

ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเมล็ดมะขามป้อม

BIOLOGICAL ACTIVITIES OF *Phyllanthus emblica* SEED EXTRACTS



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2561

KMITL-2018-SC-M-020-046

ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเมล็ดมะขามป้อม

BIOLOGICAL ACTIVITIES OF *Phyllanthus emblica* SEED EXTRACTS



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2561

KMITL-2018-SC-M-020-046

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ภายในเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแบบลงเนื้อหา และต้องขออนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

BIOLOGICAL ACTIVITIES OF *Phyllanthus emblica* SEED EXTRACTS



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE
DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษานานาชาติ โดยไม่ต้องให้ค่าไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และนำข้อมูลไปใช้เชิงพาณิชย์ของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
YEAR 2018

KMITL-2018-SC-M-020-046



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

COPYRIGHT 2018

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเมล็ดมะขามป้อม
ชื่อนักศึกษา	นางสาวอัจฉรา ใจบุญมา
รหัสประจำตัว	58605058
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
พ.ศ.	2561
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.วนิดา จันทรวีกุล

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ (ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย และฤทธิ์การปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชัน) ของสารสกัดจากเปลือกเมล็ด (seed coat) และเอ็มบริโอ (embryo) ของมะขามป้อม (*Phyllanthus emblica*) นำสารสกัดหยาบเมทานอลมาสกัดด้วยวิธี liquid-liquid extraction โดยใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ จากการทดลองพบว่า สารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตท (ScE) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด (439.09 ± 5.49 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมสารสกัด) และ ScE ยังมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS, DPPH และ FRAP สูงที่สุด ซึ่งอนุมูลอิสระ ABTS และ DPPH มีค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (50% Inhibitory concentration; IC_{50}) เท่ากับ 31.53 ± 0.36 และ 39.98 ± 0.32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และ FRAP มีค่าเท่ากับ 751.92 ± 5.22 มิลลิกรัมกรดแอสคอบิกต่อกรัมสารสกัด สำหรับฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus epidermidis* และ *Streptococcus aureus* ใช้วิธี disc diffusion และเชื้อ *Propionibacterium acnes* ใช้วิธี agar well diffusion พบว่า ScE สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. subtilis*, *B. cereus*, *M. luteus*, *S. epidermidis* และ *S. aureus* ดีที่สุดในขณะที่สารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นบิวทานอล (ScB) สามารถยับยั้งเชื้อ *P. acnes* ได้ดีที่สุดในอกจากนี้ ScE ยังมีประสิทธิภาพในการปกป้องเซลล์ชนิด L929 และ RAW 264.7 จากสภาวะเครียดออกซิเดชันได้ เมื่อนำ ScE มาแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีได้สารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate fraction; EF) ทั้งหมด 9 สารสกัดส่วนย่อย (EF1-EF9) และนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอีกครั้งพบว่า สารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 2 (EF2) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด และสามารถลดสภาวะเครียดออกซิเดชันในเซลล์ (เซลล์ชนิด L929 และ RAW 264.7) ได้ ในขณะที่สารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 4 (EF4) มีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียดีที่สุด อาจกล่าวได้ว่า สารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทจากเปลือกเมล็ดมะขามป้อมเป็นแหล่งของสารสำคัญ และเหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เช่น ยา และเครื่องสำอางได้ในอนาคต

คำสำคัญ : ฤทธิ์ทางชีวภาพ เปลือกเมล็ด มะขามป้อม เอ็มบริโอ

Thesis Title	Biological activities of <i>Phyllanthus emblica</i> seed extracts
Student Name	Atchara Jaiboonma
Student ID	58605058
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Year	2018
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Supattra Poeaim
Thesis Co-advisor	Dr. Wanida Janvikul

Abstract

The aim of this research was to investigate the biological activities (total phenolic content (TPC), antioxidant activity, antibacterial activity, and protective effect from oxidative stress) of extracts from seed coat and embryo of *Phyllanthus emblica*. The crude methanolic extracts were further successively extracted with four solvents, i.e., hexane, ethyl acetate, butanol and water, by liquid-liquid extraction method. The results indicated that the ethyl acetate seed coat extract (ScE) yielded the highest TPC (439.09 ± 5.49 mgGAE/g extract). Its antioxidant activities (ABTS and DPPH with 50% inhibitory concentration (IC_{50})) were found to be at the concentration of 31.53 ± 0.36 and 39.98 ± 0.32 $\mu\text{g/ml}$, respectively. While its FRAP was found to be at 751.92 ± 5.22 mgAAE/g extract. Disc diffusion method was used in the assessment of the antibacterial activities against *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus epidermidis* and *Streptococcus aureus*, whereas *Propionibacterium acnes* was evaluated by agar well diffusion method. The ScE demonstrated the greatest bacterial inhibition against *B. subtilis*, *B. cereus*, *M. luteus*, *S. epidermidis* and *S. aureus*, whereas the butanol seed coat extract (ScB) showed the strongest activity on *P. acnes*. Furthermore, the ScE could effectively protect L929 and RAW 264.7 cells from oxidative stress. The ScE was further purified by column chromatography to obtain nine ethyl acetate fractions (EF1-EF9). The EF2 showed the strongest TPC, antioxidant activities and cells (L929 and RAW 264.7) protection from oxidative stress. Whereas, the EF4 demonstrated the highest potency of antibacterial activities. These results suggested that the ethyl acetate fractions of *Phyllanthus emblica* seed coat could be used as a natural source of bioactive compounds to be further developed for the natural products such as drugs and cosmetics in the future.

Keywords: Biological activities, Embryo, *Phyllanthus emblica*, Seed coat

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยคามอนุเคราะห์จากหน่วยงานและบุคคลหลายท่าน ซึ่งมีพระคุณที่ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง คือ โครงการทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย (Thailand Graduate Institute of Science and Technology; TGIST) จากสำนักงานพัฒนาเทคโนโลยีและวิทยาศาสตร์ไทย (สวทช.) ซึ่งเป็นผู้มีพระคุณที่สนับสนุนทุนอุดหนุนการศึกษาตลอดหลักสูตร และทุนสนับสนุนงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้คอยสอน ชี้แนะ รวมทั้งให้คำแนะนำ ตรวจสอบ และแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในการทำวิจัยทั้งหมดด้วยความเอาใจใส่ในทุกขั้นตอน เพื่อให้วิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงอย่างมีประสิทธิภาพ และ ดร.วนิดา จันทร์วิกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่คอยให้คำแนะนำในการทำวิจัย และคอยชี้แนะข้อบกพร่องของงานวิจัยในทุกขั้นตอน

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม อาจารย์บัณฑิตประจำภาควิชา ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์ฤกษ์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ผศ.ดร.ครุฑ ศรีกุลนาถ อาจารย์ประจำภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้คำแนะนำและสละเวลาตรวจทานรูปเล่มวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์

ขอขอบคุณอาจารย์ทุกท่าน เจ้าหน้าที่ธุรการ และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่คอยให้คำชี้แนะ นอกจากนี้ขอขอบคุณพนักงานและเจ้าหน้าที่ จากหน่วยวิจัยวัสดุวิศวกรรมชีวการแพทย์ ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาเทคโนโลยีและวิทยาศาสตร์ไทย ที่คอยให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ต่างๆ และสารเคมีในการทำงานวิจัย

ขอบคุณมิตรภาพดีๆ ของเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ปริญญาเอก ปริญญาโท และปริญญาตรี จากภาควิชาชีววิทยา สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทยทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดีให้ผู้วิจัยเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อตวน-คุณแม่อนงค์ ใจบุญมา คุณสุภาพร เกี้ยวจันทิก และทุกคนในครอบครัวที่อยู่เบื้องหลังความสำเร็จในครั้งนี้คอยให้ความช่วยเหลือ ให้ความสนับสนุนในทุกๆ เรื่อง และเป็นกำลังใจที่ดีให้ผู้วิจัยตลอดมา

นางสาวอัจฉรา ใจบุญมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูป.....	ช
คำย่อ/สัญลักษณ์.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 มะขามป้อม.....	4
2.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ.....	5
2.2.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระวิธี ABTS.....	6
2.2.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH.....	6
2.2.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระวิธี FRAP.....	6
2.3 การศึกษาฤทธิ์การปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชัน.....	9
2.4 การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย.....	12
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	15
3.1 วัสดุและอุปกรณ์.....	15
3.2 สารเคมี.....	16
3.3 เซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	17
3.4 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย.....	18
3.5 วิธีการทดลอง.....	18
3.5.1 การสกัดสาร.....	18
3.5.2 การแยกสารสกัดให้บริสุทธิ์.....	19
3.5.3 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	21
3.5.3.1 การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด.....	21
3.5.3.2 การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ.....	21
3.5.3.3 การศึกษาฤทธิ์การปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชัน.....	22
3.5.3.4 การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย.....	24
3.5.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	25
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....	26
4.1 ผลการสกัดสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อม.....	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้เพื่อใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่น ๆ ได้
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีก 3.5.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขาม	
ป้อม	27
4.2.1 ผลการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด	28
4.2.2 ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ	29
4.2.3 ผลการศึกษาฤทธิ์การปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชัน	33
4.2.4 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย	37
4.3 ผลการแยกสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมด้วยวิธี	
คอลัมน์โครมาโทกราฟี	43
4.3.1 ผลการหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของ	
มะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตท	44
4.3.2 ผลการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี	44
4.4 ผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตท	46
4.4.1 ผลการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด	47
4.4.2 ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ	47
4.4.3 ผลการศึกษาฤทธิ์การปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชัน	51
4.4.4 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย	53
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	57
5.1 สรุปผลการวิจัย	57
5.2 ข้อเสนอแนะ	58
เอกสารอ้างอิง	59
ภาคผนวก	67
ประวัติผู้เขียน	74
ผลงานทางวิชาการ	75

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 แสดงแผนการทดลองที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์การปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชัน ..	24
4.1 ชื่อตัวอย่าง ชื่อย่อ และน้ำหนักแห้งของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขาม ป้อม	26
4.2 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของ มะขามป้อม	28
4.3 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อม	31
4.4 แสดงเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ แบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อม	41
4.5 แสดงระบบตัวทำละลาย จำนวน และน้ำหนักแห้งของสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ แยกได้จากสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทด้วย วิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี	45
4.6 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตท	47
4.7 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตท	49
4.8 แสดงเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสในการศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ แบคทีเรียของสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตท	55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	ลักษณะของใบ (ก) กิ่ง (ข) ลำต้น (ค) ผล (ง) ดอก (จ) เมล็ด (ฉ) ของมะขามป้อม..... 5
2.2	การเปลี่ยนเทอร์โซเลียมเป็นฟลิกฟอร์มาซาน..... 9
3.1	แผนภูมิแสดงขั้นตอนการสกัดสารจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของเมล็ดมะขามป้อม ด้วยวิธี liquid-liquid extraction..... 19
4.1	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS กับความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อม (ไม่โครกรัมต่อมิลลิลิตร) ... 29
4.2	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH กับความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อม (ไม่โครกรัมต่อมิลลิลิตร) ... 30
4.3	กราฟแสดงความสามารถในการรีดิวซ์ Fe ³⁺ -TPTZ เป็น Fe ²⁺ -TPTZ ของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อม..... 32
4.4	กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูชนิด L929 และเซลล์แมคโครฟาจของหนูชนิด RAW 264.7 ซึ่งเปรียบเทียบกับเซลล์ชุดควบคุม (Control) □ กับเซลล์ที่ป้อนร่วมกับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 250 ■, 300 ■, 350 ■ และ 400 ■ ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง และวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT..... 34
4.5	กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูชนิด L929 และเซลล์แมคโครฟาจของหนูชนิด RAW 264.7 ซึ่งเปรียบเทียบกับเซลล์ชุดควบคุม (Control) □ กับเซลล์ที่ป้อนร่วมกับสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายละลายชั้นเอทิลอะซิเตท (ScE) ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ■ สารมาตรฐานกรดแอสคอบิก (ACB) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ■ สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ ■ สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์กับสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ■ สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ กับสารมาตรฐานกรดแอสคอบิกที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ■ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง และวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT..... 37
4.6	แสดงผลตัวอย่างการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกเมล็ด (ก) และเอ็มบริโอ (ก) ของมะขามป้อมต่อเชื้อ <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 โดยใช้สารสกัดความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อดิस्क : หมายเลข 1 คือ สารสกัดในตัวทำละลายชั้นเฮกเซน 2 คือ ชั้นเอทิลอะซิเตท 3 คือ ชั้นบิวทานอล 4 คือ ชั้นน้ำ N คือ negative control และ P คือ positive control..... 41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.7	แสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกเมล็ด (ก และ ค) และเอ็มบริโอ (ข และ ง) ของมะขามป้อมต่อเชื้อ <i>P. acnes</i> DMST 14916 ใช้ สารสกัดความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อหลุม : หมายเลข 1 คือสารสกัดในตัวทำละลาย ชั้นเฮกเซน 2 คือ ชั้นเอทิลอะซิเตท 3 คือ ชั้นบิวทานอล 4 คือ ชั้นน้ำ N คือ negative control และ P คือ positive control	41
4.8	ลักษณะของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตท ที่ปรากฏบนแผ่น TLC ของสารสกัด โดยจุดลงในระบบตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทต่อ เมทานอลในอัตราส่วน 80 : 20 เปอร์เซ็นต์ และส่องด้วยแสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 (ก) และ 366 (ข) นาโนเมตร และเมื่อสเปรย์ด้วยสารละลาย anisaldehyde reagent (ค)	44
4.9	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS กับความเข้มข้นของสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตท (ไม่โครกรัมต่อมิลลิลิตร)	48
4.10	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH กับความเข้มข้นของสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตท (ไม่โครกรัมต่อมิลลิลิตร)	49
4.11	กราฟแสดงความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} -TPTZ เป็น Fe^{2+} -TPTZ ของสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตท	50
4.12	กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูชนิด L929 และ เซลล์แมคโครฟาจของหนูชนิด RAW 264.7 ซึ่งเปรียบเทียบกับเซลล์ชุดควบคุม (Control) <input type="checkbox"/> กับเซลล์ที่บ่มร่วมกับสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 2 (EF2) ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร <input type="checkbox"/> สารมาตรฐานกรดแอสคอบิก (ACB) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร <input type="checkbox"/> สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ <input type="checkbox"/> สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์กับสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตท ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร <input type="checkbox"/> สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์กับสารมาตรฐานกรดแอสคอบิก ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร <input type="checkbox"/> เป็นเวลา 20 ชั่วโมง และวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT	53
4.13	แสดงผลตัวอย่างการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทต่อเชื้อ <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 โดยใช้ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อดิสก์ : ตัวอักษร A คือ สารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 2 (EF2), B คือ EF3, C คือ EF4, D คือ EF5, E คือ EF6, F คือ EF7, G คือ EF8, H คือ EF9, N คือ negative control และ P คือ positive control	56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.14	แสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทต่อเชื้อ <i>P. acnes</i> DMST 14916 โดยใช้สารสกัดความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อหลุม: ตัวอักษร A สารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 2 (EF2), B คือ EF3, C คือ EF4, D คือ EF5, E คือ EF6, F คือ EF7, G คือ EF8, H คือ EF9, N คือ negative control และ P คือ positive control.....	56
ภาคผนวกที่ 1	กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด.....	68
ภาคผนวกที่ 2	กราฟมาตรฐานกรดแอสคอบิกสำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS.....	70
ภาคผนวกที่ 3	กราฟมาตรฐานTroloxสำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH .	71
ภาคผนวกที่ 4	กราฟมาตรฐานกรดแอสคอบิกสำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ FRAP.....	73

