

ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากต้นสารพัดพิษ  
และการบ่งชี้สายพันธุ์ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด

BIOLOGICAL ACTIVITIES OF YELLOW NECKLACEPOD EXTRACTS  
AND SPECIES IDENTIFICATION USING DNA BARCODES



พัชรนันท์ เลากกลาง

PATCHARANUN LAOWKLANG

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
พ.ศ. 2568

KMITL-2025-SC-M-020-016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

BIOLOGICAL ACTIVITIES OF YELLOW NECKLACEPOD EXTRACTS  
AND SPECIES IDENTIFICATION USING DNA BARCODES



A THESIS SUBMITTED IN FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR  
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY  
DEPARTMENT OF BIOLOGY SCHOOL OF SCIENCE  
KING MONKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG  
2025

KMITL-2025-SC-M-020-016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2025

SCHOOL OF SCIENCE

KING MONKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากต้นสารพัดพิษ และการบ่งชี้สายพันธุ์ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด
ชื่อนักศึกษา	นางสาวพัชรนันท์ เลากลาง
รหัสประจำตัว	64605079
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
พ.ศ.	2568
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

### บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและบ่งชี้สายพันธุ์ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ดของต้นสารพัดพิษ โดยการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเมทานอลจากใบ เมล็ด และใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ พบว่าสารสกัดเมทานอลจากใบและเมล็ดมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี เมื่อนำมาแยกส่วนสารสกัดด้วยวิธี Liquid-liquid extraction พบว่าสารสกัดแยกส่วนในชั้นไดคลอโรมีเทนและเอทิลอะซิเตทจากใบและเมล็ด (LD, LE, SD และ SE) มีฤทธิ์ทางชีวภาพโดยให้ผลการทดลองที่มีความสามารถใกล้เคียงกัน เมื่อนำสารสกัดแยกส่วนทั้งหมดมาแยกความบริสุทธิ์ ด้วยวิธี Column chromatography พบว่าสารสกัดส่วนย่อยจากใบในชั้นไดคลอโรมีเทน (LDF) และเอทิลอะซิเตท (LEF) สารสกัดส่วนย่อยจากเมล็ดในชั้นไดคลอโรมีเทน (SDF) และเอทิลอะซิเตท (SEF) มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ มีความสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก 2 สายพันธุ์คือ *Kocuria rhizophila* และ *Bacillus cereus* และมีความสามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ภายในหลอดทดลอง และภายในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 และเมื่อนำสารสกัดมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญด้วยวิธี GC-MS พบสารในกลุ่มอัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ กรดไขมัน และสารประกอบอินทรีย์ เช่น Matrine, Catechin, สารกลุ่ม Phthalic acid และกลุ่ม Hexanedioic acid เป็นต้น ซึ่งสารสำคัญที่พบมีรายงานด้านฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย และมีศักยภาพในการนำไปพัฒนาต่อไปในด้านต่าง ๆ เช่น เกษษวิทยา เกษตรกรรม และด้านอาหาร เป็นต้น และจากการบ่งชี้สายพันธุ์ของต้นสารพัดพิษด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง Ribulose biphosphate carboxylase (*rbcl*) บ่งชี้คือ *Sophora tomentosa* var. *truncata* โดยมีค่าความเหมือนร้อยละ 99.85

**คำสำคัญ:** ฤทธิ์ทางชีวภาพ ต้นสารพัดพิษ สารสกัด ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Biological activities of yellow necklacepod extracts and species identification using DNA barcodes
Student Name	Patcharanun Laowklang
Student No.	64605079
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Year	2025
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Supattra Poeaim

### Abstract

This study aims to evaluate the biological activities and species identification of yellow necklacepod using DNA barcoding. The biological activities of methanol extracts from leaves, seeds and de-chlorophyll leaves were examined. The methanol extracts from leaves and seeds exhibited significant biological activities. The methanolic extract were fractionated using liquid-liquid extraction, revealing that the dichloromethane and ethyl acetate fractions from leaves and seeds (LD, LE, SD, and SE) exhibited notable biological activities. Further purification using column chromatography revealed that the dichloromethane (LDF) and ethyl acetate (LEF) fractions from leaves as well as the dichloromethane (SDF) and ethyl acetate (SEF) fractions from seed exhibited antioxidant activity, antibacterial activity against *Kocuria rhizophila* and *Bacillus cereus* and anti-inflammatory effects, including nitric oxide inhibition both in vitro and RAW 264.7 macrophage cells.

GC-MS analysis of the extract revealed the presence of alkaloids, flavonoids, fatty acids and organic compounds including matrine, catechin, pathalic acid derivatives and hexanedioic acid derivatives. These bioactive compounds contribute to the observed biological activities, indicating their potential applications in pharmacology, agriculture and food sciences. Furthermore, DNA barcoding based on the ribulose biphosphate carboxylase (*rbcl*) gene identified the species as *Sophora tomentosa* var. *truncata* with the identity of 99.85 %.

**Keywords:** Biological activity, Yellow necklacepod, Extracts, DNA barcode

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อสนองพระราชดำริในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ซึ่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จจุล่งไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. สุปัตรา โพธิ์เอี่ยม ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ สนับสนุนคอยช่วยเหลือ ความอนุเคราะห์ในเรื่องตัวอย่างของพืชที่ลงพื้นที่เก็บตัวอย่างที่เกาะยวน้อยและเกาะยวใหญ่ จังหวัดพังงา โดยงานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยและนวัตกรรมจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติประจำปี 2566 ขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ ดร.ปิยรัชฎ์ ปริญาพงษ์ เจริญทรัพย์ ประธานกรรมการและผู้ทรงคุณวุฒิ จากภายนอกสถาบันฯ และรองศาสตราจารย์ ดร.สร้อยญา พันธุ์พฤกษ์ อาจารย์ประจำบัณฑิต ที่กรุณาให้คำแนะนำ และพิจารณาแก้ไขตรวจวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่และนักวิทยาศาสตร์ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คุณณัฐพร มานะประดิษฐ์ และคุณสุดใจ ผุดผาด เจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สจล. ที่อำนวยความสะดวกทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น

สุดท้ายขอขอบพระคุณบิดา มารดา และบุคคลในครอบครัว และเพื่อนทุกคนที่ให้การสนับสนุน ด้านทุนทรัพย์และกำลังใจเป็นอย่างมากในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ รวมถึงกำลังใจ ความช่วยเหลือ และคำแนะนำเป็นอย่างดีจาก คุณกัญญาพร คล่องแคล่ว คุณสุวิชญา จันทรสชา คุณกัญญา สีสดี คุณณัฐวิภา เหล่าเกื้อ คุณธนภรณ์ กลิ่นสนิท และคุณรวีรัตน์ ปานสมสวย คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจในขณะปฏิบัติงาน และขอขอบคุณทุก ๆ ท่านที่มีได้กล่าวถึงที่ให้การสนับสนุนต่อผู้วิจัยตลอดมา

พัชรนันท์ เลากกลาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ฐ
คำย่อ/สัญลักษณ์	ฒ
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b>	<b>4</b>
2.1 ต้นสารพัดพิษ	4
2.1.1 ข้อมูลทั่วไปและการกระจายพันธุ์	4
2.1.2 ลักษณะพฤกษศาสตร์	4
2.1.3 ประโยชน์ของต้นสารพัดพิษ	5
2.2 วิธีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ	6
2.2.1 สารประกอบฟีนอลิก	6
2.2.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	7
2.2.2.1 วิธี DPPH	8
2.2.2.2 วิธี ABTS	8
2.2.2.3 วิธี FRAP	9
2.2.3 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย	11
2.2.4 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส	13
2.2.5 ฤทธิ์ต้านการอักเสบ	14
2.2.6 ความเป็นพิษต่อเซลล์	16
2.3 การบ่งชี้สายพันธุ์ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด	18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย</b>	20
3.1 ตัวอย่างพืช	20
3.2 วัสดุอุปกรณ์	20
3.3 สารเคมี	21
3.3.1 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบสารพฤษเคมีเบื้องต้น	21
3.3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด	22
3.3.3 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	22
3.3.4 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์	22
3.3.5 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส	23
3.3.6 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์	23
3.3.7 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโคร ฟาจชนิด RAW 264.7	23
3.3.8 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์	23
3.3.9 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดเอ็นเอ	24
3.3.10 สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอ- เรส	24
3.3.11 สารเคมีในเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส	24
3.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย	24
3.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์	25
3.6 วิธีดำเนินการทดลอง	25
3.6.1 การสกัดสารและแยกสาร	25
3.6.1.1 การสกัดสารด้วยเมทานอล	25
3.6.1.2 การกำจัดคลอโรฟิลล์จากสารสกัดหยาบเมทานอลของ ใบสารพัดพิษ	26
3.6.1.3 การสกัดสารด้วยเทคนิค Liquid-liquid extraction	26
3.6.1.4 การแยกสารด้วยเทคนิค Column chromatography	27
3.6.2 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด	27
3.6.2.1 การตรวจสอบพฤษเคมี	27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.6.2.2 การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด	29
3.6.2.3 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	29
3.6.2.4 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย	31
3.6.2.5 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส	31
3.6.2.6 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์	32
3.6.2.7 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7	33
3.6.2.8 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์	34
3.6.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	35
3.6.4 การหาปริมาณสารสำคัญด้วยเทคนิค GC-MS	35
3.7 การบ่งชี้สายพันธุ์ของสารสกัดพืช	35
3.7.1 การสกัดดีเอ็นเอ	35
3.7.2 การตรวจสอบคุณภาพ และปริมาณของดีเอ็นเอ	36
3.7.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์	37
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล</b>	<b>39</b>
4.1 การสกัดสารด้วยเมทานอลและศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเมทานอล	39
4.1.1 ผลการสกัดสารด้วยเมทานอลจากใบ เมล็ด และการกำจัดคลอโรฟิลล์ของสารสกัดเมทานอลจากใบ	39
4.1.2 ผลการตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้น	39
4.1.3 ผลการศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด	41
4.1.4 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	42
4.1.4.1 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH	43
4.1.4.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS	44
4.1.4.3 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP	45
4.1.5 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย	46
4.1.6 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส	48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.1.7 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบ	50
4.1.7.1 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ในหลอดทดลอง	50
4.1.7.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 246.7	53
4.1.8 ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์	54
4.2 ผลการแยกส่วนของสารสกัดด้วยวิธี Liquid-liquid extraction และผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดแยกส่วน	58
4.2.1 ผลการแยกส่วนของสารสกัดด้วยวิธี Liquid- liquid extraction	58
4.2.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดแยกส่วนจากใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษ	60
4.2.2.1 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	60
4.2.2.1.1 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH	60
4.2.2.1.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS	61
4.2.2.1.3 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP	61
4.2.2.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย	62
4.2.2.3 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส	66
4.2.2.4 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบ	67
4.2.2.4.1 ฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ในหลอดทดลอง	67
4.2.2.4.2 ฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 246.7	68
4.2.2.5 ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์	70
4.3 ผลการแยกสารส่วนย่อยด้วยวิธี Column chromatography และผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดส่วนย่อย	74
4.3.1 ผลการแยกสารส่วนย่อยด้วยวิธี Column chromatography	74
4.3.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อย	75
4.3.2.1 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH	75
4.3.2.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS	76

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.3.3 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย	77
4.3.4 ผลการศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดส่วนย่อย	82
4.3.4.1 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ในหลอดทดลอง	82
4.3.4.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ ชนิด RAW 264.7	82
4.4 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC-MS	86
4.4.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเมทานอลจากใบ และเมล็ดของต้นสารพัดพิษ	86
4.4.2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดแยกส่วนจากใบ และเมล็ดของต้นสารพัดพิษ	87
4.4.3 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดส่วนย่อยจากใบ และเมล็ดของต้นสารพัดพิษ	92
4.5 ผลการศึกษาการบ่งชี้สายพันธุ์ และสายพันธุ์ย่อยของต้นสารพัดพิษ	104
4.5.1 ผลการศึกษาลักษณะพฤกษศาสตร์	104
4.5.2 ผลการบ่งชี้สายพันธุ์ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ดและระบุสายพันธุ์ย่อยของ สารพัดพิษ	106
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ</b>	<b>112</b>
5.1 สรุปผลการวิจัย	112
5.2 ข้อเสนอแนะ	112
เอกสารอ้างอิง	114
ภาคผนวก	133
ภาคผนวก ก	134
ภาคผนวก ข	137
ผลงานวิชาการ	160
ประวัติผู้เขียน	171

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	การกระจายพันธุ์ของต้นสารพัดพิษในประเทศไทย จากฐานข้อมูลหอพรรณไม้ไทย	4
3.1	องค์ประกอบและปริมาณของสารละลายที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopa-chrome	32
3.2	คู่มือการใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยบริเวณยีน <i>rbcl</i>	37
3.3	องค์ประกอบของสารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันบริเวณยีน <i>rbcl</i>	38
3.4	สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันบริเวณยีน <i>rbcl</i>	38
4.1	น้ำหนัก ร้อยละของผลได้ ลักษณะ และรหัสสีของสารสกัดเมทานอลจากใบ เมล็ด และสารสกัดใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์	39
4.2	ผลการตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดเมทานอลจากใบ เมล็ด และใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์	40
4.3	ค่าเฉลี่ยปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ของสารสกัดเมทานอลจากใบ เมล็ด และใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์	41
4.4	ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH, ABTS และ FRAP ของสารสกัดเมทานอลจากใบ เมล็ด และสารสกัดใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า $IC_{50}$ ของสารสกัดความเข้มข้น 125-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	45
4.5	บริเวณยับยั้งของเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดเมทานอลของใบ เมล็ด และใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อดิสก์	49
4.6	ค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบเมทานอลจากใบและเมล็ดของสารพัดพิษที่ระดับความเข้มข้น 125-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า $IC_{50}$	50
4.7	ร้อยละความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ และค่า $IC_{50}$ ของสารสกัดหยาบเมทานอลจากใบและเมล็ด	51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.8	สารสกัดเมทานอลจากใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50 (IC <sub>50</sub> )	52
4.9	ร้อยละความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ในเซลล์ชนิดแมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 และค่า IC <sub>50</sub> ของสารสกัดเมทานอลจากใบและเมล็ดของสารพัดพิษ	53
4.10	ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50 (IC <sub>50</sub> ) ของสารสกัดเมทานอลของใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษ ที่ความเข้มข้น 125-2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	56
4.11	ลักษณะและปริมาณผลึกฟอร์มาซานภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ Inverted microscope ที่กำลังขยาย 100 เท่า หลังจากเติม MTT เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง ที่มีลักษณะผลึกฟอร์มาซานเปรียบเทียบกับเซลล์ชุดควบคุม และเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอลของใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษ ที่ความเข้มข้น 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	57
4.12	น้ำหนัก ร้อยละผลได้ ลักษณะ และรหัสสีของสารสกัดแยกส่วนจากใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษ	59
4.13	แสดงความสามารถต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP ของสารสกัดแยกส่วนจากใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษ ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า IC <sub>50</sub> ของสารสกัด ที่ความเข้มข้น 125-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	64
4.14	ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดแยกส่วนของใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อดิสก์	65
4.15	ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดแยกส่วนจากใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษ ที่ระดับความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า IC <sub>50</sub> ของสารสกัดแยกส่วน 125-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.16	ร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์ในหลอดทดลองของสารสกัดแยกส่วนจากใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และค่า IC <sub>50</sub> ของสารสกัดที่ความเข้มข้น 125-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร	68
4.17	ร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 246.7 ของสารสกัดแยกส่วนจากใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษ ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และค่า IC <sub>50</sub> ของสารสกัดที่ความเข้มข้น 125-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร	69
4.18	ร้อยละความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ของตัวควบคุมเชิงบวกในเซลล์ชนิดแมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 และค่า IC <sub>50</sub>	70
4.19	แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ร้อยละ 50 ในเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ ของสารสกัดแยกส่วนจากใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษ ที่ทดสอบในระดับความเข้มข้น 125-2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร	73
4.20	แสดงร้อยละความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดส่วนย่อยจากใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และค่า IC <sub>50</sub> ของสารสกัดที่ความเข้มข้น 125-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร	78
4.21	แสดงร้อยละความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดส่วนย่อยจากใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และค่า IC <sub>50</sub> ของสารสกัดที่ความเข้มข้น 125-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร	79
4.22	ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดแยกส่วนของใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อดิสก์	80

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.23	ร้อยละความสามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ของสารสกัดส่วนย่อยจากใบและเมล็ด ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า IC <sub>50</sub> ของสารสกัด 125-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	84
4.24	ร้อยละความสามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 ของสารสกัดส่วนย่อยจากใบและเมล็ด ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า IC <sub>50</sub> ของสารสกัด 125-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	85
4.25	ผลวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเมทานอลจากใบและเมล็ด ด้วยวิธี GC-MS	89
4.26	แสดงผลวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดใบแยกส่วนจากชั้นไดคลอโรมีเทน (LD) และเอทิลอะซิเตท (LE)	90
4.27	แสดงผลวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเมล็ดแยกส่วนจากชั้นไดคลอโรมีเทน (SD) และเอทิลอะซิเตท (SE)	91
4.28	แสดงผลวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดส่วนย่อยของใบจากชั้นไดคลอโรมีเทน LDF1-11 ด้วยเทคนิค GC-MS	96
4.29	แสดงผลวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดส่วนย่อยของใบจากชั้นเอทิลอะซิเตท LEF1-8 ด้วยเทคนิค GC-MS	99
4.30	แสดงผลวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดส่วนย่อยของเมล็ดจากชั้นไดคลอโรมีเทน SDF1-8 ด้วยเทคนิค GC-MS	101
4.31	แสดงผลวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดส่วนย่อยของเมล็ดจากชั้นเอทิลอะซิเตท SEF1-8 ด้วยเทคนิค GC-MS	103
4.32	เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันบริเวณยีน <i>rbcl</i> กับฐานข้อมูลของ <i>S. tomentosa</i>	109
4.33	ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายพันธุ์ในสกุล <i>Sophora</i>	109

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	ลักษณะพฤกษศาสตร์ของ <i>S. tomentosa</i>	5
3.1	ขั้นตอนการสกัดสารด้วยเทคนิค Liquid-liquid extraction ของสารสกัดจากใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษ	26
4.1	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดเมทานอลใบ เมล็ด และใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ กับค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH	43
4.2	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดเมทานอลใบ เมล็ด และใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ กับค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS	44
4.3	ผลการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดเมทานอลของใบ เมล็ด และใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์	48
4.4	ลักษณะของสารสกัดแยกส่วนจากใบและเมล็ด ด้วยวิธี Liquid-liquid extraction	58
4.5	แสดงบริเวณยับยั้งของเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดแยกส่วนของใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อดิสก์	66
4.6	การเคลื่อนที่และองค์ประกอบของสารที่แยกบนแผ่น TLC แบบบางของระบบตัวทำละลายเฮกเซนต่อเอทิลอะซิเตท อัตราส่วน 3:7	74
4.7	แสดงบริเวณยับยั้งเชื้อ <i>K. rhizophila</i> และ <i>B. cereus</i> ของสารสกัดส่วนย่อยจากใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อดิสก์	81
4.8	ลักษณะพฤกษศาสตร์ของต้นสารพัดพิษ	105
4.9	ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอร์เมอเรสบริเวณยีน <i>rbcL</i> ขนาด 850 คู่เบส อุณหภูมิ Annealing 60 องศาเซลเซียส และใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 kb	106

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.10	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rbcl</i> ของตัวอย่างเกาะยว น้อย คือ STL014 และ STL015 และตัวอย่างเกาะยวใหญ่ คือ STL01 และ STL036 และตัวอย่าง <i>S. tomentosa</i> หมายเลข AB127038 โดยใช้โปรแกรม BioEdit	108
4.11	แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ (Maximum-Likelihood tree) ของตัวอย่าง สารพัดพิษจากเกาะยวน้อยและยวใหญ่ กับพืชสกุล <i>Sophora</i> ของ บริเวณยีน <i>rbcl</i>	111



## คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
DPPH	2,2-diphenyl-picrylhydrazyl
ABTS	2,2'-azino-bis [3-ethylbenzothiazole-6-sulfonic acid
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
IC <sub>50</sub>	50 % inhibitory concentration
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry
mg TE	Milligram Trolox equivalent
Mg GAE	Milligram gallic acid equivalent
SNP	Sodium nitroprusside
LPS	Lipopolysaccharide
nm	Nanometer
PCR	Polymerase chain reaction
TLC	Thin-layer chromatography
UV	Ultra Violet

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สารพัดพิช (*Sophora tomentosa* L.) อยู่ในวงศ์ Fabaceae หรือ Leguminosae มีชื่อสามัญว่า Yellow necklacepod มีลักษณะต้นขนาดเล็ก เป็นไม้พุ่มสูง 3-4 เมตร เป็นพรรณไม้ที่ขึ้นได้เฉพาะลักษณะนิเวศตามบริเวณชายฝั่งที่น้ำทะเลท่วมไม่ถึง และตามโขดหินริมฝั่งทะเล (สำนักอุทยานแห่งชาติ, 2015) สารพัดพิชเป็นพืชสมุนไพรที่ชาวบ้านนำมาใช้รักษาโรคบิด โรคท้องร่วง และอหิวาตกโรค เป็นต้น สารพัดพิชมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากรากและลำต้นพบว่ามียังมีองค์ประกอบของสารฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) เช่น Sophoraflavanone A-E และ Sophoranone (Tanaka และคณะ, 1997) อีกทั้งยังพบว่าพืชในสกุล *Sophora* มีประมาณ 52 สายพันธุ์ (Species) ซึ่งมากกว่า 15 สายพันธุ์ที่ถูกนำมาใช้เป็นยาสมุนไพร โดยมีการรายงานสรรพคุณทางยาและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสำคัญที่พบจากสารสกัด ได้แก่ Isoflavonoid, Isoprenylated และ Coumarochromones (Tang และคณะ, 2002; Xing และคณะ, 2008) จากการศึกษาของ Tai และคณะ (2011) พบว่าสารสกัดจากดอกของ *S. vicifolia* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีสารสำคัญประเภทอัลคาลอยด์ (Alkaloid) ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ระบบภูมิคุ้มกัน และอื่น ๆ (Wen และ Mao, 2006) ซึ่งอัลคาลอยด์เป็นกลุ่มสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย รวมทั้งฤทธิ์ต้านมาลาเรีย ต้านมะเร็ง ยาลดความดันโลหิต ยาแก้ปวด ต้านแบคทีเรีย และฤทธิ์ต้านเบาหวาน ตลอดจนฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง ยาคลายกล้ามเนื้อ และคุณสมบัติขยายหลอดเลือด (Gupta และคณะ, 2019) นอกจากนี้ยังพบสารที่สำคัญจาก *S. japonica* ออกไปด้วยฟลาโวนอยด์ และกรดพิโนลิกที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Zhu และคณะ, 2022) และพบสารสำคัญจาก *S. exigua* ได้แก่ Kurarinone และ Sophoraflavanone G ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ (Sato และคณะ, 1995) มีรายงานว่าสารสำคัญ Quinolizidine ที่อยู่ในกลุ่มของอัลคาลอยด์ จากใบและเมล็ดของ *S. alopecuroides* ถูกนำมาใช้ในการรักษาอาการไข้ ติดเชื้อแบคทีเรีย โรคหัวใจ โรคไขข้อ และโรคทางเดินอาหาร (Wang และคณะ, 2020) จากงานวิจัยของ Zhang และคณะ (2018) มีรายงานว่าสารสกัดของ *S. flavescens* พบองค์ประกอบของสารอัลคาลอยด์ชนิด Matrine และมีรายงานของ He และคณะ (2015) สารสำคัญอย่างเช่น Matrine เป็นสารที่พบได้ในพืชสกุล *Sophora* ซึ่งมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ และรักษาโรคหัวใจ เบาหวาน ความดันโลหิต และอัลไซเมอร์ เป็นต้น

โดยในปัจจุบันสารพัดพิชมีรายงานการศึกษาในด้านฤทธิ์ทางชีวภาพค่อนข้างน้อยและพบเพียงการศึกษาในพืชสกุลเดียวกันเป็นส่วนใหญ่ อีกทั้งชาวบ้านในพื้นที่ อำเภอกะเยาว จังหวัดพังงา เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำเมล็ดสารพัดพิษมาบริโภคนั้นเป็นยาเพื่อลดอาการท้องเสีย ท้องร่วง มีวิธีบริโภคเมล็ดสารพัดพิษตามจำนวนอายุ เช่น อายุ 20 ปี จะบริโภคเมล็ดสารพัดพิษ 20 เมล็ด (ประพัทธ วิจิตรนาวิ) ซึ่งเป็นกรบริโภคที่ไม่ทราบถึงปริมาณที่ควรบริโภค และฤทธิ์ทางชีวภาพที่อาจส่งผลกระทบต่อร่างกายมีฤทธิ์เป็นยาหรือเป็นพิษ

ในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของใบและเมล็ด รวมทั้งใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ของต้นสารพัดพิษ เนื่องจากสีคลอโรฟิลล์ที่มีสีเขียวอาจรบกวนกิจกรรมทางชีววิทยาในหลอดทดลอง และบ่งชี้สายพันธุ์ของต้นสารพัดพิษด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) โดยเก็บตัวอย่างจากตำบลเกาะยวน้อยและเกาะยวใหญ่ จังหวัดพังงา

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 เพื่อสนองพระราชดำริในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี
- 1.2.2 ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากต้นสารพัดพิษ
- 1.2.3 ระบุสายพันธุ์และสายพันธุ์ย่อยของต้นสารพัดพิษด้วยวิธีดีเอ็นเอบาร์โค้ด

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

### 1.3.1 ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของต้นสารพัดพิษ

สกัดสารจากใบและเมล็ด โดยสกัดสารให้บริสุทธิ์มากขึ้นตามลำดับการสกัด 3 วิธี คือ 1. สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล 2. สกัดแยกส่วนด้วยวิธี Liquid-liquid extraction 3. สกัดส่วนย่อยด้วยวิธี Column chromatography ซึ่งสารสกัดเมทานอลจากใบจากใบมีสีเขียวเข้มจึงนำมากำจัดคลอโรฟิลล์โดยการใช้ น้ำมันปาล์มจะได้สารสกัดใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ จากนั้นจะนำสารสกัดในแต่ละวิธีมาประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้วิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis[3-ethylbenzothiazole-6-sulfonic acid] (ABTS) และ Ferric reducing antioxidant power (FRAP) ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติด้วยวิธี MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) และนำสารสกัดมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC-MS (Gas Chromatography – Mass Spectrometry)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 1.3.2 ระบุสายพันธุ์ของต้นสารพัดพิษ

สกัดดีเอ็นเอจากใบของต้นสารพัดพิษ โดยสุ่มตัวอย่างจาก 2 แหล่ง คือ เกาะยวน้อย และ เกาะยวใหญ่ จังหวัดพังงา และสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในตำแหน่ง Ribulose-bisphosphate carboxylase (*rbcl*) และศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ พร้อมกับการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล National center for biotechnology information (NCBI) เพื่อระบุสายพันธุ์ และสายพันธุ์ย่อยของต้นสารพัดพิษ

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดของใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษ และองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดของใบและเมล็ดเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ และพัฒนาต่อด้านต่าง ๆ

1.4.2 ทราบสายพันธุ์ย่อยของต้นสารพัดพิษ เพื่อเป็นประโยชน์ต่อผู้อื่นและการอนุรักษ์ต่อไป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 ต้นสารพัดพิษ

#### 2.1.1 ข้อมูลทั่วไปและการกระจายพันธุ์

สารพัดพิษ (*Sophora tomentosa* Linn) ชื่อ สารพัดพิษ ชื่ออื่น ผื่นห่อ ขี้แมว ต้น โคนสมอ ซับพิษ ส้มพอก กักไม้ฝอย สะนวน ชื่อสามัญ Necklacepod, Yellow necklacepod และ Silverbush ชื่อวิทยาศาสตร์ *Sophora tomentosa* Linn ชื่อวงศ์ Leguminosae หรือ Fabaceae เป็นพืชไม้ล้มลุก พุ่มสูง สามารถออกดอกได้ตลอดทั้งปี มีช่วงอายุ 20-30 ปี เจริญได้เฉพาะลักษณะ นิเวศตามบริเวณชายฝั่ง น้ำทะเลที่ท่วมไม่ถึง และตามโขดหินริมฝั่งทะเล (สำนักอุทยานแห่งชาติ, 2015) สามารถพบได้ในหมู่เกาะแปซิฟิก โอเชียเนีย เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เม็กซิโก จีน แทนซาเนีย ศรีลังกา และควีนส์แลนด์ (Aly และคณะ, 2019) ในประเทศไทยต้นสารพัดพิษพบได้ทางภาคใต้ และภาคตะวันออกเฉียงใต้ ขึ้นตามชายฝั่งทะเล เช่น จังหวัดเพชรบุรี (Smitinand, 2001) และจากการรวบรวมข้อมูลจากหอพรรณไม้ไทย การกระจายพันธุ์ของต้นสารพัดพิษในประเทศไทย พบได้ในพื้นที่ ดาดชายทะเล ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 การกระจายพันธุ์ของต้นสารพัดพิษในประเทศไทยจากฐานข้อมูลหอพรรณไม้ไทย

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง	พืช	สถานที่
1	SN135645	<i>S. tomentosa</i>	เกาะพีพี จังหวัดกระบี่
2	SN120608	<i>S. tomentosa</i>	อ่าวนอง จังหวัดกระบี่
3	SN135641	<i>S. tomentosa</i>	เกาะจันทร์ จังหวัดชลบุรี
4	SN121593	<i>S. tomentosa</i>	เกาะเสม็ด จังหวัดชลบุรี
5	SN046019	<i>S. tomentosa</i>	เกาะช้าง จังหวัดตราด
6	SN123296	<i>S. tomentosa</i>	เกาะพัง จังหวัดสุราษฎร์ธานี
7	SN125693	<i>S. tomentosa</i>	เกาะสิมิลัน จังหวัดพังงา
8	SN161210	<i>S. tomentosa</i>	เกาะยาวน้อย จังหวัดพังงา
9	SN164395	<i>S. tomentosa</i>	เกาะยาวใหญ่ จังหวัดพังงา

#### 2.1.2 ลักษณะพฤกษศาสตร์

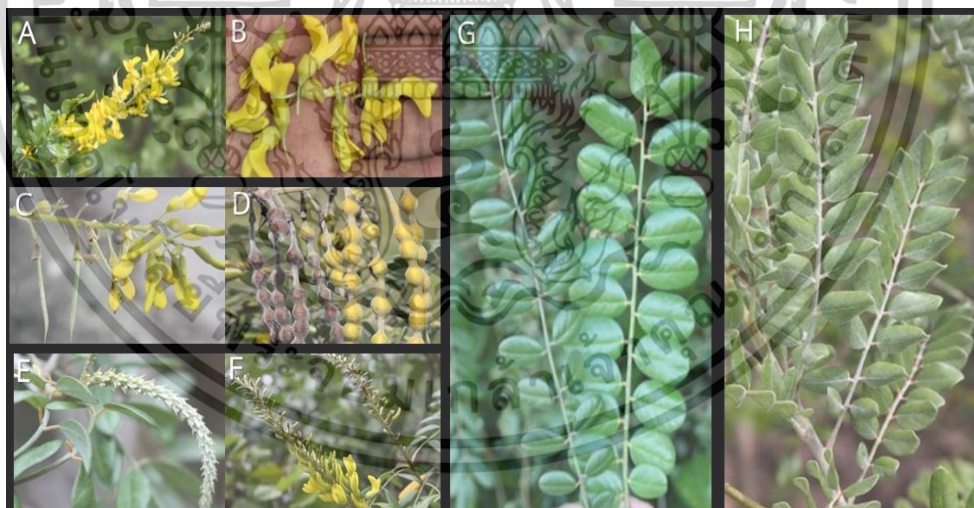
ในปัจจุบันพบ *S. tomentosa* มีลักษณะพฤกษศาสตร์ที่สามารถแยกความแตกต่างได้ 2 สายพันธุ์ย่อย (Stephen, 2018) คือ *S. tomentosa* var. *truncata* และ *S. tomentosa* var. *occidentalis* ได้ระบุว่าพืชทั้ง 2 สายพันธุ์ย่อย พบได้ทั่วไปตามบริเวณชายหาดของรัฐฟลอริดา เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยมีลักษณะดังต่อไปนี้ ต้นมีลักษณะพุ่มความสูง 2-3 เมตร ใบมีลักษณะเป็นรูปไข่ กิ่งใบยาว 20-30 เซนติเมตร ใบเรียงสลับขนนกคือประกอบด้วยใบย่อย 23 ใบ ดอกมีสีเหลืองช่อดอกยาว 20-40 เซนติเมตร (รูปที่ 2.1 A) กลีบดอกเป็นรูปถั่ว (ดังรูปที่ 2.1 B) ฝักมีลักษณะเป็นเส้นยาวสีเงิน (รูปที่ 2.1 C) เหมือนลูกปัดมีเมล็ดเป็นปล้อง (รูปที่ 2.1 D) ฝักเมื่อแก่แล้วเมล็ดจะไม่แตกออกมาพบว่า เดือนตุลาคมช่อดอกจะเริ่มออก (รูปที่ 2.1 E) และดอกจะเริ่มบานภายในเดือนตุลาคม (รูปที่ 2.1 F) และฝักเมล็ดและช่อดอก (รูปที่ 2.1 C)

โดยลักษณะที่แตกต่างกันของทั้ง 2 สายพันธุ์ย่อย คือ ลักษณะใบ ซึ่ง *S. tomentosa* var. *truncata* ช่วงใบอ่อนมีขนปกคลุมทั้งด้านบนและท้องใบ เมื่อโตเต็มวัยส่วนด้านบนของใบจะเป็นสีเขียวเข้มมันวาวและท้องใบจะเรียบไม่ปรากฏขน (รูปที่ 2.1 G) และ *S. tomentosa* var. *occidentalis* ใบอ่อนและใบแก่มีขนปกคลุมหนาแน่นทั้งด้านบนใบและท้องใบ (รูปที่ 2.1 H)

### 2.1.3 ประโยชน์ของต้นสารพัดพิษ

เมล็ดและใบนำมาบริโภคเพื่อรักษาโรคบิด โรคท้องร่วง และอหิวาตกโรค (Perry และ Metzger 1980) เมล็ด ราก และเปลือกต้นสามารถบรรเทาอาการบิดและท้องเสียได้ ช่วยขับเหงื่อ และขับปัสสาวะ (Ahlgren, 2009) และถูกนำมาใช้เป็นยาแก้พิษจากปลาหมึกพิษ (Kinoshita และคณะ, 1990)



รูปที่ 2.1 ลักษณะพฤกษศาสตร์ของ *S. tomentosa* โดย (A) ช่อดอก (B) ดอก (C) การเจริญของดอกและฝักอ่อน (D) ฝักแก่และฝักอ่อน (E-F) การเจริญของช่อดอก (G) ลักษณะใบของ *S. tomentosa* var. *truncata* (H) ลักษณะใบของ *S. tomentosa* var. *occidentalis* (ที่มา: Stephen, 2018)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.2 วิธีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ

### 2.2.1 สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds)

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารทุติยภูมิที่ได้จากกระบวนการเมทาบอลิซึมของเซลล์พืช ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อย 1 หมู่ และวงแหวนอะโรมาติก ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกนั้นสามารถพบได้ในพืช อีกทั้งยังมีโครงสร้างที่หลากหลาย โดยเป็นโครงสร้างอย่างง่ายสามารถพบได้ในสารในกลุ่มลิกนิน ซึ่งกลุ่มสารที่พบฟีนอลิกมากที่สุด คือ ฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอลิกมักจะพบในน้ำตาลในรูปของไกลโคไซด์ เช่น กลูโคสหรืออาจจะพบสารกลุ่มอัลคาลอยด์ แทนนิน เบต้าแคโรทีน และเทอร์ปีนอยด์ที่เกิดจากการรวมตัวของโปรตีนและฟีนอลิก เป็นต้น (Abdall และคณะ, 2007) การศึกษาในปัจจุบันพบว่า ฟีนอลิกมีความสามารถทางฤทธิ์ชีวภาพ เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งการอักเสบ ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย รวมถึงเภสัชวิทยา (กนกอร และคณะ, 2562) สามารถพบสารประกอบฟีนอลิกในส่วนประกอบของพืชได้ทั้งในเปลือก เมล็ด ใบ และลำต้น เป็นต้น อย่างไรก็ตามความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระขึ้นอยู่กับชนิดของพืช และบริเวณของพืชที่นำมาทดสอบ (เนตรนภา และเฉลิม, 2014) และสารต้านอนุมูลอิสระมักประกอบด้วยสารหลายชนิดทำงานเสริมกันจึงจะมีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (เอนก และบุญยกฤต, 2560)

ในการศึกษาของพืชสกุล *Sophora* การศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมีงานวิจัยของ Aly และคณะ (2021) ศึกษาน้ำมันหอมระเหยจากใบของ *S. tomentosa* และดอกของ *S. secundiflora* มาวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมีค่า 4.72 และ 18.01 mg GAE/g extract ตามลำดับ และการศึกษาของ Zhigang และคณะ (2011) นำสารสกัดเมทานอลของดอก *S. viciifolia* จากนั้นแยกส่วนสารสกัดเมทานอลของดอกด้วยตัวทำละลายปิโตเลียมเอสเทอร์ เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ พบว่าปริมาณฟีนอลิกของสารสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท บิวทานอล ปิโตเลียมเอสเทอร์ และน้ำ เท่ากับ  $143.8 \pm 8.7$ ,  $95.3 \pm 6.8$ ,  $45.8 \pm 2.5$  และ  $29.3 \pm 1.4$  mg GAE/g extract ตามลำดับ และสารสกัดเมทานอลปริมาณฟีนอลิก  $75.2 \pm 4.2$  mg GAE/g extract การศึกษาของ Mihaylova และ Schalow (2013) นำดอกตูมของ *S. japonica* มาสกัดด้วยเอทานอลจากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ได้มาสกัดฟลาโวนอยด์ด้วยน้ำร้อน มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในปริมาณสูงถึง  $425.0 \pm 2.7$  mg GAE/g extract เมื่อนำมาวิเคราะห์สารสำคัญด้วยเทคนิค HPLC (High Performance Liquid Chromatography) พบสารสำคัญประกอบอยู่เป็นหลักคือ เควอซิทิน (Quercetin) ร้อยละ 91.6 โดยเควอซิทินมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยปริมาณของฟีนอลิกทั้งหมดนั้นสัมพันธ์กับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (Amerine และ Ough, 1980) และจากการศึกษาของ Zahra และคณะ (2021) สารสกัดเมทานอลของเมล็ด *S. alopecuroides* มีปริมาณฟีนอลิก  $93.76 \pm 2.71$  GAE/mg และผลการศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดแสดงผลแนวโน้มลดลงเมื่อตัวทำละลายมีขั้วต่ำคือ เอทิลอะซิเตท คลอโรฟอร์ม และน้อยที่สุดคือ เฮกเซน โดยความมีขั้วของตัวทำละลายที่นำมาสกัดแยกส่วนแสดงให้เห็นปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดนั้นมีปริมาณมากที่สุดในเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยามให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวทำละลายที่มีขั้วสูง และในการศึกษาของพืชในตระกูลถั่ว (Fabaceae) มีรายงานการวิจัยของ Dzoyem และคณะ (2014) นำใบของ *Xylyia torreana* และ *Dalbergia nitidula* เป็นพืชในตระกูลถั่ว นำมาสกัดสารด้วยตัวทำละลายอะซิโตน จากนั้นนำมาทดสอบปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดพบว่า สารสกัดมีปริมาณฟีนอลิกเทียบเท่ากับสารโพลีฟีนอลที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน โดยปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดอะซิโตนของใบ *D. nitidula* มีค่า  $14.39 \pm 0.62$  mg GAE/g extract และสารสกัดอะซิโตนของใบ *X. torreana* มีค่า  $12.05 \pm 1.23$  mg GAE/g extract และในการศึกษาในพืชตระกูลเดียวกัน Chanda และคณะ (2010) ทำการศึกษาเปลือกหุ้มเมล็ดของถั่ว 6 สายพันธุ์ ดังนี้ ถั่วแระ (*Cajanus indica*) ถั่วลันเตา (*Pisum sativum*) ถั่วปากอ้า (*Vicia faba*) ถั่วดำ (*Vigna mungo*) ถั่วเขียว (*Vigna radiate*) และถั่วพุ่ม (*Vigna unguiculata* L. Walp) โดยทำการสกัดสารจากเปลือกหุ้มเมล็ดและเมล็ดด้วยเมทานอลพบว่า สารสกัดจากส่วนเปลือกหุ้มเมล็ดมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมากกว่าสารสกัดจากส่วนเมล็ด สารสกัดเมทานอลจากเปลือกเมล็ดถั่วแระมีปริมาณฟีนอลิกสูงสุดที่  $158.98 \pm 2.14$  mg GAE/g ตามด้วยสารสกัดเมทานอลจากถั่วเขียว ถั่วดำ ถั่วพุ่ม ถั่วปากอ้า และถั่วลันเตา มีค่า  $55.77 \pm 0.24$ ,  $43.95 \pm 0.23$ ,  $32.88 \pm 0.27$ ,  $14.36 \pm 0.07$  และ  $11.62 \pm 0.14$  mg GAE/g ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดเมทานอลจากเมล็ดมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดอยู่ในช่วง  $4.35 \pm 0.06$  -  $22.7 \pm 0.09$  mg GAE/g โดยสารสกัดเมทานอลจากถั่วดำมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด ตามด้วยสารสกัดเมทานอลจากถั่วเขียว ถั่วลันเตา ถั่วพุ่ม ถั่วแระ และถั่วปากอ้า มีค่า  $22.7 \pm 0.09$ ,  $16.29 \pm 0.0$ ,  $8.45 \pm 0.12$ ,  $8.33 \pm 0.16$ ,  $6.22 \pm 0.09$  และ  $4.35 \pm 0.06$  mg GAE/g ตามลำดับ โดยพบว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และต้านอักเสบ เป็นต้น (Amerine และ Ough, 1980; Mulaudzi และคณะ, 2011)

### 2.2.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activities)

อนุมูลอิสระ (Free radical) คือ อะตอมโมเลกุลหรือไอออนที่มีอิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่ จึงไม่เสถียรทำให้สามารถเข้าทำปฏิกิริยาทางเคมีกับโมเลกุลอื่นได้ว่องไว มีอายุสั้น ซึ่งโดยปกติในร่างกายจะมีโมเลกุลหรืออะตอมที่มีอิเล็กตรอนอยู่เป็นจำนวนมาก ในกรณีที่ร่างกายสูญเสียอิเล็กตรอนจากการถูกอนุมูลอิสระแย่งจับ ผลที่ตามมาจะส่งผลให้โมเลกุลข้างเคียงที่สูญเสียอิเล็กตรอนหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่โดยจะเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นต่อไป ส่งผลให้เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ทำให้ขาดความสมดุล และส่งผลให้เซลล์ในร่างกายถูกทำลายเกิดความเสียหายได้ โดยอนุมูลอิสระที่แย่งจับกับอิเล็กตรอนจะเรียกว่า สารออกซิแดน (Oxidant) ส่วนโมเลกุลที่สูญเสียอิเล็กตรอนเรียกว่า สารรีดิวซ์ (Reductant) (Lobo และคณะ, 2010) อนุมูลอิสระมีสาเหตุเกิดจากการใช้ออกซิเจนของกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในร่างกาย และได้รับการกระตุ้นจากปัจจัยภายนอก เช่น การสูบบุหรี่ ควันบุหรี่ รังสี มลพิษจากสิ่งแวดล้อม ยาบางชนิด สารเคมี และยาฆ่าแม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลง เป็นต้น อนุมูลอิสระทำให้เกิดโรคต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบเรื้อรัง โรคที่เกิดจากการขาดเลือด ระบบภูมิคุ้มกัน และโรคทางระบบประสาท เป็นต้น (Kumar และ Pandey, 2015)

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) คือ สารป้องกันและชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยร่างกายสามารถสร้างได้เองจากธรรมชาติหรือจากการสังเคราะห์ เช่น Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione peroxidase (GPXs), Phenolic, Carotenoids, Vitamins C, Vitamins E และ Selenium เป็นต้น สารต้านอนุมูลอิสระจะช่วยทำให้ร่างกายเกิดสมดุล รวมถึงลดสาเหตุของโรคต่าง ๆ ด้วย (Santos และคณะ, 2019; Kumar และ Pandey, 2015) โดยการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระนั้นมีหลายปัจจัยขึ้นอยู่กับกลไก และสารออกฤทธิ์แต่ละชนิด จึงจำเป็นต้องใช้วิธีวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่หลากหลายร่วมกัน

ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมีวิธีประเมินจากการส่งผ่านอิเล็กตรอนให้กับอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายที่แตกต่างกัน โดยวิธีที่นิยมนำมาศึกษา เช่น 2,2-diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis[3-ethylbenzothiazole-line-6-sulfonic acid] (ABTS) และ Ferric reducing antioxidant power (FRAP) (Apak และคณะ, 2013) วิธีดังกล่าวสามารถประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างที่จะนำมาทดสอบได้ โดยฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมีวิธีประเมินจากการส่งผ่านอิเล็กตรอนให้กับอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสี

#### 2.2.2.1 วิธี DPPH

DPPH (2,2-diphenyl-picrylhydrazyl) เป็นการทดสอบด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระคือ อนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัวและมีสีม่วงสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยสามารถวิเคราะห์ได้ถึงความสามารถในการจับอนุมูล DPPH• ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่เสถียร ถ้าสารสกัดสามารถจับกับอนุมูล DPPH• ได้สีของสารละลาย DPPH จะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง วิธี DPPH เป็นวิธีที่ง่าย สะดวกและรวดเร็ว เหมาะสำหรับการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นของสารบริสุทธิ์และสารสกัดจากพืช แต่ยังมีข้อจำกัดของสาร เช่น แคโรทีนอยด์ เนื่องจากมีความสามารถดูดกลืนแสงใกล้เคียงกับ DPPH (Apak และคณะ, 2013)

#### 2.2.2.2 วิธี ABTS

ABTS (2,2'-azino-bis[3-ethylbenzothiazole-line-6-sulfonic acid]) เป็นวิธีการวัดความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระ เป็นสารสังเคราะห์ที่มีสีเขียวปนน้ำเงินที่ไม่พบในสิ่งมีชีวิต จึงต้องนำมาทำปฏิกิริยากับกับสารชนิดอื่นอื่นเพื่อให้เป็นอนุมูลอิสระ ( $ABTS^{•+}$ ) โดยสารที่นิยมคือ แมงกานีสไดออกไซด์ (Manganese dioxide) หรือ โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (Potassium persulfate) จากนั้นนำมาวิเคราะห์ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เมื่อเกิดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ( $ABTS^{•+}$ ) จะถูกรีดิวซ์โดยสารต้านอนุมูลอิสระจะเปลี่ยนเป็นสีใส เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อดีของวิธีการนี้คือ ABTS<sup>+</sup> ละลายได้ดีในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์จึงทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว และทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH กว้าง เหมาะสำหรับศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในการวิเคราะห์ด้านอาหาร และวิจัยทางการแพทย์ (Apak และคณะ, 2013)

### 2.2.2.3 วิธี FRAP

FRAP (Ferric reducing antioxidant power) เป็นการวัดความสามารถในการให้อิเล็กตรอน หรือการวัดความสามารถในการรีดิวซ์ให้กับสารประกอบเชิงซ้อน Ferric tripyridyltriazine ( $\text{Fe}^{3+}$  -TPTZ) ให้เป็น Ferrous tripyridyl triazine ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ) ที่เกิดขึ้น สามารถประมาณความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากสีสีให้เป็นมีสีน้ำเงินเข้ม สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 539 นาโนเมตร วิธีการนี้เป็นวิธีที่ง่าย ใช้เวลาน้อย ไม่แพง และสามารถทำซ้ำได้ (Apak และคณะ, 2013)

ในปัจจุบันพบการศึกษาศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชสกุล *Sophora* ดังงานวิจัยของ Tai และคณะ (2011) นำส่วนดอกของ *S. vicifolia* มาสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล จากนั้นนำสารสกัดไปแยกส่วนโดยมีตัวทำละลายปีโตเลียมเอสเทอร์ เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ และนำมาศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP พบว่าในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากดอก *S. vicifolia* แสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากมากไปน้อยดังนี้ สารสกัดจากเอทิลอะซิเตท บิวทานอล สารสกัดหยาบเมทานอล ปีโตเลียมเอสเทอร์ และน้ำ โดยมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH จากมากไปน้อย ตามลำดับ โดยมีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ  $10.4 \pm 0.8$ ,  $15.4 \pm 2.1$ ,  $20.7 \pm 1.3$ ,  $62.9 \pm 4.8$  และ  $141.7 \pm 5.6$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เช่นเดียวกับการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS พบว่ามีความสอดคล้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยแสดงความสามารถต้านอนุมูลอิสระดังนี้ สารสกัดเอทิลอะซิเตท บิวทานอล สารสกัดหยาบเมทานอล ปีโตเลียมเอสเทอร์ และน้ำ โดยมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS จากมากไปน้อย ตามลำดับ โดยมีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ  $3.5 \pm 0.2$ ,  $4.2 \pm 0.4$ ,  $15.7 \pm 1.1$ ,  $23.0 \pm 2.6$ ,  $40.8 \pm 4.5$  และ  $4.8 \pm 0.4$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และนำมาทดสอบการต้านอนุมูลอิสระการรีดิวซ์ของสารประกอบเชิงซ้อนด้วยวิธี FRAP พบว่าความสามารถต้านอนุมูลอิสระ FRAP จากมากไปน้อยคือ สารสกัดเอทิลอะซิเตท บิวทานอล สารสกัดหยาบจากเมทานอล ปีโตเลียมเอสเทอร์ และน้ำ มีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ  $13.9 \pm 2.8$ ,  $27.4 \pm 2.4$ ,  $35.4 \pm 4.8$ ,  $39.4 \pm 1.8$  และ  $69.8 \pm 7.6$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยพบว่าสารสกัดดอกจากชั้นเอทิลอะซิเตท และบิวทานอลมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP ดีที่สุด และในงานวิจัยของ Mihaylova และ Schalow (2013) นำดอกตูมของ *S. japonica* มาสกัดด้วยเอทานอล และนำสารสกัดหยาบเอทานอลที่ได้มาสกัดฟลาโวนอยด์ด้วยน้ำร้อน จะได้สารสกัดฟลาโวนอยด์จากดอกตูม โดยนำสารสกัดฟลาโวนอยด์จากดอกตูม สารมาตรฐานโทรลล็อกซ์ และสารมาตรฐานเคอควิทินมาศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS เนื่องจากเป็นวิธีที่เสถียรที่สุด พบว่าความสามารถต้าน

อนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดฟลาโวนอยด์จากดอกตูมมีค่าร้อยละ  $62.1 \pm 3.6$  สารเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สว่นไวสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มาตรฐานโทรล็อกซ์มีค่าร้อยละ  $74.5 \pm 3.8$  และสารมาตรฐานเคอซีทินมีค่าร้อยละ  $72.1 \pm 2.4$  และความสามารถต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS โดยนำมาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ พบว่าความสามารถของสารสกัดพลาโวนอยด์จากดอกตูมมีค่า  $10.6 \pm 0.9$  ไมโครโมลาร์ และสารมาตรฐานเคอซีทินมีค่า  $12.5 \pm 0.8$  ไมโครโมลาร์ ผลการศึกษาแสดงว่าสารสกัดพลาโวนอยด์จากดอกตูมมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS และ DPPH ได้เทียบเท่ากับสารมาตรฐานโทรล็อกซ์และสารมาตรฐานเคอซีทินที่เป็นสารที่มีความสามารถในการชะลอการเกิดสารอนุมูลอิสระได้ เมื่อนำสารสกัดพลาโวนอยด์จากดอกตูมไปวิเคราะห์หาสารสำคัญด้วยเทคนิค HPLC พบว่ามีสารสำคัญคือ เคอซีทิน ปริมาณร้อยละ 91.6 และจากงานวิจัยของ Quradha และคณะ (2021) ได้นำสารสกัดจากรากของ *S. mollis* มาวิเคราะห์สารสำคัญด้วยวิธี NMR (Nuclear magnetic resonance spectroscopy) พบสารสำคัญประกอบด้วย Scopoletin และ 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-octacosyl ester เป็นสารประกอบหลัก และนำมาทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่า Scopoletin มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH มีค่าร้อยละ 83.98 และสาร 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-octacosyl ester มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH มีค่าร้อยละ 95.64 และการศึกษาของ Zahra และคณะ (2021) นำเปลือกหุ้มเมล็ดของ *S. alopecuroides* สกัดด้วยตัวทำละลาย 6 ชนิด คือ เมทานอล เอทานอล เฮกเซน คลอโรฟอร์ม เอทิลอะซิเตท และน้ำ มาทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าสารสกัดจากเมทานอลมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดคือ  $90.60 \pm 2.55$   $\mu\text{g AAE/mg}$  ตามด้วยสารสกัดจากเอทานอลมีค่า  $84.41 \pm 2.43$   $\mu\text{g AAE/mg}$  และความสามารถการต้านอนุมูลอิสระแสดงผลแนวโน้มลดลง เมื่อความเป็นขั้วของตัวทำละลายเฮกเซน คลอโรฟอร์ม เอทิลอะซิเตท และน้ำ ตามลำดับ อีกทั้งยังมีการศึกษาในตระกูลถั่ว ดังงานวิจัยของ Chanda และคณะ (2010) ทำการศึกษาเปลือกหุ้มเมล็ดและเมล็ดของถั่วทั้ง 6 สายพันธุ์ ดังนี้ ถั่วแระ (*C. indica*) ถั่วลิ้นเต่า (*P. sativum*) ถั่วปากอ้า (*V. faba*) ถั่วดำ (*V. mungo*) ถั่วเขียว (*V. radiate*) และถั่วพุ่ม (*V. unguiculata*) โดยสกัดส่วนเปลือกหุ้มเมล็ดของถั่วแต่ละสายพันธุ์ด้วยตัวทำละลายเมทานอล และนำมาศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าสารสกัดเมทานอลจากส่วนเปลือกหุ้มเมล็ดของถั่วแระมีค่า  $\text{IC}_{50}$  ดีที่สุด คือ 39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามด้วยสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดจากเมทานอลของถั่วเขียว ถั่วพุ่ม และถั่วดำ ตามลำดับ มีค่า  $\text{IC}_{50}$  220, 480 และ 560 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสกัดเมทานอลจากเปลือกหุ้มเมล็ดจากถั่วลิ้นเต่า และถั่วปากอ้า มีค่า  $\text{IC}_{50}$  มากกว่า 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และงานวิจัยของ Dzoyem และคณะ (2014) นำใบของ *X. torreana* และ *D. nitidula* เป็นพืชในตระกูลถั่ว นำมาสกัดสารด้วยตัวทำละลายอะซิโตน เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS พบว่าสารสกัดอะซิโตนจากใบของ *D. nitidula* มีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ  $9.31 \pm 2.14$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดอะซิโตนจากใบของ *X. torreana* มีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ  $16.90 \pm 5.45$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ของการทดลองต้านอนุมูลอิสระ DPPH มีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ  $9.71 \pm 2.23$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทดสอบต้านอนุมูลอิสระ ABTS สารสกัดอะซิโตนจากใบของ *X. torreana* มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $14.56 \pm 3.96$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดอะซิโตนจากใบของ *D. nitidula* มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $21.30 \pm 5.07$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารมาตรฐานโพลีฟีนอลิกของการทดลอง ABTS มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $12.48 \pm 3.7$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการทดลองต้านอนุมูลอิสระ ABTS จากการศึกษาพบว่าสารสกัดอะซิโตนจากใบของ *X. torreana* มีความสามารถเทียบเท่ากับสารมาตรฐานโพลีฟีนอลิก ซึ่งสภาพแวดล้อมและชนิดของพืชส่งผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน

### 2.2.3 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Antibacterial activities)

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเป็นความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและความสามารถในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียมักมีหลากหลายวิธี การเลือกใช้วิธีที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง เช่น ชนิดของเชื้อ ชนิดอาหาร คุณสมบัติของสารสกัด เป็นต้น ในปัจจุบันมีวิธีการทดลองการแพร่จากแผ่นดิสก์ (Disc diffusion) การเจือจางในอาหารเหลว (Broth dilution) ซึ่งแต่ละวิธีสามารถบอกค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ เช่น ความเข้มข้นของสารในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Minimal inhibitory concentration : MIC) และบอกค่าความเข้มข้นของสารที่ต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimal lethal concentration : MBC) (ประสาทพร และคณะ, 2551; Wilkinson, 2006)

