป็นไปได้ว่าอาจจะมีสารสำคัญที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ และสามารถเป็นแนวทางนำไปใช้ประโยชน์ได้ในอนาคต เช่น ยาฆ่าเชื้อบริเวณผิวหนัง และผลิตภัณฑ์ที่สามารถช่วยลดเชื้อแบคทีเรียบริเวณผิวหนังได้ เป็นต้น

4.3.3 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดส่วนย่อย

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดส่วนย่อยจากผักแว่นต้นที่แยกสารด้วยวิธี column chromatography จำนวน 19 สารสกัดส่วนย่อย ประกอบด้วยสารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DLF1-13) และเอทิลอะซิเตท (ELF1-6) ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopa chome และใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐาน และคำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เมื่อพิจารณาความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DLF) พบว่าสารสกัดส่วนย่อยที่มีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากกว่า 80 มีจำนวน 3 สารสกัด ได้แก่ DLF6, DLF12 และ DLF13 โดยมีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเท่ากับ 83.03 ± 3.38 , 89.59 ± 0.65 และ 83.83 ± 0.44 ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ELF) พบว่าสารสกัดส่วนย่อยที่มีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากกว่า 80 มีจำนวน 2 สารสกัด ได้แก่ ELF1 และ ELF2 มีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเท่ากับ 86.81 ± 0.55 และ 92.31 ± 1.50 ตามลำดับ

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยสารสกัด ELF2 มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุด แต่สารสกัด DLF11 มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสต่ำที่สุด มีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเพียง 11.16 ± 0.71 ดังรายละเอียดในตารางที่ 4.18

และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดแยกส่วนกับสารสกัดส่วนย่อยจากผักแว่นต้น พบว่าสารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DL) และเอทิลอะซิเตท (EL) มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูง และใกล้เคียงกับสารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DLF) และเอทิลอะซิเตท (ELF) โดยมีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเท่ากับ 74.50 ± 1.21 และ 71.64 ± 0.75 ตามลำดับ ซึ่งพบว่าสารสกัดส่วนย่อยทั้งจำนวน 5 สารสกัด คือ DLF6, DLF12, DLF13, ELF1 และ ELF2 มีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากกว่า 80 เป็นไปได้ว่าสารสกัดแยกส่วนที่ถูกนำมาแยกสารให้บริสุทธิ์มากขึ้น ยังคงมีสารสำคัญที่เป็นสารออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และยังออกฤทธิ์ยับยั้งได้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังมีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสใกล้เคียงกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกความเข้มข้น 100-400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละการยับยั้งเท่ากับ 15.02 ± 1.42 - 90.97 ± 2.72

เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเมทานอลของผักแว่นต้น พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่สูงกว่างานวิจัยที่ผ่านมาของ Ketprayoon และ Chaicharoenpong (2018) ที่พบว่าสารสกัดเมทานอลของปอเทือง (*C. juncea*) ใช้ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเพียง 16.12 ± 1.96 เช่นเดียวกับพืชในวงศ์เดียวกัน (Fabaceae) พบว่าสารสกัดเมทานอลจากเมล็ดของสะตอ (*P. speciosa*) มีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสต่ำเท่ากับ 14.08 ± 0.71 นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดเมทานอลของผักแว่นต้นมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงกว่าสารสกัดที่อยู่ในวงศ์เดียวกัน ดังงานวิจัยของ Muddathir และคณะ (2016) ที่พบว่าสารสกัดเมทานอลจากเนื้อไม้ของพืช *A. tortilis*, *A. seyal* var. *seyal* Del. *nilotica* และ *A. seyal* var. *fistula* และสารสกัดเมทานอลจากใบของพืช *P. aculeata* มีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเท่ากับ 33.65, 48.91, 4.40 และ 12.20 ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าสารสกัดของผักแว่นต้นมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยข้างต้นยังแสดงให้เห็นว่าพืชแต่ละชนิด และส่วนของพืชที่นำมาทดสอบ ส่งผลทำให้มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่แตกต่างกัน

จากการพิจารณาเปรียบเทียบผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากผักแว่นต้น ได้แก่ สารสกัดเมทานอล สารสกัดแยกส่วน และสารสกัดส่วนย่อย พบว่าผลการทดลองของสารสกัดทั้ง 3 กลุ่ม มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่สอดคล้องกัน โดยมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดี และเมื่อนำมาแยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction (สารสกัดแยกส่วน) และ column chromatography (สารสกัดส่วนย่อย) เพื่อให้สารบริสุทธิ์มากขึ้น พบว่ามีสารสกัดแยกส่วนจำนวน 4 สารสกัด และสารสกัดส่วนย่อยจำนวน 18 สารสกัด มีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากกว่า 50 เป็นไปได้ว่าสารสกัดของผักแว่นต้นอาจจะมีสารสำคัญที่สามารถจับกับโลหะ

คอปเปอร์ที่เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีกว่าสาร L-dopa จึงส่งผลให้เกิดการสร้างเมลานินที่ลดลง (ณพัฐอร, 2563; Ramsden และ Riley, 2014) ดังนั้นสารสกัดจากผักแว่นต้นมีความน่าสนใจอย่างยิ่ง ที่สามารถต่อยอดพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมความงาม และเวชสำอางที่ช่วยให้ผิวกระจ่างใส และลดความหมองคล้ำของผิวได้

ตารางที่ 4.18 ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดส่วนย่อยจากผักแว่นต้นที่แยกสารด้วยวิธี column chromatography ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

| สารสกัด ส่วนย่อย | ค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (%) | |
|---------------------|---|---------------------------|
| | DLF | ELF |
| 1 | 62.30 ^j ±3.19 | 86.81 ^{bc} ±0.55 |
| 2 | 76.07 ^h ±1.37 | 92.31 ^a ±1.50 |
| 3 | 72.32 ⁱ ±0.62 | 76.16 ^h ±1.23 |
| 4 | 79.83 ^{ef} ±1.88 | 79.57 ^{fg} ±0.92 |
| 5 | 78.06 ^{gh} ±2.18 | 76.31 ^{gh} ±1.32 |
| 6 | 83.03 ^{de} ±3.38 | 70.59 ⁱ ±3.66 |
| 7 | 79.84 ^{ef} ±2.89 | |
| 8 | 75.53 ^h ±1.34 | |
| 9 | 52.10 ^k ±1.64 | |
| 10 | 62.50 ^j ±0.86 | |
| 11 | 11.16 ^l ±0.71 | |
| 12 | 89.59 ^{ab} ±0.65 | |
| 13 | 83.83 ^{cd} ±0.44 | |

หมายเหตุ DLF คือ สารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ELF คือ สารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท และตัวอักษร a-l ในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan's multiple range test ($p < 0.05$)

4.3.4 ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดส่วนย่อย

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดส่วนย่อยจากผักแว่นต้น โดยทดสอบกับเซลล์จำนวน 2 ชนิด คือเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 และเซลล์เยื่อบุไตลิงชนิด Vero ด้วยวิธี MTT โดยทดสอบเฉพาะในสารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DLF) จำนวน 13 สารสกัด (DLF1-13) ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ยาต้านมะเร็งชนิดไมโทมายซิน ซี ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นชุดควบคุมเชิงบวก และรายงานผลเป็นค่าร้อยละความเป็นพิษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อเซลล์ของสารสกัด ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ไม่ได้ทดสอบกับสารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ELF) เนื่องจากพบว่าสารสกัดแยกส่วนที่ใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (EL) มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งระดับชนิด HepG2 เซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29 เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 เซลล์เยื่อปอดชนิด Vero ต่ำ และเซลล์เคอราติโนไซต์ชนิด HaCaT ปานกลาง ดังนั้นจึงไม่นำมาศึกษาในด้านความเป็นพิษต่อเซลล์ จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดส่วนย่อย DLF1-13 มีค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งระดับชนิด HepG2 อยู่ในช่วง 30.04 ± 1.84 - 90.45 ± 0.42 และมีค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์เยื่อปอดชนิด Vero อยู่ในช่วง 11.04 ± 0.44 - 89.74 ± 0.44 โดยสารสกัดส่วนย่อยที่มีค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งระดับชนิด HepG2 มากกว่า 80 มีจำนวน 9 สารสกัด ได้แก่ DLF1, DLF5, DLF6 และ DLF8-13 มีค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ 90.07 ± 0.18 , 90.45 ± 0.42 , 87.31 ± 0.56 , 88.96 ± 0.40 , 90.29 ± 0.16 , 89.17 ± 0.28 , 89.23 ± 0.64 , 89.49 ± 0.16 และ 82.22 ± 3.71 ตามลำดับ ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งระดับชนิด HepG2 ได้ดี ส่วนสารสกัด DLF7 มีค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งระดับชนิด HepG2 ต่ำที่สุดเท่ากับ 30.04 ± 1.84 และเมื่อพิจารณาสารสกัดส่วนย่อยที่มีค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์เยื่อปอดชนิด Vero มากกว่า 80 มีจำนวน 6 สารสกัด ได้แก่ DLF5, DLF6, DLF8, DLF9, DLF10 และ DLF12 โดยมีค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 80.85 ± 2.78 , 89.74 ± 0.44 , 89.40 ± 0.44 , 80.96 ± 1.75 , 89.07 ± 0.33 และ 87.91 ± 0.92 ตามลำดับ ส่วนสารสกัด DLF7 มีค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์เยื่อปอดชนิด Vero ต่ำที่สุดเช่นกันเท่ากับ 11.04 ± 0.44

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งระดับชนิด HepG2 และเซลล์เยื่อปอดชนิด Vero ของสารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DLF) พบว่าสารสกัดส่วนย่อยจำนวน 6 สารสกัด สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ทั้ง 2 ชนิดได้ดี โดยมีค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์สูง ได้แก่ DLF5, DLF6, DLF8, DLF9, DLF10 และ DLF12 ส่วนสารสกัดส่วนย่อย DLF1, DLF11 และ DLF13 สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งระดับชนิด HepG2 ได้ดี แต่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติเยื่อปอดชนิด Vero ต่ำ ส่วนสารสกัด DLF2-4 และ DLF7 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ทั้ง 2 ชนิดต่ำเช่นเดียวกัน

จากการเปรียบเทียบค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งระดับชนิด HepG2 และเซลล์เยื่อปอดชนิด Vero กับยาต้านมะเร็งชนิดไมโทมัซซิน ซี ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 78.98 ± 0.55 และ 49.94 ± 0.42 ตามลำดับ ซึ่งพบว่ายาต้านมะเร็งชนิดไมโทมัซซิน ซี มีค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ทั้ง 2 ชนิด ต่ำกว่าสารสกัดส่วนย่อยจากผักแว่นต้นจำนวน 7 สารสกัด คือ DLF1, DLF5, DLF6, DLF8-10 และ DLF 12 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ทั้ง 2 ชนิดได้ดี ซึ่งสารสกัดส่วนย่อยของผักแว่นต้นโดยส่วนใหญ่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ ดังนั้นอาจจะไม่เหมาะสมสำหรับนำไปรับประทาน ซึ่งอาจทำให้เกิดการสะสมสารพิษที่ตับและไต และทำให้อวัยวะทั้งสองเกิดการทํางานที่ผิดปกติได้ หาก

คำนึงถึงการนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคต พบว่าสารสกัด DLF11 และ DLF13 มีแนวโน้มว่าจะมีความ
 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใดเห็นประโยชน์อันใดจากการ
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหมาะสมในการนำไปพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งระดับได้ เนื่องจากมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งระดับชนิด HepG2 สูง แต่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เยื่อบุไตลิงชนิด Vero ที่เป็นเซลล์ปกติต่ำ ดังรายละเอียดในตารางที่ 4.19 แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาในสัตว์ทดลองต่อไป เพื่อพิสูจน์ว่ามีความปลอดภัยต่อร่างกายหรือไม่

จากงานวิจัยที่ผ่านมายังไม่พบการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์จากสารสกัดของพืช *C. medicaginea* มีเพียงงานวิจัยของ Fletcher และคณะ (2011) ตรวจพบสารไพโรลิซิดีน แอลคาลอยด์ (pyrrolizidine alkaloids) ชนิดใหม่กลุ่ม otonecine alkaloids โดยให้ชื่อว่า “Cromedine” ซึ่งเป็นสารพิษตามธรรมชาติที่ส่งผลเสียต่อตับมนุษย์และสัตว์ โดยงานวิจัยข้างต้นมีความใกล้เคียงกับการศึกษานี้ จะเห็นว่าสารสกัดแยกส่วนของผักแว่นต้น ได้แก่ สารสกัดแยกส่วนจากรากและใบที่ใช้ตัวทำละลายเฮกเซน (HR และ HL) ไคคลอโรมีเทน (DR และ DL) และสารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายไคคลอโรมีเทน (DLF) จำนวน 6 สารสกัด ได้แก่ DLF5, DLF6, DLF8-10 และ DLF12 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติเยื่อบุไตลิงชนิด Vero สูง ถึงแม้จะไม่ได้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ตับของมนุษย์โดยตรง แต่อาจมีแนวโน้มว่าจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ตับของมนุษย์สูงเช่นกัน

นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำละลายเฮกเซน (HL) และ ไคคลอโรมีเทน (DL) ของผักแว่นต้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 และเซลล์เยื่อบุไตลิงชนิด Vero ซึ่งใกล้เคียงกับสารสกัดเอทานอลของพืช *C. agatiflora* ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 233.1 ± 6.2 และ 352.4 ± 5.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Le Roux, 2011) แต่พบว่าสารสกัดเมทานอล สารสกัดแยกส่วน และสารสกัดส่วนย่อยของผักแว่นต้น มีความสามารถในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเต้านมต่ำกว่างานวิจัยดังต่อไปนี้ ได้แก่ งานวิจัยของ Hu และคณะ (2017) ได้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารกลุ่ม homoisoflavonoids ที่แยกจากสารสกัดเอทานอลจากเมล็ดของหิงเม้น (*C. pallida*) พบว่าสาร homoisoflavonoids ชนิดที่ 2 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 สูง โดยมีค่า IC_{50} เพียง 6.77 ± 0.11 ไมโครโมลาร์ และงานวิจัยของ Rajesh และคณะ (2019) พบว่าสารสกัดเมทานอลของพืช *C. longipes* มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7, MDA-MB 468 และ MDA-MB 231 มีค่า IC_{50} เพียง 40.51, 35.19 และ 39.12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเต้านมได้ดีกว่าสารสกัดจากผักแว่นต้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพืชแต่ละชนิด และส่วนของพืชที่นำมาทดสอบต่างกัน ส่งผลให้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่แตกต่างกัน

เมื่อเปรียบเทียบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดเมทานอล สารสกัดแยกส่วน และสารสกัดส่วนย่อยของผักแว่นต้น พบว่าสารสกัดทั้ง 3 กลุ่ม มีผลการทดลองสอดคล้องกัน โดยสารสกัดเมทานอลจากใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ของผักแว่นต้น (L) สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งระดับชนิด HepG2, เซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29 และเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ได้ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการผลการทดลองของสารสกัดแยกส่วน ที่พบว่าสารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใดเห็นใบเขียวหรือใบเหลืองนี้

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละลายเฮกเซน (HL) และไดคลอโรมีเทน (DL) มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิดสูง ทั้งนี้ยังพบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ คือเซลล์เยื่อไ้บุไตลิงชนิด Vero และเซลล์เคอราติโนไซท์ชนิด HaCaT ด้วยเช่นกัน และเมื่อนำสารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DL) มาแยกสารด้วยวิธี column chromatography โดยพบว่าสารสกัดส่วนย่อยมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่อเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 และเซลล์เยื่อไ้บุไตลิงชนิด Vero สูงเช่นกัน ดังนั้นการศึกษานี้สามารถเป็นข้อมูล เพื่อใช้เป็นแนวทางในการเลือกนำไปศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ในสัตว์ทดลอง เพื่อพัฒนาต่อยอดเป็นยาต้านมะเร็ง รวมถึงพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริม และผลิตภัณฑ์เวชสำอางได้

ตารางที่ 4.19 ร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DLF) ที่แยกสารด้วยวิธี column chromatography ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และยาต้านมะเร็งไมโทมายซิน ซี ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

| สารสกัดส่วนย่อย | ร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ (%) | |
|-----------------|-------------------------------|------------------------------|
| | เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 | เซลล์เยื่อไ้บุไตลิงชนิด Vero |
| DLF1 | 90.07 ^a ±0.18 | 59.00 ^c ±1.24 |
| DLF2 | 35.19 ^e ±0.84 | 19.76 ^g ±2.25 |
| DLF3 | 58.33 ^d ±4.82 | 25.17 ^f ±1.75 |
| DLF4 | 64.01 ^c ±2.49 | 18.98 ^g ±3.08 |
| DLF5 | 90.45 ^a ±0.42 | 80.85 ^b ±2.78 |
| DLF6 | 87.31 ^a ±0.56 | 89.74 ^a ±0.44 |
| DLF7 | 30.04 ^f ±1.84 | 11.04 ^h ±0.44 |
| DLF8 | 88.96 ^a ±0.40 | 89.40 ^a ±0.44 |
| DLF9 | 90.29 ^a ±0.16 | 80.96 ^b ±1.75 |
| DLF10 | 89.17 ^a ±0.28 | 89.07 ^a ±0.33 |
| DLF11 | 89.23 ^a ±0.64 | 47.63 ^d ±1.33 |
| DLF12 | 89.49 ^a ±0.16 | 87.91 ^a ±0.92 |
| DLF13 | 82.22 ^b ±3.71 | 38.25 ^e ±1.91 |
| ไมโทมายซิน ซี | 78.98±0.55 | 49.94±0.42 |

หมายเหตุ DLF คือ สารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน และตัวอักษร a-h ในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึง ความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan's multiple range test ($p < 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านต่าง ๆ ของผักแว่นต้น พบว่าสารสกัดจากผักแว่นต้นมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจหลายด้าน และสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการต่อยอดพัฒนาเป็นยารักษาโรค อาหารเสริม และผลิตภัณฑ์เวชสำอางในอนาคตได้ ดังนั้นการศึกษานี้จึงเลือกสารสกัดแยกส่วนจำนวน 6 สารสกัด ที่แสดงออกถึงฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกัน ได้แก่ สารสกัดแยกส่วนจากรากและใบที่ใช้ตัวทำละลายเฮกเซน (HR และ HL) ไดคลอโรมีเทน (DR และ DL) เอทิลอะซิเตท (ER และ EL) สารสกัดส่วนย่อยจำนวน 19 สารสกัด คือ สารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DLF1-13) และสารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ELF1-6) นำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC-MS เพื่อวิเคราะห์หาสารสำคัญที่น่าสนใจ เพื่อให้ทราบถึงชนิดของสารสำคัญที่มีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกัน เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต

4.4 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากผักแว่นต้นด้วยเทคนิค

GC-MS

4.4.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดแยกส่วนที่แยกสารด้วยวิธี

liquid-liquid extraction

นำสารสกัดแยกส่วนจำนวน 6 สารสกัด ประกอบด้วยสารสกัดแยกส่วนจากรากจำนวน 3 สารสกัด ได้แก่ สารสกัดแยกส่วนที่ใช้ตัวทำละลายเฮกเซน (HR) ไดคลอโรมีเทน (DR) และเอทิลอะซิเตท (ER) และสารสกัดแยกส่วนจากใบจำนวน 3 สารสกัด ได้แก่ สารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายเฮกเซน (HL) ไดคลอโรมีเทน (DL) และเอทิลอะซิเตท (EL) มาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC-MS โดยใช้เครื่องมือ GC : agilent technologies รุ่น 6890n และ MS : agilent technologies รุ่น 5973 inert ซึ่งการศึกษานี้ไม่ได้นำสารสกัดแยกส่วนจากรากและใบที่ใช้ตัวทำละลายบิวทานอล (BR และ BL) และน้ำ (WR และ WL) มาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี เนื่องจากมีฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านต่าง ๆ ต่ำ จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดแยกส่วนจากรากและใบตรวจพบสารสำคัญหลายชนิด โดยตรวจพบสารสำคัญชนิดเดียวกัน ดังนี้ สาร 9-octadecenamide และ hexadecanamide มีปริมาณในช่วง 14.23-72.46 และ 5.45-10.78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยพบสาร 9-octadecenamide ปริมาณมากที่สุด แต่สารสกัดแยกส่วนที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DR) ไม่พบสาร hexadecanamide แต่พบสารในกลุ่มเดียวกันคือ hexadecane ปริมาณ 4.20 เปอร์เซ็นต์

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดแยกส่วนจากรากและใบของผักแว่นต้น พบสารสำคัญที่น่าสนใจจำนวน 3 ชนิด ซึ่งอาจจะส่งผลต่อฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ ได้แก่ pulegone เป็นสารกลุ่มคีโตน และ loliolide เป็นสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ ตรวจพบในสารสกัดแยกส่วนจากรากและใบที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DR และ ER) เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

DL) ปริมาณ 6.13-11.05 และ 5.44-33.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสาร 1-Butanol, 3-methyl, formate หรือ Isoamyl alcohol ซึ่งเป็นสารกลุ่มแอลกอฮอล์ ตรวจพบเฉพาะในสารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (EL) ปริมาณ 50.98 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ที่พบว่าสารสกัดแยกส่วนทั้ง 3 สารสกัด สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ทั้ง 6 สายพันธุ์ คือ *B. cereus*, *B. subtilis*, *M. luteus*, *S. aureus*, *S. epidermidis* และ *P. acne* ซึ่งสารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (EL) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรีย *P. acne* เนื่องจากมีปริมาณสาร 1-Butanol, 3-methyl, formate สูง ซึ่งสารสำคัญทั้ง 3 ชนิด ไม่พบในสารสกัดแยกส่วนจากรากและใบที่ใช้ตัวทำละลายเฮกเซน (HR และ HL) และไม่พบในสารสกัดแยกส่วนจากรากที่ใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ER) จึงทำให้มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียต่ำ

และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ตรวจพบสารสำคัญที่อาจจะมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส คือสาร 13-Decosenamide เป็นกรดไขมัน และ loliolide เป็นสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ โดยสารสกัดแยกส่วนจากรากและใบที่ใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ER และ EL) ตรวจพบสาร 13-Decosenamide ปริมาณ 7.92 และ 3.60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนสารสกัดแยกส่วนจากรากและใบที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DR และ DL) ตรวจพบสาร loliolide ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดแยกส่วน ที่พบว่าสารสกัดข้างต้นมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดี โดยเฉพาะสารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DL) และเอทิลอะซิเตท (EL) ซึ่งไม่พบสารเหล่านี้ในสารสกัดแยกส่วนจากรากและใบที่ใช้ตัวทำละลายเฮกเซน (HR และ HL) จึงเป็นไปได้ว่าทำให้มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสต่ำ

นอกจากนี้ยังตรวจพบสารสำคัญที่คาดว่าจะอาจเกี่ยวข้องกับความเป็นพิษต่อเซลล์ ได้แก่ สาร phytol เป็นกรดไขมัน สาร dibutyl phthalate เป็นสารประกอบอินทรีย์ สาร phytosterol เป็นสารกลุ่มสเตียรอยด์ สาร pulegone และสาร loliolide ซึ่งสาร phytol และ dibutyl phthalate ตรวจพบในสารสกัดแยกส่วนจากรากและใบที่ใช้ตัวทำละลายเฮกเซน (HR และ HL) ปริมาณ 0.94-11.45 และ 1.56-1.27 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ตรวจพบสาร phytosterol เฉพาะในสารสกัดแยกส่วนจากรากที่ใช้ตัวทำละลายเฮกเซน (HR) ได้แก่ campesterol, beta-stigmasterol และ gamma-sitosterol ปริมาณ 8.57, 16.66 และ 20.82 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนสาร pulegone และ loliolide ตรวจพบในสารสกัดแยกส่วนจากรากและใบที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DR และ DL) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ ที่พบว่าสารสกัดข้างต้น สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งได้ดี ได้แก่ เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 เซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29 มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 รวมถึงมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ คือ เซลล์เยื่อบุไตชนิด Vero และเซลล์เคอราติโนไซต์ชนิด HaCaT แต่ไม่พบสารเหล่านี้ในสารสกัดแยกส่วนจากรากและใบที่ใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ER และ EL) จึงทำให้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ

ดังรายละเอียดในตาราง 4.20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.20 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดแยกส่วนของผักแว่นต้นด้วยเทคนิค GC-MS

| สารสกัดแยกส่วน | | | | | |
|----------------|--|----------|------------------|---------------------------------|---|
| สารสกัด | องค์ประกอบทางเคมี | Area (%) | สารสกัด | องค์ประกอบทางเคมี | Area (%) |
| HR | Cyclotetradecane | 0.80 | HL | Tetradecane | 1.08 |
| | Pentadecanoic acid, 14-methyl-, methyl ester | 6.93 | | Nonadecane | 0.73 |
| | Dibutyl phthalate | 2.56 | | Hexadecanoic acid, methyl ester | 5.71 |
| | Phytol | 0.94 | | Dibutyl phthalate | 1.27 |
| | Hexadecanamide | 5.45 | | Linolenic acid, methyl ester | 13.84 |
| | 9-Octadecenamide | 14.23 | | Phytol | 11.45 |
| | Campesterol | 8.57 | | Hexadecanamide | 10.42 |
| | beta-Stigmasterol | 16.66 | | 9-Octadecenamide | 44.63 |
| | gamma-Stigmasterol | 20.82 | | | |
| DR | 3-Hydroxy-4-methoxymandelic acid | 11.05 | DL | Pulegone | 6.13 |
| | Pulegone | 8.87 | | Isololiolide | 4.77 |
| | Hexadecane | 4.20 | | Loliolide | 33.13 |
| | Benzaldehyde, 4-hydroxy-3,5-dimethoxy | 14.16 | | Hexadecanamide | 3.12 |
| | Loliolide | 5.44 | | | |
| | Butyl cyclohexyl phthalate | 6.46 | | 9-Octadecenamide | 14.56 |
| | 9-Octadecenamide | 45.11 | | EL | 1-Butanol, 3-methyl, formate หรือ Isoamyl alcohol |
| ER | Hexadecanamide | 10.78 | Hexadecanamide | | 7.07 |
| | 9-Octadecenamide | 72.46 | 9-Octadecenamide | | 37.61 |
| | 13-Decosenamide | 7.92 | 13-Decosenamide | | 3.60 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีที่พบในสารสกัดแยกส่วนจากรากและใบของผักแว่นต้น มีความสอดคล้องกับผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ สาร 13-Decosenamide เป็นสารกลุ่มที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี (Khan และคณะ, 2019) สาร 1-Butanol, 3-methyl, formate เป็นสารกลุ่มแอลกอฮอล์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* ได้ (Irshad และคณะ, 2024) ซึ่งสารสกัดแยกส่วนจากรากและใบที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DR และ DL) ตรวจพบสาร pulegone ที่ให้ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Elansary และคณะ (2018) โดยมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* และ *S. aureus* ได้ และสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 และเซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29 ได้เช่นเดียวกัน สาร loliolide หรือ isololiolide เป็นสารแคโรทีนอยด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพโดดเด่นด้านการต้านอนุมูลอิสระ (Yang และคณะ, 2011) มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินของผิวหนังได้ (Park และคณะ, 2018) และยังมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ (Saad, 2009) นอกจากนี้ยังตรวจพบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์ ดังงานวิจัยของ Sukor และคณะ (2022) ได้ตรวจพบสาร loliolide ในสารสกัดเมทานอลของพืช *E. indica* ว่ามีพิษต่อเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 และสารกลุ่ม phthalate ซึ่งจัดเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC3 และมะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (Al-Shehri และคณะ, 2019) นอกจากนี้ สารกลุ่ม phytosterols ที่ ตรวจพบในพืช ได้แก่ campesterol, beta-stigmasterol และ gamma-sitosterol ยังตรวจพบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ดังงานวิจัยของ Ayele และคณะ (2022) ได้ตรวจพบสาร stigmasterol สารสกัดเมทานอลจากเปลือกลำต้นของพืช *A. gummifera* สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้