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

ABTS	2, 2-Azobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
ACB	Ascorbic acid
ANOVA	Analysis of variance
BHA	Tert-butyl-4-hydroxyanisol
BHI	Brain heart infusion
BHT	Butylated hydroxytoluene
DMRT	Duncan's multiple range test
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DPPH	2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide
HPLC	High performance liquid chromatography
IC ₅₀	50% Inhibitory concentration
FBS	Fetal bovine serum
FRAP	Ferric reducing ability power assay
mgAAE/g extract	Milligrams ascorbic acid equivalents per gram extract
mgGAE/g extract	Milligrams gallic acid equivalents per gram extract
mgTE/g extract	Milligrams Trolox equivalents per gram extract
MHA	Mueller Hinton Agar
MIC	Minimal inhibitory concentration
MTT	3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium
N	Negative control
NA	Nutrient agar
P	Positive control
PBS	Phosphate buffer saline
ScH	สารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเฮกเซน
ScE	สารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้น เอทิลอะซิเตท
ScB	สารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้น บิวทานอล
ScW	สารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นน้ำ
EbH	สารสกัดจากเอ็มบริโอของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเฮกเซน
EbE	สารสกัดจากเอ็มบริโอของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้น เอทิลอะซิเตท
EbB	สารสกัดจากเอ็มบริโอของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้น บิวทานอล

EbW	สารสกัดจากเอ็มบริโอของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นน้ำ
EF	สารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตท
OH [•]	Hydroxyl radical
O ^{•2}	Superoxide anion radical
RPMI 1640	Rosewell Park Memorial Institute 1640
TBHQ	Tert-butylhydroquinone
TLC	Thin layer chromatography
TPTZ	2,4,6-Tri-(2-pyridyl)-striaizine
R ²	Regression equation
ROS	Reactive oxygen species
RNS	Reactive nitrogen species
UV	Ultraviolet
XTT	Sodium 3'-[1-[(phenylamino) carbo-nyl]-3, 4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzene-sulfonic acid hydrate



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

สภาวะความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) เป็นสภาวะที่ร่างกายมีการใช้ออกซิเจนมากกว่าสภาวะปกติ (อธิป, 2557) โดยสภาวะความเครียดออกซิเดชันเกิดจากการทำงานที่ไม่สมดุลกันระหว่างสารอนุมูลอิสระ (free radical) และสารที่ทำลายอนุมูลอิสระหรือสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) (Choi *et al.*, 2010) ทำให้มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นภายในเซลล์มากเกินไปจนสมดุล ซึ่งอนุมูลอิสระอาจเกิดได้จาก 2 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยภายนอก (exogenous) เช่น รังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV) สารเคมี และมลภาวะทางอากาศ เป็นต้น และปัจจัยภายใน เช่น กระบวนการเผาผลาญและการหายใจระดับเซลล์ เป็นต้น (อธิป, 2559) ซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้จะเข้าไปทำลายสารชีวโมเลกุล (biomolecule) ต่างๆ ที่อยู่ภายในร่างกาย เช่น โปรตีน ไขมัน และกรดนิวคลีอิก (Yoshihara *et al.*, 2010) มีผลทำให้เกิดโรคต่างๆ ตามมา เช่น โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดและหัวใจ โรคข้อเข่าเสื่อม และโรคเบาหวาน เป็นต้น (Block, 1992; Valko *et al.*, 2007) โดยมีรายงานว่าอนุมูลอิสระสามารถถูกทำลายได้ด้วยสารอาหารบางชนิด เช่น สารอาหารจากผักและผลไม้ ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการช่วยต่อต้านสภาวะเครียดออกซิเดชัน และความเสียหายที่ถูกชักนำให้เกิดขึ้นโดยอนุมูลอิสระ (โอภา และคณะ, 2550) ในปัจจุบันพบว่า สารต้านอนุมูลอิสระจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจำนวนมากสามารถลดสภาวะความเครียดออกซิเดชัน อีกทั้งยังสามารถกระตุ้นการทำงานของเซลล์ได้อีกด้วย

มะขามป้อม มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Phyllanthus emblica* หรือ *Embolica officinalis* เป็นพืชสมุนไพรจัดอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae พบได้ทั่วไปตามป่าเขตร้อนของทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Morton, 1960) ในประเทศไทยสามารถพบได้ตามป่าเบญจพรรณ และป่าแดง (ชนิดา และคณะ, 2548) ซึ่งมะขามป้อมเป็นสมุนไพรที่ได้รับความนิยมอย่างมาก เนื่องจากมีรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Singh *et al.*, 2014) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Kumar *et al.*, 2014) และฤทธิ์ต้านเนื้องอก (Zhang *et al.*, 2004; Rawal *et al.*, 2014) เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่า สารสกัดจากน้ำผลสดของมะขามป้อมสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ (Saeed and Tariq 2007; Srikumar *et al.*, 2007; Saini *et al.*, 2008; Rahman *et al.*, 2009) ทั้งนี้การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของมะขามป้อมส่วนใหญ่นิยมศึกษาในผล ใบ เปลือกลำต้น และกิ่ง ในขณะที่การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเมล็ดมะขามป้อมพบรายงานที่ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Mishra *et al.*, 2015; Mondal *et al.*, 2017) ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (Nadheesha *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2009; Mishra and Mahanta, 2014) และฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (Anbuselvi and Jha, 2015; Dinesh *et al.*, 2017) ซึ่งการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นเป็นการศึกษาสารสกัดจากเมล็ด (seed) ของมะขามป้อมทั้งหมดจึงทำให้ไม่ทราบว่าฤทธิ์ทางชีวภาพอยู่ในส่วนใดของเมล็ดมะขามป้อม แต่มีการรายงานเบื้องต้นเกี่ยวกับสารสกัดหยาบเมทานอลจากเมล็ดของมะขามป้อม โดยธนฤต และคณะ (2559) ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบเมทานอลจากเปลือกเมล็ด (seed coat) และเอ็มบริโอ (embryo) ของมะขามป้อม โดยพบว่า สารสกัดหยาบเมทานอลจากเปลือกเมล็ด และเอ็มบริโอของมะขามป้อมมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (50% Inhibitory

concentration; IC₅₀) เท่ากับ 18.91±0.43 และ 22.13±1.06 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระกับสารมาตรฐานโทร็อกซ์ ซึ่งมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 18.91±0.54 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่า สารสกัดหยาบเมทานอลจากเปลือกเมล็ด และเอ็มบริโอของมะขามป้อม มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้ดีเทียบเท่ากับสารมาตรฐานโทร็อกซ์

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเมล็ดของมะขามป้อมเพิ่มเติม โดยแยกสกัดสารจากเปลือกเมล็ด และเอ็มบริโอของมะขามป้อม และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์การปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชัน และฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย เพื่อที่จะสามารถนำเมล็ดของมะขามป้อมไปใช้ในด้านต่างๆ ให้เกิดประโยชน์มากที่สุด เช่น ผลิตภัณฑ์ชะลอความแก่และลดเลือนริ้วรอย หรือผลิตภัณฑ์ลดรอยและจุดต่างดำจากสิว เป็นต้น นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้แก่เมล็ดของมะขามป้อมเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดอีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อม ได้แก่ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์การปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชัน และฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเมล็ดมะขามป้อมที่แยกเปลือกเมล็ดออกจากเอ็มบริโอ โดยนำสารสกัดหยาบเมทานอลจากเปลือกเมล็ด และเอ็มบริโอของมะขามป้อมซึ่งได้รับความอนุเคราะห์มาจาก ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม มาสกัดด้วยวิธี liquid-liquid extraction (partition) โดยใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ เฮกเซน (hexane) เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) บิวทานอล (butanol) และน้ำ (water) และนำสารสกัดในตัวทำละลายชั้นต่างๆ ที่ได้มาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ ได้แก่ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-ciocalteu ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) วิธี 2,2'-Azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) และวิธี 2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate (DPPH) จากนั้นเลือกสารสกัดในชั้นตัวทำละลายที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดมาศึกษาฤทธิ์การปกป้องเซลล์จากสภาวะความเครียดออกซิเดชันในระดับหลอดทดลอง (*in vitro*) ซึ่งจะเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดสภาวะเครียดออกซิเดชันด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide; H₂O₂) และวิเคราะห์ผลด้วยวิธี 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) โดยจะทดสอบในเซลล์ 2 ชนิด ได้แก่ เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูชนิด L929 (mouse fibroblast cell line; L929) และเซลล์แมคโครฟาจของหนูชนิด RAW 264.7 (murine macrophage cell line; RAW 264.7) สำหรับการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียจะทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus aureus* DMST 5040, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 ด้วยวิธี paper disc diffusion ส่วนการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดสิว *Propionibacterium acnes* DMST 14916 ศึกษาด้วยวิธี agar well diffusion จากนั้นเลือกสารสกัดที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก-

ทั้งหมด ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์การปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชัน และฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ดีที่สุดมาทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี แล้วนำสารสกัดส่วนย่อยมาตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอีกครั้ง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบถึงฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย และความสามารถของสารสกัดจากเมล็ดของมะขามป้อมในการปกป้องเซลล์จากสภาวะความเครียดออกซิเดชัน เพื่อนำสารสกัดหรือองค์ประกอบของสารสกัดไปในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ทางยา และเครื่องสำอางต่อไป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 มะขามป้อม

มะขามป้อม มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Phyllanthus emblica* หรือ *Emblica officinalis* จัดอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae มีชื่อสามัญว่า Emblic myraboian, Malacca tree และ Indian gooseberry ซึ่งประเทศไทยมักจะเรียกชื่อของมะขามป้อมแตกต่างกัน เช่น กั้นโดด (จันทบุรี) กำหวด (ราชบุรี) มั่งลู และสันยาสา (แม่ฮ่องสอน) (สุภาภรณ์, 2548)

มะขามป้อมพบได้ทั่วไปในป่าเขตร้อนของทวีปเอเชียตอนใต้และตะวันออกเฉียงใต้ (Morton, 1960) โดยมะขามป้อมเป็นไม้ยืนต้น มีความสูงประมาณ 10-12 เมตร ใบเป็นใบเดี่ยว ออกเรียงสลับในแนวระนาบเดียวกัน กว้างประมาณ 1-5 มิลลิเมตร และยาวประมาณ 4-5 มิลลิเมตร ปลายใบเป็นติ่งแหลม โคนใบมนหรือเว้าเข้า ขอบและแผ่นใบเรียบ (รูปที่ 2.1ก) กิ่งก้านแข็งและเหนียว (รูปที่ 2.1ข) เปลือกลำต้นมีสีเทาอมน้ำตาล แตกเป็นร่องตามยาว (รูปที่ 2.1ค) ผลเป็นรูปทรงกลม ขนาด 1.3-2 เซนติเมตร ผิวเรียบ มีสีเขียวอมเหลือง (รูปที่ 2.1ง) ดอกออกเป็นช่อกระจุกเล็กๆ สีเหลืองอ่อนออกเขียว กลีบดอกมี 5-6 กลีบ มีเกสรเพศสั้นๆ 3-5 อัน ก้านดอกสั้น (รูปที่ 2.1จ) เมล็ดมีลักษณะเป็นรูปวงรี เปลือกหุ้มเมล็ดแข็ง (รูปที่ 2.1ฉ) (มูลนิธิแผนไทยพัฒนา, 2549)

มะขามป้อม เป็นสมุนไพรที่มีการใช้กันมายาวนาน และมีประโยชน์หลากหลายด้าน ทั้งในอุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอาง ซึ่งมีตำราสมุนไพรรายงานถึงสรรพคุณจากส่วนต่างๆ ของมะขามป้อมที่นำมาใช้ในการรักษาโรคต่างๆ เช่น แก้เจ็บตาอักเสบ โรคหนองใน ผิวหนังติดเชื้อ (กาญจนา และคณะ, 2544; ศรีสุตา และคณะ, 2559) โดยรากนำมาต้มกินเป็นยาลดไข้ และพอกเลือด ผลใช้ได้ทั้งสดและแห้ง เป็นยาสมานแผล ลดไข้ บำรุงหัวใจ แก้ไอ ละลายเสมหะ แก้หวัด แก้เจ็บคอ ขับปัสสาวะ และเพิ่มระบบภูมิคุ้มกัน กิ่งสามารถใช้เป็นยาสมานแผล และรักษาแผลในช่องปาก รวมทั้งโรคผิวหนังได้ (Iamsaard *et al.*, 2014) ส่วนเปลือกใช้เป็นยาสมานแผลเช่นเดียวกับกิ่ง ส่วนใบมักนำไปต้มเพื่อใช้เป็นยาลดไข้ ดอกมีกลิ่นหอมคล้ายกลิ่นมะนาว ใช้เป็นยาระบาย

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าน้ำผลสดของมะขามป้อมมีปริมาณวิตามินซีสูง (อุดมลักษณ์ และคณะ, 2553) ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และยังสามารถลดสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ ได้ เช่น โรคตับแข็ง โรคอัลไซเมอร์ โรคหลอดเลือดแข็งตัว และโรคเบาหวานได้ (Verma and Gupta, 2004; Namiesnik *et al.*, 2013) และพบว่า สารสกัดจากมะขามป้อมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีเทียบเท่ากับสารมาตรฐานทางการค้า (วันดี, 2543) จากการศึกษาสารสำคัญในมะขามป้อมพบว่า มะขามป้อมเป็นแหล่งของสารโพลีฟีนอล ฟลาโวนอยด์ แทนนิน และสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ซึ่งสารเหล่านี้มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระส่งผลให้อาจจะลดสถานะเครียดออกซิเดชันในเซลล์ (She *et al.*, 2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 ลักษณะของใบ (ก) กิ่ง (ข) ลำต้น (ค) ผล (ง) ดอก (จ) และเมล็ด (ฉ) ของมะขามป้อม (ที่มา: ดัดแปลงจาก <https://innovareacademics.in/journals/index.php/ijas/article/view/>)

2.2 การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (free radical) คือ อิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลซึ่งจะแสดงด้วยจุดในตำแหน่งข้างบนของสัญลักษณ์ทางเคมี เช่น อนุมูลไฮดรอกซิล (OH^{\bullet}) โดยเฉพาะอนุมูลที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะไวต่อการเกิดปฏิกิริยามากกว่าที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เนื่องจากอิเล็กตรอนเดี่ยวในออร์บิทัลวงนอกสุดจะไม่เสถียร และพยายามจะจับคู่กับอิเล็กตรอนเดี่ยวอื่นๆ (เนตรนภา และเฉลิม, 2557) ดังนั้นอนุมูลอิสระจึงมีคุณสมบัติเฉพาะไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมีที่มีผลต่อการทำลายโมเลกุลอื่นๆ ต่อเนื่องไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ และสามารถคงอยู่ในสภาพอนุมูลได้นาน มีการบัญญัติศัพท์ขึ้นมาให้ครอบคลุมทั้งอนุมูลอิสระและสารดังกล่าวว่าสารความไวสูง (reactive species) ในสิ่งมีชีวิตเกิดจากกระบวนการเผาผลาญของเซลล์โดยการใช้ออกซิเจนเป็นตัวเร่งเรียกว่าปฏิกิริยาออกซิเดชัน ตัวอย่างอนุมูลอิสระที่มีความสำคัญในทางชีวภาพ ได้แก่ อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ($\text{O}_2^{\bullet-}$) และ OH^{\bullet} เป็นอนุมูลที่พบในเซลล์มากกว่าอนุมูลอื่นๆ ส่วนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) อนุมูลเหล่านี้มีบทบาทในปฏิกิริยารีดอกซ์ที่เกิดขึ้นในเซลล์เป็นอย่างมากและมีความเป็นพิษสูง ถ้ามีปริมาณมากในเซลล์จะเป็นอันตรายได้ โดยมีผลทำลายดีเอ็นเอ เยื่อหุ้มเซลล์ และเซลล์อื่นๆ ในระยะสั้นอนุมูลอิสระเหล่านี้มีผลต่อการอักเสบและการทำลายเนื้อเยื่อ ในระยะยาวอาจมีผลต่อความเสื่อมหรือการแก่ชราของเซลล์ ส่วนอนุมูลอิสระภายนอกได้รับจากแสงแดด ได้แก่ รังสี UV มลพิษในอากาศ และสารเคมีในอาหาร เป็นต้น (โอภา และคณะ, 2550)