#### 1. วิธี Disc diffusion

การทดสอบ Disc diffusion เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยทดสอบจากการวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (Inhibition zone) รอบแผ่นดิสก์ (Disc) ที่มีการเติมสารสกัดที่ทราบความเข้มข้นและปริมาณที่แน่นอนลงไปที่ถูกนำไปวางไว้บนผิวอาหาร นอกจากขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณวงใสที่ได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับเชื้อที่ทดสอบ ก็ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ อัตราการเจริญของเชื้อ ความสามารถในการละลายหรือซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อของสารสกัดในแผ่นดิสก์ เป็นต้น (Wilkinson, 2006)

#### 2. วิธี Broth dilution

การทดสอบวิธี Broth dilution ทำให้ทราบทั้งค่า MIC และ MBC หลักการคือ เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ทำการศึกษาทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวซึ่งมีสารสกัดในปริมาณต่าง ๆ และสังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยอาจใช้วิธีเทียบความขุ่นกับ McFarland เบอร์ 0.5 ความขุ่นจากการสังเกต หรือจากการวัดด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) (ประสาทพร, 2551; Wilkinson, 2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.วิธี Agar dilution

การทดสอบวิธี Agar dilution เป็นการทดสอบความไวของเชื้อแบบปริมาณ ใช้วิเคราะห์สามารถหาค่า MIC ได้ แต่ไม่สามารถหาค่า MBC ได้ โดยหลักการทดสอบคล้ายกับวิธี Broth dilution ต่างกันเพียงชนิดของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ (ประสาทร และคณะ, 2551)

โดยมีการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในพืชสกุล *Sophora* ในการศึกษาของ Hamdullah และ Ismet (2022) นำเมล็ดของ *S. alopecuroides* มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* และ *Candida albicans* ด้วยวิธี Disc diffusion โดยนำมาสกัดด้วยน้ำและนำมาสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโน โดยใช้สารสกัดจากน้ำของเมล็ด *S. alopecuroides* พบว่าไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และอนุภาคซิลเวอร์นาโนโดยใช้สารสกัดจากน้ำของเมล็ด *S. alopecuroides* มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ดีที่สุดมีบริเวณยับยั้ง 14.5 มิลลิเมตร ตามด้วยฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa*, *B. cereus*, *C. albicans*, *E. faecalis*, *B. subtilis* และ *E. coli* มีค่าบริเวณยับยั้ง 14.3, 12.2, 12.1, 10.3, 9.3 และ 8.1 มิลลิเมตร ตามลำดับ การศึกษาของ Ali และคณะ (2014) นำรากของ *S. pachycarpa* สกัดด้วยอะซิโตนนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ด้วยวิธี Disc diffusion ใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ โดยพบว่ามีบริเวณยับยั้ง  $15.0 \pm 1.00$  มิลลิเมตร จากการศึกษาของ Shaheen และคณะ (2018) ได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Agar well diffusion ของสารสกัดใบ *S. interrupta* จากตัวทำละลายน้ำ อะซิโตน แอลกอฮอล์ เบนซีน คลอโรฟอร์ม เอทิลอะซิเตท เมทานอล และปิโตเลียมเอสเตอร์ โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบกับเชื้อ *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella Pneumoniae* และ *Proteus vulgaris* โดยสารสกัดจากน้ำของใบมีบริเวณยับยั้งเชื้อ  $20.00 \pm 0.00$ ,  $29.50 \pm 0.50$ ,  $14.50 \pm 0.50$ ,  $20.25 \pm 0.43$  และ  $19.50 \pm 0.00$  มิลลิเมตร ตามลำดับ สารสกัดจากเมทานอลของใบมีบริเวณยับยั้ง  $20.25 \pm 0.43$ ,  $24.75 \pm 0.43$ ,  $12.50 \pm 0.50$ ,  $19.50 \pm 0.50$  และ  $13.35 \pm 0.50$  มิลลิเมตร ตามลำดับ โดยสารสกัดจากน้ำและเมทานอลของใบมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดีที่สุด และมีค่าบริเวณยับยั้งสูงสุดของเชื้อ *E. coli* และเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากตัวทำละลายอื่นจะพบฤทธิ์ยับยั้งในเชื้อแบคทีเรียบางชนิด โดยสารสกัดอะซิโตนจากใบมีฤทธิ์ยับยั้งเพียงในเชื้อ *B. subtilis*, *K. pneumoniae* *P. aeruginosa* มีค่าบริเวณยับยั้ง  $29.50 \pm 0.50$ ,  $11.75 \pm 0.43$  และ  $19.00 \pm 0.00$  มิลลิเมตร ตามลำดับ สารสกัดจากแอลกอฮอล์ของใบมีฤทธิ์ยับยั้งในเชื้อ *B. subtilis* และ *E. coli* มีค่า  $11.25 \pm 0.43$  และ  $8.50 \pm 0.50$  มิลลิเมตร ตามลำดับ สารสกัดจากเบนซีนของใบมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *P. aeruginosa* มีค่าบริเวณยับยั้ง  $10.50 \pm 0.50$  และ  $10.00 \pm 0.00$  มิลลิเมตร ตามลำดับ และสารสกัดจากคลอโรฟอร์มของใบมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* มีค่าบริเวณยับยั้ง  $18.50 \pm 0.50$ ,  $17.75 \pm 0.43$  และ  $10.75 \pm 0.43$  มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งสารสกัดจากปิโตเลียม

และเอทิลอะซิเตทของใบไม่พบมีบริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทุกชนิด การศึกษา Nurgun และคณะ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(2010) ได้นำสารสกัดเมทานอลของเมล็ดและกิ่งของ *S. jaubertii* มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ เชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี Broth dilution นำมาทดสอบกับเชื้อ *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* และ *S. aureus* พบว่าสารสกัดเมทานอลจากกิ่งและเมล็ดมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทั้งหมด ซึ่งพบสารสำคัญในสาร กลุ่มอัลคาลอยด์ทั้งส่วนกิ่งและเมล็ด คือ Matrine ถึงร้อยละ 34.64 และ 32.34 ตามลำดับ โดยอัลคาลอยด์เป็นสารสำคัญที่ส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ดี

#### 2.2.4 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Anti-tyrosinase activities)

เอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) เป็นเอนไซม์ที่พบได้ตามธรรมชาติในแมลง สัตว์ และคน เป็นต้น ซึ่งในคนพบเอนไซม์ไทโรซิเนสในเมลานโซม (Melanosome) ซึ่งเป็นโครงสร้างสีน้ำตาลที่ถูกสร้างขึ้นโดยเซลล์เมลานอไซต์ (Melanocyte) อยู่บริเวณล่างสุดของผิวหนังกำพวด โดยเอนไซม์ไทโรซิเนส มีหน้าที่ควบคุมการสร้างเม็ดสีเมลานินของผิวหนังโดยเร่งการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน ชนิด ไทโรซีน (Tyrosine) ให้เปลี่ยนเป็น Dihydroxyphenylalanine (3,4-dihydroxyphenylalanine; L-DOPA) ซึ่งขั้นตอนแรกนี้จะเป็นขั้นตอนกำหนดปฏิกิริยาเนื่องจากขั้นตอนหลังจากนี้จะสามารถเกิดขึ้นได้เองในสภาวะ pH ของร่างกายปกติ ต่อมาจะมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็น DOPA quinone (3,4-dihydroxyphenylalanine quinone) ซึ่งเป็นสารตัวกลางทำให้เกิดกระบวนการ Auto-oxidation และ DOPA chrome tautomerase จะกระตุ้นทำให้เกิดการสร้างเม็ดสีเมลานิน (ทักษอร, 2557)

เมลานิน (Melanin) สามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ ฟีโอเมลานิน (Pheomelanin) เป็นเซลล์สีเหลืองหรือสีแดง เพราะมีปริมาณเมลานินน้อย และยูเมลานิน (Eumelanin) เป็นเซลล์เม็ดสีเข้ม เพราะมีเมลานินปริมาณมาก (Niyomdech and Lohawittayanan, 2016) ปัจจุบันมีการใช้สารอันตราย เช่น พรอท ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ได้มาตรฐานที่ก่อให้เกิดยับยั้งการสร้างเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งทำให้เป็นพิษต่อเซลล์เกิดการแพ้อย่างรุนแรง จึงมีการใช้สมุนไพรหรือสารจากธรรมชาติมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีและไม่ก่อให้เกิดอันตราย การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมีการทดสอบในหลอดทดลอง (*In vitro*) เช่น Mushroom tyrosinase inhibitory assay และการทดสอบในสัตว์ทดลอง (*In vivo*) ด้วยวิธี Depigmenting activity (ทักษอร, 2557)

ในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสของ *S. tomentosa* พบเพียงการศึกษาในพืชสกุลและวงศ์เดียวกัน จากการศึกษาของ Lia และคณะ (2014) นำดอกสดของ *S. japonica* มาสกัดฟลาโวนอยด์และนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยใช้ L-tyrosinase เป็นสารตั้งต้นและสารตัวกลางของการสร้างเมลานิน โดยนำสารสกัดฟลาโวนอยด์จากดอกสดมาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานทั้ง 5 คือ Glycolic acid, Beta-arbutin, Alpha-arbutin, Ascorbic acid และ Hydroquinone พบว่าสารสกัดฟลาโวนอยด์จากดอกสดของ *S. japonica* มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสร้อยละ 70 โดยมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 3.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสาร

มาตรฐาน Beta-arbutin, Alpha-arbutin, Ascorbic acid และ Hydroquinone มีความสามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสร้อยละ 70 และน้อยที่สุดคือ Glycolic acid มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสร้อยละ 60 โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 37 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จึงบอกได้ว่าสารสกัดพลาโวนอยด์จากดอกสดมีฤทธิ์เทียบเท่ากับสารมาตรฐานที่ทำหน้าที่ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และจากการศึกษาของ Fan และคณะ (2024) ได้นำรากแห้งของ *S. flavescens* มาสกัดสารด้วยตัวทำละลาย 5 ชนิด ได้แก่ เอทิลอะซิเตท ไดคลอโรมีเทน เมทานอล 70 % เอทานอล 70 % และไดคลอโรมีเทนต่อเอทานอล (1: 1 v/v) จากนั้นนำสารสกัดจากรากของตัวทำละลายทั้งหมดมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนส โดยใช้ L-tyrosinase ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นและสารตัวกลางของการสร้างเมลานิน พบว่าสารสกัดจากไดคลอโรมีเทนของรากแห้งมีค่าความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสดีที่สุดในที่  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือสารสกัดจากเอทิลอะซิเตทของรากแห้งมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามด้วยสารสกัดจากไดคลอโรมีเทนต่อเอทานอล เมทานอล 70 % และเอทานอล 70 % ของรากแห้ง โดยมีค่า  $IC_{50}$  5, 6.9 และ 90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นทำการรวมสารสกัดทั้ง 5 ชนิด และนำมาละลายด้วยตัวทำละลายเมทานอลเพื่อวิเคราะห์หาสารสำคัญในกลุ่มพลาโวนอยด์ด้วยวิธี UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography) ซึ่งสามารถแยกและวิเคราะห์สารที่อยู่ในรูปของเหลว พบว่าสารสกัดจากรากแห้ง *S. flavescens* มีสารพรีนิลพลาโวนอยด์ 3 ชนิด คือ Isoanhydroicaritin, Kurarinone, และ Sophoraflavanone G เมื่อนำมาวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสพบว่า มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.7, 7.1, และ 6.7 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ และยังพบสารสำคัญในงานวิจัยของ Hyun และคณะ (2008) ได้นำสารสกัดแยกส่วนในชั้นเอทิลอะซิเตทของราก *S. flavescens* มาศึกษาความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยการแยกสารสกัดส่วนย่อยด้วยวิธี Column chromatography เมื่อนำสารสกัดส่วนย่อยไปวิเคราะห์สารสำคัญพบสารสกัดส่วนย่อยแสดงความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมีสารสำคัญ 3 ชนิด คือ Kurarinol, Kuraridinol และ Trifolirhizin โดยสารทั้ง 3 ชนิด มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $8.60 \pm 0.51$ ,  $0.88 \pm 0.06$  และ  $506.77 \pm 4.94$  ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

### 2.2.5 ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory)

การอักเสบ (Inflammation) เป็นกระบวนการที่ร่างกายตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอม ทำให้เซลล์ได้รับบาดเจ็บ เช่น เชื้อโรค การตายของเซลล์ที่เกิดจากการขาดเลือดหรือขาดออกซิเจน หรือสารสื่อกลาง (Mediator) เข้าไปกระตุ้นปลายประสาทส่งผลให้เกิดอาการบวม ปวด แดง ร้อน (พีรยุทธ์, 2554) ซึ่งในขณะเดียวกันหากมีการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบที่มากเกินไปหรือหลังเป็นระยะเวลาต่อเนื่อง จะทำให้เกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคกระเพาะ ลำไส้อักเสบ โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ โรคอัลไซเมอร์ โรคพาร์กินสัน ภาวะช็อคจากการติดเชื้อจากเซลล์ที่เสียหาย และโรคเบาหวาน เป็นต้น (Van และคณะ, 2000) จึงต้องมีการสร้างสารสื่อกลางการอักเสบที่ทำหน้าที่ยับยั้งการปล่อยสาร

Histamine ที่ทำให้เกิดอาการแพ้ บวม แดง คัน จากเซลล์เม็ดเลือดขาว เช่น prostaglandin E2 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(PGE2), Nitric oxide (NO) และ Cytokine ที่ทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้เม็ดเลือดขาวเกิดการอักเสบ เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอม และซ่อมแซม (Huang และคณะ, 2006)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบนั้นมีหลากหลายวิธี เช่น การทดสอบในหลอดทดลอง (*In vitro*) โดยการทดสอบนี้จะถูกกระตุ้นการอักเสบสภาวะในหลอดทดลองด้วย SNP (Sodium Nitroprusside) และการทดสอบกับเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 ถูกกระตุ้นการอักเสบด้วย LPS (Lipopolysaccharide) เป็นต้น โดยสารที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบจะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนเปลี่ยนไนตริกออกไซด์ให้เป็นไนโตรท์ ซึ่งเป็นสารที่พบเมื่อเกิดการบาดเจ็บหรือการอักเสบของเซลล์หรือเนื้อเยื่อ เมื่อสารกระตุ้นการหลั่งไนตริกออกไซด์ทำปฏิกิริยากับออกซิเจนเปลี่ยนไปเป็นไนโตรท์ ไนโตรท์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการอักเสบนี้นี้จะถูกวัดได้จากสารรีเอเจนต์ คือ Griess reagent โดยสังเกตได้จากสีหากมีการหลั่งไนตริกออกไซด์จะปรากฏสีชมพู และหากตัวอย่างที่นำมาทดสอบสามารถต้านอักเสบได้จะปรากฏเป็นสีเหลืองไปจนถึงสีขาวใส (Huang และคณะ, 2006)

โดยมีการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ในพืชสกุล *Sophora* และในวงศ์ Fabaceae จากการศึกษาของ Cho และคณะ (2020) ได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์โดยสกัดพลาโวนอยด์ของราก *S. japonica* พบว่ามีสาร Kushenol C โดยนำมาทดสอบกับเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 246.7 ใช้ LPS เป็นสารเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ พบว่าสารสกัดมีความสามารถในการยับยั้งการหลั่งสารสื่อกลางที่ทำให้เกิดการหลั่งไนตริกออกไซด์ ได้แก่ NO, PGE2, IL-6, IL1 $\beta$ , MCP-1 และ IFN- $\beta$  จึงนำสารสกัดไปศึกษาการอักเสบต่อในเซลล์ผิวหนังของหนูชนิด HaCaT โดยทำการทดสอบกับเซลล์ผิวหนังของหนูชนิด HaCaT โดยแบ่งเป็นการทดลองที่ความเข้มข้นของสารสกัด 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครโมลาร์ และทำการเติมสาร tBHP (tert-butyl hydroperoxide) เป็นสารเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดภายในเซลล์หรือสารที่ทำให้เกิดการออกซิเดชัน และอีกการทดลองที่ทำการเติม tBHP เพียงอย่างเดียวพบว่าการทดลองที่ได้รับสารสกัดและ tBHP ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังของหนูชนิด HaCaT แต่ในทางตรงกันข้ามเซลล์ผิวหนังของหนูชนิด HaCaT ที่ได้รับ tBHP เพียงอย่างเดียวทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ในการทดลองนี้จึงบอกได้ว่าสารสกัดพลาโวนอยด์ของราก *S. japonica* มีความสามารถในการลดสารสื่อกลางที่ส่งผลต่อการอักเสบ และการศึกษาของ Kwon และคณะ (2015) การศึกษานี้ประเมินผลการยับยั้งไนตริกออกไซด์สารสกัดส่วนย่อยจากรากของ *S. alopecuroides* เมื่อนำสารสกัดส่วนย่อยที่แยกได้มาทดลองในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 โดยใช้ LPS กระตุ้นการอักเสบพบว่าสารสกัดส่วนย่อยทั้งหมดมีฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ เมื่อนำสารสกัดส่วนย่อยไปวิเคราะห์สารสำคัญ พบว่ามีสารสำคัญคือ Kurarinone มีฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ดีที่สุดมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 7.3 ไมโครโมลาร์ รองลงมาคือ Sophoraflavanone G มีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 10.9 ไมโครโมลาร์ ซึ่งจัดเป็นสารกลุ่มพลาโวนอยด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งต้านการอักเสบได้อย่างดี และสาร Alopecurone B มีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 15.9 ไมโครโมลาร์ ซึ่งความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ของสารสกัดส่วนย่อย

จากรากของ *S. alopecuroides* แสดงฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้ดีกว่า ตัวควบคุมเชิงบวก เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Aminoguanidine มีค่า  $IC_{50}$  สูงถึง 20.6 ไมโครโมลาร์ โดยสารสกัดส่วนย่อยที่พบนั้นสามารถลดการทำงานของ Nuclear factor kappa light chain enhancer (NF- $\kappa$ B) ซึ่งเป็นสารสื่อกลางที่ส่งผลให้เกิดความอักเสบภายในเซลล์ และการศึกษาของ Chae และคณะ (2016) นำสารสกัดจากรากของ *S. tonkinensis* ไปแยกสารบริสุทธิ์ด้วยวิธี Column chromatography จากนั้นนำไปวิเคราะห์สารสำคัญ พบว่าสารสกัดส่วนย่อยมีสาร 6,8-diprenyl-7,4'-dihydroxyflavanone (DFF) จึงนำมาศึกษาต่อพบว่าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 เมื่อใช้ LPS เป็นสารเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ พบว่าสาร 6,8-diprenyl-7,4'-dihydroxyflavanone มีความสามารถในการลดสารสื่อกลาง TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  และ IL-6 ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นการอักเสบ โดย 6,8-diprenyl-7,4'-dihydroxyflavanone มีฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์  $IC_{50}$  เท่ากับ 12.21 ไมโครโมลาร์ และการศึกษาของพีชในวงศ์เดียวกันของ Augustine และคณะ (2024) ได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ภายในหลอดทดลองของสารสกัดจากน้ำของใบ *Xeroderma stuhlmannii* โดยใช้ SNP เป็นสารเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบพบว่า ความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ของตัวควบคุมเชิงบวกและสารสกัดจากน้ำของใบ *X. stuhlmannii* มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 26.55 และ 29.84 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

### 2.2.6 ความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxic activities)

การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เป็นการประเมินความเป็นพิษของเซลล์ที่สามารถบ่งบอกถึงการเปลี่ยนแปลงในกระบวนการเมตาบอลิซึม การรอดชีวิตหรือความสามารถในการเพิ่มจำนวนของเซลล์และการรอดชีวิตจากการกลายพันธุ์ หรือการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์มะเร็ง ซึ่งปัจจุบันมีวิธีการตรวจสอบที่หลากหลายวิธี เช่น การใช้ MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, XTT (sodium 3'-[1-[(phenylamino)carbo-nyl]-3, 4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzene-sulfonic acid hydrate และ WST-1 (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium) เป็นต้น (Berridge และคณะ, 2005)

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT เป็นที่นิยมนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในหลอดโดย MTT เป็นสารสังเคราะห์สีเหลืองประเภทเกลือเตตราโซเลียม (Tetrazolium salt) โดยวิธี MTT จะวัดสภาวะ Reduction environment (Mitochondrial reductase) ของไมโทคอนเดรียภายในเซลล์ ซึ่งจะวัดปริมาณหรือจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่จากปฏิกิริยารีดักชันแอนไอสม์ Succinate dehydrogenase โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะทำปฏิกิริยารีดักชันผ่านเมตาบอลิซึมภายในเซลล์สามารถเปลี่ยนเกลือเตตราโซเลียมให้อยู่ในรูปของผลึกฟอร์มาซาน (Formazan) เมื่อเกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจากสีเหลืองเป็นสีม่วง ซึ่งผลึกฟอร์มาซานสีม่วงไม่สามารถละลายในน้ำ ต้องละลายผลึกด้วย Dimethyl sulfoxide (DMSO) และนำมาวัดการดูดกลืนแสงที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของฟลิกพอร์มาซาน ซึ่งจะแปรผันโดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิต (สุชาติ และคณะ, 2016)

จากการศึกษาของ Mousavia และคณะ (2014) พบว่า สารสกัดจากเมทานอลของราก *S. pachycarpa* ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa และเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 0-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa และเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 84.07 และ 52.33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นนำสารสกัดจากเมทานอลของรากไปแยกส่วนด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน บิวทานอล และน้ำ พบว่าสารสกัดแยกส่วนในชั้นไดคลอโรมีเทนมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa และมะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 14.54 และ 27.09 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสกัดแยกส่วนในชั้นบิวทานอลมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 86.20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 206.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และในสารสกัดแยกส่วนในชั้นน้ำไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด โดยมีค่า  $IC_{50}$  มากกว่า 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการศึกษานี้ของ Yoshiaki และคณะ (2004) นำสารสำคัญของพืชในสกุล *Sophora* คือ Tetrapterol G ความเข้มข้น 15-500 ไมโครโมลาร์ มาทดสอบกับเซลล์ทั้งหมด 5 ชนิด ประกอบด้วยเซลล์มะเร็ง 2 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งช่องปากชนิด HSC-2 และเซลล์มะเร็งต่อมน้ำลายชนิด HSG เซลล์ปกติ 3 ชนิด คือ เซลล์ไฟโบรบลาสต์ชนิด HGF เซลล์โพรงประสาทฟันชนิด HPC และเซลล์เอ็นยัดชนิด HPLF พบว่าสารสกัด Tetrapterol G มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด HSC-2 และเซลล์มะเร็งต่อมน้ำลายชนิด HSG มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 17 และ 26 ไมโครโมลาร์ และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติทั้งเซลล์ไฟโบรบลาสต์ชนิด HGF เซลล์โพรงประสาทฟันชนิด HPC และเซลล์เอ็นยัดชนิด HPLF มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 42, 26 และ 31 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ และการศึกษาของ Song และคณะ (2018) ได้ศึกษา *S. alopecuroides* โดยนำส่วนเมล็ดมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล จากนั้นนำไปสกัดต่อด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท และนำไปแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี สารสกัดส่วนย่อยที่ได้ก็นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค NMR ทำให้ทราบว่ามีการสกัดได้ 8 ชนิด คือ Ethyl 2-(4-hydroxybenzyl) malic acid (1), Methyl eucomate (2), Eucomic acid (3), Piscidic acid (4), Ethyl 2-(4-hydroxybenzyl) tartrate (5), Butein-4'-O- $\beta$ -Dglucopyranoside (6), Iso-Liquiritigenin (7) และ Butein (8) จากนั้นนำสารส่วนย่อยทั้ง 8 ชนิด ดังกล่าวข้างต้นมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2, HepG3B และเซลล์มะเร็งไตชนิด HEK293 และตัวควบคุมเชิงบวก คือ Cisplatin พบว่า สารสกัดส่วนย่อยทั้ง 8 ชนิด มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 และ HepG3B โดยสาร butein (8) มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 และ HepG3B มากที่สุดที่  $19.1 \pm 2.1$  และ  $37.5 \pm 4.3$  ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ และสารสกัดส่วนย่อย 1-7 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 มีค่า  $IC_{50}$  อยู่ในช่วง  $31.7$

$\pm 2.7$  -  $94.5 \pm 4.1$  ไมโครโมลาร์ และสารสกัดส่วนย่อย 1-3 และ 6-7 มีความเป็นพิษต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG3B มีค่า  $IC_{50}$  อยู่ในช่วง  $45.6 \pm 5.3$ -  $86.1 \pm 3.2$  ไมโครโมลาร์ มีเพียงสารสกัดส่วนย่อย 4-5 ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG3B มีค่า  $IC_{50}$  มากกว่า 100 ไมโครโมลาร์ และสารสกัดส่วนย่อยทั้งหมดไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งไตชนิด HEK293 มีค่า  $IC_{50}$  มากกว่า 100 ไมโครโมลาร์ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับตัวควบคุมเชิงบวกที่มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์  $IC_{50}$  เท่ากับ  $13.71 \pm 1.86$  ไมโครโมลาร์ และในการศึกษาพิษในวงศ์เดียวกัน Sowemimo และคณะ (2015) ทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดเมทานอลจากใบ *Enterolobium cyclocarpum* กับเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 และเซลล์ปกติไตลิงชนิด Vero พบว่าสารสกัดเมทานอลจากใบของ *E. cyclocarpum* มีความเป็นพิษต่อเซลล์เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa และเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $2.07 \pm 1.30$  และ  $11.84 \pm 1.18$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติไตลิงมีค่า  $IC_{50}$  มากกว่า 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

### 2.3 การบ่งชี้สายพันธุ์ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode)

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเป็นวิธีการที่นำมาประยุกต์ใช้ในด้านชีววิทยาระดับโมเลกุล เพื่อใช้ในการระบุจำแนก และจัดกลุ่มสิ่งมีชีวิต สิ่งมีชีวิตนั้นจะมีการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์จากการเรียงตัวของเบส 4 ตัว คือ A (Adenine), T (Thymine), C (Cytosine) และ G (Guanine) ที่ผันแปรแตกต่างกันไป โดยสิ่งมีชีวิตเดียวกันจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน หรือ แตกต่างกันอย่างน้อยมากจนไม่นัยสำคัญ โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธีดีเอ็นเอบาร์โค้ดจะนำลำดับนิวคลีโอไทด์จากดีเอ็นเอในบริเวณที่มีการประเมินศักยภาพเพียงพอที่จะใช้แยกหรือระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตได้ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์มีความแตกต่างกันเกิดจากความผันแปรทางพันธุกรรม และมีตำแหน่งอนุรักษ์ (Conserved Region) ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คงเดิมซึ่งไพรเมอร์ (Primer) จะเข้าจับ และเพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือพีซีอาร์ (PCR : Polymerase chain reaction) ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์จากสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษาแล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ไพรเมอร์เดียวกันที่ทราบชื่อวิทยาศาสตร์ของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น (Williams และคณะ, 1990; Wuttipong, 2011)

ปัจจุบันดีเอ็นเอบาร์โค้ดมีการใช้ ลำดับดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะเจาะมาใช้ระบุสิ่งมีชีวิต เช่น ในสัตว์จะนิยมใช้บริเวณยีน Cytochrome c oxidase I (COI) และ Cytochrome c oxidase subunit II (COII) เป็นยีนที่อยู่ในไมโทคอนเดรียที่สามารถบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ดี ในพืชเป็นยีนที่อยู่ในคลอโรพลาสต์นิยมบริเวณยีน Ribulose-bisphosphate carboxylase (*rbcL*), Maturase K (*matK*) และ *trnL-trnF* intergenic spacer เป็นต้น และบริเวณยีน Internal transcribed spacer (ITS) ที่อยู่ในโรโบโซม (Arthofer และคณะ, 2010) ดังการศึกษาของจุฑามาส และคณะ (2020) ได้จัดจำแนกความแตกต่างของกล้วยเหลือ 40 สายพันธุ์ ด้วยบริเวณยีน ITS, *rbcL* และ *rpocL* พบว่ามีเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพียงบริเวณยีน *rbcl* และ *rpocl* ที่สามารถจำแนกถั่วเหลืองที่นำมาศึกษาได้ และบริเวณยีน *ITS* ไม่สามารถแยกสายพันธุ์ของถั่วเหลืองทั้ง 40 สายพันธุ์ออกจากกันได้ บ่งบอกได้ว่ายีนแต่ละบริเวณมีความเหมาะสมต่อการจัดจำแนกแตกต่างกัน และการศึกษาของ Abdelsalam และคณะ (2022) ได้ศึกษาพืชตระกูลถั่ว 15 สายพันธุ์ ด้วยบริเวณยีน *matK* เพื่อจัดจำแนกสายพันธุ์ของถั่ว พบว่าสามารถแบ่งถั่วทั้ง 15 สายพันธุ์ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรก *Enterolobium contortisiliquum*, *Albizia lebbek*, *A. saligna*, *Leucaena leucocephala*, *Dichrostachys cinerea*, *Delonix regia*, *Parkinsonia aculeata*, *Senna surattensis*, *C. fistula*, *C. javanica* และ *Schotia brachypetala* ซึ่งสามารถจำแนกว่าอยู่ในกลุ่มเดียวกัน และอีกกลุ่ม คือ *Erythrina humeana*, *Sophora secundiflora*, *Dalbergia sissoo* และ *Tipuana tip*



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

# วิธีการดำเนินงานวิจัย

### 3.1 ตัวอย่างพืช

ตัวอย่างใบและเมล็ดที่นำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ ใบของต้นสารพัดพิษเก็บในช่วงเดือนกันยายน จากเกาะยาวใหญ่ จังหวัดพังงา นำมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และเก็บในบรรจุภัณฑ์สุญญากาศที่อุณหภูมิห้อง สำหรับเมล็ดของต้นสารพัดพิษในช่วงแรกนำมาจากเกาะยาวใหญ่ จังหวัดพังงา เช่นเดียวกัน แต่ไม่เพียงพอกับการศึกษาวิจัย จึงซื้อจากร้านขายยาพืชสมุนไพร จังหวัดนนทบุรี (ไม่ทราบที่มาของตัวอย่างเมล็ด) นำเมล็ดมาทำความสะอาดจากฝุ่นโดยการเช็ดด้วยผ้าชุบน้ำหมาด ๆ ทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และเก็บในบรรจุภัณฑ์สุญญากาศที่อุณหภูมิห้อง

สำหรับตัวอย่างใบที่นำมาบ่งชี้สายพันธุ์ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด ได้จากการสุ่มเก็บตัวอย่างใบของต้นสารพัดพิษ จากเกาะยาวน้อยจำนวน 2 ตัวอย่าง และเกาะยาวใหญ่ จำนวน 2 ตัวอย่าง จังหวัดพังงา โดยเก็บตัวอย่างในช่วงเดือนกันยายน และเก็บในถุงพลาสติกซิปล็อคที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.2 วัสดุอุปกรณ์

- 3.2.1 กรวยกรองบุชเนอร์ (Buchner funnel)
- 3.2.2 กระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman No.1)
- 3.2.3 กระดาษทิชชู (Tissue)
- 3.2.4 กระบอกลวด (Cylinder)
- 3.2.5 ขวดโหลแก้ว (Glass jar) และขวดสีชา (Amber bottle)
- 3.2.6 ขวดแก้วดูแรน (Duran Bottle)
- 3.2.7 เข็มเย็บเย็บปลายกลม (Loop)
- 3.2.8 ขวดยาหม่อง (Vial bottle)
- 3.2.9 ขวดระเหย (Rotary Flask)
- 3.2.10 ขวดสำหรับเก็บของเหลวที่กลั่นได้ (Receiving flask)
- 3.2.11 คิวเวตควอตซ์ (Quartz Semi-Cuvette)
- 3.2.12 คอมพิวเตอร์ (Computer)
- 3.2.13 เครื่องกรองสุญญากาศ (Vacuum pump)
- 3.2.14 เครื่องชั่งสารทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Balance)
- 3.2.15 เครื่องทำความร้อน (Heat block)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.2.16 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Spin-down centrifuge)
- 3.2.17 เครื่องเขย่าสาร (Vortex)
- 3.2.18 เครื่องระเหยสูญญากาศ (Rotary evaporator)
- 3.2.19 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)
- 3.2.20 เครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท (Microplate Reader)
- 3.2.21 เพลทพลาสติก (Petri dish)
- 3.2.22 ชุดไมโครปิเปต (Micropipettes)
- 3.2.23 ช้อนตักสาร (Spatula)
- 3.2.24 ซิลิกาเจล (Silica gel)
- 3.2.25 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol lamp)
- 3.2.26 ตู้ดูดควัน (Fume hood)
- 3.2.27 ตู้บ่ม (Incubator)
- 3.2.28 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)
- 3.2.29 ตู้เย็น (Refrigerator)
- 3.2.30 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
- 3.2.31 โถดูดความชื้น (Desiccator)
- 3.2.32 ทิป (Tip)
- 3.2.33 ที่ใส่หลอดทดลอง (Rack) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 3.2.34 บีกเกอร์ (Beaker)
- 3.2.35 ปากคีบ (Forceps)
- 3.2.36 ผ้าขาวบาง (Tulle cloth)
- 3.2.37 ฟลasks (Flask) ขนาด 125 มิลลิลิตร
- 3.2.38 ไมโครเวฟ (Microwave Oven)
- 3.2.39 ไมโครไทเทอร์เพลท (96-Well plate)
- 3.2.40 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (Autoclave)
- 3.2.41 หลอดทดลอง (Eppendorf tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

### 3.3 สารเคมี

#### 3.3.1 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้น

- 3.3.1.1 Hydrochloric acid
- 3.3.1.2 Dragendroff's reagent
- 3.3.1.3 Mayer's reagent

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.3.1.4 Wagner's reagent
- 3.3.1.5 Colchicine
- 3.3.1.6 Sodium chloride
- 3.3.1.7 Ferric chloride
- 3.3.1.8 Gelatin
- 3.3.1.9 Tannin
- 3.3.1.10 Phosphate buffer saline (PBS)
- 3.3.1.11 Ascein
- 3.3.1.12 Ethanol
- 3.3.1.13 Warfarin

### 3.3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

- 3.3.2.1 Gallic acid
- 3.3.2.2 Sodium carbonate
- 3.3.2.3 Folin Ciocalteu reagent
- 3.3.2.4 Methanol

### 3.3.3 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

- 3.3.3.1 2,2'-azino-bis [3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid] (ABTS)
- 3.3.3.2 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
- 3.3.3.3 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ)
- 3.3.3.4 Acetic acid
- 3.3.3.5 Ferric chloride
- 3.3.3.6 Potassium persulfate
- 3.3.3.7 Hydrochloric acid
- 3.3.3.8 Methanol
- 3.3.3.9 Trolox
- 3.3.3.10 Ascorbic acid
- 3.3.3.11 Sodium acetate
- 3.3.3.12 2,2'-azino-bis [3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid] (ABTS)

### 3.3.4 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

- 3.3.4.1 Nutrient Broth (NB)
- 3.3.4.2 Brain Heart Infusion (BHI)
- 3.3.4.3 Agar
- 3.3.4.4 Mueller Hinton Broth (MHB)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.4.5 Methanol

3.3.4.6 Gentamicin

### 3.3.5 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

3.3.5.1 Ascorbic acid

3.3.5.2 Tyrosinase enzyme

3.3.5.3 Phosphate buffer

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

### 3.3.6 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์

3.3.6.1 Ascorbic acid

3.3.6.2 Griess reagent

3.3.6.3 Sodium nitroprusside (SNP)

3.3.6.4 Phosphate buffer saline (PBS)

### 3.3.7 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW

264.7

3.3.7.1 Fetal bovine serum (FBS)

3.3.7.2 Phosphate buffer saline (PBS)

3.3.7.3 Roswell park memorial institute 1640 medium (RPMI 1640)

3.3.7.4 Trypan blue

3.3.7.5 Griess reagent

3.3.7.6 Lipopolysaccharide (LPS)

3.3.7.7 Indomethacin

### 3.3.8 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์

3.3.8.1 [3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide]  
(MTT)

3.3.8.2 Mitomycin C

3.3.8.3 Trypsin

3.3.8.4 Trypan blue

3.3.8.5 Dimethyl sulfoxide (DMSO)

3.3.8.6 Roswell Park memorial institute 1640 medium (RPMI 1640)

3.3.8.7 Fetal bovine serum (FBS)

3.3.8.8 Phosphate buffer saline (PBS)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.3.9 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

- 3.3.9.1 Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)
- 3.3.9.2 Chloroform
- 3.3.9.3 Ethanol
- 3.3.9.4 Liquid nitrogen
- 3.3.9.5 Isopropanol
- 3.3.9.6 Isoamyl alcohol
- 3.3.9.7  $\beta$ -mercaptoethanol
- 3.3.9.8 RnaseA

### 3.3.10 สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (Polymerase chain reaction : PCR)

- 3.3.10.1 Deionize water
- 3.3.10.2 Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs)
- 3.3.10.3 Magnesium chloride;  $MgCl_2$
- 3.3.10.4 10X standard *Taq* reaction buffer
- 3.3.10.5 *Taq* DNA Polymerase
- 3.3.10.6 Primer (ตารางที่ 3.2)

### 3.3.11 สารเคมีในเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

- 3.3.11.1 1kb DNA ladder
- 3.3.11.2 100 bp DNA ladder
- 3.3.11.3 Ethidium bromide
- 3.3.11.4 6X loading dye
- 3.3.11.5 0.5X และ 1X TBE buffer
- 3.3.11.6 Agarose

## 3.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

### 3.4.1 เชื้อแบคทีเรีย

ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

- 3.4.1.1 *Bacillus subtilis* TISTR 1248
- 3.4.1.2 *Bacillus cereus* DMST 5040
- 3.4.1.3 *Kocuria rhizophila* ATCC 9341
- 3.4.1.4 *Staphylococcus aureus* TISTR 1466

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.1.5 *Staphylococcus epidermidis* TISTR 2141

3.4.1.6 *Pseudomonas aeruginosa* 2370

3.4.1.7 *Escherichia coli* TISTR 746

3.4.1.8 *Propionibacterium acnes* DMST 14916 ได้รับการอนุเคราะห์จากสถาบันพัฒนาอุตสาหกรรมสิ่งทอ

### 3.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

#### 3.5.1 ชนิดเซลล์

ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

3.5.1.1 เซลล์ไตของลิงชนิด Vero (African green monkey kidney cell line)

3.5.1.2 เซลล์มะเร็งผิวหนังชนิด HatCaT (Human keratinocyte cell line)

3.5.1.3 เซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ชนิด MCF-7 (Human breast cancer cell line)

3.5.1.4 เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT29 (Human colorectal adenocarcinoma cell line)

3.5.1.5 เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 (Human hepatoma cell line)

3.5.1.6 เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa (HeLa cell line)

3.5.1.7 เซลล์ผิวหนังของหนูชนิด L929 (Mouse fibroblast cell line)

3.5.1.8 เซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 (Murine macrophage cell line) ได้รับการอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

### 3.6 วิธีดำเนินการทดลอง

#### 3.6.1 การสกัดสารและแยกสาร

##### 3.6.1.1 การสกัดสารด้วยเมทานอล

การสกัดสารด้วยเมทานอลของใบของสารพัดพิษตัดแปลงมาจากจุฬารัตน์ (2563) โดยนำใบมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส บดให้พอยาบ โดยการนำไปผ่านการบดหยาบ 30 กรัม ห่อด้วยผ้าขาวบาง นำมาแช่ด้วยเมทานอล 300 มิลลิลิตร และเมล็ดของต้นสารพัดพิษนำมาทำความสะอาดเพื่อทำความสะอาดจากฝุ่นโดยการเช็ดด้วยผ้าชุบน้ำหมาด ๆ จากนั้นนำบดให้พอยาบ แล้วห่อด้วยผ้าขาวบางปริมาณ 30 กรัม แช่ในเมทานอล 300 มิลลิลิตร โดยทั้งตัวอย่างเมล็ดและใบที่ห่อผ้าขาวบางแล้วนำไปหมักด้วยเมทานอลที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เมื่อได้น้ำหมักมาแล้วนำไปกรอง และเอาไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) และทำให้แห้งด้วยเครื่องอบแห้งภายใต้สภาวะสุญญากาศ (Vacuum drying oven) จะได้สารสกัดเอกสารนี้เป็นเอกสารที่ส่งมอบไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หยาบเมทานอลของใบสารพัดพิษ และสารสกัดเมทานอลของเมล็ดสารพัดพิษ จากนั้นนำสารสกัดทั้งหมดมาคำนวณปริมาณที่ได้เป็นร้อยละผลได้ (% Yield) ดังสมการที่ 1

### สมการที่ 1

$$\text{ร้อยละผลได้ (\%)} = \left( \frac{\text{น้ำหนักของสารสกัด}}{\text{น้ำหนักของตัวอย่างพืชก่อนหมัก}} \right) \times 100$$

#### 3.6.1.2 การกำจัดคลอโรฟิลล์จากสารสกัดหยาบเมทานอลของใบสารพัดพิษ

เนื่องจากสารสกัดเมทานอลของใบสารพัดพิษมีสีเขียวเข้มจึงนำมากำจัดคลอโรฟิลล์ด้วยวิธี Liquid-liquid extraction ดัดแปลงวิธีการจาก Phaisan และคณะ (2020) โดยนำสารสกัดเมทานอลจากใบสารพัดพิษที่ละลายด้วยน้ำกลั่นผสมกับน้ำมันปาล์มอัตราส่วน 1: 1 (w/v) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ส่วนใสด้านบนจะถูกเก็บไว้ และนำไปทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ และนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องอบแห้งภายใต้สภาวะสุญญากาศได้เป็นสารสกัดของใบสารพัดพิษที่มีการกำจัดคลอโรฟิลล์

นำสารสกัดเมทานอลจากใบและเมล็ดจากต้นสารพัดพิษมาละลายน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และกวนด้วยเครื่องกวนสารจนกระทั่งสารสกัดละลายจนหมด จากนั้นเติมตัวทำละลายลงไปอัตราส่วน 1: 1 โดยมีตัวทำละลายทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท

บิวทานอล และน้ำ ตามลำดับ จากซ้ายไปขวา เมื่อสารสกัดผสมกับตัวทำละลายเป็นเนื้อเดียวกันจึงนำไปใส่ในกรวยแยก เขย่ากรวยในแนวนอน รอสารละลายแยกเป็น 2 ชั้น แล้วไซสารออกจากชั้นที่เป็นตัวทำละลายซึ่งตัวทำละลายจะอยู่ด้านล่าง ยกเว้นชั้นไดคลอโรมีเทนที่ตัวทำละลายจะอยู่ด้านบน จากนั้นทำการดึงน้ำออกจากสารละลายโดยการเติมสารละลายน้ำเกลืออิ่มตัวอัตราส่วน 1: 1 ทำทุกชั้นตัวทำละลายยกเว้นชั้นน้ำ หลังจากนั้นนำไปใส่ลงในกรวยแยก เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ดังรูปที่ 3.1 ไซเอาเฉพาะสารละลายชั้นตัวทำละลายออกมาแล้วเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) นำมารอง แล้วนำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ และนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องอบแห้งภายใต้สภาวะสุญญากาศแบบหมุนโดยสารสกัดที่ได้จากขั้นตอนนี้จะเรียกว่าสารสกัดแยกส่วน



รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการสกัดสารด้วยเทคนิค Liquid-liquid extraction ของสารสกัดจากใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.6.1.4 การแยกสารด้วยเทคนิค Column chromatography

การแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Column chromatography จะคัดเลือกสารสกัดแยกส่วนที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีมาแยกให้เป็นสารสกัดส่วนย่อย (Fraction) โดยจะต้องหา ระบบตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ซึ่งจะต้องเป็นตัวทำละลายที่สามารถแยกสารออกจากกันได้อย่างชัดเจน และสามารถนำสารสกัดที่หยดลงบนแผ่น Thin layer chromatography (TLC) แบบบาง เคลื่อนที่ไปที่ Front line ได้หมด ซึ่งหลังจากทราบระบบตัวทำละลายแล้ว นำมาชะสารสกัดที่เติมลงไปบนคอลัมน์ หรือเฟสคงที่ (Stationary phase)

การตรวจสอบสารที่ปรากฏบนแผ่น TLC จะนำตัวอย่างแต่ละหลอดที่ได้จากการแยกสารด้วยเทคนิค Column chromatography นำมาหยดลงบนแผ่น TLC บริเวณเส้น Base line รอจนแห้ง และใส่ลงไปใน chamber ที่มีเฟสเคลื่อนที่ ในการแยกสารด้วยเทคนิค Column chromatography เฟสเคลื่อนที่จะนำพาสารขึ้นไป Front line รอให้แห้งแล้วนำมาตรวจผล ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร แล้วนำมาสเปรย์ด้วย Anisaldehyde และให้ความร้อนด้วย hot plate จะเห็นจุดปรากฏตามแนวบนแผ่น TLC

เมื่อทราบระบบตัวทำละลายที่สามารถแยกสารออกจากกันได้อย่างเหมาะสมแล้วจะนำระบบตัวทำละลายมาผสมกับซิลิกาเจลซึ่งเป็นเฟสคงที่ในการศึกษาครั้งนี้ โดยกวนแห้งแก้วคนสารไปในทิศทางเดียวกันเป็นเวลาประมาณ 20-30 นาที จากนั้นเทลงคอลัมน์แก้วที่ทำการอุดสำลีเป็นชั้นบาง ๆ ที่ปลายคอลัมน์เพื่อป้องกันการไหลออกของซิลิกาขณะเทซิลิกาต้องเทอย่างระมัดระวังเพื่อไม่ให้เกิดฟองอากาศในแท่งคอลัมน์เพราะฟองอากาศทำให้ซิลิกาเจลในคอลัมน์แตก (Crack) ส่งผลให้การแยกสารในระบบไม่บริสุทธิ์ และใช้ตัวทำละลายอย่างช้า ๆ พร้อมกับการเทระบบตัวทำละลายลงไปด้วย เพื่อสังเกตการไหลออกของตัวทำละลายว่าเร็วเกินหรือช้าไป โดยจะต้องสังเกตการไหลของระบบของคอลัมน์จากการหยด หากหยดแรกไหล หยดที่สองจะต้องไหลตามมาทันที และขณะเทซิลิกาจะต้องเคาะคอลัมน์เพื่อไล่ฟองอากาศที่เกิดขึ้น รวมถึงเป็นการช่วยทำให้ผิวหน้าซิลิกาเรียบ จากนั้นเติมสารสกัดแยกส่วนที่ละลายด้วยระบบตัวทำละลายเดียวกับคอลัมน์ และเปิดก๊อกเพื่อเก็บสารสกัดส่วนย่อยระหว่างเก็บตัวอย่างต้องเติมระบบตัวทำละลายตลอดการทดลอง เพื่อไม่ให้คอลัมน์แห้ง ก่อนนำไปรวมหลอดสารสกัดส่วนย่อยที่ได้มาจะต้องนำไปตรวจสอบความแตกต่างของสารด้วยการจำแนกกลุ่มของสารด้วยแผ่น TLC เพื่อสังเกตและตรวจสอบความแตกต่างที่แสดงบนแผ่น TLC จากนั้นเก็บรวบรวมสารที่แสดงแถบแบนเดียวกันไว้เป็นสารสกัดส่วนย่อยเดียวกัน เรียกว่า สารสกัดส่วนย่อย

## 3.6.2 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด

### 3.6.2.1 การตรวจสอบพิษเฉียบพลัน

การตรวจสอบสารพิษเฉียบพลันเบื้องต้นจะทำการทดสอบกับสารสกัดเมทานอล จากใบ เมล็ด และใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ของต้นสารพัดพิษเท่านั้น ตามวิธีการของจุฑาภรณ์ (2563) เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 1) การทดสอบอัลคาลอยด์

ชั่งสารสกัด 0.3 กรัม ละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วแบ่งสารละลายเป็น 3 หลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตร นำมาทดสอบกับสารทดสอบ 3 ชนิด คือ Dragendorff's reagent, Mayer's reagent และ Wagner's reagent โดยหยดน้ำยาทดสอบละ 2-3 หยด สังเกตการเกิดตะกอนของสารละลาย หากสารละลายเกิดตะกอน แสดงว่ามีอัลคาลอยด์ โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโคลชิซิน (วิธีเตรียมนำโคลชิซินที่เป็นเม็ดบดให้ละเอียดเป็นผงมา 0.3 กรัม ละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำมาแบ่งทดสอบกับสารทดสอบเช่นเดียวกันกับการทดสอบสารสกัด)

### 2) การทดสอบแทนนิน

ชั่งสารสกัด 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แล้วนำมาหยดสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ 3-4 หยด จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วแบ่งสารละลายเป็น 3 หลอดทดลอง หลอดละ 3 มิลลิลิตร นำมาทดสอบกับ Gelatin solution, Gelatin salt solution และสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ โดยหยดน้ำยาทดสอบ 2-3 หยด สังเกตการเกิดตะกอนของสารละลาย เมื่อหยด Gelatin solution และ Gelatin salt solution จะเกิดตะกอนสีขาว และเมื่อหยดสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ จะเกิดตะกอนสีน้ำเงินเขียว แสดงว่ามีแทนนิน และ สารประกอบฟีนอลิก แต่ถ้าหยด Gelatin solution และ Gelatin salt solution แล้วไม่เกิดตะกอนสีขาว และหยดสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ ( $\text{FeCl}_3$ ) 1 เปอร์เซ็นต์ เกิดเฉพาะตะกอนสีน้ำเงินเขียว แสดงว่าไม่มีแทนนิน แต่มีสารประกอบฟีนอลิก โดยทำการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแทนนิก (วิธีเตรียมกรดแทนนิกความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำกรดแทนนิก 0.1 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร และนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หยดสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ 3-4 หยด จากนั้นนำมาแบ่งทดสอบกับสารทดสอบเช่นเดียวกันกับการทดสอบสารสกัด

### 3) การทดสอบซาโฟนิน

ทดสอบการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยนำเซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์ ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมกับสารสกัดที่เตรียมไว้ 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ถ้าเกิดสีแดงของฮีโมโกลบินในสารละลายส่วนใส แสดงว่าเกิดตะกอนของเม็ดเลือดแดง โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแอสซิน (Aescin) (วิธีเตรียมแอสซินความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายใน PBS 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาทดสอบการแตกของเม็ดเลือดแดงเช่นเดียวกันกับการทดสอบสารสกัด)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4) การทดสอบคูมาริน

ซึ่งสารสกัด 0.1 กรัม ละลายด้วยเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตรนำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้นนำของเหลวที่ได้จากการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 6 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร สังเกตการเกิดสีเหลืองเข้ม หากสารละลายมีสีเหลืองเข้มแสดงว่ามีคูมาริน โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานวาร์ฟาริน (Warfarin) (วิธีเตรียมวาร์ฟาริน 0.1 กรัม ละลายด้วยเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาทดสอบเช่นเดียวกับสารสกัด)

##### 3.6.2.2 การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ดัดแปลงวิธีการจากงานวิจัยของ Natungnuy และ Poaim (2018) โดยละลายสารสกัดด้วยน้ำกลั่น ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เติมสารสกัดปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงใน 96 well-plate และเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดเป็นเวลา 6 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 7.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ในการทดลองนี้ใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐานโดยแสดงผลในหน่วย mg Gallic acid equivalent (mg GAE/g extract)

##### 3.6.2.3 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

###### 1) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ดัดแปลงตามวิธีของ Natungnuy และ Poaim (2018) นำสารสกัดมาละลายด้วยเมทานอลให้ได้ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เติมสารสกัดปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน 96 well-plate บ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ตัวทำละลายเมทานอลผสมกับ DPPH เป็นชุดควบคุม และใช้ทร็อกซ์เป็นสารมาตรฐาน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ดังสมการที่ 2 รวมถึงวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ร้อยละ 50 (50 % Inhibitory concentration : IC<sub>50</sub>) โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 8 และคำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดเทียบกับสารมาตรฐานทร็อกซ์ (Trolox equivalent antioxidant capacity) แสดงผลในหน่วย mg Trolox equivalent (mg TE/g extract)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สมการที่ 2

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

โดยที่  $A_{\text{control}}$  = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม (MeOH + DPPH)

$A_{\text{sample}}$  = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง (สารตัวอย่าง + DPPH)

### 2) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย ABTS

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2'-azino-bis [3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid] (ABTS) ดัดแปลงตามวิธีของ Natungny และ Poeaim (2018) โดยใช้ ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ละลายในโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต 2.45 มิลลิโมลาร์ จะได้เป็นสารละลายที่มีสีฟ้าเขียว  $\text{ABTS}^{+}$  ก่อนการใช้งานนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร นำมาเจือจางด้วยเมทานอลอัตราส่วน 1: 1 (v/v) ให้มีค่าการดูดกลืนแสงในช่วง  $0.7 \pm 0.02$  (วิธีการเตรียมดังภาคผนวก ก) จากนั้นเตรียมสารสกัดมาละลายด้วยเมทานอลให้ได้ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารสกัดมาเติมลง 96 well-plate ปริมาตร 20 ไมโครลิตรและเติมสารละลาย  $\text{ABTS}^{+}$  ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ปั่นในที่มืดเป็นเวลา 6 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยใช้ตัวทำละลายเมทานอลผสมกับสารละลาย  $\text{ABTS}^{+}$  เป็นชุดควบคุม และใช้โทรล็อกซ์เป็นสารมาตรฐาน นำค่าดูดกลืนแสงมาวิเคราะห์หาร้อยละในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ดังสมการที่ 3 รวมถึงการวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารสกัดในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ร้อยละ 50 (50 % Inhibitory concentration :  $\text{IC}_{50}$ ) โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 8 และคำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดเทียบกับสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ (Trolox equivalent antioxidant capacity) แสดงผลในหน่วย mg Trolox equivalent (mg TE/g extract)

## สมการที่ 3

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

โดยที่  $A_{\text{control}}$  = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม (MeOH +  $\text{ABTS}^{+}$ )

$A_{\text{sample}}$  = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง (สารตัวอย่าง +  $\text{ABTS}^{+}$ )

### 3) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (Ferric reducing antioxidant power) ดัดแปลงตามวิธีของ Natungny และ Poeaim (2018) เตรียมสารละลาย FRAP reagent จากการผสมสารละลาย Acetate buffer pH 3.6 300 มิลลิโมลาร์ : TPTZ 10 มิลลิโมลาร์ ในกรดไฮโดรคลอริก 40 มิลลิโมลาร์ : สารละลายเฟอริกคลอไรด์ 20 มิลลิโมลาร์ โดยเตรียมในอัตราส่วน 10: 1: 1 ในการทดสอบเตรียมตัวอย่างสารสกัดที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เติมตัวอย่างสารสกัดลงใน 96 well-plate ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย FRAP reagent

ปริมาตร 180 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นเป็นเวลา 6 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว

เอกสารถือเป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คลื่น 593 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่นผสมกับสารละลาย FRAP จากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงมาคำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP และเพื่อเทียบความสามารถในการรีดิวซ์  $Fe^{3+}$ - TPTZ กับสารมาตรฐานแอสคอร์บิก โดยแสดงผลในหน่วย mg Ascorbic acid equivalent (mg AAE /g extract)

### 3.6.2.4 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Paper disc diffusion ดัดแปลงจาก CLCS (2012) ทดสอบโดยใช้แบคทีเรียทั้ง 8 สายพันธุ์ *Bacillus subtilis* TISTR 1248, *Bacillus cereus* DMST 5040, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* TISTR 1466, *Staphylococcus epidermidis* TISTR 2141, *Propionibacterium acnes* DMST 14916, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 2370 และ *Escherichia coli* TISTR 746 นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว Mueller- Hinton Broth (MHB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *P. acnes* จะเลี้ยงในอาหารเหลว Brain Heart Infusion (BHI) จากนั้นนำเชื้อที่ผ่านการบ่มแล้วไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้อยู่ในช่วง 0.08 - 0.13 นำมา swap ลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง MHA สำหรับเชื้อ *P. acnes* จะ Swap ลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง BHI จากนั้นวางแผ่นดิสก์ที่มีสารสกัดความเข้มข้น 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อดิสก์ ลงบนผิวหน้าอาหารที่มีการ Swap เชื้อแล้ว โดยแผ่นดิสก์ ขนาด 6 มิลลิเมตร เตรียมจากกระดาษกรองเบอร์ 1 ใช้ตัวควบคุมเชิงบวกคือ เจนตามัยซิน (Gentamicin) 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ และเมทานอลเป็นตัวควบคุมเชิงลบ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการบันทึกข้อมูลเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น (Inhibition zone) รอบแผ่นดิสก์ด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์เป็นหน่วยมิลลิเมตร