4.3.2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดส่วนย่อยที่แยกสารด้วยวิธี column chromatography

จากผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดส่วนย่อยของผักแว่นต้นจากตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DLF1-13) และเอทิลอะซิเตท (ELF1-6) พบว่าสารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทจำนวน 5 สารสกัด คือ ELF1-5 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acne* ได้ดีกว่าสารสกัดส่วนย่อยอื่น ยกเว้นสารสกัดส่วนย่อย DLF11, DLF12 และ ELF6 ที่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acne* ได้ สำหรับผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าสารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน DLF6, DLF12, DLF13 และสารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท ELF1 และ ELF2 มีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากกว่า 80 ซึ่งสารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท ELF2 มีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากถึง 92.31 ± 1.50 แต่เนื่องจากสารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (EL) มีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 เซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29 และมะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ต่ำ ดังนั้นจึงไม่ได้นำสารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ELF1-6) ไปศึกษาความเป็นพิษต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใดเห็นว่าเป็นประโยชน์ในการนำ

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ ELF6 ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ที่พบว่าสารสกัดส่วนย่อย ELF6 ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acne* ได้ แม้ว่าสารสกัดส่วนย่อย ELF1 จะไม่พบสาร salicylic acid แต่ตรวจพบสารอื่นที่อาจจะมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีเช่นกัน คือสาร succinimide ที่มีปริมาณ 2.83 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสาร lauric acid ตรวจพบในสารสกัดส่วนย่อย ELF4 และ ELF5 มีปริมาณ 0.407 และ 0.488 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับสารสำคัญที่คาดว่าจะมีผลต่อฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ไทโรซิเนส ซึ่งแต่ละสารสกัดอาจจะมีสารสำคัญที่ต่างแตกต่างกัน เช่น สาร benzoic acid ตรวจพบในสารสกัดส่วนย่อย ELF2 และ ELF3 ปริมาณ 5.19 และ 3.526 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สาร pluchidiol และ daidzein ตรวจพบเฉพาะในสารสกัดส่วนย่อย ELF1 ปริมาณ 2.14 และ 1.29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสาร kaempferide ตรวจพบในสารสกัดส่วนย่อย ELF2 และ ELF3 ปริมาณ 2.99 และ 7.52 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งแสดงรายละเอียดขององค์ประกอบทางเคมีในตารางที่ 4.22

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีที่พบในสารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DLF) และสารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ELF) พบว่าสารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DLF) ไม่พบสาร salicylic acid, pluchidiol, daidzein และ kaempferide ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ที่มีฤทธิ์ต่ำกว่าสารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ELF) จึงทราบได้ว่าสารสำคัญ salicylic acid มีผลต่อฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอย่างมาก เช่นเดียวกับสาร pluchidiol, daidzein และ kaempferide ที่อาจจะมีผลต่อฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยเช่นกัน ส่วนสารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ELF) ไม่พบสารกลุ่ม phthalate ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ทดสอบกับสารสกัดแยกส่วนจากใบที่ใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (EL) ที่พบว่ามียุทธียับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 เซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนัก HT-29 และเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ต่ำ ซึ่งเป็นไปได้ว่าสารกลุ่ม phthalate มีผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์

ตารางที่ 4.21 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดส่วนย่อย DLF1-13 ด้วยเทคนิค GC-MS

| สารสกัดส่วนย่อย DLF | | | | | |
|---------------------|--|----------|---------|-------------------------------------|----------|
| สารสกัด | สารสำคัญ | Area (%) | สารสกัด | สารสำคัญ | Area (%) |
| DLF1 | Loliolide | 0.17 | DLF4 | Benzeneacetic acid | 2.22 |
| | Hexadecanoic acid | 2.51 | | Epoxylinalool | 2.93 |
| | bibutyl phthalate | 1.02 | | Loliolide | 1.72 |
| | Phytol | 0.33 | | neophytadiene | 1.90 |
| | neophytadiene | 3.37 | | Hexadecanoic acid | 46.28 |
| | 2-Methyldecane | 0.25 | | Hexadecanamide | 6.03 |
| DLF2 | Loliolide | 0.44 | DLF5 | 9-Octadecenamide | 28.01 |
| | neophytadiene | 1.06 | | Benzeneacetic acid | 2.37 |
| | Hexadecanoic acid | 8.99 | | Loliolide | 0.62 |
| | Methyl linolenate | 7.26 | | succinimide | 1.94 |
| | Phytol | 3.07 | | Hexadecanoic acid | 60.47 |
| | Vitamin F | 63.73 | | Octadecanoic acid | 6.73 |
| | Medicarpin | 0.89 | | Diisooctyl phthalate | 10.46 |
| | Phenol, 2,4-bis (1,1-dimethylethyl) | 0.18 | | Lauric acid | 0.19 |
| | Squalene | 1.39 | | Diisooctyl phthalate | 10.46 |
| | Stigmsta-5,22-dien-3-ol | 1.89 | | Phenol, 2,4-bis (1,1-dimethylethyl) | 0.27 |
| | gamma-Sitosterol | 2.56 | | Benzoic acid | 0.25 |
| DLF3 | Loliolide | 6.78 | DLF6 | 9-Octadecenamide | 33.12 |
| | neophytadiene | 1.30 | | Octadecanoic acid | 4.30 |
| | Hexadecanoic acid | 18.59 | | Di-n-octyl phthalate | 45.07 |
| | Phytol | 3.17 | | beta-Sitosterol | 2.18 |
| | 11,14,17-Eicosatrienoic acid, methyl ester | 34.95 | DLF7 | Benzoic acid | 1.59 |
| | 9-Octadecenamide | 2.42 | | Loliolide | 0.37 |
| | Medicarpin | 0.63 | | Hexadecanoic acid | 17.75 |
| | Pulegone | 0.41 | | 9-Octadecenamide | 3.17 |
| | Campesterol | 1.99 | | beta-Sitosterol | 0.48 |
| | Stigmsta-5,22-dien-3-ol | 5.50 | | Lauric acid | 1.59 |
| | gamma-Sitosterol | 7.55 | | Butyl benzyl phthalate | 0.72 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.21 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดส่วนย่อย DLF1-13 ด้วยเทคนิค GC-MS (ต่อ)

| สารสกัดส่วนย่อย DLF | | | | | |
|---------------------|------------------------------|----------|---------|------------------------------|----------|
| สารสกัด | สารสำคัญ | Area (%) | สารสกัด | สารสำคัญ | Area (%) |
| DLF8 | Hexadecanamide | 13.79 | DLF11 | Di-n-octyl phthalate | 56.45 |
| | 9-Octadecenamide | 64.36 | | Hexadecanoic acid | 37.11 |
| | Tetradecamide | 10.81 | | 9-Octadecenamide | 2.23 |
| | Di-n-octyl phthalate | 7.86 | | benzoic acid | 4.14 |
| DLF9 | 9-Octadecenamide | 46.05 | DLF12 | Loliolide | 0.24 |
| | Di- (2-ethylhexyl) phthalate | 35.21 | | bis (2-ethylhexyl) phthalate | 82.92 |
| | Tetradecamide | 9.58 | | Neophytadiene | 0.81 |
| | Octadecenamide | 6.27 | | 9-Octadecenamide | 3.12 |
| | Hexadecanoic acid | 2.89 | | benzoic acid | 1.86 |
| | | | | | |
| DLF10 | Di- (2-ethylhexyl) phthalate | 50.16 | DLF13 | Loliolide | 0.74 |
| | 9-Octadecenamide | 28.70 | | 9-Octadecenamide | 3.48 |
| | Hexadecanoic acid | 15.92 | | Di- (2-ethylhexyl) phthalate | 86.04 |
| | Octadecenamide | 5.22 | | | |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.22 ผลการวิเคราะห์ห้องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดส่วนย่อย ELF1-6 ด้วยเทคนิค GC-MS

| สารสกัดส่วนย่อย ELF | | | | | |
|---------------------|--|----------|---------|------------------------|----------|
| สารสกัด | สารสำคัญ | Area (%) | สารสกัด | สารสำคัญ | Area (%) |
| ELF1 | Benzeneethanol, 4-hydroxy | 7.29 | ELF4 | 3-Ethyl-2-pentene | 64.17 |
| | Tetradecanoic acid | 8.49 | | Resorcinol | 2.22 |
| | Pluchidiol | 2.14 | | Salicylic acid | 4.18 |
| | Hexadecanoic acid | 19.19 | | Mome inositol | 5.95 |
| | 9-Octadecenamamide | 5.22 | | gamma-Sitosterol | 1.69 |
| | 13-Decosenamide | 3.49 | | Lauric acid | 0.49 |
| | Daidzein | 1.29 | | | |
| | diosmetin | 3.00 | | | |
| | gamma-Sitosterol | 1.39 | | | |
| ELF2 | Benzoic acid | 5.19 | ELF5 | 3-Ethyl-2-pentene | 62.43 |
| | Benzeneacetic acid | 36.39 | | Resorcinol | 2.89 |
| | Salicylic Acid | 4.65 | | Salicylic acid | 0.64 |
| | Niacinamide | 4.34 | | Mome inositol | 22.82 |
| | Kaempferide | 2.99 | | Dihydronepetalactone | 2.21 |
| | 2,3-Diphenylbutane | 5.48 | | beta-Sitosterol | 0.49 |
| | Benzoic acid, 2-(acetyloxy)-, methyl ester | 6.51 | | Lauric acid | 0.41 |
| ELF3 | 3-Furanmethanol | 12.08 | ELF6 | Diethylene glycol | 11.48 |
| | Benzoic acid | 3.53 | | Dihydronepetalactonell | 4.69 |
| | Benzeneacetic acid | 7.52 | | Dihydronepetalactone | 9.94 |
| | Kaempferide | 7.52 | | beta-Sitosterol | 13.60 |
| | Salicylic Acid | 19.45 | | Hexadecanamide | 7.44 |
| | Isovanillic acid | 11.54 | | 9-Octadecenamamide | 37.06 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากผักแว่นต้น ในการศึกษานี้ สารสกัดแยกส่วนและสารสกัดส่วนย่อยของผักแว่นต้น ไม่พบสาร quercitrin, acacetin, isorhamnetin, 3, 5, 7, 3', 4' pentahydroxy-6-methoxyflavone-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-7-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-xylopyranoside (C₃₃H₄₀O₂₁) และ 3, 5, 7-trihydroxy-8, 4'-dimethoxyflavone-5-O- β -D-galactopyranosyl-7-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-O- α -L-arabinopyranoside (C₃₄H₄₂O₂₀) ด้งานวิจัยของ Yadava และ Vishwakarma (2014) เนื่องจากไม่ได้นำสารสกัดจากกิ่งของผักแว่นต้นไปตรวจวิเคราะห์ องค์ประกอบทางเคมี เพราะว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพต่ำ จึงนำเฉพาะสารสกัดแยกส่วนจากรากและใบของ ผักแว่นต้นไปวิเคราะห์ และการศึกษานี้ไม่พบสารไพโรลิซิดีนแอลคาลอยด์ (pyrrolizidine alkaloids) ที่เป็นสารกลุ่ม otonecine alkaloids ที่มีความเป็นพิษต่อบนมนุษย์และสัตว์ ด้งานวิจัยของ Fletcher และคณะ (2011) ซึ่งเป็นไปได้ว่าอาจเกี่ยวกับข้อมูลของสารมาตรฐาน (database) ที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในเครื่องมือแต่ละชนิด และรุ่นของเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ แตกต่างกัน จึงทำให้สามารถวิเคราะห์ได้สารสำคัญที่แตกต่างกัน

จากผลการตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีสามารถตรวจพบสารสำคัญที่น่าสนใจใน สารสกัดส่วนย่อยของผักแว่นต้นที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี ด้งานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสำคัญไว้ ด้นี้ สาร medicarpin เป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ที่นิยมใช้เป็นยาจีนโบราณ ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (Cuellar และคณะ, 2020) สารกลุ่มฟีนอล เช่น สาร phenol-2,4-bis (1,1-dimethylethyl) มีรายงานว่ามียุทธียับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ (Irshad และคณะ, 2024) เช่นเดียวกับสาร salicylic acid เป็นกรดอินทรีย์ที่มีรายงานว่ามียุทธียับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีเช่นกัน (Adamczak และคณะ, 2019) ซึ่งเป็นสารที่นิยมนำมาเป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง และครีมบำรุงผิวเพื่อใช้รักษาผิว นอกจากนี้สารสำคัญที่ตรวจพบว่าเป็นสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดี ประกอบด้วย สาร pluchidiol เป็นสารกลุ่มฟีนอล (Kallassy, 2017) สาร benzoic acid เป็นกรดอินทรีย์ (Khan และคณะ, 2010) สาร daidzein เป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ที่นิยมนำไปใช้เป็นสารมาตรฐานในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Kuswanto และคณะ, 2020) เช่นเดียวกับสาร kaempferide ที่มักคุ้นเคยกันในชื่อ Keampferol เป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ที่นิยมนำไปใช้เป็นสารมาตรฐาน เนื่องจากมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดี และยังสามารถลดการเกิดเม็ดสีเมลานินได้ (Rho และคณะ, 2011) ส่วนสารกลุ่ม phthalate พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งได้ (Al-Shehri และคณะ, 2019)

ด้นั้นสารสกัดของผักแว่นต้นมีแนวโน้มว่าสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย เนื่องจากตรวจพบสารสำคัญที่ส่งผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต่างกัน โดยสารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DLF) และสารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ELF) ตรวจพบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารสำคัญที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งสามารถนำไปศึกษาและพัฒนาต่อยอดเป็นยารักษาโรคบริเวณผิวหนัง ยาฆ่าเชื้อแบคทีเรีย และยาปฏิชีวนะ เนื่องจากสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียบริเวณผิวหนังได้ดี ตลอดจนพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ เช่น นำสารสกัดผักแว่นต้นไปเป็นส่วนผสมในแผ่นแปะสิว ครีมบำรุงผิวเพื่อความกระจ่างใส และครีมกันแดดได้ เนื่องจากมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูง นอกจากนี้ยังตรวจพบสารกลุ่ม phthalate ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งระดับชนิด HepG2 และเป็นพิษต่อเซลล์ปกติเช่นกัน คือเซลล์เยื่อบุไตลิงชนิด Vero ซึ่งคาดว่าสารนี้อาจมีพิษต่อเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติชนิดอื่นเช่นกัน ดังนั้นหากต้องการนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคตเพื่อผลิตเป็นยาต้านมะเร็ง จำเป็นต้องศึกษาความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง เพื่อยืนยันความปลอดภัยก่อนนำไปใช้ประโยชน์

4.5 ผลการระบุชนิดย่อยของผักแว่นต้น

4.5.1 ผลการศึกษาสัณฐานวิทยา

นำพืชสกุล *Crotalaria* ที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันที่เก็บจากตำบลองค์พระ อำเภอด่านช้าง จังหวัดสุพรรณบุรี มาศึกษาสัณฐานวิทยา โดยแบ่งตามความสูงของพุ่มต้นออกเป็น 2 ลักษณะ คือ ผักแว่นต้นพุ่มเตี้ย (prostrate) รหัส C01 (ดังรูปที่ 4.11 ก) และผักแว่นต้นพุ่มสูง (ascending) รหัส C02 (ดังรูปที่ 4.12 ก) มาเปรียบเทียบความแตกต่างขององค์ประกอบทางสัณฐานวิทยา เพื่อสามารถระบุชนิดย่อย (variety) จากผลการศึกษาพบว่าพืชทั้ง 2 ลักษณะ มีลักษณะพุ่มต้นและความสูงของลำต้นที่ต่างกันอย่างชัดเจน โดยผักแว่นต้นพุ่มเตี้ยมีความสูง 10-30 เซนติเมตร เป็นพุ่มระนาบกับพื้นดิน ผักแว่นต้นพุ่มสูงตั้งตรงมีความสูงประมาณ 50-60 เซนติเมตร พืชทั้งสองมีลักษณะเป็นใบประกอบแบบฝ่ามือ 3 ใบย่อย (trifoliolatae dispermae) รูปไข่ ขอบใบเรียบ และปลายใบมน มีลักษณะเว้าบริเวณกลางใบ มีผิวมันเงาเล็กน้อย และมีขนสีขาวบาง ๆ บริเวณหลังใบเหมือนกัน (ดังรูปที่ 4.11 ข และ 4.12 ข) แต่แตกต่างกันที่ขนาดของใบ ที่พบว่าผักแว่นต้นพุ่มเตี้ยมีขนาดของใบเล็กกว่าผักแว่นต้นพุ่มสูง โดยผักแว่นต้นพุ่มเตี้ยมีใบยาว 8.50 ± 1.01 มิลลิเมตร กว้าง 4.49 ± 0.52 มิลลิเมตร ก้านใบยาวประมาณ 2-3 มิลลิเมตร หูใบยาวประมาณ 1.5-2.5 มิลลิเมตร ก้านใบย่อยยาวประมาณ 0.4-0.7 มิลลิเมตร และใบประดับย่อยยาวประมาณ 1.5-1.7 มิลลิเมตร ส่วนผักแว่นต้นพุ่มสูงมีใบยาว 15.10 ± 4.86 มิลลิเมตร กว้าง 11.9 ± 3.29 มิลลิเมตร ก้านใบยาวประมาณ 2-3 มิลลิเมตร หูใบยาวประมาณ 1.5-2 มิลลิเมตร ก้านใบย่อยยาวประมาณ 0.8-1.5 มิลลิเมตร และใบประดับย่อยยาวประมาณ 2-2.5 มิลลิเมตร พืชทั้ง 2 ลักษณะมีเมล็ดอ่อนสีเขียว ผิวเรียบ และมันเงา เมล็ดมีลักษณะเป็นรูปหัวใจเบี้ยว ผักแว่นต้นพุ่มเตี้ยมีความยาวของเมล็ดเท่ากับ 2.55 ± 0.20 มิลลิเมตร กว้าง 2.26 ± 0.22 มิลลิเมตร ผักแว่นต้นพุ่มสูงมีความยาวของเมล็ดเท่ากับ 1.65 ± 0.33 มิลลิเมตร กว้าง 1.60 ± 0.28 มิลลิเมตร แต่พบว่าเมล็ดของผักแว่นต้นพุ่มสูงมีการเว้าตรงบริเวณหัวเมล็ด (hilum) คล้ายรูปหัวใจที่ลึก และเว้ากว่าผักแว่นต้นพุ่มเตี้ย แสดงดังรูปที่ 4.11 ฉ และ 4.12 ฉ โดยพบว่าผักแว่นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พุ่มเตี้ยมีของเมล็ดขนาดใหญ่กว่าฝักแวนต้นพุ่มเตี้ยเล็กน้อย (ดั่งรูป 4.11 จ-ฉ และ 4.12 จ-ฉ) เมล็ดของพืชทั้งสองชนิดปกคลุมด้วยฝักรูปไข่สีเขียวที่มีขนสีขาวเล็กน้อย และมีจะงอยแหลมสีน้ำตาลบริเวณปลายฝัก (ดั่งรูปที่ 4.11 ง และ 4.12 ง) ฝักแวนต้นพุ่มเตี้ยมีฝักยาว 3.82 ± 0.75 มิลลิเมตร กว้าง 3.12 ± 0.26 มิลลิเมตร ฝักแวนต้นพุ่มสูงมีฝักยาว 4.54 ± 0.52 มิลลิเมตร กว้าง 4.33 ± 0.70 มิลลิเมตร ออกดอกเป็นช่อกระจจะ 3-6 ดอก ดอกมีสีเหลือง มีกลีบดอกจำนวน 4 กลีบ ซึ่งประกอบด้วยกลีบดอก 3 ส่วน ดังนี้ กลีบดอกส่วนกลาง (standard petal) 1 กลีบ กลีบดอกคู่ข้าง (wing) จำนวน 2 กลีบ และกลีบดอกคู่ล่าง (keel) จำนวน 1 กลีบ ซึ่งพบว่ากลีบดอกกลาง และกลีบดอกคู่ข้างมีลักษณะปลายมน และสีเหลืองอ่อน ส่วนกลีบดอกคู่ล่างมีลักษณะคล้ายกรวย ด้านหลังกลีบดอกทั้งหมดมีขนสีขาว ฝักแวนต้นพุ่มเตี้ยมีกลีบดอกส่วนกลางยาว 4.41 ± 0.26 มิลลิเมตร กว้าง 3.32 ± 0.25 มิลลิเมตร กลีบดอกคู่ข้างยาว 4.16 ± 0.06 มิลลิเมตร กว้าง 1.45 ± 0.14 มิลลิเมตร และกลีบดอกคู่ล่างยาว 3.93 ± 0.13 มิลลิเมตร ส่วนฝักแวนต้นพุ่มสูงมีกลีบดอกส่วนกลางยาว 6.93 ± 0.48 มิลลิเมตร กว้าง 4.73 ± 0.32 มิลลิเมตร กลีบดอกคู่ข้างยาว 5.70 ± 0.50 มิลลิเมตร กว้าง 2.12 ± 0.27 มิลลิเมตร และกลีบดอกคู่ล่างยาว 5.58 ± 0.21 มิลลิเมตร (ดั่งรูป 4.11 ช-ฎ และ 4.12 ช-ฎ) นอกจากนี้พบว่ามีเกสรเพศผู้จำนวน 10 อัน โดยส่วนปลายของก้านเกสรเพศผู้ของพืชทั้งสองลักษณะติดที่ฐานของอับเรณู (basifixed) ฝักแวนต้นพุ่มเตี้ยมีอับเรณูขนาด 0.3-0.4 มิลลิเมตร มีก้านชูเกสรเพศผู้ยาว 1.5-1.7 มิลลิเมตร มีรังไข่รูปรียาว 1.84 ± 0.05 กว้าง 0.81 ± 0.09 มิลลิเมตร มีก้านชูเกสรเพศเมียยาวประมาณ 2.5-3 มิลลิเมตร ฝักแวนต้นพุ่มสูงมีอับเรณูขนาด 0.6-0.85 มิลลิเมตร มีก้านชูเกสรเพศผู้ยาว 1.55-2 มิลลิเมตร มีรังไข่รูปรียาว 1.92 ± 0.06 มิลลิเมตร กว้าง 0.98 ± 0.05 มิลลิเมตร มีก้านชูเกสรเพศเมียยาวประมาณ 3-3.5 มิลลิเมตร พืชทั้ง 2 ลักษณะมีกลีบเลี้ยงคล้ายระฆังจำนวน 5 แฉก ที่มีสีเขียว และมีขนสีขาวกระจายอยู่ทั่วกลีบเลี้ยง มักจะออกดอกช่วงเดือนตุลาคมถึงพฤศจิกายน ซึ่งข้อมูลขนาดขององค์ประกอบทางสัณฐานวิทยา มีรายละเอียดแสดงดังตารางที่ 4.23

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของฝักแวนต้นพุ่มเตี้ย และฝักแวนต้นพุ่มสูงกับงานวิจัยที่ศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพืช *C. medicaginea* จำนวน 5 ชนิดย่อย ได้แก่ *C. medicaginea* var. *medicaginea*, *C. medicaginea* var. *neglecta*, *C. medicaginea* var. *linearis*, *C. medicaginea* var. *luxurians* และ *C. medicaginea* var. *herniarioides* พบว่าฝักแวนต้นพุ่มเตี้ยมีลักษณะพุ่มต้นคล้ายคลึงกับ *C. medicaginea* var. *neglecta* ในงานวิจัยของ Mastakar และคณะ (2023) พบว่ามีพุ่มต้นกระจายตัวแตกแขนงระนาบไปกับพื้นดิน และแตกกิ่งก้านมาก แต่เมื่อเปรียบเทียบลักษณะของช่อดอก โดยพืช *C. medicaginea* var. *neglecta* จะมีช่อดอกกระจจะตั้งตรงและออกดอก 6-12 ดอก แต่ฝักแวนต้นพุ่มเตี้ยมีช่อดอกเป็นช่อกระจจะที่ออกดอกเพียง 3-6 ดอก นอกจากนี้สีด้านหลังของกลีบดอกส่วนกลางของพืช *C. medicaginea* var. *neglecta* มีสีแดง แต่ฝักแวนต้นพุ่มเตี้ยมีสีแดงบางส่วนบริเวณโคนกลีบดอก แต่เมื่อนำฝักแวนต้นพุ่มเตี้ยและ

ฝักแวนต้นพุ่มสูงมาเปรียบเทียบกับชนิดย่อยอื่น พบว่าพืชทั้ง 2 ลักษณะ มีลักษณะและขนาดของพืชที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