สารต้านอนุมูลอิสระเป็นคำศัพท์ที่แปลมาจากคำว่า antiradical ปัจจุบันคำศัพท์นี้ได้ถูกบัญญัติใหม่เป็นสารกำจัดอนุมูลอิสระ (โอภา และคณะ, 2549) เพื่อให้ถูกต้องตามการทำงานอาจใช้คำว่าสารแอนติออกซิแดนซ์ (antioxidant) หรือสารต้านอนุมูลอิสระที่มีความสามารถในการทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยตรง เพื่อยับยั้งอนุมูลอิสระให้หมดไป โดยสารต้านอนุมูลอิสระ แบ่งได้เป็น 2 ประเภท

ตามแหล่งที่มา ได้แก่ สารต้านอนุมูลอิสระแบบธรรมชาติ (natural antioxidant) พบในผักและผลไม้ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก สารประกอบฟลาโวนอยด์ และสารต้านอนุมูลอิสระแบบสังเคราะห์ (synthesis antioxidant) เช่น tert-butyl-hydroxyltoluene (BHT), tert-butyl-4-hydroxyanisol (BHA) และ tert-butylhydroquinone (TBHQ) เป็นต้น (โสภา และคณะ, 2550)

ดังนั้นจึงมีวิธีการทดสอบหาสารที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ เป็นการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่าง ซึ่งวิธีที่นิยม ได้แก่ การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระวิธี 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) และการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ Ferric reducing antioxidant power (FRAP) ซึ่งวิธีการดังกล่าวจะมีการสร้างอนุมูลอิสระที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน และวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งหรือกำจัดอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างที่สนใจโดยวัดปริมาณอนุมูลอิสระที่ลดลงจากการดูดกลืนแสง ซึ่งวัดจากเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยมีวิธีการและหลักการวิเคราะห์ดังนี้

2.2.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

ABTS เป็นวิธีการวัดความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} เป็นสารสังเคราะห์ที่มีสีเขียวปนน้ำเงินสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เนื่องจากสีของ ABTS^{•+} ปกติจะมีค่าการดูดกลืนแสงสูง จึงต้องทำการเจือจาง ABTS^{•+} ด้วยน้ำ จากนั้นนำ ABTS^{•+} ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่ละลายน้ำ ซึ่งจะทำให้สีจางลงและตั้งทิ้งไว้ เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาจึงสามารถหาความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้ ข้อดีของวิธีการนี้คือ ABTS^{•+} ละลายได้ดีในน้ำ และตัวทำละลายอินทรีย์ จึงทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว และทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH กว้าง (พวงศักดิ์ และสุรศักดิ์, 2555)

2.2.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

DPPH เป็นการทดสอบโดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัว และมีสีม่วงสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 515-517 นาโนเมตร เมื่อ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่ละลายด้วยแอลกอฮอล์ จะทำให้สารตัวอย่างจะเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนจากสีม่วงกลายเป็นสีเหลือง ซึ่งก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงต้องบ่มที่มืด เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาทำให้สามารถหาความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้ (บุหรัน, 2556)

2.2.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

วิธีการนี้อาศัยหลักของสารต้านอนุมูลอิสระสามารถให้อิเล็กตรอนกับสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe(III)-(TPTZ)_2]^{3+}$ ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปเป็น $[Fe(II)-(TPTZ)_2]^{2+}$ ซึ่ง $[Fe(II)-(TPTZ)_2]^{2+}$ มีความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ดังนั้นปริมาณของ $[Fe(II)-(TPTZ)_2]^{2+}$ ที่เกิดขึ้นสามารถแปรผลออกมาเป็นความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในรูป FRAP value ซึ่งสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe(III)-(TPTZ)_2]^{3+}$ ซึ่งมีส่วนผสมจากการนำสารละลาย TPTZ (2,4,6-tri (2-pyridyl)-striaizine) ในกรดไฮโดรคลอริกมาทำปฏิกิริยากับสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ และสารละลายเฟอร์ริกไตรคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต จากนั้นทำการรีดิวซ์เฟอร์ริกโดยการเติมสารตัวอย่างและบ่มที่มืด ซึ่งวิธีการนี้เป็นวิธีที่ง่าย ประหยัดเวลา และสามารถซ้ำแล้วให้ผลเหมือนเดิม

(ปริญญานันท์, 2549) โดยรายงานวิจัยที่เกี่ยวกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากเมล็ดมะขามป้อม มีดังนี้

Nadheesha *et al.* (2007) ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของเมล็ด (seed) และผล (fruit) มะขามป้อม โดยสกัดด้วยตัวทำละลาย 5 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน ไตคลอโรฟอร์ม เอทิลอะซิเตท และเอทานอล และน้ำ จากนั้นศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี peroxide value liver shark พบว่า สารสกัดจากเมล็ดในตัวทำละลายชั้นเฮกเซน ไตคลอโรฟอร์ม เอทิลอะซิเตท เอทานอล และน้ำ มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ peroxide values เท่ากับ 331.37, 424.78, 499.56, 497.19 และ 528.24 milliequivalents/kilogram (meq/kg) เมื่อเปรียบเทียบกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระระหว่างผลกับเมล็ดพบว่า สารสกัดจากเมล็ดมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าผล นอกจากนี้ยังพบว่า เมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงเทียบเท่ากับสารมาตรฐาน butylated hydroxyl toluene (BHT)

Sharma *et al.* (2009) ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบบวบ (*Trichosanthes dioica*) ฝักมะรุม (*Moringa oleifera*) เมล็ดมะขามป้อม (*Emblca officinalis*) และรากของบันยัน (*Ficus bengalensis*) สกัดด้วยวิธี Soxhlet extraction โดยใช้ น้ำเป็นตัวทำละลาย ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP เมื่อเปรียบเทียบกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระกับสารมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4$) พบว่า สารสกัดหยาบชั้นน้ำจากใบบวบ ฝักมะรุม เมล็ดมะขามป้อม และรากของบันยันมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 65.00 ± 1.53 , 51.00 ± 2.08 , 85.00 ± 5.00 และ 23.00 ± 1.73 มิลลิกรัมเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดทั้ง 4 ชนิดพบว่า สารสกัดหยาบชั้นน้ำของเมล็ดมะขามป้อมมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด รองลงมา คือ ใบบวบ ตามด้วยฝักมะรุม และรากของบันยันมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุด

Mishra and Mahanta (2014) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผงแห้งจากผล (fruit) เปลือกเมล็ด (seed coat) และเมล็ด (seed) ของมะขามป้อม ทำการอบแห้งและบดให้เป็นผงแห้ง จากนั้นวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เมื่อใช้ผงแห้งปริมาณ 1 มิลลิกรัมพบว่า ผงแห้งจากผลของมะขามป้อมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด เท่ากับ 1.88 ± 0.0 รองลงมาคือ ผงแห้งจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 1.85 ± 0.2 และผงแห้งจากเมล็ดของมะขามป้อมมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH น้อยที่สุด เท่ากับ 0.74 ± 0.1 ตามลำดับ

Nambiar *et al.* (2015) ซึ่งศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผล (whole fruit) เนื้อผล (pulp) และเมล็ด (seed) ของมะขามป้อม (*Emblca officinalis*) ทำการด้วยวิธีการหมัก (maceration) โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย จะได้สารสกัดหยาบ 3 ชนิด ได้แก่ สารสกัดหยาบเมทานอลของผล เนื้อผล และเมล็ดของมะขามป้อม จากนั้นวัดปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-ciocalteu พบว่า สารสกัดหยาบเมทานอลจากเนื้อผลของมะขามป้อมมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด เท่ากับ 10.24 ± 0.01 มิลลิกรัมแกลติกต่อกรัมสารสกัด รองลงมาคือ สารสกัดหยาบเมทานอลจากเมล็ดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 6.50 ± 0.10 มิลลิกรัมแกลติกต่อกรัมสารสกัด และผลของมะขามป้อมมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดน้อยที่สุด เท่ากับ 6.00 ± 0.01 มิลลิกรัมแกลติกต่อกรัมสารสกัด และเมื่อศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่า สารสกัดหยาบเมทานอลจากเนื้อผลของมะขามป้อมมีฤทธิ์การต้าน

อนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด ซึ่งมีค่า IC_{50} ต่ำที่สุดเท่ากับ 6.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ สารสกัดหยาบเมทานอลจากผลของมะขามป้อม มีค่า IC_{50} เท่ากับ 11.20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ เมล็ดของมะขามป้อม มีค่า IC_{50} เท่ากับ 13.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Mishra *et al.* (2015) ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกเมล็ด (seed coat) ของมะขามป้อม โดยสกัดสารจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมด้วยวิธีการหมักด้วยเอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ และสกัดด้วยวิธี liquid-liquid extraction ด้วยตัวทำละลายทั้งหมด 3 ชนิด คือ เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เมื่อใช้สารสกัด ปริมาณ 1 มิลลิกรัมพบว่า สารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามป้อมในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ดี ที่สุด ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 61.07 ± 1.63 รองลงมาคือ สารสกัดจากเปลือกเมล็ด มะขามป้อมในตัวทำละลายบิวทานอล มีเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 12.99 ± 2.25 เปอร์เซ็นต์ และน้ำ มีเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุด เท่ากับ 0.098 ± 0.98 เปอร์เซ็นต์ และ ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วย 2 วิธี ได้แก่ วิธี Folin-ciocalteu และ High performance liquid chromatography (HPLC) โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน เมื่อทดสอบ ด้วยวิธี Folin-ciocalteu พบว่า สารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายเอทิลอะซิ เตทมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด เท่ากับ 853.65 ± 1.71 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมสาร สกัด รองลงมาคือ สารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายบิวทานอล มีปริมาณ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 411.50 ± 2.11 และน้ำมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด น้อยที่สุด เท่ากับ 104.61 ± 2.20 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมสารสกัด และเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC พบว่า สารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายบิวทานอล มีปริมาณสารประกอบฟี นอลิกทั้งหมดสูงที่สุด ซึ่งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 156.34 ± 0.91 มิลลิกรัมแกล ลิกต่อกรัมสารสกัด รองลงมาคือ สารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามป้อมในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 64.80 ± 0.81 และน้ำมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ทั้งหมด เท่ากับ 7.34 ± 1.04 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมสารสกัด

Mondal *et al.* (2017) ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผล (fruit) เปลือก เมล็ด (seed coat) และเมล็ด (seed) ของมะขามป้อมซึ่งสกัดด้วยวิธีการหมักด้วยตัวเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่า ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากเมล็ดมะขามป้อมมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระดีที่สกัดด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ สารสกัดหยาบเอทานอลจากเปลือกเมล็ดของ มะขามป้อมมีค่า IC_{50} เท่ากับ 98 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดหยาบเอทานอลจากผลของ มะขามป้อม มีค่า IC_{50} เท่ากับ 144 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ธนภุต และคณะ (2559) ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเมทานอลจาก เปลือกเมล็ด (seed coat) และเอ็มบริโอ (embryo) ของมะขามป้อม ซึ่งสกัดด้วยวิธีการหมักด้วย เมทานอล จากนั้นวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เมื่อเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นที่ สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) พบว่า สารสกัดหยาบเมทานอลจากเปลือกเมล็ด ของมะขามป้อมมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH (IC_{50} เท่ากับ 18.91 ± 0.43 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ดีกว่าเอ็มบริโอของมะขามป้อม (IC_{50} เท่ากับ 22.13 ± 1.06 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เมื่อเปรียบเทียบ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระกับสารมาตรฐานโทร็อกซ์ (IC_{50} เท่ากับ 18.91 ± 0.54 ไมโครกรัมต่อ

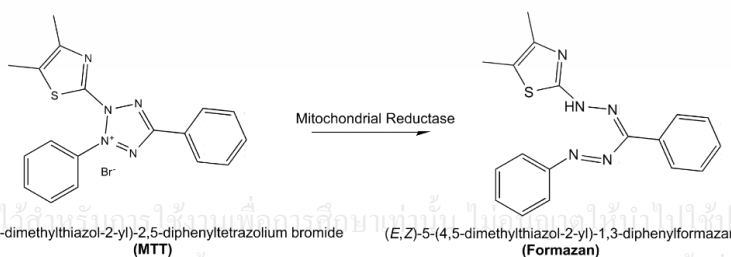
มิลลิลิตร) พบว่า สารสกัดหยาบเมทานอลจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อมมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับสารมาตรฐานโทรล็อกซ์

2.3 การศึกษาฤทธิ์การปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชัน

สภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) เป็นภาวะที่ร่างกายมีการใช้ออกซิเจน หรือไนโตรเจนมากกว่าปกติ เป็นสาเหตุให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้น ซึ่งอนุมูลอิสระมี 2 ชนิด คือ อนุมูลอิสระของออกซิเจน เรียกว่า reactive oxygen species (ROS) และอนุมูลอิสระที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ เรียกว่า reactive nitrogen species (RNS) โดยอนุมูลอิสระเหล่านี้จะไปทำลายสารชีวโมเลกุลต่างๆ ที่อยู่ในร่างกายแล้วชักนำให้เกิดพยาธิสภาพต่างๆ ขึ้น เช่น การชราภาพและการแตกสลายของเซลล์ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้การเกิดโรคต่างๆ ตามมา เช่น โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดและหัวใจ โรคข้อเข่าเสื่อม โรคเบาหวาน และโรคอัลไซเมอร์ เป็นต้น

ในปัจจุบันพบว่า อนุมูลอิสระเหล่านี้สามารถถูกทำลายได้ด้วยสารบางอย่างภายในร่างกาย หรือได้รับจากสารอาหารที่เรียกว่า สารต้านอนุมูลอิสระ ด้วยเหตุนี้การเรียนรู้เกี่ยวกับสารอาหารที่เกี่ยวข้องกับอนุมูลอิสระอาจจะเป็นปัจจัยสำคัญในการเพิ่มหรือลดสภาวะเครียดออกซิเดชันในร่างกายได้ ดังนั้นการควบคุมสมดุลภาวะโภชนาการในร่างกายจึงอาจเป็นแนวทางหนึ่งในการลดหรือป้องกันสาเหตุที่นำไปสู่โรค (อธิป, 2557)

วิธีที่นิยมใช้ในการศึกษาสภาวะเครียดออกซิเดชันเบื้องต้น คือ วิธีการวัดการมีชีวิตรอดของเซลล์ ด้วยกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ มีหลักการ คือ การรีดักชันของสีเทตระโซเลียม (tetrazolium dye reduction) ซึ่งสีที่นิยมใช้ทดสอบ คือ 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) เป็นสารสีเหลืองละลายน้ำได้ และถูกรีดิวซ์โดยการทำงานของเอนไซม์ซัคซิเนส ดีไฮโดรจีเนส (succinate dehydrogenase) ในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิตได้เป็นผลึกฟอร์มาซาน (formazan) (รูปที่ 2.2) ที่มีสีม่วงไม่ละลายน้ำและติดอยู่ภายในเซลล์ ปริมาณผลึกฟอร์มาซานถูกวิเคราะห์โดยการดูดกลืนแสงหลังจากที่ละลายด้วยตัวทำละลายได้เป็นสารละลายฟอร์มาซานที่มีสีน้ำเงินม่วง ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายฟอร์มาซานจะขึ้นอยู่กับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต เซลล์แต่ละชนิดจะมีการตอบสนองต่อวิธี MTT ได้แตกต่างกัน นอกจากนี้วิธี MTT ยังถูกนำไปใช้ในการทดสอบการเพิ่มจำนวนเซลล์อีกด้วย ข้อดีของการทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์โดยวิธี MTT คือ สามารถวิเคราะห์สารทดสอบได้ครั้งละหลายตัวอย่างในคราวเดียวกัน ในปัจจุบันมีเกลือเทตระโซเลียมที่นิยมใช้อีกตัวหนึ่งคือ 2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-Carboxanilide (XTT) ให้ฟอร์มาซานที่ละลายน้ำได้ แต่มีราคาสูงกว่า MTT (กล่าวขวัญ, 2556)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับอาจารย์ใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.2 การเปลี่ยนเทตระโซเลียมเป็นผลึกฟอร์มาซาน