### 3.6.2.5 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopa-chrome ดัดแปลงมาจาก Phonmakham และคณะ (2018) โดยจะใส่สารละลายที่ทำการทดสอบดังตารางที่ 3.1 แสดงปริมาณของสารผสมสำหรับทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ลงใน 96-well plate ใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เติมน้ำฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.8 จากนั้นเติมเอนไซม์ไทโรซิเนส 279 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และเติม L-dopa 2.5 มิลลิโมลาร์ ลงไปจึงจะทำการบ่มต่อในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที โดยใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐาน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร แล้วนำไปวิเคราะห์หาค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (% Tyrosinase inhibition) ดังสมการที่ 4 รวมถึงการวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารสกัดในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสร้อยละ 50 (50 % Inhibitory concentration : IC<sub>50</sub>) โดยใช้โปรแกรม

GraphPad Prism 8.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 องค์ประกอบและปริมาตรของสารละลายที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้ง  
เอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopa-chrome

ชุดควบคุม/ สารสกัด	ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (ul)	เอนไซม์ไทโรซิเนส (ul)	ตัวอย่าง สารสกัด (ul)	L-dopa (ul)
(A) Control	140	20	-	40
(B) Blank control	160	-	-	40
(C) Sample	80	20	60	40
(D) Blank sample	100	-	60	40

หมายเหตุ : เครื่องหมาย - ไม่เติมสารละลายลงในหลุม 96-well plate

#### สมการที่ 4

นำค่าที่ได้มาคำนวณหาร้อยละของฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส  
จากสูตร

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

โดย A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ Control

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ Blank control

C คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ Sample

D คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ Blank sample

#### 3.6.2.6 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ในหลอดทดลอง

วิธีการประเมินยับยั้งไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide scavenging assay : NOA) ตามวิธีของจุฑาภรณ์ (2563) เตรียมสารละลาย Sodium nitroprusside (SNP) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ละลายด้วย PBS ทดสอบกับสารสกัดความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชุดควบคุม (A) จะเติม PBS 50 ไมโครลิตร ผสมกับ Sodium nitroprusside 50 ไมโครลิตร ชุดทดลอง (B) จะเติมสารสกัด 50 ไมโครลิตร ใน 96-well plate เติม Sodium nitroprusside 50 ไมโครลิตร และชุด Blank sample (C) จะเติมสารสกัด 50 ไมโครลิตร และ PBS 50 ไมโครลิตร จากนั้นทำการบ่มเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และเติม Griess reagent ทุกชุด การทดลองหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่ม 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 546 นาโนเมตร โดยใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐาน และนำมาคำนวณค่าร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์ (% Nitric oxide inhibition) ดังสมการที่ 5 รวมถึงการวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารสกัดใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสร้อยละ 50 (50 % Inhibitory concentration : IC<sub>50</sub>) โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 8

### สมการที่ 5

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

โดยที่ A คือ Control ค่าการดูดกลืนแสงของ Sodium nitroprusside และ PBS

B คือ Sample ค่าการดูดกลืนแสงของ Sodium nitroprusside และสารสกัด

C คือ Blank sample ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด และ PBS

#### 3.6.2.7 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7

วิเคราะห์ความเข้มข้นของไนโตรที่โดยปฏิกิริยา Griess reagent ตามวิธีของ จุฑาภรณ์ (2563) ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 วัดจากความเข้มข้นของไนโตรที่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งจะบอกปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์ เนื่องจากไนโตรที่เป็นผลที่ได้จากการออกซิเดชันไนตริกออกไซด์ โดยเฉพาะเลี้ยงเซลล์ที่ความเข้มข้น  $1.5 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงใน 96-well plate ด้วยอาหาร RPMI 1640 ที่ประกอบด้วย FBS 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม และนำไปบ่มที่ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อบ่มครบตามกำหนดแล้วเติมส่วนผสมของอาหารเลี้ยงเซลล์กับสารสกัด 100 ไมโครลิตร โดยละลายสารสกัดด้วย DMSO ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยความเข้มข้นของ DMSO ต้องไม่เกิน 2 เปอร์เซ็นต์ เพื่อป้องกันความเป็นพิษต่อเซลล์ และเติมส่วนผสมของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี Lipopolysaccharide (LPS) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม โดยจะเติม LPS ลงในหลุมของชุดควบคุม (A) ชุดทดลอง (B) และชุด Blank (C) โดยชุดควบคุมเชิงบวกคือ indomethacin จะไม่เติม LPS จากนั้น นำไปบ่มที่ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อบ่มครบ 24 ชั่วโมงแล้ว จะทำการวัดปริมาณไนตริกออกไซด์โดยจะดูดส่วนใสของสารสกัดที่อยู่ใน 96-well plate ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเติม Griess reagent 100 ไมโครลิตร อัตราส่วน 1 : 1 ลงใน 96-well plate และบ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 546 นาโนเมตร เพื่อนำมาคำนวณร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์ (% Nitric oxide inhibition) ดังสมการที่ 6 รวมถึงการวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารสกัดในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ ร้อยละ 50 (50 % Inhibitory concentration : IC<sub>50</sub>) โดยใช้โปรแกรม GraphPad prism 8.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สมการที่ 6

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

โดยที่ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดลอง

C คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ Blank

### 3.6.2.8 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์จะใช้วิธี MTT ตามวิธีของ Natungnyu และ Poeaim (2018) นำเซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร RPMI 1640 ที่ประกอบด้วย FBS 5 เปอร์เซ็นต์ โดยเจือจางความเข้มข้นของเซลล์ให้ได้  $1.5 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงใน 96-well plate ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นนำไปบ่มที่ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง การเตรียม Stock สารสกัดที่ใช้ในการทดสอบ สารสกัดความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาละลายด้วย DMSO ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันจากนั้นเติม PBS ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จะได้ปริมาตรของสารสกัด 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปกรองด้วยแผ่นกรองขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร หากจะนำสารสกัดมาทดสอบจะต้องนำ Stock ที่เตรียมตั้งข้างต้นมาเจือจางด้วยอาหาร RPMI 1640 ที่ประกอบด้วย FBS 5 เปอร์เซ็นต์ ตามความเข้มข้นที่ต้องการจะทดสอบ เมื่อบ่มเซลล์ครบ 24 ชั่วโมง จะทำการดูดอาหารออกจนหมด จากนั้นชุดควบคุมจะเติมเพียงอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่ประกอบด้วย FBS 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (A) ชุดควบคุมเชิงบวกจะเติมยาต้านมะเร็งไมโทมายซิน (Mitomycin) และชุดควบคุมเชิงลบจะเติม DMSO ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และในชุดทดลอง (B) เติมสารสกัดที่เจือจางตามความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมง จึงเติมสารละลาย MTT ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงไปในทุก ๆ หลุม จากนั้นนำไปบ่มเป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดสารละลายในหลุมออก และเติม DMSO 100 ไมโครลิตร เพื่อละลายผลึกฟอร์มาซาน จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร เพื่อคำนวณความเป็นพิษต่อเซลล์ (% Cytotoxicity) ดังสมการที่ 7 หรือนำมาวิเคราะห์ค่าร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ (% Cell viability) โดยใช้คำนวณร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ ดังสมการที่ 8 และสามารถนำมาคำนวณหาความเข้มข้นของสารสกัดที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ร้อยละ 50 (Cytotoxicity concentration : IC<sub>50</sub>) โดยใช้โปรแกรม GraphPad prism 8.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### สมการที่ 7

% ความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity) =  $[(A-B)/A] \times 100$

### สมการที่ 8

% การรอดชีวิตของเซลล์ (Cell viability) =  $[B/A] \times 100$

โดยที่ A control คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดการทดลอง

ซึ่ง ค่า A และ B จะต้องหักลบจากค่าการดูดกลืนแสงของ Blank จากนั้นจึงนำไปคำนวณในสมการข้างต้น

#### 3.6.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

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

#### 3.6.4 การหาปริมาณสารสำคัญด้วยเทคนิค GC-MS

การหาปริมาณสารสำคัญด้วยเทคนิค GC-MS เป็นเทคนิคที่รวมเทคโนโลยีของแก๊สโครมาโตกราฟีเข้ากับแมสโตรเมตรี ในการวิเคราะห์สารในครั้งนี้จะทำการละลายสารสกัดด้วยเมทานอลด้วยเครื่องมือ GC : Agilent technologies รุ่น 6890 NMS : Agilent technologies รุ่น 5973 inert ของศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

### 3.7 การบ่งชี้สายพันธุ์ของต้นสารพัดพิษด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode)

#### 3.7.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดด้วยวิธี CTAB ดัดแปลงจากวิธี Doyle และ Doyle (1987) นำตัวอย่างใบที่สุ่มจากเกาะยวน้อยและเกาะยวใหญ่ จังหวัดพังงา โดยระบุรหัสตัวอย่างด้วยตัวอักษร STL ตัวอักษร S คือ Sophora T คือ Tomentosa L คือ Leave จากนั้นตามด้วยตัวเลขของตัวอย่าง ซึ่งในการศึกษานี้สุ่มตัวอย่างจากการสำรวจที่เกาะยวน้อย 2 ตัวอย่าง ได้แก่ STL014 และ STL15 และเกาะยวใหญ่ 2 ตัวอย่าง ได้แก่ STL01 และ STL036 รวมทั้งหมด 4 ตัวอย่าง โดยนำใบของตัวอย่างมาล้างทำความสะอาด ซับให้แห้งด้วยทิชชูที่ปลอดเชื้อ ตัดให้มีขนาดเล็ก เนื่องจากตัวอย่างใบจากเกาะยวน้อยและเกาะยวใหญ่มีขนปกคลุมทั่วบริเวณใบจึงนำมาแช่ด้วย 2X CTAB ให้ท่วมตัวอย่างเป็นเวลา

ข้ามคืน จากนั้นนำตัวอย่างที่เตรียมไว้ตั้งข้างต้นมาใส่โกรงที่แช่เย็น และนำไปบดกับไนโตรเจนเหลว จนละเอียดเป็นผง จากนั้นเติม 2X CTAB ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ลงไปในโกรงบดจนเป็นเนื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สว่นไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เดียวกัน แล้วนำไปใส่ในหลอดทดลองขนาด 2 มิลลิลิตร เติม  $\beta$ -mercaptoethanol ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ Proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง กลับหลอดไปมาเบา ๆ ทุก 15 นาที หลังจากครบเวลาแล้วจึงเติม Chloroform: Isoamylalcohol (24: 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร และกลับหลอดไปมาเบา ๆ นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดทดลองใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเติม RNase A ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร บ่มในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา เติม 10 เปอร์เซ็นต์ CTAB ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วจึงเติม Chloroform: Isoamyl alcohol (24: 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบา ๆ ปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดทดลองใหม่ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Isopropanol ที่เย็น อัตราส่วน 1: 1 (v/v) ของส่วนใสที่ดูดได้ กลับหลอดไปมา และเก็บที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ที่สารละลายส่วนใสด้านบน จะเห็นตะกอนที่ก้นหลอด แล้วจึงเติมเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงความเร็ว รอบ 14000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง เติม Absolute ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 1400 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง และคว่ำหลอดทดลองบนกระดาษทิชชูจนแห้ง และละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer แล้วนำไปบ่มในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส จนกว่าตะกอนดีเอ็นเอจะละลาย แล้วจึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และนำไปตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

### 3.7.2 การตรวจสอบคุณภาพ และปริมาณของดีเอ็นเอ

ในการตรวจสอบปริมาณ และคุณภาพของดีเอ็นเอทำได้ 2 วิธีคือ วิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส เป็นการตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอ และวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เป็นการหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ในการตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส การเตรียมเจลโดยใช้อะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ จะต้องละลายผงอะกาโรส 0.2 กรัม ใน 1X TBE บัฟเฟอร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยใช้เครื่องเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เติม 1X TBE บัฟเฟอร์ให้ท่วมวุ้น นำตัวอย่างดีเอ็นเอ ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ผสมกับ 3X Loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เปรียบเทียบกับ DNA marker ขนาด 1 kb ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ใช้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำแผ่นวุ้นแช่สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ 10 นาที แล้วนำไปแช่ในน้ำกลั่นต่ออีก 10 นาที จากนั้นนำวุ้นไปส่องภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง Gel document แล้วจะสังเกตเห็นลักษณะแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น และคุณภาพของดีเอ็นเอทำได้โดยการดูสารละลายดีเอ็นเอที่เราต้องการตรวจสอบมาปริมาณ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร และใส่น้ำกลั่น 495 ไมโครลิตร (ค่าการเจือจางคือ 100) จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอคำนวณได้จากอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 และความเข้มข้นดีเอ็นเอคำนวณดังสมการที่ 9

### สมการที่ 9

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

#### 3.7.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

การศึกษาโดยใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการระบุพืชสารพัดพิษจากเกาะยวน้อยและเกาะยวใหญ่จากดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของใบบริเวณยีน *rbcl* ดังตารางที่ 3.2 ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยมีปริมาตรสารในการทำปฏิกิริยา (Yamashita และ Tamura 2000) ดังตารางที่ 3.3 และสภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Ernst และ Michael, 1997) มีดังตารางที่ 3.4 เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส จะนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel electrophoresis) เทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน DNA marker ขนาด 100 bp โดยใช้เครื่องเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส จากนั้นส่งผลิตภัณฑ์พีซีอาร์วิเคราะห์ผลเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างถูกวิเคราะห์ด้วยวิธี BTSeq จากนั้นนำมาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม BioEdit แล้วนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) บนฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อบ่งชี้สายพันธุ์ของต้นสารพัดพิษ

ตารางที่ 3.2 คู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยบริเวณยีน *rbcl*

ตำแหน่ง	ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	อ้างอิง
<i>rbcl</i>	<i>rbcl</i> N	5' ATG TCA CCA CAA ACA GAA ACT 3'	Yamashita และ
	<i>rbcl</i> 840R	5' TTG TCG CGG CAA TAA TGA GCC 3'	Tamura (2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.3 องค์ประกอบของสารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยบริเวณยีน *rbcl* ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Yamashita และ Tamura (2000)

สารละลาย	ความเข้มข้น เริ่มต้น	ความเข้มข้น สุดท้าย	ปริมาตรต่อ ตัวอย่าง (ไมโครลิตร)
ตัวอย่างดีเอ็นเอ		50ng	2.0
Standard <i>Taq</i> reaction buffer	10X	1X	2.5
dNTP	1.25 mM	0.1 mM	2.0
Forward primer	20 pmol	0.8 pmol	1.0
Reverse primer	20 pmol	0.8 pmol	1.0
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1.5 mM	1.5
<i>Taq</i> DNA polymerase	5,000 U/ml	1 U/mol	0.2
DI water			14.8
ปริมาตรรวมทั้งหมด			25.0

ตารางที่ 3.4 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสบริเวณยีน *rbcl* ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Ernst และ Michael (1997)

คู่ไพรเมอร์	ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	จำนวน รอบ
<i>rbcl</i> N/ <i>rbcl</i> 840R	Initial denaturation	94	2.00	1
	Denaturation	94	0.30	30
	Annealing	45	0.30	
	Extension	72	1.00	
	Final extension	72	4.00	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

# ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

### 4.1 การสกัดสารด้วยเมทานอลและศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเมทานอล

#### 4.1.1 ผลการสกัดสารด้วยเมทานอลจากใบ เมล็ด และการกำจัดคลอโรฟิลล์ของสารสกัดเมทานอลจากใบ

จากการนำตัวอย่างใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษมาสกัดสารด้วยวิธีหมักโดยใช้ตัวทำละลายเมทานอล หลังจากนั้นนำมาระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน พบว่าสารสกัดเมทานอลของใบ มีสีของสารสกัดใบสีเขียวเข้มลักษณะกึ่งหนืด มีน้ำหนักเท่ากับ 43.18 กรัม คิดเป็นร้อยละผลได้ 8.24 และสารสกัดเมทานอลของเมล็ดมีสีเหลืองออกไปทางส้มลักษณะเป็นกึ่งหนืดมีน้ำหนักเท่ากับ 51.18 กรัม คิดเป็นร้อยละผลได้ 5.19 โดยน้ำหนัก และการกำจัดคลอโรฟิลล์จากสารสกัดเมทานอลจากใบสารพัดพิษโดยใช้น้ำมันปาล์มในการขจัดสีเขียวจากคลอโรฟิลล์ออกไป จากสารสกัดเมทานอลจากใบ ซึ่งสีของสารสกัดเมทานอลจากใบสารพัดพิษที่มีการกำจัดคลอโรฟิลล์มีสีเหลืองออกไปทางสีน้ำตาลลักษณะเหนียว มีน้ำหนักเท่ากับ 12.43 กรัม คิดเป็นร้อยละผลได้ 24.86 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก ร้อยละผลได้ ลักษณะของสารสกัด และสีของสารสกัดโดยเทียบรหัสสีจากกระดาศสีมาตราฐาน NBS/ISCC color system แสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 น้ำหนัก ร้อยละของผลได้ ลักษณะ และรหัสสีของสารสกัดเมทานอลจากใบ เมล็ด และสารสกัดใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์

สารสกัด	น้ำหนัก (กรัม)	ร้อยละผลได้	ลักษณะของสาร	สี	รหัสสี
ใบ	43.18	8.24	เหนียว	เขียวเข้ม	#232C16
เมล็ด	51.18	5.19	กึ่งหนืด	น้ำตาล	#945D0B
ใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์	12.43	24.86	เหนียว	เหลืองเข้ม	#B57900

#### 4.1.2 ผลการตรวจสอบพิษเคมีเบื้องต้น

การตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดเมทานอลจากใบ เมล็ด และใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ ในการทดสอบสารกลุ่มอัลคาลอยด์ โดยใช้สารทดสอบ Dragendorff's, Mayer's และ Wagner's พบว่า สารสกัดมีตะกอนและมีสีขุ่นเกิดขึ้นแสดงว่าสารสกัดมีสารกลุ่มอัลคาลอยด์ เมื่อนำสารสกัดมาตรวจสอบสารกลุ่มแทนนิน โดยใช้สารทดสอบ Gelatin solution, Gelatin salt solution ไม่พบการเกิดตะกอนหรือการเปลี่ยนแปลงของสารสกัดแต่เมื่อทดสอบโดยใช้สารเฟอร์ริก เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คลอไรด์ ( $\text{FeCl}_3$ ) พบว่า สารสกัดเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้ม แสดงว่าสารสกัดไม่มีสารกลุ่มแทนนินแต่มีสารประกอบฟีนอลิก การทดสอบสารกลุ่มคูมาริน โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 6 โมลาร์ พบว่า สารสกัดไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของสี แสดงว่าสารสกัดไม่มีสารกลุ่มคูมาริน และการทดสอบสารกลุ่มซาโปนิน ได้ทดสอบด้วยวิธี Froth test โดยสังเกตการเกิดฟองและการคงตัวหลังจากผ่านไป 30 นาที พบว่า มีเพียงสารสกัดใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ที่เกิดฟอง และวิธี Hemolysis test โดยสังเกตการแตกตัวของเม็ดเลือดแดง ซึ่งสารสกัดไม่ทำให้เกิดการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดง แสดงว่าสารสกัดใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์มีสารในกลุ่มซาโปนิน แสดงดังตารางที่ 4.2

จากการศึกษาของ Kaewdana และคณะ (2021) ศึกษาพฤกษเคมีของสารสกัดเอทานอลจากรากของ *S. exigua* พบสารในกลุ่มคูมาริน ซาโปนิน เทอร์พีน ฟลาโวนอยด์ และอัลคาลอยด์ และการศึกษาของ Zhao และคณะ (2021) นำรากและเมล็ดของ *S. flavescens* มาศึกษาพฤกษเคมีพบกลุ่มสารเทอร์พีนอยด์ ฟีนอล อัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ และไตรเทอร์พีน ซึ่งสารกลุ่มอัลคาลอยด์ ซาโปนิน คูมาริน และแทนนินที่เป็นสารประกอบฟีนอล ซึ่งจัดเป็นสารสำคัญมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Scalbert และคณะ, 2005)

ตารางที่ 4.2 ผลการตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดเมทานอลจากใบ เมล็ด และใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์

กลุ่มสารที่ทดสอบ	วิธีการทดสอบ	สารมาตรฐาน	สารสกัด		
			ใบ	เมล็ด	ใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์
อัลคาลอยด์	Dragendorff's	โคชิซิน	+++	++	++
	Mayer's		+++	+++	+++
	Wagner's		+++	++	++
แทนนิน	Gelatin solution	กรดแทนนิก	-	-	-
	Gelatin salt solution		-	-	-
	$\text{FeCl}_3$		+++	+++	+++
คูมาริน	6 M NaOH	วาร์ฟาริน	-	+	-
		+++			
ซาโปนิน	Froth test	ซาโปนิน	-	-	++
	Hemolysis	แอสซิน	-	-	-
		+++			

หมายเหตุ สัญลักษณ์ - คือไม่พบ + คือ พบน้อย ++ คือ พบปานกลาง +++ คือ พบมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 4.1.3 ผลการศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

จากการศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเมทานอลจากใบ เมล็ด และใบที่มีการกำจัดคลอโรฟิลล์ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก เมื่อนำค่าดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 6.25-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาสร้างกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (ภาพภาคผนวกที่ ข-1) ได้สมการในการคำนวณ  $Y = 0.0033x$  พบว่า สารสกัดเมทานอลจากใบ และเมล็ดมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ  $92.07 \pm 1.80$  และ  $38.48 \pm 0.61$  mg GAE/g extract ตามลำดับ และสารสกัดใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ  $35.5 \pm 2.45$  mg GAE/g extract

เมื่อนำปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดมาพิจารณาทางสถิติสารสกัดเมทานอลจากใบมีปริมาณฟีนอลิกสูงที่สุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสารสกัดเมทานอลจากเมล็ด และใบที่มีการกำจัดคลอโรฟิลล์ ในขณะที่สารสกัดเมทานอลจากเมล็ดและสารสกัดใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์นั้นไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ค่าเฉลี่ยปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ของสารสกัดเมทานอลจากใบ เมล็ด และใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์

สารสกัด	ค่าเฉลี่ยปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/g extract)
ใบ	$92.07^a \pm 1.80$
เมล็ด	$38.48^b \pm 0.61$
ใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์	$35.5^b \pm 2.45$

หมายเหตุ ผลลัพธ์แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษร a-b ภายในคอลัมน์เดียวกัน บ่งชี้ความสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ด้วยวิธี Duncan's multiple range test

จากผลการทดลองปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมีความสอดคล้องกับการทดลองพฤษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดเมทานอล โดยพบสารอัลคาลอยด์และแทนนิน ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิกส่งผลให้มีปริมาณฟีนอลิกสูง ดังงานวิจัยของ Aly และคณะ (2020) ศึกษาปริมาณฟีนอลิกของน้ำมันหอมระเหยจากใบของ *S. tomentosa* และดอกของ *S. secundiflora* มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 4.72 และ 18.01 mg GAE/g extract ตามลำดับ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจากสารสกัดใบของต้นสารพัดพิษ มีปริมาณฟีนอลิกสูงกว่าสารสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบของ *S. tomentosa* และการกำจัดคลอโรฟิลล์นั้นมีแนวโน้มที่จะทำให้ปริมาณสารฟีนอลิกลดลง ดังงานวิจัยของ Suppalak และคณะ (2020) ได้ทำการกำจัดคลอโรฟิลล์จากสารสกัดเอทานอลจากใบสาบเสือ (*Chromolaena odorata*) พบว่ามีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดลดลง โดยสารสกัดเอทานอลของใบสาบเสือนี้อาจมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด  $33.44 \pm 1.37$  mg GAE/0.5 g extract และเมื่อนำไปกำจัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คลอโรฟิลล์ด้วยน้ำมันปาล์ม พบว่ามีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดลดลงโดยมีค่า  $14.89 \pm 0.41$  mg GAE/0.5 g extract ซึ่งลดลงร้อยละ 44.53 โดยในการศึกษาครั้งนี้การกำจัดคลอโรฟิลล์ด้วยน้ำมันปาล์มทำให้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดลดลงร้อยละ 38.56 เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Suthasinee และคณะ (2021) ได้วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเอทานอลจากสาหร่ายไก (*Cladophora glomerata*) และสาหร่ายไกที่กำจัดคลอโรฟิลล์ด้วยคลอโรฟอร์ม พบว่าสารสกัดสาหร่ายไกที่ไม่กำจัดคลอโรฟิลล์มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าสารสกัดที่กำจัดคลอโรฟิลล์ โดยมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด  $25.69 \pm 0.21$  และ  $21.03 \pm 0.03$  mg GAE/g extract ตามลำดับ โดยปริมาณลดลงเพียงเล็กน้อย และในการทดลองครั้งนี้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของเมล็ดมีปริมาณน้อยกว่าสารสกัดหยาบเมทานอลจากใบ และในทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์นั้นไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ อาจเกิดจากส่วนประกอบของเมล็ดที่ส่งผลต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ดังการศึกษาของ Chanda และคณะ (2010) ทำการศึกษาปริมาณฟีนอลิกของเปลือกหุ้มเมล็ดและเมล็ดของถั่วทั้ง 6 สายพันธุ์ ดังนี้ ถั่วแระ (*C. indica*) ถั่วลันเตา (*P. sativum*) ถั่วปากอ้า (*V. fabal*) ถั่วดำ (*V. mungo*) ถั่วเขียว (*V. radiate*) และถั่วพุ่ม (*W. vigna*) โดยสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดและเมล็ดด้วยเมทานอลพบว่า สารสกัดจากส่วนเปลือกหุ้มเมล็ดมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมากกว่าสารสกัดจากส่วนเมล็ด สารสกัดเมทานอลจากเปลือกเมล็ดถั่วแระมีปริมาณฟีนอลิกสูงสุดที่  $158.98 \pm 2.14$  mg GAE/g ตามด้วยสารสกัดเมทานอลจากถั่วเขียว ถั่วดำ ถั่วพุ่ม ถั่วปากอ้า ถั่วลันเตา มีค่า  $55.77 \pm 0.24$ ,  $43.95 \pm 0.23$ ,  $32.88 \pm 0.27$ ,  $14.36 \pm 0.07$  และ  $11.62 \pm 0.14$  mg GAE/g ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดเมทานอลจากเมล็ดมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดอยู่ในช่วง  $4.35 \pm 0.06 - 22.7 \pm 0.09$  mg GAE/g โดยสารสกัดเมทานอลจากถั่วดำมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดตามด้วยสารสกัดเมทานอลจากถั่วเขียว ถั่วลันเตา ถั่วพุ่ม ถั่วแระ และถั่วปากอ้า มีค่า  $22.7 \pm 0.09$ ,  $16.29 \pm 0.0$ ,  $8.45 \pm 0.12$ ,  $8.33 \pm 0.16$ ,  $6.22 \pm 0.09$  และ  $4.35 \pm 0.06$  mg GAE/g ตามลำดับ จากการศึกษาข้างต้นยังไม่มีการศึกษาสารสกัดจากเมล็ดของสารพืช แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดเมทานอลจากเมล็ดมีปริมาณฟีนอลิกสูงซึ่งมีแนวโน้มที่จะมีสารสำคัญที่ส่งผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านอื่น ๆ และสารฟีนอลิกมีความสามารถในการให้ไฮโดรเจนอะตอม และสามารถกำจัดออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน โดยฟีนอลิกส่งเสริมให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้อย่างดี (นันทชนก และคณะ, 2556) ในการศึกษาครั้งนี้จึงนำสารสกัดหยาบเมทานอลจากใบ เมล็ด และใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์มาศึกษาต่อไป

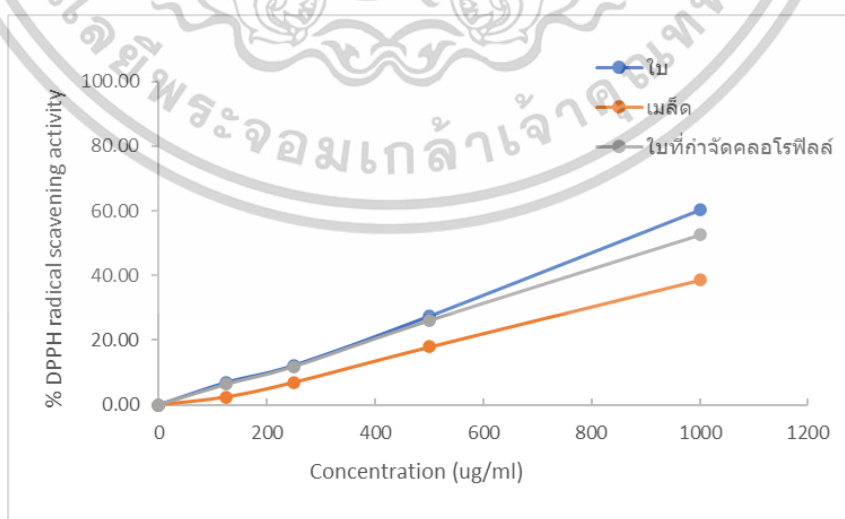
#### 4.1.4 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมทานอลจากใบ เมล็ด และใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ ด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP โดยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแต่ละวิธีดังต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.1.4.1 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

จากการศึกษาการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมทานอลจากใบ เมล็ด และใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ด้วยวิธี DPPH ที่ระดับความเข้มข้น 125-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้สารโทรล็อกซ์เป็นสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 6.25-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาสร้างกราฟมาตรฐานของสารโทรล็อกซ์ (ภาพภาคผนวกที่ ข-2) คือสมการ  $Y = 0.972x$  แล้วนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารโทรล็อกซ์ที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ร้อยละ 50 หรือ  $IC_{50}$  ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 8.0 พบว่าสารมาตรฐานโทรล็อกซ์มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 47.69 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางภาคผนวกที่ ข-3) และร้อยละความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดอยู่ในช่วง  $2.46 \pm 2.08 - 60.23 \pm 2.09$  (ตารางภาคผนวกที่ ข-4) และนำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดเมทานอลจากใบ เมล็ด และใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ กับร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดังรูปที่ 4.1 และค่าเฉลี่ยความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH อยู่ในช่วง  $11.40 \pm 3.17 - 20.52 \pm 1.71$  mg TE/g extract โดยสารสกัดเมทานอลจากใบมีความสามารถการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีที่สุดในค่า  $20.52 \pm 1.71$  mg TE/g extract มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 838.58 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์มีความสามารถการต้านอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ  $19.02 \pm 0.83$  mg TE/g extract มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 945.754 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดเมทานอลจากเมล็ดมีความสามารถการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้น้อยที่สุดที่  $11.40 \pm 3.17$  mg TE/g extract และมีค่า  $IC_{50}$  มากกว่า 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำมาพิจารณาค่าทางสถิติสารสกัดเมทานอลจากใบและสารสกัดใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์มีค่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แต่สารสกัดเมทานอลจากใบและใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) กับสารสกัดเมทานอลจากเมล็ด ดังตารางที่ 4.4 แสดงค่าเฉลี่ยความสามารถต้านอนุมูลอิสระที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า  $IC_{50}$  ของสารสกัด



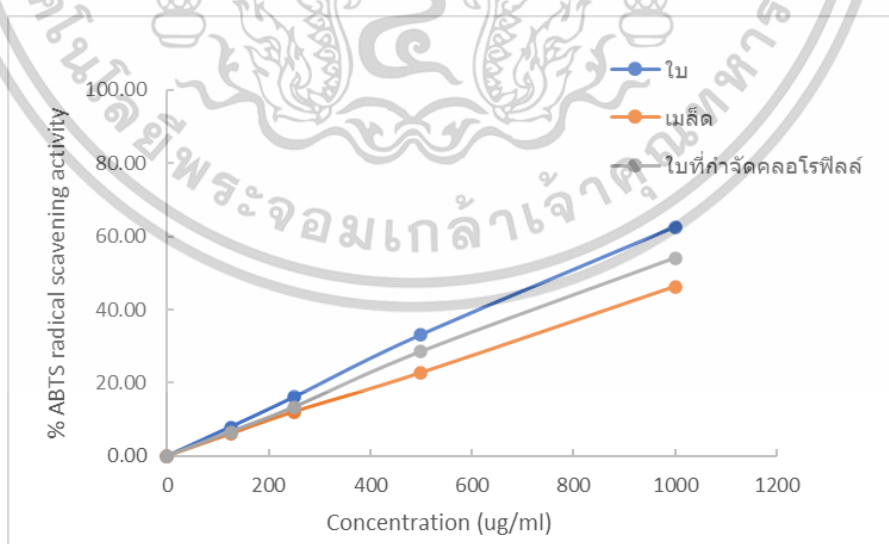
รูปที่ 4.1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดเมทานอลใบ เมล็ด

และใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ กับค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.1.4.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

จากการศึกษาการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมทานอลจากใบ เมล็ด และใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ด้วยวิธี ABTS โดยใช้สารมาตรฐานโทรล็อกซ์เป็นสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 6.25-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาสร้างกราฟมาตรฐานของสารโทรล็อกซ์ (ภาพภาคผนวกที่ ข-2) คือสมการ  $Y = 0.8195x$  แล้วนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารโทรล็อกซ์ที่สามารถต้านสารอนุมูลอิสระ ABTS ที่ร้อยละ 50 หรือ  $IC_{50}$  ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 8.0 พบว่า สารมาตรฐานโทรล็อกซ์มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 57.71 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางภาคผนวกที่ ข-5) เมื่อนำสารสกัดมาทดสอบต้านอนุมูลอิสระที่ความเข้มข้น 125-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดอยู่ในช่วง  $6.11 \pm 5.11 - 62.48 \pm 0.85$  (ตารางภาคผนวกที่ ข-6) และนำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดเมทานอลจากใบ เมล็ด และใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์กับร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้ดังรูปที่ 4.2 และค่าเฉลี่ยความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS อยู่ในช่วง  $56.40 \pm 3.84 - 76.70 \pm 4.64$  mg TE/g extract โดยสารสกัดเมทานอลจากใบมีความสามารถการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้ดีที่สุดเท่ากับ  $76.70 \pm 4.64$  mg TE/g extract มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 772.77 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์มีความสามารถการต้านอนุมูลอิสระ ABTS เท่ากับ  $65.90 \pm 2.43$  mg TE/g extract มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 910.47 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดเมทานอลจากเมล็ดมีความสามารถการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้น้อยที่สุดที่  $56.40 \pm 3.84$  mg TE/g extract และมีค่า  $IC_{50}$  มากกว่า 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 4.4 แสดงผลต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดเมทานอลจากใบสูงกว่าสารสกัดใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ และสารสกัดเมทานอลจากเมล็ดต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้น้อยที่สุด



รูปที่ 4.2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดเมทานอลใบ เมล็ด และใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์กับค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.1.4.3 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

จากการศึกษาการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมทานอลจากใบ เมล็ด และใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ด้วยวิธี FRAP โดยใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 20-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำค่าดูดกลืนแสงมาสร้างกราฟมาตรฐานของกรดแอสคอร์บิก (ภาพภาคผนวกที่ ข-4) คือสมการ  $Y = 0.0122x$  เมื่อนำสารสกัดเมทานอลจากใบ เมล็ด และใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์มาทดสอบสารสกัดที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า สารสกัดเมทานอลจากใบมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ FRAP ดีที่สุดที่  $92.07 \pm 1.80$  mg AAE/g extract ใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ FRAP เท่ากับ  $54.48 \pm 0.47$  และสารสกัดเมทานอลจากเมล็ดมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ FRAP น้อยที่สุด เท่ากับ  $38.80 \pm 2.82$  mg AAE/g extract แสดงผลดังตารางที่ 4.4 เมื่อนำมาพิจารณาร่วมกันทางสถิติสารสกัดเมทานอลจากใบและสารสกัดใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ แต่สารสกัดเมทานอลจากใบและใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสารสกัดเมทานอลจากเมล็ด ( $p < 0.05$ )

**ตารางที่ 4.4** ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH, ABTS และ FRAP ของสารสกัดเมทานอลจากใบ เมล็ด และสารสกัดใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า  $IC_{50}$  ของความเข้มข้นสารสกัด 125-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัด	ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ			$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	DPPH (mg TE/g extract)	ABTS (mg TE/g extract)	FRAP (mg AAE/g extract)	DPPH	ABTS
ใบ	$20.52^a \pm 1.71$	$76.70^a \pm 4.64$	$55.16^a \pm 1.94$	838.58	772.77
เมล็ด	$11.40^b \pm 3.17$	$56.40^c \pm 3.84$	$38.80^b \pm 2.82$	>1000	>1000
ใบที่กำจัด คลอโรฟิลล์	$19.02^a \pm 0.83$	$65.90^b \pm 2.43$	$54.48^a \pm 0.47$	945.75	910.47

หมายเหตุ ผลลัพธ์แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษร a-c ภายในคอลัมน์เดียวกันบ่งชี้ความสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ด้วยวิธี Duncan's multiple range test

จากการศึกษาความสามารถการต้านอนุมูลอิสระ DPPH, ABTS และ FRAP ให้ผลการทดลองของสารสกัดสอดคล้องกัน โดยสารสกัดเมทานอลจากใบมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสารสกัดของใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH, ABTS และ FRAP มีฤทธิ์ใกล้เคียงกัน และสารสกัดเมทานอลจากเมล็ดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH, ABTS และ FRAP น้อยที่สุด เมื่อพิจารณาความสามารถการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมทานอลของใบและใบที่ถูกกำจัดคลอโรฟิลล์ซึ่งคลอโรฟิลล์อาจส่งผลกระทบต่อความสามารถการเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้านอนุมูลอิสระ ดังการศึกษาของ Olatunde และคณะ (2018) นำสารสกัดใบฝรั่ง (*P. guajava*) จากตัวทำละลายเมทานอล อะซีโตน และโพรพานอลมากำจัดคลอโรฟิลล์ พบว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH, ABTS และ FRAP ลดลง และมีปริมาณฟีนอลิกลดลง จากการกำจัดคลอโรฟิลล์ เมื่อนำปริมาณฟีนอลิกของสารสกัดมาพิจารณาความสัมพันธ์กับความสามารถต้านอนุมูลอิสระ พบว่า ความสัมพันธ์กันเนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกที่ทำหน้ากำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และสารสกัดเมทานอลของใบสารพัดพิษมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกสูง สอดคล้องกับการศึกษาของ Arumugama และคณะ (2021) นำสารสกัดเมทานอลของใบ *S. alopecuroides* var. *alopecuroides* พบว่าสารสกัดเมทานอลของใบมีปริมาณฟีนอลิกสูงที่สุดคือ  $10.61 \pm 0.01$  mg GAEs/g extract และสารสกัดเมทานอลของใบมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH IC<sub>50</sub> เท่ากับ 14.82 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS มีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 3.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการศึกษาสารสกัดเมทานอลของเมล็ดมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุดอาจขึ้นอยู่กับส่วนของพืชที่นำมาทดสอบ ดังการศึกษาของพืชในตระกูลถั่ว Martins และคณะ (2024) นำสารสกัดเอทานอลของใบ ผล และเปลือกของ *Inga laurina* มาทดสอบความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS พบว่า สารสกัดเอทานอลของใบมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณฟีนอลิกสูงที่สุด

#### 4.1.5 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

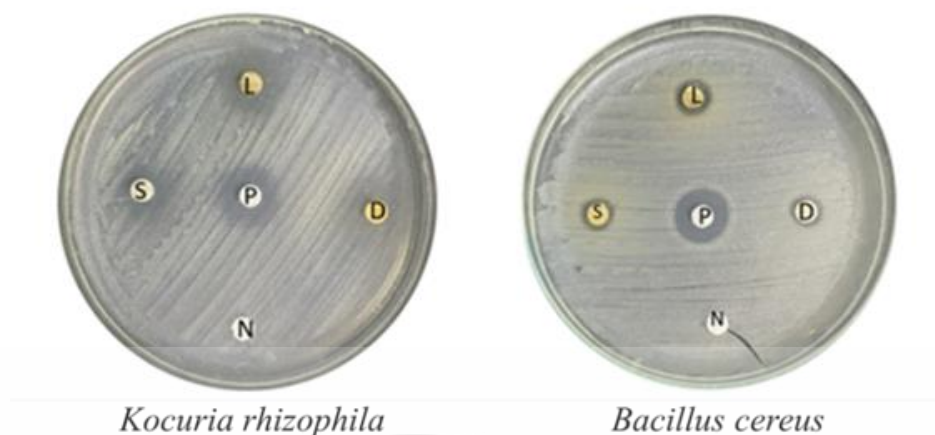
การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Paper disc diffusion โดยนำสารสกัดเมทานอลของใบ เมล็ด และใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 3 มิลลิกรัมต่อดิสก์ มาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 8 สายพันธุ์ ซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรียแกรมบวก 6 สายพันธุ์ คือ *B. cereus*, *B. subtilis*, *K. rhizophila*, *S. aureus*, *S. epidermidis* และ *P. acne* และแบคทีเรียแกรมลบ 2 สายพันธุ์ คือ *E. coli* และ *P. aeruginosa* เปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะเจนตามัยซิน (Gentamicin) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ เป็นตัวควบคุมเชิงบวก และเมทานอลเป็นตัวควบคุมเชิงลบ จากการทดลองพบว่า สารสกัดเมทานอลของใบ เมล็ด และใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ 2 สายพันธุ์ คือ *B. cereus* และ *K. rhizophila* ดังรูปที่ 4.3 แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. acne*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* ได้ โดยสารสกัดเมทานอลของเมล็ด ใบ และใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์มีบริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* เท่ากับ  $9.87 \pm 0.32$ ,  $8.06 \pm 0.10$  และ  $7.37 \pm 0.59$  มิลลิเมตร ตามลำดับ และมีบริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *K. rhizophila* เท่ากับ  $12.44 \pm 2.81$ ,  $12.70 \pm 0.93$  และ  $8.65 \pm 1.62$  มิลลิเมตร ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.5

เมื่อนำมาพิจารณาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *K. rhizophila* และ *B. cereus* ของสารสกัดร่วมกันพบว่า ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *K. rhizophila* ของสารสกัดเมทานอลเป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอลจากเมล็ดและใบมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *K. rhizophila* แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และสารสกัดใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *K. rhizophila* ได้น้อยที่สุด และฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ของสารสกัดเมทานอลของเมล็ดนั้นดีที่สุด และเมื่อนำสารสกัดเมทานอลของใบและใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ มาเปรียบเทียบกับฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. cereus* พบว่า แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดอาการท้องเสีย ท้องร่วงสอดคล้องกับที่มีการนำใบและเมล็ดสารพัดพืชมาบริโภคเป็นยารักษาอาการท้องร่วงได้ โดย *K. rhizophila* เป็นเชื้อก่อโรคฉวยโอกาสและเป็นเชื้อ Coagulase-negative เมื่ออยู่ภายนอกร่างกายจะไม่ส่งผลอันตรายแต่หากพบเชื้อในร่างกายอาจทำให้มีโอกาสดูดเชื้อในกระแสเลือดได้ ก่อให้เกิดอาการท้องร่วงเนื่องจากมีคุณสมบัติกระตุ้นให้เกิดการท้องเสียและสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อ (Ziogou และคณะ, 2023) และเชื้อ *B. cereus* สร้างสปอร์ ผลิตสารพิษ เป็นสาเหตุของการเกิดอาการท้องร่วงและอาหารเป็นพิษหากได้รับเชื้อในปริมาณมากส่งผลให้เกิดของการติดเชื้อในกระแสเลือด หรือเยื่อหุ้มสมองอักเสบได้ด้วย และข้ออักเสบได้ (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์)

จากการทดลองฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียพบว่าสารสกัดใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้น้อยที่สุด โดยการกำจัดคลอโรฟิลล์สารสำคัญอาจถูกกำจัดไปเนื่องจากคลอโรฟิลล์นั้นละลายได้ดีในน้ำมัน (Carrillo และคณะ, 2022) และในสารสกัดประกอบด้วยสารมีขั้วและไม่มีขั้วส่งผลให้สารสำคัญที่เป็นสารมีขั้วหรือไม่มีขั้วถูกกำจัดไปด้วย (Peyman และคณะ, 2023) ทั้งนี้คลอโรฟิลล์นั้นเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดหนึ่งที่ได้รับการพิสูจน์แล้วว่า มีฤทธิ์ทางชีวภาพในหลากหลายด้าน เช่น ต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ต้านอักเสบ และต้านมะเร็ง เป็นต้น (Peyman และคณะ, 2023) ดังการศึกษาของ Ahmadi และคณะ (2022) พบว่าคลอโรฟิลล์ที่สกัดจาก *Medicago sativa* L. มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *E. coli*, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhi* และ *P. aeruginosa* ได้ดี สอดคล้องกับการศึกษาของ Olatunde และคณะ (2018) สารสกัดจากใบฝรั่งที่มีการกำจัดคลอโรฟิลล์มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, *L. monocytogenes* และ *S. aureus* ได้น้อยกว่าสารสกัดใบฝรั่งที่ไม่มีการกำจัดคลอโรฟิลล์

เมื่อนำสารสกัดเมทานอลของใบ เมล็ด และสารสกัดใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์มาพิจารณาการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย พบว่าในการทดลองข้างต้นของสารสกัดใบที่ทำการกำจัดคลอโรฟิลล์นั้นมีฤทธิ์ทางชีวภาพในปริมาณน้อย ดังนั้นการทดลองต่อจากนี้ไปจึงเลือกเพียงสารสกัดเมทานอลจากใบ และเมล็ดนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในการทดลองด้านต่าง ๆ ต่อไป



รูปที่ 4.3 ผลการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดเมทานอลของใบ เมล็ด และใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ โดย P คือ ตัวควบคุมเชิงบวก N คือ ตัวควบคุมเชิงลบ L คือ สารสกัดเมทานอลของใบ D คือ ใบที่ทำการกำจัดคลอโรฟิลล์ และ S คือ สารสกัดเมทานอลของเมล็ด

#### 4.1.6 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopa chrome โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกความเข้มข้น 100-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก โดยมีสมการ  $Y = 0.1954x$  (ภาพภาคผนวกที่ ข-5) เมื่อนำมาคำนวณค่า  $IC_{50}$  ของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกมีค่า 255.86 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดเมทานอลของใบและเมล็ดความเข้มข้น 125-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัดหยาบเมทานอลของใบ และเมล็ดมีค่าร้อยละความสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสอยู่ในช่วง  $9.76 \pm 0.32 - 83.87 \pm 0.23$  (ตารางที่ 4.6)

พบว่าสารสกัดเมทานอลของใบที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงสุด  $83.87 \pm 1.30$  มีค่า  $IC_{50}$  ต่ำสุด เท่ากับ 215.98 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดเมทานอลของเมล็ดมีค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส  $39.29 \pm 1.01$  มีค่า  $IC_{50}$  มากกว่า 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า สารสกัดเมทานอลของใบมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีกว่าสารสกัดเมทานอลของเมล็ด แต่สารสกัดเมทานอลของใบและเมล็ดมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้น้อยกว่าสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 บริเวณยับยั้งของเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดเมทานอลของใบ เหมือด และใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อติสก์

สารสกัด	บริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (มิลลิเมตร)							
	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>K. rhizophila</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. acne</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
ใบ (L)	8.06 <sup>c</sup> ± 0.10	0	12.70 <sup>ab</sup> ± 0.93	0	0	0	0	0
เหมือด (S)	9.87 <sup>b</sup> ± 0.32	0	12.44 <sup>ab</sup> ± 2.81	0	0	0	0	0
ใบที่กำจัด คลอโรฟิลล์ (D)	7.37 <sup>c</sup> ± 0.59	0	8.65 <sup>b</sup> ± 1.62	0	0	0	0	0
เจนตามัยซิน (P)	15.20 <sup>a</sup> ± 1.03	15.78 <sup>a</sup> ± 2.03	15.06 <sup>a</sup> ± 0.42	15.01 <sup>a</sup> ± 0.03	15.48 <sup>a</sup> ± 4.13	15.80 <sup>a</sup> ± 1.05	15.30 <sup>a</sup> ± 1.23	15.45 <sup>a</sup> ± 1.45

หมายเหตุ ผลลัพธ์แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษร a-c ภายในคอลัมน์เดียวกันบ่งชี้ความสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ด้วยวิธี Duncan's multiple range test

สารสกัดเมทานอลของใบมีปริมาณฟีนอลิกในปริมาณสูง ซึ่งสารในกลุ่มฟีนอลิกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี เนื่องจากมีวงแหวนอะโรมาติกที่มีหมู่ไฮดรอกซิลหนึ่งหมู่ และมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารกลุ่มโพลีฟีนอลิก เนื่องจากสารสำคัญ เช่น Kaempferol, Quercetin และ Catechin สามารถจับกับโลหะในโครงสร้างของเมลาโทนิน (Melatonin) ทำให้ลดการสร้างเม็ดสีจะยับยั้งการสร้าง DOPA ไปเป็น Dopachrome (Ebanks และคณะ, 2009; Masum และคณะ, 2019) ดัชนีการศึกษาของ Wang และคณะ (2006) พบว่า สารสกัดจากดอก *S. japonica* ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสร้อยละ  $54.4 \pm 1.3$  และยังพบว่า สารสกัดจากดอกมีปริมาณฟีนอลิกในปริมาณสูง และในการศึกษาของ Tian และคณะ (2020) สารสกัดจากดอกของ *S. japonica* มีสารประกอบ Kaempferol, Quercetin, Catechin, Isorhamnetin, Rutin, Chlorogenic acid, Protocatechuic acid และ Kaempferol-3-O-rutinoside

ตารางที่ 4.6 ค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเมทานอลจากใบและเมล็ดของสารพัดพิษที่ระดับความเข้มข้น 125-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า IC<sub>50</sub>

สารสกัด	ความเข้มข้น (µg/ml)	ค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
ใบ	125	24.56 <sup>d</sup> ± 1.20	215.98
	250	57.45 <sup>c</sup> ± 0.61	
	500	72.05 <sup>b</sup> ± 1.63	
	1000	83.87 <sup>a</sup> ± 0.23	
	125	9.76 <sup>d</sup> ± 0.32	
เมล็ด	250	19.06 <sup>c</sup> ± 0.80	>1000
	500	32.87 <sup>b</sup> ± 1.52	
	1000	39.29 <sup>a</sup> ± 1.01	

หมายเหตุ ผลลัพธ์แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษร a-d แสดงนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ด้วยวิธี Duncan's multiple range test

#### 4.1.7 ผลการศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบ

##### 4.1.7.1 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ในหลอดทดลอง

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ หรือ Nitric oxide scavenging assay (NOA) โดยใช้ Sodium nitroprusside (SNP) เป็นสารที่เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ นำมาทดสอบกับสารสกัดเมทานอลจากใบและเมล็ดที่ความเข้มข้น 125-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น 200-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาสร้างกราฟเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก แสดงสมการ  $Y = 0.0577x$  (ภาพภาคผนวกที่ ข-6) เพื่อคำนวณร้อยละความสามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ และค่า  $IC_{50}$  จากการทดลองพบว่า สารสกัดเมทานอลของใบและเมล็ดมีร้อยละความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์อยู่ในช่วง  $41.30 \pm 0.87 - 62.04 \pm 6.51$  และ  $10.63 \pm 2.60 - 52.69 \pm 1.91$  ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7) โดยที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดเมทานอลของใบมีร้อยละยับยั้งไนตริกออกไซด์คือ  $62.04 \pm 6.51$  มีค่า  $IC_{50}$  489.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดเมทานอลของเมล็ดมีร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์คือ  $52.69 \pm 1.91$  มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 565.69 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำค่า  $IC_{50}$  ของสารสกัดมาเปรียบเทียบกับความสามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ระหว่างสารสกัดพบว่า สารสกัดเมทานอลของใบมีความสามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้สูงกว่าสารสกัดเมทานอลของเมล็ด และเมื่อนำมาพิจารณาพร้อมกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 866.55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่า สารสกัดเมทานอลของใบและเมล็ดมีความสามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้สูงกว่าสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก

ตารางที่ 4.7 ร้อยละความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ และค่า  $IC_{50}$  ของสารสกัดเมทานอลจากใบและเมล็ด

สารสกัด	ความเข้มข้น ( $\mu\text{g/ml}$ )	ร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
ใบ	125	$41.30^c \pm 0.87$	489.50
	250	$41.82^c \pm 2.03$	
	500	$50.50^b \pm 3.87$	
	1000	$62.04^a \pm 6.51$	
เมล็ด	125	$10.63^e \pm 2.60$	565.69
	250	$23.32^d \pm 0.29$	
	500	$45.83^{ab} \pm 6.99$	
	1000	$52.69^b \pm 1.91$	

หมายเหตุ ผลลัพธ์แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษร a-e ภายในคอลัมน์เดียวกัน บ่งชี้ความสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ด้วยวิธี Duncan's multiple range test

ดังนั้นในการศึกษานี้จะทำการทดสอบการอักเสบด้วยการใช้สารสกัดเมทานอลของใบและเมล็ด กับเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 โดยจะทำการศึกษาการอักเสบโดยใช้สาร Lipopolysaccharide (LPS) เป็นสารเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบทำให้เกิดการหลั่งไนตริกออกไซด์ โดยก่อนที่จะทำการศึกษาก่อนจะยับยั้งไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 จะทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 ด้วยวิธี MTT เพื่อหาความเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้นของสารสกัดที่เหมาะสมในการทดลองฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7

#### การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7

ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 ด้วยวิธี MTT โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 125-2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รายงานผลเป็นค่าร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ (Cell viability) และค่า IC<sub>50</sub> ของสารสกัด พบว่าสารสกัดเมทานอลมีร้อยละการมีชีวิตรอดอยู่ในช่วง  $20.28 \pm 2.08 - 96.45 \pm 1.50$  มีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 1438.81 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดเมทานอลจากเมล็ดร้อยละการมีชีวิตรอดอยู่ในช่วง  $5.03 \pm 1.38 - 97.07 \pm 1.89$  มีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 1421.41 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.8) โดยที่ความเข้มข้น 1500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารสกัดที่ความเป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้นในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 จะใช้ความเข้มข้นของสารสกัดต่ำกว่า 1500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7

ตารางที่ 4.8 สารสกัดเมทานอลจากใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50 (IC<sub>50</sub>)

สารสกัด	ความเข้มข้น ( $\mu\text{g/ml}$ )	การมีชีวิตรอดของเซลล์ (%)	ความเป็นพิษต่อเซลล์ IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )
ใบ	125	$96.45^a \pm 1.50$	1438.81
	250	$91.31^b \pm 2.07$	
	500	$87.15^c \pm 1.39$	
	1000	$69.65^d \pm 3.51$	
	2000	$20.28^e \pm 2.08$	
เมล็ด	125	$97.07^a \pm 1.89$	1421.41
	250	$93.85^b \pm 2.76$	
	500	$79.84^c \pm 3.13$	
	1000	$69.90^d \pm 2.97$	
	2000	$5.03^e \pm 1.38$	

หมายเหตุ ผลลัพธ์แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษร a-e แสดงนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  ด้วยวิธี Duncan's multiple range test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.1.7.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ

##### ชนิด RAW 264.7

ผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบด้วยวิธียับยั้งไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 โดยใช้ LPS เป็นสารเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 300-1500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และตัวควบคุมเชิงบวก คือ ยาอินโดเมทาซิน (Indomethacin) ความเข้มข้น 125-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดเมทานอลของใบและเมล็ดมีร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์อยู่ในช่วง  $41.45 \pm 0.57$  -  $64.78 \pm 0.20$  และ  $45.51 \pm 1.28$  -  $61.88 \pm 0.14$  ตามลำดับ และมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 553.45 และ 522.24 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.9) โดยสารสกัดเมทานอลของเมล็ดมีฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้สูงกว่าสารสกัดหยาบเมทานอลจากใบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเปรียบเทียบค่าร้อยละยับยั้งไนตริกออกไซด์ และค่า  $IC_{50}$  ของสารสกัดเมทานอลของใบและเมล็ด กับยาอินโดเมทาซินพบว่า สารสกัดเมทานอลของใบและเมล็ดมีความสามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ต่ำกว่ายาอินโดเมทาซิน ซึ่งมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 365.36 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.9 ร้อยละความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ในเซลล์ชนิดแมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 และค่า  $IC_{50}$  ของสารสกัดเมทานอลจากใบและเมล็ดของสารพัดพิษ

สารสกัด	ความเข้มข้น ( $\mu\text{g/ml}$ )	ร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
ใบ	300	$41.45^e \pm 0.57$	553.45
	600	$57.10^c \pm 2.16$	
	900	$61.01^b \pm 0.76$	
	1200	$63.04^a \pm 0.78$	
	1500	$64.78^a \pm 0.20$	
เมล็ด	300	$45.51^e \pm 1.28$	522.24
	600	$55.51^d \pm 0.50$	
	900	$56.81^c \pm 0.44$	
	1200	$58.26^c \pm 0.12$	
	1500	$61.88^b \pm 0.14$	
Indomethacin	125	$32.61^f \pm 2.05$	365.36
	250	$42.61^e \pm 1.34$	
	500	$56.23^c \pm 0.49$	
	1000	$66.16^a \pm 0.83$	