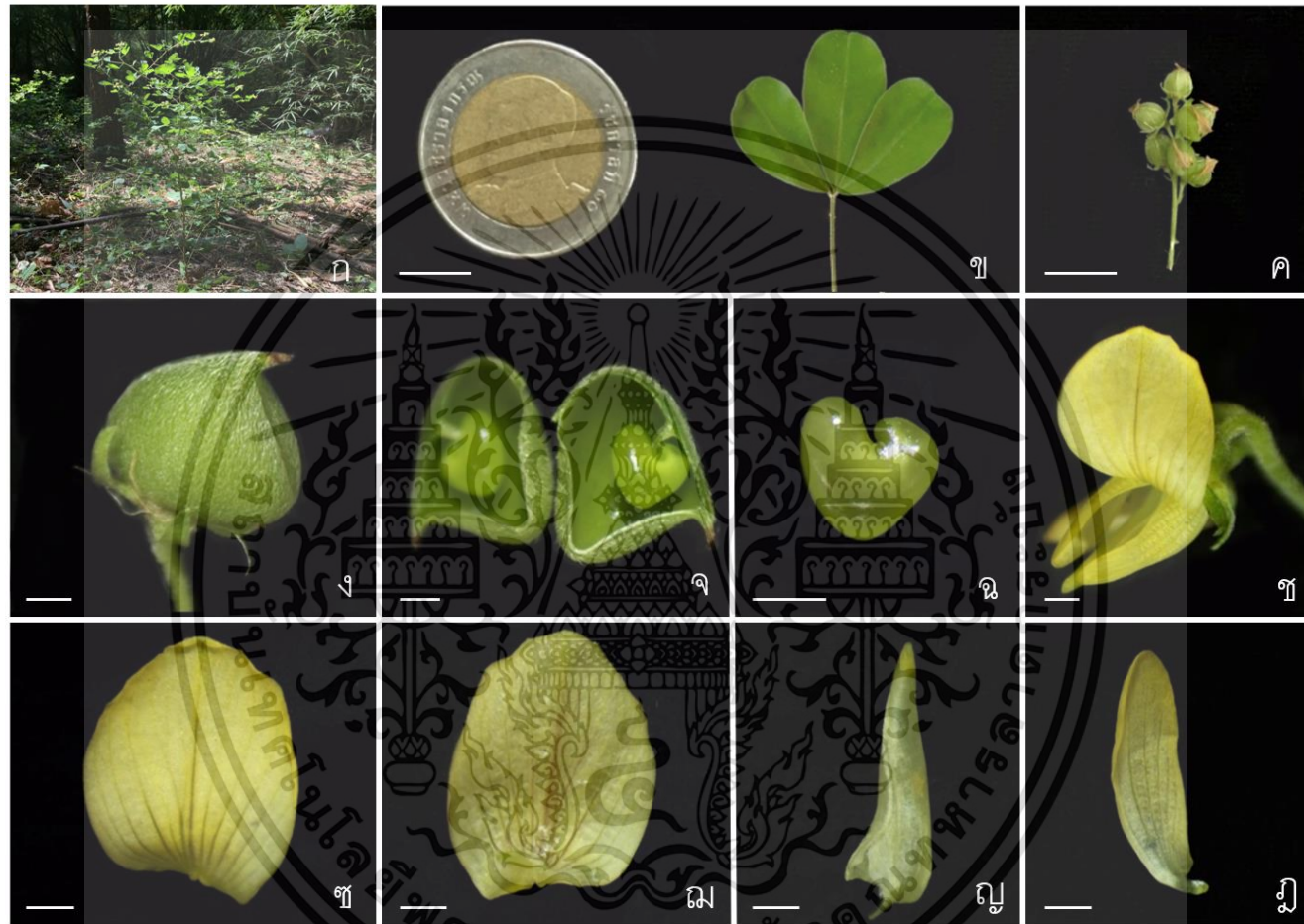
ใกล้เคียงกับการศึกษาสัณฐานวิทยาของพืช *C. medicaginea* var. *luxurians* เพียงบางส่วนในงานวิจัยของ Ninkaew และคณะ (2017a) โดยพบว่าพืช *C. medicaginea* var. *luxurians* มีความสูงประมาณ 15-50 เซนติเมตร มีใบเป็นลักษณะรูปไข่ เป็นใบประกอบแบบฝ่ามือ 3 ใบย่อย ใบมีความยาว 3-15 มิลลิเมตร และกว้าง 2-10 มิลลิเมตร ก้านใบมีขนสีน้ำตาล มีดอกสีเหลือง มีฝักเป็นรูปไข่ และมีเมล็ดเป็นรูปหัวใจเบี้ยว มีขนาดของอับเรณู ขนาดก้านชูเกสรเพศผู้ และขนาดก้านชูเกสรเพศเมียที่ใกล้เคียงกับฝักแวนต้นพุ่มเตี้ยและฝักแวนต้นพุ่มสูง

ต่อมงานวิจัยของ Ninkaew และคณะ (2017b) ได้นำเมล็ดแก่ของพืชสกุล *Crotalaria* จำนวน 19 ชนิด มาศึกษาสัณฐานวิทยาของเมล็ดเพื่อจัดกลุ่มชนิดพืชเบื้องต้น พบว่าพืช *C. medicaginea* var. *luxurians* มีลักษณะของเมล็ดเป็นรูปหัวใจเบี้ยว สีน้ำตาลเข้ม มีลักษณะของขั้วเมล็ดเว้าเล็กน้อย ปลายมน ผิวเรียบ และมันเงา โดยมีความยาว 1.90 ± 0.12 มิลลิเมตร กว้าง 1.61 ± 0.09 มิลลิเมตร มีลักษณะการเว้าของขั้วเมล็ดตรงกับเมล็ดของฝักแวนต้นพุ่มเตี้ย แต่มีขนาดของเมล็ดที่ใกล้เคียงกับฝักแวนต้นพุ่มสูง ซึ่งต่างที่สีของเมล็ดคาดว่าเมล็ดที่เป็นสีเขียวคือเมล็ดอ่อน และเมล็ดที่เป็นสีน้ำตาลคือเมล็ดแก่ โดยการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของพืชเพียงอย่างเดียว อาจไม่เพียงพอต่อการระบุชนิดย่อยของพืชทั้ง 2 ลักษณะได้ เนื่องจากฝักแวนต้นแต่ละชนิดย่อย มีลักษณะคล้ายคลึงกัน และมีขนาดที่ใกล้เคียงกัน นอกจากนี้จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้รายงานข้อมูลด้านความแตกต่างของลักษณะสัณฐานวิทยาของฝักแวนต้นยังคงมีข้อมูลไม่มากนัก ซึ่งยังไม่เพียงพอที่จะระบุชนิดย่อยได้ ดังนั้นการศึกษานี้จึงนำฝักแวนต้นพุ่มเตี้ย และฝักแวนต้นพุ่มสูงไประบุชนิดย่อยด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดต่อไป เพื่อยืนยันชนิดย่อยที่ถูกต้องของฝักแวนต้นทั้ง 2 ลักษณะ

ตารางที่ 4.23 ขนาดขององค์ประกอบทางสัณฐานวิทยาของฝักแวนต้นพุ่มเตี้ยและฝักแวนต้นพุ่มสูง

| องค์ประกอบทาง สัณฐานวิทยา | ฝักแวนต้นพุ่มเตี้ย (C01) | | ฝักแวนต้นพุ่มสูง (C02) | |
|------------------------------|--------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|
| | ยาว (มิลลิเมตร) | กว้าง (มิลลิเมตร) | ยาว (มิลลิเมตร) | กว้าง (มิลลิเมตร) |
| ใบ | 8.50±1.01 | 4.49±0.52 | 15.10±4.86 | 11.09±3.29 |
| ก้านใบ | 2-3 | ND | 2-3 | ND |
| หูใบ | 1.5-2.5 | ND | 1.5-2 | ND |
| ก้านใบย่อย | 0.4-0.7 | ND | 0.8-1.5 | ND |
| ใบประดับย่อย | 1.5-1.7 | ND | 2-2.5 | ND |
| ฝัก | 3.82±0.75 | 3.12±0.26 | 4.54±0.52 | 4.33±0.70 |
| เมล็ด | 2.55±0.22 | 2.26±0.22 | 1.65±0.33 | 1.60±0.28 |
| กลีบดอกส่วนกลาง | 4.41±0.26 | 3.32±0.25 | 6.39±0.48 | 4.73±0.32 |
| กลีบดอกคู่ข้าง | 4.16±0.06 | 1.45±0.14 | 5.70±0.50 | 2.12±0.27 |
| กลีบดอกคู่ล่าง | 3.93±0.13 | ND | 5.58±0.21 | ND |
| อับเรณู | 0.3-0.4 | ND | 0.6-0.85 | ND |
| รังไข่ | 1.84±0.05 | 0.81±0.09 | 1.92±0.06 | 0.98±0.05 |
| ก้านชูเกสรเพศเมีย | 2.5-3 | ND | 3-3.5 | ND |
| ก้านชูเกสรเพศผู้ | 1.5-1.7 | ND | 1.55-2 | ND |

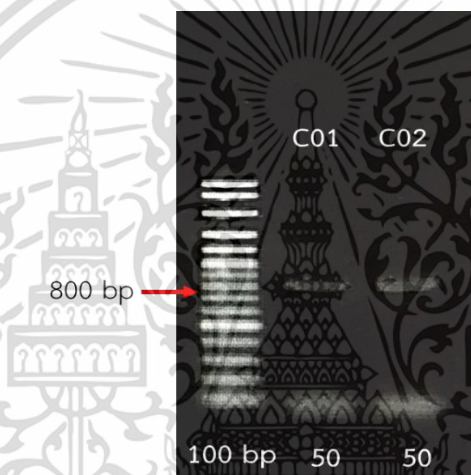
หมายเหตุ ND คือ not determined และค่าที่วัดได้จากตารางแสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=10)



รูปที่ 4.12 ลักษณะและองค์ประกอบทางสัณฐานวิทยาของฝักแวนต้นพุ่มสูง ถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอประกอบด้วย (ก) ลักษณะของพุ่มต้น (ข) ใบ (ค) ช่อฝัก (ง) ฝัก (จ-ฉ) เมล็ด (ช) ดอก (ซ) กลีบดอกส่วนกลางด้านหน้า (ณ) กลีบดอกส่วนกลางด้านหลัง (ญ) กลีบดอกคู่ล่าง และ (ฎ) กลีบดอกคู่ข้าง หมายเหตุ รูป ข-ค scale bar= 10 mm. และรูป ง-ฎ scale bar= 1 mm.

4.5.2 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด

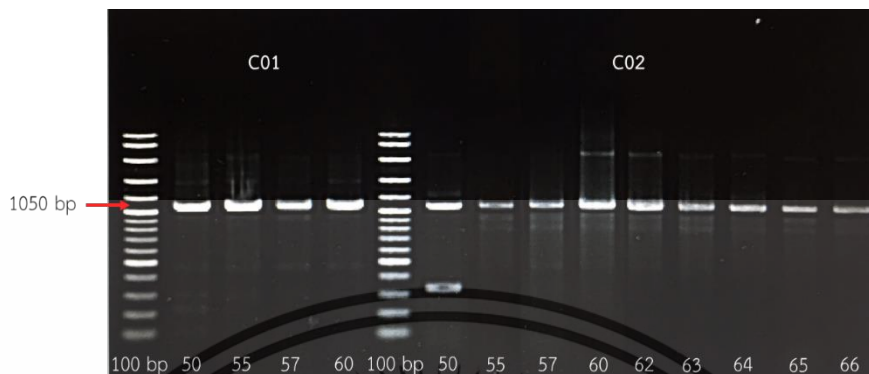
จากการนำผักแว่นต้นพุ่มเตี้ย (C01) และผักแว่นต้นพุ่มสูง (C02) มาสกัดดีเอ็นเอและทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดี มีปริมาณมาก ปรากฏการปนเปื้อนด้วยอาร์เอ็นเอและโปรตีน จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน โดยใช้บริเวณยีนตำแหน่ง Ribulose-bisphosphate carboxylase (*rbcL*), *trnL-trnF* intergenic spacer (*trnL-trnF*) และ Internal transcribed spacer (*ITS*) จากผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนตำแหน่ง *rbcL* ที่ใช้อุณหภูมิ annealing เท่ากับ 50 องศาเซลเซียส พบว่ามีความเหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพืชทั้ง 2 ลักษณะ โดยปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ PCR ที่เข้ม และชัดเจนจำนวน 1 แถบ โดยมีขนาดประมาณ 800 คู่เบส แสดงดังรูปที่ 4.13



รูปที่ 4.13 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันบริเวณยีนตำแหน่ง *rbcL* มีขนาด 800 คู่เบส และใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส
หมายเหตุ ตัวเลข 50 คือ อุณหภูมิ annealing ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

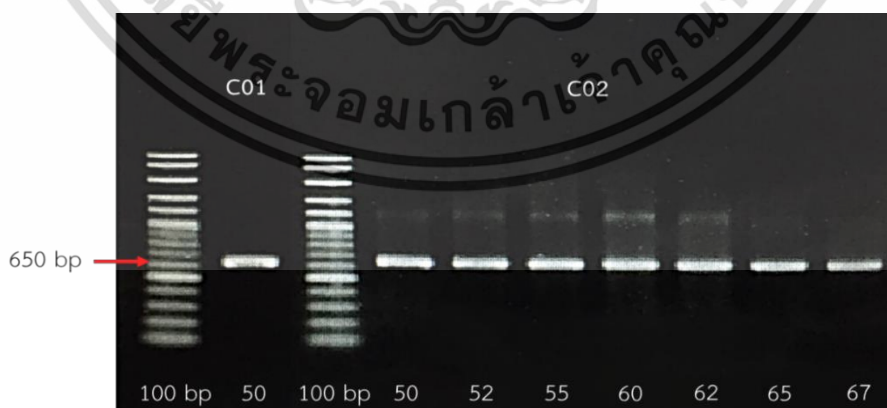
สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนตำแหน่ง *trnL-trnF* ของผักแว่นต้นพุ่มเตี้ยที่ใช้อุณหภูมิ annealing เท่ากับ 50 องศาเซลเซียส (Subramaniam และคณะ, 2015a) พบว่าปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ PCR จำนวนหลายแถบ จึงได้มีการหาอุณหภูมิที่เหมาะสม โดยศึกษาที่อุณหภูมิ 55, 57 และ 60 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ PCR เพียงแถบเดียวที่มีขนาดประมาณ 1050 คู่เบส ดังรูปที่ 4.14 ส่วนผักแว่นต้นพุ่มสูงเมื่อใช้อุณหภูมิ annealing เท่ากับ 50 องศาเซลเซียส พบว่าปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ PCR จำนวนหลายแถบเช่นกัน และปรากฏ 2 แถบที่เข้ม คือขนาดประมาณ 350 และ 1050 คู่เบส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ยังไม่เหมาะสม ดังนั้นจึงได้มีการหาอุณหภูมิที่เหมาะสม โดยศึกษาที่อุณหภูมิ 55, 57, 60, 62, 63, 64, 65 และ 66

องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 66 องศาเซลเซียส ปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ PCR เพียงแถบเดียวที่มีขนาดประมาณ 1050 คู่เบส ดังรูปที่ 4.14



รูปที่ 4.14 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสบริเวณยีนตำแหน่ง *trnL-trnF* มีขนาด 1050 คู่เบส และใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส
หมายเหตุ ตัวเลข 50-66 คือ อุณหภูมิ annealing ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนตำแหน่ง *ITS* ของพืชทั้ง 2 ลักษณะที่อุณหภูมิ annealing เท่ากับ 50 องศาเซลเซียส พบว่าผักแว่นต้นพุ่มเตี้ยปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ PCR เพียงแถบเดียวที่มีขนาดประมาณ 650 คู่เบส แต่พบว่าผักแว่นต้นพุ่มสูงปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ PCR จำนวน 2 แถบ คือขนาดประมาณ 650 และ 1200 คู่เบส ดังนั้นจึงได้มีการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมโดยศึกษาที่อุณหภูมิ 52, 55, 60, 62, 65 และ 67 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 67 องศาเซลเซียส ปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ PCR เพียงแถบเดียวที่มีขนาดประมาณ 650 คู่เบส ดังรูปที่ 4.15



รูปที่ 4.15 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสบริเวณยีนตำแหน่ง *ITS* มีขนาด 650 คู่เบส และใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส
หมายเหตุ ตัวเลข 50-67 คือ อุณหภูมิ annealing ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

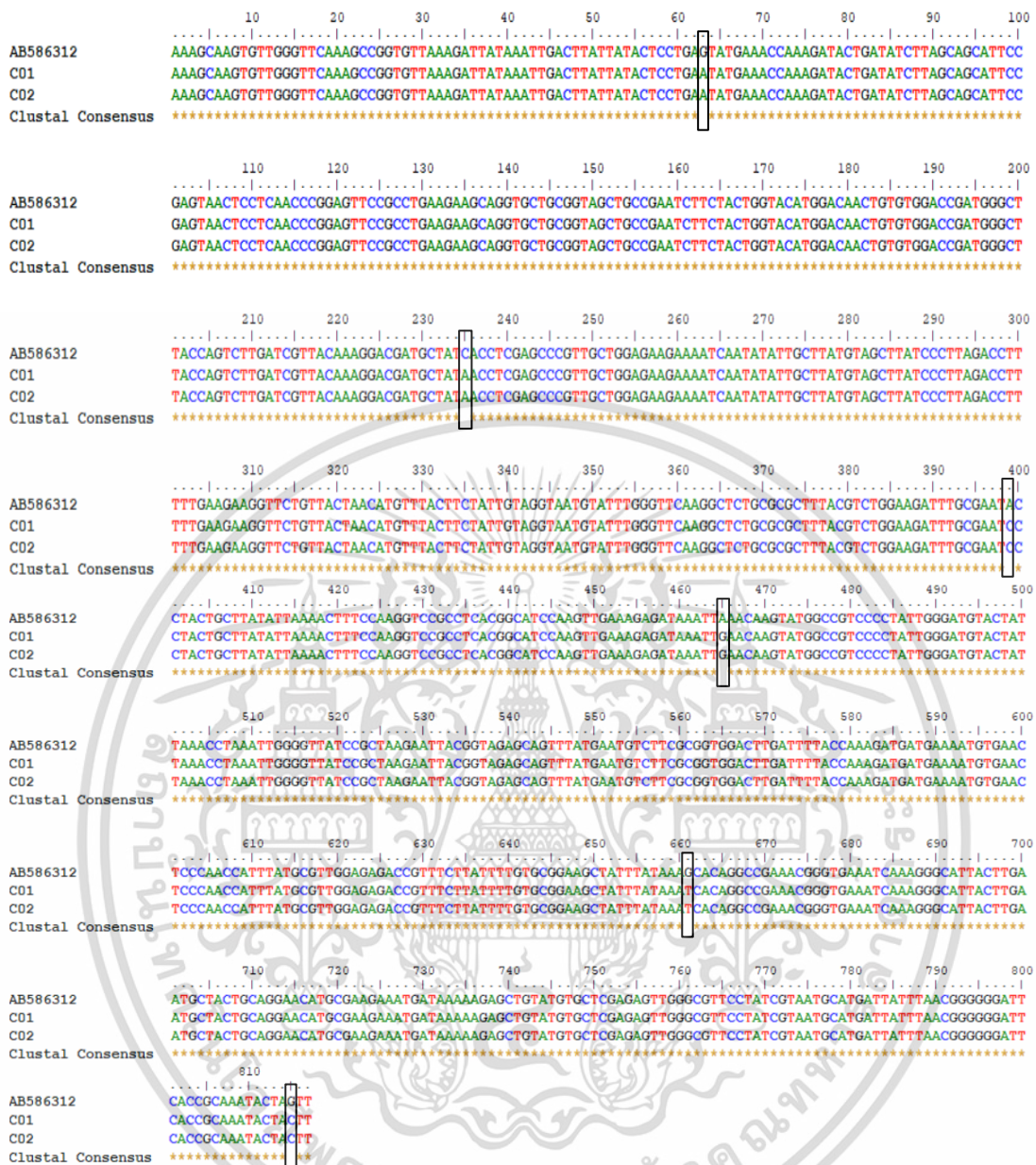
นำดีเอ็นเอที่ผ่านการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่อุณหภูมิดังกล่าวส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท U2bio โดยวิเคราะห์ด้วยวิธี BTSeq™ (Barcode-Tagged Sequencing) จากการวิเคราะห์เปรียบเทียบขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์ของผักแว่นต้นพุ่มเตี้ยและผักแว่นต้นพุ่มสูง โดยใช้โปรแกรม Bio edit พบว่าดีเอ็นเอบริเวณยีนตำแหน่ง *rbcL* ของพืชทั้ง 2 ลักษณะมีขนาดเท่ากับ 817 คู่เบส ดีเอ็นเอบริเวณยีนตำแหน่ง *trnL-trnF* มีขนาดเท่ากับ 1022 คู่เบส ตามลำดับ และดีเอ็นเอบริเวณยีนตำแหน่ง *ITS* ที่มีขนาด 629 คู่เบส ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์ PCR ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของผักแว่นต้นพุ่มเตี้ยและผักแว่นต้นพุ่มสูง มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLAST ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าบริเวณยีนตำแหน่ง *rbcL* ยังไม่มีข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืช *C. medicaginea* แต่เมื่อนำไปเปรียบเทียบในฐานข้อมูล พบว่าตรงกับพืช *Crotalaria* sp. หมายเลข AB586312 โดยมีค่าความเหมือน (percent identity) เท่ากับ 98.93 และ 98.94 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการนำมาเปรียบเทียบความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Bio edit ปรากฏว่าผักแว่นต้นพุ่มเตี้ยและผักแว่นต้นพุ่มสูง ไม่พบความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างจากพืช *Crotalaria* sp. เพียง 6 ตำแหน่ง ดังรายละเอียดแสดงในตารางที่ 4.24 และรูปที่ 4.16 เมื่อนำมาคำนวณหาความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ ทำโดยนำจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกันหารด้วยขนาดของขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์ และคูณ 100 ยกตัวอย่างเช่น ดีเอ็นเอบริเวณยีนตำแหน่ง *rbcL* มีขนาดเท่ากับ 817 คู่เบส โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชต่างกัน 6 ตำแหน่ง ซึ่งสามารถคำนวณเป็นค่าร้อยละดังนี้ $(6/817) \times 100$ คิดเป็น 0.73 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของผักแว่นต้นพุ่มเตี้ย และผักแว่นต้นพุ่มสูงต่างจากพืช *Crotalaria* sp. เพียง 0.73 เปอร์เซ็นต์ ถือว่าต่างกันน้อยมาก จึงทำให้บริเวณยีนตำแหน่งนี้ยังไม่สามารถจำแนกชนิดและชนิดย่อยของพืชทั้ง 2 ลักษณะนี้ได้

ตารางที่ 4.24 เปรียบเทียบความต่างของดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณยีนตำแหน่ง *rbcL* ของผักแว่นต้นพุ่มเตี้ย ผักแว่นต้นพุ่มสูง และพืช *Crotalaria* sp. ในฐานข้อมูล GenBank

| ตำแหน่ง | ผักแว่นต้น | | <i>Crotalaria</i> sp. |
|---------|-----------------|---------------|-----------------------|
| | พุ่มเตี้ย (C01) | พุ่มสูง (C02) | AB586312 |
| 63 | A | A | G |
| 235 | A | A | C |
| 399 | C | C | A |
| 465 | G | G | A |
| 661 | T | T | G |
| 815 | C | C | G |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.16 เปรียบเทียบความต่างของดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณยีนตำแหน่ง *rbcL* ด้วยโปรแกรม Bio edit โดยตัวอักษร AB586312 คือพืช *Crotalaria* sp., C01 คือผักแว่นต้นพุ่มเตี้ย และ C02 คือผักแว่นต้นพุ่มสูง ซึ่งกรอบสี่เหลี่ยมสีดำแสดงถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกัน

เมื่อวิเคราะห์ด้วยบริเวณยีนตำแหน่ง *trnL-trnF* พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชทั้ง 2 ลักษณะตรงกับพืช *C. medicaginea* var. *luxurians* หมายเลข KP691153 และ KP691155 โดยผักแว่นต้นพุ่มเตี้ยมีค่าความเหมือนเท่ากับ 99.21 และ 97.93 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนผักแว่นต้นพุ่มสูงมีค่าความเหมือนเท่ากับ 99.13 และ 97.78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อพิจารณาจากการนำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบความต่างกับพืช *C. medicaginea* var. *luxurians* หมายเลขข้างต้น พบว่าต่างกันจำนวน 3-24 ตำแหน่ง ดังรายละเอียดแสดงในตารางที่ 4.25 และรูปที่ 4.17