(ที่มา: https://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay)

โดยปกติตามธรรมชาติอนุมูลไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นผลพลอยได้ที่ได้จากกระบวนการเผาผลาญออกซิเจนภายในร่างกาย (Jamshidzadeh and Mehrabadi, 2010; Adetutu *et al.*, 2011) ซึ่งอนุมูลไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เหล่านี้จะแพร่ผ่านเข้าทางเยื่อหุ้มเซลล์อย่างรวดเร็วทำให้เกิดปฏิกิริยา hydroxyl radical มีฤทธิ์ในการทำลายสารชีวโมเลกุลต่างๆ เช่น ดีเอ็นเอ โปรตีน และไขมัน (Heo *et al.*, 2008) ซึ่งในปัจจุบันการศึกษาส่วนใหญ่มักใช้สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นตัวเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดสภาวะเครียดออกซิเดชัน ดังเช่นงานวิจัยของ Tian *et al.* (2015) ศึกษาฤทธิ์การปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชันของสารสกัดจากรากโกโบ (*Arctium lappa*) ซึ่งทำการสกัดด้วยวิธีการคลื่นเสียง (sonication) ซึ่งใช้อัตราส่วน : น้ำ ในอัตราส่วน 55 : 45 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวทำลาย จากนั้นทำการศึกษาฤทธิ์การปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชันในเซลล์ประสาทของมนุษย์ชนิด SH-SY5Y (human neuroblastoma SH-SY5Y cell line) วัดเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT เมื่อทำการเหนี่ยวนำให้เซลล์ประสาทของมนุษย์ชนิด SH-SY5Y เกิดสภาวะเครียดออกซิเดชันด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ พบว่า เซลล์ประสาทของมนุษย์ชนิด SH-SY5Y มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 62.01 ± 3.50 เปอร์เซ็นต์ และจากการบ่มเซลล์ระหว่างสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ กับสารสกัดหยาบเอทานอลของรากโกโบ ที่ความเข้มข้น 20, 40, และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า เซลล์ประสาทของมนุษย์ชนิด SH-SY5Y มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเพิ่มขึ้นเท่ากับ 68.11 ± 2.16 , 76.35 ± 1.51 และ 85.17 ± 2.52 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Zhou *et al.* (2016) ศึกษาฤทธิ์การปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชันของสารรูทีน (rutin) ซึ่งศึกษาเซลล์เลนส์ตาของมนุษย์ชนิด HLE (human lens epithelial cell: HLE) วัดเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT เมื่อเหนี่ยวนำให้เซลล์เลนส์ตาของมนุษย์ชนิด HLE เกิดสภาวะเครียดออกซิเดชันด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 100, 200, 400 และ 800 ไมโครโมลาร์ บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่า เซลล์เลนส์ตาของมนุษย์ชนิด HLE มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ เท่ากับ 62.5, 55.4, 37.7 และ 22.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อทำการบ่มเซลล์ร่วมกันระหว่างสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ กับสารรูทีน ความเข้มข้น 25 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่า เซลล์เลนส์ตาของมนุษย์ชนิด HLE มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์เพิ่มขึ้น เท่ากับ 67.3 ± 5.4 และ 84.9 ± 4.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Luo *et al.* (2018) ศึกษาฤทธิ์การปกป้องเซลล์ปอดของมนุษย์ชนิด MRC-5 (medical research council cell strain 5; MRC-5) จากสภาวะเครียดออกซิเดชันของสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบผักกาด (*Raphanus sativus*) โดยเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดสภาวะเครียดออกซิเดชันด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ส่งผลให้เซลล์มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 64.13 ± 2.12 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อบ่มเซลล์ระหว่างสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กับสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 2 (เนื่องจากมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด) ด้วยความเข้มข้น 12.5, 25 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่บ่มด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ พบว่า สารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 2 ความเข้มข้น 12.5, 25 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ช่วยส่งเสริมให้เซลล์มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดเพิ่มมากขึ้น มีค่าเท่ากับ 72.84 ± 2.19 , 77.49 ± 1.89 และ 82.31 ± 2.22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

รายงานการวิจัยเกี่ยวกับการศึกษาฤทธิ์การปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชันของสารสกัดจากเมล็ดมะขามป้อมนั้นยังไม่พบว่ามีรายงาน มีเพียงการรายงานเกี่ยวกับการศึกษาฤทธิ์การปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชันของสารสกัดจากผล (fruit) ของมะขามป้อม ดังเช่นรายงานของ Wongpradabchai *et al.* (2013) ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดน้ำของผลสดมะขามป้อมซึ่งอาจปกป้องการตายของเซลล์เยื่อหลอดเลือดชนิด EA.hy926 (human umbilical vein endothelial cells; EA.hy926) จากการเหนี่ยวนำด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ใช้น้ำของผลสดและระเหยน้ำออกด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เมื่อชักนำเซลล์ให้เกิดสภาวะเครียดออกซิเดชันด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 100-10,000 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดด้วยวิธี MTT พบว่า เซลล์ที่เหนี่ยวนำด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์ ส่งผลให้เซลล์มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 50.65 ± 0.94 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการบ่มเซลล์ร่วมกับสารสกัดน้ำของผลสดมะขามป้อมระหว่างความเข้มข้น 0.1, 1, 5, 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมงพบว่า สารสกัดน้ำของผลสดมะขามป้อมมีประสิทธิภาพช่วยให้เซลล์มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเพิ่มขึ้น จากเดิมประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ เป็น 55, 58, 60, 65, 70, 75, 80, 85 และ 85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Rugina *et al.* (2015) สกัดสารแอนโทไซยานิน (anthocyanin) ซึ่งเป็นสารจำพวกโพลีฟีนอลจาก *Aronia melanocarpa* ศึกษาฤทธิ์การปกป้องเซลล์ตับอ่อนของหนูชนิด β TC3 (murine insulinoma β TC3 cell line) จากสภาวะเครียดออกซิเดชันจากการเหนี่ยวนำด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยพบว่า เมื่อเหนี่ยวนำด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 70 ไมโครโมลาร์พบว่า เซลล์ตับอ่อนของหนูชนิด β TC3 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเป็น 45 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการบ่มสารแอนโทไซยานินที่ความเข้มข้น 1, 5 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรร่วมกับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์พบว่า เซลล์มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเพิ่มขึ้นจาก 45 เปอร์เซ็นต์ เป็น 70, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Shokoohinia *et al.* (2017) ได้สกัดสารเคอควิทิน (quercetin) ซึ่งเป็นสารประเภทฟลาโวนอยด์จาก *Echinophora cinerea* มาศึกษาฤทธิ์การปกป้องเซลล์เนื้อเยื่อหมวกไตของหนูชนิด PC12 (rat adrenal medulla; PC12) จากสภาวะเครียดออกซิเดชันจากการเหนี่ยวนำด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยพบว่า เมื่อเหนี่ยวนำด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 118 ไมโครโมลาร์พบว่า เซลล์เนื้อเยื่อหมวกไตของหนูชนิด PC12 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 45.94 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการบ่มสารเคอควิทินที่ความเข้มข้น 3, 6, 12 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์พบว่า เซลล์มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเพิ่มขึ้นจากเดิม 45.94 เปอร์เซ็นต์ เป็น 50.12 ± 3.52 , 60.38 ± 4.08 , 70.12 ± 3.58 และ 75.21 ± 3.64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Chansriniyom *et al.* (2018) ศึกษาฤทธิ์การปกป้องเซลล์เยื่อผิวมนุษย์ชนิด ECV304 (human endothelial cell; ECV304) จากสภาวะเครียดออกซิเดชันของสารสกัดหยาดเอทานอลจากผล (fruit) ของมะขามป้อมพบว่า เมื่อเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดสภาวะเครียดออกซิเดชันด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที เซลล์มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อศึกษาฤทธิ์การปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชันด้วยการผสมระหว่างสารสกัดหยาดเอทานอลของผลมะขามป้อมความเข้มข้น 20 และ 50

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ และวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT พบว่า เซลล์มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตประมาณ 85 และ 90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

2.4 ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

วิธี paper disc diffusion เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์อย่างแพร่หลายมากที่สุด เนื่องจากมีความสะดวก ประหยัด และใช้เวลาน้อยกว่าวิธีอื่นๆ โดยสามารถสังเกตการปนเปื้อนของเชื้ออื่นได้ง่าย วิธีนี้เป็นทดสอบในเชิงคุณภาพ สามารถบอกผลได้ว่าเชื้อมีความไวต่อสารที่ใช้ในการทดสอบหรือไม่ และวิธีนี้ทำให้ไม่ทราบค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (minimal inhibitory concentration; MIC) ได้ ซึ่งไม่เหมาะสมกับการทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการเจริญเติบโตช้า โดยมีหลักการคือ การใช้สารสกัดจากสมุนไพรหรือสารต้านจุลชีพหยดลงบนแผ่นดิสก์ (paper disc) จากนั้นจะอาศัยหลักการแพร่ของสารออกจากกระดาชกรองเป็นลักษณะรูปกลมในทุกทิศทางบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้กวาด (spread) หรือป้าย (swab) เชื้อในปริมาณและจำนวนที่เหมาะสม หลังจากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงให้เชื้อเจริญเติบโต และตรวจผลโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (inhibition zone) ที่เกิดขึ้นรอบๆ แผ่นกระดาช ค่าที่ได้จะมีหน่วยเป็นมิลลิเมตร วิธีการนี้โดยทั่วไปมักทดสอบกับสารสกัดจากพืชสมุนไพร หรือสารต้านจุลชีพเพียง 1 ความเข้มข้นเท่านั้น และเป็นการตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้น (ประสาทรพ คณะ, 2551)

การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเมล็ดมะขามป้อม มีดังนี้ จากงานวิจัยของ Priya *et al.* (2012) ที่ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเมล็ด (seed) ของมะขามป้อม ซึ่งสกัดด้วยวิธีการหมักด้วยเมทานอล จากนั้นศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ *Streptococcus aureus* ด้วยวิธี agar well diffusion โดยใช้สารสกัดหยาบเมทานอลที่มีความเข้มข้น 50, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่า สารสกัดหยาบเมทานอลของเมล็ดมะขามที่ความเข้มข้น 50, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ซึ่งวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสเท่ากับ 12.5, 15.0, 18.5 และ 21.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ นอกจากนี้แล้วสารสกัดหยาบเมทานอลของเมล็ดมะขามที่ความเข้มข้น 50, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยังมีผลต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Escherichia coli* (เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสเท่ากับ 12, 17, 18 และ 19 มิลลิเมตร ตามลำดับ), *Pseudomonas aeruginosa* (เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสเท่ากับ 14, 15, 16 และ 17 มิลลิเมตร ตามลำดับ), *Klebsiella pneumonia* (เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสเท่ากับ 13.5, 16.0, 17.0 และ 19.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ) และ *Enterococcus sp.* (เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสเท่ากับ 11, 16, 18 และ 20 มิลลิเมตร ตามลำดับ) ได้

Anbuselvi and Jha (2015) ซึ่งศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดของเมล็ด (seed) มะขามป้อม ซึ่งสกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ เบนซีน เมทานอล เอทิลอะซิเตท และคลอโรฟอร์ม โดยทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียใช้วิธี paper disc diffusion เมื่อใช้สารสกัดจากเมล็ดมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นต่างๆ ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่า สารสกัดจากเมล็ดมะขามป้อมในตัวทำละลายทุกชั้นมีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ทั้งหมด โดยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสของตัวทำ

ละลายชั้นเบนซีน เมทานอล เอทิลอะซิเตท และคลอโรฟอร์ม เท่ากับ 3.2, 17.0, 7.0 และ 7.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ และยังพบว่าสารสกัดจากเมล็ดมะขามป้อมมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา เช่น *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigates* และ *Candida tropicalis* ซึ่งก่อโรคในมนุษย์และสัตว์ได้อีกด้วย

Dinesh *et al.* (2017) ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเมล็ด (seed) ของมะขามป้อม (*Phyllanthus emblica*) ที่สกัดสารด้วยตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ จากนั้นสกัดต่อด้วยตัวทำละลายเมทานอลโดยใช้วิธี immersion ทำการเคลือบ (capped) ด้วย Palladium nanoparticle (PdNs) ใช้วิธี convention ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดของมะขามป้อมต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *S. aureus* และ *Proteus mirabilis* ด้วยวิธี agar well diffusion โดยใช้ความเข้มข้น 50, 75 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่า เมล็ดมะขามป้อมที่ไม่ได้เคลือบ PdNs มีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ *P. aeruginosa* (วัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสเท่ากับ 11.6 ± 0.70 , 12.3 ± 1.13 และ 13.4 ± 0.97 มิลลิเมตร ตามลำดับ) เชื้อ *B. subtilis* (วัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสเท่ากับ 10.4 ± 1.35 , 12.5 ± 0.41 และ 14.9 ± 1.46 มิลลิเมตร ตามลำดับ), *S. aureus* (วัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสเท่ากับ 12.4 ± 1.40 , 13.5 ± 0.96 และ 14.2 ± 1.10 มิลลิเมตร ตามลำดับ) และ *P. mirabilis* (วัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสเท่ากับ 11.2 ± 1.10 , 11.6 ± 0.90 และ 12.1 ± 0.91 มิลลิเมตร ตามลำดับ) และวิธี Minimal Inhibitory Concentration (MIC) เมล็ดมะขามป้อมที่ไม่ได้เคลือบ PdNs มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *S. aureus* และ *P. mirabilis* มี MIC เท่ากับ 47 ± 5 , 29 ± 7 , 33 ± 8 และ 49 ± 7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนเมล็ดของมะขามป้อมที่เคลือบ PdNs มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *S. aureus* และ *P. mirabilis* มีค่า MIC เท่ากับ 43 ± 2 , 27 ± 1 , 35 ± 1 และ 51 ± 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเมล็ดพืชซึ่งอยู่ในสกุลเดียวกันกับมะขามป้อม และสารสกัดจากเมล็ดของพืชชนิดอื่น เช่น การศึกษาของ Mathur *et al.* (2012) ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากพืชลูกใต้ใบ (*Phyllanthus niruri*) นำใบ เมล็ด ลำต้น และรากของลูกใต้ใบมาทำการสกัดด้วยสารละลายเมทานอล จากนั้นทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี agar well diffusion ต่อเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Enterobacter cloacae*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Escherichia coli* และ *Streptococcus viridians* พบว่า สารสกัดหยาบเมทานอลของเมล็ดลูกใต้ใบ มีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *E. cloacae*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* และ *S. viridians* ซึ่งวัดค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสเท่ากับ 10 ± 0.62 , 16 ± 1.01 , 14 ± 0.87 , 12 ± 0.61 และ 13 ± 0.83 มิลลิเมตร ตามลำดับ และงานวิจัยของ Shanmugapriya *et al.* (2011) ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*, *B. subtilis* และ *S. aureus* ของสารสกัดจากเมล็ดตะมุตะมิ ทำการสกัดด้วยวิธี liquid-liquid extraction ด้วยตัวทำละลายทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ เอทานอล อะซิโตน เอทิลอะซิเตท และน้ำ จากนั้นทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี agar well diffusion พบว่า มีเพียงสารสกัดจากเมล็ดตะมุตะมิในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทที่มีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และ *B. subtilis* ซึ่งวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสเท่ากับ 14 และ 14 มิลลิเมตร ตามลำดับ

งานวิจัยที่ผ่านมายังไม่พบการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดมะขามป้อมในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว *P. acnes* มีเพียงการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวของสารสกัดจากเมล็ดของพืชชนิดอื่น เช่น งานวิจัยของ Chaudhary *et al.* (2013) ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* ของสารสกัดจากเมล็ดฝิ่น (*Papaver somniferum*) ซึ่งสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล เอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ และน้ำ และศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* ด้วยวิธี agar well diffusion โดยใช้สารสกัดความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อหลุมพบว่า สารสกัดหยาบจากเมล็ดฝิ่นในตัวทำละลายเอทานอล เอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ และน้ำมีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* ด้วยค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสเท่ากับ 14 ± 1.80 , 13 ± 1.70 และ 13 ± 1.04 มิลลิเมตร ตามลำดับ