หมายเหตุ ผลลัพธ์แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษร a-f ภายในคอลัมน์

เดียวกันบ่งชี้ นัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ด้วยวิธี Duncan's multiple range test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากยังไม่พบการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์โดยใช้ SNP และการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 โดยใช้ LPS ของพืช *S. tomentosa* มีเพียงการศึกษาในพืชสกุลและตระกูลเดียวกันเท่านั้น ดังการศึกษาของ Chae และคณะ (2016) สกัดสารจากรากของ *S. tonkinensis* และแยกสารสกัดส่วนย่อยด้วยวิธี Column chromatography พบว่า สารสกัดส่วนย่อยมีสาร 6,8-diprenyl-7,4'-dihydroxyflavanone จึงนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ภายในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 โดยใช้ LPS เป็นสารเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบพบว่า สารสำคัญ 6,8-diprenyl-7,4'-dihydroxyflavanone มีความสามารถในการลดสารสื่อกลางที่กระตุ้นการอักเสบภายในเซลล์ เช่น TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  และ IL-6 โดยแสดงฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์มีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 12.21 ไมโครกรัม ซึ่งจะเห็นได้ว่าชนิดของพืชที่นำมาทดสอบ และสารสำคัญเมื่อถูกแยกให้บริสุทธิ์ตามขั้นตอนทำให้มีฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์แตกต่างกัน เช่นเดียวกับการศึกษาของ Chusana และคณะ (2018) นำสารสกัดเมทานอลของเมล็ดถั่วแดง (*V. angularis*) มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบภายในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 246.7 พบว่าสารสกัดเมทานอลของเมล็ดถั่วแดงที่ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้ง TNF- $\alpha$  ที่ทำให้เกิดการอักเสบได้ถึงร้อยละ 80.39 และการศึกษาของ Augustine และคณะ (2024) ได้ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์ของสารสกัดใบจากชั้นน้ำของ *Xeroderis stuhlmannii* โดยใช้ SNP เป็นสารเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ พบว่าความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์สารสกัดใบจากชั้นน้ำของ *X. stuhlmannii* มีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 29.84 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

#### 4.1.8 ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์

จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติทั้งหมด 8 ชนิด ประกอบด้วยเซลล์มะเร็ง 5 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29 เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 เซลล์มะเร็งช่องปากชนิด KB และเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa และเซลล์ปกติ 3 ชนิด ประกอบด้วยเซลล์เคอราติโนไซต์มนุษย์ชนิด HaCaT เซลล์ผิวหนังของหนูชนิด L929 และเซลล์เยื่อบุไตลิงชนิด Vero ด้วยวิธี MTT ทดสอบกับสารสกัดเมทานอลของใบและเมล็ด ความเข้มข้น 125-2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสังเกตได้เบื้องต้นจากลักษณะผลึกฟอรัมซาที่เกิดขึ้น ถ้ามีผลึกฟอรัมซาปริมาณมากแสดงว่า สารสกัดมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ และถ้าเกิดมีผลึกฟอรัมซาปริมาณน้อยแสดงว่า สารสกัดมีความเป็นพิษต่อเซลล์สูง จากนั้นละลายผลึกที่เกิดขึ้นและนำมาวัดค่าดูดกลืนแสง (ตารางที่ 4.11) เพื่อนำมารายงานผลเป็นร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ (ตารางภาคผนวกที่ ข-11) และค่าความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50 (IC<sub>50</sub>) พบว่าสารสกัดเมทานอลของใบมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ โดยที่ค่า IC<sub>50</sub> ต่ำกว่า 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29

เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 เซลล์มะเร็งช่องปากชนิด KB และเซลล์เคอราติโนไซต์มนุษย์ชนิด HaCaT เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปเผยแพร่ขึ้นต้นการค้นคว้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 489.43, 550.53, 976.02 และ 930.51 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และ สารสกัดเมทานอลของใบที่มีค่า  $IC_{50}$  มากกว่า 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความเป็นพิษต่อ เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 เซลล์ผิวหนังของหนูชนิด L929 และเซลล์เยื่อบุไตลิงชนิด Vero มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 1617.06, 1470.27, 1663.67 และ 1532.85 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสกัดเมทานอลของเมล็ดมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและ เซลล์ปกติ ที่ค่า  $IC_{50}$  ต่ำกว่า 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้และ ทวารหนักชนิด HT-29 เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 478.26, 575.01 และ 521.99 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสกัดเมทานอลของ เมล็ดที่มีค่า  $IC_{50}$  มากกว่า 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด KB เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa เซลล์ผิวหนังของหนูชนิด L929 เซลล์เยื่อบุไตลิงชนิด Vero และเซลล์เคอราติโนไซต์มนุษย์ชนิด HaCaT มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 1026.37, 1554.55, 1603.01, 1555.23 และ 1006.22 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.10)

เมื่อนำมาพิจารณาร่วมกัน พบว่าสารสกัดหยาบเมทานอลของใบและเมล็ดที่ความ เข้มข้น 125-2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูงที่สุด 4 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29 เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 เซลล์มะเร็งช่องปากชนิด KB และเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ในขณะที่เดียวกันสารสกัดเมทานอลของใบและเมล็ดมีความ เป็นพิษต่อเซลล์ปกติที่ความเข้มข้นต่ำคือ เซลล์เคอราติโนไซต์มนุษย์ชนิด HaCaT เซลล์ผิวหนังของ หนูชนิด L929 และเซลล์เยื่อบุไตลิงชนิด Vero

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ยังไม่พบในพืช *S. tomentosa* ซึ่งพบในพืชสกุลและ ตระกูลเดียวกัน เช่น การศึกษาของ Vithya และคณะ (2012) มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของ สารสกัดหยาบเมทานอลจาก *S. interrupta* โดยนำมาทดสอบกับเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa และเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่  $IC_{50}$  เท่ากับ 211.5 และ 158.2 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร เมื่อนำมาเปรียบเทียบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของพืชในสกุลเดียวกัน พบว่ามีความ เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูงกว่าสารสกัดเมทานอลของใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษ เช่นเดียวกับ การศึกษาของ Trang และคณะ (2021) พบว่าสกัดแยกส่วนจากคลอโรฟอร์มของราก *S. flavescens* สามารถยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 47.68 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร และจากการศึกษาของ Mousavia และคณะ (2014) พบว่าสารสกัดหยาบเมทานอลของ ราก *S. pachycarpa* มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa และเซลล์มะเร็งเต้านม ชนิด MCF-7 มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 84.07 และ 52.33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นนำไป แยกส่วนด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน บิวทานอล และน้ำ พบว่าสารสกัดแยกส่วนในชั้นไดคลอโร มีเทนมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa และมะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 14.54 และ 27.09 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสกัดแยกส่วนในชั้นบิวทานอลมี

ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 86.20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 206.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และในสารสกัด แยกส่วนในชั้นน้ำไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด โดยมีค่า  $IC_{50}$  มากกว่า 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยส่วนของพืชและตัวทำละลายส่งผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ ในขณะที่เดียวกันพืชแต่ละชนิดมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติเช่นเดียวกับสารสกัดเมทานอลของใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ ดังการศึกษาของ Yoshiaki และคณะ (2004) นำสารสำคัญของพืชในสกุล *Sophora* คือ Tetrapterol G ที่ความเข้มข้น 15-500 ไมโครโมลาร์ มาทดสอบกับเซลล์ทั้งหมด 5 ชนิด ประกอบด้วยเซลล์มะเร็ง 2 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งช่องปากชนิด HSC-2 เซลล์มะเร็งต่อมน้ำลายชนิด HSG และเซลล์ปกติ 3 ชนิด คือ เซลล์ไฟโบรบลาสต์ชนิด HGF เซลล์โพรงประสาทฟันชนิด HPC เซลล์เอ็นยัดชนิด HPLF พบว่าสารสกัด Tetrapterol G มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด HSC-2 และเซลล์มะเร็งต่อมน้ำลายชนิด HSG มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 17 และ 26 ไมโครโมลาร์ ในขณะเดียวกันก็มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ คือ เซลล์ไฟโบรบลาสต์ชนิด HGF เซลล์โพรงประสาทฟันชนิด HPC และเซลล์เอ็นยัดชนิด HPLF มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 42, 26 และ 31 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าสารสำคัญที่ถูกแยกสารตามหัวของตัวทำละลายจะมีความสามารถในการออกฤทธิ์ได้ต่างกัน

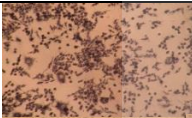

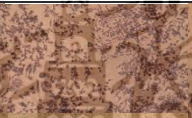
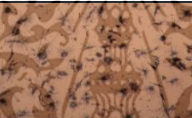


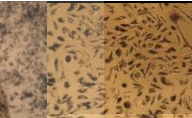
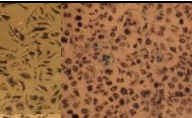
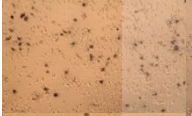
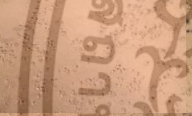


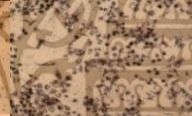
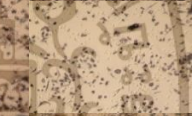
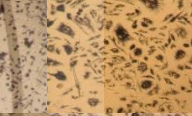
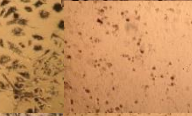
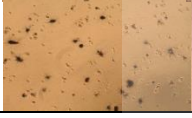
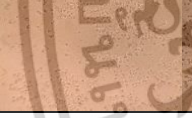




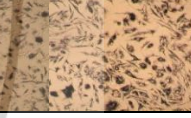
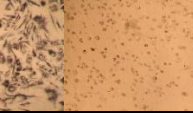
การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพด้านต่างๆของสารสกัดเมทานอลจากใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษ แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพในการศึกษาด้านต่าง ๆ โดยสารสกัดหยาบเมทานอลจากใบมีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงกว่าสารสกัดเมทานอลจากเมล็ดเพียงเล็กน้อย ดังนั้นจึงนำทั้งสองสารสกัดไปศึกษาต่อโดยการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Liquid-liquid extraction โดยใช้สารตัวทำละลายหัวที่แตกต่างกันเพื่อนำไปศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพดังต่อไปนี้ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และความเป็นพิษต่อเซลล์ต่อไป

ตารางที่ 4.10 ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50 ( $IC_{50}$ ) ของสารสกัดเมทานอลของใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษ ที่ความเข้มข้น 125-2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัด	ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50 ( $IC_{50}$ : $\mu\text{g/ml}$ )							
	HT-29	HepG2	MCF-7	KB	HeLa	L929	Vero	HaCaT
ใบ	489.43	550.53	1470.27	976.02	1617.06	1663.67	1532.85	930.51
เมล็ด	478.26	575.01	521.99	1026.37	1554.55	1603.01	1555.23	1006.22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.11 ลักษณะและปริมาณผลึกฟออร์มาซานภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ Inverted microscope ที่กำลังขยาย 100 เท่า หลังจากเติม MTT เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง ที่มีลักษณะผลึกฟออร์มาซานเปรียบเทียบกับเซลล์ชุดควบคุม และเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอลของใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษ ที่ความเข้มข้น 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัด	ชนิดเซลล์							
	เซลล์มะเร็ง				เซลล์ปกติ			
	HT-29	HepG2	MCF-7	KB	HeLa	L929	Vero	HaCaT
ชุดควบคุม								
ใบ								
เมล็ด								

## 4.2 ผลการแยกส่วนของสารสกัดด้วยวิธี Liquid- liquid extraction และผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดแยกส่วน

### 4.2.1 ผลการแยกส่วนของสารสกัดด้วยวิธี Liquid- liquid extraction

นำสารสกัดเมทานอลของใบและเมล็ดจากต้นสารพัดพิษมาสกัดต่อด้วยการแยกสารด้วยวิธี Liquid-liquid extraction โดยใช้ตัวทำละลายต่าง ๆ ซึ่งการแยกสารในการศึกษานี้จะเรียงลำดับจากตัวทำละลายสารขั้วต่ำไปยังสารขั้วสูง ได้แก่ เฮกเซน (H) ไดคลอโรมีเทน (D) เอทิลอะซิเตท (E) บิวทานอล (B) และน้ำ (W) ตามลำดับ โดยสารสกัดเมทานอลจากใบ (L) และเมล็ด (S) เมื่อนำมาแยกสารตามขั้วแล้วจะทำให้ได้สารสกัดแยกส่วนจากใบ (L) ทั้งหมด 5 สารสกัด และสารสกัดแยกส่วนจากเมล็ด (S) ทั้งหมด 5 สารสกัด รวมสารสกัดแยกส่วนทั้งหมด 10 สารสกัด เนื่องจากมีจำนวนสารสกัดจำนวนมากจึงกำหนดการเรียกสารสกัดแยกส่วนดังนี้ ตัวอักษรตัวแรก คือ ส่วนของพืช และตัวอักษรลำดับถัดมาจะเป็นชนิดของตัวทำละลาย เช่น สารสกัดแยกส่วนของใบ (L) จากตัวทำละลายเฮกเซน (H) จะเรียกว่า LH และสารสกัดแยกส่วนของเมล็ด (S) จากตัวทำละลายเฮกเซน (H) จะเรียกว่า SH ฉะนั้นจะทำการเรียกสารสกัดใบตามขั้วของตัวทำละลายดังนี้ LH, LD, LE, LB และ LW และจะเรียกสารสกัดเมล็ดตามขั้วของตัวทำละลายดังนี้ SH, SD, SE, SB และ SW

จากการสกัดแยกสารด้วยวิธี Liquid-liquid extraction พบว่าสารสกัดเมทานอลจากใบและเมล็ดนั้นเป็นสารขั้วสูง เนื่องจากได้ปริมาณสารสกัดในชั้นน้ำมากที่สุด รองลงมาคือชั้นบิวทานอล เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และน้อยที่สุดคือในชั้นเอทิลอะซิเตท ซึ่งลักษณะของสารสกัดแสดงดังรูปที่ 4.4 และตารางที่ 4.12 แสดงปริมาณสารสกัด ลักษณะ และสีของสารสกัดแยกส่วนจากใบและเมล็ด จากนั้นจะนำสารสกัดแยกส่วนจากใบและเมล็ดมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพดังต่อไปนี้ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และความเป็นพิษต่อเซลล์ ต่อไป



รูปที่ 4.4 ลักษณะของสารสกัดแยกส่วนจากใบและเมล็ด ด้วยวิธี Liquid-liquid extraction

โดย L คือสารสกัดจากใบ S คือสารสกัดจากเมล็ด H คือ ตัวทำละลายเฮกเซน

D คือ ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน E คือ ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท

B คือ ตัวทำละลายบิวทานอล และ W คือ ตัวทำละลายน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.12 น้ำหนัก ร้อยละผลได้ ลักษณะ และรหัสสีของสารสกัดแยกส่วนจากใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษ

สารสกัดแยกส่วน	ตัวทำละลาย	ชื่อสารสกัด	น้ำหนัก (g)	ร้อยละผลได้	ลักษณะสารสกัด	สีของสารสกัด	รหัสสี
ใบ (L)	เฮกเซน (H)	LH	5.78	11.56	เหนียว	เขียวเข้ม	#232C16
	ไดคลอโรมีเทน (D)	LD	3.115	6.23	เหนียว	เขียวมะกอก	#434B1B
	เอทิลอะซิเตท (E)	LE	0.504	1.01	เหนียว	เหลืองเข้ม	#B57900
	บิวทานอล (W)	LB	7.91	15.82	เหนียว	เหลืองเข้มออกป็น้ำตาล	#95500C
	น้ำ (B)	LW	24.18	48.37	หนืด	เหลืองเข้ม	#E59E1F
	รวม		41.49	82.98			
เมล็ด (S)	เฮกเซน (H)	SH	7.21	14.42	หนืด	เหลือง	#FFD35F
	ไดคลอโรมีเทน (D)	SD	1.25	2.51	เหนียว	เหลืองออกป็นส้ม	#D79D41
	เอทิลอะซิเตท (E)	SE	0.69	1.37	หนืด	ส้มออกป็นเหลือง	#FFCF40
	บิวทานอล (W)	SB	13.18	26.36	เหนียว	ส้มเข้ม	#C37629
	น้ำ (B)	SW	22.18	44.36	เหนียว	เหลืองเข้มออกป็นส้ม	#E59E1F
	รวม		44.51	89.02			

## 4.2.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดแยกส่วนจากใบและเมล็ดของ ต้นสารพัดพิษ

### 4.2.2.1 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

#### 4.2.2.1.1 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดแยกส่วนจากใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษทั้งหมด 10 สารสกัด ความเข้มข้น 125-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโทร็อกซ์ เพื่อหาค่าร้อยละความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และค่า  $IC_{50}$  ของสารสกัด พบว่าสารสกัดแยกส่วนจากใบ (LH, LD, LE, LB และ LW) มีร้อยละความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH อยู่ในช่วง  $8.60 \pm 4.17 - 88.18 \pm 0.54$  (ตารางภาคผนวกที่ ข-12) เมื่อนำความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดแยกส่วนจากใบมาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโทร็อกซ์ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัด LE มีค่าสูงที่สุด คือ  $52.35 \pm 0.32$  mg TE/g extract และสารสกัด LW มีค่าต่ำที่สุด  $24.63 \pm 2.42$  mg TE/g extract ดังตารางที่ 4.13 และค่า  $IC_{50}$  ของสารสกัดจากใบอยู่ในช่วง 138.75 - 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัด LE, LD และ LB มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 138.75, 262.36 และ 705.65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสกัดที่มีค่า  $IC_{50}$  มากกว่า 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คือ สารสกัด LH และ LW เมื่อนำสารสกัดแยกส่วนจากใบมาพิจารณาร่วมกัน พบว่าสารสกัด LE มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด รองลงมาคือ LD, LB, LH และ LW ตามลำดับ

ในส่วนสารสกัดแยกส่วนจากเมล็ด (SH, SD, SE, SB และ SW) มีร้อยละความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH อยู่ในช่วง  $7.94 \pm 2.98 - 87.07 \pm 0.22$  (ตารางภาคผนวกที่ ข-12) เมื่อนำความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดแยกส่วนจากเมล็ดมาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโทร็อกซ์ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัด SE มีค่าสูงที่สุด คือ  $51.69 \pm 0.13$  mg TE/g extract และสารสกัด SW มีค่าต่ำที่สุด  $11.81 \pm 0.18$  mg TE/g extract ดังตารางที่ 4.13 และมีค่า  $IC_{50}$  ของสารสกัดแยกส่วนจากเมล็ดอยู่ในช่วง 223.00 - 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัด SE และ SD มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 223.00 และ 602.31 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสกัดแยกส่วนจากเมล็ด SH, SB และ SW มีค่า  $IC_{50}$  มากกว่า 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำมาพิจารณาร่วมกัน พบว่าสารสกัด SE มีค่าความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด รองลงมาคือ SD, SB, SH และ SW ตามลำดับ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดแยกส่วนจากใบและเมล็ด พบว่า สารสกัดในชั้นเอทิลอะซิเตทมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้สูงกว่าชั้นไดคลอโรมีเทน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.2.2.1.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดแยกส่วนของใบและเมล็ดทั้งหมด 10 สารสกัด โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 125-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโทรล็อก เพื่อหาค่าร้อยละความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS และค่า  $IC_{50}$  พบว่า สารสกัดแยกส่วนของใบและเมล็ดมีร้อยละความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS อยู่ในช่วง  $16.40 \pm 2.65 - 87.79 \pm 4.42$  (ตารางภาคผนวกที่ ข-13) เมื่อนำความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดแยกส่วนจากใบมาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัด LE มีต้านอนุมูลอิสระ ABTS สูงที่สุด คือ  $157.86 \pm 7.94$  mg TE/g extract และสารสกัด LH มีค่าต่ำที่สุด คือ  $67.64 \pm 4.99$  mg TE/g extract (ตารางที่ 4.13) และความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดจากใบมีค่า  $IC_{50}$  อยู่ในช่วง 174.19 - 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัด LD, LE และ LB มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 174.19, 216.02 และ 602.20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสกัด LH และ LW มีค่า  $IC_{50}$  มากกว่า 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำมาพิจารณาพร้อมกัน พบว่าสารสกัด LE มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS สูงที่สุด รองลงมาคือ LD, LB, LW และ LH ตามลำดับ

ในส่วนสารสกัดแยกส่วนจากเมล็ดมีร้อยละความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS อยู่ในช่วง  $1.68 \pm 1.25 - 76.28 \pm 0.56$  (ตารางภาคผนวกที่ ข-13) เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัด SE มีค่าสูงที่สุด คือ  $137.17 \pm 0.99$  mg TE/g extract และสารสกัด SW มีค่าต่ำที่สุด คือ  $15.67 \pm 3.32$  mg TE/g extract ดังตารางที่ 4.13 และความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดแยกส่วนจากเมล็ดมีค่า  $IC_{50}$  อยู่ในช่วง 407.03 - 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัด SE และ SD มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 407.03 และ 425.94 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสกัด SH, SB และ LW มีค่า  $IC_{50}$  มากกว่า 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำมาพิจารณาพร้อมกัน พบว่าสารสกัด SE มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS สูงที่สุด รองลงมาคือ SD, SB, SW และ SH ตามลำดับ

เมื่อนำมาเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดแยกส่วนจากใบและเมล็ดพบว่า สารสกัดในชั้นเอทิลอะซิเตทมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS สูงกว่าชั้นไดคลอโรมีเทน

#### 4.2.2.1.3 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

จากการทดสอบสารสกัดแยกส่วนจากใบและเมล็ดทั้ง 10 สารสกัด นำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ FRAP โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแกลลิก เพื่อหาค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP พบว่า สารสกัดแยกส่วนจากใบ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแกลลิกมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP อยู่ในช่วง  $19.67 \pm 0.82 - 57.23 \pm 0.03$  mg GAE/g extract (ตารางที่ 4.13) โดยความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP ของสารสกัด LE มีค่าสูงที่สุด คือ  $57.23 \pm$  เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์อื่นใดทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0.03 mg GAE/g extract และน้อยที่สุดในสารสกัด LW คือ  $19.67 \pm 0.82$  mg GAE/g extract ส่วน สารสกัดแยกส่วนจากเมล็ดเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแกลลิกมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ FRAP อยู่ในช่วง  $24.80 \pm 0.73 - 50.24 \pm 0.40$  mg GAE/g extract ดังตารางที่ 4.13 ซึ่ง ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP ของสารสกัดแยกส่วนจากเมล็ดสูงในสารสกัด SE และ SD คือ  $57.23 \pm 0.03$  และ  $54.02 \pm 0.57$  mg GAE/g extract ตามลำดับ และน้อยที่สุดในสารสกัด SB คือ  $24.80 \pm 0.73$  mg GAE/g extract เมื่อนำความสามารถต้านอนุมูลอิสระ FRAP ของสารสกัดแยกส่วนจากใบและเมล็ดมาพิจารณาาร่วมกัน พบว่า สารสกัดของใบและเมล็ดจากชั้นโคคลอโรมีเทน และเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ FRAP ได้ดีกว่าสารสกัดในตัวทำละลายเฮกเซน บิวทานอล และน้ำ

จากการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้ง 3 วิธีคือ DPPH, ABTS และ FRAP พบว่าสารสกัดแยกส่วนของใบและเมล็ดในชั้นตัวทำละลายโคคลอโรมีเทน และเอทิลอะซิเตทแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดี เป็นไปได้ว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีผลในตัวทำละลาย ขี้ต่าง ๆ เป็นผลมาจากการแยกสารตามขี้ตัวทำละลาย ทำให้เกิดการลดและเพิ่มประสิทธิภาพของ สารสำคัญที่อยู่ในตัวทำละลายและสารบางตัวมีความเป็นไปได้ที่ต้องแสดงประสิทธิภาพทางฤทธิ์ทางชีวภาพแบบส่งเสริมกัน

#### 4.2.2.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

เนื่องจากในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบเมทานอลมี ความสามารถในการยับยั้งเฉพาะเชื้อ *B. cereus* และ *K. rhizophira* ฉะนั้นในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้ง แบคทีเรียของสารสกัดแยกส่วนจากใบและเมล็ดได้นำสารสกัดแยกส่วนทั้ง 10 สารสกัดมาทดสอบกับ เชื้อแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์เท่านั้น คือ *B. cereus* และ *K. rhizophira* ด้วยวิธี Paper disc diffusion โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 3 มิลลิกรัมต่อดิสก์ และยาเจนตามัยซิน 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ เป็น ตัวควบคุมเชิงบวก และเมทานอลเป็นตัวควบคุมเชิงลบ จากการทดลองพบว่าสารสกัดแยกส่วนจากใบ มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *K. rhizophira* และ *B. cereus* โดยสารสกัด LD และ LE มีความสามารถยับยั้งเชื้อ *K. rhizophira* มีค่าบริเวณยับยั้งเท่ากับ  $8.23 \pm 0.08$  และ  $8.43 \pm 0.07$  มิลลิเมตร ตามลำดับ เช่นเดียวกับความสามารถยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ของสารสกัด LD และ LE มีค่า  $7.21 \pm 0.06$  และ  $7.87 \pm 0.06$  มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งสารสกัด LH, LB และ LW ไม่พบบริเวณ ยับยั้งเชื้อ *K. rhizophira* และ *B. cereus*

ในส่วนสารสกัดแยกส่วนจากเมล็ดพบบริเวณยับยั้งเชื้อ *K. rhizophira* และ *B. cereus* ของสารสกัด SD และ SE ซึ่งสารสกัด SH, SH และ SW ไม่พบบริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ดัง รูปที่ 4.5 โดยสารสกัดแยกส่วนจากเมล็ดมีความสามารถยับยั้งเชื้อ *K. rhizophira* สารสกัด SD และ SE มีค่าบริเวณยับยั้งเท่ากับ  $9.57 \pm 0.04$  และ  $7.16 \pm 0.06$  มิลลิเมตร ตามลำดับ และมีบริเวณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ของสารสกัด SD และ SE มีค่าบริเวณยับยั้ง  $9.33 \pm 0.10$  และ  $7.11 \pm 0.01$  มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.14 และรูปที่ 4.5)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.13 แสดงความสามารถต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP ของสารสกัดแยกส่วนจากใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษ ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม และค่า IC<sub>50</sub> ของสารสกัดที่ความเข้มข้น 125-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม

การทดลอง	DPPH				ABTS				FRAP	
	mg TE/g extract		IC <sub>50</sub> (µg/ml)		mg TE/g extract		IC <sub>50</sub> (µg/ml)		mg GAE/g extract	
	ใบ	เมล็ด	ใบ	เมล็ด	ใบ	เมล็ด	ใบ	เมล็ด	ใบ	เมล็ด
เฮกเซน (H)	26.05 <sup>c</sup> ±0.27	22.14 <sup>c</sup> ±2.70	>1000	>1000	67.64 <sup>d</sup> ±4.99	15.67 <sup>e</sup> ±3.32	>1000	>1000	28.87 <sup>d</sup> ±1.07	28.79 <sup>d</sup> ±0.96
ไดคลอโรมีเทน (D)	51.89 <sup>a</sup> ±1.23	34.32 <sup>b</sup> ±0.48	262.36	602.31	155.33 <sup>a</sup> ±3.20	111.59 <sup>b</sup> ±3.03	216.02	425.94	54.02 <sup>b</sup> ±0.57	46.05 <sup>b</sup> ±0.74
เอทิลอะซิเตท (E)	52.35 <sup>a</sup> ±0.32	51.69 <sup>a</sup> ±0.13	138.75	223.00	157.86 <sup>a</sup> ±7.94	137.17 <sup>a</sup> ±0.99	174.19	407.03	57.23 <sup>a</sup> ±0.03	50.24 <sup>a</sup> ±0.40
บิวทานอล (B)	36.97 <sup>b</sup> ±1.61	25.69 <sup>c</sup> ±3.92	705.65	>1000	121.60 <sup>b</sup> ±2.12	49.09 <sup>c</sup> ±2.26	602.20	>1000	25.50 <sup>c</sup> ±1.63	36.37 <sup>c</sup> ±1.18
น้ำ (W)	24.63 <sup>c</sup> ±2.42	11.81 <sup>d</sup> ±0.18	>1000	>1000	74.51 <sup>c</sup> ±2.80	47.52 <sup>d</sup> ±1.78	>1000	>1000	19.67 <sup>e</sup> ±0.82	24.80 <sup>e</sup> ±0.73

หมายเหตุ ผลลัพธ์แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษร a-e ภายในคอลัมน์เดียวกันบ่งชี้ความสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ด้วยวิธี Duncan's multiple range test

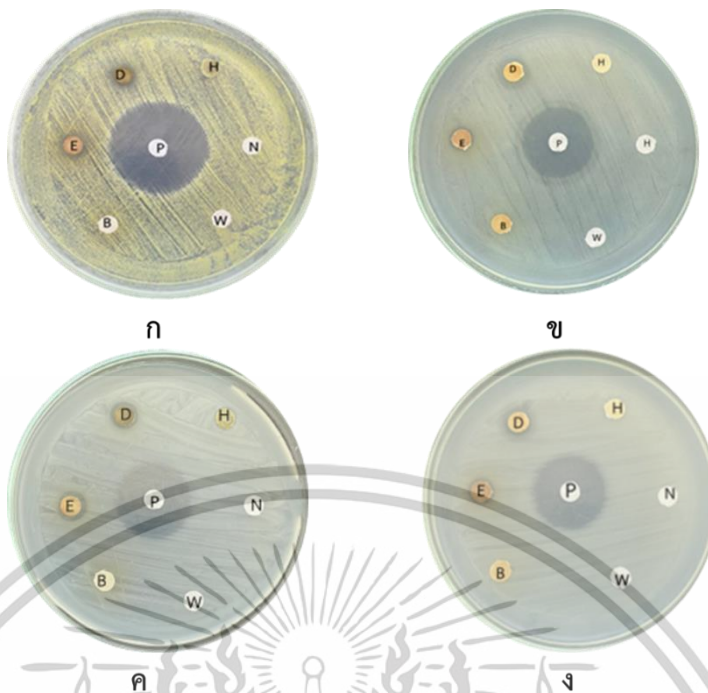
เมื่อนำสารสกัดแยกส่วนจากใบและเมล็ดมาพิจารณาร่วมกัน พบว่าสารสกัดแยกส่วนจากใบและเมล็ดมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *K. rhizophira* และ *B. cereus* ได้ในชั้นตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนและเอทิลอะซิเตทเท่านั้น โดยสารสกัดในชั้นตัวทำละลายเฮกเซน บิวทานอล และน้ำ ไม่พบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับบริเวณยับยั้งของยาปฏิชีวนะเจนตามัยซินของเชื้อ *K. rhizophira* มีค่า  $22.19 \pm 0.07$  มิลลิเมตร และเชื้อ *B. cereus* มีค่า  $25.98 \pm 0.67$  มิลลิเมตร สารสกัดแยกส่วนจากใบและเมล็ดมีบริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรียต่ำกว่ายาปฏิชีวนะเจนตามัยซินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามในการสกัดสารแยกส่วน สารในชั้นตัวทำละลายต่าง ๆ อาจส่งผลต่อสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย เนื่องจากสารสกัดมีฤทธิ์ส่งเสริมกันเมื่อสารสกัดถูกแยกให้บริสุทธิ์ตามหัวของตัวทำละลายส่งผลให้เกิดฤทธิ์ทางชีวภาพลดลง

ตารางที่ 4.14 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดแยกส่วนของใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อดิสก์

เชื้อ	บริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (มิลลิเมตร)			
	<i>K. rhizophira</i>		<i>B. cereus</i>	
	ใบ	เมล็ด	ใบ	เมล็ด
เฮกเซน (H)	0	0	0	0
ไดคลอโรมีเทน (D)	$8.23^c \pm 0.08$	$9.57^b \pm 0.04$	$7.21^c \pm 0.06$	$9.33^b \pm 0.10$
เอทิลอะซิเตท (E)	$8.43^b \pm 0.07$	$7.16^c \pm 0.06$	$7.87^b \pm 0.06$	$7.11^c \pm 0.01$
บิวทานอล (B)	0	0	0	0
น้ำ (W)	0	0	0	0
เจนตามัยซิน (P)	$22.19^a \pm 0.07$		$25.98^a \pm 0.67$	

หมายเหตุ ผลลัพธ์แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษร a-c บ่งชี้มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ด้วยวิธี Duncan's multiple range test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 แสดงบริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดแยกส่วนของใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษ ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อดิสก์ (ก) สารสกัดแยกส่วนจากใบของเชื้อ *K. rhizophila* (ข) สารสกัดแยกส่วนจากเมล็ดของ *K. rhizophila* (ค) สารสกัดแยกส่วนจากใบของเชื้อ *B. cereus* (ง) สารสกัดแยกส่วนจากเมล็ดของเชื้อ *B. cereus* โดยตัวอักษร H คือ สารสกัดในชั้นเฮกเซน D คือ สารสกัดในชั้นไดคลอโรมีเทน E คือ สารสกัดในชั้นเอทิลอะซิเตท B คือ สารสกัดในชั้นบิวทานอล W คือ สารสกัดในชั้นน้ำ N คือ ชุดควบคุมเชิงลบ และ P คือ ยาปฏิชีวนะเจนตามัยซิน

#### 4.2.2.3 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopa chrome นำมาทดสอบกับสารสกัดแยกส่วนจากใบและเมล็ดที่ระดับความเข้มข้น 125-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก 100-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และหาค่าร้อยละความสามารถของฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและค่า  $IC_{50}$  พบว่าสารสกัดแยกส่วนจากใบมีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสอยู่ในช่วง  $17.51 \pm 0.32 - 58.92 \pm 1.31$  (ตารางที่ 4.15) โดยความสามารถของฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัด LE มีร้อยละการยับยั้งดีที่สุด คือ  $58.92 \pm 1.31$  และมีค่า  $IC_{50}$  น้อยที่สุดเท่ากับ 397.06 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัด LH, LD, LB และ LW มีค่า  $IC_{50}$  มากกว่า 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อพิจารณาที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเพียงสารสกัด LE เท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ในส่วนของสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สกัดแยกส่วนจากเมล็ด มีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสอยู่ในช่วง  $4.08 \pm 0.67 - 18.16 \pm 0.70$  สารสกัดที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัด SE มีร้อยละความสามารถของฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุด คือ  $18.16 \pm 0.70$  มีค่า  $IC_{50}$  มากกว่า 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกับสารสกัด SH, SE, SB และ SW มีค่า  $IC_{50}$  มากกว่า 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เมื่อนำสารสกัดแยกส่วนจากใบและเมล็ดมาพิจารณาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสรวมกันที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเพียงสารสกัด LE เท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสารสกัดในชั้นตัวทำละลายในชั้นอื่น ๆ รวมถึงสารสกัดแยกส่วนจากเมล็ดไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 293.54 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดแยกส่วนจากใบและเมล็ดของสารพัดพิษมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสต่ำกว่าสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก

**ตารางที่ 4.15** ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดแยกส่วนจากใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษ ที่ระดับความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า  $IC_{50}$  ของสารสกัดแยกส่วน 125-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัด	ร้อยละความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส		$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )		กรดแอสคอร์บิก
	ใบ	เมล็ด	ใบ	เมล็ด	
เฮกเซน (H)	$28.96^c \pm 1.76$	$4.37^d \pm 1.01$	>1000	>1000	
ไดคลอโรมีเทน (D)	$35.73^b \pm 0.67$	$11.49^b \pm 1.72$	>1000	>1000	
เอทิลอะซิเตท (E)	$58.92^a \pm 1.31$	$18.16^a \pm 0.70$	397.06	>1000	293.54
บิวทานอล (B)	$17.51^d \pm 0.32$	$7.36^c \pm 5.19$	>1000	>1000	
น้ำ (W)	$17.65^d \pm 1.81$	$4.08^d \pm 0.67$	>1000	>1000	

หมายเหตุ ผลลัพธ์แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษร a-d ภายในคอลัมน์เดียวกันบ่งชี้ความสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ด้วยวิธี Duncan's multiple range test

#### 4.2.2.4 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบ

##### 4.2.2.4.1 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ในหลอดทดลอง

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ในหลอดทดลอง โดยใช้ SNP เป็นสารเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ นำมาทดสอบกับสารสกัดแยกส่วนของใบและเมล็ดความเข้มข้น 125-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก ความเข้มข้น 100-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และหาค่าร้อยละความสามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ และค่า  $IC_{50}$  เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่าสารสกัดแยกส่วนจากใบมีความสามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์สูงที่สุดในชั้นเอทิลอะซิเตท (LE) ที่ความเข้มข้นสารสกัด 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร มีค่าร้อยละ  $57.27 \pm 1.74$  และมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 397.06 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร และสารสกัด LH, LD, LB และ LW มีค่า  $IC_{50}$  มากกว่า 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร (ตารางที่ 4.16) และสารสกัดแยกส่วนจากเมล็ด ที่ความเข้มข้นสารสกัด 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร พบว่าสารสกัด SD มีค่าร้อยละยับยั้งไนตริกออกไซด์สูงที่สุดมีค่า  $57.46 \pm 0.59$  และมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 822.51 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร และสารสกัด SH, SE, SB และ SW มีค่า  $IC_{50}$  มากกว่า 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร กล่าวคือสารสกัด LE และสารสกัด SD มีความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่มีค่า  $IC_{50}$  866.55 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร พบว่าสารสกัด LE และ SD มีฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้ดีกว่าสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก ดังนั้นจึงนำสารสกัดแยกส่วนของใบและเมล็ดมาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ภายในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 ต่อไป

ตารางที่ 4.16 ร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์ในหลอดทดลองของสารสกัดแยกส่วนจากใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร และค่า  $IC_{50}$  ของสารสกัดที่ความเข้มข้น 125-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร

สารสกัด	ร้อยละการยับยั้ง		$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	ไนตริกออกไซด์ ( $\mu\text{g/ml}$ )		ใบ	เมล็ด
	ใบ	เมล็ด		
เฮกเซน (H)	$32.00^b \pm 1.76$	$43.91^{bc} \pm 2.34$	>1000	>1000
ไดคลอโรมีเทน (D)	$31.90^b \pm 0.67$	$57.46^a \pm 0.59$	>1000	822.51
เอทิลอะซิเตท (E)	$57.27^a \pm 1.74$	$49.35^b \pm 3.79$	397.06	>1000
บิวทานอล (B)	$7.73^c \pm 0.32$	$38.86^c \pm 7.56$	>1000	>1000
น้ำ (W)	$16.73^d \pm 1.81$	$38.00^c \pm 4.39$	>1000	>1000

หมายเหตุ ผลลัพธ์แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษร a-d ภายในคอลัมน์

เดียวกันบ่งชี้ความสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ด้วยวิธี Duncan's multiple range test

#### 4.2.2.4.2 ฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7

ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 โดยนำมาทดสอบกับสารสกัดแยกส่วนจากใบและเมล็ด ที่ระดับความเข้มข้น 125-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร เปรียบเทียบกับยาอินโดเมทาซินความเข้มข้น 125-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร และหาค่าร้อยละความสามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ และค่า  $IC_{50}$  พบว่าสารสกัดแยกส่วนจากใบที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร สารสกัด LE มีร้อยละความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ดีที่สุด คือ  $61.59 \pm 2.66$  และมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 393.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิลิตร โดยความเข้มข้นของสารสกัด LH, LD, LB และ LW มีร้อยละความสามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ต่ำ และมีค่า  $IC_{50}$  มากกว่า 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.17) และสารสกัดแยกส่วนจากเมล็ดความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสารสกัด SD มีร้อยละความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ที่ดีที่สุด คือ  $53.58 \pm 1.43$  และมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 870.14 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสารสกัด SH, SE, SB และ SW มีร้อยละความสามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ต่ำ และมีค่า  $IC_{50}$  มากกว่า 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กล่าวคือสารสกัด LE และสารสกัด SD มีความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ภายในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 ได้ดี เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับยาอินโดเมทาซินมีค่า  $IC_{50}$  307.73 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.18) พบว่ายานินโดเมทาซินมีฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้ดีกว่าสารสกัด SD และ LE

เมื่อนำผลการทดลองยับยั้งไนตริกออกไซด์ในหลอดทดลอง และในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 มีผลสอดคล้องกัน คือ สารสกัดแยกส่วนจากใบในชั้นเอทิลอะซิเตท (LE) และสารสกัดแยกส่วนจากเมล็ดในชั้นไดคลอโรมีเทน (SD) มีความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้ดี

ตารางที่ 4.17 ร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 ของสารสกัดแยกส่วนจากใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า  $IC_{50}$  ของสารสกัด 125-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การทดลอง	สารสกัด	ร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์ ( $\mu\text{g/ml}$ )		$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	
		ใบ	เมล็ด	ใบ	เมล็ด
เฮกเซน	(H)	$41.89^e \pm 2.05$	$42.02^d \pm 2.67$	>1000	>1000
ไดคลอโรมีเทน	(D)	$43.71^d \pm 1.05$	$53.58^a \pm 1.43$	>1000	870.14
เอทิลอะซิเตท	(E)	$61.59^a \pm 2.66$	$47.56^b \pm 2.41$	393.18	>1000
บิวทานอล	(B)	$44.37^b \pm 2.92$	$43.65^d \pm 2.96$	>1000	>1000
น้ำ	(W)	$44.21^c \pm 1.76$	$45.11^c \pm 2.01$	>1000	>1000

หมายเหตุ ผลลัพธ์แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษร a-d ภายในคอลัมน์เดียวกันบ่งชี้ความสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ด้วยวิธี Duncan's multiple range test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.18 ร้อยละความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ของตัวควบคุมเชิงบวกในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 และค่า IC<sub>50</sub>

สาร	ความเข้มข้น ( $\mu\text{g/ml}$ )	ร้อยละการยับยั้ง ไนตริกออกไซด์ ( $\mu\text{g/ml}$ )	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )
Indomethacin	125	39.58 <sup>d</sup> ±1.46	307.73
	250	46.09 <sup>c</sup> ±0.82	
	500	64.17 <sup>b</sup> ±1.05	
	1000	77.52 <sup>a</sup> ±2.03	

หมายเหตุ ผลลัพธ์แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษร a-d ภายในคอลัมน์เดียวกันบ่งชี้ความสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ด้วยวิธี Duncan's multiple range test

#### 4.2.2.5 ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติทั้งหมด 8 ชนิด ประกอบด้วยเซลล์มะเร็ง 5 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29 เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 เซลล์มะเร็งช่องปากชนิด KB และเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa และเซลล์ปกติ 3 ชนิด ประกอบด้วยเซลล์เคอราติโนไซต์มนุษย์ชนิด HaCaT เซลล์ผิวหนังของหนูชนิด L929 และเซลล์เยื่อบุไตชนิด Vero ด้วยวิธี MTT โดยทดสอบกับสารสกัดแยกส่วนจากใบและเมล็ด ที่ระดับความเข้มข้น 125-2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อหาค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ (ตารางภาคผนวกที่ ข 14-29) และค่า IC<sub>50</sub> พบว่าสารสกัด LH, LD และ LE ที่ความเข้มข้น 125-2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ โดยสารสกัด LD มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทุกชนิด คือ เซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29 เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 และเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด KB และเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa โดยมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 945.23, 595.29, 760.42, 303.88 และ 1974.22 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสกัด LH และ LE เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29 เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 และเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด KB โดยสารสกัด LH มีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 709.10, 503.43, 1192.10 และ 665.09 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสกัด LE มีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 720.29, 1854.91, 1490.83 และ 976.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งสารสกัด LH และ LE มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa ต่ำโดยมีค่า IC<sub>50</sub> มากกว่า 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัด LB เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29 และเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 มีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 1775.45 และ 1725.14 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งสารสกัด LB มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 เซลล์มะเร็งช่องปากชนิด KB และเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa ต่ำ เนื่องจากมีค่า IC<sub>50</sub> มากกว่า 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัด LW มีความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทุกชนิดต่ำ มีค่า  $IC_{50}$  มากกว่า 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัด LH, LD และ LE มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติทั้ง 3 ชนิด คือ เซลล์เยื่อบุไตลิงชนิด Vero เซลล์เคอราติโนไซต่มนุษย์ชนิด HaCaT และเซลล์ผิวหนังของหนูชนิด L929 ซึ่งสารสกัด LH มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 1681.66, 790.39 และ 704.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สารสกัด LD มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 1738.20, 501.88 และ 429.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสกัด LE มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 1947.06, 780.49 และ 851.62 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสกัด LB มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ 2 ชนิด คือ เซลล์เคอราติโนไซต่มนุษย์ชนิด HaCaT และเซลล์ผิวหนังของหนูชนิด L929 มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 1264.21 และ 1607.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งสารสกัด LB มีความเป็นพิษต่อเซลล์เยื่อบุไตลิงชนิด Vero ต่ำ เนื่องจากมีค่า  $IC_{50}$  มากกว่า 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัด LW มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติทั้ง 3 ชนิดต่ำ โดยมีค่า  $IC_{50}$  มากกว่า 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.19)

เมื่อนำสารสกัดแยกส่วนจากใบมาพิจารณาร่วมกัน พบว่าสารสกัด LH, LD และ LE มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 3 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29 เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 และเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด KB ในระดับสูง ในขณะที่เดียวกันสารสกัด LH, LD และ LE มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติเซลล์เคอราติโนไซต่มนุษย์ชนิด HaCaT เซลล์ผิวหนังของหนูชนิด L929 และเซลล์เยื่อบุไตลิงชนิด Vero เช่นกัน

สารสกัดแยกส่วนจากเมล็ดที่ความเข้มข้น 125-2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัด SH, SD และ SE มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ โดยสารสกัด SD มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทุกชนิด คือ เซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29 เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 เซลล์มะเร็งช่องปากชนิด KB และเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 949.46, 703.99, 843.72, 204.60 และ 1721.70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสกัด SH และ SE เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29 เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 และเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด KB โดยสารสกัด SH มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 724.88, 601.63, 875.63 และ 1489.21 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสกัด SE มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 1868.48, 1638.31, 1792.94 และ 1229.41 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งสารสกัด SH และ SE มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa ต่ำ โดยมีค่า  $IC_{50}$  มากกว่า 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัด SB เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29 และเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 1818.02 และ 1565.44 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งสารสกัด SB มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 เซลล์มะเร็งช่องปากชนิด KB และเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa ต่ำ เนื่องจากมีค่า  $IC_{50}$  มากกว่า 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัด SW มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทุกชนิดต่ำ มีค่า  $IC_{50}$  มากกว่า 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัด SH, SD และ SE มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติทั้ง 3 ชนิด คือ เซลล์เยื่อบุไตลิงชนิด Vero เซลล์เคอราติโน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไซต์มนุษย์ชนิด HaCaT และเซลล์ผิวหนังของหนูชนิด L929 ซึ่งสารสกัด SH มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 1978.413, 635.15 และ 1284.61 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สารสกัด SD มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 1722.46, 261.26 และ 281.41 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสกัด SE มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 1866.16, 1100.61 และ 814.82 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสกัด SB มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ 2 ชนิด คือ เซลล์เคอราติโนไซต์มนุษย์ชนิด HaCaT และเซลล์ผิวหนังของหนูชนิด L929 มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 1903.51 และ 1486.57 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งสารสกัด SB มีความเป็นพิษต่อเซลล์เยื่อบุไตลิงชนิด Vero ต่ำ เนื่องจากมีค่า  $IC_{50}$  มากกว่า 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัด SW มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติทั้ง 3 ชนิด ต่ำ โดยมีค่า  $IC_{50}$  มากกว่า 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.19)

เมื่อนำสารสกัดแยกส่วนจากใบมาพิจารณาาร่วมกันพบว่าสารสกัด SH, SD และ SE เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 3 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29 เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 และเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด KB ในขณะที่เดียวกันสารสกัด SH, SD และ SE มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติเซลล์เคอราติโนไซต์มนุษย์ชนิด HaCaT เซลล์ผิวหนังของหนูชนิด L929 และเซลล์เยื่อบุไตลิงชนิด Vero เช่นกัน

เมื่อนำสารสกัดแยกส่วนจากใบและเมล็ดมาพิจารณาร่วมกัน พบว่ามีผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติของสารสกัดที่ความเข้มข้นของสารสกัด 125-2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในชั้นตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทิลอะซิเตท มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งได้ทั้งในเซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29 เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 และเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด KB และมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa ต่ำ อย่างไรก็ตามชั้นตัวทำละลายข้างต้นก็มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติทุกชนิดสูงเช่นกัน

ในการศึกษาสารสกัดแยกส่วนจากใบและเมล็ด พบว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย ฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ และพบว่าสารสกัดแยกส่วนในชั้นไดคลอโรมีเทนและเอทิลอะซิเตท มีฤทธิ์ทางชีวภาพดีกว่าสารสกัดแยกส่วนในชั้นอื่น ๆ ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะนำสารสกัดแยกส่วนจากใบและเมล็ดในชั้นไดคลอโรมีเทนและเอทิลอะซิเตทไปแยกสารสกัดให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Column chromatography และนำไปศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และฤทธิ์ต้านการอักเสบ รวมทั้งการระบุชนิดของสารสำคัญในสารสกัดส่วนย่อยต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.19** แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50 ในเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ ของสารสกัดแยกส่วนจากใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษ ที่ทดสอบในระดับความเข้มข้น 125-2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ส่วนของพืช	สารสกัด	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50							
		IC <sub>50</sub> (µg/ml)							
		เซลล์มะเร็ง					เซลล์ปกติ		
		HT-29	HepG2	MCF-7	KB	HeLa	Vero	HaCaT	L929
ใบ	เฮกเซน (H)	709.10	503.43	1192.10	665.09	>2000	1681.66	790.39	704.01
	ไดคลอโรมีเทน (D)	945.23	595.29	760.42	303.88	1974.22	1738.20	501.88	429.05
	เอทิลอะซิเตท (E)	720.29	1854.91	1490.83	976.01	>2000	1947.06	780.49	851.62
	บิวทานอล (B)	1775.45	1725.14	>2000	>2000	>2000	>2000	1264.21	1607.39
	น้ำ (B)	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
เมล็ด	เฮกเซน (H)	724.88	601.63	875.63	1489.21	>2000	1978.413	635.15	1284.61
	ไดคลอโรมีเทน (D)	949.46	703.99	843.72	204.60	1721.70	1722.46	261.26	281.41
	เอทิลอะซิเตท (E)	1868.48	1638.31	1792.94	1229.41	>2000	1866.166	1100.61	814.82
	บิวทานอล (B)	1818.02	1565.44	>2000	>2000	>2000	>2000	1903.51	1486.57
	น้ำ (W)	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000

### 4.3 ผลการแยกสารส่วนย่อยด้วยวิธี Column chromatography และการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดส่วนย่อย

#### 4.3.1 ผลการแยกสารส่วนย่อยด้วยวิธี Column chromatography

จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดแยกส่วนด้วยวิธี Liquid-liquid extraction พบว่าสารสกัดแยกส่วนจากใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษในชั้นตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (H) และเอทิลอะซิเตท (E) มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง จึงนำมาศึกษาต่อโดยนำมาแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Column chromatography และจากการหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อแยกองค์ประกอบของสารสกัดใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษในชั้นตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนและเอทิลอะซิเตท คือระบบตัวทำละลายเฮกเซนต่อเอทิลอะซิเตทในอัตราส่วน 3: 7 เมื่อนำมาสังเกตการณ์เคลื่อนที่ของสารโดยการหยดสารสกัดลงบนแผ่น TLC และสเปรย์ Anisaldehyde reagent จากนั้นนำแผ่น TLC มาส่องภายใต้แสงยูวีความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร (รูปที่ 4.6 ก และ ข) ซึ่งสารสกัดสามารถเคลื่อนที่จากจุด Base line ไปยังจุด Front line และแสดงแถบแบนของสารได้



**รูปที่ 4.6** การเคลื่อนที่และองค์ประกอบของสารที่แยกบนแผ่น TLC แบบบางของระบบตัวทำละลายเฮกเซนต่อเอทิลอะซิเตท อัตราส่วน 3 : 7 โดย (ก) หลังสเปรย์ Anisaldehyde reagent และส่องภายใต้ UV ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และ (ข) ส่องภายใต้ UV ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร และตัวอักษร A คือ สารสกัดแยกส่วนจากเมล็ดในชั้นไดคลอโรมีเทน (SD) B คือ สารสกัดแยกส่วนจากใบในชั้นไดคลอโรมีเทน (LD) C คือ สารสกัดแยกส่วนจากเมล็ดในชั้นเอทิลอะซิเตท (SE) และ D คือ สารสกัดแยกส่วนจากใบในชั้นเอทิลอะซิเตท (LE)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการแยกองค์ประกอบของระบบตัวทำละลายเฮกเซนต่อเอทิลอะซิเตทในอัตราส่วน 3: 7 พบว่าสารสกัดใบในชั้นไดคลอโรมีเทน (LD) ที่แยกได้ 11 สารสกัดส่วนย่อย โดยจะเรียกว่า LDF (Leave of dichloromethane fraction 1-11) ตามด้วยลำดับของสารสกัดส่วนย่อยที่แยกได้ เช่น สารสกัดส่วนย่อยของสารสกัดใบในชั้นไดคลอโรมีเทนที่แยกได้ในลำดับสารที่ 1 จะเรียกว่า LDF1 ดังนั้นจะมี LDF1 - 11 โดยจะมีการรวมของสารสกัดที่แสดงองค์ประกอบสารเหมือนกันจากการตรวจสอบด้วย TLC เช่นเดียวกับสารสกัดใบในชั้นเอทิลอะซิเตท (LE) ที่แยกได้ 8 สารสกัดส่วนย่อยจะเรียกว่า LEF1 - 8 (Leave of ethyl acetate fraction 1 - 8) และสารสกัดเมล็ดในชั้นไดคลอโรมีเทน (SD) ที่แยกได้ 8 สารสกัดส่วนย่อย จะเรียกว่า SDF1 - 8 (Seed of dichloromethane fraction 1 - 8) และสารสกัดเมล็ดในชั้นเอทิลอะซิเตท (SE) ที่แยกได้ 8 สารสกัดส่วนย่อยเช่นกัน โดยจะเรียกว่า SEF1 - 8 (Seed of ethyl acetate fraction 1 - 8) ซึ่งลักษณะของสารสกัด LDF และสารสกัด LEF มีลักษณะเหนียว สีเหลืองเข้มออกไปทางสีเขียวเข้ม มีน้ำหนักรวมของสารสกัดส่วนย่อยเท่ากับ 7.36 และ 6.33 กรัม มีร้อยละผลได้รวม 73.57 และ 63.27 ตามลำดับ และสารสกัด SDF และสารสกัด SEF มีลักษณะเป็นน้ำมัน สีเหลืองออกไปทางสีส้มเข้ม มีน้ำหนักรวมของสารสกัด SDF และสารสกัด SEF เท่ากับ 6.15 และ 5.25 กรัม ตามลำดับ มีร้อยละผลได้รวม 61.53 และ 52.55 ตามลำดับ สารสกัดส่วนย่อยจากใบและเมล็ดในชั้นไดคลอโรมีเทนและเอทิลอะซิเตทสามารถแยกสารสกัดส่วนย่อยได้ทั้งหมดจำนวน 35 สารสกัดส่วนย่อย จากนั้นจึงนำมาศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS และ DPPH ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และฤทธิ์ต้านการอักเสบ

#### 4.3.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อย

ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อยจากใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษจะนำมาทดสอบความสามารถต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS เท่านั้น เนื่องจากการทดสอบด้วย DPPH และ ABTS ทำปฏิกิริยาได้ในตัวอย่างที่มีลักษณะเป็นน้ำมันได้ แต่วิธี FRAP เป็นการทดสอบความสามารถรีดิวซ์ของฟอสฟอรัส ซึ่งไม่เอื้อต่อปฏิกิริยารีดอกซ์ของสารประกอบบางชนิดที่เป็นน้ำมันหอมระเหย (Karolina, 2020) โดยนำสารสกัดส่วนย่อยทั้งหมด 35 สารสกัดส่วนย่อยที่ระดับความเข้มข้น 125-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโพลีฟีนอล ความเข้มข้น 20-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อหาค่าร้อยละความสามารถต้านอนุมูลอิสระ และค่า  $IC_{50}$  แสดงผลการศึกษาดังต่อไปนี้