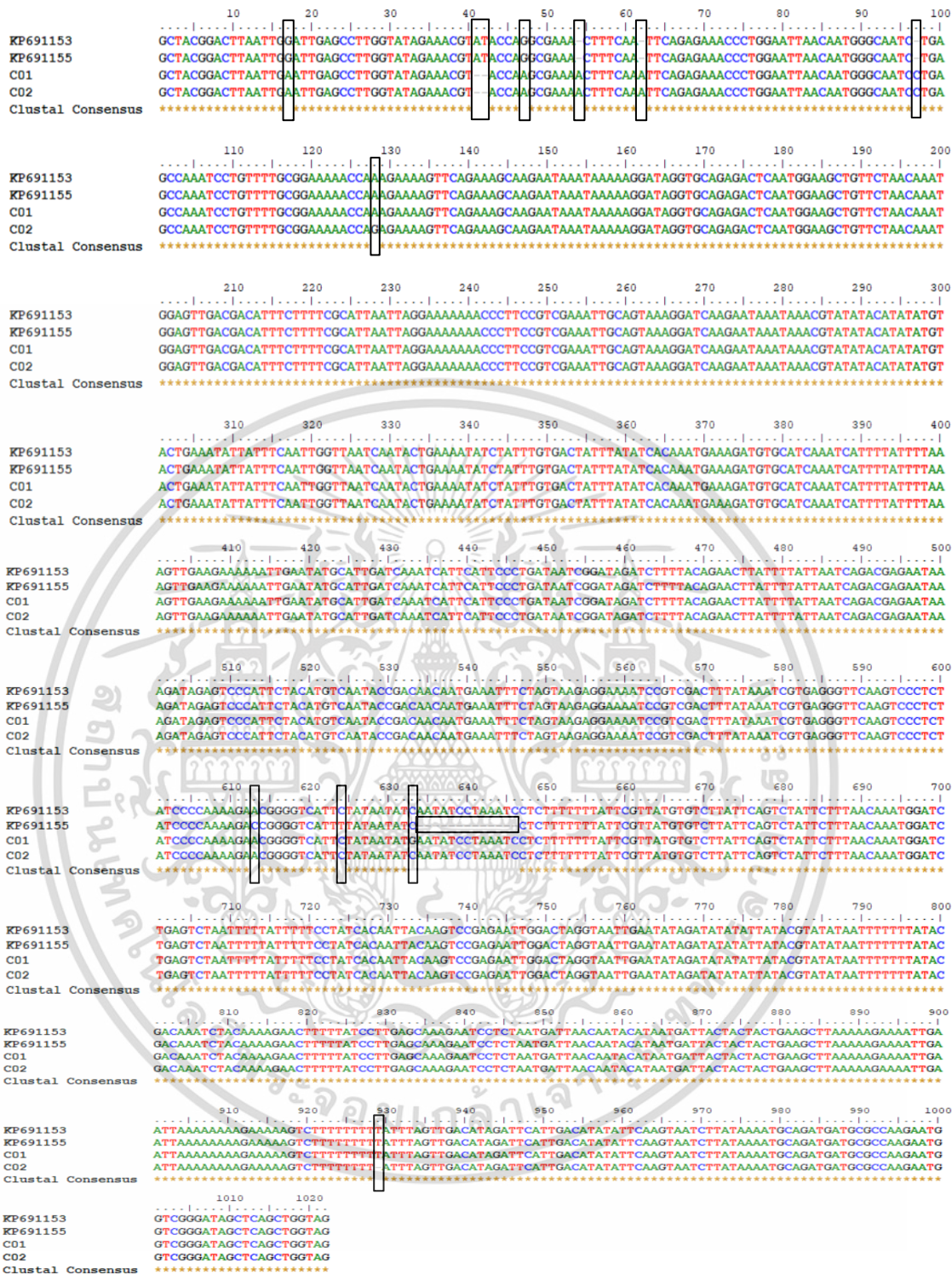
เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบความต่างของฝักแวนต้นพุ่มเตี้ยและพืชแต่ละหมายเลข พบว่าฝักแวนต้นพุ่มเตี้ยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างจากฝักแวนต้นพุ่มสูงเพียง 3 ตำแหน่ง คือตำแหน่งที่ 128, 633 และ 929 ซึ่งต่างกันเพียง 0.29 เปอร์เซ็นต์ และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างจากพืช *C. medicaginea* var. *luxurians* หมายเลข KP691153 และ KP691155 จำนวน 8 และ 23 ตำแหน่ง ตามลำดับ คิดเป็น 0.78 และ 2.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบความต่างของฝักแวนต้นพุ่มสูงกับพืชหมายเลขข้างต้น พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 9 และ 24 ตำแหน่ง ตามลำดับ คิดเป็น 0.88 และ 2.35 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบความต่างของพืช *C. medicaginea* var. *luxurians* หมายเลข KP691153 กับ KP691155 พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 15 ตำแหน่ง แต่พืชทั้ง 2 หมายเลขถูกระบุว่าเป็นพืชชนิดย่อยเดียวกัน ดังนั้นการใช้บริเวณยีนตำแหน่ง *trnL-trnF* ยังไม่สามารถระบุชนิดย่อยของฝักแวนต้นพุ่มเตี้ยและฝักแวนต้นพุ่มสูงได้ เนื่องจากมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกันน้อย นอกจากนี้เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของฝักแวนต้นพุ่มเตี้ยและฝักแวนต้นพุ่มสูง มาเปรียบเทียบความต่างกับชนิดย่อยที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank คือ *C. medicaginea* var. *hemiaroides* หมายเลข KP691154 ที่มีขนาดของดีเอ็นเอบริเวณยีนตำแหน่ง *trnL-trnF* เท่ากับ 438 คู่เบส พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกันจำนวน 2-3 ตำแหน่ง โดยฝักแวนต้นพุ่มเตี้ยและฝักแวนต้นพุ่มสูง มีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกันเพียง 2 ตำแหน่ง คิดเป็น 0.46 เปอร์เซ็นต์ และต่างจากพืช *C. medicaginea* var. *hemiaroides* เพียง 3 ตำแหน่ง คิดเป็น 0.68 เปอร์เซ็นต์ ถือว่าต่างกันน้อยมากเช่นกัน โดยรายละเอียดแสดงดังรูปที่ 4.18 จะเห็นได้ว่ายังไม่สามารถระบุชนิดย่อยได้เช่นกัน ซึ่งการศึกษาเพียงบริเวณยีนตำแหน่ง *trnL-trnF* อาจยังไม่เพียงพอต่อการจำแนกชนิดย่อยของฝักแวนต้นพุ่มเตี้ยและฝักแวนต้นพุ่มสูงออกจากกันได้ แม้ว่าจะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ต่างกัน ดังนั้นจึงได้วิเคราะห์โดยใช้บริเวณยีนตำแหน่ง *ITS* ต่อไป

ตารางที่ 4.25 เปรียบเทียบความต่างของดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณยีนตำแหน่ง *trnL-trnF* ของผักแว่น ต้นพุ่มเตี้ย ผักแว่นต้นพุ่มสูง และพืช *C. medicaginea* var. *luxurians* ในฐานข้อมูล GenBank

| ตำแหน่ง | ผักแว่นต้น | | <i>C. medicaginea</i> var. <i>luxurians</i> | |
|---------|-----------------|---------------|---|----------|
| | พุ่มเตี้ย (C01) | พุ่มสูง (C02) | KP691153 | KP691155 |
| 17 | A | A | G | G |
| 41 | - | - | A | A |
| 42 | - | - | T | T |
| 47 | A | A | G | G |
| 54 | A | A | - | - |
| 62 | A | A | - | - |
| 97 | C | C | - | - |
| 128 | A | G | A | A |
| 613 | A | A | A | C |
| 624 | C | C | C | T |
| 633 | G | C | C | C |
| 634 | A | A | A | - |
| 635 | A | A | A | - |
| 636 | T | T | T | - |
| 637 | A | A | A | - |
| 638 | T | T | T | - |
| 639 | C | C | C | - |
| 640 | C | C | C | - |
| 641 | T | T | T | - |
| 642 | A | A | A | - |
| 643 | A | A | A | - |
| 644 | A | A | A | - |
| 645 | T | T | T | - |
| 646 | C | C | C | - |
| 929 | T | - | T | T |

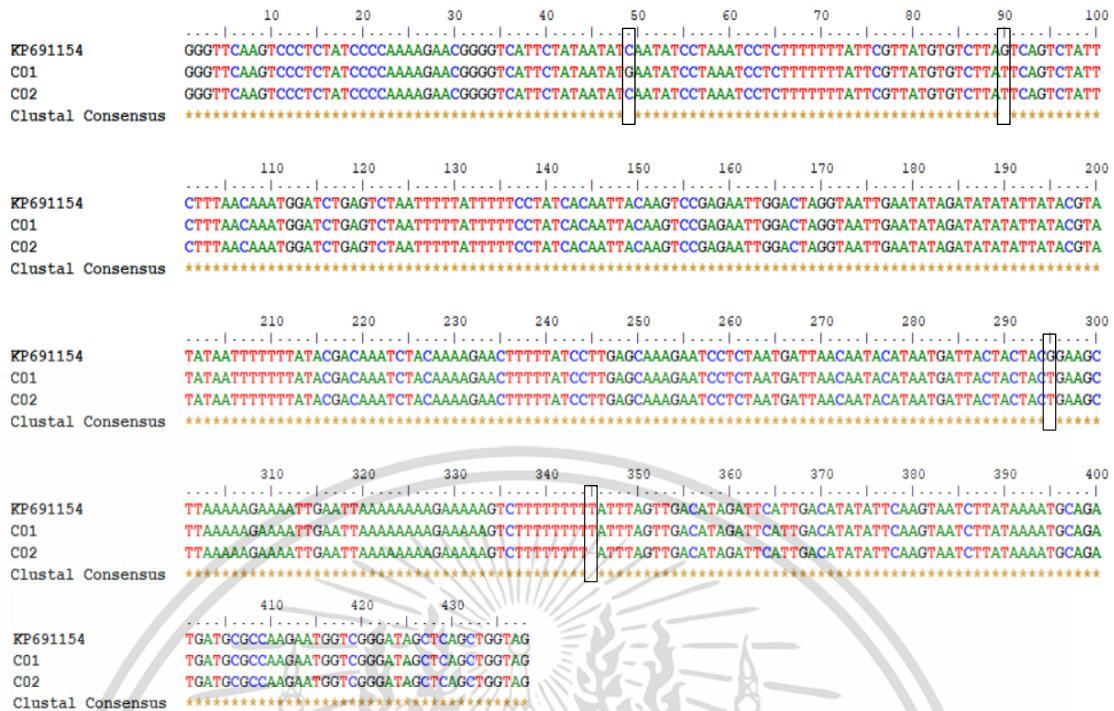
หมายเหตุ เครื่องหมาย - คือ ไม่พบลำดับนิวคลีโอไทด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.17 เปรียบเทียบความต่างของดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณยีนตำแหน่ง *trnL-trnF* ด้วยโปรแกรม Bio edit โดยตัวอักษร KP691153 และ KP691155 คือพืช *C. medicaginea* var. *luxurians*, C01 คือผักแว่นต้นพุ่มเตี้ย และ C02 คือผักแว่นต้นพุ่มสูง ซึ่งกรอบสี่เหลี่ยมสีดำแสดงถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้拿去ใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.18 เปรียบเทียบความต่างของดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณยีนตำแหน่ง *trnL-trnF* ด้วยโปรแกรม Bio edit โดยตัวอักษร KP691154 คือพืช *C. medicaginea* var. *herniarioides*, C01 คือผักแว่นต้นพุ่มเตี้ย และ C02 คือผักแว่นต้นพุ่มสูง ซึ่งกรอบสี่เหลี่ยมสีดำแสดงถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกัน

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผักแว่นต้นพุ่มเตี้ยและผักแว่นต้นพุ่มสูง โดยใช้บริเวณยีนตำแหน่ง *ITS* พบว่าผักแว่นต้นพุ่มเตี้ยตรงกับพืช *C. medicaginea* หมายเลข JN990115 และ *C. medicaginea* var. *luxurians* หมายเลข KP698667 โดยมีค่าความเหมือนเท่ากับ 98.28 เปอร์เซ็นต์ และพืช *C. medicaginea* หมายเลข JQ067334 เท่ากับ 97.52 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับผักแว่นต้นพุ่มสูงที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับพืช *C. medicaginea* หมายเลขข้างต้น โดยมีค่าความเหมือนเท่ากับ 98.75 และ 98.60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกันจำนวน 3-11 ตำแหน่ง ดังรายละเอียดแสดงในตารางที่ 4.26 และรูปที่ 4.19

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบความต่างของผักแว่นต้นพุ่มเตี้ยกับพืชแต่ละหมายเลข พบว่าผักแว่นต้นพุ่มเตี้ยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างจากผักแว่นต้นพุ่มสูงจำนวน 8 ตำแหน่ง คือตำแหน่งที่ 72, 88, 109, 120, 455, 478, 583 และ 598 คิดเป็น 1.27 เปอร์เซ็นต์ และลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างจากพืช *C. medicaginea* หมายเลข JN990115, *C. medicaginea* var. *luxurians* หมายเลข

KP698667 และ *C. medicaginea* หมายเลข JQ067334 จำนวน 11 ตำแหน่งเช่นเดียวกัน ซึ่งคิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็น 1.75 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบความต่างของฝักแวนต้นพุ่มสูงกับพืช *C. medicaginea* หมายเลข JN990115, *C. medicaginea* var. *luxurians* หมายเลข KP698667 พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกันจำนวน 7 ตำแหน่ง และต่างจากพืช *C. medicaginea* หมายเลข JQ067334 เพียง 3 ตำแหน่ง ซึ่งคิดเป็น 1.11 และ 0.48 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าฝักแวนต้นพุ่มเตี้ยและฝักแวนต้นพุ่มสูง มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกับพืชหมายเลขข้างต้นน้อย ดังนั้นจึงทำให้ยังไม่สามารถระบุชนิดย่อยได้ นอกจากนี้เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของฝักแวนต้นพุ่มเตี้ยและฝักแวนต้นพุ่มสูง มาเปรียบเทียบความต่างกับชนิดย่อยที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank คือ *C. medicaginea* var. *neglecta* หมายเลข KX371730 ที่มีขนาดของดีเอ็นเอบริเวณยีนตำแหน่ง ITS เท่ากับ 369 คู่เบส พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกันจำนวน 3-4 ตำแหน่ง รายละเอียดแสดงดังรูปที่ 4.20 โดยฝักแวนต้นพุ่มเตี้ยและฝักแวนต้นพุ่มสูงต่างกัน 4 ตำแหน่ง คิดเป็น 1.08 เปอร์เซ็นต์ และต่างจากพืช *C. medicaginea* var. *neglecta* หมายเลข KX371730 จำนวน 3 ตำแหน่ง เช่นเดียวกัน คิดเป็น 0.81 เปอร์เซ็นต์ จากการวิเคราะห์ด้วยบริเวณยีนตำแหน่ง ITS ยังคงไม่สามารถระบุชนิดย่อยของฝักแวนต้นพุ่มเตี้ยและฝักแวนต้นพุ่มสูงได้ เนื่องจากมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกันน้อยมาก

จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด โดยใช้บริเวณยีนตำแหน่ง *rbcL* พบว่าไม่สามารถจำแนกฝักแวนต้นพุ่มเตี้ยและฝักแวนต้นพุ่มสูงออกจากกันได้ เนื่องจากไม่พบความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ เช่นเดียวกับบริเวณยีนตำแหน่ง *trnL-F* และ ITS ยังคงไม่สามารถระบุชนิดย่อยได้ เนื่องจากมีความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์น้อย นอกจากนี้มีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของชนิดย่อยพืช *C. medicaginea* ในฐานข้อมูล GenBank ค่อนข้างน้อย จึงเป็นข้อจำกัดในการระบุชนิดย่อยด้วยเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang และคณะ (2022) พบว่าบริเวณยีนตำแหน่ง *rbcL*, *matK*, *trnL-F* และ ITS ไม่สามารถจำแนกพันธุ์ (cultivated variety: cultivar) และชนิดย่อยของหญ้าไรย์ (*Lolium perenne*) พันธุ์ Medalist Gold, Pickwick, Taya และ Ascend และหญ้าสาเลียงชนิดย่อย *Agropyron cristatum* var. *cristatum* และ *Agropyron cristatum* var. *pectiniforme* ได้ เนื่องจากไม่พบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ แต่มีเพียงบริเวณยีนตำแหน่ง *trnL-F* ที่พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกันเพียง 5 ตำแหน่ง แต่ยังไม่สามารถจำแนกชนิดย่อยของหญ้าสาเลียง และพันธุ์ของหญ้าไรย์ได้ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Lathanatudom และคณะ (2017) ได้ศึกษาการจำแนกลำไย (*Dimocarpus longan*) จำนวน 26 พันธุ์ โดยใช้บริเวณยีนตำแหน่ง ITS2, *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA*, *trnL-I* และ *trnL-trnF* พบว่าบริเวณยีนตำแหน่ง ITS2, *matK*, *rbcL*, *trnL-I* และ *trnL-trnF* ไม่สามารถจำแนกชนิดย่อยและพันธุ์ปลูกของลำไยได้ ซึ่งมีเพียงบริเวณยีนตำแหน่ง *trnH-psbA* ที่ตรวจพบความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของลำไยชนิดย่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

D. longan spp. *longan* var. *obtusus* จำนวน 4 พันธุ์ ได้แก่ ลำไยเถา ลำไยแก้วยี่ ลำไยบ้านโง่ง 60 และลำไยพื้นเมือง พบว่าสามารถจำแนกความแตกต่างของลำไยเถาออกจากลำไยพันธุ์อื่นได้ดีที่สุด โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่างจากพันธุ์อื่นถึงจำนวน 70 ตำแหน่ง คิดเป็น 22.50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในอนาคต ลำไยเถาอาจจะสามารถแยกออกมาเป็นชนิดย่อยใหม่ได้ ซึ่งขัดแย้งกับผักแว่นต้นพุ่มเตี้ยและผักแว่นต้นพุ่มสูง ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกันเพียง 3-8 ตำแหน่ง ดังนั้นจึงยังไม่สามารถจำแนกพืชทั้ง 2 ลักษณะ ให้เป็นชนิดย่อยที่แตกต่างกันได้ แต่อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ใช้บริเวณยีนเพียง 3 ตำแหน่ง อาจยังไม่เพียงพอสำหรับการระบุชนิดย่อยของผักแว่นต้น เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบผล การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา ที่พบว่าพืชทั้ง 2 ลักษณะ มีองค์ประกอบของพืชต่างกันหลายส่วน เช่น ลักษณะพุ่มต้น ขนาดของใบ และลักษณะของเมล็ดที่แตกต่างกัน ซึ่งมีแนวโน้มว่าอาจจะจะเป็นพืชที่มีชนิดย่อยต่างกัน ดังนั้นควรมีการศึกษาการระบุชนิดย่อยของผักแว่นต้นพุ่มเตี้ยและผักแว่นต้นพุ่มสูง โดยใช้บริเวณยีนตำแหน่งอื่น ๆ เพื่อหาดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่เหมาะสมในการจำแนกความแตกต่าง และระบุชนิดย่อยของพืชทั้ง 2 ลักษณะต่อไป

นอกจากนี้ปัจจัยด้านสภาพแวดล้อม อาจมีผลกระทบต่อพืชทั้ง 2 ลักษณะ จึงทำให้มีลักษณะสัณฐานวิทยาแตกต่างกัน ดังงานวิจัยของ เชิดศักดิ์ และมลิวรรณ (2558) ได้ศึกษาความแตกต่างของกลอย (*Dioscorea hispida* Dennst var. *hispida*) และกลอยเขา (*Dioscorea hispida* Dennst var. *neoscaphoides*) โดยใช้หลักฐานทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่างพรรณไม้แห้งที่ได้เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชจากที่ต่าง ๆ พบว่าพืชทั้งสองมีขนาดของหัวใต้ดิน ลำต้น ใบ ดอก ผล เมล็ด รูปร่างของใบ และส่วนประกอบของดอกที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน ซึ่งกลอยจะมีขนาดใหญ่ส่วนต่าง ๆ กว่ากลอยเขา แต่เมื่อนำมาการศึกษาโดยใช้บริเวณยีนตำแหน่ง *rbcl* เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของดีเอ็นเอของกลอยและกลอยเขาจำนวน 9 ตัวอย่าง แต่พบว่าพืชทั้ง 2 ชนิด มีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกัน โดยบริเวณยีนตำแหน่ง *rbcl* ไม่สามารถแยกเป็นชนิดย่อยที่แตกต่างกันได้ ซึ่งเมื่อพิจารณาปัจจัยด้านสภาพแวดล้อม พบว่ากลอยสามารถเจริญได้ในพื้นที่แห้งแล้ง ในขณะที่กลอยเขาสามารถเจริญได้ในป่าเบญจพรรณที่มีต้นไม้อื่นช่วยบังแสง ดินมีความอุดมสมบูรณ์และมีความชื้นสูง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ ที่พบว่าผักแว่นต้นพุ่มเตี้ยเจริญบนพื้นดินเหนียวปนหินพบบริเวณริมทางที่มีแสงแดดส่องถึงตลอดทั้งวัน มีความชื้นต่ำ และแห้งแล้ง ต่างจากผักแว่นต้นพุ่มสูงที่เจริญบนภูเขาพื้นที่ราบสูง โดยมีร่มเงาของพืชชนิดอื่นบดบังแสง เช่น ก่อไผ่ และต้นไม้ยืนต้นอื่น ๆ จึงทำให้สัมผัสแสงแดดรำไร มีลักษณะของดินเป็นดินร่วน และมีความชื้นสูง จึงอาจจะเป็นไปได้ว่าลักษณะสัณฐานวิทยาของพืชทั้ง 2 ลักษณะที่แตกต่างกันนั้น ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม และพื้นที่การเจริญของพืช ซึ่งทำให้พืชมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมบริเวณถิ่นอาศัยเพื่อการอยู่รอด

ดังนั้นในอนาคตควรมีการศึกษาเพิ่มเติม โดยนำเมล็ดพันธุ์ของพืชทั้ง 2 ลักษณะ มาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดทดลอง โดยควบคุมสภาวะต่าง ๆ ให้เหมือนกัน เช่น ชนิดของอาหาร

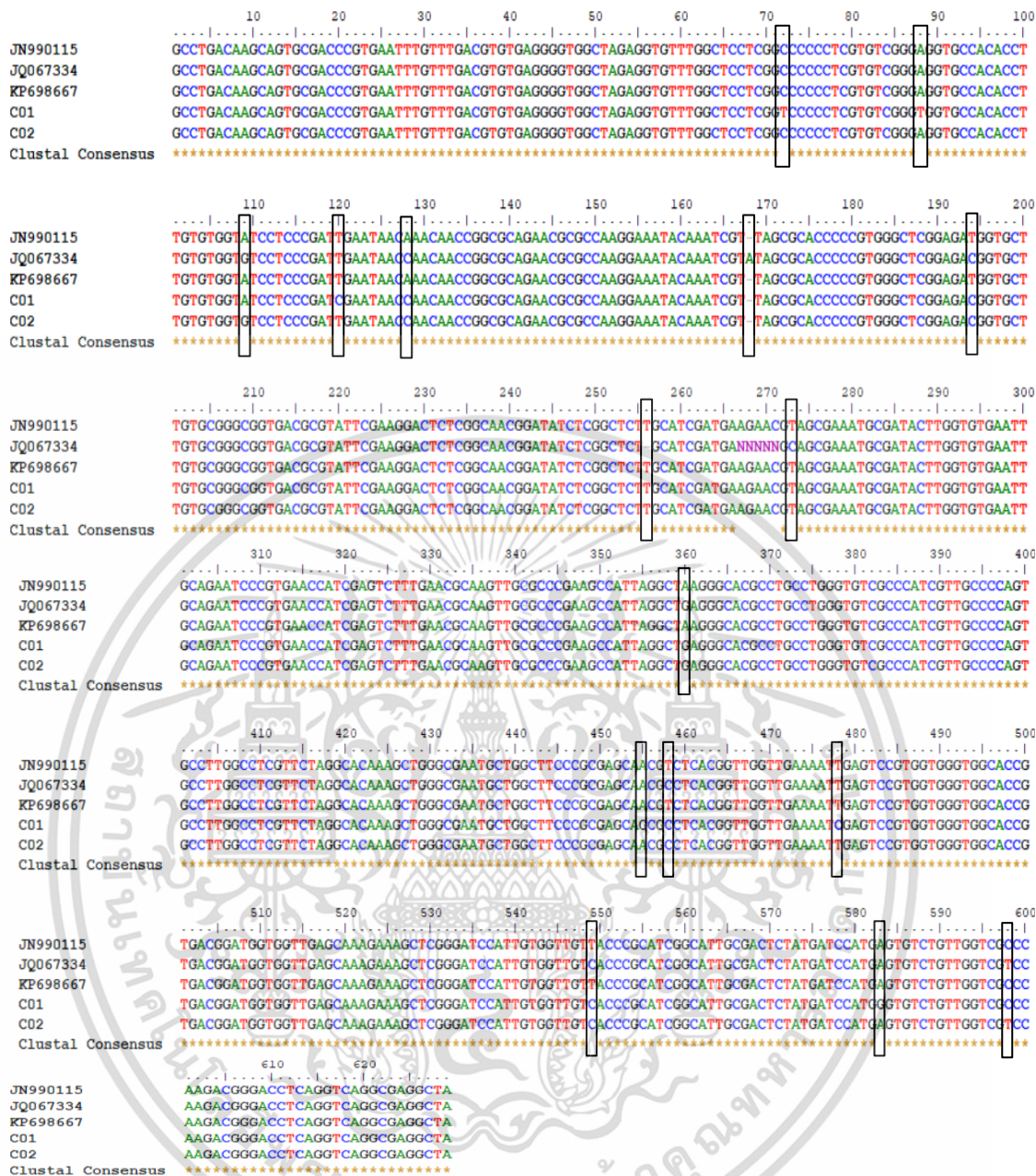
อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณแสงที่ได้รับ เป็นต้น เพื่อช่วยยืนยันว่าลักษณะสัณฐานวิทยาของพืชที่ปรากฏมีความเกี่ยวข้องกับปัจจัยด้านสภาพแวดล้อมหรือไม่

ตารางที่ 4.26 เปรียบเทียบความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีนตำแหน่ง ITS ของผักแว่นต้น พุ่มเตี้ย ผักแว่นต้นพุ่มสูง และพืช *C. medicaginea* ในฐานข้อมูล GenBank

| ตำแหน่ง | ผักแว่นต้น | | <i>C. medicaginea</i> | | |
|---------|-----------------|---------------|-----------------------|----------|-----------------------------------|
| | พุ่มเตี้ย (C01) | พุ่มสูง (C02) | JN990115 | JQ067334 | KP698667 var. <i>luxurians</i> |
| 72 | T | C | C | C | C |
| 88 | T | A | A | A | A |
| 109 | A | G | A | G | A |
| 120 | C | T | T | T | T |
| 128 | C | C | A | C | A |
| 168 | - | - | - | A | - |
| 194 | C | C | T | C | T |
| 256 | T | T | T | - | T |
| 273 | T | T | T | C | T |
| 360 | G | G | A | G | A |
| 455 | G | A | A | A | A |
| 458 | C | C | T | C | T |
| 478 | C | T | T | T | T |
| 549 | C | C | T | C | T |
| 583 | G | A | A | A | A |
| 598 | C | T | C | T | C |