Tseng *et al.* (2014) ศึกษาฤทธิ์การเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว *P. acnes* ของสารสกัดจากเมล็ดลำไย (*Dimocarpus longan*) ซึ่งสกัดด้วยตัวทำละลายทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ จากนั้นนำสารสกัดในตัวทำละลายชั้นต่างๆ โดยใช้ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อดิสก์ มาศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion พบว่า มีเพียงสารสกัดจากเมล็ดของลำไยในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* ซึ่งวัดค่าเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสเท่ากับ 13 มิลลิเมตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

- 3.1.1 กระดาษกรองสารวอทแมนเบอร์ 1 (Whatman No. 1 filter paper)
- 3.1.2 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope)
- 3.1.3 กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (Inverted microscope)
- 3.1.4 เข็มเย็บเย็บ (Needle)
- 3.1.5 คิวเวตพลาสติก (Plastic cuvettes)
- 3.1.6 เครื่องกวนสารละลายพร้อมให้ความร้อน (Hot plate magnetic stirrer)
- 3.1.7 เครื่องแก้ว (Glassware)
- 3.1.8 เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง (Balance)
- 3.1.9 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
- 3.1.10 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Spin down)
- 3.1.11 เครื่องเป่าลมร้อน (Air blower)
- 3.1.12 เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (Rotary evaporator)
- 3.1.13 เครื่องอบลมร้อน (Hot air oven)
- 3.1.14 เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (Microplate reader)
- 3.1.15 คอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column chromatography) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร สูง 60 เซนติเมตร
- 3.1.16 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dishes)
- 3.1.17 จานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม (96-well plates)
- 3.1.18 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol lamp)
- 3.1.19 ตู้เย็น (Refrigerator)
- 3.1.20 ตู้บ่ม (Incubator)
- 3.1.21 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)
- 3.1.22 โถดูดความชื้น (Desiccator)
- 3.1.23 ทิป (Tip)
- 3.1.24 แท่งแม่เหล็กกวนสาร (Magnetic bar)
- 3.1.25 ปัมสุญญากาศ (Vacuum pump)
- 3.1.26 ไมโครเวฟ (Microwave)
- 3.1.27 ไม้พันสำลี (Cotton buds)
- 3.1.28 เวอร์เนียคาลิเปอร์ (Digital vernier caliper)
- 3.1.29 หลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge tube) ขนาด 1.5, 15 และ 50 มิลลิลิตร
- 3.1.30 ห่วงเย็บเย็บ (Loop)
- 3.1.31 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
- 3.1.32 ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Heamacytometer)

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ ห้ามเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น หากท่านมีข้อสงสัย กรุณาติดต่อฝ่ายวิชาการ และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.33 TLC Aluminium Sheet 20x20 cm

3.1.34 TLC tank

3.1.35 UV box

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารเคมีในการสกัดและแยกสารให้บริสุทธิ์

3.2.1.1 Acetic acid

3.2.1.2 *p*-Anisaldehyde

3.2.1.3 *n*-Butanol

3.2.1.4 Distillated Water

3.2.1.5 Ethanol

3.2.1.6 Ethyl acetate

3.2.1.7 Hexane

3.2.1.8 Methanol

3.2.1.9 Sea sand

3.2.1.10 Silica gel

3.2.1.11 Sodium sulfate anhydrous

3.2.1.12 Sulfuric acid

3.2.1.13 Sodium chloride

3.2.2 สารเคมีในการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

3.2.2.1 Distillated Water

3.2.2.2 Folin-ciocalteu reagent

3.2.2.3 Gallic acid

3.2.2.4 Methanol

3.2.2.5 Sodium carbonate

3.2.3 สารเคมีในการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

3.2.3.1 2, 2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)

3.2.3.2 2, 2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

3.2.3.3 2,4,6-Tri-(2-pyridyl)-striaizine (TPTZ)

3.2.3.4 Acetic acid

3.2.3.5 Ascorbic acid

3.2.3.6 Distillated Water

3.2.3.7 Hydrochloric acide

3.2.3.8 Ferric chloride hexahydrate

3.2.3.9 Trolox ใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

3.2.3.10 Methanol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามนำผลไปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3.11 Potassium persulfate

3.2.3.12 Sodium acetate trihydrate

3.2.4 สารเคมีในการศึกษาฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชัน

- 3.2.4.1 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)
- 3.2.4.2 Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- 3.2.4.3 Ethanol
- 3.2.4.4 Fetal bovine serum (FBS)
- 3.2.4.5 Gentamycin
- 3.2.4.6 Hydrogen peroxide 30%
- 3.2.4.7 Phosphate buffer saline (PBS)
- 3.2.4.8 Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI 1640)
- 3.2.4.9 Sodium bicarbonate
- 3.2.4.10 Sterilized water
- 3.2.4.11 Trypan blue solution 0.4%
- 3.2.4.12 Trysin-EDTA 0.25%

3.2.5 สารเคมีในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

- 3.2.5.1 Agar
- 3.2.5.2 Brain heart infusion (BHI)
- 3.2.5.3 Clindramycin
- 3.2.5.4 Distillated Water
- 3.2.5.5 DMSO
- 3.2.5.6 Gentamycin
- 3.2.5.7 Methanol
- 3.2.5.8 Mueller Hinton agar (MHA)
- 3.2.5.9 Normal saline solution
- 3.2.5.10 Nutrient agar (NA)
- 3.2.5.11 Sheep's blood

3.3 เซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย

เซลล์ที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมด มีจำนวนเซลล์ 2 ชนิด ดังนี้

3.3.1 เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูชนิด L929 (mouse fibroblast cell line) ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.3.2 เซลล์แมคโครฟาจของหนูชนิด RAW 264.7 (mouse macrophage cell line) ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.นพ.อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์ ห้องปฏิบัติการนาโนชีวเวชศาสตร์ ภาควิชา

เอกสารนี้เป็นกายวิภาคศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย การศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยนี้ใช้ทั้งหมด 6 สายพันธุ์ ซึ่ง 5 สายพันธุ์ ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.จิตติ ท๋าไว อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ดังนี้

3.4.1 *Bacillus subtilis* ATCC 6633

3.4.2 *Bacillus cereus* DMST 5040

3.4.3 *Micrococcus luteus* ATCC 9341

3.4.4 *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

3.4.5 *Staphylococcus aureus* TISTR 1466

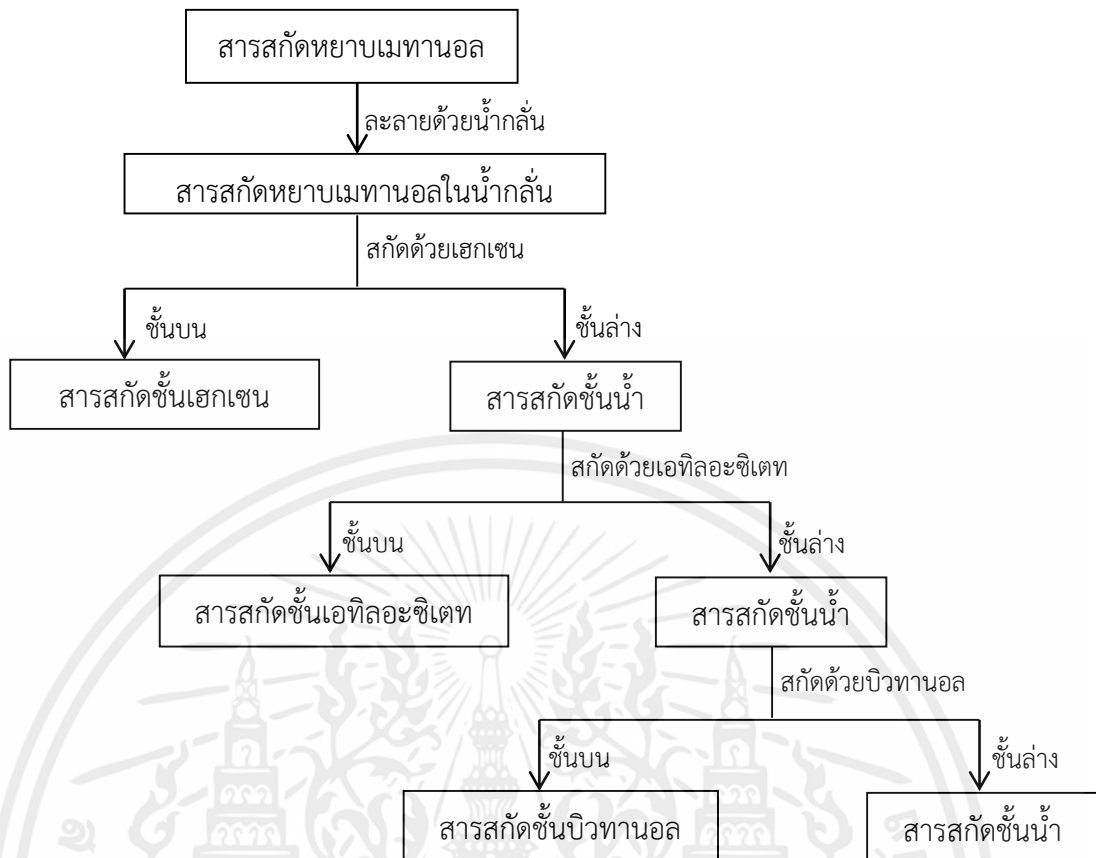
และเชื้อแบคทีเรียอีก 1 สายพันธุ์ คือ เชื้อแบคทีเรีย *Propionibacterium acnes* DMST 14916 ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การสกัดสาร

การสกัดสารจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อมใช้วิธี liquid-liquid extraction (partition) ดัดแปลงจากวิธีของ Beedeessie *et al.* (2012) โดยนำสารสกัดหยาบเมทานอลที่สกัดได้จากเปลือกเมล็ด (seed coat) และเอ็มบริโอ (embryo) ของมะขามป้อม ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เยี่ยม มาทำการชั่งน้ำหนักและละลายด้วยน้ำกลั่น กวนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เติมตัวทำละลายเฮกเซนลงไปในอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเทใส่กรวยแยก ตั้งทิ้งไว้จนกว่าสารละลายจะแยกออกเป็น 2 ชั้น โดยชั้นบน คือ สารสกัดชั้นตัวทำละลาย ชั้นล่าง คือ สารสกัดชั้นน้ำ นำสารสกัดชั้นน้ำสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนซ้ำอีก 2 ครั้ง แล้วสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท และบิวทานอล ตามลำดับ ซึ่งแผนผังสรุปการสกัดวิธี Liquid-liquid extraction แสดงดังรูปที่ 3.1 (ทำการสกัดซ้ำเช่นเดียวกับตัวทำละลายชั้นเฮกเซน) จะได้สารสกัดในตัวทำละลายชั้นต่างๆ ทั้งหมด 4 ชั้น จากนั้นนำสารสกัดแต่ละชั้นที่ได้ ยกเว้นสารสกัดชั้นน้ำมาทำการดึงน้ำออกโดยการเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์อิ่มตัว ในอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร จากนั้นไซสารสกัดชั้นตัวทำละลายดังกล่าวใส่ในขวดคูแรน เติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส ประมาณ 3-5 กรัมต่อลิตร เพื่อดึงน้ำที่อาจหลงเหลืออยู่ในสารสกัดชั้นตัวทำละลายออกอีกครั้งแล้วกรองด้วยกระดาษวอทแมนเบอร์ 1 ทันทีก นำสารสกัดชั้นตัวทำละลายที่ได้ไปทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ ส่วนสารสกัดชั้นน้ำ (ชั้นสุดท้าย) จะนำมาทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จากนั้นนำสารสกัดชั้นตัวทำละลายต่างๆ ที่แห้งแล้วมาชั่งน้ำหนักแห้ง และบันทึกผลการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.1 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการสกัดสารจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อมด้วยวิธี Liquid-liquid extraction

3.5.2 การแยกสารสกัดให้บริสุทธิ์

3.5.2.1 การหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

การหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin layer chromatography: TLC) เพื่อนำไปใช้ในการแยกสารให้บริสุทธิ์และรวมสารสกัดส่วนย่อย (fraction) ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งดัดแปลงจาก Meyer *et al.* (2007) โดยตัดแผ่น TLC ให้มีขนาด 2x5 เซนติเมตร ชีตเส้นจากปลายขอบบน (front line) ให้มีความยาวเท่ากับ 0.2 เซนติเมตร และขอบล่าง (base line) ให้มีความยาวเท่ากับ 0.5 เซนติเมตร ด้วยดินสอเพื่อหาระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ จากนั้นหยด (spot) สารที่ต้องการทดสอบลงบนแผ่น TLC บริเวณ base line ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ทดสอบหาอัตราส่วนของระบบตัวทำละลายที่อัตราส่วนต่างๆ โดยเริ่มจากใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกัน 2 ชนิด ในอัตราส่วน 50 : 50 เปอร์เซ็นต์ แล้วจึงลดหรือเพิ่มของอัตราส่วนของตัวทำละลายชนิดต่างๆ ซึ่งขึ้นอยู่กับสารที่ spot ลงบนแผ่น TLC เช่น หากต้องแยกสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตท อาจเริ่มจากการใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทกับเมทานอลในอัตราส่วน 50 : 50 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเพิ่มความขั้วของสารขึ้นเรื่อยๆ จนได้อัตราส่วนที่ทำให้สารเกิดการแยกเป็นจุดชัดเจน เตรียม TLC Tank โดยเทตัวทำละลายลงไป ปิดฝา TLC Tank ให้สนิท เพื่อให้ระบบตัวทำละลายอิ่มตัว เมื่อระบบตัวทำละลายอิ่มตัวแล้วจุ่มแผ่น TLC ที่ spot สารที่ต้องการทดสอบลงใน TLC Tank ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งตัวทำละลายเคลื่อนที่มาถึง front line ที่กำหนดไว้ นำ

แผ่น TLC ออกจาก TLC Tank และตรวจสอบแถบสีของสารด้วยการส่องภายใต้รังสี UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร

ผลการทดลองที่เกิดขึ้นตรวจสอบได้จากการนำแผ่น TLC มาส่องภายใต้รังสี UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร จากนั้นบันทึกผลการเรืองแสง UV แล้วนำแผ่น TLC มาสเปรย์ด้วยสารละลาย anisaldehyde reagent ปล่อยให้แห้ง และให้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 110 องศาเซลเซียส เพื่อให้เกิดแถบสีขึ้น ถ้าสามารถแยกเห็นเป็นจุดอย่างชัดเจน แสดงว่าอัตราส่วนของระบบตัวทำละลายนั้นเป็นระบบที่เหมาะสม เมื่อได้ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้วสามารถนำระบบตัวทำละลายนี้ไปใช้ในการแยกสารที่ต้องการทดสอบให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีต่อไป

3.5.2.2 การแยกสารสกัดให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

การแยกสารสกัดให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีดัดแปลงมาจากวิธีของ Smyth *et al.* (2012) เตรียมคอลัมน์แก้วโดยบรรจุแบบเปียก (wet packing) โดยตั้งคอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร สูง 60 เซนติเมตร ให้ตรง ใส่สำลีลงในคอลัมน์แก้วที่ปลายด้านล่างสุดของคอลัมน์ เติมสารละลายเอทิลอะซิเตทลงในคอลัมน์แก้วประมาณ 1 ใน 3 ส่วนของคอลัมน์ และเตรียมซิลิกาเจล (silica gel) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 40-63 ไมโครเมตร ประมาณ 300 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ เติมตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทให้ท่วมใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน ลักษณะของซิลิกาเจลที่เตรียมได้จะมีลักษณะขุ่นเหลว (slurry) เทซิลิกาเจลที่เตรียมได้ลงในคอลัมน์แก้วพร้อมกับใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทออกจากคอลัมน์ และใช้อุปกรณ์ที่มีลักษณะอ่อนนุ่มเคาะด้านข้างของคอลัมน์แก้วเบาๆ เพื่อช่วยให้ซิลิกาเจลแน่นขึ้นและลดปัญหาการเกิดฟองอากาศ จากนั้นใช้แท่งแก้วเกลี่ยบริเวณผิวหน้าซิลิกาเจลให้ผิวหน้าเรียบ เติมทราย (sea sand) ลงในคอลัมน์ เพื่อป้องกันผิวหน้าของซิลิกาเจล

เตรียมสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตท สำหรับบรรจุลงคอลัมน์แก้ว โดยชั่งสารสกัดประมาณ 10 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ เติมสารละลายเมทานอลจนสารสกัดละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติมซิลิกาเจล ประมาณ 30 กรัม ผสมกับสารสกัดให้มีลักษณะเป็น slurry และใช้เครื่องเป่าลมร้อนเป่าด้านข้างของบีกเกอร์จนตัวทำละลายเมทานอลระเหยออกจนหมดจะได้เป็นผงของสารสกัดที่เคลือบอยู่บนผิวของซิลิกาเจล ทำการแยกสารสกัดให้บริสุทธิ์ด้วยการบรรจุสารสกัดที่เตรียมไว้ลงในคอลัมน์แก้ว (ด้านบนของทราย) จากนั้นเติมตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทลงในคอลัมน์ และเพิ่มความเข้มข้นของตัวทำละลายด้วยเมทานอลครั้งละ 5 เปอร์เซ็นต์จนถึงเมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ เก็บสารสกัดส่วนย่อยที่ออกจากคอลัมน์ด้วยหลอดทดลองแก้ว ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

การตรวจสอบสารสกัดที่เก็บจากคอลัมน์ด้วยวิธี TLC โดยนำสารสกัดแต่ละหลอดที่เก็บได้มา spot ลงบนแผ่น TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายในอัตราส่วนที่หาได้ในข้อ 3.5.2.1 มาใช้ในการรวมสารสกัดส่วนย่อย ตรวจสอบแถบสารด้วยการส่องภายใต้รังสี UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร บันทึกผลการเรืองแสง UV แล้วนำแผ่น TLC มาสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent ปล่อยให้แห้ง และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ ประมาณ 110 องศาเซลเซียส เพื่อให้เกิดแถบสีขึ้น บันทึกผลการเกิดแถบสีที่ปรากฏขึ้นบนแผ่น TLC โดยรวมสารที่มีลักษณะแถบสีเหมือนกันเป็นสารสกัดส่วนย่อย (fraction) เดียวกัน นำสารสกัดส่วนย่อยที่รวมได้มาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ จากนั้นทำการชั่งน้ำหนักแห้งและบันทึกผล

3.5.3 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.5.3.1 การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-ciocalteu ซึ่งดัดแปลงตามวิธีการของ Quy *et al.* (2014) โดยละลายสารสกัดด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย Folin-ciocalteu reagent ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ลงในจานขนาด 96 หลุม ให้เข้ากัน บ่มที่มืดและอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่มืดและอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน โดยใช้ความเข้มข้น 25, 50, 75, 100, 125 และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจะเทียบจากกราฟมาตรฐานแกลลิก แสดงผลในหน่วยของมิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด (milligrams gallic acid equivalents/g extract; mgGAE/g extract)

3.5.3.2 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

3.5.3.2.1 วิธี ABTS

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ดัดแปลงจากวิธีของ Saeed *et al.* (2012) เตรียมสารละลาย ABTS^{•+} reagent โดยผสมสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ กับสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร บ่มที่มืดและอุณหภูมิห้อง เมื่อต้องการใช้งานนำสารละลาย ABTS^{•+} reagent เจือจางด้วยน้ำกลั่น และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง 734 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.70 ± 0.02 ผสมสารสกัดที่ละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 25, 50, 75, 100, 125 และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร กับสารละลาย ABTS^{•+} reagent ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ลงในจานขนาด 96 หลุม บ่มที่มืดและอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ใช้กรดแอสคอบิกเป็นสารมาตรฐาน ใช้ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระโดยใช้สมการ 3.1 และคำนวณค่าการต้านอนุมูลอิสระที่สามารถยับยั้งได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (50% inhibitory concentration; IC₅₀) ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5.0

$$\% \text{ ABTS scavenging activity} = (A_c - A_s) / A_c \times 100 \quad (3.1)$$

A_c คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม (น้ำกลั่น+ABTS^{•+} reagent)

A_s คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง (สารตัวอย่าง+ABTS^{•+} reagent)

3.5.3.2.2 วิธี DPPH

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ดัดแปลงจากวิธีของ Armania *et al.* (2013) เตรียม DPPH ละลายด้วยเมทานอลให้มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ เตรียมสารสกัดด้วยการละลายเมทานอลให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 25, 50, 75, 100, 125 และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นผสมสารสกัด ปริมาตร 20 ไมโครลิตร กับสารละลาย DPPH ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ลงในจานขนาด 96 หลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องและมืด เป็น

เวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ใช้โทรล็อกซ์เป็นสารมาตรฐาน โดยใช้ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระโดยใช้สมการ 3.2 และคำนวณค่า IC₅₀ ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5.0

$$\% \text{ DPPH scavenging activity} = (A_c - A_s) / A_c \times 100 \quad (3.2)$$

A_c คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม (เมทานอล+DPPH)

A_s คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง (สารตัวอย่าง+DPPH)

3.5.3.2.3 วิธี FRAP

การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ดัดแปลงตามวิธีการของ Saeed *et al.* (2012) เตรียมสารละลาย FRAP reagent โดยผสมสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์: สารละลาย TPTZ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์: สารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วน 10 : 1 : 1 โดยปริมาตร เตรียมสารสกัดโดยละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นผสมสารสกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตร กับสารละลาย FRAP reagent ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ลงในงานขนาด 96 หลุม บ่มที่มืดและอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐาน โดยใช้ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเปรียบเทียบความสามารถในการรีดิวซ์ Fe³⁺-TPTZ จากกราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกจะแสดงผลในหน่วยมิลลิกรัมกรดแอสคอร์บิกต่อกรัมสารสกัด (milligrams ascorbic acid equivalent/g extract; mgAAE/g extract)

3.5.3.3 การศึกษาฤทธิ์การปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชัน

การศึกษาฤทธิ์การปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชันจะวิเคราะห์ด้วยวิธี 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ดัดแปลงจากวิธีของ Zagmutt *et al.* (2016) เริ่มจากเก็บเกี่ยวเซลล์จากพลาสติกเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการดังนี้ เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูชนิด L929 ซึ่งใช้วิธี Trypsinization ส่วนเซลล์แมคโครฟาจของหนูชนิด RAW-264.7 ใช้วิธีการลอกเซลล์โดยใช้ไม้ rubber policeman จากนั้นนับเซลล์ด้วยวิธีการย้อมสีทริปแลนบลู (trypan blue) ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ หยอดสารละลายเซลล์ลงในฮีมาไซโตมิเตอร์ จากนั้นส่องดูการติดสีของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และคำนวณจำนวนเซลล์เริ่มต้น โดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูชนิด L929 จำนวน 1.8×10⁵ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเซลล์แมคโครฟาจของหนูชนิด RAW 264.7 จำนวน 2.5×10⁵ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการเจือจางเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ที่เสริมด้วย fetal bovine serum (FBS) 5 เปอร์เซ็นต์ ปลูกเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เตรียมสารสกัดโดยเตรียม stock ของสารสกัดให้มีความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลายสารสกัดประมาณ 2000 มิลลิกรัม ด้วยสารละลาย DMSO ปริมาตร 1 มิลลิลิตรจนเป็นเนื้อเดียวกันก่อน ปรับปริมาตรจนครบ 10 มิลลิลิตร ด้วย PBS กรองสารสกัดด้วยเมมเบรนที่มีรูพรุนขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นเก็บไว้เป็น stock สารสกัด เมื่อต้องการนำสาร

สกัดมาใช้ในการศึกษาฤทธิ์การปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชัน ให้ทำการเจือจางสารสกัด stock ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ที่เสริมด้วย FBS 5 เปอร์เซ็นต์ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ซึ่งทำการทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งใช้ความเข้มข้นของสารสกัดในช่วง 50-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลปรากฏว่า ความเข้มข้นในช่วงดังกล่าวมีความเป็นพิษต่อเซลล์ ส่งผลให้เซลล์เกิดการตาย ดังนั้นจึงทำการลดความเข้มข้นลงมาครั้งหนึ่งเหลือเพียง 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งความเข้มข้นนี้เป็นความเข้มข้นที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใช้สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ (ซึ่งได้จากการหาสภาวะความเข้มข้นที่เหมาะสมที่เหนียวทำให้เซลล์เกิดการตาย ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์) เป็นชุดควบคุมเชิงบวก ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใช้สารสกัดความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นชุดควบคุมเชิงลบ และใช้สารมาตรฐานกรดแอสคอบิกความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นชุดควบคุมมาตรฐาน (ซึ่งความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอบิกใช้ตามวิธีของ Safaeian *et al.*, 2016) ในการเตรียมชุดควบคุมมาตรฐานและชุดควบคุมเชิงบวก เตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมสารสกัด คือ เจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เสริมด้วย FBS 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงสภาวะการทดลองดังตารางที่ 3.1

เมื่อปลูกเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย FBS 5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม เติมน้ำสารสกัดความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นชุดควบคุมเชิงลบ และเติมน้ำสารมาตรฐานกรดแอสคอบิกความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นชุดมาตรฐาน หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา เติมน้ำสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง และเติมน้ำสารละลาย MTT ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดสารละลายในแต่ละหลุมออก แล้วเติมน้ำสารละลาย DMSO : เอทานอล (1 : 1 โดยปริมาตร) เพื่อละลายผลึกฟอรัมาซาน และนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท และนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ (% Cell viability) จากสมการ 3.3

$$\% \text{ Cell viability} = (A/B) \times 100 \quad (3.3)$$

โดยที่ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมทดสอบ (เซลล์ที่เพาะเลี้ยงอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เสริมด้วย FBS 5 เปอร์เซ็นต์ และมีส่วนผสมของสารตัวอย่าง)

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุม (เซลล์ที่เพาะเลี้ยงอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เสริมด้วย FBS 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีส่วนผสมของสารตัวอย่าง)

หมายเหตุ: ค่า A และ B จะต้องลบค่าการดูดกลืนแสงของ blank ออกก่อน โดยที่ blank ของ A คือ อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เสริมด้วย FBS 5 เปอร์เซ็นต์ และมีส่วนผสมของสารตัวอย่าง และ blank ของ B คือ อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เสริมด้วย FBS 5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจึงนำไปคำนวณในสมการ 3.3

ตารางที่ 3.1 แสดงแผนการทดลองที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์การปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชัน

สภาวะการทดลอง	ชุดควบคุม	ชุดควบคุมเชิงลบ	ชุดควบคุมมาตรฐาน ¹	ชุดควบคุมเชิงบวก	การทดลอง	ชุดควบคุมมาตรฐาน ²
เซลล์	✓	✓	✓	✓	✓	✓
H ₂ O ₂	-	-	-	✓	✓	✓
สารสกัด	-	✓	-	-	✓	-
กรดแอสคอบิก	-	-	✓	-	-	✓

หมายเหตุ: 1 คือ ชุดมาตรฐานที่ประกอบด้วยเซลล์เพาะเลี้ยงอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ที่เสริมด้วย FBS 5 เปอร์เซ็นต์โดยไม่มีส่วนผสมของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

2 คือ ชุดมาตรฐานที่ประกอบด้วยเซลล์เพาะเลี้ยงอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ที่เสริมด้วย FBS 5 เปอร์เซ็นต์โดยมีส่วนผสมของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

✓ คือ เซลล์ที่เพาะเลี้ยงอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ที่เสริมด้วย FBS 5 เปอร์เซ็นต์ และมีส่วนผสมของสารที่ต้องการทดสอบ

- คือ เซลล์ที่เพาะเลี้ยงอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ที่เสริมด้วย FBS 5 เปอร์เซ็นต์ และไม่มีส่วนผสมของสารที่ต้องการทดสอบ

3.5.3.4 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบมีทั้งหมด 6 สายพันธุ์ คือ *Bacillus subtilis*

ATCC 6633, *Bacillus aureus* DMST 5040, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 และ *Propionibacterium acnes* DMST 14916

สำหรับเชื้อ *B. subtilis* ATCC 6633, *B. aureus* DMST 5040, *M. luteus* ATCC 9341, *S. epidermidis* ATCC 12228 และ *S. aureus* TISTR 1466 นำมา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrients agar (NA) และนำไปป้อมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเชียวโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบมา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA อีกครั้งนำไปป้อมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรียให้มากขึ้น หลังจากนั้นเชียวเชื้อแบคทีเรียมาเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปรับความขุ่นให้เท่ากับ McFarland 0.5 หรือวัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร โดยทำการเจือจางให้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.08-0.13 ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว *P. acnes* DMST 14916 จะ streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Brain heart infusion (BHI) agar ที่เสริมด้วยเลือดของแกะ (Sheep's blood) ปราศจากเชื้อ 8 เปอร์เซ็นต์ และนำไปป้อมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเชียวโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* DMST 14916 มา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด BHI agar ที่เสริมด้วยเลือดแกะปราศจากเชื้อ 8 เปอร์เซ็นต์ อีกครั้ง นำไปป้อมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรียให้มากขึ้น หลังจากนั้นเชียวเชื้อแบคทีเรียมาเจือจางด้วยอาหารเหลวชนิด BHI ปรับความขุ่นให้เท่ากับ McFarland 2.0 หรือวัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร โดยทำการเจือจางให้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.4-0.5 (CLSI, 2012)

การเตรียมสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ โดยละลายสารสกัดด้วยตัวทำละลาย DMSO : น้ำ (1 : 1 โดยปริมาตร) เจือจางสารสกัดให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1,000 ไมโครกรัมต่อดิสก์ จากนั้นหยอดสารสกัดที่เตรียมไว้ลงบนแผ่นดิสก์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 6.00 มิลลิเมตร (ปราศจากเชื้อ) ในการทดลองใช้ DMSO : น้ำ (1 : 1 โดยปริมาตร) เป็นตัวควบคุมเชิงลบ (negative control) และใช้ยาปฏิชีวนะ gentamicin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) จากนั้นปล่อยให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อ

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดยกเว้น *P. acnes* DMST 14916 ด้วยวิธี paper disc diffusion ดัดแปลงจากวิธีของ Meerungrueng *et al.* (2014) โดยใช้ไม้พินสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจุ่มในสารละลายแบคทีเรียที่เตรียมไว้แล้วป้ายเชื้อ (swab) ให้ทั่วบนผิวอาหารแข็ง MHA โดยให้เชื้อแบคทีเรียกระจายสม่ำเสมอ ตั้งทิ้งไว้ให้ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง จากนั้นนำแผ่นดิสก์ที่หยอดสารแล้ววางลงบนผิวหน้าของอาหารที่มีเชื้อที่ต้องการทดสอบ โดยให้สารสกัดที่ต้องการทดสอบ ตัวควบคุมเชิงบวก และตัวควบคุมเชิงลบอยู่ในจานเดียวกัน ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณวงใส (inhibition zone) ที่เกิดขึ้น บันทึกผลการทดลองโดยมีหน่วยเป็นมิลลิเมตร

ส่วนการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว *P. acnes* DMST 14916 ใช้วิธี agar well diffusion ดัดแปลงจากวิธีของพัชวรรณ (2558) โดยใช้ไม้พินสำลีที่ปราศจากเชื้อจุ่มลงในสารละลายเชื้อ บิดให้แห้งพอหมาด ทำการป้ายเชื้อให้ทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง BHI ที่เสริมด้วยเลือดแกะปราศจากเชื้อ 8 เปอร์เซ็นต์ ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 3-5 นาที เพื่อให้ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง จากนั้นใช้ cork borer เจาะรูอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้เกิดหลุม (well) ซึ่งเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 6 มิลลิเมตร สำหรับหยอดสารสกัด จากนั้นหยอดสารสกัด ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในหลุม สำหรับเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* DMST 14916 ใช้ยาปฏิชีวนะ clindamycin ความเข้มข้น 1.25 ไมโครกรัมต่อหลุม เป็นตัวควบคุมเชิงบวก และบ่มในสภาวะไร้อากาศ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณวงใสที่เกิดขึ้น บันทึกผลการทดลองโดยมีหน่วยเป็นมิลลิเมตร