##### 4.3.2.1 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

จากผลการทดลองความสามารถต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดส่วนย่อยจากใบและเมล็ดที่ความเข้มข้น 125-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดส่วนย่อยจากใบในชั้นไดคลอโรมีเทน (LDF1-11) มีร้อยละความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH อยู่ในช่วง  $51.44 \pm 1.03 - 71.20 \pm 0.40$  และมีค่า  $IC_{50}$  อยู่ในช่วง 144.02 - 970.47 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

โดยสารสกัด LDF5 มีร้อยละความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด มีค่า  $IC_{50}$  น้อยที่สุด เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เท่ากับ 144.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารสกัดส่วนย่อยจากใบในชั้นเอทิลอะซิเตท (LEF1 - 8) มีร้อยละความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH อยู่ในช่วง  $50.01 \pm 0.45 - 69.31 \pm 0.80$  และมีค่า  $IC_{50}$  อยู่ในช่วง 227.19 - 753.63 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งความสามารถต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด LEF5 มีร้อยละความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 227.19 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารสกัดส่วนย่อยจากเมล็ดในชั้นไดคลอโรมีเทน (SDF1 - 8) มีร้อยละความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH อยู่ในช่วง  $26.91 \pm 0.20 - 65.30 \pm 0.77$  และมีค่า  $IC_{50}$  อยู่ในช่วง  $326.79 - >1000$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัด SDF4 มีร้อยละความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 326.79 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสารสกัดส่วนย่อยจากเมล็ดในชั้นเอทิลอะซิเตท (SEF1 - 8) มีร้อยละความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH อยู่ในช่วง  $24.06 \pm 0.37 - 69.15 \pm 0.72$  มีค่า  $IC_{50}$  อยู่ในช่วง  $263.94 - >1000$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัด SEF8 มีร้อยละความสามารถต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 263.94 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 4.20 เมื่อนำสารสกัดส่วนย่อยจากใบและเมล็ดมาพิจารณาความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่า LDF5, LEF5, SDF4 และ SEF8 มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูง และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโทรล็อกซ์มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 47.69 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นสารสกัดส่วนย่อยในการศึกษาครั้งนี้มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ต่ำกว่าสารมาตรฐานโทรล็อกซ์

#### 4.3.2.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

จากผลการทดลองความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดส่วนย่อยจากใบและเมล็ดที่ความเข้มข้น 125-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าในสารสกัดส่วนย่อยจากใบในชั้นไดคลอโรมีเทน (LDF1-11) มีร้อยละความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS อยู่ในช่วง  $50.28 \pm 0.44 - 67.92 \pm 0.82$  มีค่า  $IC_{50}$  อยู่ในช่วง 231.35 - 988.46 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่ง LDF5 มีร้อยละความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS สูงที่สุด มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 231.35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารสกัดส่วนย่อยจากใบในชั้นเอทิลอะซิเตท (LEF1-8) มีร้อยละความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS อยู่ในช่วง  $50.38 \pm 0.44 - 68.02 \pm 0.17$  มีค่า  $IC_{50}$  อยู่ในช่วง 231.04 - 978.63 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัด LEF5 มีร้อยละความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS สูงที่สุด มีค่า  $IC_{50}$  231.04 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารสกัดส่วนย่อยจากเมล็ดในชั้นไดคลอโรมีเทน (SDF1-8) มีร้อยละความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS อยู่ในช่วง  $43.58 \pm 1.16 - 68.91 \pm 0.86$  มีค่า  $IC_{50}$  อยู่ในช่วง  $334.70 - >1000$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า SDF4 มีร้อยละความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS สูงที่สุด มีค่า  $IC_{50}$  คือ 334.70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัด SDF1 และ SDF2 มีค่า  $IC_{50}$  มากกว่า 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารสกัดส่วนย่อยจากเมล็ดในชั้นเอทิลอะซิเตท (SEF1-8) มีร้อยละความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS อยู่ในช่วง  $27.34 \pm 0.24 - 66.78 \pm 0.99$  มีค่า  $IC_{50}$  อยู่ในช่วง  $282.77 - >1000$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัด SEF8 มีร้อยละ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS สูงที่สุด มีค่า  $IC_{50}$  282.77 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 4.21

เมื่อนำสารสกัดส่วนย่อยจากใบและเมล็ดมาพิจารณาความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS ร่วมกัน พบว่าสารสกัด LDF5, LEF5, SDF4 และ SEF8 มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้สูง เนื่องจากมีค่า  $IC_{50}$  ต่ำ และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโทรล็อกซ์มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 57.71 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารมาตรฐานโทรล็อกซ์มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้สูงกว่าสารสกัด LDF5, LEF5, SDF4 และ SEF8 จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS และ DPPH พบว่าสารสกัดส่วนย่อยจากใบและเมล็ดมีผลการศึกษาความสามารถต้านอนุมูลอิสระที่สอดคล้องกัน โดยมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีในสารสกัด LDF5, LEF5, SDF4 และ SEF8 เช่นเดียวกันทั้ง 2 วิธี แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าสารสกัดส่วนย่อยมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าสารมาตรฐานโทรล็อกซ์

#### 4.3.3 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

จากการทดลองฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดแยกส่วนจากใบและเมล็ด แสดงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียเพียง 2 สายพันธุ์ คือ *K. rhizophila* และ *B. cereus* ดังนั้นจะทดลองฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดส่วนย่อยจากใบและเมล็ดกับเชื้อดังกล่าว ด้วยวิธี Paper disc diffusion ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อดิสก์ โดยใช้ยาปฏิชีวนะเจนตามัยซิน 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ เป็นชุดควบคุมเชิงบวก พบว่าสารสกัด LDF1 - 11 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *K. rhizophila* อยู่ในช่วง 0.00 - 10.10 ± 0.06 มิลลิเมตร และเชื้อ *B. cereus* อยู่ในช่วง 0.00 - 9.13 ± 0.02 มิลลิเมตร โดย LDF11 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *K. rhizophila* และ *B. cereus* สูงที่สุด และสารสกัด LEF1 - 8 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *K. rhizophila* อยู่ในช่วง 0.00 - 8.38 ± 0.03 มิลลิเมตร และมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. cereus* อยู่ในช่วง 0.00 - 8.40 ± 0.04 มิลลิเมตร ซึ่งสารสกัด LEF1 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *K. rhizophila* และเชื้อ *B. cereus* สูงที่สุด ในส่วนของสารสกัด SDF1 - 8 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *K. rhizophila* อยู่ในช่วง 0.00 - 7.73 ± 0.11 มิลลิเมตร และฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. cereus* อยู่ในช่วง 0.00 - 8.33 ± 0.02 มิลลิเมตร โดย SDF8 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *K. rhizophila* และ *B. cereus* สูงที่สุด และสารสกัด SEF1 - 8 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *K. rhizophila* อยู่ในช่วง 0.00 - 8.61 ± 0.04 มิลลิเมตร และฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. cereus* อยู่ในช่วง 0.00 - 9.01 ± 0.06 มิลลิเมตร ซึ่งสารสกัด SEF8 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อสูงที่สุด

เมื่อนำมาพิจารณาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *K. rhizophila* และ *B. cereus* ของสารสกัดส่วนย่อยจากใบและเมล็ด พบว่าสารสกัด LDF11 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *K. rhizophila* และ *B. cereus* สูงที่สุด และไม่พบบริเวณยับยั้งเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ ของสารสกัด LDF4, LDF9, LEF4, LEF7, SDF1, SDF2, SDF5, SDF7, SEF1, SEF3 และ SEF5 ผลดังตารางที่ 4.22 และรูปที่ 4.7 ที่แสดงบริเวณยับยั้งเชื้อ *K. rhizophila* และ *B. cereus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.20 แสดงร้อยละความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดส่วนย่อยจากใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า IC<sub>50</sub> ของสารสกัดที่ความเข้มข้น 125-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัด ส่วนย่อย	ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH							
	ร้อยละความสามารถต้านอนุมูลอิสระ				IC <sub>50</sub> (µg/ml)			
	LDF	LEF	SDF	SEF	LDF	LEF	SDF	SEF
1	61.46 <sup>d</sup> ±0.48	60.77 <sup>c</sup> ±0.43	48.94 <sup>f</sup> ±0.74	24.06 <sup>g</sup> ±0.37	486.89	446.36	>1000	>1000
2	60.95 <sup>d</sup> ±0.04	57.75 <sup>d</sup> ±0.43	26.91 <sup>g</sup> ±0.20	66.64 <sup>b</sup> ±0.99	318.08	499.28	>1000	302.98
3	60.23 <sup>d</sup> ±0.72	67.44 <sup>b</sup> ±0.62	63.16 <sup>b</sup> ±0.87	33.95 <sup>f</sup> ±0.76	497.97	241.38	423.33	>1000
4	53.79 <sup>f</sup> ±0.53	50.01 <sup>f</sup> ±0.45	65.30 <sup>a</sup> ±0.77	59.28 <sup>d</sup> ±0.12	891.94	753.63	326.79	482.27
5	71.20 <sup>a</sup> ±0.40	69.31 <sup>a</sup> ±0.80	56.45 <sup>d</sup> ±0.32	50.67 <sup>e</sup> ±0.12	144.02	227.19	562.74	988.93
6	66.60 <sup>b</sup> ±0.51	67.19 <sup>b</sup> ±0.23	61.76 <sup>c</sup> ±0.45	63.75 <sup>c</sup> ±0.31	269.76	247.66	447.53	439.51
7	70.10 <sup>a</sup> ±0.06	54.47 <sup>e</sup> ±0.80	52.55 <sup>e</sup> ±0.54	65.09 <sup>b</sup> ±0.51	224.74	615.19	980.33	306.64
8	58.22 <sup>e</sup> ±0.31	67.17 <sup>b</sup> ±0.60	61.91 <sup>c</sup> ±1.29	69.15 <sup>a</sup> ±0.72	492.51	254.79	461.97	263.94
9	51.44 <sup>g</sup> ±1.03				970.47			
10	65.27 <sup>c</sup> ±0.22				285.69			
11	60.86 <sup>d</sup> ±0.01				327.69			

หมายเหตุ เครื่องหมาย > แสดงค่า IC<sub>50</sub> ที่มีค่ามากกว่า 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดย LDF คือ สารสกัดส่วนย่อยจากใบในชั้นไดคลอโรมีเทน LEF คือ สารสกัดส่วนย่อยจากใบในชั้นเอทิลอะซิเตท SDF คือ สารสกัดส่วนย่อยจากเมล็ดในชั้นไดคลอโรมีเทน และ SEF คือ สารสกัดส่วนย่อยจากเมล็ดในชั้นเอทิลอะซิเตท และตัวอักษร a-g แสดงถึงความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan's multiple range test (p<0.05)

ตารางที่ 4.21 แสดงร้อยละความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระวิธี ABTS ของสารสกัดส่วนย่อยจากใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษที่ ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า IC<sub>50</sub> ของสารสกัดที่ความเข้มข้น 125-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัด ส่วนย่อย	ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS							
	ร้อยละความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS				IC <sub>50</sub> (µg/ml)			
	LDF	LEF	SDF	SEF	LDF	LEF	SDF	SEF
1	55.69 <sup>e</sup> ±0.75	64.72 <sup>c</sup> ±0.61	46.46 <sup>f</sup> ±0.59	27.34 <sup>g</sup> ±0.24	434.69	374.48	>1000	>1000
2	59.17 <sup>d</sup> ±0.95	60.03 <sup>d</sup> ±0.96	43.58 <sup>g</sup> ±1.16	61.64 <sup>b</sup> ±0.64	362.66	439.21	>1000	327.95
3	65.30 <sup>c</sup> ±0.37	67.49 <sup>ab</sup> ±0.53	65.99 <sup>b</sup> ±0.55	41.64 <sup>f</sup> ±0.59	326.86	243.97	445.90	>1000
4	51.37 <sup>f</sup> ±0.41	50.38 <sup>e</sup> ±0.44	68.91 <sup>a</sup> ±0.86	59.42 <sup>c</sup> ±1.01	964.94	978.63	334.70	438.62
5	67.92 <sup>a</sup> ±0.82	68.02 <sup>a</sup> ±0.17	53.97 <sup>d</sup> ±0.75	50.61 <sup>e</sup> ±0.46	231.35	231.04	570.22	944.01
6	58.22 <sup>e</sup> ±0.81	66.94 <sup>b</sup> ±0.78	63.88 <sup>bc</sup> ±0.64	56.48 <sup>d</sup> ±0.35	405.93	247.84	454.98	486.49
7	66.57 <sup>ab</sup> ±0.76	51.32 <sup>e</sup> ±0.42	50.94 <sup>e</sup> ±0.82	60.86 <sup>bc</sup> ±0.83	241.65	835.88	946.28	338.14
8	60.24 <sup>d</sup> ±0.62	61.52 <sup>d</sup> ±0.70	62.16 <sup>c</sup> ±0.36	66.78 <sup>a</sup> ±0.99	331.35	407.42	462.52	282.77
9	50.28 <sup>f</sup> ±0.44				988.46			
10	55.24 <sup>e</sup> ±1.01				434.57			
11	56.43 <sup>e</sup> ±0.71				427.45			

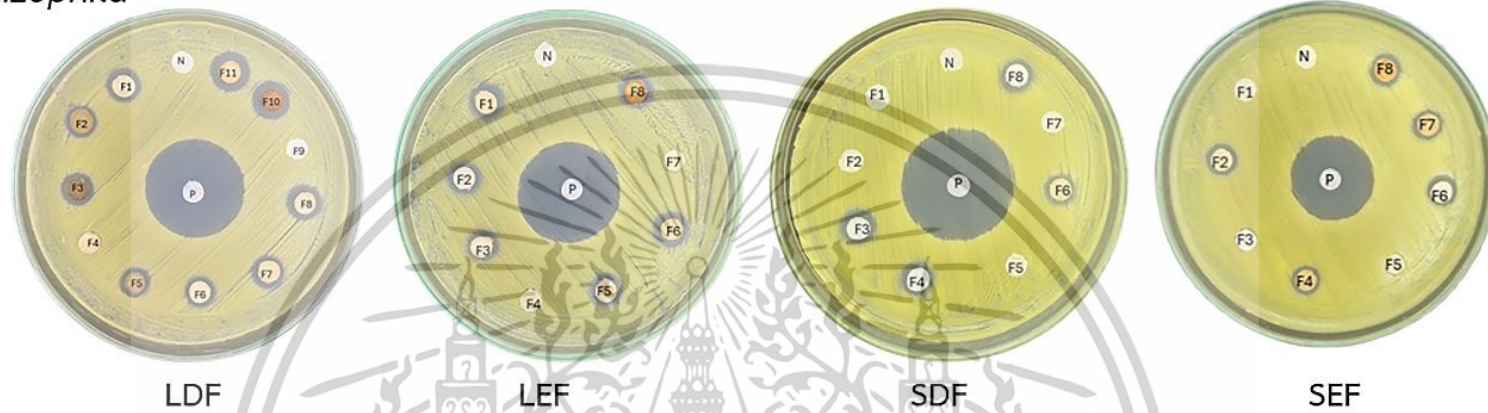
หมายเหตุ เครื่องหมาย > แสดงค่า IC<sub>50</sub> มีค่ามากกว่า 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดย LDF คือ สารสกัดส่วนย่อยจากใบในชั้นไดคลอโรมีเทน LEF คือ สารสกัดส่วนย่อยจากใบในชั้นเอทิลอะซิเตท SDF คือ สารสกัดส่วนย่อยจากเมล็ดในชั้นไดคลอโรมีเทน และ SEF คือ สารสกัดส่วนย่อยจากเมล็ดในชั้นเอทิลอะซิเตท และตัวอักษร a-g แสดงถึงความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan's multiple range test (p<0.05)

ตารางที่ 4.22 แสดงบริเวณยับยั้งเชื้อ *K. rhizophila* และ *B. cereus* ของสารสกัดส่วนย่อยจากใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อดิสก์

สารสกัดส่วนย่อย	<i>K. rhizophila</i>				<i>B. cereus</i>			
	LDF	LEF	SDF	SEF	LDF	LEF	SDF	SEF
1	8.47 <sup>d</sup> ±0.05	8.38 <sup>b</sup> ±0.03	0	0	8.78 <sup>c</sup> ±0.04	8.40 <sup>b</sup> ±0.04	0	0
2	7.90 <sup>ef</sup> ±0.04	7.68 <sup>e</sup> ±0.06	0	8.11 <sup>d</sup> ±0.00	7.49 <sup>d</sup> ±0.06	8.15 <sup>bc</sup> ±0.02	0	7.65 <sup>d</sup> ±0.04
3	8.46 <sup>d</sup> ±0.11	7.75 <sup>f</sup> ±0.05	7.48 <sup>c</sup> ±0.05	0	7.08 <sup>e</sup> ±0.07	8.20 <sup>bc</sup> ±0.06	7.15 <sup>c</sup> ±0.04	0
4	0	0	7.11 <sup>d</sup> ±0.04	8.20 <sup>c</sup> ±0.03	0	0	6.36 <sup>e</sup> ±0.05	7.72 <sup>e</sup> ±0.02
5	7.79 <sup>f</sup> ±0.06	7.97 <sup>d</sup> ±0.04	0	0	6.92 <sup>f</sup> ±0.01	8.06 <sup>d</sup> ±0.05	0	0
6	8.08 <sup>e</sup> ±0.01	8.12 <sup>e</sup> ±0.03	7.01 <sup>e</sup> ±0.01	8.00 <sup>e</sup> ±0.02	7.27 <sup>de</sup> ±0.04	7.95 <sup>e</sup> ±0.02	6.76 <sup>d</sup> ±0.05	8.87 <sup>c</sup> ±0.02
7	8.67 <sup>d</sup> ±0.11	0	0	8.25 <sup>c</sup> ±0.06	7.29 <sup>de</sup> ±0.00	0	0	8.96 <sup>c</sup> ±0.02
8	9.06 <sup>c</sup> ±0.07	7.98 <sup>e</sup> ±0.05	7.73 <sup>b</sup> ±0.11	8.61 <sup>b</sup> ±0.04	7.43 <sup>d</sup> ±0.02	8.17 <sup>bc</sup> ±0.06	8.33 <sup>b</sup> ±0.02	9.01 <sup>b</sup> ±0.06
9	0				0			
10	9.36 <sup>bc</sup> ±0.12				8.94 <sup>c</sup> ±0.02			
11	10.10 <sup>b</sup> ±0.06				9.13 <sup>b</sup> ±0.02			
เจนตามัยซิน		27.56 <sup>a</sup> ±0.70				25.24 <sup>a</sup> ±0.83		

หมายเหตุ LDF คือ สารสกัดส่วนย่อยจากใบในชั้นไดคลอโรมีเทน LEF คือ สารสกัดส่วนย่อยจากใบในชั้นเอทิลอะซิเตท SDF คือ สารสกัดส่วนย่อยจากเมล็ดในชั้นไดคลอโรมีเทน และ SEF คือ สารสกัดส่วนย่อยจากเมล็ดในชั้นเอทิลอะซิเตท และตัวอักษร a-f แสดงถึงความแตกต่างทางสถิติจากการทดสอบด้วยวิธี Duncan's multiple range test (p<0.05)

*K. rhizophila*



*B. cereus*



รูปที่ 4.7 แสดงบริเวณยับยั้งเชื้อ *K. rhizophila* และ *B. cereus* ของสารสกัดส่วนย่อยจากใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อดิสก์ โดย LDF คือ สารสกัดส่วนย่อยจากใบในชั้นไดคลอโรมีเทน LEF คือ สารสกัดส่วนย่อยจากใบในชั้นเอทิลอะซิเตท SDF คือ สารสกัดส่วนย่อยจากเมล็ดในชั้นไดคลอโรมีเทน และ SEF คือ สารสกัดส่วนย่อยจากเมล็ดในชั้นเอทิลอะซิเตท โดย N คือ ตัวควบคุมเชิงลบ และ P คือ ตัวควบคุมเชิงบวก

#### 4.3.4 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดส่วนย่อย

##### 4.3.4.1 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ในหลอดทดลอง

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ด้วยวิธี Nitric oxide scavenging assay โดยใช้ SNP นำมาทดสอบกับสารสกัดส่วนย่อยจากใบและเมล็ดความเข้มข้น 125-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (ภาพภาคผนวกที่ซ-6) และหาร้อยละความสามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ และค่า  $IC_{50}$  พบว่าสกัดส่วนย่อยจากใบในชั้นไดคลอโรมีเทน (LDF1-11) มีฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์เกินร้อยละ 50 เฉพาะสารสกัด LDF2 และ LDF5 มีค่าร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์  $73.85 \pm 1.28$  และ  $64.19 \pm 1.84$  ตามลำดับ ซึ่งมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 302.92 และ 559.23 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สารสกัดส่วนย่อยจากใบในชั้นเอทิลอะซิเตท (LEF1-8) มีฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์เกินร้อยละ 50 เฉพาะสารสกัด LEF1, LEF3 และ LEF5 มีค่าร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์  $57.72 \pm 0.78$ ,  $54.02 \pm 0.19$  และ  $69.68 \pm 0.61$  ตามลำดับ และมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 833.49, 848.11 และ 467.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดส่วนย่อยจากเมล็ดในชั้นไดคลอโรมีเทน (SDF1-8) พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์เกินร้อยละ 50 เฉพาะสารสกัด SDF4 และ SDF8 โดยมีค่าร้อยละ  $51.63 \pm 0.31$  และ  $64.30 \pm 0.93$  ตามลำดับ และมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 932.06 และ 735.23 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสกัดส่วนย่อยจากเมล็ดในชั้นเอทิลอะซิเตท (SEF1-8) พบฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์เกินร้อยละ 50 เฉพาะ SEF7 และ SEF8 มีค่าร้อยละ  $61.77 \pm 0.27$  และ  $50.20 \pm 0.54$  มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 708.87 และ 948.59 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.23)

เมื่อพิจารณาจากจากความเข้มข้นสารสกัดส่วนย่อยจากใบและเมล็ด พบว่าที่ค่า  $IC_{50}$  น้อยกว่า 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัด LDF2 มีฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์สูงที่สุด รองลงมาคือ LEF5 และน้อยที่สุดคือ LDF5 มีค่า  $IC_{50}$  302.92, 467.02 และ 559.23 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 866.90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกมีความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้ต่ำกว่าสารสกัด LDF2, LEF5 และ LDF5

##### 4.3.4.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ

###### ชนิด RAW 246.7

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 246.7 โดยใช้ LPS มาทดสอบกับสารสกัดส่วนย่อยจากใบและเมล็ดความเข้มข้น 125-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาเปรียบเทียบกับยาอินโดเมทาซินความเข้มข้น 125-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และหาร้อยละความสามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ และค่า  $IC_{50}$  พบว่าสกัดส่วนย่อยจากใบในชั้นไดคลอโรมีเทน (LDF1-11) มีฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์เกินร้อยละ 50 เฉพาะสารสกัด LDF2 และ LDF5 มีค่าร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์  $61.44 \pm 1.18$  และ  $59.79 \pm 0.47$  ตามลำดับ ซึ่งมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

319.71 และ 565.06 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สารสกัดส่วนย่อยจากใบในชั้นเอทิลอะซิเตท (LEF1-8) มีฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์เกินร้อยละ 50 เฉพาะสารสกัด LEF1, LEF3 และ LEF5 มีค่าร้อยละยับยั้งไนตริกออกไซด์  $51.19 \pm 1.08$ ,  $55.93 \pm 1.49$  และ  $58.91 \pm 0.95$  ตามลำดับ และมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 846.75, 858.23 และ 452.87 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดส่วนย่อยจากเมล็ดในชั้นไดคลอโรมีเทน (SDF1-8) พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์เกินร้อยละ 50 เฉพาะสารสกัด SDF4 และ SDF8 โดยมีค่าร้อยละ  $52.96 \pm 1.09$  และ  $55.49 \pm 0.78$  ตามลำดับ และมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 943.93 และ 745.92 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสกัดส่วนย่อยจากเมล็ดในชั้นเอทิลอะซิเตท (SEF1-8) พบฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์เกินร้อยละ 50 เฉพาะ SEF7 และ SEF8 มีค่าร้อยละ  $65.34 \pm 0.66$  และ  $52.74 \pm 0.41$  มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 694.48 และ 924.06 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.24)

เมื่อพิจารณาจากจากความเข้มข้นสารสกัดส่วนย่อยจากใบและเมล็ด พบว่าที่ค่า  $IC_{50}$  น้อยกว่า 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัด LDF2 มีฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์สูงที่สุด รองลงมาคือ LEF5 และน้อยที่สุดคือ LDF5 มีค่า  $IC_{50}$  319.71, 452.87 และ 565.06 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับยาอินโดเมทาซินมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 307.73 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ายานินโดเมทาซินมีความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้สูงกว่าสารสกัด LDF2, LEF5 และ LDF5

เมื่อนำสารสกัดส่วนย่อยจากใบและเมล็ดมาพิจารณาความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ในหลอดทดลอง และยับยั้งไนตริกออกไซด์ภายในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้เฉพาะสารสกัด LDF2, LDF5, LEF1, LEF3, LEF5, SDF4, SDF8, SEF7 และ SEF8 โดย LDF2 มีฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้สูงที่สุด

ตารางที่ 4.23 ร้อยละความสามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ของสารสกัดส่วนย่อยจากใบและเมล็ดที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า IC<sub>50</sub> ของสารสกัด 125-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัด ส่วนย่อย	ความสามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์							
	ร้อยละความสามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์				IC <sub>50</sub> (µg/ml)			
	LDF	LEF	SDF	SEF	LDF	LEF	SDF	SEF
1	37.86 <sup>s</sup> ±0.68	57.72 <sup>b</sup> ±0.78	47.45 <sup>c</sup> ±1.18	34.45 <sup>s</sup> ±0.41	>1000	833.49	>1000	>1000
2	73.85 <sup>a</sup> ±1.28	44.03 <sup>e</sup> ±1.28	46.46 <sup>c</sup> ±0.93	45.13 <sup>c</sup> ±1.28	302.92	>1000	>1000	>1000
3	37.31 <sup>s</sup> ±1.35	54.02 <sup>c</sup> ±0.19	42.93 <sup>de</sup> ±0.64	41.50 <sup>de</sup> ±0.68	>1000	848.11	>1000	>1000
4	41.39 <sup>e</sup> ±0.16	40.29 <sup>f</sup> ±0.47	51.63 <sup>b</sup> ±0.31	39.74 <sup>ef</sup> ±1.80	>1000	>1000	932.06	>1000
5	64.19 <sup>b</sup> ±1.84	69.68 <sup>a</sup> ±0.61	42.86 <sup>de</sup> ±0.02	42.82 <sup>cd</sup> ±0.56	559.23	467.02	>1000	>1000
6	43.37 <sup>d</sup> ±0.56	47.89 <sup>d</sup> ±1.18	44.25 <sup>d</sup> ±0.83	38.08 <sup>f</sup> ±2.55	>1000	>1000	>1000	>1000
7	40.62 <sup>ef</sup> ±0.54	39.41 <sup>f</sup> ±0.56	41.50 <sup>f</sup> ±0.54	61.77 <sup>a</sup> ±0.27	>1000	>1000	>1000	708.87
8	38.96 <sup>fg</sup> ±0.00	43.15 <sup>e</sup> ±1.02	64.30 <sup>a</sup> ±0.93	50.20 <sup>b</sup> ±0.54	>1000	>1000	735.23	948.59
9	40.73 <sup>ef</sup> ±0.82				>1000			
10	34.34 <sup>h</sup> ±0.54				>1000			
11	46.79 <sup>c</sup> ±0.41				>1000			

หมายเหตุ เครื่องหมาย > แสดงค่า IC<sub>50</sub> ที่มีค่ามากกว่า 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร LDF คือ สารสกัดส่วนย่อยจากใบในชั้นไดคลอโรมีเทน LEF คือ สารสกัดส่วนย่อยจากใบในชั้น เอทิลอะซิเตท SDF คือ สารสกัดส่วนย่อยจากเมล็ดในชั้นไดคลอโรมีเทน และ SEF คือ สารสกัดส่วนย่อยจากเมล็ดในชั้น เอทิลอะซิเตท และผลลัพธ์แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษร a-h ภายในคอลัมน์เดียวกันบ่งชี้ความสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ด้วยวิธี Duncan's multiple range test

ตารางที่ 4.24 ร้อยละความสามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 ของสารสกัดส่วนย่อยจากใบและเมล็ดที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม และค่า IC<sub>50</sub> ของสารสกัด 125-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม

สารสกัดส่วนย่อย	ความสามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7							
	ร้อยละความสามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์				IC <sub>50</sub> (µg/ml)			
	LDF	LEF	SDF	SEF	LDF	LEF	SDF	SEF
1	33.46 <sup>g</sup> ±2.20	51.19 <sup>b</sup> ±1.08	43.04 <sup>c</sup> ±2.30	33.46 <sup>f</sup> ±1.02	>1000	846.75	>1000	>1000
2	61.44 <sup>a</sup> ±1.18	42.05 <sup>de</sup> ±2.16	42.05 <sup>c</sup> ±1.43	49.54 <sup>c</sup> ±1.18	319.71	>1000	>1000	>1000
3	41.72 <sup>cd</sup> ±2.06	55.93 <sup>a</sup> ±1.49	46.34 <sup>bc</sup> ±0.83	36.98 <sup>e</sup> ±0.71	>1000	858.23	>1000	>1000
4	36.10 <sup>fg</sup> ±1.58	39.18 <sup>de</sup> ±1.84	52.96 <sup>ab</sup> ±1.09	37.53 <sup>e</sup> ±0.56	>1000	>1000	943.93	>1000
5	59.79 <sup>a</sup> ±0.47	58.91 <sup>a</sup> ±0.95	46.12 <sup>bc</sup> ±0.79	41.94 <sup>d</sup> ±2.11	565.06	452.87	>1000	>1000
6	43.70 <sup>c</sup> ±1.36	43.81 <sup>c</sup> ±0.68	45.35 <sup>c</sup> ±7.79	35.88 <sup>ef</sup> ±2.55	>1000	>1000	>1000	>1000
7	42.82 <sup>cd</sup> ±1.12	39.18 <sup>de</sup> ±1.84	42.49 <sup>c</sup> ±1.24	65.34 <sup>b</sup> ±0.66	>1000	>1000	>1000	694.48
8	39.96 <sup>de</sup> ±0.97	37.64 <sup>e</sup> ±1.24	55.49 <sup>a</sup> ±0.78	52.74 <sup>a</sup> ±0.41	>1000	>1000	745.92	924.06
9	38.30 <sup>ef</sup> ±2.40				>1000			
10	36.54 <sup>fg</sup> ±1.12				>1000			
11	48.99 <sup>b</sup> ±1.53				>1000			

หมายเหตุ เครื่องหมาย > แสดงค่า IC<sub>50</sub> ที่มีค่ามากกว่า 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม LDF คือ สารสกัดส่วนย่อยจากใบในชั้นไดคลอโรมีเทน LEF คือ สารสกัดส่วนย่อยจากใบในชั้นเอทิลอะซิเตท SDF คือ สารสกัดส่วนย่อยจากเมล็ดในชั้นไดคลอโรมีเทน และ SEF คือ สารสกัดส่วนย่อยจากเมล็ดในชั้นเอทิลอะซิเตท และผลลัพธ์แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษร a-g ภายในคอลัมน์เดียวกันบ่งชี้ความสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ด้วยวิธี Duncan's multiple range test

## 4.4 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC-MS

### 4.4.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเมทานอลจากใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษ

เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเมทานอลจากใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษพบสารสำคัญแสดงดังตารางที่ 4.25 สารสกัดเมทานอลจากใบพบสารสำคัญปริมาณสูงที่สุด คือ Matrine ร้อยละ 35.06 และ Inositol ร้อยละ 51.60 ซึ่ง Matrine เป็นสารสำคัญพบในพืชสกุล *Sophora* จัดอยู่ในกลุ่มอัลคาลอยด์ มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย รวมถึงเป็นสารที่ถูกนำมาใช้เป็นยารักษาโรค เช่น ฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ยารักษาความดัน โรคหัวใจ บำรุงเลือด เป็นต้น (ศิริพร และ พจนพร, 2559) และสารสำคัญ Inotisol มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านอักเสบ (Danayah และคณะ, 2015) ซึ่งฤทธิ์ทางชีวภาพของ Matrine และ Inositol ในปริมาณสูงคาดว่า มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ส่งเสริมให้สารสกัดเมทานอลจากใบของต้นสารพัดพิษนั้นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ดังการศึกษาของ Kavaz และ Razan (2023) พบว่าสารสกัดจากใบ *Juniperus sabina* จากตัวทำละลายเมทานอลมีปริมาณสารสำคัญ Inositol สูงถึงร้อยละ 48.71 มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. cereus* และ *S. aureus* อีกทั้งยังมีความสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 และในการศึกษาของ Gu และคณะ (2009) พบว่า Inotisol สามารถลดการอักเสบของเยื่อぶล้าไส้ใหญ่ได้โดยยับยั้งการทำงานของโปรตีน Nuclear factor kappa light chainenhancer (NF-kB) และ Cyclooxygenase-2 (COX-2) ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบ และสารสกัดเมทานอลจากใบสารพัดพิษมีความสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ พบว่า มีสารสำคัญ beta-Amyrenol, D-Proline และ Isololiolide ปริมาณร้อยละ 1.78, 0.48 และ 0.3 ตามลำดับ ซึ่งสารสำคัญที่พบนั้นมีแนวโน้มส่งเสริมในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดย beta-Amyrenol จัดเป็นสารในกลุ่ม Triterpene มีฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งการอักเสบ เช่นเดียวกับ D-proline เป็นกรดอะมิโน และ Isololiolide เป็นสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และการสร้างเม็ดสีเมลานิน (Han และคณะ, 2009; Viet และคณะ, 2021; Sang และคณะ, 2018)

ในส่วนขององค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเมทานอลจากเมล็ดสารสำคัญที่พบมีปริมาณสูง คือ Hexadecanoic acid methyl ester, Docosane และ Hexadecanoic acid buty ester ซึ่งมีปริมาณสูงมีร้อยละ 21.05, 17.98 และ 34.25 ตามลำดับ ซึ่งสารสำคัญที่พบมีแนวโน้มส่งเสริมสารสกัดเมทานอลของเมล็ดสารพัดพิษให้ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และความเป็นพิษต่อเซลล์ โดย Hexadecanoic acid เป็นกรดไขมัน อนุพันธ์ของกรดปาล์มิติก มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง เป็นต้น (Ganesan และคณะ, 2024; Aparna และคณะ, 2012; Sangpairaj และคณะ, 2012)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2022) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Martyasari และคณะ (2021) สารสกัดจาก *Sargassum crassifolium* พบสารสำคัญ Hexadecanoic acid methyl ester ส่งเสริมให้ยับยั้งการเจริญของ เซลล์มะเร็งผิวหนังชนิดเมลาโนมาในหนู B16-F10 และยังพบว่าสาร Hexadecanoic acid methyl ester มีความสามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์โดยยับยั้งการทำงานของ NF-KB ของเนื้อเยื่อตับและปอด ของหนู (Saeed และคณะ, 2012) และพบว่า Docosane ให้ผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษา ของ Elham และคณะ (2017) พบสาร Docosane ซึ่งเป็นกรดไขมัน มีปริมาณ 11.00 เปอร์เซ็นต์ จากน้ำมันหอมระเหยจาก *Satureja avromanica* มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก คือ *S. aureus* และ *B. cereus* จากการทดลองสารสกัดใบและเมล็ดจากเมทานอลนั้นมีฤทธิ์ทางชีวภาพสอดคล้องกัน แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำมาวิเคราะห์สารสำคัญ พบว่าปริมาณสารและชนิดของสารสำคัญที่แตกต่างกัน นั้นส่งผลต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพเหมือนและแตกต่างกัน

#### 4.4.2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดแยกส่วนจากใบและเมล็ดของ

##### ต้นสารพัดพิษ

เมื่อนำสารสกัดหยาบเมทานอลจากใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษมาแยกส่วนด้วยสาร ชั่วต่ำไปยังชั่วสูงทั้ง 5 ตัวทำละลาย คือ เฮกเซน (H) ไดคลอโรมีเทน (D) เอทิลอะซิเตท (E) บิวทานอล (B) และน้ำ (W) ทำให้ได้สารสกัดแยกส่วนทั้งหมด 10 สารสกัด ซึ่งการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี จะนำเพียงจากสารสกัดแยกส่วนจากใบ 2 สารสกัด คือ สารสกัดแยกส่วนจากใบในชั้นไดคลอโรมีเทน (LD) และเอทิลอะซิเตท (LE) และสารสกัดแยกส่วนจากเมล็ด 2 สารสกัด คือ สารสกัดแยกส่วนจาก เมล็ดในชั้นไดคลอโรมีเทน (SD) และเอทิลอะซิเตท (SE) โดยพิจารณาจากฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีจาก การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และฤทธิ์ยับยั้งไน ตริกออกไซด์ และความเป็นพิษต่อเซลล์

โดยสารสกัด LD พบสารสำคัญ คือ Matrine, Cyclohexane และ Heptadecanoic acid ปริมาณสูงมีปริมาณร้อยละ 22.69, 15.99 และ 11.47 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.26) มีรายงานการ วิจัยว่าสารดังกล่าวส่งเสริมให้เกิดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ สอดคล้องกับ งานวิจัยของ Fereshteh และคณะ (2023) พบว่าสารสำคัญ Cyclohexane จากใบของ *Onosma dichroantha* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 เช่นเดียวกับการศึกษาของ Jelodar และคณะ (2020) ได้สกัดสาร Cyclohexane จากใบ วอลนัทพบว่า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี และสารสำคัญ Heptadecanoic acid มีแนวโน้มส่งเสริม ให้มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและความเป็นพิษต่อเซลล์ สอดคล้องกับการศึกษาของ Nedhal และ Ashok (2019) สารสกัดจาก *Mercurialis annua* L. พบสาร Heptadecanoic acid ร้อยละ 11.8 มีฤทธิ์ ต้านอนุมูลอิสระ อย่างไรก็ตามสารสำคัญที่พบเมื่อมีปริมาณและองค์ประกอบที่หลากหลายส่งผลให้มี ฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายเช่นกัน ดังการศึกษาของ Rossellia และคณะ (2007) ที่พบว่าสารสกัด

ไดคลอโรมีเทนจากรากของ *Helleborus bocconei* พบสารสำคัญ Heptadecanoic acid มีฤทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบคือ *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. faecalis* และ *E. coli* และจากการศึกษาของ Kim และคณะ (2023) สาร Heptadecanoic acid มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดชนิด PC-9 (Xu และคณะ, 2019)

สารสกัด LE พบสารสำคัญ คือ Diisooctyl phthalate และ Polyethylene glycol ปริมาณสูงร้อยละ 52.94 และ 22.26 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.26) โดย Diisooctyl phthalate โดยมีรายงานการศึกษาสอดคล้องกับ Ngidi และคณะ (2021) พบว่าสกัดสาร *Anredera cordifolia* จากใบ พบว่ามี Diisooctyl phthalate สูงถึงร้อยละ 50.51 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 และสาร Polyethylene glycol มีฤทธิ์ทางชีวภาพสอดคล้องกับการศึกษาของ Gareth และคณะ (2010) พบว่าสาร Polyethylene glycol แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Suran และคณะ (2021) พบว่า Polyethylene glycol ที่สกัดเอทานอลของโพรโพลิส (Propolis) มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ และสารสกัด LE นั้นมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จากการวิเคราะห์พบ Isololiolide เป็นสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ และ Phenylethyl alcohol มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและการสร้างเม็ดสีเมลานิน (Sang และคณะ, 2018)

สารสกัด SD พบสารสำคัญปริมาณสูง คือ 9,12-Octadecadienoic acid , 9-octadecenamide และ Hexadecanoic acid มีร้อยละ 14.31, 11.03 และ 10.37 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.27) ให้ผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาของ Nausheen และคณะ (2021) พบสารสำคัญจากผล *Elaeagnus umbellata* คือ 9,12-octadecadienoic acid, 9-octadecenamide และ Hexadecanoic acid ร้อยละ 32.21, 32.08 และ 27.55 ที่ส่งเสริมให้มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ โดย 9-octadecenamide และ Hexadecanoic acid คาดว่าส่งเสริมให้สารสกัดมีฤทธิ์ทางชีวภาพ โดย 9-octadecenamide มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว และมีฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ และฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Hideki และคณะ, 2002) และ Hexadecanoic acid มีฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ (Vasudevan และคณะ, 2012)

สารสกัด SE พบสารสำคัญ Benzonic acid , 9-octadecenamide, Syringol และ Polyethylene glycol ในปริมาณสูงร้อยละ 28.84, 16.56, 10.44 และ 10.03 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.27) โดยมีรายงานการศึกษาร Benzonic acid มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ และฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Mehler และ Gerhards, 1987; Sindhuja และคณะ, 2024) รวมทั้งจากการศึกษาของ Ozturkel และคณะ (2024) พบว่าสาร Benzonic acid แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด HT-29 เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC-3 และเซลล์มะเร็งปอดชนิด CRM612 และจากการศึกษาของ Milan และคณะ (2022) ศึกษาสารสกัด *Eleusine coracana* พบสาร Syringol มีฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ นอกจากนี้สารสกัด SE พบสาร Catechin ร้อยละ 3.12 ซึ่งเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านการอักเสบ เป็นต้น (Mita และคณะ, 2024)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำพิจารณาสารสกัดแยกส่วนที่พบในปริมาณสูงร่วมกันมีสารสำคัญชนิดเดียวในสารสกัด SD และ SE คือ 9-Octadecenamide และสารสกัด LE และ SE พบสารชนิดเดียวกัน คือ Polyethylene glycol และเมื่อนำสารสำคัญของสารสกัดเมทานอลจากใบและเมล็ด และสารสกัดแยกส่วนจากใบและเมล็ด พบ Matrine ในสารสกัดเมทานอลจากใบ และพบในสารสกัดแยกส่วนจากใบในชั้นไดคลอโรมีเทน ซึ่งคาดว่าเมื่อสารสกัดถูกแยกตามขั้วตัวทำละลายทำให้สารสกัดมีฤทธิ์ทางชีวภาพเหมือนหรือแตกต่างกัน และปริมาณของสารส่งผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพเช่นกัน

ตารางที่ 4.25 ผลวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีสารสกัดใบของสารสกัดเมทานอลจากใบและเมล็ดด้วยวิธี GC-MS

สารสกัด	สาร	Total (%)	สารสกัด	สาร	Total (%)
	D-proline	0.48		$\beta$ -Amyrenol	1.78
	Phytol	0.35		Phenylacetaldehyde	1.09
	Tetradecane	0.28		Decane	1.05
	Levoglucozan	0.71		Hexadecane	3.99
	Inositol	51.60		Inositol	0.62
	Isotoliolide	0.30		Docosane	21.05
	Hexadecanamide	1.14		Hexadecanamide	4.63
	Lamprolobine	0.74		9-Octadecenamide	0.90
ใบ	Matrine	35.06	เมล็ด	Hexadecanoic acid buty ester	34.25
	Triphenylphosphine oxide	1.40		Hexadecanoic acid methyl ester	17.98
	Formic acid isopentyl ester	5.60		9,12-Octadecadienoic acid methyl ester	2.62
	Hexadecanoic acid methyl ester	0.22		Octadecanoic acid methyl ester	6.43
	4H-pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl	0.27			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.26 แสดงผลวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดใบแยกส่วนจากชั้น  
ไคคลอโรมีเทน (LD) และเอทิลอะซิเตท (LE)

สารสกัด	สาร	Total (%)	สาร	Total (%)
LD	Heptadecanoic acid	11.47	Diisooctyl phthalate	2.65
	2,2-DIMETHYLPENTANE	4.54	Medicarpin	3.73
	Cyclohexane	15.99	Trendione	4.14
	Maltol	9.26	Homopterocarpin	1.81
	Maleic acid	3.25	Quinoxaline,2,3-diphenyl	1.20
	Mercaptopyridone	1.54	1-(p-Methoxyphenyl)ethanol	3.81
	2-vinyl-2-adamantanol	2.07	9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester	1.11
	Loliolide	7.26	2(4H)Benzofuranone,5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl	0.66
	Cyclohexane	0.84	Lamprolobine	1.03
	Pentanamide	0.91	Matrine	22.69
	Isololiolide	0.24	Polyethylene glycol	22.26
	Vomifoliol	0.27	Hexylene glycon	1.95
	Cyclotetradecane	1.03	Benzaldehyde	0.53
	Oleyl alcohol	2.38	2-Butenal 3 methyl	0.47
LE	1-Octadecene	1.07	Phenylethyl alcohol	2.81
	Hexadecanamide	0.91	Ribitol	5.70
	9-Octadecenamide	2.05	Hexanedioic acid	3.83
	Diisooctyl phthalate	52.94	Benzonic acid	0.53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.27 แสดงผลวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเมล็ดแยกส่วนจาก  
ชั้นไดคลอโรมีเทน (SD) และเอทิลอะซิเตท (SE)

สารสกัด	สาร	Total (%)	สาร	Total (%)
SD	9,12-Octadecadienoic acid methyl ester	2.92	Hexylene Glycol	0.64
	Ocatadecanoic acid methyl ester	0.91	Pantolactone	0.36
	Hexadecanamide	3.39	phenylethyl alcohol	0.92
	Dihydroxyethyl terephthalate	2.03	Phenyl glycol	1.12
	2,6-Diphenylpyridine	4.23	DL-Proline,5-oxo-, methyl ester	5.25
	9-octadecenamide	11.03	1-phenylalanine methyl ester	0.44
	Hexanedioic acid	4.88	Benzonic acid, 4-ethyl ester	0.32
	Benzamide,p-chloro-N-(1,2-diphenylethyl)-N-methyl	2.60	Phenylalanine, N-isovalaryl, methyl ester	1.82
	Hexadecanoic acid	10.37	Acetosyringone	1.34
	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis (2-ethylhexyl) ester	4.38	Loliolide	1.97
	9,12-Octadecadienoic acid methyl ester	14.86	1-Hexadecene	0.67
	Phenylalanine anhydride	2.63	Stigmasterol	2.06
	Stigmasterol	2.06	gamma.Sitosterol	8.45
	SE	Palmitic acid methyl ester	2.43	Hexylene Glycol
Hexadecanoic acid		7.53	Benzonic acid	2.78
Oley alcohol		3.05	Catechin	3.12
1-Heptadecanol		6.56	2-Cumaranone	3.95
9-octadecenamide		16.56	Benzonic acid	28.84
Hexanedioic acid		6.29	Polyethylene glycol	10.03
Syringol		10.44	Palmitic acid methyl ester	2.43
Benzenepropanoic acid		3.30	Syringol	10.44
Bezeneacetic acid	1.89	Tetradecene	3.34	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.4.3 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดส่วนย่อยจากใบและเมล็ดของต้น

##### สารพัดพิษ

จากการนำสารสกัดส่วนย่อยจากใบในชั้นไดคลอโรมีเทน (LDF1 - 11) สารสกัดส่วนย่อยจากใบในชั้นเอทิลอะซิเตท (LEF1 - 8) สารสกัดส่วนย่อยจากเมล็ดในชั้นไดคลอโรมีเทน (SDF1 - 8) และสารสกัดส่วนย่อยจากเมล็ดในชั้นเอทิลอะซิเตท (SEF1 - 8) รวมจำนวน 35 สารสกัดมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

สารสำคัญที่พบในสารสกัดส่วนย่อยจากใบในชั้นไดคลอโรมีเทน (LDF1 - 11) คือ Phthalic acid และ Hexanedioic acid (ตารางที่ 4.28) โดย Phthalic acid เป็นสารกลุ่ม Phthalate ที่ประกอบด้วยอนุพันธ์ทางเคมีที่ส่งผลทางชีวภาพด้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งแบคทีเรีย โดยสารสำคัญนี้มีรายงานจากการศึกษาของ Ekta และคณะ (2019) สารสกัดจากใบของ *Artocarpus lakoocha* พบสารที่เป็นองค์ประกอบหลัก คือ Phthalic acid และ Diethyl ซึ่งส่งเสริมให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก คือ *S. aureus*, *Sarcina lutea*, *Micrococcus aureus* และ *M. roseus* (Habib และ Karim, 2009) และมีรายงานการศึกษาของ Siddharth และ Rai (2019) พบว่าสาร Bis (2-ethylhexyl) phthalate มีฤทธิ์ส่งเสริมต้านอนุมูลอิสระ และสาร di-butyl phthalate มีผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Thiyagaraj และ Madepalli (2018) พบว่า di-butyl phthalate ที่สกัดจาก *Begonia malabarica* มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและลบ คือ *S. epidermidis*, *S. pneumoniae*, *E. coli*, *M. luteus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Vibrio cholerae* และ *P. aeruginosa* และสารกลุ่ม Hexanedioic acid มีผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Eyasu และคณะ (2024) โดยรายงานการสกัดสารจาก *Thymus schimperi* พบสาร Hexanedioic acid และ bis (2- ethylhexyl) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีและมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย ในการศึกษาในครั้งนี้สารสกัด LDF10 และ LDF11 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และมีสารสำคัญ Matrine โดย Matrine เป็นสารกลุ่มอัลคาลอยด์มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย รวมถึงเป็นสารที่ถูกนำมาใช้เป็นยารักษาโรค เช่น ยาด้านการอักเสบ ยายับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ยารักษาความดัน โรคหัวใจ และบำรุงเลือด เป็นต้น (ศิริพร และ พจนพร, 2559)

สารสำคัญที่พบในสารสกัดส่วนย่อยจากใบในชั้นเอทิลอะซิเตท (LEF1 - 8) และคาดว่าส่งผลให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย คือ Hexadecanamide, 4H-pyran-4-one และ 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl (ตารางที่ 4.29) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยเกี่ยวกับ Hexadecanamide มีฤทธิ์ส่งเสริมการยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ คือ *E. coli* และ *S. aureus* และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Bergandi และคณะ, 2022) สำหรับสารสำคัญ 4H-pyran-4-one และ 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl (DDMP) มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (Zhifei และคณะ, 2021) รวมทั้งสารสกัด LEF8 ตรวจพบสาร Mesitylene ซึ่งเป็นไอโซเมอร์ของ trimethylbenzenes ที่มีรายงานในการต้านอนุมูลอิสระ (Khaled และคณะ, 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารสำคัญที่น่าสนใจในสารสกัดส่วนย่อยจากเมล็ดในชั้นไดคลอโรมีเทน (SDF1 - 8) และคาดว่าจะมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย คือ 9-Octadecenoic acid, 9,12-Octadecadienoic acid และ Hexadecanoic acid (ตารางที่ 4.30) โดยมีรายงานการศึกษาของ Reza และคณะ (2021) ที่สกัดสารจาก *Achyranthes ferruginea* พบสารสำคัญ คือ 9-Octadecenoic acid, 9,12-Octadecadienoic acid methyl ester และ Hexadecanoic acid ที่แสดงฤทธิ์ส่งเสริมให้เกิดความสามารถต้านอนุมูลอิสระ เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Mohammed และ Mosab (2020) ที่สกัดสารจาก *Adansonia digitata* และพบสารสำคัญ 9-octadecanoic acid methyl ester, 9,12-Octadecadienoic acid, Hexadecanoic acid และ methyl ester ที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ ได้แก่ *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* และ *Candida albicans*

สารสกัดส่วนย่อยจากเมล็ดในชั้นเอทิลอะซิเตท (SEF1 - 8) ที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย พบสารสำคัญ คือ n-Hexadecanoic acid, 4H-pyran-4-one และ 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl (DDMP) (ตารางที่ 4.31) โดยมีรายงานการศึกษาวิจัยของ Theivanai และคณะ (2022) ที่สกัดสารจากใบของ *Ipomoea eriocarpa* พบสารสำคัญ n-Hexadecanoic acid ที่แสดงความสามารถต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย คือ *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* และ *K. pneumoniae*

เมื่อนำสารสกัด SDF และ SEF มาพิจารณาาร่วมกันพบว่า SDF1, SDF2, SEF1 และ SEF3 ตรวจพบสาร Toluene ซึ่งคาดว่าจะส่งผลให้สารสกัด SDF1, SDF2, SEF1 และ SEF3 มีผลความสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดและไม่พบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียอย่างสอดคล้องกัน ซึ่งมีรายงานการศึกษาของ Karabulut และคณะ (2009) ทำการทดสอบประสิทธิภาพการออกซิเดชันความสามารถการต้านอนุมูลอิสระของเยื่อหุ้มเม็ดเลือดแดงมาพบว่า Toluene ส่งผลต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระโดยจะลดกิจกรรมลปิดออกซิเดชันและทำให้โปรตีนเกิดความเสียหาย และรายงานของ อมร (2561) สาร Toluene เป็นสารไฮโดรคาร์บอนชนิดอะโรมาติก มีฤทธิ์ระคายเคืองระบบทางเดินหายใจ และมีความเป็นพิษ

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ในหลอดทดลองและในเซลล์แมคโครฟาจ ชนิด RAW 264.7 ของสารสกัดส่วนย่อยจากใบและเมล็ด พบเพียงสารสกัด LDF1, LDF2, LEF1, LEF3, LEF5, SDF4, SDF8, SEF7 และ SEF8 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ โดยสารสำคัญที่ตรวจพบในสารสกัดย่อยดังกล่าวข้างต้นคาดว่าแนวโน้มส่งเสริมให้มีฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ เช่น องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัด LDF1 และ LDF2 (ตารางที่ 4.28) ตรวจพบสารที่คาดว่า มีฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ ได้แก่ Vanillic acid, Loliolide, Gusperimus จากสารสกัด LDF1 และ LDF2 พบสาร Vanillic acid และ Loliolide ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Cassia และคณะ (2015) ในแบบจำลองการอักเสบด้วยหนูเมาส์ ที่แสดงว่า Vanillic acid แสดงกลไกการออกฤทธิ์เกี่ยวข้องกับ การต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการผลิตไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบที่เกี่ยวข้องกับสารสื่อกลาง NF-เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

KB เช่นเดียวกับ Loliolide จากการศึกษาของ Silva และคณะ (2021) ที่แสดงว่า Loliolide มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งการไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 และสารสกัด LDF2 พบสาร Gusperimus ที่เป็นสารในการนำมาใช้เป็นยารักษาโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์และโรคต่อมไทรอยด์อักเสบ (Miklos และคณะ, 2014)

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัด LEF1 - 8 (ตารางที่ 4.29) โดยตรวจพบว่า มีฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ของสารสกัด LEF1, LEF3 และ LEF5 โดยพบสาร 2,4-Di-tert-butylphenol (2,4-DTBP), Methyl 4-hydroxycinnamate และ Hexadecanamide (ตารางที่ 4.28) โดยสาร LEF1 พบสาร Hexadecanamide ที่สอดคล้องกับการศึกษาของ Bao และคณะ (2023) ที่แสดงให้เห็นว่า Hexadecanamide มีความสามารถในการต้านการอักเสบของโรคเต้านมอักเสบของวัว และสารสกัด LEF3 พบสาร 2,4-Di-tert-butylphenol (2,4-DTBP) ที่การศึกษาของ Nair และคณะ (2018) แสดงให้เห็นว่า 2,4-Di-tert-butylphenol (2,4-DTBP) สกัดจากรากของ *Humboldtia unijuga* มีฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 รวมทั้งสารสกัด LEF5 ที่พบสาร Methyl 4-hydroxycinnamate เช่นเดียวกับ Kim และคณะ (2022) ที่แสดงให้เห็นว่า Methyl 4-hydroxycinnamate มีฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ภายในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7

สำหรับสารสกัด SDF1 - 8 พบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ในสารสกัด SDF4 และ SDF8 คือ  $\beta$ -Sitosterol acetate, L-ascorbic acid, Linoleic acid และ Epoxyoleic acid (ตารางที่ 4.30) โดยสารสกัด SDF4 มีองค์ประกอบทางเคมีของ  $\beta$ -Sitosterol acetate ที่มีรายงานถึงความสามารถในด้านการต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบ (Shyamaladevi และ Selvaraj, 2020) และสารสกัด SDF8 พบสาร Epoxyoleic acid และ L-ascorbic acid โดย Epoxyoleic acid เป็นกรดไขมันที่มีรายงานความสามารถในการมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Cindy และคณะ, 2020) และ L-Ascorbic acid ที่มีรายงานความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันการเสื่อมสภาพของเซลล์สร้างคอลลาเจน และกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Johnston และ Luo, 1994 ; Li และคณะ, 2022) และสาร Linoleic acid เป็นกรดไขมัน มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ และต้านอนุมูลอิสระ (Fritsche และคณะ, 2014)