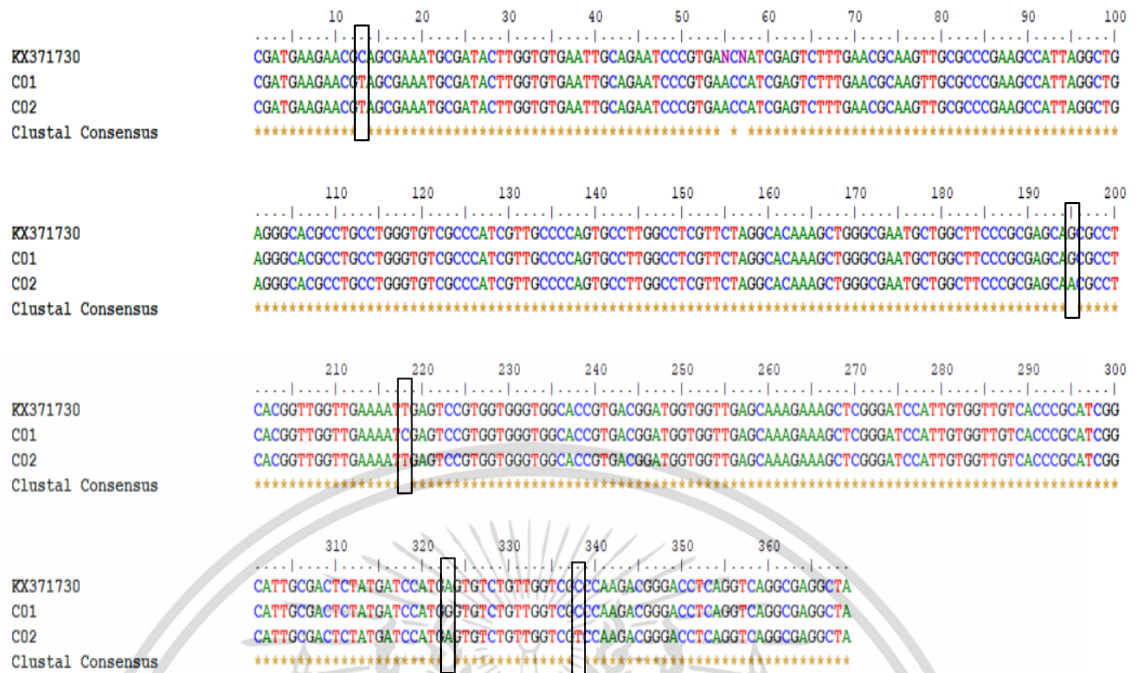
หมายเหตุ เครื่องหมาย - คือ ไม่พบลำดับนิวคลีโอไทด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.19 เปรียบเทียบความต่างของดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณยีนตำแหน่ง ITS ด้วยโปรแกรม Bio edit โดยตัวอักษร JN990115 และ JQ067334 คือพืช *C. medicaginea*, KP698667 คือพืช *C. medicaginea* var. *luxurians*, C01 คือผักแว่นต้นพุ่มเตี้ย และ C02 คือผักแว่นต้นพุ่มสูง ซึ่งกรอบสี่เหลี่ยมสีดำแสดงถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.20 เปรียบเทียบความต่างของดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณยีนตำแหน่ง ITS ด้วยโปรแกรม Bio edit โดยตัวอักษร KX371730 คือพืช *C. medicaginea* var. *neglecta*, C01 คือ ผักแว่นต้นพุ่มเตี้ย และ C02 คือผักแว่นต้นพุ่มสูง ซึ่งกรอบสี่เหลี่ยมสีดำแสดงถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกัน

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้น พบว่าสารสกัดรากและใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์มีฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านต่าง ๆ ดีกว่าสารสกัดเมทานอลจากกิ่งที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ กิ่งที่กำจัดคลอโรฟิลล์ และใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ โดยเฉพาะมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 เซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29 และเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ดังนั้นจึงนำมาแยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction พบว่าสารสกัดแยกส่วนจากราก (L) มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีกว่าสารสกัดแยกส่วนจากราก (R) โดยเฉพาะสารสกัดแยกส่วนจากรากที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DL) และเอทิลอะซิเตท (EL) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดี นอกจากนี้สารสกัดแยกส่วนจากรากที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DL) ยังมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิดข้างต้น รวมถึงมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ ได้แก่ เซลล์เยื่อบุไตลิงชนิด Vero และเซลล์เคอราติโนไซต์ชนิด HaCaT ดังนั้นจึงนำทั้ง 2 สารสกัดแยกส่วน มาแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี column chromatography พบว่าสารสกัดส่วนย่อยจากรากที่ใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ELF) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acne* และมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดี ส่วนสารสกัดส่วนย่อยจากรากที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DLF) มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 และเซลล์เยื่อบุไตลิงชนิด Vero สูงเช่นเดียวกัน ซึ่งอาจจะไม่เหมาะสมต่อการนำไปรับประทาน เนื่องจากอาจทำให้อวัยวะตับและไตทำงานผิดปกติ

จากการนำสารสกัดที่แยกสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction จำนวน 6 สารสกัด ได้แก่ สารสกัดแยกส่วนจากรากที่ใช้ตัวทำละลายเฮกเซน (HR) ไดคลอโรมีเทน (DR) เอทิลอะซิเตท (ER) และสารสกัดแยกส่วนจากรากที่ใช้ตัวทำละลายเฮกเซน (HL) ไดคลอโรมีเทน (DL) และเอทิลอะซิเตท (EL) มาวิเคราะห์ห้องค์ประกอบทางเคมี สามารถตรวจพบสารสำคัญที่น่าสนใจหลายชนิด เช่น 1-Butanol, 3-methyl, formate หรือ Isoamyl alcohol, 13-Decosenamide, phytol, dibutyl phthalate, pulegone และ loliolide ซึ่งสารเหล่านี้อาจมีผลโดยตรงกับฤทธิ์ทางชีวภาพ นอกจากนี้สารสกัดส่วนย่อยที่แยกสารด้วยวิธี column chromatograph จำนวน 19 สารสกัด (DLF1-13 และ ELF1-6) ตรวจพบสารสำคัญที่น่าสนใจหลายชนิด โดยสารสกัดส่วนย่อยจากรากที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DLF) ตรวจพบสาร medicarpin, phenol, 2,4-bis (1,1-dimethylethyl), Phenol, bis (1,1-dimethylethyl), Phenol, 3,5-bis (1,1-dimethylethyl, pulegone, succinimide, lauric acid และ benzoic acid ที่มีความสำคัญในด้านฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ส่วนสารกลุ่ม phthalate พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 และเซลล์เยื่อบุไตลิงชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Vero สำหรับสารสกัดส่วนย่อยจากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (ELF) ตรวจพบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ได้แก่ salicylic acid (BHA), benzoic acid, succinimide, pluchidiol, daidzein, niacinamide, kaempferide และ lauric acid จะเห็นได้ว่าสารสกัดของผักแว่นต้นมีแนวโน้มที่สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดได้หลายด้าน เช่น ยารักษาโรค ยาฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ยาปฏิชีวนะ ตลอดจนพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ เช่น แผ่นแปะผิว ครีมแต้มผิว ยาสมุนไพร ครีมบำรุงผิวเพื่อความกระจ่างใส และครีมกันแดดได้ในอนาคต

การระบุชนิดย่อยของผักแว่นต้นโดยการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา และการใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด พบว่าผักแว่นต้นพุ่มเตี้ยและผักแว่นต้นพุ่มสูง มีลักษณะพุ่มต้น ความสูงของลำต้น ขนาดของใบ มีลักษณะและความลึกของบริเวณข้อเมล็ดที่ต่างกัน แต่เมื่อนำมาระบุชนิดย่อยด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด โดยใช้บริเวณยีน 3 ตำแหน่ง คือ *rbcl*, *trnL-trnF* และ *ITS* พบว่าบริเวณยีนตำแหน่ง *rbcl* ไม่พบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ ส่วนบริเวณยีนตำแหน่ง *trnL-trnF* และ *ITS* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกันเพียง 3-8 ตำแหน่ง ซึ่งบริเวณยีนดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความผันแปรทางพันธุกรรมในผักแว่นต้น แต่ยังไม่สามารถระบุชนิดย่อยของผักแว่นต้นได้ ดังนั้นควรมีการนำบริเวณยีนตำแหน่งอื่น ๆ มาศึกษาเพื่อจำแนกความแตกต่างของพืชทั้ง 2 ลักษณะต่อไปในอนาคต

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของผักแว่นต้นด้วยวิธี GC-MS พบว่าสารสกัดของผักแว่นต้นมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี โดยเฉพาะฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งมีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ทางเวชสำอางเนื่องจากพบสารสำคัญ เช่น salicylic acid, medicarpin, succinimide, lauric acid, pulegone, niacinamide และ kaempferide แต่อย่างไรก็ตามตรวจพบสารกลุ่ม phthalate ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ ควรมีการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ในสัตว์ทดลอง (*In vivo*)

สำหรับการระบุชนิดย่อยของผักแว่นต้นโดยการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องของปัจจัยด้านสภาพแวดล้อม ที่มีผลทำให้ลักษณะสัณฐานวิทยาของผักแว่นต้นพุ่มเตี้ยและผักแว่นต้นพุ่มสูง โดยนำเมล็ดมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดทดลอง ซึ่งควบคุมสภาวะแวดล้อมให้เหมือนกัน และควรศึกษาเพิ่มเติมด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด โดยใช้บริเวณยีนตำแหน่งอื่น ๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการจำแนกความแตกต่างของพืชทั้ง 2 ลักษณะ

เอกสารอ้างอิง

จาริวัฒน์ ศิริอินทร์ และเจียร ชีระวรงค์. 2563. “การศึกษาเบื้องต้นของสารสกัดจากพืชที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้และผิวหนัง.” *วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเชีย ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*. 14(3) : 99-114.

จุฑารัตน์ ศรีประเสริฐ. 2559. “การทดสอบสารพฤษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของแคนา.” *วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยบูรพา*.

จุฑาภรณ์ ผลมะขาม. 2563. “ปัจจัยที่มีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากใบสัก.” *วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง*.

ชนัญชิตา แซ่ม้า และวรรณ จิรภาคย์กุล. 2554. “ผลของชนิดตัวทำละลายต่อสารระเหยที่สกัดจากน้ำมะพร้าวหอมเผา.” หน้า 564-572. ใน *การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49*. กรุงเทพฯ : สาขาอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เชิดศักดิ์ ทัพใหญ่ และมลิวรรณ นาคขุนทด. 2557. *หลักฐานทางสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุลเปรียบเทียบระหว่างกลอยและกลอยเขา*. พิษณุโลก : มหาลัยนเรศวร.

ณัฐฉิณี ชีรกุลกิตติพงศ์, ภักดี สุขพรสวรรค์, อาณัติ ดีพัฒนา, สมชาติ โชคชัยธรรม, จักริน สุขสวัสดิ์ชื่น และมารุต ตั้งวัฒนาชูลีพร. 2561. “การวิเคราะห์ความไวต่อยาปฏิชีวนะรูปแบบใหม่และมีประสิทธิภาพสูงสำหรับการทดสอบตัวอย่างทางคลินิกระดับจุลภาคด้วยวิธีการพิสูจน์เอกลักษณ์ภาพดิจิทัล.” *มหาวิทยาลัยบูรพา*.

เนตรดาว เพี้ยแก้ว. 2545. “การศึกษาโครโมโซมและเรณูของพรรณไม้เผ่า *Crotalarieae* และ *Indigofereae* (Papilionideae) ในอุทยานแห่งชาติภูพาน.” *วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยขอนแก่น*.

บุหรัน พันธุ์สวรรค์. 2556. “อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ.” *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*. 21(3) : 275-286.

ประสาทร บริสุทธิ์เพชร, พิทย กัญบุตร และสาธิต พรตระกูลพิพัฒน์. 2551. “การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ.” *การประชุมวิชาการสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ครั้งที่ 9 สัตวแพทย์ทางเลือกวันนี้*. ขอนแก่น : มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

เพชรรุ่ง นาดสกุลมงคล และวนิดา สุวรรณเมฆ. 2564. “การบ่งชี้สายพันธุ์ของ *Crotalaria* sp. และการประเมินพฤษเคมี.” *วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง*.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- รัชดา อุษยนิยงค์ และสุนิดา เมืองโคตร. 2563. “การยับยั้งแบคทีเรียก่อให้เกิดโรคที่ปนเปื้อนในผักกาดหอม ด้วยสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทย.” *วารสารการเกษตรราชภัฏ*. 19(2) : 67-76.
- ลือชัย บุตุคูป. 2012. “สารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ทางชีวภาพ.” *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม*. 31(4) : 443-455.
- วรพร ศीलศร. 2554. “การเตรียมสารสกัดมาตรฐานกล้วยไม้หวายม่วงแดงเพื่อใช้ประโยชน์ทางเครื่องสำอาง.” วิทยาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง.
- สันติ โพธิ์ศรี, ปราโมทย์ มหคุณากร และอัจฉรา ศรีสดใส. (ม.ป.ป.) “ฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดจากใบรางจืด : ผลต่อการสร้าง nitric oxide และ prostaglandin E₂ ในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7).” *คณะเภสัชศาสตร์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น*.
- สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม, อินทิรา เพชรทับทิม และเกษม สร้อยทอง. 2555. “ความเป็นพิษต่อเซลล์ของ Beauvericin และสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อราสกุล *Beauveria* sp.” *วารสารวิจัยราชภัฏพระนคร*. 7(1) : 35-43.
- สุวิชญา จันทรสภา. 2565. “ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์และฤทธิ์ทางชีวภาพของลำไยเถา.” *ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง*.
- สุธิรา มณีฉาย และประสพอร รินทอง. 2016. “ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลจากดอกชงโค อัญชัน เข็มฝรั่งและพุทธรักษา.” *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม*. 36(2) : 148-153.
- อชิป สกุลเผือก. 2559. **อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ**. (Online). สืบค้นจาเว็บไซต์ : <https://ccpe.pharmacycouncil.org/index>.
- Adamczak, A., Ozarowski, M. and Karpinski, T.M. 2019. “Antibacterial activity of some flavonoids and organic acids widely distributed in plants.” *Journal of clinical medicine* 9(1) : 1-17.
- Akbar, A., Soekamto, N.H., Firdaus and Bahrin. 2021. “Antioxidant of n-hexane, ethyl acetate and methanol extracts of *Padina* sp. with DPPH method.” *International Conference on Sustainable Utilization of Natural Resources*. 800 : 1-6.
- Anim, M.T., Larbie, C., Appiah-Opong, R., Tuffour, I., Baffour-Awuah Owusu, K. and Aning, A. 2016. “Phytochemical, antioxidant and cytotoxicity of hydroethanolic extracts of *Crotalaria retusa* L.” *World Journal of Pharmaceutical Research* *World Journal Pharmaceutical of Research*. 5(2) : 162-179.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Ashraf, M.A., Muhammad, I., Rasheed, R., Hussain, I., Riaz, M. and Arif, M.S. 2018. "Chapter 8 : Environmental stress and secondary metabolites in plants : An Overview." *Plant Metabolites and Regulation Under Environmental Stress*. 153-167.
- Ayele, T.T., Gurmessa, G.T., Abdissa, Z., Kenasa, G. and Abdissa, N. 2022. "Oleanane and stigmasterol-type triterpenoid derivatives from the stem bark of *Albizia gummifera* and their antibacterial activities." *Hindawi Journal of Chemistry*. 1-7.
- Azwanida, N.N. (2015). "A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation." *Medicinal and Aromatic Plants*. 4(3) : 1-6.
- Al-Shehri, M. and Moustafa, M. 2019. "Anticancer, antibacterial, and phytochemicals derived from extract of *Aerva javanica* (Burm.f.) Juss. ex Schult. grown naturally in saudi arabia." *Tropical Conservation Science*. 12 : 1-10.
- Biswas, T. and Dwivedi, U.N. 2019. "Plant triterpenoid saponins : biosynthesis, *In vitro* production, and pharmacological relevance." *Protoplasma*. 25 : 1463-1486.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. and Gontier, E. 2001. "Production of plant secondary metabolites : A historical perspective." *Plant Science*. 161(5) : 839-851.
- 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.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2020. "Performance standards for antimicrobial susceptibility testing." 30th ed. CLSI supplement M100 (ISBN 978-1-68440-066-9 [Print] ; ISBN 978-1-68440-067-6 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA.
- Creedy, T.J., Norman, H., Tang, C.Q., Qing Chin, K., Andujar, C., Arribas, P. and Vogler, A.P. 2020. "A validated workflow for rapid taxonomic assignment and monitoring of a national fauna of bees (Apiformes) using high throughput DNA barcoding." *Molecular ecology resources*. 20(1) : 40-53.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Cuellar, E.J., Martínez, J., Rojano, B., Gil, H.J. and Durango, D. 2020. "Chemical composition and antioxidant and antibacterial activity of *Platymiscium gracile* Benth : a species threatened by extinction." *Journal of King Saud University-Science*. 32(1) : 702-708.
- Devendra, B.N., Srinivas, N. and Solmon, K.S. 2012. "A comparative pharmacological and phytochemical analysis of in vivo and in vitro propagated *Crotalaria* species." *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 5(1) : 37-41.
- Doyle, S. and Doyle, J.L. 1987. "A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue." *Phytochemical Bulletin*. 19(1) : 11-15.
- Elansary, H.O., Abdelgaleil, S.A.M., Mahmoud, E.A., Yessoufou, K., Elhindi, K. and El-Hendawy, S. 2018. "Effective antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of essential oils of horticultural aromatic crops in northern Egypt." *BMC complementary and alternative medicine*. 18(214) : 1-10.
- Esler, A.E. 1988. "The naturalisation of plants in urban Auckland, New Zealand. The nature of the naturalised species." *New Zealand Journal of Botany*. 26(3) : 345-385.
- Fletcher, M.T., Hayes, P.Y., Somerville, M.J. and De Voss, J.J. 2011. "*Crotalaria medicaginea* associated with horse deaths in northern Australia : new pyrrolizidine alkaloids." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59(21) : 11888-11892.
- Grabarczyk, M., Winska, K., Maczka, W. and Potaniec, B. 2015. "Loliolide-the most ubiquitous lactone." *Folia Biologica et Oecologica*. 11.
- Gadhoumi, H., Hayouni, E.L.A., Martinez-Rojas, E., Yeddes, W. and Tounsi, M.S. 2022. "Biochemical composition, antimicrobial and antifungal activities assessment of the fermented medicinal plants extract using lactic acid bacteria." *Archives of Microbiology*. 204(7) : 1-24.
- Hojnik, M., Skerget, M. and Knez, Z. 2007. "Isolation of chlorophylls from stinging nettle (*Urtica dioica* L.)." *Separation and Purification Technology*. 57 : 37-46.
- Holland, A.E. 2002. "A review of *Crotalaria* L. (Fabaceae : Crotalarieae) in Australia." *Austrobaileya*. 6(2) : 293-332.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Hostettmann, K.A. and Marston, A. 1995. **Saponins : chemistry and pharmacology of natural products**. Cambridge : Cambridge University.
- Hu, X.R., Chou, G.X. and Cheng, G.Z. 2017. “Flavonoids, alkaloids from the seeds of *Crotalaria pallida* and their cytotoxicity and anti-inflammatory activities.” *Phytochemistry*. 143 : 64-71.
- Idris, S., Mishra, A. and Khushtar, M. 2020. “Phytochemical, ethnomedicinal and pharmacological applications of aescin from *Aesculus hippocastanum* L. towards future medicine.” *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*. 31(5) : 1-13.
- Irshad, S., Iftikhar, S., Riaz, M., Mahmood, A., Mushtaq, A., Saleem, Y., Shamim, R. and Akter, S.Q. 2024. “Chemical fingerprinting, antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer potential of greenly synthesized silver nanoparticles from pistachio (*Pistacia vera*) nuts and senna (*Cassia angustifolia* Vahl.) leaves.” *Food Science and Nutrition*. 1-8.
- Jain, S.C., Jain, R. and Singh, R. 2009. “Ethnobotanical survey of Sariska and Siliserh regions from Alwar district of Rajasthan, India.” *Ethnobotanical Leaflets*. 13 : 171-188.
- Jamboonsri, P., Pithayanukul, P., Bavovada, R. and Chomnawang, M.T. 2011. The inhibitory potential of Thai mango seed kernel extract against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.” *Molecules*. 16(8) : 6255-6270.
- Kallassy. H. 2017. “Phytochemistry and biological activities of selected Lebanese plant species (*Crataegus azarolus* L. and *Ephedra campylopoda*).” *Human health and pathology*. Université de Limoges ; Université Libanaise, English.
- Ketprayoon, T. and Chaicharoenpong, C. 2018. “Tyrosinase inhibitory activity of some edible plants.” 1-5. in **the 6th International Conference on Biochemistry and Molecular Biology**. Bangkok : Chulalongkorn University.
- Khan, S.B., Khan, M.T.H, Jang, E.S, Akhtar, K., Seo, J. and Han, H. 2010. “Tyrosinase inhibitory effect of benzoic acid derivatives and their structure-activity relationships.” *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 25(6) : 812-817.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Khan, S., Richa, Kaur, H. and Jhamta, R. 2019. "Evaluation of antioxidant potential and phytochemical characterization using GC-MS analysis of bioactive compounds of *Achillea filipendulina* (L.) Leaves." *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 8(3) : 258-265.
- Khoddami, A., Wilkes, M.A. and Roberts, T.H. 2013. "Techniques for analysis of plant phenolic compounds." *Molecules*. 18 : 2328-2375.
- Kim, Y.J. and Uyama, H. 2005 "Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic source : structure, inhibition mechanism and prospective for the future." *Cellular and Molecular Life Sciences*. 62 : 1707-1723.
- Kuswanto, D. Lister, I.N.E., Girsang, E., Nasution, A.N. and Widowati, W. 2020. "Comparison of antioxidant and anti-tyrosinase activity between black soybean (*Glycine max* (L) Merr) and Daidzein." *Bulet in Farmatera*. 5(1) : 163-171.
- Koss-Mikołajczyk, I., Kusznierevicz, B. and Bartoszek, A. 2019. "The relationship between phytochemical composition and biological activities of differently pigmented varieties of berry fruits ; comparison between embedded in food matrix and isolated anthocyanins." *Foods*. 8(12) : 1-18.
- Kumar, K.I.A., Manickam, M.S., Sreejith, M. and Sebastin, V. 2021. "In vitro antioxidant and anthelmintic activity of the extracts of whole plant *Crotalaria biflora* (L)." *Annals of The Romanian Society for Cell Biology*. 25(4) : 250-161.
- Kwon, K.C., Won, J.G., Kim, S.M., Shin, Y.W., Park, S.W. and Song, Y.S. 2023. "Anti-acne activity of carnitine salicylate and magnolol through the regulation of exfoliation, lipogenesis, bacterial growth and inflammation." *Skin Research and Technology*. 29(7) : 1-10.
- Le Roux, k. 2011. "Selective cytotoxicity of *Crotalaria agatiflora* subspecies *agatiflora* Schweinf." Master of Science (Medicinal Plant Science), University of Pretoria.
- Le Roux, M.M., Boatwright, J.S. and Van Wyk, B.E. 2013. "A global infrageneric classification system for the genus *Crotalaria* (Leguminosae) based on molecular and morphological evidence." *Taxon*. 62(5) : 957-971.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Lithanatudom, S.K., Chaowasku, T., Nantarat, N., Jaroenkit, T., Smith, D.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 reports*. 7 : 1-11.
- Mastakar, V.K., Swamy, J. and Barman, R.D. 2023. "*Crotalaria medicaginea* var. *neglecta* (Fabaceae : Crotalarieae) : A new distributional record for eastern India." *Biological Forum-An International Journal*. 15(10) : 7-8.
- Muddathir, A.M., Yamauchi, K., Batubara, I., Mohieldin, E.A.M. and Mitsunaga, T. 2016. "Anti-tyrosinase, total phenolic content and antioxidant activity of selected Sudanese medicinal plants." *South African Journal of Botany*. 109 : 9-15.
- Ninkaew, S., Balslev, H., Pornpongrueng, P. and Chantaranothai, P. 2017a. "*Crotalaria* L. (Fabaceae : Faboideae) in continental Southeast Asia." *Phytotaxa*. 320(1) : 1-74.
- Ninkaew, S., Pornpongrueng, P., Balslev, H. and Chantaranothai, P. 2017b. "Seed morphology of nineteen *Crotalaria* L. (Fabaceae) species in Thailand." *Thai Forest Bulletin (Botany)*. 45(1) : 47-57.
- Nithitanakool, S., Pithayanukul, P. and Bavovada, R. 2009. "Antioxidant and hepatoprotective activities of Thai mango seed kernel extract." *Planta Medica*. 75(10) : 1118-1123.
- Niyomdham, C. 1978. "A revision of the genus *Crotalaria* Linn. (Papilionoideae) plants." *Thai Forest Bulletin (Botany)*. 11 : 105-181.
- Pagare, S., Bhatia, M., Tripathi, N., Pagare, S. and Bansal, Y. K. 2015. "Secondary metabolites of plants and their role: Overview." *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*. 9(3) : 293-304.
- Phaisan, S., Yusakul, G., Sakdamas, A., Taluengjit, N., Sakamoto, S. and Putalun, W. 2020. "A green and effective method using oils to remove chlorophyll from *Chromolaena odorata* (L.) R.M. King and H. Rob." *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 42(5) : 1084-1090.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Pimratch, S., Thammapat, P. and Mungkunkamchao, T. 2022. "Bio-active compounds and antioxidant activity in flowers and seeds of Sunn hemp." *Prawarun Agricultural Journal*. 19(2) : 172-179.
- Park, S., Choi, E., Kim, S., Kim, D., Kim, J., Chang, S., Choi, J., Park, K., Roh, K.B. and Lee, J. 2018. "Oxidative stress-protective and anti-melanogenic effects of loliolide and ethanol extract from fresh water green algae, *Prasiola japonica*." *International Journal of Molecular Sciences*. 19(9) :1-15.
- Rahiman, S., Tantry, B.A. and Kumar, A. 2012. "Variation of antioxidant activity and phenolic content of some common home remedies with storage time." *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*. 10 : 124-127.
- Rajesh, A., Doss, A., Tresina, P.S. and Mohan, V.R. 2019. "In vitro anticancer activity of few plant extracts against MCF-7, MDA-MB468 and MDA-MB231 cell lines." *The Pharma Innovation Journal*. 8(3) : 38-41.
- Ramsden, C. A. and Riley P. A. 2014. "Tyrosinase : the four oxidation states of the active site and their relevance to enzymatic activation, oxidation and inactivation." *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 22(8) : 2388–2395.
- Rather, S. A., Subramaniam, S., Danda, S. and Pandey, A. K. 2018. "Discovery of two new species of *Crotalaria* (Leguminosae, Crotalarieae) from Western Ghats, India." *PLOS One*. 13(2) : 1-20.
- Rho, H.S., Ghimeray, A.K., Yoo, D.S., Ahn, S.M., Kwon, S.S., Lee, K.H., Cho, D.H. and Cho, J.Y. 2011. "Kaempferol and kaempferol rhamnosides with depigmenting and anti-inflammatory properties." *Molecules*. 16(4) : 3338-3344.
- Rockinger, A., Flores, A.S. and Renner, S.S. 2017. "Clock-dated phylogeny for 48% of the 700 species of *Crotalaria* (Fabaceae : Papilionoideae) resolves sections worldwide and implies conserved flower and leaf traits throughout its pantropical range." *BMC Evolutionary Biology*. 17(61) : 1-13.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Rosaria, L., Bresciani, M., Lami, A. and Morabito, G. 2017. "Chlorophyll a interference in phycocyanin and allophycocyanin spectrophotometric quantification." *Journal of limnology*. 77(1) : 169-177.
- Saad, E.E. 2009. "Cytotoxic and Antibacterial Constituents from the Roots of *Sonchus oleraceus* L. Growing in Egypt." *Pharmacognosy Magazine*. 4(20) : 1-5.
- Saba, S.K. 2019. "Phytochemical and Pharmacological Potential of *Crotalaria* L. A Review." Bachelor degree, Brac University.
- Serrano, J., Puupponen-Pimi, R., Dauer, A., Aura, AM. and Saura-Calixto, F. 2009 "Tannins : current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects." *Molecular Nutrition and Food Research*. 53 : 310-329.
- Sharma, G.N., Dubey, S.K., Sati, N. and Sanadya, J. 2011. "Anti-inflammatory activity and total flavonoid content of *Aegle marmelos* seeds." *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*. 3(3) : 214-218.
- Sharma, L. and Khandelwal, S. 2010. "Traditional Uses of Plants as Cooling Agents by the Tribal and Traditional Communities of Dang Region in Rajasthan, India." *Ethnobotanical Leaflets*. 14 : 218-224.
- Sinan, K.I., Saftić, L., Peršurić, Ž., Pavelić, S.K., Etienne, O.K., Picot-Allain, M.C.N., Mahomoodally, M.F. and Zengin, G. 2020. "A comparative study of the chemical composition, biological and multivariate analysis of *Crotalaria retusa* L. stem barks, fruits, and flowers obtained via different extraction protocols." *South African Journal of Botany*. 128 : 101-108.
- Singtonat, S. and Osathanunkul, M. 2015. "Fast and reliable detection of toxic *Crotalaria spectabilis* Roth. in *Thunbergia laurifolia* Lindl. herbal products using DNA barcoding coupled with HRM analysis." *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 15(162) : 1-8.
- Srinivasan, S., Wankhar, W., Rathinasamy, S. and Rajan, R. 2016. "Free radical scavenging potential and HPTLC analysis of *Indigofera tinctoria* Linn (Fabaceae)." *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 6 : 125-131.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Subramaniam, S., Pandey, A. K. and Rather, S. A. 2015a. "A revised circumscription of the species in *Bracteatae* complex (section *Calycinae*) in the genus *Crotalaria* L. : evidence from nuclear and chloroplast markers." *Plant Systematics and Evolution*. 301 : 2261-2290.
- Subramaniam, S., Pandey, A.K., Geeta, R. and Mort, M.E. 2013b. "Molecular systematics of Indian *Crotalaria* (Fabaceae) based on analyses of nuclear ribosomal ITS DNA sequences." *Plant Systematics and Evolution*. 299 : 1089-1106.
- Sukor, S., Zahari, Z., Rahim, N., Yusoff, J. and Salim, F. 2022. "Chemical constituents and antiproliferative activity of *Eleusine indica* (L.) Gaertn." *Sains Malaysiana*. 51(3) : 873-882.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. and Bouvet, J. 1991. "Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA." *Plant Molecular Biology*. 17(5) : 1105-1109.
- Tagrida, M. and Benjakul, S. 2020. "Ethanollic extract of Betel (*Piper betle* L.) and Chaphlu (*Piper sarmentosum* Roxb.) dechlorophyllized using sedimentation process: Production, characteristics, and antioxidant activities." *Journal of Food Biochemistry*. 44(1) : 1-14.
- Venkatachalam, U. and Muthukrishnan, S. 2012. "Free radical scavenging activity of ethanollic extract of *Desmodium gangeticum*." *Journal of Acute Medicine*. 2 : 36-42.
- Yadava, R.N. and Vishwakarma, U.K. (2014). "New potential allelochemicals from *Crotalaria medicaginea* Lam." *Chemical Science Transactions*. 3(1) : 141-150.
- Yang, X., Kang, M.C., Lee, K.W., Kang, S.M., Lee, W.W. and Jeon, Y.J. 2011. "Antioxidant activity and cell protective effect of loliolide isolated from *Sargassum ringgoldianum* subsp." *Algae*. 26 : 201-208.
- Wang, J., Yan, Z., Zhong, P., Shen, Z., Yang, J. and Ma, L. 2022. "Screening of universal DNA barcodes for identifying grass species of Gramineae." *Frontiers in Plant Science*. 1-8.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Wangcharoen, W. and Phimphilia, S. 2016. "Chlorophyll and total phenolic contents, antioxidant activities and consumer acceptance test of processed grass drinks." *Journal of Food Science and Technology*. 53(12) : 4135-4140.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J.W. 1990. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. San Diego, CA : Academic Press.
- Wight, R. and Walker-arnott, G.A. 1834. **Prodromus florae peninsulae india orientalis**. London : Parbury, Allen and Co. 1 : 191-192.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารเคมีสำหรับการตรวจสอบสารพิษเคมี