3.5.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองทั้งหมดนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (Analysis of variance: ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistic 23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการสกัดสารจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อม

การสกัดสารจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อมด้วยวิธี liquid-liquid extraction (partition) โดยใช้น้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบเมทานอลจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อม ปริมาณ 108.21 และ 26.21 กรัม ตามลำดับ จากนั้นสกัดต่อด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ นำสารสกัดที่ได้ในแต่ละชั้นไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบสูญญากาศ ยกเว้นชั้นน้ำซึ่งระเหยน้ำออกด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ได้สารสกัดในตัวทำละลายชั้นต่างๆ จำนวน 8 สารสกัด เมื่อนำสารสกัดที่ได้มาทำการชั่งน้ำหนักแห้งและพิจารณาจากตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารพบว่า สารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นน้ำมีน้ำหนักแห้งมากที่สุด เท่ากับ 25.94 กรัม และตัวทำละลายชั้นเฮกเซนมีน้ำหนักแห้งน้อยที่สุด เท่ากับ 10.44 กรัม เช่นเดียวกันกับสารสกัดจากเอ็มบริโอของมะขามป้อมโดยพบว่า สารสกัดสารสกัดจากเอ็มบริโอของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นน้ำมีน้ำหนักแห้งมากที่สุด เท่ากับ 6.56 กรัม และตัวทำละลายชั้นเฮกเซนมีน้ำหนักแห้งน้อยที่สุด เท่ากับ 1.85 กรัม แสดงน้ำหนักแห้งของสารสกัดดังตารางที่ 4.1 จากนั้นนำสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นต่างๆ ที่ได้ไปศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

ตารางที่ 4.1 ชื่อตัวอย่าง ชื่อย่อ และน้ำหนักแห้งของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อม

สารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อม	ชื่อย่อสารสกัด*	น้ำหนักแห้ง (กรัม)
เปลือกเมล็ดชั้นเฮกเซน	ScH	10.44
เปลือกเมล็ดชั้นเอทิลอะซิเตท	ScE	20.05
เปลือกเมล็ดชั้นบิวทานอล	ScB	24.08
เปลือกเมล็ดชั้นน้ำ	ScW	25.94
เอ็มบริโอชั้นเฮกเซน	EbH	1.85
เอ็มบริโอชั้นเอทิลอะซิเตท	EbE	4.63
เอ็มบริโอชั้นบิวทานอล	EbB	2.55
เอ็มบริโอชั้นน้ำ	EbW	6.56

* หมายเหตุ: ชื่อย่อสารสกัด Sc คือเปลือกเมล็ด Eb คือเอ็มบริโอมะขามป้อม ตัวอักษรตัวที่สามคือตัวทำละลาย ประกอบด้วย H คือเฮกเซน E คือเอทิลอะซิเตท B คือบิวทานอล และ W คือน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อม

4.2.1 ผลการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ผลการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อมทั้งหมด 8 ชนิด ด้วยวิธี Folin-ciocalteu โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก ($y=0.0085x$, $R^2=0.9959$; ค่า R^2 คือ ค่า Regression equation ถ้าค่า R^2 เข้าใกล้ 1 แสดงว่ากราฟมาตรฐานที่ได้มีความแม่นยำสูง) แสดงกราฟดังรูปภาคผนวก ก-1 ซึ่งค่าที่ได้แสดงออกมาในหน่วยมิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมสารสกัด (mgGAE/g extract) โดยแสดงวิธีการคำนวณดังภาคผนวกที่ ก-1 จากการทดลองพบว่า สารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อมมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดอยู่ในช่วง 64.52 ถึง 439.09 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมสารสกัด เมื่อพิจารณาตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารพบว่า สารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 439.09 ± 5.49 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมสารสกัด รองลงมาคือ ชั้นบิวทานอล มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 260.77 ± 5.45 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมสารสกัด ส่วนชั้นน้ำ และชั้นเฮกเซนมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 130.70 ± 5.58 และ 126.41 ± 2.60 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ และตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารจากเอ็มบริโอของมะขามป้อมพบว่า สารที่สกัดจากตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด มีค่าเท่ากับ 399.40 ± 4.39 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมสารสกัด รองลงมา คือ ชั้นบิวทานอล มีค่าเท่ากับ 198.60 ± 3.28 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมสารสกัด ส่วนชั้นเฮกเซน และชั้นน้ำ มีค่าเท่ากับ 83.00 ± 4.50 และ 64.52 ± 3.44 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดจากเปลือกเมล็ดกับเอ็มบริโอของมะขามป้อมในตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดชนิดเดียวกันพบว่า สารสกัดจากเปลือกเมล็ดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากกว่าเอ็มบริโอของมะขามป้อม และเมื่อเปรียบเทียบค่าความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์พบว่า สารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นต่างๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงข้อมูลดังตารางที่ 4.2 จากผลการทดลองการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อมพบว่า สารสกัดในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด เมื่อเทียบกับตัวทำละลายน้ำ บิวทานอล และเฮกเซน เนื่องจากสารกลุ่มฟีนอลิกสามารถสกัดออกมาได้ดีในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (Liu *et al.*, 2012; Mishra *et al.*, 2015; Abu *et al.*, 2017; Kaur, 2017) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mishra *et al.* (2015) ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากสารสกัดเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมซึ่งสกัดด้วยตัวทำละลายทั้งหมด 3 ชนิด คือ เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-ciocalteu พบว่า สารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด มีค่าเท่ากับ 853.65 ± 1.71 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมสารสกัด และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดในตัวทำละลายชั้นต่างๆ ในงานการศึกษาครั้งนี้กับสารสกัดหยาบเมทานอลจากงานวิจัยอื่น เช่น Nambiar *et al.* (2015) วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบเมทานอลจากเมล็ดมะขามป้อมด้วยวิธี Folin-ciocalteu พบว่า มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 6.5

มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมสารสกัด และงานวิจัยของ Mondal *et al.* (2017) ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเมล็ดของมะขามป้อมโดยสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์พบว่า สารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเมล็ดของมะขามป้อมมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 39.51 และ 36.00 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมสารสกัดตามลำดับ จะเห็นได้ว่าสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อมในงานวิจัยครั้งนี้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่างานวิจัยที่ผ่านมา

ตารางที่ 4.2 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อม

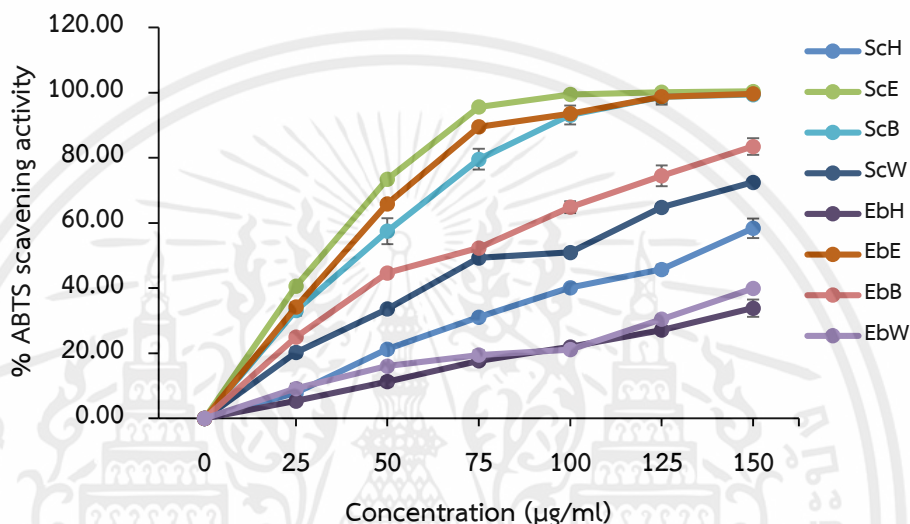
สารสกัดจากมะขามป้อม	ตัวทำละลาย	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมสารสกัด)± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)
เปลือกเมล็ด	เฮกเซน	126.41 ^e ±2.60
	เอทิลอะซิเตท	439.09 ^a ±5.49
	บิวทานอล	260.77 ^c ±5.45
	น้ำ	130.70 ^e ±5.58
เอ็มบริโอ	เฮกเซน	83.00 ^f ±4.50
	เอทิลอะซิเตท	399.40 ^b ±4.39
	บิวทานอล	198.60 ^d ±3.28
	น้ำ	64.52 ^g ±3.44

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษ a-g ที่แตกต่างกันแสดงค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

4.2.2 ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อมด้วยวิธี ABTS, DPPH และ FRAP ซึ่งในการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ใช้ความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อมอยู่ในช่วงระหว่าง 0-150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงดังรูปที่ 4.1 เมื่อคำนวณค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (50% Inhibitory concentration; IC₅₀) ซึ่งใช้หลักการวิเคราะห์ดังนี้ ถ้าสารสกัดหรือสารตัวอย่างมีค่า IC₅₀ ต่ำ แสดงว่ามีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระดีพบว่า สารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS ดีที่สุดซึ่งมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 31.53±0.36 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ ชั้นบิวทานอล มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 41.82±0.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนชั้นน้ำ มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 78.74±1.83 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และชั้นเฮกเซนมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS ต่ำที่สุด มีค่า IC₅₀ 134.71±4.61 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดจากเอ็มบริโอของมะขามป้อมพบว่า สารสกัดจากเอ็มบริโอของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้ดีที่สุด มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 37.15±0.36 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ ชั้นบิวทานอล มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 67.06±0.92

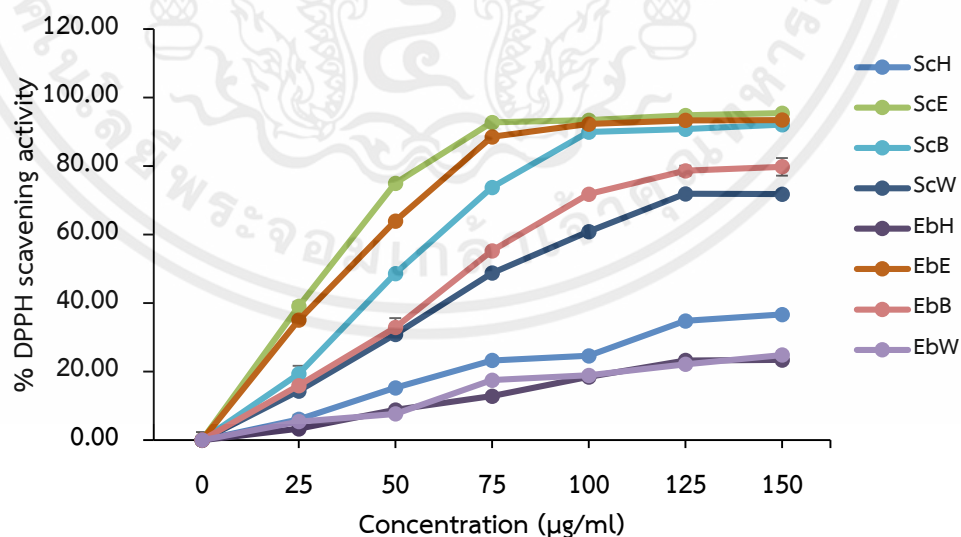
ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนชั้นเฮกเซน และชั้นน้ำมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS ต่ำที่สุด ซึ่งมีค่า IC_{50} มากกว่า 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบค่า IC_{50} สารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อม ในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทกับสารมาตรฐานกรดแอสคอบิกพบว่า มีค่า IC_{50} ต่ำกว่าสารมาตรฐาน กรดแอสคอบิก (IC_{50} เท่ากับ 34.35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) (แสดงตัวอย่างการคำนวณในภาคผนวกที่ ก-2) เมื่อเปรียบเทียบค่าความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อมมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงดังตารางที่ 4.3



รูปที่ 4.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS กับความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อม (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

สำหรับการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ใช้ความเข้มข้นของสารสกัดซึ่งอยู่ในช่วงเดียวกับวิธี ABTS แสดงดังรูปที่ 4.2 ซึ่งเมื่อพิจารณาค่า IC_{50} ของสารสกัดในตัวทำละลายชั้นต่างๆ พบว่า ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีที่สุดในรองลงมาคือ บิวทานอล น้ำ และเฮกเซน โดยสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 31.98 ± 0.32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ ชั้นบิวทานอล มีค่า IC_{50} เท่ากับ 51.15 ± 0.58 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนชั้นน้ำ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 77.14 ± 0.69 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และชั้นเฮกเซนมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ต่ำที่สุด มีค่า IC_{50} มากกว่า 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดจากเอ็มบริโอของมะขามป้อมพบว่า สารสกัดจากเอ็มบริโอของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีที่สุดในรองลงมาคือ ชั้นบิวทานอล มีค่า IC_{50} เท่ากับ 68.94 ± 1.21 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนชั้นเฮกเซน และชั้นน้ำมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ต่ำที่สุด ซึ่งมีค่า IC_{50} มากกว่า 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทกับสารมาตรฐานโทร็อกซ์ (แสดงตัวอย่างการคำนวณในภาคผนวกที่ ก-3) พบว่า สารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีกว่าสารมาตรฐานโทร็อกซ์ โดยสารมาตรฐานโทร็อกซ์มีค่า IC_{50} เท่ากับ 63.69 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เมื่อเปรียบเทียบค่าความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อมมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงดังตารางที่ 4.3 เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อมในการศึกษาครั้งนี้กับสารสกัดหยาบเมทานอลจากเมล็ดของมะขามป้อมในงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของเมล็ดมะขามป้อมด้วยวิธี DPPH ซึ่งใช้สารสกัดหยาบเมทานอลช่วงความเข้มข้น 10-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่า สารสกัดหยาบเมทานอลจากเมล็ดของมะขามป้อม มีค่า IC_{50} เท่ากับ 85.92 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่ามากกว่าค่า IC_{50} ของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวอย่างละลายชั้นเอทิลอะซิเตท (IC_{50} เท่ากับ 31.98 ± 0.32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) (Dinesh *et al.*, 2016) และการศึกษาของ Mondal *et al.* (2017) ซึ่งศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเอทานอลจากเปลือกเมล็ด และเมล็ดของมะขามป้อม เมื่อทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่า สารสกัดหยาบเอทานอลจากเมล็ดของมะขามป้อมมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดหยาบเอทานอลจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 98 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวอย่างละลายชั้นเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงกว่างานวิจัยที่ผ่านมา นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของผงแห้งจากเปลือกเมล็ดและเมล็ดของมะขามป้อมพบว่า ผงแห้งปริมาณ 1 มิลลิกรัม มีเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 1.85 ± 0.2 และ 0.74 ± 0.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Mishra and Mahanta, 2014) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Mishra *et al.* (2015) ซึ่งใช้สารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อม โดยสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ สารสกัดปริมาณ 1 มิลลิกรัม พบว่า สารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวอย่างละลายชั้นเอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ มีเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 61.07 ± 1.63 , 12.99 ± 2.25 และ 0.098 ± 0.98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



รูปที่ 4.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH กับความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อม (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