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัด SEF1-8 ตรวจพบว่า มีฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ของสารสกัด SEF7 และ SEF8 พบสาร Catechin, Syringol, Vanillic acid และ Linoleic acid (ตารางที่ 4.31) โดยสารสกัด SEF7 พบสาร Catechin และ Syringol โดยสารสำคัญที่พบให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Nakanishi และคณะ (2010) พบว่า Catechin สามารถต้านการอักเสบของเซลล์โพรงประสาทฟันได้ เช่นเดียวกับ Mita และคณะ (2024) สาร Catechin มีฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้ดี ซึ่งเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีฤทธิ์ต้านอักเสบ และมีคุณสมบัติทางยา และสาร Syringol มีผลการศึกษาสอดคล้องกับการศึกษาของ Milan และคณะ (2022) จากการศึกษา *Eleusine coracana* (L.) พบว่า Syringol สามารถยับยั้งเอนไซม์ sPLA2 ที่เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวกระตุ้นให้เกิดการอักเสบภายในเซลล์ และสารสกัด SEF8 พบสาร Vanillic acid และ Linoleic acid

จากการตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสำคัญ พบว่าสารที่วิเคราะห์ได้นั้นมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สัมพันธ์กันโดยมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสำคัญหรือการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดซึ่งมีสารที่ส่งผลให้มีฤทธิ์ทางชีวภาพส่งเสริมหรือก่อให้เกิดฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย ซึ่งสารสำคัญของสารสกัดจากใบและเมล็ดทั้งหมดมีสารที่น่าสนใจ คือ Matrine เป็นสารสำคัญที่พบได้ในใบ และสำคัญที่พบได้ในเมล็ดคือ Catechin และสารสกัดจากใบและเมล็ด พบสาร Vanillic acid, Linoleic acid, Hexadecanoic acid, 9,12 Octadecadienoic acid, 9-Octadecenamide และสารกลุ่ม Phthalic acid



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.28 แสดงผลวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดส่วนย่อยของใบจากชั้นโคคลอโรมีเทน LDF1-11 ด้วยเทคนิค GC-MS

LDF	Name of the compound	Total (%)	LDF	Name of the compound	Total (%)
	Triacetin	1.30		Dodecane	0.46
	Vanillic acid	12.40		Propanoic acid, 3-chloro-, 4-formylphenyl ester	1.24
	Phthalic acid, Di-2-ethylhexyl	25.35		Pestalotin acetate	2.88
	Loliolide	2.61		p-Methoxyphenylethyl alcohol	1.08
LDF1	Phthalic acid, butyl octyl ester	15.13	LDF3	Phthalic acid, butyl nonyl ester	8.21
	Phthalic acid, Din-butyl	33.95		Oleic Acid	21.98
	Phthalic acid, mono-(2-ethylhexyl) ester	5.80		9-Methoxy-6a,11a-dihydro-6H-benzofuro[3,2-c]chromen-3-ol	27.88
	Dihydrokaempferide	3.46		3-Hydroxy-3'-methoxyflavone	32.90
	2-Trifluoroacetoxydodecane	1.08		3',8,8'-Trimethoxy-3-piperidyl-2,2'-binaphthalene-	
	2-Pyridinamine, 3,6-dimethyl	1.83		1,1',4,4'-tetrone	3.38
	Teresantalol	2.42		Diphenyl sulfide	13.66
	Tetradecane, 2,6,10-trimethyl-	3.24		Diethyl Phthalate	2.62
LDF2	Vanillic acid	22.24	LDF4	Phthalic acid, dibutyl ester	14.33
	Ageratriol	4.65		Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	55.40
	Loliolide	10.65		Phthalic acid, Di-2-ethylhexyl	14.00
	Gusperimus	53.90			

ตารางที่ 4.28 แสดงผลวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดส่วนย่อยของใบจากชั้นโคคลอโรมีเทน LDF1-11 ด้วยเทคนิค GC-MS (ต่อ)

LDF	Name of the compound	Total (%)	LDF	Name of the compound	Total (%)
	4-(2-Hydroxyethyl)phenylhydrazine	1.77		O-Decylhydroxylamine	1.06
	2(1H)-Pyridinethione, 3-(acetyloxy)-	3.29		Butylated Hydroxytoluene	27.98
	Phthalic acid, butyl octyl ester	10.06		Diethyl Phthalate	6.14
LDF5	Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	29.66		1,6,6-Trimethyl-7-(3-oxobut-1-enyl)-3,8-dioxatricyclo[5.1.0.0(2,4)]octan-5-one	1.20
	Medicarpin	23.23	LDF7	6-Hydroxy-3-oxo- $\alpha$ -ionol	2.72
	3-Hydroxy-4'-methoxyflavone	27.54		Hexadecanoic acid, methyl ester	14.56
	Monostearin	4.45		Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	9.49
	O-Decylhydroxylamine	0.90		Methyl 9-cis,11-trans-octadecadienoate	36.86
	Ethyl 4-oxo-2-phenylpentanoate	3.34		O-Decylhydroxylamine	2.23
	Dehydrovomifoliol	7.30		2,5-di-tert-Butyl-1,4-benzoquinone	3.01
	Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	5.48		Ethyl 4-oxo-2-phenylpentanoate	3.61
LDF6	n-Hexadecanoic acid	2.78		Linoelaidic acid	11.24
	3-[(Trimethylsilyl)oxy]androstan-11,17-dione		LDF8	Benzoic acid, 4-methyl-2-trimethylsilyloxy-, TMS	69.62
	17-(O-benzyloxime)	2.40		Cholesta-5,7-dien-3-ol, 24-(2-methylpropylidene)- acetate	10.30
	3-Formylindole	74.35			

ตารางที่ 4.28 แสดงผลวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดส่วนย่อยของใบจากชั้นโคคลอโรไมเทน LDF1-11 ด้วยเทคนิค GC-MS (ต่อ)

LDF	Name of the compound	Total (%)	LDF	Name of the compound	Total (%)
	Dodecane	2.89		Erythritol	2.41
	O-Decylhydroxylamine	6.86		Diphenyl sulfide	3.80
	2,4-Di-tert-butylphenol	10.77		2,4-Di-tert-butylphenol	3.82
	Diphenyl sulfide	13.55			
LDF9	Phthalic acid, diethyl ester	65.93	LDF11	4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidineethanol	22.19
	Phthalic acid, dibutyl ester	7.11		Octadecanoic acid	11.12
	Pentadecanoic acid, 14-methyl-, methyl ester	1.97		Matrine	24.18
	Heptacosane	6.41		Phthalic acid, Di-2-ethylhexyl	32.48
	Matrine	13.92			
LDF10	3',8,8'-Trimethoxy-3-piperidyl-2,2'-binaphthalene-1,1',4,4'-tetrone	63.51		4,4'-Thiodianiline, N,N'-bis(trifluoroacetyl)-	9.33
	Heptacosane	7.09			

ตารางที่ 4.29 แสดงผลวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดส่วนย่อยของใบจากชั้นเอทิลอะซิเตท LEF1-8 ด้วยเทคนิค GC-MS

LEF	Name of the compound	Total (%)	LEF	Name of the compound	Total (%)
LEF1	2-Butenal 3 methyl	31.23	LEF4	Hexylene Glycon	9.55
	n-Hexadecanoic acid	16.91		4H-pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl	25.02
	Deoxyspergualin	4.93		Hexadecanamide	7.85
	Palmitoleamide	25.94		Oleyl amide	43.43
	Hexadecanamide	21.00		3beta-Chloro-5alpha-cholestan-6-one	14.16
LEF2	2-Butenal 3 methyl	48.87	LEF5	4H-pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl	71.60
	Hydroxybenzoic acid	10.03		Methyl 4-hydroxycinnamate	16.69
	n-Hexadecanoic acid	10.15		2-Propenoic acid, 3-(3-(isopropoxyoxycarbonyl)oxy-4-methoxyphenyl)-, methyl ester, (2E)-	11.71
	3beta-Chloro-5alpha-cholestan-6-one	30.95			
LEF3	4H-pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl	23.83	LEF6	Benzaldehyde	60.44
	Parametaxylene	18.86		Sorbic alcohol	12.35
	2,4-Di-tert-butylphenol (2,4-DTBP)	7.29		Hexadecanoic acid	8.96
	Heptacosane	10.58		9-Octadecenamide, (Z)-	18.25
	Nonacosane	27.49			
	Hentriacontane	11.97			

ตารางที่ 4.29 แสดงผลวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดส่วนย่อยของใบจากชั้นเอทิลอะซิเตท LEF1-8 ด้วยเทคนิค GC-MS (ต่อ)

LEF	Name of the compound	Total (%)	LEF	Name of the compound	Total (%)
	Mesitylene	46.19		Mesitylene	83.45
	Hexadecanoic acid	9.71	LEF8	Phenylethyl alcohol	16.55
LEF7	9-Octadecenamide, (Z)-	19.31			
	Dinaphtho[2,1-d:1,2 f] [1,3,2] dioxaphosphepin-4-ol 4-oxide, O-TMS	24.79			



ตารางที่ 4.30 แสดงผลวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดส่วนย่อยของเมล็ดจากชั้นไดคลอโรมีเทน SDF1-8 ด้วยเทคนิค GC-MS

SDF	Name of the compound	Total SDF (%)	SDF	Name of the compound	Total (%)
SDF1	Toluene	53.40	SDF4	Hexadecanoic acid, methyl ester	67.29
	9-Octadecenoic acid, 12-hydroxy-, methyl ester, (Z)-	24.00		9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester, (E,E)-	0.71
	Lagochilin	22.60		9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester	9.30
SDF2	Toluene	40.30	SDF4	Octadecanoic acid, methyl ester	8.88
	Chloroxylenol	34.67		Hexadecanoic acid, butyl ester	3.99
	Phenol, 2,4-di-tert-butyl-	25.03		Heptacosane	1.44
SDF3	Hexadecanoic acid, methyl ester	42.67	SDF4	Octacosane	1.75
	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester	9.26		Nonacosane	1.58
	9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester	16.56		Sebacic acid, 2-propylpentyl tetradecyl ester	1.38
	Methyl stearate	7.60		$\beta$ -Sitosterol acetate	3.67
	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	10.79			
	Oleic Acid	13.12			

ตารางที่ 4.30 แสดงผลวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดส่วนย่อยของเมล็ดจากชั้นไดคลอโรมีเทน SDF1-8 ด้วยเทคนิค GC-MS (ต่อ)

SDF	Name of the compound	Total (%)	SDF	Name of the compound	Total (%)
				Epoxyoleic acid	26.79
	Pantolactone	11.20		9-Octadecenoic acid,12-hydroxy,methyl ester, (z)	26.94
SDF5	Hexadecanoic acid, methyl ester	48.15	SDF7	Ethylene Glycol	0.35
	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester	40.64		L-Phenylalanine, N-acetyl-, methyl ester	0.48
				Hexadecanoic acid, methyl ester	11.64
	Pantolactone	17.00		n-Hexadecanoic acid	8.12
	Benzoic acid	9.38		L-Ascorbic acid	13.13
	Benzeneacetic acid, methyl ester	15.18		Oleic acid, ethyl ester	6.01
	Benzeneacetic acid	6.20		9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	34.57
SDF6	9-Octadecenoic acid, 12-hydroxy-, methyl ester, [R-(Z)]-	30.60	SDF8	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester	14.92
	Oxiraneoctanoic acid, 3-octyl-, methyl ester	21.64		Linoleic acid	9.49
	Ethylene Glycol	26.99		Distearin	1.29
SDF7	Benzeneacetic acid, methyl ester	19.28			

ตารางที่ 4.31 แสดงผลวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดส่วนย่อยของเมล็ดจากชั้นเอทิลอะซิเตท SEF1-8 ด้วยเทคนิค GC-MS

SEF	Name of the compound	Total (%)	SEF	Name of the compound	Total (%)
	Toluene	0.32		4H-pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl	92.37
	Dimethyl Sulfoxide	97.56	SEF5	n-Hexadecanoic acid	7.63
SEF1	Sulphonylbismethan	2.12		4H-pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl	56.87
	Ethylene Glycol	31.17	SEF6	Heptacosane	16.52
SEF2	Hexadecanoic acid, methyl ester	29.54		Nonacosane	26.62
	n-Hexadecanoic acid	39.29		Catechin	40.30
	Toluene	66.48	SEF7	Chloroxyleneol	34.67
SEF3	Hexadecanoic acid, methyl ester	8.77		Syrigol	25.03
	n-Hexadecanoic acid	24.75		Phenylacetaldehyde	48.86
	Ethylene Glycol	7.91		Vanillic acid	7.20
	1-Dodecanol	49.97	SEF8	n-Hexadecanoic acid	19.12
	n-Hexadecanoic acid	9.24		Linoelaidic acid	3.22
SEF4	Dodecanoic acid, dodecyl ester	32.89		Octadecanoic acid	4.15
				Dinaphtho[2,1-d:1,2-f][1,3,2]dioxaphosphepin-4-ol 4-oxide, O-TMS	17.45

## 4.5 ผลการศึกษาการบ่งชี้สายพันธุ์ และสายพันธุ์ย่อยของต้นสารพัดพิษ

### 4.5.1. ผลการศึกษาลักษณะพฤกษศาสตร์

ในการศึกษานี้ได้นำตัวอย่างของต้นสารพัดพิษจากเกาะยวน้อย และเกาะยวใหญ่ อำเภอเกาะยว จังหวัดพังงา มาศึกษาลักษณะพฤกษศาสตร์ โดยมีลักษณะดังนี้ ต้น ลำต้น และกิ่งที่เจริญไม่เต็มที่มีเปลือกสีเขียวนวล เมื่อโตเต็มทีลำต้นและกิ่งจะมีสีเทาอมน้ำตาลโดยมีความสูงประมาณ 3-4 เมตร (รูปที่ 4.8 A) ก้านใบยาว 30-40 เซนติเมตร ประกอบด้วยใบย่อย 12-21 ใบ ขนาดใบกว้าง 1.5-3.5 เซนติเมตร ยาว 3-7 เซนติเมตร (รูปที่ 4.8 B) ใบที่เจริญไม่เต็มที่มีอ่อนมีสีเขียวนวลมีขนสีขาวปกคลุมหนาแน่นมีขนาด 5-10 เซนติเมตร (รูปที่ 4.8 C) เมื่อเจริญเต็มทีมีลักษณะเป็นใบประกอบแบบขนนกปลายคี่เรียงตัวแบบตรงข้ามเป็นรูปไข่กลับขอบใบแบบเรียบ ส่วนหลังใบที่เป็นด้านของใบที่ทำหน้าที่รับแสงมีขนสีขาวนวลปกคลุมเล็กน้อย และบริเวณท้องใบที่ไม่ได้ทำหน้าที่รับแสงมีขนสีขาวนวลปกคลุม (รูปที่ 4.8 D) ช่อดอก ก้านช่อดอกมีลักษณะเป็นช่อดอกแทงออกมาจากปลายยอดความยาว 30-40 เซนติเมตร (รูปที่ 4.8 E) ดอกมีลักษณะทรงกระบอกมีสีเหลือง (รูปที่ 4.8 G) ประกอบด้วยกลีบดอกจำนวน 5 กลีบ (รูปที่ 4.8 H) ความกว้าง 1-2 เซนติเมตร ความยาว 1-3 เซนติเมตร ความยาวช่อดอกยาว 10-20 เซนติเมตร (รูปที่ 4.8 F) ในช่อดอกมีดอกหนาแน่น มีฐานดอกประดับด้วยสีเหลืองอมเขียวห่อหุ้มดอกไว้ (รูปที่ 4.8 I) มีขนปกคลุมเล็กน้อย ประกอบด้วยเกสรเพศผู้ 10 ช่อ มีสีเหลืองและสีขาวครีม ขนาดความยาว 1-2 เซนติเมตร เกสรตัวเมียมีลักษณะเป็นแท่งโค้งมีขนปกคลุม ขนาดความยาว 1-2 เซนติเมตร (รูปที่ 4.8 J) ผล ออกผลเป็นฝัก (รูปที่ 4.8 K) ก้านช่อของฝักมีความยาว 30-40 เซนติเมตร (รูปที่ 4.8 L) ฝักเป็นเมล็ดเดี่ยวมีลักษณะขอเป็นข้อหรือกระเปราะยาวมีขนปกคลุม เรียงตัวกันยาวคล้ายลูกบิด ฝักอ่อนเปลือกมีสีเขียวสด มีขนปกคลุมทั่วเปลือกฝัก (รูปที่ 4.8 M) ฝักแก่เปลือกมีสีน้ำตาลเข้มมีเมล็ด 5-10 เมล็ด ภายในกระเปราะมีเมล็ดกลมมันวาว (รูปที่ 4.8 N) เมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมน้ำตาลเมื่อแห้งจะกลายเป็นสีดำ

โดยลักษณะพฤกษศาสตร์ของตัวอย่างต้นสารพัดพิษจากเกาะยวใหญ่มีลักษณะสอดคล้องกับการศึกษาของ Stephen (2018) โดยพบว่า *S. tomentosa* พบได้บริเวณชายหาด มีลักษณะต้นพุ่มสูง 2-3 เมตร มีดอกสีเหลือง เมล็ดเป็นกระเปาะยาวคล้ายลูกบิด มีลักษณะใบเรียงสลับขนนกคี่ ลักษณะของใบเป็นส่วนของพืชที่สามารถแยกความแตกต่างได้ 2 ชนิดย่อย คือ *S. tomentosa* var. *truncata* พบว่าใบอ่อนมีขนปกคลุมทั้งด้านบนและท้องใบ เมื่อโตเต็มวัยส่วนด้านบนจะเป็นสีเขียวเข้มมันวาวและท้องใบจะเรียบไม่ปรากฏขน ซึ่งลักษณะพฤกษศาสตร์ของใบสอดคล้องกับลักษณะใบจากต้นสารพัดพิษที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Palomino และคณะ (1993) ระบุว่า *S. tomentosa* var. *truncata* และ *S. tomentosa* var. *occidentalis* สามารถพบได้ในรัฐฟลอริดา เพอร์โตริโก และเท็กซัส และลักษณะของใบนั้นแตกต่างกันคือ *S. tomentosa* var. *truncata* ด้านบนใบมีสีเขียวเข้มและท้องใบมีขน ในขณะที่ *S. tomentosa* var. *occidentalis* มีขนปกคลุมหนาแน่นทั้งด้านบนและท้องของใบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำลักษณะทางพฤกษศาสตร์จากการศึกษาคั้งนี้ มาพิจารณาเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ย่อยของ *S. tomentosa* var. *truncata* และ *S. tomentosa* var. *occidentalis* สามารถระบุได้ว่า พืชสารพัดพิษจากเกาะยาวน้อยและเกาะใหญ่ มีลักษณะคล้ายคลึงกับ *S. tomentosa* var. *truncata* จากลักษณะของใบที่จะพบขนปกคลุมที่ด้านบนของใบ และด้านล่างใบไม่มีขน อย่างไรก็ตาม การศึกษาเพียงลักษณะทางพฤกษศาสตร์อาจไม่เพียงพอ เนื่องจากลักษณะของสายพันธุ์ย่อยเบื้องต้นแตกต่างกันเพียงลักษณะใบเท่านั้น ดังนั้นจึงมีการระบุสายพันธุ์และสายพันธุ์ย่อย ด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด

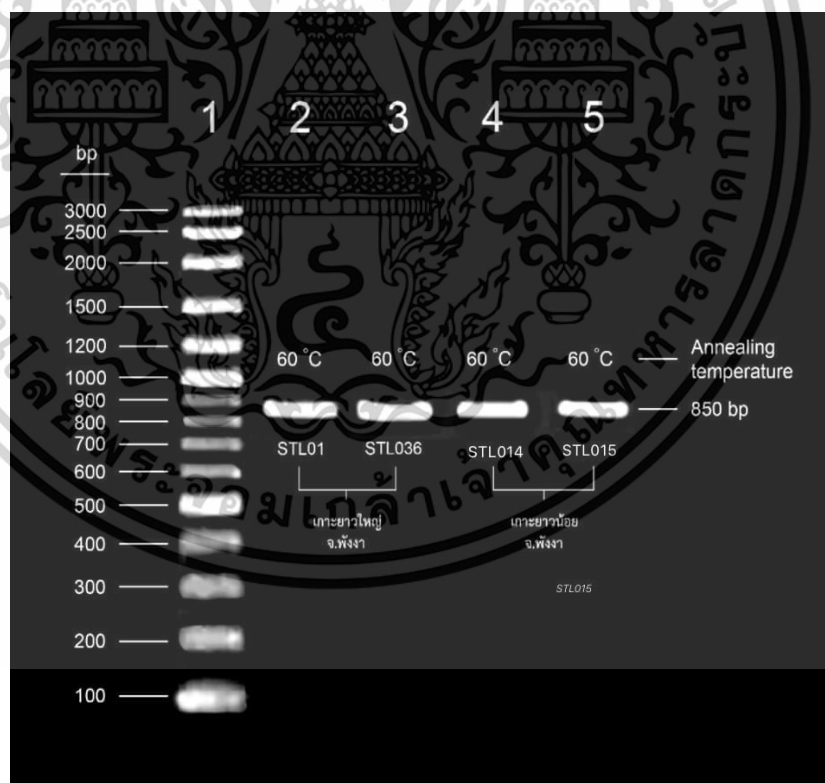


**รูปที่ 4.8** ลักษณะพฤกษศาสตร์ของต้นสารพัดพิษ (A) ต้น (B) ใบ (C) ยอดใบ (D) ใบย่อย (E-F) ช่อดอก (G) ดอก (H) กลีบดอก (I) ภายในดอก (J) อับเรณู (K) ผล (L) ก้านช่อดอก (M) ฝักอ่อน (N) เมล็ด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.5.2 ผลการบ่งชี้สายพันธุ์ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ดและระบุสายพันธุ์ย่อยของสารพัดพิษ

ผลการระบุชนิดของต้นสารพัดพิษด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด โดยใช้บริเวณยีน *rbcl* ที่อยู่ในบริเวณคลอโรพลาสต์ สุ่มตัวอย่างใบของต้นสารพัดพิษจากเกาะยวน้อย และเกาะยาวใหญ่ จังหวัดพังงา เกาะละ 2 ตัวอย่าง คือ STL014 และ STL015 จากเกาะยวน้อย และ STL01 และ STL036 จากเกาะยาวใหญ่ ซึ่งการสกัดดีเอ็นเอจะนำตัวอย่างใบแช่ด้วย CTAB เพื่อกำจัดองค์ประกอบของพืชที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพของดีเอ็นเอก่อนนำมาสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นนำดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่หรือเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) โดยใช้ยีนบริเวณ *rbcl* (Ribulose-bisphosphate carboxylase) ด้วยคู่ไพรเมอร์ *rbclN/840R* โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *rbcl* ของตัวอย่างพืชสารพัดพิษที่อุณหภูมิ Annealing 45 องศาเซลเซียส (Ernst และ Michael, 1997) พบว่าผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอแสดงแถบแบนไม่ชัดเจนและมีจำนวนหลายแถบ จึงเพิ่มอุณหภูมิ Annealing พบว่าที่อุณหภูมิ Annealing 60 องศาเซลเซียส ตัวอย่างแสดงแถบแบนเดียวที่มีขนาด 850 คู่เบส ดังรูปที่ 4.9 จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ส่งตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท U2Bio และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLAST ในฐานข้อมูล NCBI



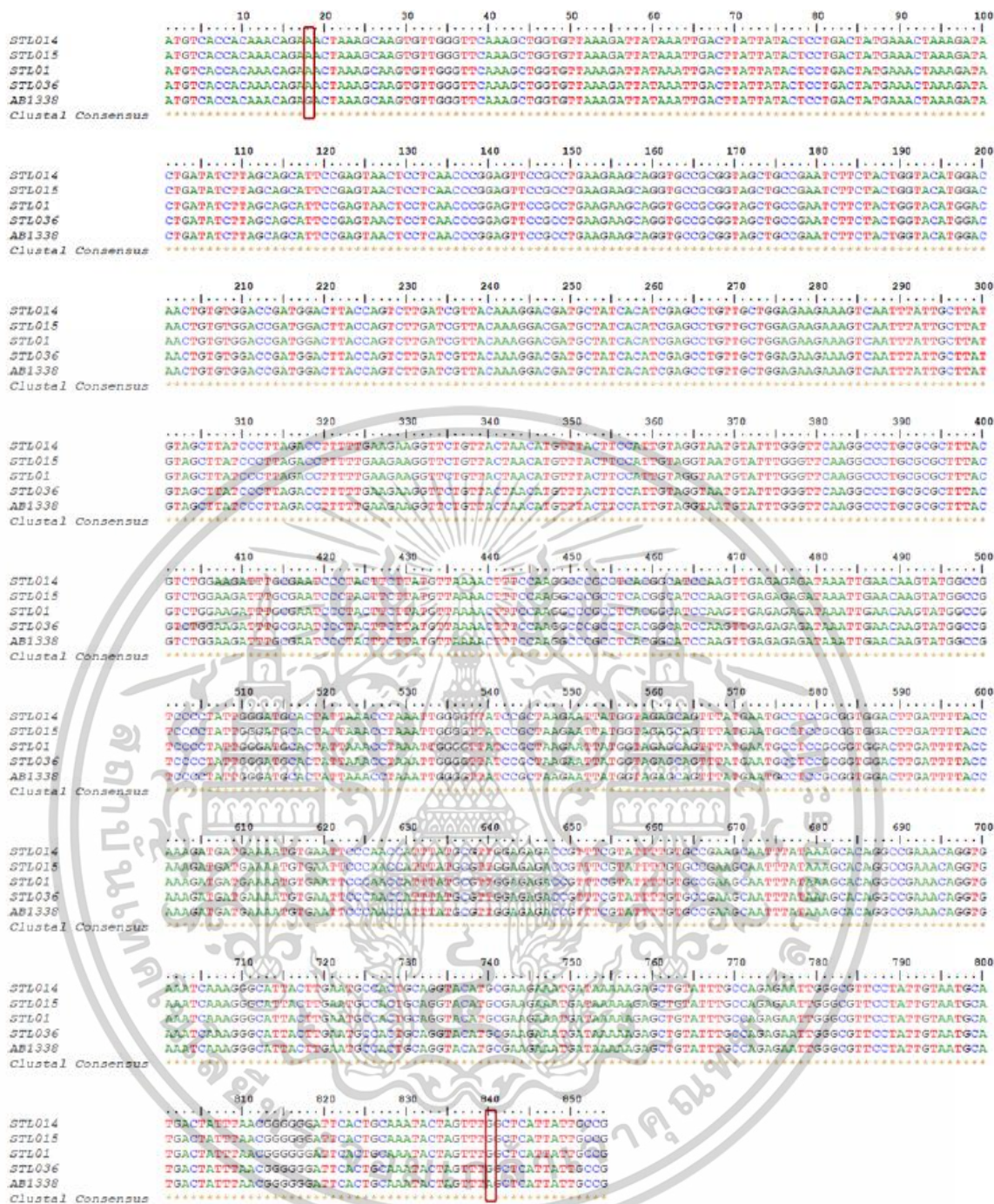
รูปที่ 4.9 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอร์เมอเรสบริเวณยีน

*rbcl*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับการเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในพืชทั้ง 4 ตัวอย่าง ไม้มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLAST ในฐานข้อมูล NCBI พบมีลำดับความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* มีความยาว 854 คู่เบส ดังรูปที่ 4.12 และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบความคล้ายคลึงในฐานข้อมูล NCBI พบว่าตัวอย่างมีความคล้ายคลึงกับพืช *S. tomentosa* หมายเลข AB127038 มีค่าความเหมือน 99.76 เปอร์เซ็นต์ โดยมีบริเวณแตกต่างกัน 2 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 18 และ 840 ดังตารางที่ 4.32

จากการศึกษาตัวอย่างจากเกาะยวน้อยและเกาะยวใหญ่พบว่าไม่แตกต่างกันเนื่องจากไม่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกันจากการใช้บริเวณยีน *rbcl* ซึ่งยีนบริเวณ *rbcl* เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่สามารถนำมาระบุตัวอย่างพืช *S. tomentosa* ได้ เนื่องจากยีน *rbcl* เป็นบริเวณที่เพิ่มจำนวนได้ง่าย มีการแทนที่ของเบสต่ำ ส่งผลให้สามารถบอกความแตกต่างในระดับวงศ์และสกุลได้ (Kress และ Erick, 2007) สอดคล้องกับการศึกษาของ Mayada และคณะ (2022) ใช้บริเวณยีน *rbcl* เพื่อระบุสายพันธุ์ของถั่วที่ไม่ทราบสายพันธุ์ที่พบได้ตามบริเวณแม่น้ำ Garow , Bronco, Cerdon, Goru และ Giza 3 เป็นสายพันธุ์เดียวกับ *Phaseolus vulgaris* อย่างไรก็ตามบริเวณยีนแต่ละตำแหน่งมีข้อจำกัดในการระบุชนิดพืชดังการศึกษาของจุฑามาส และคณะ (2020) ได้จัดจำแนกความแตกต่างของถั่วเหลือง 40 สายพันธุ์ ด้วยบริเวณยีน *ITS*, *rbcl* และ *rpocL* พบว่ามีเพียงบริเวณยีน *rbcl* และ *rpocL* ที่สามารถจำแนกถั่วเหลืองสายพันธุ์ขอนแก่น ออกจากสายพันธุ์ของถั่วเหลืองที่นำมาศึกษาได้ และบริเวณยีน *ITS* ไม่สามารถแยกสายพันธุ์ของถั่วเหลืองทั้ง 40 สายพันธุ์ออกจากกันได้ บ่งบอกได้ว่าบริเวณยีนแต่ละตำแหน่งมีความเหมาะสมต่อการจัดจำแนกแตกต่างกัน



รูปที่ 4.10 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ของตัวอย่างเกาะยวน้อย คือ STL014 และ STL015 และตัวอย่างเกาะยวนใหญ่ คือ STL01 และ STL036 และตัวอย่าง *S. tomentosa* หมายเลข AB127038 โดยใช้โปรแกรม BioEdit

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สแกนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.32 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันบริเวณยีน *rbcl* กับฐานข้อมูลของ *S. tomentosa*

ตำแหน่ง	ฐานข้อมูล GenBank		ตัวอย่างสารพัดพิช		
	<i>S. tomentosa</i>		เกาะยาวน้อย	เกาะยาวใหญ่	
	AB127038	STL014	STL015	STL01	STL036
18	G	A	A	A	A
840	A	G	G	G	G

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของแผนภูมิต้นไม้ด้วยโปรแกรม Mega 11 โดยอาศัยข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณยีน *rbcl* ของสายพันธุ์ในสกุล *Sophora* จำนวน 16 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4.33) จากฐานข้อมูล NCBI และรวมตัวอย่างในการศึกษานี้อีก 4 ตัวอย่าง โดยทำการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธี Maximum-Likelihood tree กำหนดค่าความเชื่อมั่นในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วย Bootstrap resampling method 1000 ซ้ำ สามารถจัดจำแนกได้ดังนี้ (รูปที่ 4.13)

ตารางที่ 4.33 ข้อมูลพืชในสกุล *Sophora* จำนวน 16 ตัวอย่าง ที่นำมาวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้

ลำดับ	สกุล	Accession number
1	<i>S. tomentosa</i>	AB127038
2	<i>S. tomentosa</i> var. <i>truncata</i>	KX385993
3	<i>S. tomentosa</i> var. <i>occidentalis</i>	KX385992
4	<i>S. tonkinensis</i> var. <i>polyphylla</i>	ON996753
5	<i>S. tonkinensis</i>	ON996752
6	<i>S. griffithii</i>	ON996721
7	<i>S. flavescens</i>	AB127037
8	<i>S. molloyi</i>	ON996732
9	<i>S. microphylla</i>	AY725480
10	<i>S. toromiro</i>	ON996754
11	<i>S. fernandeziana</i>	ON996715
12	<i>S. yunnanensis</i>	ON996764
13	<i>S. dunii</i>	ON996714
14	<i>S. velutina</i> var. <i>cavaleriei</i>	ON996758
15	<i>S. xanthoantha</i>	ON996763
16	<i>S. velutina</i>	ON996756

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่ม A แสดงความสัมพันธ์ของตัวอย่างจากเกาะยวน้อย (STL014 และ STL015) และเกาะยวใหญ่ (STL01 และ STL036) ที่มีลักษณะใบที่มีขนปกคลุมด้านบนใบคล้ายคลึงกับ *S. tomentosa* var. *truncata* และ *S. tomentosa* (AB127038) พบได้บริเวณติดชายหาด

กลุ่ม B *Sophora tomentosa* var. *occidentalis* ซึ่งใบมีขนปกคลุมหนาแน่นทั้งบริเวณด้านบนและด้านล่างของใบ ที่แสดงความสัมพันธ์กับพืช *S. griffithii*

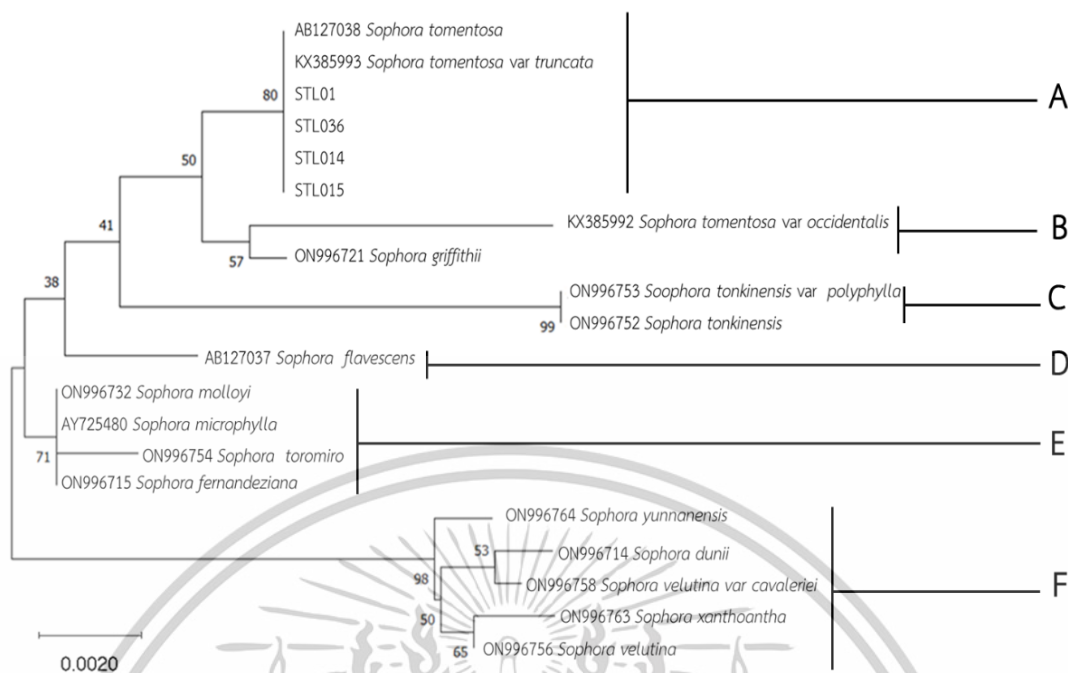
กลุ่ม C เป็นพืช *S. tonkinensis* แสดงความสัมพันธ์กับชนิดย่อย *S. tonkinensis* var. *polyphylla* เป็นพืชประจำถิ่นในประเทศจีนพบได้บริเวณแห้งแล้งมีลักษณะภูมิประเทศแบบหินปูน (Liang และคณะ, 2023)

กลุ่ม D *S. flavescens* เป็นไม้พุ่มผลัดใบเจริญบริเวณพื้นที่ดินทรายหรือดินร่วน

กลุ่ม E เป็นกลุ่มที่มีลักษณะใบเป็นใบประกอบแบบขนนกเรียงสลับ ใบย่อยมีขนาดเล็กมีรูปร่างของใบเป็นรูปขอบขนานพบได้ตามหมู่เกาะ *S. molloyi*, *S. microphylla*, *S. toromiro* และ *S. fernandeziana*

กลุ่ม F เป็นกลุ่มพืชที่เจริญได้ลักษณะภูมิประเทศเนินเขา *S. yunanensis*, *S. dunii*, *S. velutina* var. *cavaleriei*, *S. xanthoantha* และ *S. velutina*

เมื่อนำมาพิจารณาความสัมพันธ์ของแผนภูมิต้นไม้และพฤกษศาสตร์ของตัวอย่างพืชสารพัดพืช พบว่าตัวอย่างสารพัดพืชที่นำมาศึกษาในครั้งนี้มีความสัมพันธ์กับกับ *S. tomentosa* var. *truncata* ในกลุ่ม A เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับผลการศึกษาพฤกษศาสตร์พบว่าตัวอย่างพืชจากเกาะยวน้อยและเกาะยวใหญ่มีลักษณะของต้น ดอก เมล็ด และใบ อย่างสอดคล้องกัน จึงสามารถระบุชนิดย่อยได้ว่าตัวอย่างพืชที่นำมาว่าเป็นพืช *S. tomentosa* var. *truncata* อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาด้วยยีนบริเวณอื่นด้วย และศึกษาลักษณะของพืชเพื่อเป็นประโยชน์ในการศึกษาของพืชสารพัดพืชต่อไป



รูปที่ 4.11 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ (Maximum- Likelihood tree) ของตัวอย่างสารพันธุกรรมจากเกาะยวน้อยและยวใหญ่ กับพืชสกุล *Sophora* ของบริเวณยีน *rbcL*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

# สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

### 5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเมทานอลจากใบ เมล็ด และใบที่มีการกำจัดคลอโรฟิลล์ การประเมินพิษเคมีเบื้องต้นพบสารในกลุ่มอัลคาลอยด์และแทนนิน และสกัดจากใบและเมล็ดมีฤทธิ์ทางชีวภาพดีกว่าสารสกัดใบที่มีการกำจัดคลอโรฟิลล์ ทั้งในด้านความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก 2 สายพันธุ์ คือ *K. pneumonia* และ *B. cereus* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคที่ส่งผลให้เกิดอาการท้องเสีย ท้องร่วง และฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ เมื่อนำสารสกัดเมทานอลจากใบและเมล็ดมาแยกส่วนด้วยวิธี Liquid-liquid extraction ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ พบว่าสารสกัดแยกส่วนในชั้นไดคลอโรมีเทนและเอทิลอะซิเตทจากใบและเมล็ดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์สูง จึงนำสารสกัดแยกส่วนจากใบและเมล็ดในชั้นไดคลอโรมีเทนและเอทิลอะซิเตทมาแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Column chromatography พบสารสกัดส่วนย่อยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และฤทธิ์ต้านการอักเสบ และเมื่อนำสารสกัดจากใบและเมล็ดมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ตรวจพบสารสำคัญที่เป็นที่น่าสนใจในกลุ่มอัลคาลอยด์ กรดไขมัน และสารประกอบอินทรีย์ Matrine, Catechin, Hexadecanoic acid, 9,12 Octadecadienoic acid, 9-Octadecenamide และสารกลุ่ม Phthalic acid ซึ่งสารสำคัญที่ตรวจพบคาดว่าจะมีความสัมพันธ์ให้เกิดฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีซึ่งสามารถนำไปพัฒนาต่อด้านต่าง ๆ ได้ เช่น ทางเภสัชวิทยา อาหาร เกษตรกรรม เป็นต้น สำหรับการระบุสายพันธุ์และสายพันธุ์ย่อยของต้นสารพัดพิษด้วยวิธีดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณยีน *rbcl* พบว่าตัวอย่างจากเกาะยวน้อยและเกาะยวใหญ่ไม่พบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ และจากการศึกษาลักษณะและอนุกรมวิธานเพื่อระบุชนิดย่อยพบว่าตัวอย่างจากเกาะยวน้อยและเกาะยวใหญ่คล้ายคลึงกับ *S. tomentosa* var. *truncata* มีค่าความเหมือนร้อยละ 99.85

### 5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพจากใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษพบสารสำคัญที่สามารถนำไปพัฒนาต่อได้ในหลากหลายด้าน ในขณะเดียวกันสารสำคัญบางชนิดส่งผลให้เกิดความเป็นพิษจากการบริโภคอย่างเช่นเมล็ดที่พบสาร Toluene ในสารสกัดส่วนย่อยพบสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ภายในหลอดทดลองและภายในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 ได้ดีรวมทั้งส่งเสริมให้มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา จึงควรมีการศึกษาในสัตว์ทดลอง ส่งเสริมให้มีการปลูกต้นสารพัดพิษมากขึ้น โดยเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านการศึกษาไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดอกสามารถนำมาเป็นไม้ประดับเนื่องจากมีสีสันสวยงามและเพื่อเพิ่มการอนุรักษ์สายพันธุ์พืชสารพัด  
พืช อย่างไรก็ตามควรมีการกำหนดพื้นที่ในการปลูกเนื่องจากเมล็ดสารพัดพืชเป็นพืชต่อผู้บริโภคตั้ง  
ประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 424