1.1 Dragendroff's reagent

เตรียมสารละลาย Dragendroff's reagent ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำโดยชั่งปัสเมสไนเตท 8 กรัม ละลายในกรดไนตริกความเข้มข้น 30% ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ 27.2 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยนำมาผสมกับสารละลายปัสเมสไนเตท และปรับปริมาตรจนถึง 100 มิลลิลิตร

1.2 Mayer's reagent

เตรียมสารละลาย Mayer's reagent ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำโดยชั่งเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.136 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 6 มิลลิลิตร และละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ 0.5 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ผสมลงในสารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์ และปรับปริมาตรจนถึง 10 มิลลิลิตร เมื่อสารทั้งสองชนิดผสมกันจะสังเกตเห็นเป็นสีส้มและจะค่อย ๆ จางลงเป็นสีใส

1.3 Wagner's reagent

เตรียมสารละลาย Wagner's reagent ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำโดยชั่งโพแทสเซียมไอโอไดด์ 0.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นเล็กน้อย จากนั้นเติมผงไอโอดีน 0.127 กรัม ลงไปและละลายให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรจนถึง 10 มิลลิลิตร

1.4 Gelatin solution

เตรียมสารละลาย Gelatin solution ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยชั่งผงเจลาติน 0.1 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเจลาตินละลาย

1.5 Gelatin salt solution

เตรียมสารละลาย Gelatin salt solution โดยผสมสารละลาย Gelatin solution และสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 10% ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ผสมให้เข้ากัน

1.6 เฟอร์ริก คลอไรด์

เตรียมสารละลายเฟอร์ริก คลอไรด์ความเข้มข้น 1% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยชั่ง เฟอร์ริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรท ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) จำนวน 0.17 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรจนถึง 10 มิลลิลิตร

2. การเตรียมสารเคมีสำหรับการหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

2.1 Folin-ciocalteu reagent

เตรียมสารละลาย Folin-ciocalteu reagent ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยผสมสารละลาย Folin-ciocalteu reagent ปริมาตร 10 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 90 มิลลิลิตร

2.2 สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต

เตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7.5% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดย ชั่งผง โซเดียมคาร์บอเนต 7.5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และปรับปริมาตรจนถึง 100 มิลลิลิตร

3. การเตรียมสารเคมีสำหรับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

3.1 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer)

การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.8 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร โดยการเตรียมจากสาร A คือ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ และสาร B $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ชั่งสาร 0.312 และ 0.280 กรัม ตามลำดับ โดยแต่ละสารจะละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายทั้ง 2 สารมาผสมกัน ให้มีค่า pH เท่ากับ 6.8 จากนั้นจึงปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.2 สารละลาย L-dopa

เตรียมสารละลาย L-dopa ความเข้มข้น 1.7 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เตรียมโดยชั่งผง L-dopa 3.35 มิลลิกรัม ละลายด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.8 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.3 เอนไซม์ไทโรซิเนส

เตรียมเอนไซม์ไทโรซิเนสความเข้มข้น 48 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยเจือจางจากสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ความเข้มข้นสูงสุด 2681 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยทำเจือจางสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนสผสมกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.8 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ให้มีความเข้มข้นของเอนไซม์เป็น 1000, 500, 100 และ 48 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเก็บไว้ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ข้อเสนอแนะในการเตรียมเอนไซม์ไทโรซิเนส ควรเตรียมให้สถานะที่มีอุณหภูมิต่ำ และปราศจากแสง เนื่องจากเอนไซม์เสื่อมสภาพง่าย

4. การเตรียมสารเคมีสำหรับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์

4.1 สารละลาย Phosphate buffered saline (PBS)

เตรียมสารละลาย Phosphate buffered saline ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยการชั่ง NaCl 0.08 กรัม KCl 0.02 กรัม NaHPO_4 0.115 กรัม และ KH_2PO_4 0.02 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน และนำไปปรับค่า pH ให้ได้เท่ากับ 7.2 จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์หนึ่ง และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

4.2 สารละลาย Sodium nitroprusside (SNP)

เตรียมสารละลาย Sodium nitroprusside ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยชั่งผง Sodium nitroprusside 29.9795 มิลลิกรัม ละลายในสารละลาย Phosphate buffered saline ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

4.3 สารละลาย Griss reagent

เตรียมสารละลาย Griss reagent ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยชั่งผง Griss reagent 0.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

5. การเตรียมสารเคมีสำหรับการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

5.1 อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 แบบ incomplete media

เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เตรียมโดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ชนิดผง 1 ซอง และผงโซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO_3) 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 900 มิลลิลิตร กวนให้เข้ากันจนละลายเป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง และปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วง 7-7.4 ก่อนนำมากรองด้วยตัวกรองที่บรรจุแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร โดยเตรียมภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5.2 อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 แบบ completed media

เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 เสริมด้วย Fetal bovine serum (FBS) 5% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยทำการ Heat inactivate FBS ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส 30 นาทีก่อนนำไปใช้งาน โดยผสม FBS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร กับยาปฏิชีวนะเจนตามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่ได้จากข้อ 5.1 จากนั้นเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6. การเตรียมสารเคมีสำหรับการระบุชนิดพืชในสกุล *Crotalaria*

6.1 สารละลาย 2X CTAB buffer

เตรียมสารละลาย 2X CTAB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำโดยเตรียมน้ำกลั่น สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ และสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0 และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นผสมสาร CTAB จำนวน 2 กรัม และ Polyvinylpyrrolidone (PVP) 1 กรัม ละลายด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 28 มิลลิลิตร และสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจนสารละลาย โดยปั่นกวนด้วยเครื่องกวนสาร และค่อย ๆ เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงไปเพื่อปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

6.2 สารละลาย 10% CTAB buffer

เตรียมสารละลาย 10% CTAB buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยชั่งผง CTAB 10 กรัม ละลายด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.7 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจนละลาย และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6.3 สารละลาย dNTPs

เตรียมสารละลาย dNTPs ความเข้มข้น 1.25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร โดยผสมสารละลาย ดังนี้ dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ตูตแต่ละสารละลายมาอย่างละ 6.25 ไมโครลิตร และผสมกับน้ำกลั่นปราศจากไอออน ปริมาตร 475 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

6.4 สารละลาย 10X TBE buffer

เตรียมสารละลาย 10X TBE buffer ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร โดยชั่งสาร Tris-base ($C_4H_{11}NO_3$) 108 กรัม Boric acid 55 กรัม และสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และกวนจนละลายเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

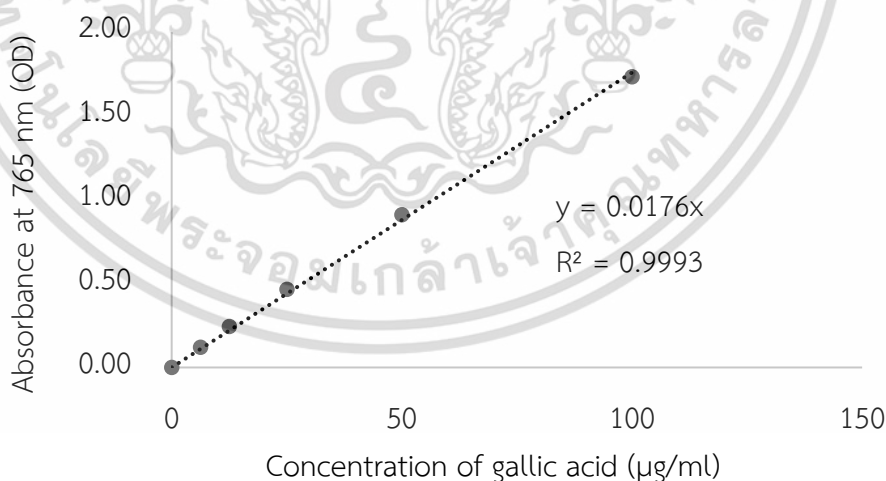
ภาคผนวก ข

1. การคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

นำค่าดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ดังตารางภาคผนวกที่ ข-1 โดยวิเคราะห์ตามวิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric มาสร้างกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก แสดงดังรูปภาคผนวกที่ ข-1

ตารางภาคผนวกที่ ข-1 ค่าดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

| ความเข้มข้นของสาร มาตรฐานกรดแกลลิก ($\mu\text{g/ml}$) | ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร | | | ค่าเฉลี่ย |
|---|--|------|------|------------------|
| | 1 | 2 | 3 | |
| 6.25 | 0.12 | 0.13 | 0.11 | 0.12 ± 0.007 |
| 12.5 | 0.25 | 0.25 | 0.24 | 0.24 ± 0.005 |
| 25 | 0.48 | 0.46 | 0.46 | 0.47 ± 0.011 |
| 50 | 0.91 | 0.91 | 0.91 | 0.91 ± 0.001 |
| 100 | 1.74 | 1.73 | 1.74 | 1.73 ± 0.004 |



รูปภาคผนวกที่ ข-1 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

จากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (รูปภาคผนวกที่ ข-1) ได้สมการเส้นตรงของสารมาตรฐานดังนี้

$$y = 0.0176X \quad (\text{ข-1})$$

โดยที่ y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

X คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

ตารางภาคผนวกที่ ข-2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้น

| สารสกัดผักแว่นต้น | ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/g extract) | | | ค่าเฉลี่ย |
|---------------------------|---|-------|-------|------------|
| | 1 | 2 | 3 | |
| ราก | 19.03 | 19.72 | 20.11 | 19.62±0.55 |
| กิ่งที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ | 18.13 | 18.92 | 18.64 | 18.56±0.40 |
| กิ่งที่กำจัดคลอโรฟิลล์ | 17.67 | 18.18 | 16.70 | 17.52±0.75 |
| ใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ | 47.84 | 48.86 | 48.30 | 48.33±0.51 |
| ใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ | 22.56 | 22.61 | 23.18 | 22.78±0.35 |

นำค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ของสารสกัดเมทานอลจากรากของผักแว่นต้นที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คือ 0.335, 0.347 และ 0.354 ตามลำดับ มาวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเมทานอลของผักแว่นต้น โดยแทนค่า y ในสมการ ข-1

จากสมการ ข-1 เมื่อหาค่า x

$$x = y/0.0176 \quad (\text{ข-2})$$

$$x = 0.335/0.0176$$

$$x = 19.03 \mu\text{g GAE/ml}$$

จากนั้นนำค่าที่ได้จากการคำนวณหารด้วยความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ คือ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และคูณด้วย 1000 เพื่อเปลี่ยนหน่วยเป็น mg GAE/g extract จากนั้นนำค่าในแต่ละซ้ำมาหาค่าเฉลี่ย ดังนั้น สารสกัดเมทานอลจากรากผักแว่นต้นจะมีค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานได้เท่ากับ 19.62±0.55 mg GAE/g extract โดยทำเช่นเดียวกันนี้ในทุกสารสกัดที่ทดสอบ

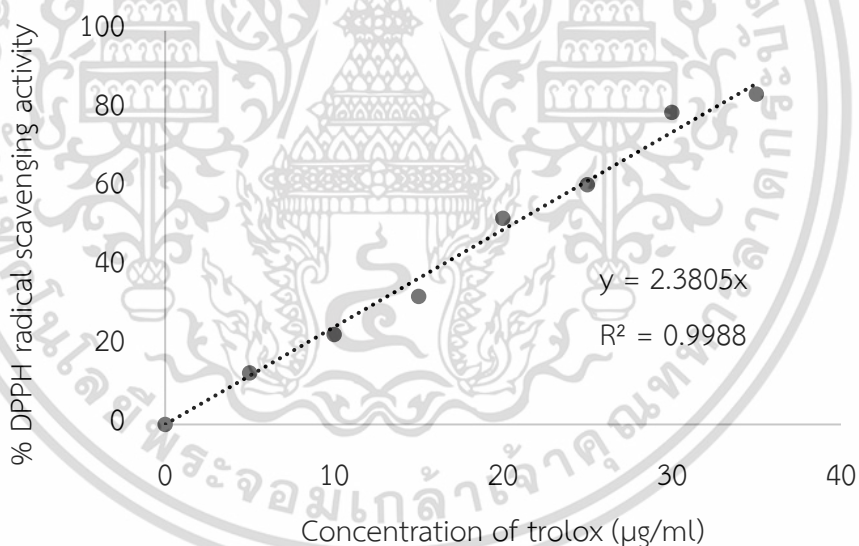
2. การคำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH

นำค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารมาตรฐานโทโรลิกซ์ ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 25, 30 และ 35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากตารางภาคผนวกที่ ข-3 มาคำนวณหาค่าเฉลี่ยร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ และสร้างกราฟมาตรฐาน ดังรูปภาคผนวกที่ ข-2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข-3 ค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

| ความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ (µg/ml) | ค่าร้อยละการต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH | | | ค่าเฉลี่ย |
|---|-------------------------------------|-------|-------|------------|
| | 1 | 2 | 3 | |
| 5 | 13.57 | 12.54 | 13.13 | 13.08±0.52 |
| 10 | 22.99 | 23.40 | 22.07 | 22.82±0.68 |
| 15 | 31.86 | 33.98 | 31.56 | 32.47±1.32 |
| 20 | 49.58 | 55.43 | 51.96 | 52.32±2.94 |
| 25 | 60.39 | 59.61 | 62.57 | 60.86±1.53 |
| 30 | 77.29 | 80.50 | 79.89 | 79.22±1.71 |
| 35 | 83.93 | 84.12 | 83.52 | 83.86±0.31 |



รูปภาคผนวกที่ ข-2 กราฟมาตรฐานโทรล็อกซ์จากการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH

จากกราฟมาตรฐานกรดโทรล็อกซ์ (รูปภาคผนวกที่ ข-2) ได้สมการเส้นตรงของสารมาตรฐานดังนี้

$$y = 2.3805X \quad (\text{ข-3})$$

โดยที่ y คือ ค่าร้อยละการต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH

x คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

จากสมการ ข-3 จะได้ เมื่อหาค่า x $x = y/2.3805$ (ข-4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และสามารถหาค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานโทรลิกซ์ จากการคำนวณจากสมการ ข-4 โดยแทนค่า y เท่ากับร้อยละ 50 ดังนี้

$$x = 50/2.3805$$

$$x = 21.00$$

โดยค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานโทรลิกซ์ที่ได้จากการคำนวณด้วยสมการ ข-4 เท่ากับ 21.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ IC_{50} ของสารมาตรฐานโทรลิกซ์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย โปรแกรม GraphPad Prism 5.0 เท่ากับ 19.27 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยในบทที่ 4 ได้รายงานค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานโทรลิกซ์ที่ได้จากโปรแกรม GraphPad Prism 5.0

ตารางภาคผนวกที่ ข-4 ค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดเมทานอลจากรากฝั้วต้น ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

| ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$) | ค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH | | | | |
|-------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|----------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| | ราก | กิ่งที่ไม่กำจัด คลอโรฟิลล์ | กิ่งที่กำจัด คลอโรฟิลล์ | ใบที่ไม่กำจัด คลอโรฟิลล์ | ใบที่กำจัด คลอโรฟิลล์ |
| 125 | 21.88±0.52 | 9.07±0.67 | 9.31±0.96 | 26.44±0.46 | 13.45±0.47 |
| 250 | 38.67±0.51 | 16.68±0.43 | 13.73±0.61 | 39.85±0.84 | 25.63±0.29 |
| 500 | 50.82±0.80 | 26.12±0.37 | 20.42±0.46 | 67.72±0.63 | 47.38±0.72 |
| 1000 | 87.67±0.35 | 57.75±0.58 | 35.09±0.68 | 92.35±0.59 | 78.43±0.62 |
| 2000 | 91.23±0.74 | 83.68±0.10 | 61.14±0.78 | 94.88±0.57 | 80.97±0.74 |

นำค่าเฉลี่ยร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของการทดสอบแต่ละรอบ ซึ่งรอบละ 3 ซ้ำ ของสารสกัดเมทานอลจากรากฝั้วต้นที่ความเข้มข้น 125, 250, 500, 1000 และ 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คือ 21.93, 39.12, 50.44, 87.98 และ 91.84 ตามลำดับ มาคำนวณหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยแทนค่า y ในสมการ ข-4

จากสมการ ข-4 เมื่อหาค่า x

$$x = 21.93/2.3805$$

$$x = 9.21 \mu\text{g TE/ml}$$

จากนั้นนำค่าที่ได้จากการคำนวณหารด้วยความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ และคูณด้วย 1000 เพื่อเปลี่ยนหน่วยเป็น mg TE/g extract จากนั้นนำค่าความเข้มข้นที่คำนวณได้จากการทดลองทั้งหมด 3 รอบมาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ดังนั้น สารสกัดเมทานอลจากรากฝั้วต้นจะมีค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานได้เท่ากับ 73.53 ± 1.76 mg TE/g extract โดยทำเช่นเดียวกันนี้ในทุกสารสกัดที่ทดสอบ

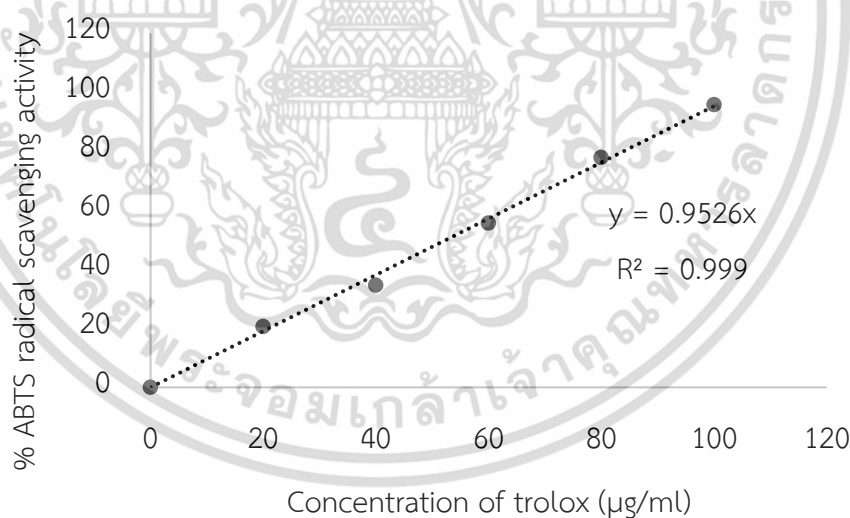
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การคำนวณความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระ ABTS

นำค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ ที่ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร จากตารางภาคผนวกที่ ข-5 มาคำนวณหาค่าเฉลี่ยร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ และสร้างกราฟมาตรฐาน ดังรูปภาคผนวกที่ ข-3

ตารางภาคผนวกที่ ข-5 ค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

| ความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ (µg/ml) | ค่าร้อยละการต้านสารอนุมูลอิสระ ABTS | | | ค่าเฉลี่ย |
|---|-------------------------------------|-------|-------|------------|
| | 1 | 2 | 3 | |
| 20 | 19.97 | 20.92 | 21.19 | 20.69±0.64 |
| 40 | 34.82 | 34.28 | 34.95 | 34.68±0.36 |
| 60 | 54.25 | 59.24 | 53.44 | 55.65±3.14 |
| 80 | 76.92 | 75.30 | 81.65 | 77.96±3.30 |
| 100 | 95.95 | 95.82 | 95.68 | 95.82±0.13 |



รูปภาคผนวกที่ ข-3 กราฟมาตรฐานโทรล็อกซ์จากการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากกราฟมาตรฐานโทรลล็อกซ์ (รูปภาคผนวกที่ ข-3) ได้สมการเส้นตรงของสารมาตรฐานดังนี้

$$y = 0.9526X \quad (\text{ข-5})$$

โดยที่ y คือ ค่าร้อยละการต้านสารอนุมูลอิสระ ABTS

x คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรลล็อกซ์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

จากสมการ ข-5 จะได้ เมื่อหาค่า x $x = y/0.9526$ (ข-6)

และสามารถหาค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานโทรลล็อกซ์ จากการคำนวณจากสมการ ข-6 โดยแทนค่า y เท่ากับร้อยละ 50 ดังนี้

$$x = 50/0.926$$

$$x = 54.00$$

โดยค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานโทรลล็อกซ์ที่ได้จากการคำนวณด้วยสมการ ข-5 เท่ากับ 54.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ IC_{50} ของสารมาตรฐานโทรลล็อกซ์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย โปรแกรม GraphPad Prism 5.0 เท่ากับ 55.13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางภาคผนวกที่ ข-6 ค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดเมทานอลจากผักแว่นต้น ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

| ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$) | ค่าร้อยละการต้านสารอนุมูลอิสระ ABTS | | | | |
|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | ราก | กิ่งที่ไม่กำจัด | กิ่งที่กำจัด | ใบที่ไม่กำจัด | ใบที่กำจัด |
| | | คลอโรฟิลล์ | คลอโรฟิลล์ | คลอโรฟิลล์ | คลอโรฟิลล์ |
| 125 | 7.83 \pm 0.64 | 10.16 \pm 2.81 | 8.92 \pm 1.38 | 12.73 \pm 0.78 | 7.61 \pm 1.23 |
| 250 | 38.66 \pm 2.65 | 15.87 \pm 1.86 | 14.01 \pm 3.43 | 16.69 \pm 1.99 | 15.18 \pm 1.13 |
| 500 | 61.72 \pm 1.28 | 22.70 \pm 1.37 | 22.06 \pm 1.41 | 33.91 \pm 1.75 | 28.18 \pm 0.70 |
| 1000 | 89.05 \pm 0.84 | 29.38 \pm 0.79 | 47.45 \pm 0.87 | 49.92 \pm 0.76 | 46.28 \pm 1.84 |
| 2000 | 91.50 \pm 0.44 | 59.93 \pm 1.60 | 66.97 \pm 1.09 | 91.64 \pm 1.18 | 90.65 \pm 2.71 |

นำค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของการทดสอบแต่ละรอบ ซึ่งรอบละ 3 ซ้ำ ของสารสกัดเมทานอลจากรากผักแว่นต้นที่ความเข้มข้น 125, 250, 500, 1000 และ 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คือ 7.19, 37.57, 62.32, 90.00 และ 92.00 ตามลำดับ มาคำนวณหาความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระ ABTS โดยแทนค่า y ในสมการ ข-6