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง

- กนกอร อัมพรายณ์, อนันต์ พิริยะภัทรกิจ และสุชมาภรณ์ แสงงาม. 2562. "สารพิษจากเชื้อแบคทีเรียและสมบัติ การต้านอนุมูลอิสระในใบขลุ่ยตากแห้งของชุมชนบ้านคลองตาหุ ชลบุรี" *วารสารเกษตร มสธ.* 1(1): 5-14.
- กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. *Bacillus cereus* เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคอาหารเป็นพิษ. [Online]. จาก [chromeextension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://nih.dmsc.moph.go.th/data/data/fact\\_sheet/66/nihfactsheet66-7.pdf](https://chromeextension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://nih.dmsc.moph.go.th/data/data/fact_sheet/66/nihfactsheet66-7.pdf).
- จุฑาภรณ์ ผลมะขาม. 2563. "ปัจจัยที่มีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากใบสัก." ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง.
- จุฑามาส พักทองพรรณ, อ้อยทิน ผลพานิช, อรุโณทัย ชาววา, ปาจรีย์ อินทะชูป และศุภลักษณ์ สัตยสมิทธิ. 2020. ความหลากหลายทางชีวภาพและจัดทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจ. กรมวิชาการเกษตร
- ทักษอร รัตนยูวัน. 2557. การพัฒนาตัวพออนุภาคนาโนไขมันที่บรรจุสารสกัดดอกดาวเรืองเพื่อยับยั้งฤทธิ์เอนไซม์ไทโรซิเนส. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์เภสัชกรรม บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- เนตรนภา เมยกลาง และเฉลิม เรืองวิริยะชัย. 2014. "การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ การต้านอนุมูลอิสระในเครื่องต้มผลไม้." *KKU Research Journal.* 14(4): 69-79.
- ประสาทร บรีสุทธิ์เพ็ชร, พิทย กัญญบุตร และสาธิต พรตระกูล พิพัฒน์. 2551. "การทดสอบฤทธิ์ ต้านเชื้อของสมุนไพรใน ห้องปฏิบัติการ." การประชุมวิชาการสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. (9): 91-101.
- พิรยุทธ สิทธิไชยากุล. 2554. Acute and Chronic Inflammation. [ออนไลน์]. เข้าถึงจาก <http://www.med.nu.ac.th/pathology/405313/book54/Inflammation.pdf>
- ศิริพร หมดหล้า และ พจนพร ไกรดิษฐ์. 2559. "สารอัลคาลอยด์จากพืช และกลไกการออกฤทธิ์ระดับ โมเลกุลในการต้านมะเร็ง." *Songklanagarind Medical Journal.* 35(1): 83-94.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- สำนักอุทยานแห่งชาติ. 2015. ชนิดของป่า สภาพป่าและพันธุ์พืช. [ออนไลน์]. เข้าถึงจาก.<http://portal.dnp.go.th/Content/nationalpark?contentId=2603>.
- สุชาติา โทผล, ปิยาภรณ์ วรานุสันติกุล, ศรีสุดา หาญภาคภูมิ, และนิวัฒน์ กังวานรังสรรค์. 2016. “ความเป็นพิษและการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็ง โดยสารสกัดหยาบจากสาบเสือ.” *SDU Research Journal of Sciences and Technology*. 9(2): 1-30.
- อมร ปोंกกัน. 2561. “การประเมินการรับสัมผัสสารโกลูอินที่มีความสัมพันธ์กับการทำหน้าที่ของตับไต และเม็ดเลือด ของผู้ปฏิบัติงานในสถานประกอบการอุ้เคาะพ่นสีรถยนต์ ในเขตอำเภอเมือง จังหวัดระยอง.” สาขาวิชาอาชีวอนามัยและความปลอดภัย คณะสาธารณสุขศาสตร์มหาวิทยาลัยบูรพา.
- เอนก หาลี และบุญยกฤต รัตน์พันธุ์. 2560. “การศึกษาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระจากพืชผักสมุนไพรพื้นบ้าน 15 ชนิด.” *วารสารวิจัยและพัฒนา มจร*. 40(2): 283-293.
- Abdalla, E.M.A., Darwish, S.M., Ayad, E.H.E. and Hamahmy, R.M. 2007. “Egyptian mango by-product 2: Antioxidant and antimicrobial activities of extract and oil from mango seed kernel.” *Food Chemistry*. 103: 1141-1152.
- Abdelsalam, N.R., Hasan, M.E., Javed, T., Rabie, S.M.A., El-Wakeel, H.E.M.F., Zaitoun. A.F., Abdelsalam, A.Z., Aly, H.M., Ghareeb, R.Y., Hemeida, A.A. and Shah, A.N. 2022. “Endorsement and phylogenetic analysis of some Fabaceae plants based on DNA barcoding.” *Molecular Biology Reports*. 49(6): 5645-5657.
- Ahlgren C.L. 2009. *Survivorship of Sophora tomentosa on the reef islands of Mo'orea, French Polynesia*. Environmental Science Biology. University of California. Berkeley: USA.
- Ahmadi, A., Shahidi, S.A., Safari, R., Motamedzadegan, A.I. and Azade, G.H. 2022. “Evaluation of stability and antibacterial properties of extracted chlorophyll from alfalfa (*Medicago sativa* L.)” *Food and Chemical Toxicology*. 163: 112980.
- Ali, F., Mehrdad, I., S, A.E., Esam, A.A.R., Gholamreza, Z. and Ahmad, R.S. 2014. “Sophoraflavanone G from *Sophora pachycarpa* Enhanced the Antibacterial Activity of Gentamycin against *Staphylococcus aureus*.” *Zeitschrift fur Naturforschung*. 61(9-10): 769-772.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Aly, S.H., Elissawy, A.M., Eldahshan, O.A., Elshanawany, M.A. and Singaab, A.N.B. 2019. "Morphological and genetic characteristics of *Sophora secundiflora* and *Sophora tomentosa* (Fabaceae) cultivated in Egypt." *Taekholmia*. 39: 103-129.
- Aly, S.H., Elissawy, A.M., Eldahshan, O.A., Elshanawany, M.A. and Singaab, A.N.B. 2020. "New quinolizidine alkaloid and insecticidal activity of *Sophora secundiflora* and *Sophora tomentosa* against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae)." *Natural Product Research*. 36(11): 2722-2734.
- Amerine, M.A. and Ough, C.S. 1980. "Total Phenolics-method for analysis of musts and wines." *John Wiley*. 5(4): 181-184.
- Apak, R., Gorinstein, S., Bohm, V., Schaich, K.M., Ozyurek, M. and Guclu, K. 2013. "Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant Capacity/activity (IUPACTechnical Report)." *Pure and Applied Chemistry*. 85(5): 957-998.
- Aparna, V., Dileep, K. V., Mandal, P. K., Karthe, P., Sadasivan, C. and Haridas, M. 2012. "Anti-Inflammatory Property of n-Hexadecanoic Acid: Structural Evidence and Kinetic Assessment." *Chemical Biology and Drug Design*. 80(3): 434-439.
- Arthofer, W., Schuler, S., Steiner, F.M. and Schlick-Steiner, B.C. 2010. "Chloroplast DNA-based studies in molecular ecology may be compromised by nuclear-encoded plastid sequence." *Molecular Ecology*. 19: 3853-3856.
- Arumugama, R., Sarikurkub, C., Mutluc, M. and Teped, B. 2021. "*Sophora alopecuroides* var. *alopecuroides*: Phytochemical composition, antioxidant and enzyme inhibitory activity of the methanolic extract of aerial parts, flowers, leaves, roots, and stems." *South African Journal of Botany* 143: 282-290.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Augustine, N.K., Edwige, L.N., Jacquy, J.W.K., William, N.Y., Calvin, Z.B., Christelle, S.S., Willifred, T.D.T., Timo, D.S., Guy, B.A.A. and Alain, B.D. 2024. “*Xeroderris stuhlmannii* (Taub.) Mendonça and E.P.Sousa (Fabaceae): Evidence of the antihypertensive and antioxidant activities of its leaf aqueous extract in cadmium chloride hypertensive rats.” *Heliyon*. 10(18): e38075.
- Berridge, M.V., Herest, P.M. and Tan, A.S. 2005. “Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction.” *Biotechnology Annual Review*. 11: 127-152.
- Bergandi, L., Apprato, G. and Silvagno, F. 2022. “Antioxidant and anti-inflammatory activity of combined phycocyanin and palmitoylethanolamide in human lung and prostate epithelial cells.” *Antioxidants*. 11(2): 201.
- Carrillo, C., Nieto, G., Lorena, M.Z., Ros, G., Kamiloglu, S., Paulo, E.S. M., Pateiro, M., Lorenzo, M., Juana, F.L., 7, Manuel, V.M., Jose A.P.A. and Barba, F.J. 2022. “Novel approaches for the recovery of natural pigments with potential health effects.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 70(23): 6864-6883.
- Cassia, C.C., Thacyana, T.H., Hohmann, M.S.N., Felipe, A.P.R., Victor, F., Manchope, M.F., Ana, Z.C., Marcela, M.B., Sandra, R.G., Rubia, C. and Waldiceu, A.V.J. 2015. “Vanillic acid inhibits inflammatory pain by inhibiting neutrophil recruitment, oxidative stress, cytokine production, and NF-KB activation in mice.” *Journal of Natural Products*. 78(8): 1799-808.
- Chae, H.S., Yoo, H., Kim, Y.M., Choi, Y.H. and Chin, Y.W. 2016. “Anti-Inflammatory effects of 6,8-Diprenyl-7,4-dihydroxyflavanone from *Sophora tonkinensis* on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells.” *Molecules*. 21: 1049.
- Chanda, S., Dudhatra, S. and Kaneria, M. 2010. “Antioxidative and antibacterial effects of seeds and fruit rind of nutraceutical plants belonging to the Fabaceae family.” *Food and Function*. 1(3): 308-315.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Chusana, M., Siriporn, T. and Nednapis, V. 2018. "Anti-inflammatory and antioxidant activities of germinated small red bean (*Vigna angularis*) extracts on hyperglycemia condition in murine macrophage cell line" *Journal of Nutrition Association of Thailand*. 53(2): 84-97.
- Cho, B.O., Che, D.N., Kim, J.S., Kim, J.H., Shin, J.Y., Kang, H.J. and Jang, S. 2020. "In vitro anti-inflammatory and anti-Oxidative stress activities of Kushenol C isolated from the roots of *Sophora flavescens*." *Molecules*. 25: 1768.
- Cindy, M.R., Morisseau, C., Wagner, K. and Hammock, B. 2020. "Epoxy fatty acids Are promising targets for treatment of pain, cardiovascular disease and other indications characterized by mitochondrial dysfunction, endoplasmic stress and inflammation." *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1274: 71-99.
- Daniyah, A., Sue, E.S. and Ashok, K.G. 2015. "How effective are antioxidant Supplements in obesity and diabetes?." *Medical Principles and Practice*. 24(3): 201-215.
- Doyle, J. and Doyle, J.L. 1987. "A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue." *Phytochemical Bulletin*. 19(1): 11-15.
- Dzoyem, J.P., Mcgaw, J.L. and Eloff, J.N. 2014. "In vitro antibacterial, antioxidant and cytotoxic activity of acetone leaf extracts of nine under-investigated Fabaceae tree species leads to potentially useful extracts in animal health and productivity." *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 14: 147.
- Ebanks, J.P., Wickett, R.R., and Boissy, R.E. 2009. "Mechanisms regulating skin pigmentation: The rise and fall of complexion coloration." *International Journal of Molecular Sciences*. 10(9): 4066-4087.
- Ekta, B., Rajashree, D., Swati, C. and Suparna, M.B. 2019. "Phytochemical profiling of *Artocarpus lakoocha* Roxb. leaf methanol extract and its antioxidant, antimicrobial and antioxidative activities." *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 9(11): 484-492.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Elham, A., Shima, J., Maryam, A., Seyran, H. and Dara, D. 2017. "Chemical composition and biological properties of *Satureja avromanica* Maroofi." *Journal of Food Science and Technology*. 54(3): 727-734.
- Ernst, K.S. and Michael, W. 1997. "Phylogenetic Relationships in the Papilionoidea (Family Leguminosae) based on nucleotide sequences of cpDNA (*rbcl*) and ncDNA (ITS 1 and 2)." *Molecular Phylogenetics And Evolution*. 8(1): 65-88.
- Eyasu, M., Benedi, J., Romero, J.A. and Martin-Aragon, S. 2024. "Antioxidant and antibacterial activities of selected medicinal plants from Addis Ababa against MDR-Uropathogenic bacteria." *International Journal of Molecular*. 25(19): 10281.
- Fan, F., Chen, L., Chen, C. Ang, S., Gutkowski, J., Seeram, N.P, Ma, H., and Li, D. 2024. "Prenylated flavonoids from *Sophora flavescens* inhibit mushroom tyrosinase activity and modulate melanogenesis in murine melanoma cells and zebrafish." *Frontiers in Pharmacology*. 15.
- Fereshteh, S., Mahdi, M.F., Masoud, G. and Houman, B. 2023. "In vitro wound healing potential of cyclohexane extract of *Onosma dichroantha* Boiss. based on bioassay-guided fractionation." *Scientific Reports*. 13: 5018.
- Fritsche, K.L. 2014. "Linoleic acid, vegetable oils and inflammation." *Missouri Medicine*. 111(1): 41-43.
- Ganesan, T., Subban, M., Leslee, D.B.C., Kuppannan, S.B. and Seedeivi, P. 2024. "Structural characterization of n-hexadecanoic acid from the leaves of *Ipomoea eriocarpa* and its antioxidant and antibacterial activities." *Biomass Conversion and Biorefinery*. 14: 14547-14558.
- Gareth, L.A., Ana, G.D.A., Song, T.Y., Robert, C.S., Alexander, D., Nigel, J. K., Mervyn, S. and Alexander, V.G. 2010. "Low-molecular-weight polyethylene glycol improves survival in experimental sepsis." *Critical Care Medicine*. 38(2): 629-636.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Gu, M., Roy, S., Raina, K., Agarwal, C. and Agarwal, R. 2009. "Inositol hexaphosphate suppresses growth and induces apoptosis in prostate carcinoma cells in culture and nude mouse xenograft: PI3K-Akt pathway as potential target." *Cancer Research*. 69(24): 9465-9472.
- Gupta, M.K. and Sharma, P.K.A., Han, S., Mistry, A., Chang, J.S., Cunningham, D., Matt, G.P.C., Bonnette, H.W., Boris, A.C., Aspnes, G.E., Walker, D.P., Brosius, A.D. and Leonard, B. 2009. "Structural characterization of proline-rich tyrosine kinase 2 (PYK2) reveals a unique (DFG-out) conformation and enables inhibitor design." *The Journal of Biological Chemistry*. 284(19): 13193-13201.
- Habib, M.R. and Karim, M.R. 2009. "Antimicrobial and cytotoxic activity of Di-(2-ethylhexyl) phthalate and anhydrosophoradiol-3-acetate isolated from *Calotropis gigantea* (Linn.) Flower." *Microbiology*. 37: 31-36.
- Hamdullah, S. and Ismet, M. 2022. "Synthesis and characterization of *Sophora alopecuroides* L. green synthesized of Ag nanoparticles for the antioxidant, antimicrobial and DNA damage prevention activity." *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 58(1): e20992.
- He, X., Fang, J., Huang, L., Wang, J. and Huang, X. 2015. "*Sophora flavescens* Ait. traditional usage, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine." *Journal of Ethnopharmacology*. 172: 10-29.
- Hideki, H., Uki, Y., H.K., Eri, F., Jun, K. and Yuto, K. 2002. "Antitumor activity of palmitic acid found as a selective cytotoxic substance in a marine red algae." *Anticancer Research*. 22(5): 2587-2590.
- Huang, W.H. LEE, A.R. and Yang, C.H. 2006. "Antioxidative and anti-inflammatory activities of polyhydroxyflavonoids of *Scutellaria baicalensis* GEORGI." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 70(10): 2371-2380.
- Inas, M.M.A.E.E., A.R., Zeatar, A.Z., Maie, A.E. and Yehia, A. G.M. 2023. "Diisooctyl phthalate as a secondary metabolite from actinomycete inhabit animal's dung with promising antimicrobial activity." *Egyptian Journal of Chemistry*. 66(12): 261-277.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Jelodar, G., Mohammadi, M., Akbari, A. and Nazifi, S. 2020. "Cyclohexane extract of walnut leaves improves indices of oxidative stress, total homocysteine and lipids profiles in streptozotocin-induced diabetic rats." *Physiological Reports*. 8(1): e14348.
- John, W., Ho, Parry, Lee., Ngan, Hon. and Wai, O.C. 2009. "Effects of oxymatrine from Ku shen on cancer cells." 9(8): 823-826.
- Johnston, C.S. and Luo, B. 1994. "Comparison of the absorption and excretion of three commercially available sources of vitamin C." *Journal of the American Dietetic Association*. 94(7): 779-781.
- Jorge, K. 2003. "Soft drinks chemical composition." *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Second Edition). 5346-5352.
- Kaewdana, K., Chaniad, P., Jariyapong, P., Phuwajaroanpong, A. and Punsawad, C. 2021. "Antioxidant and antimalarial properties of *Sophora exigua* Craib. root extract in Plasmodium berghei-infected mice." *Tropical Medicine and Health*. 49: 24.
- Karabulut, I., Balkanci, Z.D., Pehlivanoglu, B., Erdem, A. and Fadillioglu, E. 2009. "Effect of toluene on erythrocyte membrane stability under in vivo and in vitro conditions with assessment of oxidant/antioxidant status." *Toxicology and Industrial Health*. 25(8): 545-550.
- Karolina, A.W.K. 2020. "Approach to optimization of FRAP Methodology for studies based on selected monoterpenes." *Molecules*. 25(22): 5267.
- Kavaz, D. and Razan, E.L. 2023. "Investigation of composition, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic characteristics from *Juniperus sabina* and *Ferula communis* extracts." *Scientific Reports*. 13: 7193.
- Khaled, F.E., Ahmed, H.E., Amr, F.E.M., Ahmed, H.E.G. and Amr, F. 2002. "Antioxidant activity and volatile components of Egyptian *Artemisia judaica* L." *Food Chemistry*. 79(3): 331-336.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Kim, H.Y., Moon, J.Y. and Cho, S.K. 2023. "Heptadecanoic acid, an odd-chain fatty acid, induces apoptosis and enhances gemcitabine chemosensitivity in pancreatic cancer cells." *Journal of Medicinal Food*. 26(3): 201-210.
- Kinoshita, T., Ichinose, K., Takahashi, C., Ho, F.C, Wu, J.B. and Sankawa, U. 1990. "Chemical studies on *Sophora tomentosa*: the isolation of a new class of bioflavonoid." *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 38(10): 2756-2759.
- Kumar, S. and Pandey, A.K. 2015. "Free radicals: health implications and their mitigation by herbals." *British Journal of Medicine and Medical Research*. 7(6): 438-457.
- Kwon, J., Basnet, S., Lee, J. W., Seo, E.-K., Tsevegsuren, N., Hwang, B. Y. and Lee, D. 2015. "Chemical constituents isolated from the Mongolian medicinal plant *Sophora alopecuroides* L. and their inhibitory effects on LPS-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages." *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 25(16): 3314-3318.
- Lai, J.S., Lin, C.C. and Chiang, T.M. 2014. "Tyrosinase inhibitory activity and thermal stability of the flavonoid complex from *Sophora japonica* L. (Fabaceae)." *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 13(2): 243-247.
- Li, Q., Wu, Y., Chen, X., Zhu, L. and Wan, L. 2022. "Ascorbic acid 6-palmitate modulates microglia M1/M2 polarization in lipopolysaccharide-stimulated BV-2 cells via PERK/eIF2 $\alpha$  mediated endoplasmic reticulum stress." *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 22: 302.
- Liang, Y., Wei, F., Qin, S., Li, M., Hu, Y., Lin, Y., Wei, G., Wei, K., Miao, J. and Zhang, Z. 2023. "*Sophora tonkinensis*: response and adaptation of physiological characteristics, functional traits, and secondary metabolites to drought stress." *Plant Biology*. 25(7): 1109-1120.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A. and Chandra, N. 2010. "Free radicals, antioxidants and foods: Impact on human health." *Pharmacognosy Reviews*. 4(8): 118-126.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Madepalli, B.V. and Thiyagaraj, M.S. 2018. "Antibacterial activity of di-butyl phthalate isolated from *Begonia malabarica*." *Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering*. 5(2): 97-100.
- Martins, A.M., Malafaia, C.R.A., Nunes, R.M., Mecnas, A.S., Moura, P.H.B.D., Muzitano, M.F., Machado, T.D.B., Carneiro, C.D.S. and Leal, I.C.R. 2024. "Nutritional, chemical and functional potential of *Inga laurina* (Fabaceae): A barely used edible species." *Food Research International*. 178: 113751.
- Martiyasari, N.W.R., Ardiana, A., Ilhami, B.T.K., Padi, H., Abidin, A.S., Sunarwidhi, S.L., Sunarpi, H., Nikmatullah, A., Widyastuti, S. and Prasedya, E.S. 2021 "The effect of extraction solvent polarity on cytotoxic properties of *Sargassum crassifolium* against B16-F10 melanoma cancer cell model." *International Conference on Bioscience and Biotechnology*. 913(1): 012105.
- Masum, M.N., Yamauchi, K., and Tohru, M. 2019 "Tyrosinase Inhibitors from natural and synthetic sources as skin-lightening agents." *Reviews in Agricultural Science*. 7: 41-58.
- Mayada, Y.E., El-Akkad, T.A., Agez, A., Refaat, M.H. and Abd-El-Sabour, M. 2022. "DNA-barcoding and identification for some common bean and tepary bean genotypes using *rbcL* Gene." *Annals of agricultural science, Moshtohor*. 60(1): 119-126.
- Mehler, E.L. and Gerhards, J. 1987. "Electronic determinants of the anti-inflammatory action of benzoic and salicylic acids." *Molecular Pharmacology*. 31(3): 284-293.
- Mihaylova, D. and Schalow, S. 2013. "Antioxidant and stabilization activity of a quercetin containing flavonoid extract obtained from Bulgarian *Sophora japonica* L." *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 56(3): 431-438.
- Miklos, P., David, R.W.J and Oliver, F. 2014. "Gusperimus: immunological mechanism and clinical applications." *Rheumatology*. 53: 1732-1741.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Milan, G., K, J., Vikram, J., Manjuprasanna, V.N., Rudresha, G.V., Devadasan, V., Raman, P. Jameel, N.M. and Vishwanath, B.S. 2022. "Syringol isolated from *Eleusine coracana* (L.) Gaertn bran suppresses inflammatory response through the down-regulation of cPLA2, COX-2, **IKK $\alpha$** , p38 and MPO signaling in sPLA2 induced mice paw oedema." *Inflammopharmacology*. 30(5): 1853-1870.
- Mita, S.R., Husni, P., Putriana, N.A., Maharani, R., Hendrawan, R.P. and Dewi, D.A. 2024. "A recent update on the potential use of catechins in cosmeceuticals." *Cosmetics*. 11(1): 23.
- Mohammed, B.H. and Mosab, N.M.H. 2020. "GC-MS analysis, antimicrobial and antioxidant activity of *Sudanes Adansoina digitata* L; (Malvaceae) fixed Oil." *Saudi Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences*. 6(8): 535-540.
- Mousavia, S.H., Motaeza, M., Zamiri-Akhlagh, A., Emamic, S.A. and Tayarani-Najaran, Z. 2014. "In-vitro evaluation of cytotoxic and apoptogenic properties of *Sophora Pachycarpa*." *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 13(2): 665-673.
- Mulaudzi, R.B., Ndhlala, A.R., Kulkarni, M.G., Finnie, J.F. and Van, S.J. 2011. "Antimicrobial properties and phenolic contents of medicinal plants used by the Venda people for conditions related to venereal diseases." *The Journal of Ethnopharmacology*. 135(2): 330-337.
- Nair, R.V.R., Jayasree, D.V., Biju, P.G. and Baby, S. 2018. "Anti-inflammatory and anticancer activities of erythrodiol-3-acetate and 2,4-di-tert-butylphenol isolated from *Humboldtia unijuga*." *Natural Product Research*. 34(16): 2319-2322.
- Nakanishi, T., Mukai, K., Yumoto, H., Hirao, K., Hosokawa, Y. and Matsuo, T. 2010. "Anti-inflammatory effect of catechin on cultured human dental pulp cells affected by bacteria-derived factors." *European Journal of Oral Sciences*. 118(2): 145-150.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Natungnuy, K. and Poeaim, S. 2018. "Antioxidant and cytotoxic activities of methanolic extracts from *Mimusops elengi* Flowers." *International Journal of Agricultural Technology*. 14(5): 731-740.
- Nausheen, N., Muhammad, Z., Faheem, U. and Mohammad, N. 2021. "Chemical composition, in vitro antioxidant, anticholinesterase, and antidiabetic potential of essential oil of *Elaeagnus umbellata* Thunb." *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 21(1): 73.
- Nedhal, A.L. and Ashok, K.S. 2019. "Fatty acids analysis and antioxidant activity of a lipid extract obtained from *Mercurialis annua* L. grown wildly in Jordan." *Polish Pharmaceutical Society*. 2(76)76: 275-281.
- Ngidi, L.S., Nxumalo, C.I., Shandu, J.S., Maliehe, T.S. and Rene, K. 2021. "Antioxidant, antiquorum sensing and cytotoxic properties of the endophytic *Pseudomonas Aeruginosa* CP043328.1 's extract." *Pharmacognosy Journal*. 13(2): 332-340.
- Niyomdechcha, M. and Lohawittayan, D. 2016. "Synthesis of Oseltamivir derivatives with anti-tyrosinase for making whitening skin." *Veridian E-Journal Science and Technology Silpakorn University*. 3(5): 66-81.
- Nurgun K., Nezaket, A., Semiha, O. and Fatma, T. 2010. "Alkaloid profiles and biological activities of different *Sophora jaubertii* extracts." *The Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*. 7(1): 1-8.
- 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(5): 1-12.
- Palomino, G., Martinez, P., Bernal, C. and Sousa, M.S. 1993. "Diferencias cromosomicas entre algunas species de los generos *Sophora* L. y *Styphnolobium* Schott." *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 80(1): 284-290.
- Perry, L.M. and Metzger, J. 1980. *Medicinal plants of East and Southeast Asia: attributed properties and uses. Bibliography*, MIT Press, Cambridge, Massachusetts London. 447-493.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Peyman, E., Zahra, S., Setareh, T., Dasha, M. and Anna, L. 2023 “Chlorophylls as natural bioactive compounds existing in food by-products: a critical review.” *Plants*. 12: 1553.
- 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 & H. Rob.” *Songklanakarinn Journal Science. Technol.* 42(5): 1084-1090.
- Phonmakham, J., Wattanasuksakul, S. and Poeaim, S. 2018. “Antibacterial and anti-tyrosinase activities of the methanolic extracts from leaves of *Tectona grandis*.” *International Journal of Agricultural Technology*. 14(7): 1611-1618.
- Piyada, B., Theerachai, T. and Narumol, T. 2015. “Identification of mangoes cultivars in Thailand using DNA sequences of *rpoC1* and *rbcl* genes.” *Thai Science and Technology Journal*. 23(6): 983-994.
- Kress, W.J. and Erickson, D.L. 2007. “A two-locus global DNA barcode for land plants: The coding *rbcl* Gene complements the non-coding *trnH-psbA* Spacer region. *PLOS ONE*. 2: e508.
- Quradha, M.M., Khan, R., Adhikari, A., Rauf, A., Rashid, U., Bawazeer, S., Al-Awthan, Y.S., Bahattab, O. and Mubaarak, M.S. 2021. “Isolation, biological evaluation, and molecular docking studies of compounds from *Sophora mollis* (Royle) Graham Ex Baker.” *ACS Omega*. 6(24): 15911-15919.
- Ozturkel, K.H., Sezer, K.M., Onat, T.K.A. and Col, B. 2024. “The cytotoxicity effect of benzoic acid on ten different cancer cell lines.” *Eskisehir Technical University Journal of Science and Technology A - Applied Sciences and Engineering*. 25(1): 66-77.
- Reza, A.S.M.A., Haque, M.A., Sarker, J., Nasrin, M. S., Rahman, M. M., Tareq, A. M. and Alam, A. K. 2021. “Antiproliferative and antioxidant potentials of bioactive edible vegetable fraction of *Achyranthes ferruginea* Roxb. in cancer cell line.” *Food Science and Nutrition*. 9(7): 3777-3805.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Rossellia, S., Maggio, M., Formisanob, C., Napolitanob, P., Senatoreb, F., Spadaroc, V. and Brunoa, M. 2007. "Chemical composition and antibacterial activity of extracts of *Helleborus bocconeii* Ten. subsp. *intermedius*." *Natural Product Communications*. 2(6): 676-679.
- Saeed, N.M., Demerdash, E.E., Rahman, A.H.M., Algandaby, M.M., Al-Abbasi, F.A. and Abdel-Naim, A. B. 2012. "Anti-inflammatory activity of methyl palmitate and ethyl palmitate in different experimental rat models." *Toxicology and Applied Pharmacology*. 264(1): 84-93.
- Sang, H.P., Eunju, C., Sunggyu, K., Dong, S.K., Ji-Hyeon, K., SeokGu, C., Jae-Seok, C., Kyung-Ja, P., Kyung-Baeg, R., Jongsung, L., Byong-Chul, Y. and Jae-Youl, C. 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: 2825.
- Sangpairoj, K., Settacomkul, R., Siangcham, T., Meemon, K., Niamnont, N., Sornkaew, N., Tamtin, M., Sobhon, P. and Vivithanaporn, P. 2022. "Hexadecanoic acid-enriched extract of *Halymenia durvillei* induces apoptotic and autophagic death of human triple-negative breast cancer cells by upregulating ER stress." *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 12(3): 132-140
- Santos, N.F., Salas-Coronado, R. and Villanueva, C. 2019. "Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism." *Antioxidant*. 10.5772
- Sato, M., Tsuchiya, H., Takase, I., Kureshiro, H., Tanigaki, S. and Iinuma, M. 1995. "Antibacterial activity of flavanone isolated from *Sophora exigua* against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and its combination with antibiotics." *Phytotherapy Research*. 9: 509-512.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesv, C. and Jimenez, L. 2005. "Dietary polyphenols and the prevention of diseases." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 45(4): 287-306.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Shaheen, S., Khajapeer, M. and Kavitha, B. 2018. "Pharmacognostical studies and antimicrobial activity of the leaves of *Sophora interrupta* Bedd." *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 8(4): 935-947.
- Shyamaladevi, B. and Selvaraj, J. 2020. "An update on  $\beta$ -sitosterol: A potential herbal nutraceutical for diabetic management." *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 131: 110702.
- Siddharth, S. and Rai, V.R. 2019. "Isolation and characterization of bioactive compounds with antibacterial, antioxidant and enzyme inhibitory activities from marine-derived rare actinobacteria *Nocardiopsis* sp. SCA21." *Microbial Pathogenesis*. 103775.
- Silva, J., Alves, C., Martins, A., Susano, P., Simoes, M., Guedes, M., Rehfeldt, S., Pinteus, S., Gaspar, H., Rodrigues, A., Goettert, M.I., Alfonso, A. and Pedrosa, R., 2021. "Loliolide, a new therapeutic option for neurological diseases? *In vitro* neuroprotective and anti-inflammatory activities of a monoterpenoid lactone isolated from *Codium tomentosum*." *International Journal of Molecular Sciences*. 22(4): 1888.
- Sindhuja, L., Kesavaram, P., Thirunavukarasu, U.A. and Dhandapani, P. 2024. "Phytochemical profiling and antioxidant potential of methanolic extract of *Vitis vinifera* L seeds." *Chulalongkorn Medical Journal*. 68(4): 299-305.
- Smitinand, T. 2001. Thai plant names. Bangkok, The Forest Herbarium Royal Forest Department. 491.
- Song, P., Chen, H., Wen, Y.Z., Yibing, L., Shihao, D., and Xinzhou, Yang. 2018. "Cytotoxic compounds from the seeds of *Sophora alopecuroides*." *Natural Product Communications*. 13(8): 997-1000.
- Sowemimo, A., Venables, L., Odedeji, M., Koekemoer, T., Venter, M.V.D. and Hongbing, L. 2015. "Antiproliferative mechanism of the methanolic extract of *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. (Fabaceae)." *Journal of Ethnopharmacology*. 159: 257-261.
- Stephen H. Brown. 2018. *Sophora tomentosa*. [Online]. University of Florida <http://lee.ifas.ufl.edu/hort/GardenHome.html>.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Suthasinee, Y., Theeraphol, S., Sutee, W., Chalalai, J. and Sitthipong, N. 2021. "Characteristic and antioxidant activity of *Cladophora glomerata* ethanolic extract as affected by prior chlorophyll removal and drying methods." *Food Process Preservation*. 48(8): 2-14.
- Suppalak, P., Gorawit, Yusakul., Attapon, S., Nattapon, T., Seiichi, S. and Waraporn, P. 2020. "A green and effective method using oils to remove chlorophyll from *Chromolaena odorata* (L.) R.M. King & H. Rob." *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 42 (5): 1084-1090.
- Suran, J., Ivica, C., Tomislav, M., Kristina, S., Gajger, I.T., Mihaela, V., Radic, B., Sasa, R., Ivan, K. and Josipa, V. 2021. "Nonaqueous polyethylene glycol as a safer alternative to ethanolic propolis extracts with comparable antioxidant and antimicrobial activity." *Antioxidants*. 10: 978.
- Tai, Z., Cai, L., Dai, L., Dong, L., Wang, M., Yang, Y., Cao, Q. and Ding, Z. 2011. "Antioxidant activity and chemical constituents of edible flower of *Sophora vicijifolia*." *Food Chemistry*. 126: 1648-1654.
- Tanaka, T., Iinuma, M., Asai, F., Ohyama, M. and Burandt, B. 1997. "Flavonoids from the root and stem of *Sophora tomentosa*." *Phytochemistry*. 46: 1431-1437.
- Tang, Y.P., Hu, J., Wang, J.H. and Lou, F.C. 2002. "A new coumaronochromone from *Sophora japonica*." *Journal of Asian Natural Products Research*. 4: 1-5.
- Thiyagaraj, M.S. and Madepalli, B.G.V. 2018. "Antibacterial activity of di-butyl phthalate isolated from *Begonia malabarica*." *Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering*. 5(2): 97-100.
- Theivanai, G., Murugesan, S., Denzil, B., Shanmuga, B. and Palaniappan, S. 2022. "Structural characterization of n-hexadecanoic acid from the leaves of *Ipomoea eriocarpa* and its antioxidant and antibacterial activities." *Biomass Conversion and Biorefinery*. 14(3): 14547-14558.
- Tian, J., Gong, Y. and Li, J. 2022. "Nutritional attributes and phenolic composition of flower and bud of *Sophora japonica* L. and *Robinia pseudoacacia* L." *Molecules*. 27(24): 8932.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Trang, C.M.N., Chi, H.N.Q., Manh, N.K., Son, H.N., Ngo, D.N. and Long, L.T. 2021. “The chloroform extracts of Vietnamese *Sophora flavescens* Ait. Inhibit the proliferation of HepG2 cells through apoptosis induction.” *Molecules*. 26(23): 7228.
- Van der vliet, A., Eiserich, P.J. and Cross, C.E. 2000. “Nitric oxide: a pro-inflammatory mediator in lung disease.” *Respiratory research*. 1(2): 67-72.
- Vasudevan, A., Kalarickal V.D., Pradeep, K.M., Ponnuraj, K., Chittalakkottu, S., and Madathilkovilakathu, H. 2012. “Anti-inflammatory property of n-hexadecanoic Acid: structural evidence and kinetic assessment.” *Chemical Biology & Drug Design*. 80: 434-439.
- Viet, T.D., Xuan, T.D. and Anh, L.H. 2021. “ $\alpha$ -Amyrin and  $\beta$ - Amyrin isolated from *Celastrus hindsii* leaves and their antioxidant, anti-xanthine oxidase, and anti-tyrosinase potentials.” *Molecules*. 26: 7248.
- Vithya, T., Kavimani, D.R.V., Alhasajiju, K., Raj Kapoor, B. and Savitha, B.K. 2012. “An in vitro evaluation of cytotoxic activity of *Sophora interrupta*.” *International journal of Pharma and Biosciences*. 2(2): 420-425.
- Wang , U.O., Lin, R.D., Hsu, F.L., Huang, Y.H., Chang, H.C., Huang, C.Y. and Lee, M.H. 2006. “Cosmetic applications of selected traditional Chinese herbal medicines.” *Journal of Ethnopharmacology*. 106: 353-359.
- Wang, R., Deng, X., Gao, Q., Wu, X., Han, L., Gao, X., Zhao, S., Chen, W., Zhou, R., Li, Z. and Bai, C. 2020. “*Sophora alopecuroides* L.: An ethnopharmacological, phytochemical, and pharmacological review.” *Journal of Ethnopharmacology*. 248(2): 112172.
- Wen, M. and Mao, X.J. 2006. “Research progress on chemical composition, anti inflammatory and antiallergic activity of *Sophora viciifolia*.” *Yunnan Journal of Traditional Chinese Medicine and Materia Medical*. 27: 63-64.
- Wilkinson J.M. 2006. *Modern Phytomedicine: Turning Medicinal Plants into Drugs*. Germany, Wiley-VCH.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.U. 1990. "DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers." *Nucleic Acids Research*. 8: 6531-6535.
- Wuttipong Mahakham. 2011. "DNA barcodes of plants: basic concept, application and limitation." *Thai journal of botany*. 3(1): 1-30.
- Xing, N.L., Sha, N., Yan, H.X., Pang, X.Y., Guan, S.H., Yang, M., Hua, H.M., Wu, L.J. and Guo, D.A. 2008. "Isoprenylated flavonoids from the roots of *Sophora tonkinensis*." *Phytochemistry Letters*. 1: 163-167.
- Xu, C., Wu, P., Gao, J., Zhang, L., Ma, T., Ma, B., Yang, S., Shao, G., Yu, Y., Huang, X., Yang, H. and Zhang, B. 2019. "Heptadecanoic acid inhibits cell proliferation in PC9 non-small cell lung cancer cells with acquired gefitinib resistance." *Oncology Reports*. 41(6): 3499-3507.
- Yamashita, J. and Tamura, M.N. 2000. Molecular phylogeny of the Convallariaceae (Asparagales). In: Wilson, K.L. and Morrison, D.A. (eds.) *Monocots-Systematics and Evolution*. CSIRO Publishing: Melbourne.
- Yoshiaki, S., Mari, W., Yamamoto, Y., Hashimoto, K., Sayoh, K., Ishihara, M., Kikuchi, H., Nishikawa, H., Minagawa, K., Motohashi, N. and Sakagami, H. 2004. "Cytotoxicity and radical modulating activity of isoflavones and isoflavanones from *Sophora* Species." *Anticancer Research*. 24: 1481-1488.
- Zahra, S.A., Iqbal, J., Abbasi, B.A., Yaseen, T., Hameed, A., Shahbaz, A., Kanwal, S., Mahmood, T. and Ahmad, P. 2021. "Scanning electron microscopy of *Sophora alopecuroides* L. seeds and their cytotoxic, antimicrobial, antioxidant and enzyme inhibition potentials." *Microscopy Research and Technique*. 84(8): 1809-1820.
- Zhang, B.M., Wang, Z.B., Xin, P., Wang, Q.H., Bu, H. and Kuang, H.X. 2018. "Phytochemistry and pharmacology of genus Ephedra." *Chinese Journal of Natural Medicines*. 16: 811-828.
- Zhao, W.Y., Xiao, W., Hao, H.Q., Zheng, K., Zhang, D.D., Jin, Q. and Zhu, Q.S. 2021. "Comparison of activity and components of *Sophora flavescens* root and seed." *Earth and Environmental Science*. 705(1): 1755-1315.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Zhifei, C., Qiang, L., Zhiwei, Z., Bing, B., Zhitao, S., Lili, C., Yufeng, F., Yuping, M., Qingfu, W. and Gaolei, X. 2021. "Effect of hydroxyl on antioxidant properties of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one to scavenge free radicals." *The Royal Society of Chemistry*. 11: 34456.
- Zhigang, T., Le, C., Lin, D., Liuhong, D., Mingfeng, W., Yabin, Y., Qiue, C. and Zhongtao, D. 2011. "Antioxidant activity and chemical constituents of edible flower of *Sophora viciifolia*." *Food Chemistry*. 126(4): 1648-1654.
- Zhu, Y., Wang, W., Ruan, R. and Chen, J. 2022. "Oxidative potential and nano antioxidant activity of flavonoids and phenolic acids in *Sophora flavescens*." *International Journal of Analytical Chemistry*. 1(3): 7.
- Ziogou, A., Giannakodimos, I., Giannakodimos, A., Baliou, B. and Ioannou, P. 2023. "Kocuria species infections in humans. A Narrative Review." *Microorganisms*. 11(9): 236.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



## ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

### การเตรียมสารเคมี

#### 1. การเตรียมสารเคมีในการทดลองพฏกษเคมีเบื้องต้น

##### 1.1 Gelatin solution

เตรียมสารละลาย Gelatin solution 10 มิลลิลิตร โดยชั่งเจลาติน 0.1 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร โดยใช้ความร้อนสารละลายเจลาติน

##### 1.2. Gelatin salt solution

เตรียมสารละลาย Gelatin salt solution นำสารละลาย Gelatin solution ผสมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ในอัตราส่วน 1: 1 (v/v)

##### 1.3. เฟอร์ริกคลอไรด์

เตรียมสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ 10 มิลลิลิตร ชั่งเฟอร์ริกคลอไรด์ ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 0.17 กรัม และละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

#### 2. การเตรียมสารเคมีในการทดลองปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

##### 2.1. Folin-Ciocalteu reagent

เตรียมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ 100 มิลลิลิตร โดยใช้สารละลาย Folin-Ciocalteu reagent 10 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร

##### 2.2. สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต

เตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ 100 มิลลิลิตร ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 7.5 กรัม และละลายด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

#### 3. การเตรียมสารเคมีในการทดลองต้านอนุมูลอิสระ

##### 3.1. สารอนุมูลอิสระ DPPH

เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ชั่ง DPPH 2.364 มิลลิกรัม ละลายด้วยเมทานอลและปรับปริมาตรถึง 30 มิลลิลิตร

##### 3.2. สารอนุมูลอิสระ ABTS

เตรียมสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ชั่ง ABTS 90 มิลลิกรัม ละลายด้วยเมทานอล 25 มิลลิลิตร จากนั้นเตรียมโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (Potassium persulfate) ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ ชั่งสาร 16.55 มิลลิกรัม ละลายด้วยเมทานอล 25 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลาย ABTS และ โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟตมาผสมกัน และบ่มไว้ 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปทำการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.3. สารละลาย FRAP reagent

เตรียมสารละลาย Acetate buffer ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ pH 3.6 ต่อ สารละลาย TPTZ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ในกรดไฮโดรคลอริก ต่อ สารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ (Ferric chloride) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ (Acetate buffer: TPTZ: Ferric chloride) อัตราส่วน 10: 1: 1

## 4. การเตรียมสารเคมีในการทดลองเอนไซม์ไทโรซิเนส

### 4.1. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

เตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ pH 6.8 โดยแบ่งการเตรียมคือสาร A และ B โดยการเตรียมสาร ก ซึ่ง  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.280 กรัม ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร และการเตรียมสาร B ซึ่ง  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.132 กรัม ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำสาร A และ B มาผสมกันปรับ pH 6.8 และปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

### 4.2 สารละลาย L-Dopa

เตรียมสารละลาย L-Dopa ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ซึ่ง L-Dopa 4.49 มิลลิกรัม ละลายด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 มิลลิลิตร

## 5. การเตรียมสารเคมีในการทดลองยับยั้งในตริกออกไซด์

### 5.1 สารละลาย Phosphate buffer saline (PBS)

เตรียมสารละลาย Phosphate buffer saline ซึ่ง NaCl 0.08 กรัม KCl 0.02 กรัม  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.115 กรัม และ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.02 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.2 แล้วนำไปกรองด้วยกระดาษ Whatman no 1 และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 เซลเซียส 15 นาที

### 5.2 สารละลาย Sodium nitroprusside (SNP)

เตรียมสารละลาย Sodium nitroprusside ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ซึ่ง Sodium nitroprusside 29.9795 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

### 5.3 สารละลาย Griess reagent

เตรียมสารละลาย Griess reagent ซึ่ง Griess reagent 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร

### 5.4 สารละลาย Lipopolysaccharide (LPS)

เตรียมสารละลาย Lipopolysaccharide ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่ง LPS 1 มิลลิกรัม ละลายด้วย PBS 1000 ไมโครลิตร กรองด้วยตัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นนำมาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 5.5 การเตรียมยาอินโดเมทาซิน (Indomethacin)

เตรียมสารละลาย Indomethacin ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัม นำมาละลายด้วย PBS 1000 ไมโครกรัม จากนั้นกรองด้วยตัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นนำมาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640

## 6. การเตรียมสารเคมีในการทดลองความเป็นพิษต่อเซลล์

### 6.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์

เตรียมอาหาร RPMI 1640 โดยนำอาหาร RPMI มาละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 1000 มิลลิลิตร เติม  $\text{NaHCO}_3$  2 กรัม กวนผสมให้เข้ากันและปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 7-7.4 นำมากรองด้วยตัวกรองที่บรรจุแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร ภายในตู้ปลอดเชื้อ โดยจะเรียกการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ในขั้นตอนข้างต้นว่า RPMI 1640 แบบ Incomplete media จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์แบบ RPMI 1640 แบบ Complete media โดยจะทำการเติม Fetal bovine serum (FBS) ซึ่งก่อนจะนำมาใช้จะต้อง inactivate FBS ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที และเติมยาปฏิชีวนะเจนตามัยซิน (Gentamicin) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 50 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำมากรองด้วยตัวกรองที่บรรจุแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

## 7. การเตรียมสารในการระบุสายพันธุ์ของต้นสารพิษ

### 7.1 สารละลาย 2X CTAB buffer

เตรียมสารละลาย 2X CTAB buffer ซึ่งสาร CTAB 2 กรัม และ PVP 1 กรัม ละลายด้วย NaCl 5 โมลาร์ 28 มิลลิลิตร และ EDTA 0.5 โมลาร์ pH 8.0 4 มิลลิลิตร นำมาปั่นกวนให้ละลาย จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร และนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

### 7.2 สารละลาย 10% CTAB buffer

เตรียมสารละลาย 10% CTAB buffer ซึ่ง CTAB 10 กรัม ละลายด้วย NaCl 0.7 โมลาร์ 100 มิลลิลิตร นำมาปั่นกวนให้ละลาย และนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

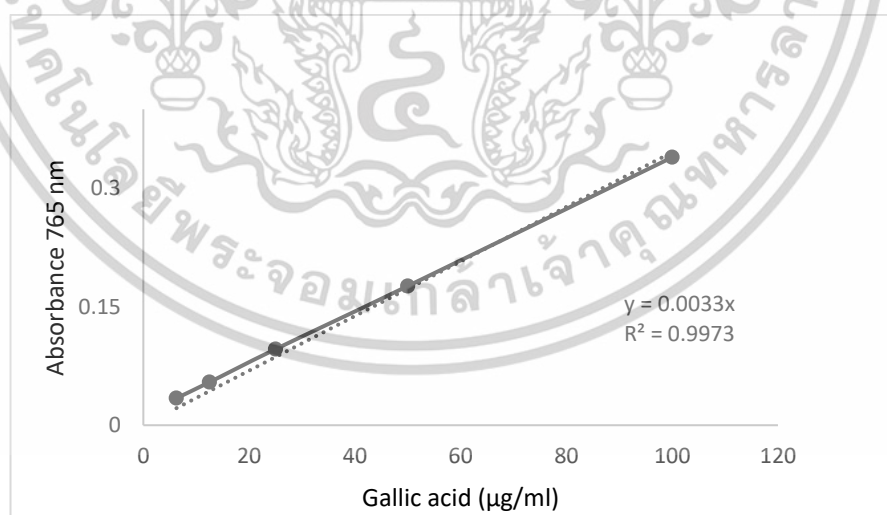
## ภาคผนวก ข

### 1. การคำนวณปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด

นำค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร จากการวิเคราะห์ตามวิธี Folin-Ciocalteu แสดงดังตารางภาคผนวกที่ ข-1 มาสร้างกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกดังภาพภาคผนวกที่ ข-1

ตารางภาคผนวกที่ ข-1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้น 6.25-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของสาร มาตรฐานแกลลิก ( $\mu\text{g/ml}$ )	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย	ค่า เบี่ยงเบน มาตรฐาน
	1	2	3		
6.25	0.067	0.064	0.068	0.07	0.002
12.5	0.086	0.087	0.088	0.09	0.001
25	0.127	0.135	0.132	0.13	0.004
50	0.209	0.209	0.206	0.21	0.002
100	0.369	0.37	0.368	0.37	0.001



ภาพภาคผนวกที่ ข-1 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (รูปภาคผนวกที่ ข-1) ได้สมการมาตรฐานดังนี้

$$Y = 0.0033 \times (x-1)$$

โดยที่ y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

X คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

**ตารางภาคผนวกที่ ข-2** ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาดเมทานอลจากใบ  
เมล็ด และใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์ของต้นสารพัดพิษ

สารสกัด	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/g extract)			ค่าเฉลี่ย	ค่า เบี่ยงเบน มาตรฐาน
	1	2	3		
เมล็ด	38.48	37.88	39.09	38.48	0.61
ใบ	90.00	93.33	92.73	92.07	1.80
ใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์	38.182	33.939	33.939	35.35	2.45

#### การคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

โดยการคำนวณค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร ของสารสกัดเมทานอลของสารสกัด  
เมล็ดจากต้นสารพัดพิษที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการทดลอง 3 ซ้ำได้เท่ากับ  
0.169 ,0.167 และ 0.171 ตามลำดับ มาคำนวณหาค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยแทนในสมการ  
ข-2

จากสมการข-1 เมื่อหาค่า x จะได้  $x=y/0.0035$  (ข-2)

หลังจากนำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเมทานอลของเมล็ดจากต้นสารพัดพิษแทนลงในสมการที่ ข-  
2 แล้วจะได้ค่าในการคำนวณในแต่ละซ้ำเท่ากับ 38.48, 37.88 และ 33.09 ตามลำดับ

จากนั้นนำจากการคำนวณได้มาหารด้วยความเข้มข้นของสารสกัดที่ทดสอบคือ 1000  
ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าที่ได้จะอยู่ในหน่วย  $\mu\text{g GAE/g extract}$  และนำไปคูณด้วย 1000 เพื่อ  
เปลี่ยนหน่วยเป็น  $\text{mg GAE/g extract}$  ดังนั้นสารเมทานอลของเมล็ดจากต้นสารพัดพิษในแต่ละซ้ำจะ  
มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 38.48, 37.88 และ 33.09  $\text{mg GAE/g extract}$   
ตามลำดับ และนำค่าแต่ละซ้ำมาหาค่าเฉลี่ยของสารสกัดเมทานอลของเมล็ดจากต้นสารพัดพิษมี  
ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานได้เท่ากับ  $35.48 \pm 2.45 \text{ mg GAE/g extract}$

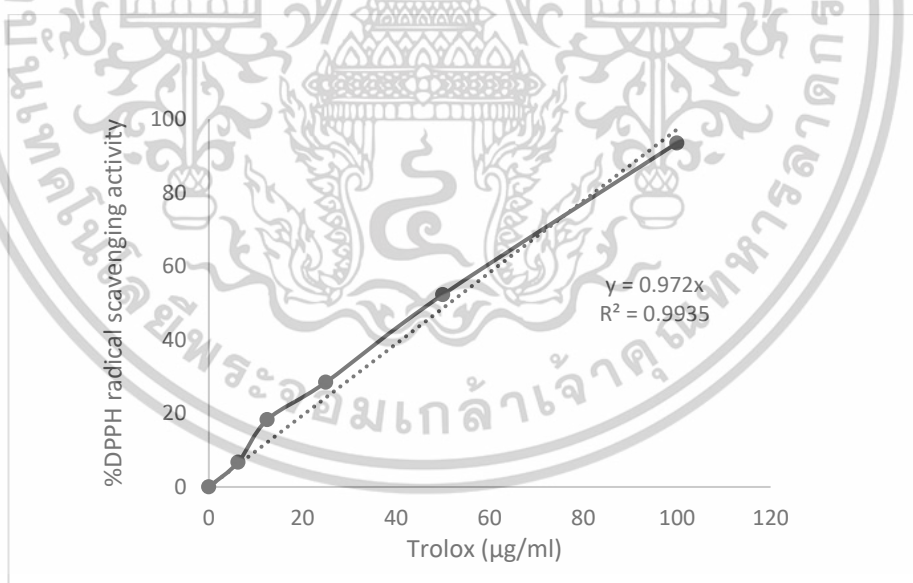
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2. การคำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH

นำค่าการดูดกลืนแสงของสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH ความเข้มข้นต่างๆ ดังตารางภาคผนวกที่ ข-3 มาสร้างกราฟมาตรฐานโทรล็อกซ์ระหว่างความเข้มข้นของสารโทรล็อกซ์กับค่าเฉลี่ยร้อยละการต้านอนุมูลอิสระดังภาพภาคผนวกที่ ข-2

ตารางภาคผนวกที่ ข-3 สารมาตรฐานโทรล็อกซ์ที่ความเข้มข้น 6.25-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH

ความเข้มข้นของสาร มาตรฐานโทรล็อกซ์ ( $\mu\text{g/ml}$ )	ค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	1	2	3		
6.25	7.12	7.03	6.13	6.76	0.55
12.5	18.52	18.16	18.07	18.25	0.24
25	27.98	29.49	28.07	28.51	0.85
50	52.13	51.29	53.09	52.17	0.90
100	93.59	93.51	93.42	93.51	0.09



ภาพภาคผนวกที่ ข-2 กราฟมาตรฐานโทรล็อกซ์ในการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH

จากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (รูปภาคผนวกที่ ข-2) ได้สมการสารมาตรฐานดังนี้

$$Y = 0.972x \quad (\text{ข-3})$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยที่  $y$  คือ ค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH

$X$  คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรลิกซ์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

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

จากสมการ ข-4 สามารถหาค่า  $IC_{50}$  ของสารมาตรฐานโทรลิกซ์ได้ โดยแทนค่า  $y$  เท่ากับร้อยละ 50 ในสมการที่ข-4 ได้ดังนี้  $x= 50/0.972$

$$X= 51.44$$

ค่า  $IC_{50}$  ของสารมาตรฐานโทรลิกซ์ที่ได้จากการคำนวณเท่ากับ 51.44 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า  $IC_{50}$  ของสารมาตรฐานโทรลิกซ์ที่ได้จากโปรแกรม GraphPad Prism 8.0 เท่ากับ 47.69 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางภาคผนวกที่ ข-4 ค่าเฉลี่ยร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบเมทานอลจากใบ เมล็ด และใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์

ความเข้มข้นสารสกัด ( $\mu\text{g/ml}$ )	ค่าเฉลี่ยร้อยละของอนุมูลอิสระDPPH		
	ใบ	เมล็ด	ใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์
125	6.94 $\pm$ 1.20	2.46 $\pm$ 2.08	6.40 $\pm$ 1.87
250	12.26 $\pm$ 2.01	6.99 $\pm$ 1.98	11.92 $\pm$ 3.98
500	27.43 $\pm$ 1.09	17.88 $\pm$ 1.90	26.10 $\pm$ 2.45
1000	60.23 $\pm$ 2.09	38.61 $\pm$ 1.00	52.60 $\pm$ 1.67

#### การคำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH

นำค่าเฉลี่ยร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างสารสกัดหยาบเมทานอลของของเมล็ดจากต้นสารพัดพิษที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการทดลอง 3 ซ้ำได้ที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 11.01 ,10.78 และ 11.46 ตามลำดับ มาคำนวณหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH

จากสมการข-4 เมื่อหาค่า  $x$  จะได้  $x=y/0.972$  (ข-4)

นำค่าที่ได้จากการคำนวณข้างต้นของสารสกัดหยาบเมทานอลของเมล็ดจากต้นสารพัดพิษ คือ 11.33, 11.09 และ 11.79 มาหารด้วยความเข้มข้นของสารสกัดคือ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาคูณด้วย 1000 จะได้ค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอยู่ในหน่วย mg TE/g extract และเมื่อนำมาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารสกัดหยาบเมทานอลเมล็ด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

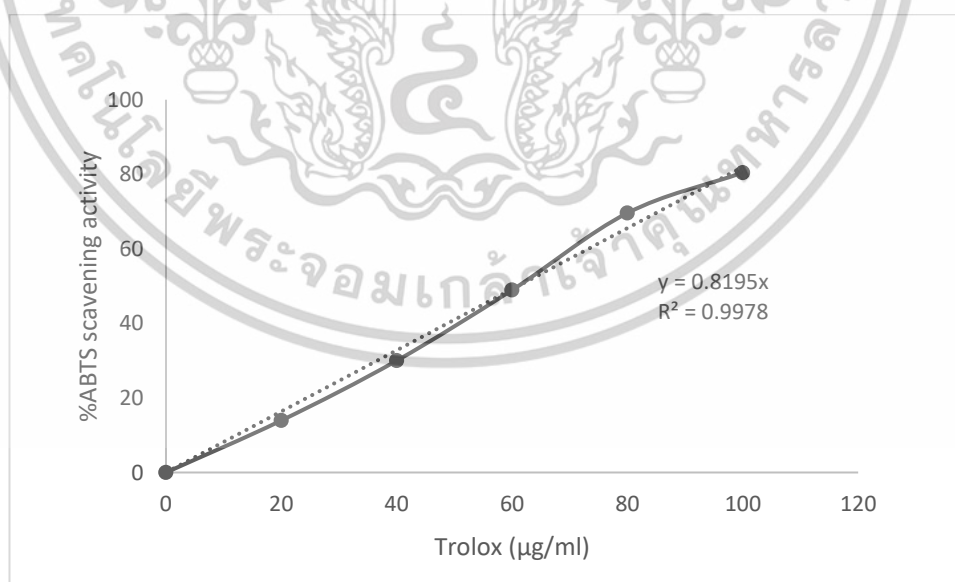
จากต้นสารพัดพิษได้เท่ากับ  $11.40 \pm 3.17$  mg TE/g extract ส่วนในสารสกัดเมทานอลของตัวอย่างอื่น ๆ คำนวณเช่นเดียวกัน

### 3. การคำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS

นำค่าการดูดกลืนแสงของสารต้านอนุมูลอิสระ ABTS ที่ความเข้มข้นต่างๆดังตารางภาคผนวกข-5 มาสร้างกราฟมาตรฐานโทรล็อกซ์ระหว่างความเข้มข้นของสารโทรล็อกซ์กับค่าเฉลี่ยร้อยละการต้านอนุมูลอิสระดังภาคผนวกข-3

ตารางภาคผนวกที่ ข-5 สารมาตรฐานโทรล็อกซ์ที่ความเข้มข้น 20-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS

ความเข้มข้นของสาร มาตรฐานโทรล็อกซ์ ( $\mu\text{g/ml}$ )	ค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	1	2	3		
20	13.95	13.9	13.94	13.93	0.03
40	29.98	30.01	30.12	30.04	0.07
60	48.23	48.9	49.18	48.77	0.49
80	69.09	69.75	70.12	69.65	0.52
100	80.41	81.09	79.46	80.32	0.82



ภาพภาคผนวกที่ ข-3 กราฟมาตรฐานโทรล็อกซ์ในการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS

จากกราฟมาตรฐานโทรล็อกซ์ (รูปภาคผนวกที่ ข-5) ได้สมการสารมาตรฐานดังนี้ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$Y = 0.8195x \quad (\text{ข-5})$$

โดยที่  $y$  คือ ค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS

$X$  คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรลล็อกซ์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

จากสมการที่ ข-5 หาค่า  $x$  จะได้  $x=y/0.8195$  (ข-4)

จากสมการ ข-6 สามารถหาค่า  $IC_{50}$  ของสารมาตรฐานโทรลล็อกซ์ได้ โดยแทนค่า  $y$  เท่ากับร้อยละ 50 ในสมการที่ข-6 ได้ดังนี้  $x= 50/0.8195$

$$X = 51.01$$

ค่า  $IC_{50}$  ของสารมาตรฐานโทรลล็อกซ์ที่ได้จากการคำนวณเท่ากับ 51.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า  $IC_{50}$  ของสารมาตรฐานโทรลล็อกซ์ที่ได้จากโปรแกรม GraphPad Prism 8.0 เท่ากับ 57.71 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางภาคผนวกที่ ข-6 ค่าเฉลี่ยร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดหยาบเมทานอล จากใบ

ความเข้มข้นสารสกัด ( $\mu\text{g/ml}$ )	ค่าเฉลี่ยร้อยละของอนุมูลอิสระ ABTS		
	ใบ	เมล็ด	ใบที่กำจัดคลอโรฟิลล์
125	7.94 $\pm$ 3.30	6.11 $\pm$ 5.11	6.62 $\pm$ 1.85
250	16.11 $\pm$ 1.65	12.11 $\pm$ 1.55	13.36 $\pm$ 2.48
500	33.07 $\pm$ 2.90	22.79 $\pm$ 2.57	28.50 $\pm$ 1.20
1000	62.48 $\pm$ 0.85	46.32 $\pm$ 4.66	54.03 $\pm$ 1.31

การคำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS

นำค่าเฉลี่ยร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างสารสกัดหยาบเมทานอลจากเมล็ดของต้นสารพัดพิษที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการทดลอง 3 ซ้ำได้ที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 46.23 ,46.54 และ 45.17 ตามลำดับ มาคำนวณหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS

จากสมการข-6 เมื่อหาค่า  $x$  จะได้  $x=y/0.8195$  (ข-6)

นำค่าที่ได้จากการคำนวณข้างต้นของสารสกัดเมทานอลของเมล็ดจากต้นสารพัดพิษคือ 57.63, 56.80 และ 55.12 มาหารด้วยความเข้มข้นของสารสกัดคือ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากนั้นนำมาคูณด้วย 1000 จะได้ค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอยู่ในหน่วย  $\text{mg TE/g}$  เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

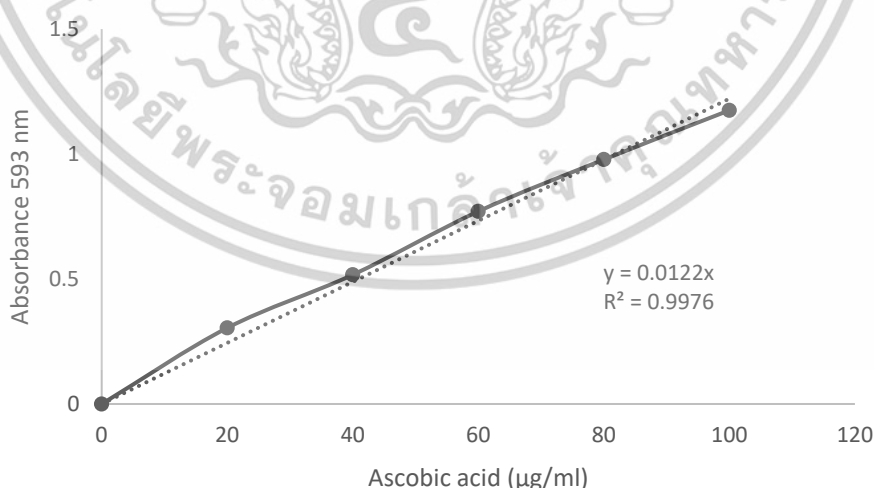
extract และเมื่อนำมาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารสกัดเมล็ดจากต้นสารพัดพิษได้เท่ากับ  $56.40 \pm 3.84$  mg TE/g extract ส่วนในสารสกัดเมทานอลและสารสกัดจากเทคนิค liquid-liquid extraction ของตัวอย่างอื่น ๆ คำนวณเช่นเดียวกัน

#### 4. การคำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังตารางภาคผนวกที่ ข-7 มาสร้างกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิกกับค่าการดูดกลืนแสง ดังภาพภาคผนวกที่ ข-4

ตารางภาคผนวกที่ ข-7 สารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่างๆและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์  $Fe^{3+}$ -TPTZ (FRAP)

ความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก ( $\mu\text{g/ml}$ )	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	1	2	3		
20	0.31	0.30	0.30	0.30	0.00
40	0.53	0.51	0.52	0.52	0.01
60	0.72	0.79	0.80	0.77	0.04
80	0.99	0.96	0.99	0.98	0.02
100	1.19	1.16	1.18	1.18	0.02



ภาพภาคผนวกที่ ข-4 กราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกในการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากกราฟมาตรฐานแอสคอร์บิก (รูปภาคผนวกที่ ข-7) ได้สมการมาตรฐานดังนี้

$$Y = 0.0122x \quad (\text{ข-7})$$

โดยที่  $y$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร

$X$  คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

#### การคำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP

โดยการคำนวณค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบเมทานอลจากเมล็ดของต้นสารพัดพิษที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการทดลอง 3 ซ้ำได้เท่ากับ 0.418 , 0.434 และ 0.484 ตามลำดับ มาคำนวณหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP โดยแทนในสมการ ข-8

จากสมการข-7 เมื่อหาค่า  $x$  จะได้  $x=y/0.0122$  (ข-8)

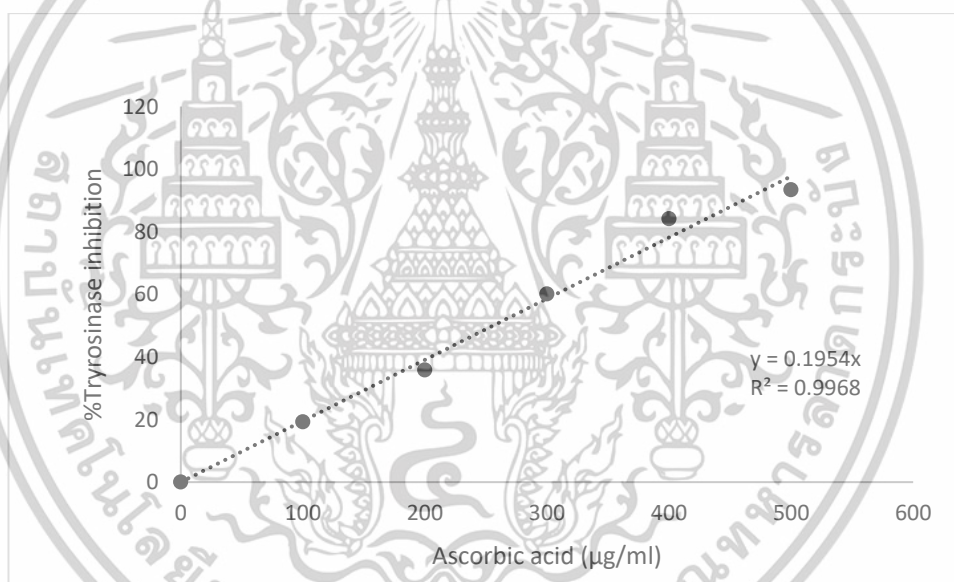
หลังจากนำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบเมทานอลจากเมล็ดของต้นสารพัดพิษแทนลงในสมการที่ ข-8 แล้วจะได้ค่าในการคำนวณในแต่ละซ้ำเท่ากับ 36.64, 37.95 และ 42.05 ตามลำดับ จากนั้นนำจากการคำนวณได้มาหารด้วยความเข้มข้นของสารสกัดที่ทดสอบคือ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าที่ได้จะอยู่ในหน่วย  $\mu\text{g GAE/g extract}$  และนำไปคูณด้วย 1000 เพื่อเปลี่ยนหน่วยเป็น  $\text{mg GAE/g extract}$  ดังนั้นสารเมทานอลของเมล็ดจากต้นสารพัดพิษในแต่ละซ้ำจะมีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP เท่ากับ 36.64, 37.95 และ 42.05  $\text{mg GAE/g extract}$  ตามลำดับ และนำค่าแต่ละซ้ำมาหาค่าเฉลี่ยของสารสกัดหยาบเมทานอลจากเมล็ดของต้นสารพัดพิษมีค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานได้เท่ากับ  $38.80 \pm 2.82 \text{ mg GAE/g extract}$

#### 5. การคำนวณค่าความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

นำค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น 100-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ตารางภาคผนวกที่ ข-8 สารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่างๆและค่าการดูดกลืนแสง

ความเข้มข้นของสาร มาตรฐานกรด แอสคอร์บิก ( $\mu\text{g/ml}$ )	ค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	1	2	3		
100	16.21	18.36	20.09	18.22	1.94
200	33.72	37.88	32.57	34.72	2.79
300	60.83	60.83	59.40	60.35	0.83
400	86.37	86.37	84.51	85.75	1.08
500	93.40	93.40	92.68	93.16	0.41



ภาพภาคผนวกที่ ข-5 กราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

จากกราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (รูปภาคผนวกที่ข-5 ) ได้สมการมาตรฐานดังนี้

$$Y = 0.1954x \quad (\text{ข-8})$$

โดยที่  $y$  คือ ค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

$X$  คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

จากสมการที่ ข-8  $x = y/0.1954$  (ข-9)  
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากสมการ ข-9 สามารถหาค่า  $IC_{50}$  ของสารมาตรฐานแอสคอร์บิกได้โดยแทนค่า  $y$  เท่ากับร้อยละ 50 ในสมการที่ ข-9 ได้ดังนี้  $x=50/0.1954$

$$x = 255.86$$

ค่า  $IC_{50}$  ของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ได้จากการคำนวณเท่ากับ 255.86 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า  $IC_{50}$  ของสารมาตรฐานของกรดแอสคอร์บิกที่ได้จากโปรแกรม GraphPad Prism 8.0 เท่ากับ 261.94 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

**ตารางภาคผนวกที่ ข-9** ค่าเฉลี่ยร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ ของสารสกัดหยาบเมทานอลจากใบ และเมล็ด

ความเข้มข้นสารสกัด ( $\mu\text{g/ml}$ )	ค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ	
	ใบ	เมล็ด
125	24.56 $\pm$ 0.98	9.76 $\pm$ 1.12
250	57.45 $\pm$ 0.45	19.06 $\pm$ 1.06
500	72.05 $\pm$ 0.65	32.87 $\pm$ 0.94
1000	83.87 $\pm$ 1.30	39.29 $\pm$ 0.87

#### การคำนวณความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ

นำค่าร้อยละยับยั้งอนุมูลอิสระของตัวอย่างสารสกัดหยาบเมทานอลจากเมล็ดของต้นสารพัดพิษที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คำนวณร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระพบว่ามีความเฉลี่ย 37.87

จากสมการ ข-9 หาค่า  $x$  จะได้  $x=y/0.1954$  (ข-10)

เมื่อแทนค่า  $y$  ในสมการที่ (ข-10)  $x=37.87/0.1954$

$$x = 193.81$$

นำค่าจากการคำนวณ คำนวณได้มาหารด้วยความเข้มข้นของสารสกัดที่ทดสอบคือ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าที่ได้จะอยู่ในหน่วย  $\mu\text{g AAE/g extract}$  และนำไปคูณด้วย 1000 ค่าที่ได้จะอยู่ในหน่วย  $\text{mg AAE/g extract}$  พบว่ามีค่า 193.81  $\text{mg AAE/g extract}$  แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และสารสกัดเมทานอลตัวอย่างอื่น ๆ คำนวณเช่นเดียวกัน

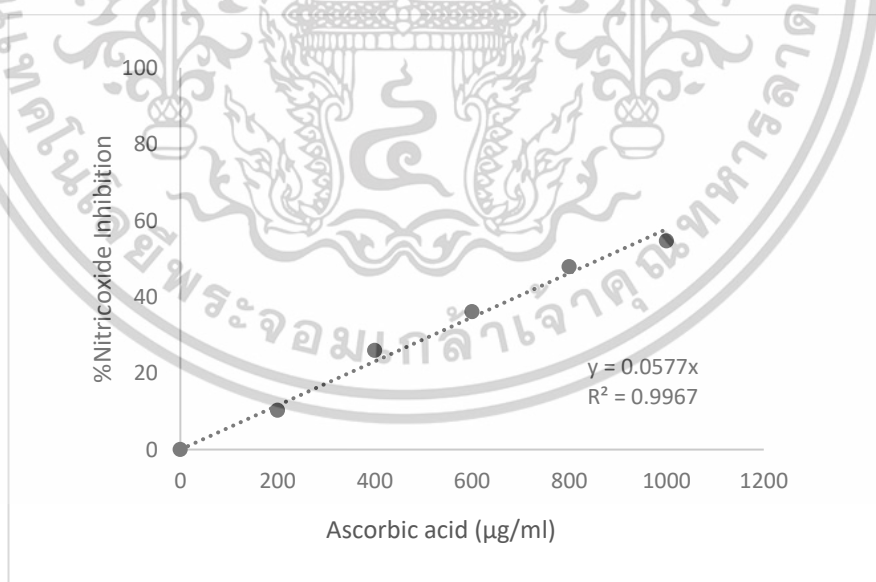
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 6. การคำนวณความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์

นำค่าร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์ด้วยวิธี NOA ของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังตารางภาคผนวก ข-10 มาสร้างกราฟมาตรฐานแอสคอร์บิกกับค่าร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์ดังภาพภาคผนวกที่ ข-6

ตารางภาคผนวกที่ ข-10 สารมาตรฐานแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับค่าร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์

ความเข้มข้นของสาร มาตรฐานกรด แอสคอร์บิก ( $\mu\text{g/ml}$ )	ค่าร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	1	2	3		
200	10.28	10.34	11.91	10.84	0.92
400	24.97	26.78	25.67	25.81	0.91
600	35.87	36.73	37.74	36.78	0.94
800	46.78	47.89	47.09	47.25	0.57
1000	54.67	55.09	58.12	55.96	1.88



ภาพภาคผนวกที่ ข-6 กราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับค่าร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์ด้วยวิธี NOA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากกราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (รูปภาคผนวกที่ ข-6) ได้สมการมาตรฐานดังนี้

$$Y = 0.0577x \quad (\text{ข-11})$$

โดยที่  $y$  คือ ค่าร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์

$X$  คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

จากสมการข-10 สามารถหาค่า  $IC_{50}$  ของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกได้โดยแทนค่า  $y$  เท่ากับร้อยละ 50 ในสมการที่ ข-9 ได้ดังนี้  $x = 50/0.0577$

$$X = 866.55$$

ค่า  $IC_{50}$  ของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ได้จากการคำนวณเท่ากับ 866.55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ส่วนค่า  $IC_{50}$  ของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ได้จากโปรแกรม GraphPad Prism 8 เท่ากับ 866.90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

#### การคำนวณความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์

นำค่าร้อยละยับยั้งไนตริกออกไซด์ตัวอย่างสารสกัดหยาบเมทานอลจากเมล็ดของต้นสารพัดพิษ ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คำนวณร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์พบว่ามียค่าเฉลี่ย 52.70

จากสมการ ข-9 หาค่า  $x$  จะได้  $x = y/0.1954$  (ข-10)

เมื่อแทนค่า  $y$  ในสมการที่ (ข-10)  $x = 52.70/0.1954$

$$x = 311.09$$

นำค่าจากการคำนวณ คำนวณได้มาหารด้วยความเข้มข้นของสารสกัดที่ทดสอบคือ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าที่ได้จะอยู่ในหน่วย  $\mu\text{g AAE/g extract}$  และนำไปคูณด้วย 1000 ค่าที่ได้จะอยู่ในหน่วย  $\text{mg AAE/g extract}$  พบว่ามีค่า 311.09  $\text{mg AAE/g extract}$  แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และสารสกัดเมทานอลตัวอย่างอื่น ๆ คำนวณเช่นเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 7. ค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบเมทานอลใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษ

ตารางภาคผนวกที่ ข -11 ค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบใบและเมล็ดของสารพัดพิษ

สารสกัด	ความเข้มข้น ( $\mu\text{g/ml}$ )	ชนิดเซลล์							
		HT-29	HepG2	MCF-7	KB	HeLa	L929	Vero	HaCaT
ใบ	125	13.54 $\pm$ 1.46	4.25 $\pm$ 3.16	16.01 $\pm$ 0.76	3.00 $\pm$ 0.67	1.38 $\pm$ 0.95	0.78 $\pm$ 1.09	2.73 $\pm$ 0.35	2.15 $\pm$ 0.63
	250	39.08 $\pm$ 1.69	18.25 $\pm$ 2.88	22.16 $\pm$ 3.52	14.56 $\pm$ 1.71	6.46 $\pm$ 0.51	2.98 $\pm$ 0.50	3.82 $\pm$ 0.80	4.06 $\pm$ 0.63
	500	45.66 $\pm$ 5.83	46.64 $\pm$ 1.68	51.35 $\pm$ 1.98	25.96 $\pm$ 4.21	8.30 $\pm$ 0.95	10.01 $\pm$ 0.55	10.36 $\pm$ 0.77	12.38 $\pm$ 1.74
	1000	71.91 $\pm$ 7.04	74.51 $\pm$ 6.15	72.05 $\pm$ 0.57	50.80 $\pm$ 1.47	14.01 $\pm$ 1.02	13.41 $\pm$ 1.72	14.52 $\pm$ 2.21	55.87 $\pm$ 3.49
	2000	85.20 $\pm$ 0.88	83.34 $\pm$ 0.90	85.09 $\pm$ 0.83	63.63 $\pm$ 1.48	91.49 $\pm$ 0.75	77.80 $\pm$ 0.76	96.45 $\pm$ 0.20	66.39 $\pm$ 2.37
เมล็ด	125	32.96 $\pm$ 2.15	16.56 $\pm$ 0.69	27.15 $\pm$ 0.78	13.95 $\pm$ 1.51	1.81 $\pm$ 0.59	2.13 $\pm$ 0.42	1.47 $\pm$ 0.55	0.67 $\pm$ 0.48
	250	46.08 $\pm$ 1.95	26.40 $\pm$ 0.31	40.06 $\pm$ 0.87	23.82 $\pm$ 1.35	3.11 $\pm$ 0.19	5.23 $\pm$ 0.36	4.34 $\pm$ 0.29	3.04 $\pm$ 0.94
	500	47.34 $\pm$ 0.76	45.04 $\pm$ 4.12	44.75 $\pm$ 1.16	29.86 $\pm$ 1.48	8.45 $\pm$ 0.36	6.91 $\pm$ 1.48	10.32 $\pm$ 0.69	15.86 $\pm$ 1.07
	1000	81.72 $\pm$ 1.36	72.01 $\pm$ 0.68	85.36 $\pm$ 0.89	49.38 $\pm$ 3.23	11.81 $\pm$ 1.11	11.82 $\pm$ 0.61	13.55 $\pm$ 0.60	50.73 $\pm$ 0.90
	2000	83.82 $\pm$ 1.26	84.66 $\pm$ 0.99	86.29 $\pm$ 1.32	75.15 $\pm$ 1.95	99.19 $\pm$ 0.41	85.12 $\pm$ 1.36	99.56 $\pm$ 0.38	81.11 $\pm$ 2.35

## 8. ค่าเฉลี่ยร้อยละความสามารถต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเมทานอลใบและเมล็ดของต้นสารพัดพิษด้วยวิธี liquid-liquid extraction

ตารางภาคผนวกที่ ข -12 ค่าเฉลี่ยร้อยละต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดส่วนย่อยด้วยวิธี

Liquid-Liquid extraction

สารสกัด	ร้อยละเฉลี่ยความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH				
	ความเข้มข้น ( $\mu\text{g/ml}$ )				
	125	250	500	1000	
ใบ	LH	10.93 $\pm$ 1.46	19.04 $\pm$ 1.24	29.67 $\pm$ 0.63	43.88 $\pm$ 0.45
	LD	29.85 $\pm$ 0.63	46.39 $\pm$ 2.92	72.72 $\pm$ 2.08	87.40 $\pm$ 2.08
	LE	45.91 $\pm$ 2.34	73.31 $\pm$ 2.60	86.87 $\pm$ 0.88	88.18 $\pm$ 0.54
	LB	8.60 $\pm$ 4.17	24.60 $\pm$ 4.88	38.75 $\pm$ 4.10	62.27 $\pm$ 2.71
	LW	10.75 $\pm$ 1.25	17.79 $\pm$ 3.12	25.67 $\pm$ 0.82	42.03 $\pm$ 5.20
	เมล็ด	SH	15.03 $\pm$ 1.40	20.91 $\pm$ 2.33	23.98 $\pm$ 1.10
SD		11.34 $\pm$ 4.55	19.89 $\pm$ 0.34	43.21 $\pm$ 2.8	57.81 $\pm$ 0.80
SE		38.56 $\pm$ 0.34	53.34 $\pm$ 0.29	83.67 $\pm$ 3.79	87.07 $\pm$ 0.22
SB		14.55 $\pm$ 1.27	20.67 $\pm$ 2.41	39.58 $\pm$ 3.56	43.27 $\pm$ 5.51
SW		7.94 $\pm$ 2.98	9.68 $\pm$ 3.27	10.51 $\pm$ 3.99	19.89 $\pm$ 3.12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข-13 ค่าเฉลี่ยร้อยละฤทธิ์ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัด ส่วนย่อยด้วยวิธี Liquid-Liquid extraction

สารสกัด	ร้อยละเฉลี่ยความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS				
	ความเข้มข้น ( $\mu\text{g/ml}$ )				
	125	250	500	1000	
ใบ	LH	21.45 $\pm$ 0.95	28.52 $\pm$ 1.96	28.35 $\pm$ 1.57	37.62 $\pm$ 2.78
	LD	39.11 $\pm$ 2.91	49.70 $\pm$ 3.61	67.05 $\pm$ 4.15	86.38 $\pm$ 1.78
	LE	45.04 $\pm$ 4.52	55.50 $\pm$ 1.76	69.99 $\pm$ 3.57	87.79 $\pm$ 4.42
	LB	29.45 $\pm$ 0.81	44.60 $\pm$ 2.09	48.34 $\pm$ 1.38	67.62 $\pm$ 1.18
	LW	16.40 $\pm$ 2.65	20.09 $\pm$ 0.90	25.76 $\pm$ 0.73	41.44 $\pm$ 1.56
	เมล็ด	SH	1.68 $\pm$ 1.25	3.02 $\pm$ 0.39	4.86 $\pm$ 1.75
SD		10.77 $\pm$ 1.79	17.32 $\pm$ 3.62	57.39 $\pm$ 0.73	62.06 $\pm$ 1.69
SE		19.29 $\pm$ 3.03	37.72 $\pm$ 4.09	53.90 $\pm$ 2.67	76.28 $\pm$ 0.56
SB		6.61 $\pm$ 3.39	7.84 $\pm$ 1.40	14.3 $\pm$ 1.87	27.30 $\pm$ 1.26
SW		5.48 $\pm$ 2.19	7.59 $\pm$ 0.71	14.11 $\pm$ 0.62	26.43 $\pm$ 0.99

### 9. ค่าเฉลี่ยร้อยละฤทธิ์ความสามารถความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติของสารสกัดแยกส่วนด้วยวิธี Liquid-Liquid extraction

ตารางภาคผนวกที่ ข-14 ค่าเฉลี่ยร้อยละเฉลี่ยความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29 ของสารสกัดแยกส่วนจากใบด้วยวิธี Liquid-Liquid extraction

ความเข้มข้น	เซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29				
	ค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์				
	สารสกัดแยกส่วน ( $\mu\text{g/ml}$ )				
	LH	LD	LE	LB	LW
2000	88.06 $\pm$ 0.50	86.59 $\pm$ 3.31	88.39 $\pm$ 0.67	65.20 $\pm$ 4.47	18.39 $\pm$ 1.60
1000	87.44 $\pm$ 1.02	52.42 $\pm$ 3.81	83.88 $\pm$ 0.40	13.26 $\pm$ 1.37	14.95 $\pm$ 1.27
500	19.93 $\pm$ 0.55	30.73 $\pm$ 5.01	19.63 $\pm$ 0.54	13.15 $\pm$ 2.08	14.43 $\pm$ 1.60
250	17.73 $\pm$ 2.04	23.37 $\pm$ 4.09	16.92 $\pm$ 1.70	11.58 $\pm$ 0.94	12.89 $\pm$ 0.22
125	13.15 $\pm$ 1.68	12.49 $\pm$ 1.65	10.40 $\pm$ 3.30	10.84 $\pm$ 0.56	11.17 $\pm$ 1.40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข-15 ค่าเฉลี่ยร้อยละเฉลี่ยความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29 ของสารสกัดแยกส่วนจากเมล็ดด้วยวิธี Liquid-Liquid extraction

เซลล์มะเร็งลำไส้และทวารหนักชนิด HT-29					
ค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์					
สารสกัดแยกส่วน ( $\mu\text{g/ml}$ )					
ความเข้มข้น	SH	SD	SE	SB	SW
2000	78.39 $\pm$ 1.91	63.73 $\pm$ 1.52	53.66 $\pm$ 0.67	55.66 $\pm$ 0.79	32.65 $\pm$ 1.15
1000	58.82 $\pm$ 2.18	52.83 $\pm$ 0.76	32.54 $\pm$ 0.38	37.71 $\pm$ 1.54	16.40 $\pm$ 1.36
500	40.65 $\pm$ 0.83	18.59 $\pm$ 0.51	25.00 $\pm$ 2.49	38.65 $\pm$ 0.60	8.79 $\pm$ 1.17
250	18.85 $\pm$ 1.47	9.99 $\pm$ 0.89	14.06 $\pm$ 1.35	21.72 $\pm$ 1.25	7.09 $\pm$ 0.75
125	10.11 $\pm$ 0.51	9.43 $\pm$ 0.93	8.03 $\pm$ 0.88	3.02 $\pm$ 1.41	0.87 $\pm$ 0.86

ตารางภาคผนวกที่ข-16 ค่าเฉลี่ยร้อยละเฉลี่ยความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 ของสารสกัดแยกส่วนจากใบด้วยวิธี Liquid-Liquid extraction

เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2					
ค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์					
สารสกัดแยกส่วน ( $\mu\text{g/ml}$ )					
ความเข้มข้น	LH	LD	LE	LB	LW
2000	76.77 $\pm$ 0.91	71.44 $\pm$ 1.39	56.67 $\pm$ 1.34	59.76 $\pm$ 1.30	32.48 $\pm$ 1.78
1000	63.96 $\pm$ 1.40	58.68 $\pm$ 1.56	22.54 $\pm$ 0.82	24.64 $\pm$ 0.88	21.28 $\pm$ 1.65
500	49.65 $\pm$ 1.23	42.06 $\pm$ 1.55	20.23 $\pm$ 1.29	9.62 $\pm$ 0.42	13.06 $\pm$ 1.64
250	24.26 $\pm$ 0.72	24.54 $\pm$ 0.74	12.56 $\pm$ 8.17	9.17 $\pm$ 0.43	11.66 $\pm$ 0.56
125	3.14 $\pm$ 0.16	0.74 $\pm$ 0.47	4.42 $\pm$ 0.48	6.08 $\pm$ 0.80	2.36 $\pm$ 1.16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข-17 ค่าเฉลี่ยร้อยละเฉลี่ยความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งระดับชนิด HepG2 ของสารสกัดแยกส่วนจากเมล็ดด้วยวิธี Liquid-Liquid extraction

เซลล์มะเร็งระดับชนิด HepG2					
ค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์					
สารสกัดแยกส่วน ( $\mu\text{g/ml}$ )					
ความเข้มข้น	SH	SD	SE	SB	SW
2000	78.66 $\pm$ 1.61	71.44 $\pm$ 1.39	57.25 $\pm$ 2.67	63.35 $\pm$ 1.29	48.01 $\pm$ 0.84
1000	67.21 $\pm$ 0.73	63.35 $\pm$ 1.98	36.21 $\pm$ 0.81	31.67 $\pm$ 1.01	34.28 $\pm$ 0.85
500	45.65 $\pm$ 0.88	37.06 $\pm$ 2.42	22.76 $\pm$ 1.24	14.17 $\pm$ 1.24	24.39 $\pm$ 1.00
250	14.53 $\pm$ 1.28	17.88 $\pm$ 4.52	6.50 $\pm$ 0.45	9.38 $\pm$ 0.30	14.98 $\pm$ 2.41
125	3.63 $\pm$ 0.33	0.74 $\pm$ 0.47	0.85 $\pm$ 0.18	1.42 $\pm$ 0.48	10.03 $\pm$ 0.09

ตารางภาคผนวกที่ ข-18 ค่าเฉลี่ยร้อยละเฉลี่ยความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ของสารสกัดแยกส่วนจากใบด้วยวิธี Liquid-Liquid extraction

เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7					
ค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์					
สารสกัดแยกส่วน ( $\mu\text{g/ml}$ )					
ความเข้มข้น	LH	LD	LE	LB	LW
2000	84.37 $\pm$ 4.78	80.99 $\pm$ 0.27	56.11 $\pm$ 4.06	53.18 $\pm$ 1.04	40.85 $\pm$ 1.04
1000	43.68 $\pm$ 1.47	70.96 $\pm$ 0.73	41.11 $\pm$ 1.66	20.61 $\pm$ 5.06	23.17 $\pm$ 2.09
500	17.20 $\pm$ 0.72	23.17 $\pm$ 1.74	28.03 $\pm$ 0.45	16.87 $\pm$ 2.30	13.88 $\pm$ 4.66
250	8.81 $\pm$ 1.51	16.45 $\pm$ 2.85	18.10 $\pm$ 1.04	5.13 $\pm$ 1.29	9.35 $\pm$ 2.98
125	4.01 $\pm$ 0.80	11.86 $\pm$ 0.94	11.22 $\pm$ 0.99	0.16 $\pm$ 1.47	2.73 $\pm$ 1.82

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข-19 ค่าเฉลี่ยร้อยละเฉลี่ยความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ของสารสกัดแยกส่วนจากเมล็ดด้วยวิธี Liquid-Liquid extraction

เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7					
ค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์					
สารสกัดแยกส่วน ( $\mu\text{g/ml}$ )					
ความเข้มข้น	SH	SD	SE	SB	SW
2000	76.85 $\pm$ 0.72	69.58 $\pm$ 1.81	58.90 $\pm$ 1.79	49.06 $\pm$ 3.46	38.64 $\pm$ 3.32
1000	56.14 $\pm$ 0.95	54.59 $\pm$ 2.34	23.92 $\pm$ 2.30	25.14 $\pm$ 3.82	26.04 $\pm$ 2.49
500	26.04 $\pm$ 1.98	32.02 $\pm$ 0.60	13.28 $\pm$ 1.31	17.68 $\pm$ 3.28	21.92 $\pm$ 2.65
250	16.78 $\pm$ 3.46	18.96 $\pm$ 2.45	6.68 $\pm$ 1.00	12.21 $\pm$ 1.14	12.73 $\pm$ 2.51
125	15.55 $\pm$ 2.60	0.89 $\pm$ 0.55	1.66 $\pm$ 1.27	3.14 $\pm$ 1.14	7.58 $\pm$ 1.50

ตารางภาคผนวกที่ ข-20 ค่าเฉลี่ยร้อยละเฉลี่ยความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด KB ของสารสกัดแยกส่วนจากใบด้วยวิธี Liquid-Liquid extraction

เซลล์มะเร็งช่องปากชนิด KB					
ค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์					
สารสกัดแยกส่วน ( $\mu\text{g/ml}$ )					
ความเข้มข้น	LH	LD	LE	LB	LW
2000	82.93 $\pm$ 1.31	79.84 $\pm$ 0.72	66.63 $\pm$ 0.46	50.62 $\pm$ 6.28	33.76 $\pm$ 1.19
1000	56.31 $\pm$ 4.45	75.63 $\pm$ 0.87	50.62 $\pm$ 4.85	51.39 $\pm$ 2.35	27.72 $\pm$ 0.88
500	46.54 $\pm$ 8.05	57.85 $\pm$ 1.77	40.78 $\pm$ 2.01	34.39 $\pm$ 2.84	29.33 $\pm$ 8.49
250	27.58 $\pm$ 1.50	48.51 $\pm$ 4.02	35.38 $\pm$ 0.70	27.72 $\pm$ 1.96	31.37 $\pm$ 6.11
125	12.41 $\pm$ 1.64	42.12 $\pm$ 2.51	22.45 $\pm$ 2.41	23.57 $\pm$ 4.84	20.76 $\pm$ 4.53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข-21 ค่าเฉลี่ยร้อยละเฉลี่ยความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด KB ของสารสกัดแยกส่วนจากเมล็ดด้วยวิธี Liquid-Liquid extraction

เซลล์มะเร็งช่องปากชนิด KB					
ค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์					
สารสกัดแยกส่วน ( $\mu\text{g/ml}$ )					
ความเข้มข้น	SH	SD	SE	SB	SW
2000	61.39 $\pm$ 8.82	76.96 $\pm$ 5.47	54.34 $\pm$ 2.40	49.46 $\pm$ 4.08	26.21 $\pm$ 1.07
1000	39.61 $\pm$ 4.24	74.80 $\pm$ 2.36	47.22 $\pm$ 5.04	44.78 $\pm$ 2.41	16.85 $\pm$ 7.94
500	35.07 $\pm$ 3.79	72.21 $\pm$ 1.57	37.17 $\pm$ 2.92	33.26 $\pm$ 5.93	11.76 $\pm$ 5.59
250	9.87 $\pm$ 4.02	56.93 $\pm$ 2.75	29.49 $\pm$ 2.82	26.91 $\pm$ 2.18	13.99 $\pm$ 2.26
125	7.64 $\pm$ 2.11	38.98 $\pm$ 1.37	25.37 $\pm$ 5.32	12.25 $\pm$ 5.24	8.68 $\pm$ 5.88

ตารางภาคผนวกที่ ข-22 ค่าเฉลี่ยร้อยละเฉลี่ยความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa ของสารสกัดแยกส่วนจากใบด้วยวิธี Liquid-Liquid extraction

เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa					
ค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์					
สารสกัดแยกส่วน ( $\mu\text{g/ml}$ )					
ความเข้มข้น	LH	LD	LE	LB	LW
2000	45.81 $\pm$ 0.29	50.30 $\pm$ 1.42	47.31 $\pm$ 1.95	47.62 $\pm$ 1.07	39.39 $\pm$ 2.35
1000	35.92 $\pm$ 1.81	38.52 $\pm$ 1.15	36.00 $\pm$ 2.14	36.00 $\pm$ 3.02	22.13 $\pm$ 6.19
500	22.40 $\pm$ 0.73	32.92 $\pm$ 4.65	33.79 $\pm$ 1.98	21.22 $\pm$ 1.61	16.25 $\pm$ 1.98
250	25.63 $\pm$ 1.74	11.76 $\pm$ 0.82	30.64 $\pm$ 4.88	11.29 $\pm$ 0.84	9.32 $\pm$ 3.05
125	2.18 $\pm$ 1.32	4.51 $\pm$ 0.97	2.89 $\pm$ 4.45	9.87 $\pm$ 3.38	4.04 $\pm$ 5.56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข-23 ค่าเฉลี่ยร้อยละเฉลี่ยความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa ของสารสกัดแยกส่วนจากเมล็ดด้วยวิธี Liquid-Liquid extraction

เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa					
ค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์					
สารสกัดแยกส่วน ( $\mu\text{g/ml}$ )					
ความเข้มข้น	SH	SD	SE	SB	SW
2000	48.20 $\pm$ 1.21	50.08 $\pm$ 2.12	46.16 $\pm$ 1.10	39.33 $\pm$ 2.51	32.01 $\pm$ 3.88
1000	39.17 $\pm$ 0.30	36.55 $\pm$ 1.54	23.47 $\pm$ 4.79	37.24 $\pm$ 5.03	23.59 $\pm$ 2.86
500	34.01 $\pm$ 0.26	19.79 $\pm$ 3.18	13.29 $\pm$ 3.12	12.67 $\pm$ 1.18	15.29 $\pm$ 1.92
250	16.35 $\pm$ 2.60	12.84 $\pm$ 5.62	8.18 $\pm$ 8.90	11.16 $\pm$ 3.76	6.09 $\pm$ 3.85
125	6.70 $\pm$ 2.35	6.34 $\pm$ 1.83	7.36 $\pm$ 4.36	6.79 $\pm$ 5.29	2.00 $\pm$ 0.36

ตารางภาคผนวกที่ ข-24 ค่าเฉลี่ยร้อยละเฉลี่ยความเป็นพิษต่อเซลล์เยื่อบุไตลิงชนิด Vero ของสารสกัดแยกส่วนจากใบด้วยวิธี Liquid-Liquid extraction

เซลล์เยื่อบุไตลิงชนิด Vero					
ค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์					
สารสกัดแยกส่วน ( $\mu\text{g/ml}$ )					
ความเข้มข้น	LH	LD	LE	LB	LW
2000	76.71 $\pm$ 1.02	66.29 $\pm$ 1.93	51.31 $\pm$ 0.63	31.19 $\pm$ 2.26	13.28 $\pm$ 0.85
1000	10.23 $\pm$ 0.82	18.16 $\pm$ 1.16	14.94 $\pm$ 0.54	14.94 $\pm$ 1.89	12.17 $\pm$ 1.02
500	6.40 $\pm$ 0.80	9.78 $\pm$ 1.44	8.84 $\pm$ 2.77	8.84 $\pm$ 1.33	11.17 $\pm$ 0.31
250	4.90 $\pm$ 1.64	2.41 $\pm$ 1.99	5.40 $\pm$ 2.87	5.40 $\pm$ 2.05	8.06 $\pm$ 0.90
125	2.52 $\pm$ 0.80	1.30 $\pm$ 1.22	1.13 $\pm$ 0.67	1.13 $\pm$ 0.93	1.96 $\pm$ 0.62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข-25 ค่าเฉลี่ยร้อยละเฉลี่ยความเป็นพิษต่อเซลล์เยื่อบุไตลิงชนิด Vero ของสารสกัดแยกส่วนจากเมล็ดด้วยวิธี Liquid-Liquid extraction

เซลล์เยื่อบุไตลิงชนิดVero					
ค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์					
สารสกัดแยกส่วน (µg/ml)					
ความเข้มข้น	SH	SD	SE	SB	SW
2000	50.63±0.98	76.99±0.77	54.58±1.41	25.78±0.65	22.34±1.15
1000	23.07±4.58	31.71±3.77	21.79±8.60	22.57±1.74	16.14±0.73
500	16.69±7.23	16.96±2.09	18.16±1.89	19.03±2.92	11.77±1.79
250	13.52±1.06	7.78±0.67	10.49±1.78	7.41±1.20	5.94±0.73
125	9.89±0.80	5.02±0.67	3.31±0.35	2.27±1.19	1.30±0.89

ตารางภาคผนวกที่ ข-26 ค่าเฉลี่ยร้อยละเฉลี่ยความเป็นพิษต่อเซลล์เคอราตินไฮโดรฟิลิกชนิด HaCaT ของสารสกัดแยกส่วนจากใบด้วยวิธี Liquid-Liquid extraction

เซลล์เคอราตินไฮโดรฟิลิกชนิด HaCaT					
ค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์					
สารสกัดแยกส่วน (µg/ml)					
ความเข้มข้น	LH	LD	LE	LB	LW
2000	71.01±5.31	91.22±2.79	67.59±1.48	50.71±1.93	14.84±2.35
1000	56.26±1.22	85.34±1.00	65.63±1.61	41.10±3.86	10.01±2.57
500	45.38±1.61	50.39±2.29	26.08±6.08	7.42±2.33	5.96±1.24
250	13.06±2.29	24.67±4.52	4.82±2.81	5.01±1.02	5.28±1.39
125	11.42±3.01	13.56±2.68	2.50±2.42	1.68±1.43	1.23±2.69

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข-27 ค่าเฉลี่ยร้อยละเฉลี่ยความเป็นพิษต่อเซลล์เคอราทีโนไซต์มนุษย์ชนิด HaCaT ของสารสกัดแยกส่วนจากเมล็ดด้วยวิธี Liquid-Liquid extraction

เซลล์เคอราทีโนไซต์มนุษย์ชนิด HaCaT					
ค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์					
สารสกัดแยกส่วน ( $\mu\text{g/ml}$ )					
ความเข้มข้น	SH	SD	SE	SB	SW
2000	69.57 $\pm$ 2.04	88.11 $\pm$ 0.51	72.32 $\pm$ 0.34	52.84 $\pm$ 2.57	31.97 $\pm$ 2.13
1000	56.33 $\pm$ 1.22	87.80 $\pm$ 1.00	50.51 $\pm$ 1.61	30.47 $\pm$ 2.46	25.87 $\pm$ 0.47
500	47.03 $\pm$ 1.61	59.34 $\pm$ 2.29	36.85 $\pm$ 6.08	27.23 $\pm$ 1.26	12.70 $\pm$ 2.03
250	6.11 $\pm$ 2.29	32.49 $\pm$ 4.52	27.87 $\pm$ 2.81	10.38 $\pm$ 1.13	9.75 $\pm$ 1.48
125	1.54 $\pm$ 3.01	15.98 $\pm$ 2.68	1.69 $\pm$ 2.42	2.63 $\pm$ 0.46	0.16 $\pm$ 1.27

ตารางภาคผนวกที่ ข-28 ค่าเฉลี่ยร้อยละเฉลี่ยความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังของหนูชนิด L929 ของสารสกัดแยกส่วนจากใบด้วยวิธี Liquid-Liquid extraction

เซลล์ผิวหนังของหนูชนิด L929					
ค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์					
สารสกัดแยกส่วน ( $\mu\text{g/ml}$ )					
ความเข้มข้น	LH	LD	LE	LB	LW
2000	69.81 $\pm$ 4.28	84.59 $\pm$ 2.87	69.50 $\pm$ 6.61	59.86 $\pm$ 1.64	36.33 $\pm$ 3.57
1000	56.49 $\pm$ 2.09	79.39 $\pm$ 1.17	55.48 $\pm$ 1.63	45.90 $\pm$ 0.76	24.85 $\pm$ 0.24
500	34.55 $\pm$ 1.40	61.63 $\pm$ 2.66	41.91 $\pm$ 1.62	34.55 $\pm$ 2.41	18.57 $\pm$ 1.39
250	31.76 $\pm$ 1.63	40.89 $\pm$ 2.36	15.08 $\pm$ 1.95	25.86 $\pm$ 1.02	13.81 $\pm$ 1.59
125	11.15 $\pm$ 0.77	21.55 $\pm$ 1.53	10.71 $\pm$ 0.56	7.43 $\pm$ 2.03	9.44 $\pm$ 1.25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข-29 ค่าเฉลี่ยร้อยละเฉลี่ยความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังของหนูชนิด L929 ของสารสกัดแยกส่วนจากเมล็ดด้วยวิธี Liquid-Liquid extraction

เซลล์ผิวหนังของหนูชนิด L929					
ค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์					
สารสกัดแยกส่วน ( $\mu\text{g/ml}$ )					
ความเข้มข้น	SH	SD	SE	SB	SW
2000	83.24 $\pm$ 3.11	86.79 $\pm$ 3.95	62.35 $\pm$ 0.81	49.19 $\pm$ 1.94	32.03 $\pm$ 9.23
1000	44.99 $\pm$ 4.12	88.85 $\pm$ 2.21	55.64 $\pm$ 1.12	33.13 $\pm$ 1.26	22.36 $\pm$ 1.23
500	42.67 $\pm$ 2.00	75.89 $\pm$ 1.23	34.16 $\pm$ 1.29	21.07 $\pm$ 1.85	13.45 $\pm$ 4.26
250	37.71 $\pm$ 3.05	37.58 $\pm$ 1.75	33.38 $\pm$ 1.47	11.07 $\pm$ 2.12	8.81 $\pm$ 2.30
125	22.36 $\pm$ 1.00	33.90 $\pm$ 3.70	11.84 $\pm$ 0.48	3.20 $\pm$ 1.47	4.17 $\pm$ 0.90

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## Comparative evaluation of leaf and seed methanolic extracts obtained from *Sophora tomentosa* Linn. for phytochemical, phenolic content, antioxidant and antibacterial activities

Laowklang, P., Poeaim, S.\* and Tangthirasunun, N.

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

Laowklang, P., Poeaim, S. and Tangthirasunun, N. (2023). Comparative evaluation of leaf and seed methanolic extracts obtained from *Sophora tomentosa* Linn. for phytochemical, phenolic content, antioxidant and antibacterial activities. International Journal of Agricultural Technology 19(1):165-174.

**Abstract** *Sophora tomentosa* Linn. (Fabaceae), also known as a yellow necklace pod, is a traditional medicinal plant widely used to treat dysentery and diarrhea. This study evaluated the biological activities of methanolic leaf and seed extracts of *S. tomentosa*. The total phenolic content of methanolic leaf (STL) seed (STS) and dechlorophyll of leaf extract (DSTL) showed  $92.02 \pm 1.78$ ,  $38.48 \pm 0.61$ , and  $35.35 \pm 2.45$  mg GAE/g extract, respectively. For antioxidant activity, DPPH, ABTS, and FRAP assay was found in leaves (STL) more than in dechlorophyll of leaf extract (DSTL) and seed (STS). The methanolic extracts were assessed for antibacterial activity against eight pathogenic bacterial species. The seed extract showed the most potent antibacterial activity against *Kocuria rhizophila* with  $12.85 \pm 3.85$  mm inhibition zones. For phytochemical evaluation, both leaf and seed extracts exhibited alkaloids and coumarin. The results showed that the leaf extract (STL) had higher antioxidant activity and total phenolic content than seeds and dechlorophyll of leaf extract (DSTL). On the other hand, the seed extract presented the most potent antibacterial activity. The current study suggested that both leaf and seed extracts of *S. tomentosa* gave the potential source of natural bioactive compounds, which will be further evaluated in other biological activities.

**Keywords:** Phytochemical, Total phenolic content, Antibacterial, Antioxidant, *Sophora tomentosa* Linn

### Introduction

*Sophora* species have secondary metabolites from different parts showing numerous pharmacological activities (Abd-Alla *et al.*, 2021), such as the root extract from *S. viciifolia* (Ao *et al.*, 2019). The seed extracts of *S. alopecuroides* have properties of antimicrobial, antioxidant, and enzyme inhibition (Zahra *et al.*, 2021). The *Sophora* genus was rich in chemical compounds. Including their biological activities were identified from different parts and *Sophora* species (Krishna *et al.*, 2012; Awwad *et al.*, 2015; Bansode and Salalkar, 2015; Li *et*

\* Corresponding Author: Poeaim, S.; Email: [supattra.poe@kmitl.ac.th](mailto:supattra.poe@kmitl.ac.th)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

al., 2020). For antioxidant activity, the extracts from *S. japonica* are rich in flavonoids and phenolics, showing high antioxidant capacities (Zhu *et al.*, 2022). Generally, antioxidant activity was correlated with total phenols and flavonoids. *Sophora* species have been reported with antimicrobial activities (Yamaki *et al.*, 1990; Cho *et al.*, 1999; Sato *et al.*, 1995; Sohn *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2019).

Chlorophyll helps plants create their food through photosynthesis. On the other hand, chlorophyll can act as a peroxidation or negatively impact the resulting plant extract (Olatunde *et al.*, 2018). The greenish chlorophyll color might interfere with in vitro biological activities on fluorescence measurements. Therefore, this experiment compared biological activities between the extracted with and without chlorophyll removal.

*Sophora tomentosa* L. belongs to the Fabaceae family, also known as the yellow necklace pod, a small tree and shrub of up to 3-4 meters. It grows on coastal habitats such as sandy beaches, seashores, and open grassland along the beach. Although *S. tomentosa* is a native medicinal plant used against dysentery, diarrhea and cholera in Southeast Asia, some studies report on the chemical composition of extracts and their biological activities. It has been reported that 17 flavonoids, such as sophoraflavanoneA-E and isosophoranone, are from the root and stem of *S. tomentosa* (Tanaka *et al.*, 1997). However, the prenylated flavonoids from the genus *Sophora* like sophoraflavanoneG, sophoflavescenol and alopecuronesA and B, play important roles in their biological properties as antibacterial and cytotoxic activities (Boozari *et al.*, 2019). Therefore, this study aimed to investigate the phytochemicals, total phenolic contents, antioxidant, and antibacterial activities of leaf and seed methanolic extracts obtained from *Sophora tomentosa* with and without chlorophyll removal.

## Materials and methods

### *Plant material collection and extraction*

*Sophora tomentosa* (the Thai name is Sara phat phit) leaves were collected from Koh Yao Yai, Phang Nga province and seeds were purchased from the herbal drug store in Nonthaburi province, Thailand. The leaves and seeds were cleaned with tap water, air drying and ground with an electric grinder to obtain a fine powder. The samples were extracted with methanol using maceration for a week. Afterward, the extracts were filtered through filter paper and concentrated in a rotary evaporator to obtain the methanolic extracts of *S. tomentosa* leaves (STL) and seeds (STS).

### ***Remove the chlorophyll from the methanolic leaves extract***

The chlorophyll removal efficiency was established following the protocol of Phaisan *et al.* (2020) with some modifications. Briefly, the leaf extract was mixed with palm oil at 1:1 (w/v) for the liquid-liquid extraction method. The mixtures were separated by centrifugation at 4500 rpm for 10 minutes. The top layer without chlorophyll was collected and concentrated in a rotary evaporator to obtain the dechlorophyllized *S. tomentosa* leaves (DSTL).

### ***Phytochemical screening***

Phytochemical was determined for the potential presence of alkaloids, tannins, coumarin, and saponins of the LST, SLT and DLST extracts following the method of Evans (2002) and Farnsworth (1966) with some modifications.

### ***Evaluation of total phenolic content***

The extract's total phenolic content was evaluated by the Folin- Ciocalteu method, according to Natungnuy and Poeaim (2018). Briefly, 50  $\mu$ l of the sample was prepared at 1000  $\mu$ g/ml, and 50  $\mu$ l of 10% Folin- Ciocalteu was mixed and kept in the dark. Then, 100  $\mu$ l of 7.5 % (w/v) sodium carbonate was added and incubated for 30 minutes. The absorbance was measured at 765 nm. The total phenolic content was expressed as a milligram of gallic acid equivalents per gram extract (mg GAE/g of extract) using gallic acid as a standard.

### ***Evaluation of antioxidant activities***

DPPH and ABTS free radical scavenging assay and Ferric-reducing antioxidant power (FRAP) assay were evaluated using the in-house method (Natungnuy and Poeaim, 2018). For DPPH and ABTS assays were expressed in milligrams of Trolox equivalent per g extract (mg TE/g extract). For FRAP, ascorbic acid was used and constructed as a standard curve, and the result was expressed as milligrams of ascorbic acid equivalent per g extract (mg AAE/g extract).

### ***Evaluation of antibacterial activity***

The disc diffusion method has been standardized according to the CLSI adapted in 2012. Eight different strains of bacteria, i.e., *Bacillus subtilis* TISTR

1248, *Bacillus cereus* DMST 5040, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* TISTR 1466, *Staphylococcus epidermidis* TISTR 2141, *Propionibacterium acnes* DMST 14916, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 2370 and *Escherichia coli* TISTR 746 were obtained from the Department of Biology, School of Science, KMITL, Thailand. The inoculum of bacteria was transferred individually to Mueller Hinton Broth (MHB) and incubated. After incubation, the bacteria culture was swabbed on Mueller Hinton Agar (MHA). The extract solutions (3 mg/disc) were loaded on 6 mm in diameter of paper discs, and the disc was dried and placed on the surface of MHA. The plates were incubated at 37°C, 24 hr. Gentamicin and methanol were used as the positive and negative control, respectively. The zone of inhibition was to be measured.

### Statistical analysis

All experiments were measured in triplicates and are expressed as means  $\pm$  standard deviation (SD) using SPSS version 25 statistical software for a one-way analysis of variance (ANOVA).

## Results

### Phytochemical Screening

For phytochemical screening, alkaloids and tannins are recorded in *S. tomentosa* seeds (STS), leaves (STL), and the dechlorophyllized *S. tomentosa* leaves (DSTL) extract. Coumarins are presented only in the extract of the seeds. Saponins were absent in the leaves and seeds extract. However, saponins can be found in the dechlorophyllized *S. tomentosa* leaves (DSTL), which are presented in Table 1.

**Table 1.** Phytochemical screening of the methanolic extract of seeds and leaves from *S. tomentosa*

Phytochemical	Name of test/Solution	Extracts		
		STS	STL	DSTL
Alkaloid	Dragendorff's solution	+	+	+
	Mayer's solution	+	+	+
	Wagner's solution	+	+	+
Tannin	Gelatin solution	-	-	-
	Gelatin salt solution	-	-	-
	FeCl <sub>3</sub>	+	+	+
Coumarin	Coumarin test	+	-	-
Saponin	Froth test	-	-	+

+ = presence, - = absence

### Total phenolic content

The total phenolic content of STS, STL, and DSTL extracts was estimated using gallic acid (0-100 µg/ml) as a standard compound. The calibration curve showed  $y = 0.0033x$  with an  $r^2$  value of 0.9984, and the values of total phenolic content were expressed as mg GAE/g extract. The total phenolic content of STL, STS and DSTL extract was  $92.07 \pm 1.80$ ,  $38.48 \pm 0.610$  and  $35.35 \pm 2.45$  mg GAE/g extract, respectively. The total phenolic contents of STL extracts were significantly higher than STS and DSTL extracts, which was insignificant between STS and DSTL extracts ( $p < 0.05$ ).

### Antioxidant activities

Three assays estimated antioxidant activity including DPPH, ABTS and FRAP are presented in Table 2. *S. tomentosa* leaves (STL) extract showed the highest antioxidant capacity with values of  $20.52 \pm 1.71$ ,  $76.70 \pm 4.64$  mgTE/g extract and  $55.16 \pm 1.94$  mgAAE/g extract in DPPH, ABTS and FRAP assays, respectively. The antioxidant capacity of seeds extract (STD) was significantly lower than STL and DSTL extracts. For DPPH and FRAP assays, the dechlorophyllized *S. tomentosa* leaves (DSTL) presented insignificantly lower antioxidant capacity than the STL, with values of  $19.02 \pm 0.83$  mgTE/g extract and  $54.48 \pm 0.47$  mgAAE/g extract. However, in ABTS assays, the DSTL presented significantly lower antioxidant capacity than the STL, with values of  $65.90 \pm 2.43$  mgTE/g extract.

**Table 2.** Antioxidant activities of the methanolic extracts from *S. tomentosa* leaves and seeds

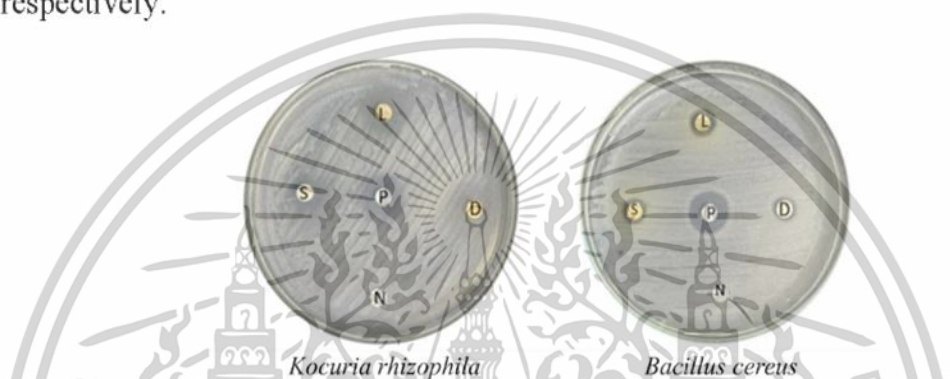
Methanolic extracts	Antioxidant capacity		
	DPPH assay (mg TE/g extract)	ABTS assay (mg TE/g extract)	FRAP assay (mg AAE/g extract)
STS	$11.40^b \pm 3.17$	$56.40^c \pm 3.84$	$38.80^b \pm 2.82$
STL	$20.52^a \pm 1.71$	$76.70^a \pm 4.64$	$55.16^a \pm 1.94$
DSTL	$19.02^a \pm 0.83$	$65.90^b \pm 2.43$	$54.48^a \pm 0.47$

The results are expressed as mean  $\pm$ SD. The letters a-c within the same column indicate the statistical significance at  $p < 0.05$ .

### Antibacterial activity

Antibacterial activity of the methanolic extracts from *S. tomentosa* leaves (STL) and seeds (STS) extract, as well as the dechlorophyllized *S. tomentosa* leaves (DSTL), was done using *B. subtilis*, *B. cereus*, *K. rhizophila*, *S. aureus*,

*S. epidermidis*, *P. acnes* as gram-positive bacteria and *P. aeruginosa* and *E. coli* as gram-negative bacteria. The antibacterial activity of each extract was determined by the disc diffusion method, which used gentamicin 10 µg/ml as a positive control. The result revealed three extracts (3 mg/disc) presented antibacterial activity only with *K. rhizophila* and *B. cereus*, as shown in Figure 2 and Table 3. On the other hand, its did not inhibit *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. acnes*, *P. aeruginosa* and *E. coli*. However, DSTL extract (8.65±1.62 and 7.37± 0.59 mm) showed lower antibacterial activity than STL extract (12.70±0.93 and 8.06±0.10 mm) for *K. rhizophila* and *B. cereus*, respectively.



**Figure 1.** Antibacterial activity of the methanolic extracts from *S. tomentosa* leaves (STL), seeds (STS) extract and the dechlorophyllized *S. tomentosa* leaves (DSTL) by disc diffusion method. P: positive control, N: Negative control, S: STS, L: STL and D: DSTL

**Table 3.** The inhibition zone of the methanolic extracts prepared from *S. tomentosa* leaves (STL), seeds (STS) extract and the dechlorophyllized *S. tomentosa* leaves (DSTL) (3 mg/disc) and gentamicin (10 µg/disc)

Extracts	Inhibition zone (mm)	
	<i>Kocuria rhizophila</i>	<i>Bacillus cereus</i>
STS	12.44 <sup>ab</sup> ± 2.81	9.87 <sup>b</sup> ± 0.32
STL	12.70 <sup>ab</sup> ± 0.93	8.06 <sup>c</sup> ± 0.10
DSTL	8.65 <sup>b</sup> ± 1.62	7.37 <sup>c</sup> ± 0.59
Gentamicin	15.06 <sup>a</sup> ± 0.42	15.20 <sup>a</sup> ± 1.03

The results are expressed as mean±SD; the letters a-c within the same column indicate the statistical significance at p<0.05

## Discussion

The literature survey found that all plants have a considerable proportion of important phytochemicals and secondary metabolites. Several plant species of *Sophora* have been used in traditional medicine. Different parts of *Sophora*

species have secondary metabolites showing numerous pharmacological activities, such as *S. alopecuroides*, *S. flavescens*, *S. japonica*, *S. secundiflora*, and *S. tetraptera* (Krishna *et al.*, 2012; Boozari *et al.*, 2019; Abd-Alla *et al.*, 2021). *Sophora tomentosa*, whose local name is Sara phat phit, is one of the species that has not been previously reported for its biological activities of methanolic extract. Therefore, the study focused on the leaves and seeds extraction for phytochemical activity, total phenolic contents, and antioxidant and antibacterial activities. However, leaves presented a greenish-dark color which interfered with the resulting analysis. So, leaves were applied to remove chlorophyll using palm oil by liquid-liquid extraction. In this study, the results of the alkaloid test using Dragendorff, Mayer and Wagner reagents, alkaloids were represented in three extraction samples. All extracts exhibited tannin only on the  $\text{FeCl}_3$ . Coumarins are presented only in the extract of the seeds. Saponins were absent in the leaves and seeds extract. However, the dechlorophyllized *S. tomentosa* leaves (DSTL) extract presented saponin on the froth test. The previous research has shown the percentage of secondary metabolites among *Sophora* species extract like alkaloids, tannin, chromones, coumarins, sterols, isoflavonoids, flavonols, saponins, and stilbene oligomers (Awwad *et al.*, 2015; Bansode and Salalkar, 2015; Li *et al.*, 2020). Alkaloids are found primarily in plants such as in *Sophora* species Ex. Sophovicine A-C from *S. davidii*, epilamprobin-N-oxide from *S. tomentosa* (Abd-Alla *et al.*, 2021).

According to the results of this study, the methanolic extracts from STS, STL and DSTL extracts of *S. tomentosa* are composed of the phenolic compound that STL extract revealed a higher total phenolic content ( $92.07 \pm 1.80$  mg GAE/g extract) than STS and DSTL extracts ( $38.48 \pm 0.610$  and  $35.35 \pm 2.45$  mg GAE/g extract). Our results are consistent with results from a previous study that the extract from flowers of *S. japonica* has total phenolic content of  $84.23 \pm 4.69$  mg GAE/g extract (Zheng *et al.*, 2018). In agreeing with Chang *et al.* (2019), who reported that the total phenolic content in the leaves extract of *S. tomentosa* had total phenolics containing  $61.21 \pm 0.08$  mg GAE/g extract.

Generally, total phenolic content and antioxidant activity are correlated because phenolics react with various free radicals (Zeb, 2020). This study determined the antioxidant capacities of the sample extracts. It found that STL extract has the effect of the best antioxidant activity, followed by DSTL extract and STS extract, respectively. The extracts showed a strong correlation between phenolic content and antioxidant activities. These results agree with previous reports that *S. japonica* had a high antioxidant capacity because it has a high phenolic and flavonoid content (Zhu *et al.*, 2022). In DPPH and FRAP assays,

the dechlorophyllized *S. tomentosa* leaves (DSTL) presented insignificantly lower antioxidant capacity than the STL. However, in ABTS assays, the DSTL presented lower antioxidant activity than the STL. In this study, the dechlorophyllized *S. tomentosa* leaves found that the antioxidant capacity was reduced. According to the results of Benjakul and Tagrida (2020), it has been reported the total phenolic content, and antioxidant activity of *Piper sarmentosum* leaf extracts that removed chlorophyll were decreased. In contrast, Phaisan *et al.* (2020) reported using oils for dechlorophyllization, and the result indicated palm oil and soybean oil gave high antioxidant activity. So, the result of the antioxidant activity of this study is implicated in their total phenolic content.

In this study, the methanolic extract from the seed of *S. tomentosa* (STS) presented the highest inhibited zone of *K. rhizophila* and *B. cereus*. On the other hand, its did not inhibit *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. acnes*, *P. aeruginosa* and *E. coli*. These findings are inconsistent with those previously reported that *Sophora* species have been reported with antimicrobial activities against both gram-positive and gram-negative (Yamaki *et al.*, 1990; Cho *et al.*, 1999; Sato *et al.*, 1995; Sohn *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2019). Several compounds in *S. flavescens* have been shown against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* (Yamaki *et al.*, 1990). The methanol extract from *S. flavescens* showed growth inhibition against gram-positive bacteria such as *Bacillus subtilis* and *S. aureus* and gram-negative bacteria such as *P. aeruginosa* (Cho *et al.*, 1999). In addition, bioactive compounds such as flavanone isolated from *S. exigua* inhibited the growth of 21 strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Sato *et al.*, 1995). The extract of *S. viciifolia* had higher antioxidant and antimicrobial activity potential (Lin *et al.*, 2019). The extracts with chlorophyll removal exhibited antibacterial activity lower than those without chlorophyll removal. However, our result follows that coumarin is related to antibacterial activity.

This study reported on the biological activity of the methanolic extract of seed and leaves from *S. tomentosa* and the effect of chlorophyll removal from leaves. The results showed that the extraction without chlorophyll removal is not related to the potential of biological activity. The antioxidant activity is implicated in their total phenolic content. *S. tomentosa* leaves extract showed high antioxidant capacity. In addition, coumarins and antibacterial activity are correlated. The methanolic extract from the seeds of *S. tomentosa* presented the highest inhibited zone of *K. rhizophila* and *B. cereus*. Further studies should be promoted and needed to evaluate the potential of biological activity and identify the constituent of their bioactive compounds from both seeds and leaves of *S. tomentosa*.

## Acknowledgments

This work is 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 Initiation of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn (RSPG). The leave samples were supported by Koh Yao Yai Community, Phang Nga province.

## References

- Abd-Alla, H. I., Souguir, D. and Radwan, M. O. (2021). Genus *Sophora*: a comprehensive review on secondary chemical metabolites and their biological aspects from past achievements to future perspectives. Archives of Pharmacal Research, 44:903-986.
- Ao, M., Xiao, X. and Li, Q. (2019). Efficacy and safety of compound Kushen injection combined with chemotherapy on postoperative patients with breast cancer: a meta-analysis of randomized controlled trials. Medicine, 98:3.
- Awwad, A. M., Salem, N. M. and Abdeen, O. A. (2015). Phytochemical and spectral studies of synthesis sulfur nanoparticles using *Sophora japonica* pods extract. Journal of Advances in Chemistry, 11:3426-3432.
- Bansode, T. S. and Salalkar, B. K. (2015). Phytochemical analysis of some selected Indian medicinal plants. International Journal of Pharma and Bio Sciences, 6:550-556.
- Benjakul, S. and Tagrida, M. (2020). Ethanolic extract of Betel (*Piper betel* L.) and Chaphlu (*Piper sarmentosum* Roxb.) dechlorophyllized using sedimentation process: Production, characteristic, and antioxidant activities. Journal of Food Biochemistry, 44:1-14.
- Boozari, M., Soltani, S. and Iranshahi, M. (2019). Biologically active prenylated flavonoids from the genus *Sophora* and their structure-activity relationship-A review. Phytotherapy Research, 33:546-560.
- Chang, H. C., Liu, K. F., Teng, C. J., Lai, S. H., Yang, S. E., Ching, H. and Wu, C. R. (2019). *Sophora tomentosa* extract prevents MPTP-induced parkinsonism in C57BL/6 mice via the inhibition of GSK-3 $\beta$  phosphorylation and oxidative stress. Nutrients, 11:252.
- Cho, H., Weon, S. R., Yang, E. Y., Kim, J. S., You, I. S., Ryu, D. G., Lee, J. H., Kang, K. U. and Bake, S. H. (1999). Antimicrobial effect of the extract of *Sophora flavescens* Ait. Korean Journal of Pharmacognosy, 43:419-422.
- Evans, W. C. (2002). Trease and Evans Pharmacognosy. 15<sup>th</sup> Edition. W.B Saunder, Edinburgh. 585.
- Farnsworth, N. R. (1966). Biological and phytochemical screening of plants. Journal of Pharmaceutical Sciences, 55:225-276.
- Krishna, P. M., Rao, K. N. V., Sandhya, S. and Banji, D. (2012). A review on phytochemical, ethnomedical and pharmacological studies on genus *Sophora*, Fabaceae. Revista Brasileira de Farmacognosia, 22:1145-1154.
- Li, Y., Wang, G., Liu, J. and Ouyang, L. (2020). Quinolizidine alkaloids derivatives from *Sophora alopecuroides* Linn: Bioactivities, structure-activity relationships and preliminary molecular mechanisms. European Journal of Medicinal Chemistry, 188.
- Lin, B. B., Liu, X., Wu, S. Q., Zheng, H. X., Huo, K. K., Qi, S. S. and Chen, C. (2019). Phytochemicals content, antioxidant and antibacterial activities of *Sophora viciifolia*. Chemistry and Biodiversity, 16.

- Natungnyu, K. and Poeaim, S. (2018). Antioxidant and cytotoxic activities of methanolic extracts from *Mimusops elengi* flowers. *International Journal of Agricultural Technology*, 14:731-740.
- 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*, 42:1-12.
- Phaisan, S., Yusakul, G., Sakdamas, A., Taluengit, N., Sakamoto, S. and Putalun, W. (2020). A green and effective method using oils to remove chlorophyll from *Chromolaena odorata* (L.) R.M. King & H. Rob. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 42:1084-1090.
- Sato, M., Tsuchiya, H., Takase, I., Kureshiro, H., Tanigaki, S. and Inuma, M. (1995). Antibacterial activity of flavanone isolated from *Sophora exigua* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its combination with antibiotics. *Phytotherapy*, 9:509-512.
- Sohn, H. Y., Son, K. H., Kwon, C. S., Kwon, G. S. and Kang, S. S. (2004). Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medicinal plants: *Morus alba* L., *Morus mongolica* Schneider, *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent *Sophora flavescens* Ait and *Echinosophora koreensis* Nakai. *Phytomedicine*, 11:666-672.
- Tanaka, T., Inuma, M., Asai, F., Ohyama, M. and Burandt, B. (1997). Flavonoids from the root and stem of *Sophora tomentosa*. *Phytochemistry*, 46:1431-1437.
- Yamaki, M., Kashiwara, M. and Takagi, S. (1990). Activity of Kushen compounds against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans*. *Phytotherapy Research*, 4:235-236.
- Zahra, S. A., Iqbal, J., Abbasi, B. A., Yaseen, T., Hameed, A., Shahbaz, A., Kanwal, S., Mahmood, T. and Ahmad, P. (2021). Scanning electron microscopy of *Sophora alopecuroides* L. seeds and their cytotoxic, antimicrobial, antioxidant, and enzyme inhibition potentials. *Microscopy Research and Technique*, 84:1809-1820.
- Zeb, A. (2020). Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. *Journal of Food Biochemistry*, 44:1-22.
- Zheng, J., Yu, X., Maninder, M. and Xu, B. (2018). Total phenolics and antioxidants profiles of commonly consumed edible flowers in China. *International Journal of Food Properties*, 21:1524-1540.
- Zhu, Y., Wang, W., Ruan, R. and Chen, J. (2022). Oxidative potential and nanoantioxidant activity of flavonoids and phenolic acids in *Sophora flavescens*. *International Journal of Analytical Chemistry*, 7.

(Received: 20 October 2022, accepted: 30 December 2022)

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวพัชรนันท์ เลากลาง
วัน เดือน ปีเกิด	5 ธันวาคม 2541
ที่อยู่ปัจจุบัน	56 หมู่ 5 ตำบลด่านคล้า อ.โนนสูง จังหวัดนครราชสีมา 30160
ประวัติการศึกษา	(2563) วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ เกรดเฉลี่ย 2.74 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (2567) วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผลงานทางวิชาการ	(2566) P. Laowklang, S. Poeaim, N. Tangthirasunun. 2023. “Comparative evaluation of leaf and seed methanolic extracts obtained from <i>Sophora tomentosa</i> Linn. for phytochemical, phenolic content, antioxidant and antibacterial activities” International Journal of Agricultural Technology. 19(1): 165-174.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้