จากสมการ ข-6 เมื่อหาค่า x $x = 7.19/0.926$

$$x = 7.77 \mu\text{g TE/ml}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

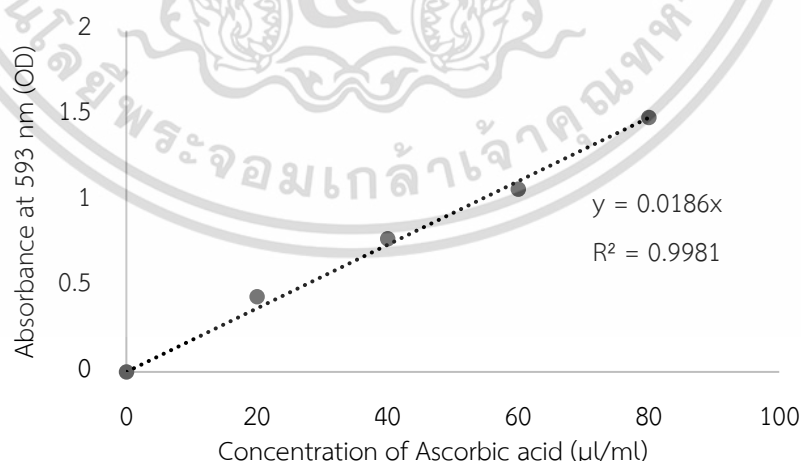
จากนั้นนำค่าที่ได้จากการคำนวณหาด้วยความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ และคูณด้วย 1000 เพื่อเปลี่ยนหน่วยเป็น mg TE/g extract จากนั้นนำค่าความเข้มข้นที่คำนวณได้จากการทดลอง ทั้งหมด 3 รอบมาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ดังนั้น สารสกัดเมทานอลจากรากผักแว่นต้น จะมีค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานได้เท่ากับ 65.76 ± 5.36 mg TE/g extract โดยทำเช่นเดียวกันนี้ในทุกสารสกัดที่ทดสอบ

4. การคำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP

นำค่าดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานโทร็อกซ์ ซึ่งใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ABTS ที่ความเข้มข้น 20, 40, 60 และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร จากตารางภาคผนวกที่ ข-7 มาคำนวณหาค่าเฉลี่ยร้อยละ การต้านอนุมูลอิสระ และสร้างกราฟมาตรฐาน ดังรูปภาคผนวกที่ ข-4

ตารางภาคผนวกที่ ข-7 ค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ FRAP ของสารสกัดเมทานอลของผักแว่นต้น ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

| ความเข้มข้นของสาร มาตรฐานกรดแอสคอร์บิก ($\mu\text{g/ml}$) | ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร | | | ค่าเฉลี่ย |
|---|--|-------|-------|------------------|
| | 1 | 2 | 3 | |
| 20 | 0.426 | 0.441 | 0.451 | 0.44 ± 0.013 |
| 40 | 0.777 | 0.774 | 0.795 | 0.78 ± 0.011 |
| 60 | 1.072 | 1.021 | 1.119 | 1.07 ± 0.049 |
| 80 | 1.479 | 1.509 | 1.494 | 1.49 ± 0.015 |



รูปภาคผนวกที่ ข-4 กราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกจากการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (รูปภาคผนวกที่ ข-4) ได้สมการเส้นตรงของสารมาตรฐานดังนี้

$$y = 0.0186X \quad (\text{ข-7})$$

โดยที่ y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร

X คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

นำค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ของสารสกัดเมทานอลจากรากผักแว่นต้นที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการทดลอง 3 ซ้ำ คือ 0.164, 0.166 และ 0.166 ตามลำดับ มาวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ FRAP ของสารสกัดเมทานอลของผักแว่นต้น โดยแทนค่า y ในสมการ ข-7

$$\text{จากสมการ ข-7 เมื่อหาค่า } x \quad x = y/0.0186 \quad (\text{ข-8})$$

$$x = 0.164/0.0186$$

$$x = 8.82 \mu\text{g GEA/ml}$$

จากนั้นนำค่าที่ได้จากการคำนวณหารด้วยความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ คือ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และคูณด้วย 1000 เพื่อเปลี่ยนหน่วยเป็น mg AAE/g extract ดังนั้น สารสกัดเมทานอลจากรากผักแว่นต้นจะมีค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานได้เท่ากับ 71.11 ± 0.50 mg AAE/g extract โดยทำเช่นเดียวกันนี้ในทุกสารสกัดที่ทดสอบ

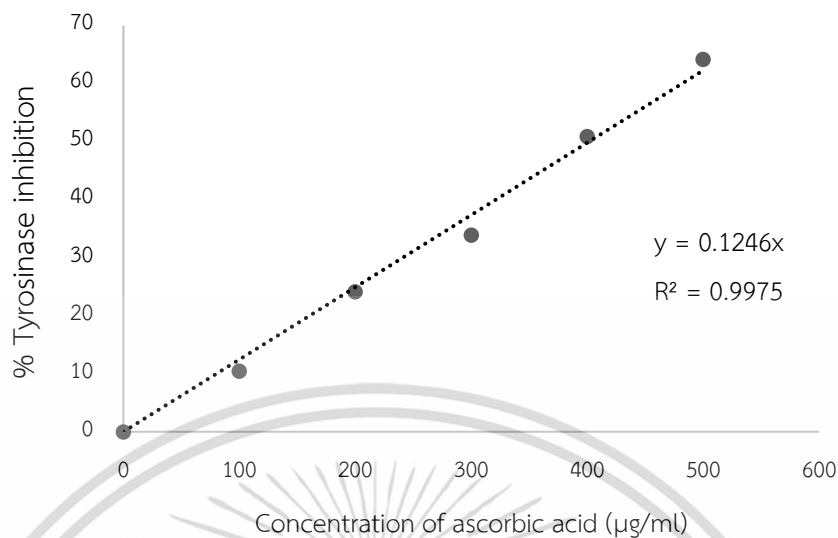
5. การคำนวณค่าความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

นำค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก ที่ความเข้มข้น 100-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากตารางภาคผนวกที่ ข-8 มาคำนวณหาค่าเฉลี่ยการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และสร้างกราฟมาตรฐาน ดังรูปภาคผนวกที่ ข-5

ตารางภาคผนวกที่ ข-8 ค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

| ความเข้มข้นของสาร มาตรฐานกรดแอสคอร์บิก ($\mu\text{g/ml}$) | ค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส | | | ค่าเฉลี่ย |
|---|-------------------------------------|-------|-------|------------------|
| | 1 | 2 | 3 | |
| 100 | 10.84 | 10.15 | 10.38 | 10.46 ± 0.35 |
| 200 | 22.38 | 25.82 | 24.27 | 24.15 ± 1.72 |
| 300 | 32.87 | 34.60 | 34.25 | 33.91 ± 0.91 |
| 400 | 50.77 | 50.09 | 51.81 | 50.89 ± 0.87 |
| 500 | 64.03 | 65.06 | 63.51 | 64.20 ± 0.79 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปภาคผนวกที่ ข-5 กราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกจากการวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

จากกราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (รูปภาคผนวกที่ ข-5) ได้สมการเส้นตรงของสารมาตรฐาน ดังนี้

$$y = 0.1246 X \quad (\text{ข-9})$$

โดยที่ y คือ ค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

x คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

จากสมการ ข-9 จะได้ เมื่อหาค่า x $x = y/0.1246$ (ข-10)

และสามารถหาค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก จากการคำนวณจากสมการ ข-10 โดยแทนค่า y เท่ากับร้อยละ 50 ดังนี้

$$x = 50/0.1246$$

$$x = 401.28$$

โดยค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ได้จากการคำนวณด้วยสมการ ข-10 เท่ากับ 401.28 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ IC_{50} ของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย โปรแกรม GraphPad Prism 5.0 เท่ากับ 394.69 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

6. การคำนวณความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์

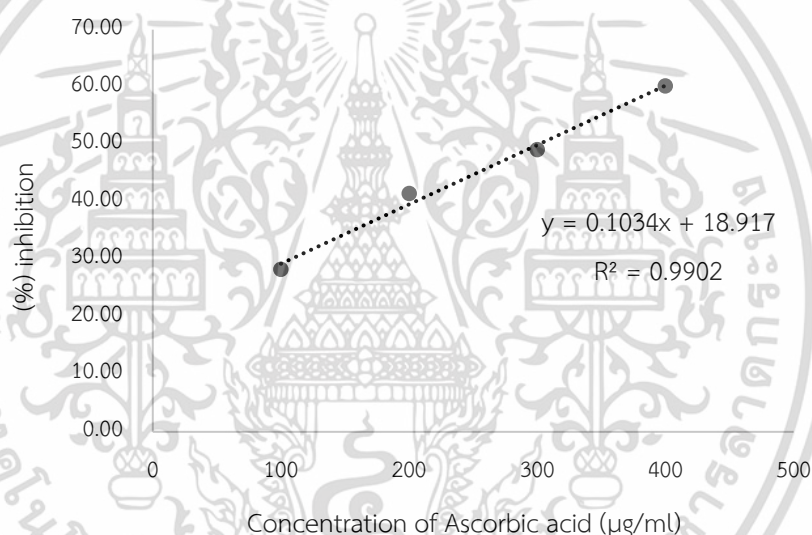
นำค่าร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์ของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น 100-400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากตารางภาคผนวกที่ ข-9 มาคำนวณหาค่าเฉลี่ยการยับยั้งไนตริกออกไซด์

และสร้างกราฟมาตรฐาน ดังรูปภาคผนวกที่ ข-6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข-9 ค่าร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์ของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่
ความเข้มข้นต่าง ๆ

| ความเข้มข้นของสาร มาตรฐานกรดแอสคอร์บิก ($\mu\text{g/ml}$) | ค่าร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์ | | | ค่าเฉลี่ย |
|---|----------------------------------|-------|-------|------------------|
| | 1 | 2 | 3 | |
| 100 | 27.43 | 28.69 | 28.69 | 28.27 \pm 0.73 |
| 200 | 43.46 | 42.62 | 38.40 | 41.49 \pm 2.71 |
| 300 | 48.52 | 50.21 | 48.52 | 49.09 \pm 0.97 |
| 400 | 59.07 | 58.65 | 62.87 | 60.20 \pm 2.32 |



รูปภาคผนวกที่ ข-6 กราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกจากการวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้ง
ไนตริกออกไซด์

จากกราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (รูปภาคผนวกที่ ข-9) ได้สมการเส้นตรงของสารมาตรฐาน
ดังนี้

$$y = 0.1034X + 18.917 \quad (\text{ข-11})$$

โดยที่ y คือ ค่าร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์

x คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

จากสมการ ข-11 จะได้ เมื่อหาค่า x $x = (y - 18.917) / 0.1034$ (ข-12)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และสามารถหาค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก จากการคำนวณจากสมการ ข-12 โดยแทนค่า y เท่ากับร้อยละ 50 ดังนี้

$$x = (50 - 18.917) / 0.1034$$

$$x = 300.61$$

โดยค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ได้จากการคำนวณด้วยสมการ ข-12 เท่ากับ 300.61 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย โปรแกรม GraphPad Prism 5.0 เท่ากับ 265.08 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

7. ค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งการเจริญของเซลล์ที่ของสารสกัดแยกส่วนของผักแว่นต้นที่สกัดด้วยวิธี liquid-liquid extraction

นำค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญของเซลล์ หรือความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดแยกส่วนจากรากและใบที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์ของผักแว่นต้น ที่ความเข้มข้น 250-2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาคำนวณหาค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 เซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29 เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 เซลล์เยื่อปอดชนิด Vero และเซลล์เคอราติโนไซต์ชนิด HaCaT ดังตารางภาคผนวกที่ ข-10-ข-14

ตารางภาคผนวกที่ ข-10 ค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 จากสารสกัดแยกส่วนของผักแว่นต้นที่สกัดด้วยวิธี liquid-liquid extraction

| เซลล์ไลน์ | สารสกัดแยกส่วน | ความเข้มข้นของสารสกัดแยกส่วน ($\mu\text{g/ml}$) | | | |
|-----------|----------------|---|-------------|-------------|------------|
| | | 250 | 500 | 1000 | 2000 |
| HepG2 | HR | -8.42±1.98 | 14.17±3.46 | 89.21±0.13 | 89.09±0.46 |
| | DR | 53.38±2.52 | 88.79±0.19 | 88.16±0.15 | 88.32±0.38 |
| | ER | -35.79±2.54 | -31.81±2.24 | -29.36±2.13 | 18.15±1.46 |
| | BR | -17.85±2.29 | -10.45±2.02 | 2.79±2.64 | 20.22±1.58 |
| | WR | -11.55±2.13 | -7.40±2.16 | -6.05±2.43 | 3.21±1.92 |
| HL | HL | 90.63±0.44 | 91.94±0.19 | 92.44±0.14 | 93.46±0.25 |
| | DL | 74.64±0.51 | 89.89±0.44 | 90.51±0.25 | 90.92±0.14 |
| | EL | -25.73±2.28 | -14.84±3.02 | 22.44±1.21 | 64.32±4.03 |
| | BL | -19.69±3.59 | -6.17±1.84 | 11.67±2.92 | 62.23±1.11 |
| | WL | -18.78±4.83 | -7.77±1.49 | -2.51±0.80 | 16.03±1.54 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข-11 ค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29 จากสารสกัดแยกส่วนของผักแว่นต้นที่สกัดด้วยวิธี liquid-liquid extraction

| เซลล์ไลน์ | สารสกัดแยกส่วน | ความเข้มข้นของสารสกัดแยกส่วน ($\mu\text{g/ml}$) | | | |
|-----------|----------------|---|-------------------|-------------------|------------------|
| | | 250 | 500 | 1000 | 2000 |
| HT-29 | HR | -33.76 \pm 3.92 | -9.49 \pm 3.14 | 90.13 \pm 0.13 | 90.26 \pm 0.34 |
| | DR | -25.34 \pm 2.74 | 79.70 \pm 1.31 | 89.66 \pm 0.53 | 89.49 \pm 0.90 |
| | ER | -37.48 \pm 3.68 | -29.44 \pm 3.04 | -22.61 \pm 2.67 | 26.45 \pm 2.70 |
| | BR | -28.08 \pm 1.22 | -23.33 \pm 3.62 | -2.44 \pm 1.12 | 4.66 \pm 1.09 |
| | WR | -27.52 \pm 0.74 | -25.00 \pm 2.56 | -2.31 \pm 1.61 | 2.91 \pm 0.82 |
| | HL | 86.80 \pm 0.98 | 91.82 \pm 0.80 | 91.36 \pm 0.19 | 91.11 \pm 0.95 |
| | DL | 64.22 \pm 2.44 | 89.76 \pm 0.70 | 89.34 \pm 0.96 | 89.63 \pm 0.13 |
| | EL | -11.21 \pm 0.65 | -10.16 \pm 4.86 | 22.67 \pm 2.21 | 66.25 \pm 2.01 |
| | BL | -16.35 \pm 4.64 | -15.17 \pm 1.22 | -3.37 \pm 2.46 | 44.71 \pm 2.37 |
| | WL | -33.59 \pm 4.79 | -24.32 \pm 0.41 | -21.07 \pm 3.60 | 17.36 \pm 2.60 |

ตารางภาคผนวกที่ ข-12 ค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 จากสารสกัดแยกส่วนของผักแว่นต้นที่สกัดด้วยวิธี liquid-liquid extraction

| เซลล์ไลน์ | สารสกัดแยกส่วน | ความเข้มข้นของสารสกัดแยกส่วน ($\mu\text{g/ml}$) | | | |
|-----------|----------------|---|------------------|------------------|------------------|
| | | 250 | 500 | 1000 | 2000 |
| MCF-7 | HR | -16.41 \pm 2.60 | -6.76 \pm 1.87 | 5.96 \pm 4.29 | 89.27 \pm 0.17 |
| | DR | -3.92 \pm 3.67 | 66.44 \pm 2.46 | 82.68 \pm 1.20 | 90.29 \pm 0.17 |
| | ER | -17.83 \pm 0.94 | 5.17 \pm 3.46 | 5.11 \pm 1.92 | 11.70 \pm 1.11 |
| | BR | -12.55 \pm 1.81 | 5.11 \pm 2.97 | 10.79 \pm 3.87 | 18.23 \pm 2.91 |
| | WR | -11.24 \pm 0.17 | 10.56 \pm 1.12 | 17.66 \pm 2.27 | 18.34 \pm 2.96 |
| | HL | 10.62 \pm 0.81 | 90.70 \pm 0.74 | 91.58 \pm 0.37 | 91.83 \pm 0.37 |
| | DL | 49.09 \pm 1.36 | 78.66 \pm 1.04 | 90.06 \pm 0.37 | 89.28 \pm 0.39 |
| | EL | -0.05 \pm 1.57 | 1.96 \pm 4.20 | 20.66 \pm 2.90 | 54.43 \pm 3.82 |
| | BL | 0.78 \pm 0.90 | 3.72 \pm 1.36 | 32.89 \pm 0.78 | 35.93 \pm 1.84 |
| | WL | -6.75 \pm 2.43 | 4.01 \pm 2.65 | 7.68 \pm 3.97 | 38.47 \pm 3.01 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข-13 ค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์เยื่อปูไตลิงชนิด Vero จากสารสกัดแยก ส่วนของผักแว่นต้นที่สกัดด้วยวิธี liquid-liquid extraction

| เซลล์ไลน์ | สารสกัดแยก ส่วน | ความเข้มข้นของสารสกัดแยกส่วน ($\mu\text{g/ml}$) | | | |
|-----------|-----------------|---|------------------|------------------|------------------|
| | | 250 | 500 | 1000 | 2000 |
| Vero | HR | -7.47 \pm 2.41 | -2.54 \pm 3.17 | 87.76 \pm 0.42 | 91.04 \pm 0.24 |
| | DR | -5.62 \pm 2.26 | 31.53 \pm 1.62 | 83.57 \pm 0.64 | 89.14 \pm 0.49 |
| | ER | -7.79 \pm 0.97 | -5.72 \pm 1.39 | -1.70 \pm 4.52 | 14.15 \pm 2.07 |
| | BR | -5.62 \pm 0.51 | -5.78 \pm 3.22 | 6.41 \pm 1.63 | 10.44 \pm 0.66 |
| | WR | -9.17 \pm 1.83 | 0.16 \pm 1.30 | 13.67 \pm 2.31 | 17.38 \pm 0.97 |
| | HL | -15.91 \pm 1.33 | 75.52 \pm 0.83 | 91.48 \pm 0.08 | 92.00 \pm 0.22 |
| | DL | 21.75 \pm 2.00 | 62.48 \pm 3.04 | 89.60 \pm 0.22 | 90.54 \pm 0.14 |
| | EL | -7.30 \pm 1.93 | 5.56 \pm 0.90 | 24.11 \pm 3.61 | 52.50 \pm 1.42 |
| | BL | 9.13 \pm 2.47 | 12.19 \pm 3.52 | 14.03 \pm 1.78 | 18.55 \pm 2.12 |
| | WL | -8.71 \pm 3.33 | -7.20 \pm 4.53 | -2.73 \pm 3.73 | 5.04 \pm 2.49 |

ตารางภาคผนวกที่ ข-14 ค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์โคราติโนไซท์ชนิด HaCaT จากสารสกัด แยกส่วนของผักแว่นต้นที่สกัดด้วยวิธี liquid-liquid extraction

| เซลล์ไลน์ | สารสกัดแยก ส่วน | ความเข้มข้นของสารสกัดแยกส่วน ($\mu\text{g/ml}$) | | | |
|-----------|-----------------|---|------------------|------------------|------------------|
| | | 250 | 500 | 1000 | 2000 |
| HaCaT | HR | 6.11 \pm 0.76 | 31.54 \pm 1.08 | 86.11 \pm 2.16 | 91.68 \pm 0.55 |
| | DR | 11.09 \pm 0.58 | 36.56 \pm 0.89 | 70.32 \pm 2.01 | 90.35 \pm 0.18 |
| | ER | 10.39 \pm 0.70 | 12.76 \pm 0.99 | 18.09 \pm 0.62 | 52.12 \pm 2.16 |
| | BR | 9.57 \pm 0.62 | 16.96 \pm 1.08 | 19.10 \pm 0.18 | 23.77 \pm 2.17 |
| | WR | -4.20 \pm 0.77 | 3.66 \pm 0.86 | 10.11 \pm 2.06 | 14.90 \pm 0.38 |
| | HL | 67.80 \pm 0.60 | 84.81 \pm 0.95 | 89.87 \pm 0.10 | 90.90 \pm 0.20 |
| | DL | 68.20 \pm 0.79 | 90.16 \pm 0.10 | 90.50 \pm 0.49 | 91.13 \pm 0.74 |
| | EL | 20.93 \pm 0.69 | 41.24 \pm 2.98 | 52.45 \pm 2.20 | 71.84 \pm 0.78 |
| | BL | 27.59 \pm 1.39 | 32.03 \pm 1.81 | 42.83 \pm 1.63 | 61.49 \pm 0.60 |
| | WL | 16.38 \pm 0.74 | 21.73 \pm 1.55 | 32.99 \pm 1.29 | 33.79 \pm 1.73 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ผลงานทางวิชาการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Phytochemical screening, antioxidant activity and total phenolic content of methanolic extract of Phak Wan Ton (*Crotalaria medicaginea* Lam.)

Thuion, T., Poeaim, S.* and Poeaim, A.

Department of Biology, School of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL), Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand.

Thuion, T., Poeaim, S. and Poeaim, A. (2023). Phytochemical screening, antioxidant activity and total phenolic content of methanolic extract of Phak Wan Ton (*Crotalaria medicaginea* Lam.). International Journal of Agricultural Technology. 19(1):277-290.

Abstract The chlorophyll content of the methanolic extract of *Crotalaria medicaginea* without chlorophyll removal ranged from 0.50 ± 0.03 to 1.24 ± 0.06 mg/g extract, and with chlorophyll removal ranged from 0.09 ± 0.01 to 0.18 ± 0.00 mg/g extract. The highest total phenolic content using the Folin-Ciocalteu method was presented in the leaves extract without chlorophyll removal as 48.33 ± 0.51 mg GEA/g extract. Moreover, the leaves extract without chlorophyll removal showed the lowest antioxidant activity with 50% inhibitory concentration (IC_{50}) in DPPH radical scavenging assay at 344.76 μ g/ml. Besides, the root extract exhibited rich potential for gram-positive bacteria, including *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Kocuria rhizophila*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. The overall results showed that the extracts without chlorophyll removal had more efficiency than those with chlorophyll removal. Hence, the phytochemical screening was investigated only in the methanolic extract without chlorophyll removal. All extracts found alkaloids and coumarins, while tannins were found only in roots and did not display saponins. The current study suggested that the extracts of *C. medicaginea* Lam. gave the potential source of natural bioactive compounds.

Keywords: Antioxidant, Chlorophyll removal, *Crotalaria medicaginea*, Phytochemical, Total phenolic content

Introduction

Medicinal plants are important in various ailments due to the bioactive compounds hidden in those plants, such as alkaloids, flavonoids, coumarins and tannins. These are mostly phenolic compounds, essential bioactive compounds in plants presented as antimicrobial, antioxidant, anticarcinogen and antiinflammatory (Elangovan *et al.*, 1994; Stavric, 1994; Ngoci *et al.*, 2011). Therefore, drug research is essential to evaluate biological activities and identify and isolate natural bioactive or secondary metabolized compounds from plant materials.

Crotalaria medicaginea Lam. commonly known in Thai as Phak Wan Ton, is a folk medicinal plant belonging to the genus *Crotalaria* and the family Fabaceae. The distribution of this genus has been displayed in India, China and Southeast Asia, such as Malaysia and Thailand (Niyomdham, 1978; Yadava and Vishwakarma, 2014; Ninkaew *et al.*, 2018). Most medicinal attributes have been presented in the whole plant, traditionally used as an analeptic for rheumatism and myofascial pain syndrome treatment (Ninkaew *et al.*, 2018), impetigo skin, and used as a blood tonic in anemia (Jain *et al.*, 2009). Besides, *C. medicaginea* contained bioactive compounds, including alkaloids, phenolics and flavonoids, that highly presented antioxidant and antibacterial activities in vivo and in vitro from ethanolic extract (Devendra *et al.*, 2012). In addition, bioactive compounds such as quercitrin, acacetin, isorhamnetin and new allelochemicals have been isolated from methanolic extract of the stems of *C. medicaginea* (Yadava and Vishwakarma, 2014). Those new allelochemicals exhibited antimicrobial activities against various bacteria and inhibited the growth of pathogenic fungi such as *Aspergillus niger*, *Candida albican* and *Mucor indicus*.

Chlorophyll is almost present in green color, found in the chloroplast of the leaves, stems and various parts of any green plants (Kwartiningsih *et al.*, 2021). Chlorophyll is an important component for the absorption of sunlight in photosynthesis to provide energy (Hörtensteiner and Kräutler, 2011). Chlorophyll contains anti-inflammatory, antibacterial, antifungal, antioxidant, wound healing, anticarcinogenic activity and detoxification activity (Breinholt *et al.*, 1995; Yin and Cheng, 1998; Ferruzzi and Blakeslee, 2007). Hence, chlorophyll is widely used as alternative medicine, supplementary food, natural food colorant, beverage and food industries. The plant leaves contain some pharmacologically active. However, chlorophyll in the crude extract may reduce the interest in products (Phaisan *et al.*, 2020). Chlorophyll can dissolve in a wide range of organic solvents (Phaisan *et al.*, 2020) such as ethanol, methanol, ethyl ester, petroleum ether, acetone and chloroform. Likewise, chlorophyll can be inevitably contained in the processing of plant extraction at various concentrations, presents the dark-greenish color of the extracts and might interfere with the analysis or resulting extract. Therefore, the use of extract was limited, especially in food applications, because the dark-greenish color causes a change in color in food or hides other colors (Namal Senanayake, 2013; Olatunde *et al.*, 2018). Additionally, chlorophyll pigments have wavelengths absorption between 400 and 700 nm. There is the measurement range used to indicate biological endpoints. Thus, a greenish color might interfere with in

vitro and in vivo bioassay readings on fluorescence measurements, cause to inaccurate analysis (Denizot and Lang, 1986; DeGraff and Mitchell, 1987).

A previous study reported the ethanolic extracts with dechlorophyllization by sedimentation process had higher antioxidant activity potential than those without dechlorophyllization (Tagrida and Benjakul, 2020). Another method was reported as the effective method for chlorophyll removal from *Chromolaena odorata* using various oils. Palm oil and soybean oil showed high total phenolic and flavonoid content and high efficiency for chlorophyll removal (Phaisan *et al.*, 2020). Therefore, the study aimed to investigate the phytochemicals, total phenolic contents, antioxidant and antibacterial activities of *C. medicaginea* with and without chlorophyll removal.

Materials and methods

Extraction of Crotalaria medicaginea

C. medicaginea was collected from Suphanburi province, Thailand. The plants were separated into roots, stems and leaves. These were dried at 40°C and ground to powder. The maceration method was prepared for extraction in one week. The mixture was filtrated and concentrated to obtain the methanolic extract of roots, stems and leaves of *C. medicaginea*.

Chlorophyll removal

The method of chlorophyll removal from the extract has modified the method of Phaisan *et al.* (2020) using palm oil by the liquid-liquid extraction method. The crude extract of the stems and leaves without chlorophyll removal was dissolved in methanol at the ratio of 1:20 (w/v). The mixtures were mixed with palm oil and centrifuged at 5000 rpm for 25 min. The upper phase was collected and concentrated to obtain crude extract with chlorophyll removal.

Determination of chlorophyll content

The stems and leaves were used to determine the chlorophyll content following the method of Olatunde *et al.* (2018). The crude extracts were dissolved with methanol to a concentration of 2 mg/ml, and measured absorbance of wavelengths at 645 and 663 nm using a microplate reader. The chlorophyll a, chlorophyll b and total chlorophyll content were calculated using the below equations: Chlorophyll a (mg/ml) = 12.7 (A₆₆₃) - 2.69 (A₆₄₅),

Chlorophyll b (mg/ml) = 22.9 (A₆₄₅) - 4.68 (A₆₆₃) and Total chlorophyll (mg/ml) = 20.2 (A₆₄₅) + 8.02 (A₆₆₃).

Determination of total phenolic content

Five different extracts of *C. medicaginea* consisted of roots, stems and leaves without chlorophyll removal and stems and leaves with chlorophyll removal. All extracts were estimated with the total phenolic content using the Folin-Ciocalteu method modified from Chantarasaka *et al.* (2022). The reaction was 10% Folin-Ciocalteu reagent, 7.5% sodium carbonate (Na₂CO₃), and gallic acid was used as standard. The total phenolic content was presented as mg of gallic acid equivalent (GAE)/g extract.

Determination of antioxidant activity

All extracts estimated the antioxidant activity using DPPH free radical scavenging assay following the method of Armania *et al.* (2013) with few modifications. The extract concentrations ranged from 125 to 2000 µg/ml. 0.1 mM methanolic DPPH was used as a reaction. The Trolox was used as standard. Methanol was used instead of samples for control. The percentage of DPPH radical scavenging activity was estimated following the below equations, and antioxidant activity with 50% inhibitory concentration (IC₅₀) was examined by GraphPad Prism 5.0 program.

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

Where A_{control} is the absorbance of the control and A_{sample} is the absorbance of a sample or standard.

Evaluation of antibacterial activity

Five different extracts of *C. medicaginea* were evaluated for their antibacterial activity against gram-positive bacteria, including *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Kocuria rhizophila*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* and gram-negative bacteria, including *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. The antibacterial activity was estimated using Kirby-Bauer's disc diffusion method, according to the CLSI adopted in 2012. The bacteria were cultured into Mueller- Hinton Broth (MHB). The tested extract concentration was 2 mg/disc. One µg/disc of Gentamicin was used as a

positive control, while methanol and Dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as the negative control.

Phytochemical screening

The primary phytochemical activity of methanolic extracts of *C. medicaginea* was determined according to Lordkhem (2016), Sreeprasert (2016), and Thiankathet *et al.* (2019)

Test of alkaloids

Each extract was prepared in 1% hydrochloric acid solution (HCl). The mixtures were filtered and tested with three different reagents: Dragendorff's, Mayer's, and Wagner's. The precipitates of the mixture solution were observed and compared with the colchicine as a standard.

Test of tannins

Each extract was dissolved in distilled water, and 10% sodium hydroxide (NaOH) was added. Three different reagents were used for testing, including gelatin solution, gelatin salt solution, and 1% ferric chloride (FeCl_3). The white residues of the mixture solution were observed on the test tubes, which added gelatin solution and gelatin salt solution. The brownish-green or dark blue precipitates were observed on the test tubes, adding 1% FeCl_3 . Tannic acid was used as a standard.

Test of coumarins

Each extract was dissolved in 50% ethanol and filtered by Whatman paper no. 1. 6M NaOH was added. The dark green or dark yellow color was compared with warfarin as a standard.

Test of saponins

The froth test was examined by dissolving the extracts in distilled water. The mixtures were filtered and shaken. The stable foam was observed for about 30 min. The saponin solution was used as a standard.

Statistical analysis

The information was with the one-way analysis of variance (ANOVA) by using the IBM SPSS Statistics program version 26 (SPSS Inc., USA.). The multiple range tests were compared by Duncan's at the significant differences ($P < 0.05$). The GraphPad Prim 5.0 program was used to determine the IC_{50} .

Results

Extraction and chlorophyll removal

The extraction yield of roots was 3.70%, and stems and leaves without chlorophyll removal were 4.02 and 16.96%, respectively. Stems and leaves with chlorophyll removal were 0.33 and 0.44%, respectively. The methanolic extracts of roots showed yellow color and powdered solid. Leaves without chlorophyll removal showed a rather greenish-dark color than stems without chlorophyll removal; both were viscous textures. However, the extract of the leaves with chlorophyll removal showed a slightly greenish color when compared with leaves without chlorophyll removal extracts. Stems with chlorophyll removal showed brown-yellow color; both textures were powdered solid.

Chlorophyll content in methanolic extracts

Chlorophyll a, chlorophyll b, and total chlorophyll content in methanolic of stems and leaves extract without chlorophyll removal and with chlorophyll removal were determined (Table 1). As a result, chlorophyll a, chlorophyll b, and total chlorophyll in the extracts without chlorophyll removal exhibited the highest chlorophyll content, especially in the leaves. However, the chlorophyll content in stems and leaves with chlorophyll removal decreased.

Table 1. Chlorophyll content in methanolic extracts of *C. medicaginea*

| Sample | Chlorophyll a (mg/g) | Chlorophyll b (mg/g) | Total chlorophyll (mg/g) |
|------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| Roots | nd | nd | nd |
| Stems without chlorophyll removal | 0.35±0.02 | 0.15±0.01 | 0.50±0.03 |
| Leaves without chlorophyll removal | 0.78±0.03 | 0.46±0.03 | 1.24±0.06 |
| Stems with chlorophyll removal | 0.03±0.01 | 0.06±0.00 | 0.09±0.01 |
| Leaves with chlorophyll removal | 0.08±0.00 | 0.10±0.00 | 0.18±0.00 |

nd = not determined

Determination of total phenolic content

The total phenolic content was calculated by a linear equation of $y = 0.0176X$, $R^2 = 0.9993$, a linear calibration curve of gallic acid. The methanolic

extract from leaves without chlorophyll removal and with chlorophyll removal exhibited a high value of total phenolic content. However, the results exhibited the highest total phenolic content in the leaves extracts without chlorophyll removal as 48.33 ± 0.51 mg GEA/g extract. The amount of total phenolic content compared with stems (17.52 and 18.56 mg GEA/g extract) and roots extract (19.62 mg GEA/g extract) showed no significant differences in the extraction (Table 2).

Table 2. Total phenolic content and antioxidant activity in methanolic extracts of *C. medicaginea*

| Sample | TPC (mg EA/g extract) | DPPH (IC ₅₀ , µg/ml) |
|------------------------------------|--------------------------|------------------------------------|
| Roots | 19.62 ± 0.55 | 479.21 |
| Stems without chlorophyll removal | 18.56 ± 0.40 | 881.50 |
| Leaves without chlorophyll removal | 48.33 ± 0.51 | 344.76 |
| Stems with chlorophyll removal | 17.52 ± 0.75 | 1552.52 |
| Leaves with chlorophyll removal | 22.78 ± 0.35 | 532.98 |

IC₅₀ = 50% inhibitory concentration

Determination of antioxidant activity

Five different samples of methanolic extracts of *C. medicaginea* were investigated for antioxidant activity using DPPH free radical scavenging assay. All extracts exhibited high activity at the maximum concentration (2000 µg/ml) (Figure 1). Leaves extract without chlorophyll removal exhibited higher activity than other extracts, which showed a percentage of DPPH radical scavenging activity in the maximum concentration was $94.88 \pm 0.57\%$, followed by roots extract ($91.23 \pm 0.74\%$). A percentage of DPPH radical scavenging activity of stems and leaves with chlorophyll removal was reduced from those without chlorophyll removal from 83.69 ± 0.1 to $61.15 \pm 0.78\%$ and 94.88 ± 0.57 to $80.97 \pm 0.74\%$, respectively. It showed IC₅₀ values in the extraction's DPPH radical scavenging activity assay (Table 2). The leaves without chlorophyll removal exhibited the highest antioxidant activity with an IC₅₀ of 344.76 µg/ml.

Evaluation of antibacterial activity

The result showed roots extract exhibited more efficiency against five gram-positive bacteria, including *B. cereus*, *B. subtilis*, *K. rhizophila*, *S. aureus*, and *S. epidermidis*, as 10.03 ± 0.03 , 8.93 ± 0.36 , 9.61 ± 0.66 , 7.33 ± 0.24 and

9.34±0.80 mm, respectively. Stems without chlorophyll removal showed antibacterial activity against *B. cereus*, *B. subtilis*, and *K. rhizophila* at 9.12±0.23, 7.10±0.15 and 7.88±0.3 mm, respectively. The extraction from leaves both with and without chlorophyll removal showed antibacterial activity against only *B. cereus* and *B. subtilis* as 7.39±0.22, 8.38±0.35 mm and 8.49±0.73, 9.95±0.39 mm, respectively. Nonetheless, all extracts were unable to against *E. coli* and *P. aeruginosa*.

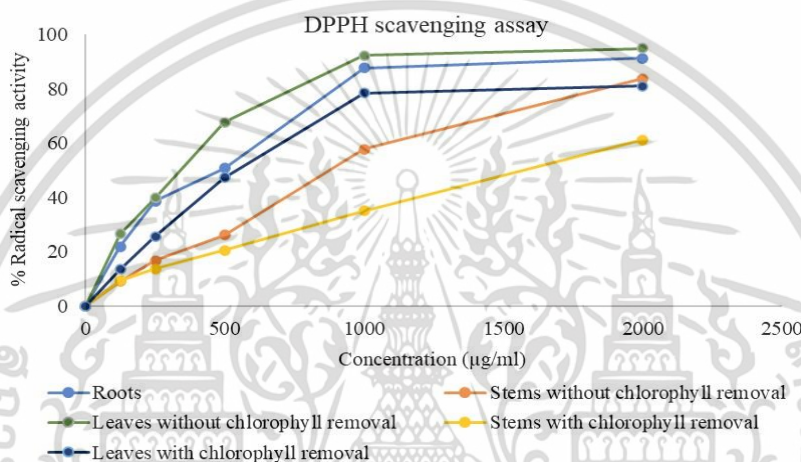


Figure 1. The percentage of DPPH radical scavenging activity from different parts of *C. medicaginea* at different concentrations

Phytochemical screening

The result showed that all extracts presented positive precipitation to Dragendorff's, Mayer's, Wagner's reagents and color changed to green-yellow or dark yellow when added 6M NaOH. The tannins test was examined using gelatin solution, gelatin salt solution, and 1% FeCl₃. The precipitation was shown with roots extract and slightly with leaves when added 1% FeCl₃. However, all extracts did not display saponin on the froth test (Table 3).

Table 3. Phytochemical screening for different methanolic extracts of *C. medicaginea*

| Phytochemical | Test/ Reagent | Roots | Stems | Leaves |
|---------------|-----------------------|-------|-------|--------|
| Alkaloid | Dragendorff's | + | + | + |
| | Mayer's | + | + | + |
| | Wagner's | + | + | + |
| Tannin | Gelatin solution | + | - | - |
| | Gelatin salt solution | + | - | - |
| Coumarin | 1% FeCl ₃ | + | - | + |
| | 6M NaOH | + | + | + |
| Saponin | Froth test | - | - | - |

Where + = presences and - = absent

Discussion

Presently, the plant genus of *Crotalaria* is widely used in traditional medicine. *C. medicaginea*, that local name is Phak Wan Ton, is one of the species which has never been reported for its biological activities of methanolic extract. Therefore, the study focused on the phytochemical activity, total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of different parts of *C. medicaginea*.

According to the results, the maceration method extracted three parts (roots, stems and leaves) of samples. Only stems and leaves were applied to remove chlorophyll using palm oil by liquid-liquid extraction because these presented a greenish-dark color which interfered with the resulting analysis (Namal Senanayake, 2013; Olatunde *et al.*, 2018). The chlorophyll content in stems and leaves with chlorophyll removal of *C. medicaginea* was determined and compared to those of the extracts without chlorophyll removal. The stems and leaves with chlorophyll removal exhibited lower chlorophyll a, chlorophyll b and total chlorophyll content. Our results are related to a previous study that reported the dechlorophyllization of guava leaf extracts showed that the chlorophyll a, chlorophyll b and total chlorophyll content were reduced (Olatunde *et al.*, 2018). Our results were consistent with those previously reported of *Piper betle* and *Piper sarmentosum* extracts with chlorophyll removal using a sedimentation method, exhibited a total chlorophyll content reduction by 23.08 and 10.19%, as documented by Tagrida and Benjakul (2020).

The total phenolic content in this study was determined using the FolinCiocalteu method. The leaves extract without chlorophyll removal showed higher total phenolic content of 48.33±0.51 mg GEA/g extract than other

extracts. Our result was similar to the same species (*Crotalaria verrucosa* leaves extract), which exhibited a total phenolic content of approximately 41 ± 1.1 mg GEA/g extract (Sana *et al.*, 2020). Likewise, the ethanolic extract of *Crotalaria spectabilis* exhibited total phenolic content of 40.8 ± 1.1 mg GEA/g extract (Suwanchaikasem *et al.*, 2013). This study found that the stems and leaves extracted with chlorophyll removal presented lower than those without chlorophyll removal. According to Olatunde *et al.* (2018), the total phenolic content of ethanolic guava leaf extract with dechlorophyllization was decreased. Phaisan *et al.* (2020) described that the total phenolic content of *Chromolaena odorata* extract that removed chlorophyll from palm oils was lower than the control (without chlorophyll removal). It is similar to the decrease of total phenolic content in lead seed extracts treated by chlorophyll removal (Benjakul *et al.*, 2014).

Furthermore, the result of the antioxidant activity is implicated in their total phenolic content. The leaves extract without chlorophyll removal showed the highest percentage of DPPH radical scavenging activity and exhibited the lowest IC_{50} in DPPH radical scavenging assay. Although the result of antioxidant activity from roots extract and leaves extract with chlorophyll removal showed slightly different total phenolic content. The free radical inhibition values remained nearby not only phenolic compounds that provided antioxidant activity but which non-phenolic antioxidants also donated to an activity (Banerjee *et al.*, 2005). In previous studies, Devendra *et al.* (2012) reported the antioxidant activity of ethanolic leaf extracts from *Crotalaria* species. As a result, presented *C. medicaginea* showed IC_{50} at 74.0 μ g/ml, which is lower activity than the extracts from this study. The low IC_{50} presented a more effective antioxidant, possibly the factors caused by the extraction solvents. In agreeing with Borges *et al.* (2020), who reported ethanol proved to be the best solvent to extract bioactive compounds with antioxidant properties of *Acacia dealbata* and *Olea europaea* compared with methanol.

On the other hand, the extracts may contain different phenolic compounds, which have different activities depending on the structure (Rahiman *et al.*, 2012). The extracts with chlorophyll removal found that the percentage of DPPH radical scavenging activity was reduced in this finding. In contrast, Phaisan *et al.* (2020) reported using oils for the dechlorophyllization of *Chromolaena odorata*, indicating that palm oil and soybean oil gave high antioxidant activity compared with the control. However, our results were similar to the document of Tzima *et al.* (2020), they reported the antioxidant activity of rosemary and thyme with chlorophyll removal was examined with DPPH, ABTS and FRAP assays. They found the antioxidant activity of chlorophyll removal extracts was lower than the control in all assays.

In this study, the methanolic extract from the roots of *C. medicaginea* presented a higher potential for antibacterial activity with gram-positive bacteria. In contrast, the extracts with chlorophyll removal exhibited lower antibacterial activity when compared to their extracts without chlorophyll removal. In a previous study, similar to our result, the ethanol and chloroform extracts of *C. medicaginea* exhibited high activity against *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* and *P. aeruginosa* at a concentration of 2.5 mg/disc (Devendra *et al.*, 2012). In addition, Yadava and Vishwakarma (2014) reported the new allelochemicals from the methanolic extract from stems of *C. medicaginea* exhibited antibacterial activity against *E. coli* and *B. subtilis*. In comparison, our study presented that all extracts were unable to against gram-negative bacteria. Nevertheless, new allelochemical compounds had not inhibited *S. aureus*, which showed the same result in the stem extract of this study.

The phytochemical activity was investigated to screen the primary bioactive compounds in methanolic extracts from roots, stems and leaves without chlorophyll removal of *C. medicaginea*. This study showed all extracts presented alkaloid and coumarin compounds. The roots extract exhibited strong tannins. However, all extracts did not display saponins on the froth test. Besides, Devendra *et al.* (2012) found that both ethanol and chloroform extracts from leaves of *C. medicaginea* presented alkaloids and tannins. In addition, a previous study found alkaloids, tannins and coumarins in a methanolic extract with chlorophyll removal and without chlorophyll removal from the whole plant extracts of *C. medicaginea*. (Natsakulmong and Suwanmek, 2021). Therefore, our result is in accordance with both mentioned documents.

This study is the first report of biological activity from different parts of the methanolic extracts of *C. medicaginea*. The extract without chlorophyll removal had higher potential biological activity to total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities compared to their extract with chlorophyll removal. However, antibacterial activity from the methanolic extract of *C. medicaginea* did not affect gram-negative bacteria. Therefore, *C. medicaginea* should be evaluated for biological activity with different solvents partition in further studies, which may help to develop food products, medicine and cosmetic applications.

Acknowledgments

This work was funded free from the School of Science and financially supported by King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (grant number: A 118-0261-010). This project is a part of the Plant Genetic

Conservation Project under the Royal Initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn (RSPG). The samples were supported by Ban Wang Hora Community, Ong Phra Subdistrict, Dan Chang District, Suphanburi province.

References

- Armania, N., Yazan, L. S., Musa, S. N., Ismail, I. S., Foo, J. B., Chan, C. H., Noreen, H., Hisyam, A. H., Zulfahmi, S. and Ismail, M. (2013). *Dillenia suffruticosa* exhibited antioxidant and cytotoxic activity through induction of apoptosis and G₂/M cell cycle arrest. *Journal of Ethnopharmacology*, 146:525-535.
- Banerjee, A., Dasgupta, N. and De, B. (2005). In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. *Food Chemistry*, 90:727-733.
- Benjakul, S., Kittiphattanabawon, P., Sumpavapol, P. and Maqsood, S. (2014). Antioxidant activities of lead (*Leucaena leucocephala*) seed as affected by extraction solvent, prior dechlorophyllisation and drying methods. *Journal of Food Science and Technology*, 51:3026-3037.
- Borges, A., José, H., Homem, V. and Simões, M. (2020). Comparison of techniques and solvents on the antimicrobial and antioxidant potential of extracts from *Acacia dealbata* and *Olea europaea*. *Antibiotics*, 9:48.
- Breinholt, V., Bailey, G., Schimerlik, M. and Dashwood, R. (1995). Mechanisms of chlorophyllin anticarcinogenesis against Aflatoxin B1: Complex formation with the carcinogen. *Chemical Research in Toxicology*, 8:506-514.
- 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*, 18:63-76.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition*. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 32(2).
- DeGraff, W. G. and Mitchell, J. B. (1987). Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity. *Cancer Research*, 47:943-946.
- Denizot, F. and Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*, 89:271-277.
- Devendra, B. N., Srinivas, N. and Solmon, K. S. (2012). A comparative pharmacological and phytochemical analysis of in vivo and in vitro propagated *Crotalaria* species. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 5:37-41.
- Elangovan, V., Sekar, N. and Govindasamy, S. (1994). Chemoprotective potential of dietary bipoflavonoids against 20-methylcholanthrene-induced tumorigenesis. *Cancer Letters*, 87:107-113.

- Ferruzzi, M. G. and Blakeslee, J. (2007). Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. *Epidemiologic Nutrition Research*, 27:1-12.
- Hörtensteiner, S. and Kräutler, B. (2011). Chlorophyll breakdown in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*, 1807:977-988.
- Jain, S. C., Jain, R. and Singh, R. (2009). Ethnobotanical survey of Sariska and Siliserh regions from Alwar district of Rajasthan, India. *Ethnobotanical Leaflets*, 13:171-188.
- Kwartiningsih, E., Ramadhani, A. N., Putri, N. G. A., and Damara, V. C. J. (2021). Chlorophyll extraction methods review and chlorophyll stability of Katuk Leaves (*Sauropus androgynous*). *Journal of Physics: Conference Series*, 1858:12-15.
- Lordkhem, P. (2016). Bioactivity and genetic diversity of *Phlogacanyhus pulcherrimus*. (Master Thesis). King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Thailand.
- Namal Senanayake, S. P. J. (2013). Green tea extract: chemistry, antioxidant properties and food applications - A review. *Journal of Functional Foods*, 5:1529-1541.
- Natsakulmong, P. and Suwanmek, W. (2021). Species identification of *Crotalaria* sp. and evaluation of phytochemical screening. (Bachelor Thesis). King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Thailand.
- Ngoci, S. N., Mwendia, C. M. and Mwaniki, C. G. (2011). Phytochemical and cytotoxicity testing of *Indigofera lupatana* Baker F. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 11:13641373.
- Ninkaew, S., Balslev, H. and Chantaranothai, P. (2018). *Crotalaria* L. In: K. Chayamarit et al. (eds), *Flora of Thailand*. The Forest Herbarium, Bangkok, 4:260-261.
- Niyomdham, C. (1978). A revision of the genus *Crotalaria* Linn. (Papilionoideae) plants. *Thai Forest Bulletin (Botany)*, 11:105-181.
- Olatunde, O. O., Benjakul, S. and Vongkamjan, K. (2018). Antioxidant and antibacterial properties of guava leaf extracts as affected by solvents used for prior dechlorophyllization. *Journal of Food Biochemistry*, 42:1-11.
- Phaisan, S., Yusakul, G., Sakdamas, A., Taluengjit, N., Sakamoto, S. and Putalun, W. (2020). A green and effective method using oils to remove chlorophyll from *Chromolaena odorata* (L.) R.M. King and H. Rob. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 42:1084-1090.
- Rahiman, S., Tantry, B. A. and Kumar, A. (2012). Variation of antioxidant activity and phenolic content of some common home remedies with storage time. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines: AJTCAM / African Networks on Ethnomedicines*, 10:124-127.
- Sana, S. S., Kumbhakar, D. V., Pasha, A., Pawar, S. C., Grace, A. N., Singh, R. P., Nguyen, V. H., Le, Q. van. and Peng, W. (2020). *Crotalaria verrucosa* leaf extract mediated synthesis of Zinc Oxide nanoparticles: assessment of antimicrobial and anticancer activity. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25:1-21.

- Sreeprasert, J. (2016). Phytochemical screening and biological activity of *Dolichandrone Serrulata*. (Master Thesis). University of Burapha, Thailand.
- Stavric, B. (1994). Antimutagens and anticarcinogens in foods. *Food and Chemical Toxicology*, 32:79-90.
- Suwanchaikasem, P., Phadungcharoen, T. and Sukrong, S. (2013). Authentication of the Thai medicinal plants sharing the same common name "Rang Chuet": *Thunbergia laurifolia*, *Crotalaria spectabilis*, and *Curcuma* aff. *amada* by combined techniques of TLC, PCR-RFLP fingerprints, and antioxidant activities. *Science Asia*, 39:124-133.
- Tagrida, M. and Benjakul, S. (2020). Ethanolic extract of Betel (*Piper betle* L.) and Chaplu (*Piper sarmentosum* Roxb.) dechlorophyllized using sedimentation process: production, characteristics, and antioxidant activities. *Journal of Food Biochemistry*, 44:1-14.
- Thiankathet, C., Luengsawet, P. and Bututham, A. (2019). Preliminary on the bioactivity of methanolic extract from santol. (Bachelor degree). King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Thailand.
- Tzima, K., Brunton, N. P. and Rai, D. K. (2020). Evaluation of the impact of chlorophyll removal techniques on polyphenols in rosemary and thyme by-products. *Journal of Food Biochemistry*, 44:1-22.
- Yadava, R. N. and Vishwakarma, U. K. (2014). New potential allelochemicals from *Crotalaria medicaginea* Lam. *Chemical Science Transactions*, 3:141-150.
- Yin, M. C. and Cheng, W. S. (1998). Inhibition of *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* by some herbs and spices. *Journal of Food Protection*, 61:123-125.

(Received: 21 October 2022, accepted: 30 December 2022)

ประวัติผู้เขียน

| | |
|----------------------|---|
| ชื่อ | นางสาวธรรรณสรร์ พุ้ยอัน |
| วัน เดือน ปีเกิด | 18 มีนาคม 2541 |
| ที่อยู่ปัจจุบัน | 12 หมู่ 5 ตำบลน้ำตัก อำเภอพาน้อย จังหวัดน่าน 55150 |
| ประวัติการศึกษา | (2564) วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ เกรดเฉลี่ย 3.57 มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง (2566) วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง |
| ทุนการศึกษาที่ได้รับ | ทุนอุดหนุนการศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษาของคณะวิทยาศาสตร์ ปีการศึกษา 2564 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง รหัสทุนการศึกษา A 118-0261-010 |
| ผลงานทางวิชาการ | (2565) นำเสนอผลงานทางวิชาการเรื่อง Phytochemical screening, antioxidant activity and total phenolic content of methanolic extract of Phak Wan Ton (<i>Crotalaria medicaginea</i> Lam.) ในการประชุมทางวิชาการ International Conference on Integration of Science and Technology for Sustainable Development 2022 (10 th ICIST) ครั้งที่ 10 วันที่ 25 พฤศจิกายน 2565 ณ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (2566) ตีพิมพ์ผลงานทางวิชาการในฐานข้อมูล SJR-Scopus Quartile 4 Thuion, T., Poeaim, S.* and Poeaim, A. 2023. "Phytochemical screening, antioxidant activity and total phenolic content of methanolic extract of Phak Wan Ton (<i>Crotalaria medicaginea</i> Lam.)." <i>International Journal of Agricultural Technology</i> . 19(1) : 277-290. |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้