ตารางที่ 4.3 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อม

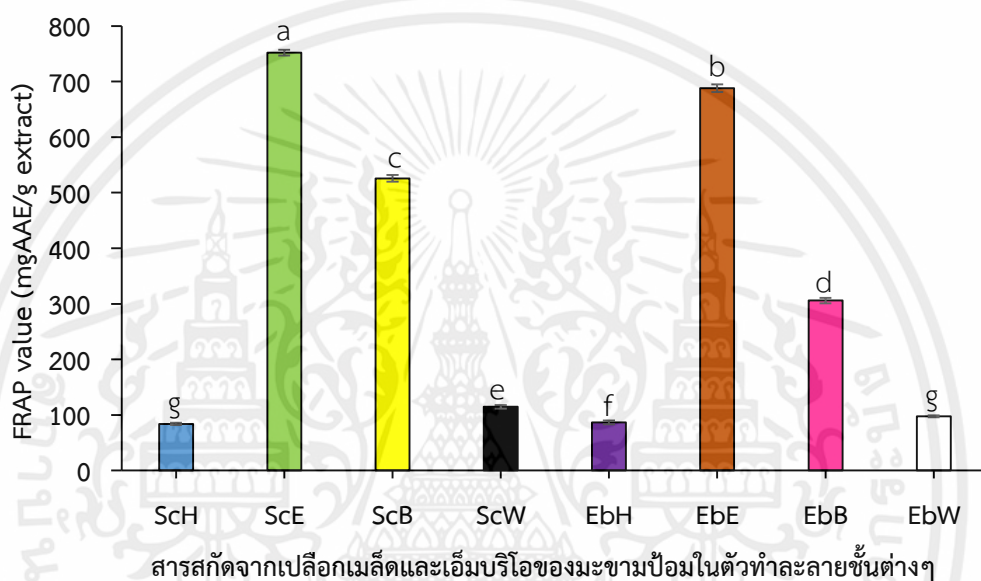
สารสกัดจาก มะขามป้อม	ตัวทำละลาย	IC ₅₀ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)±SD	
		ABTS	DPPH
เปลือกเมล็ด	เฮกเซน	134.71 ^f ±4.61	>150
	เอทิลอะซิเตท	31.53 ^a ±0.36	31.98 ^a ±0.32
	บิวทานอล	41.82 ^c ±0.39	51.15 ^c ±0.58
	น้ำ	78.74 ^e ±1.83	77.14 ^e ±0.69
เอ็มบริโอ	เฮกเซน	>150	>150
	เอทิลอะซิเตท	37.15 ^b ±0.36	37.52 ^b ±1.15
	บิวทานอล	67.06 ^d ±0.92	68.94 ^d ±1.21
	น้ำ	>150	>150
สารมาตรฐาน		34.35 [*]	63.69 [#]

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษ a-f ที่แตกต่างกันแสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี DMRT อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

* ใช้กรดแอสคอบิกเป็นสารมาตรฐาน และ # ใช้โธรส็อกซ์เป็นสารมาตรฐาน

สำหรับการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP จะวิเคราะห์ผลออกมาเป็นความสามารถในการรีดิวซ์ Fe³⁺-TPTZ เป็น Fe²⁺-TPTZ ของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อมในตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ ซึ่งจากการทดลองหาความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นต่างๆ พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ใช้ในการหาความสามารถในการรีดิวซ์ Fe³⁺-TPTZ เป็น Fe²⁺-TPTZ อยู่ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เทียบกับกราฟของสารมาตรฐานกรดแอสคอบิก ($y = 0.0152x, R^2 = 0.9940$) แสดงดังรูปภาคผนวกที่ ก-4 แสดงในหน่วยมิลลิกรัมแอสคอบิกต่อกรัมสารสกัด (mgAAE/g extract) แสดงวิธีการคำนวณในภาคผนวกที่ ก-4 เมื่อเปรียบเทียบตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารพบว่า ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทมีความสามารถในการรีดิวซ์ Fe³⁺-TPTZ สูงที่สุด รองลงมาคือ บิวทานอล น้ำ และเฮกเซน โดยสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทมีค่าความสามารถในการรีดิวซ์ Fe³⁺-TPTZ สูงที่สุด เท่ากับ 751.92±5.22 มิลลิกรัมแอสคอบิกต่อกรัมสารสกัด รองลงมาคือ ชั้นบิวทานอลมีค่าเท่ากับ 525.87±5.93 มิลลิกรัมแอสคอบิกต่อกรัมสารสกัด ส่วนชั้นน้ำมีค่าเท่ากับ 114.59±3.19 มิลลิกรัมแอสคอบิกต่อกรัมสารสกัด และชั้นเฮกเซนมีค่าความสามารถในการรีดิวซ์ Fe³⁺-TPTZ น้อยที่สุด เท่ากับ 83.86±1.90 มิลลิกรัมแอสคอบิกต่อกรัมสารสกัด และสารสกัดจากเอ็มบริโอของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทมีค่าความสามารถในการรีดิวซ์ Fe³⁺-TPTZ สูงที่สุด เท่ากับ 688.16±6.69 มิลลิกรัมแอสคอบิกต่อกรัมสารสกัด รองลงมาคือ ชั้นบิวทานอลมีค่าเท่ากับ 305.82±5.13 มิลลิกรัมแอสคอบิกต่อกรัมสารสกัด ส่วนชั้นน้ำมีค่าเท่ากับ 305.82±5.13 มิลลิกรัมแอสคอบิกต่อกรัมสารสกัด และชั้นเฮกเซนมีค่าความสามารถในการรีดิวซ์ Fe³⁺-TPTZ น้อยที่สุด เท่ากับ 86.45±3.59 มิลลิกรัมแอสคอบิกต่อกรัมสารสกัด และเมื่อเปรียบเทียบค่าความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์พบว่า สารสกัดเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นต่างๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงดังรูปที่ 4.3 ซึ่งมีการรายงานวิจัยเกี่ยวกับค่าความสามารถ

ในการรีดิวซ์ Fe^{3+} -TPTZ ของสารสกัดหยาบเมทานอลจากเมล็ดของมะขามป้อม โดย Sharma *et al.* (2009) ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} -TPTZ ของสารสกัดหยาบชั้นน้ำของเมล็ดมะขามป้อม ซึ่งสกัดด้วยวิธี Soxhlet extraction โดยใช้ น้ำเป็นตัวทำละลายพบว่า สารสกัดหยาบชั้นน้ำของเมล็ดมะขามป้อมมีค่าความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} -TPTZ เท่ากับ 85 ± 5.00 มิลลิกรัมเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมสารสกัด เนื่องจากค่าความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} -TPTZ ของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นต่างๆ การศึกษาครั้งนี้ใช้สารมาตรฐานแตกต่างกัน ดังนั้นจึงไม่สามารถเปรียบเทียบความแตกต่างของความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} -TPTZ ได้



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} -TPTZ เป็น Fe^{2+} -TPTZ ของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อม

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษ a-g ที่แตกต่างกันแสดงถึงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระซึ่งได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี DMRT แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เมื่อเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระทั้ง 3 วิธี (ABTS, DPPH และ FRAP) พบว่า สารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด และจากการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระพบว่า มีความสัมพันธ์กัน โดยสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด และยังมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดด้วยเช่นกัน แสดงให้เห็นว่า ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทมีประสิทธิภาพในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระได้อย่างมีประสิทธิภาพดีกว่าตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด คือ น้ำ บิวทานอล และเฮกเซน โดย Cai *et al.* (2004); Wong *et al.* (2006) และสุภกร และคณะ (2558) ได้รายงานว่ามีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้ดี ส่วนใหญ่มักจะเป็นสารประกอบจำพวกฟีนอลและฟลาโวนอยด์ เช่น กรดฟีนอลิก (phenolic acids) และแทนนิน (tannins) เป็นต้น ซึ่งสารสำคัญเหล่านี้มักจะสกัดได้จากตัวทำละลาย

เอทิลอะซิเตท ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทไปศึกษาฤทธิ์การปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชัน และนำมาแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีต่อไป

4.2.3 ผลการศึกษาฤทธิ์การปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชัน

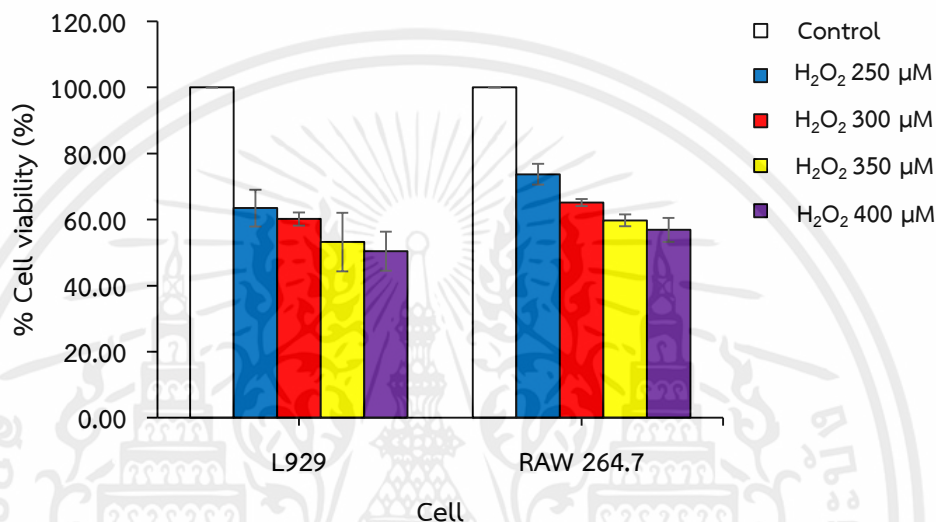
การศึกษาศักยภาพการปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชัน ซึ่งในงานวิจัยนี้เลือกสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทมาศึกษาเนื่องจากมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด โดยเซลล์ที่ใช้ในการศึกษามีทั้งหมด 2 ชนิด ได้แก่ เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูชนิด L929 และเซลล์แมคโครฟาจของหนูชนิด RAW 264.7 จากนั้นวัดเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT

4.2.3.1 การหาความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เหมาะสม

การศึกษาศักยภาพการปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชันซึ่งเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดสภาวะเครียดออกซิเดชันด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยความเข้มข้นที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ 250, 300, 350 และ 400 ไมโครโมลาร์ จากการทดลองเหนี่ยวนำเซลล์เกิดสภาวะเครียดออกซิเดชัน เป็นเวลา 20 ชั่วโมง และวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT พบว่า สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 250, 300, 350 และ 400 ไมโครโมลาร์ สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูชนิด L929 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 63.46 ± 5.55 , 60.16 ± 2.00 , 53.19 ± 8.89 และ 50.41 ± 5.90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนเซลล์แมคโครฟาจของหนูชนิด RAW 264.7 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 73.70 ± 3.12 , 65.15 ± 1.03 , 59.76 ± 1.78 และ 56.88 ± 3.65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูชนิด L929 และเซลล์แมคโครฟาจของหนู RAW 264.7 แสดงดังกราฟรูปที่ 4.4

เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้กับงานวิจัยที่ผ่านมา เช่น การศึกษาของ Wongpradabchai *et al.* (2013) ใช้สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 100-10,000 ไมโครโมลาร์ เหนี่ยวนำให้เซลล์เยื่อหุ้มหลอดเลือดชนิด EA.hy926 เกิดสภาวะเครียดออกซิเดชันพบว่า เซลล์เยื่อหุ้มหลอดเลือดชนิด EA.hy926 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลงจาก 100 เป็น 10 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์ ซึ่งมีผลทำให้เซลล์เยื่อหุ้มหลอดเลือดชนิด EA.hy926 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ Zhou *et al.* (2016) ที่เหนี่ยวนำให้เซลล์เลนส์ตาของมนุษย์ชนิด HLE เกิดสภาวะเครียดออกซิเดชันด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 100-800 ไมโครโมลาร์พบว่า เซลล์เลนส์ตาของมนุษย์ชนิด HLE มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลงจาก 62.5 เป็น 22.4 เปอร์เซ็นต์ ฉะนั้นจึงเลือกใช้สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ซึ่งทำให้เซลล์มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 55.40 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Tian *et al.* (2015) เหนี่ยวนำให้เซลล์ประสาทของมนุษย์ชนิด SH-SY5Y เกิดสภาวะเครียดออกซิเดชันด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 62.01 ± 3.50 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับ Luo *et al.* (2018) เหนี่ยวนำให้เซลล์ปอดของมนุษย์ชนิด MRC-5 เกิดสภาวะเครียดออกซิเดชันด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 64.13 ± 2.12 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่า การศึกษาส่วนใหญ่มักจะใช้สารละลายไฮโดรเจนเปอร์

ออกไซด์ในการเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดสภาวะเครียดออกซิเดชัน ซึ่งความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตใกล้เคียงกับ 50 เปอร์เซ็นต์ อยู่ในช่วง 200-300 ไมโครโมลาร์ ทั้งนี้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับลักษณะและชนิดของเซลล์ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ โดยเป็นความเข้มข้นที่เหนี่ยวนำให้เซลล์ทั้ง 2 ชนิด คือ เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูชนิด L929 และเซลล์แมคโครฟาจของหนูชนิด RAW 264.7 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตใกล้เคียงกับ 50 เปอร์เซ็นต์ มาใช้ในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในการปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชันต่อไป



รูปที่ 4.4 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูชนิด L929 และเซลล์แมคโครฟาจของหนูชนิด RAW 264.7 ซึ่งเปรียบเทียบกับเซลล์ชุดควบคุม (Control) □ กับเซลล์ที่ป้อนร่วมกับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H₂O₂) ที่ความเข้มข้น 250 ■, 300 ■, 350 ■ และ 400 ■ ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง และวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT

4.2.3.2 การศึกษาฤทธิ์การปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชัน

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทในการปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชัน โดยทำการทดสอบหาความเข้มข้นของสารสกัดที่เหมาะสมซึ่งต้องไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยทำการทดสอบความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทในช่วงระหว่าง 50-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลปรากฏว่า ความเข้มข้นในช่วงดังกล่าวมีความเป็นพิษต่อเซลล์ส่งผลให้เซลล์เกิดการตาย โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเหลือเพียง 20-50 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงทำการลดความเข้มข้นของสารสกัดลงมาครึ่งหนึ่งเหลือเพียง 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งความเข้มข้นนี้เป็นความเข้มข้นที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งเซลล์ต้องมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตใกล้เคียงกับเซลล์ชุดควบคุม (Control) คือ มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตไม่ต่ำกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดสภาวะเครียดออกซิเดชันด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นเหมาะสมซึ่งเหนี่ยวนำให้เซลล์มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตใกล้เคียงกับ 50 เปอร์เซ็นต์ และวัดเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT

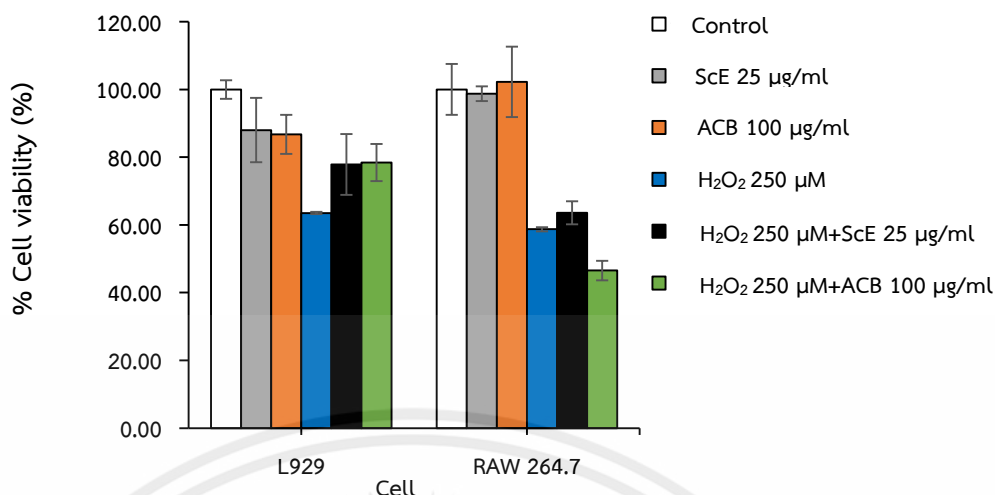
เมื่อเหนี่ยวนำให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูชนิด L929 เกิดภาวะเครียด ออกซิเดชันด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ (ชุดควบคุมเชิงบวก) เป็นเวลา 20 ชั่วโมงพบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูชนิด L929 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 63.50 ± 0.33 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการบ่มเซลล์ร่วมกันระหว่างสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ (สภาวะการทดลอง) เป็นเวลา 20 ชั่วโมงพบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูชนิด L929 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 77.81 ± 8.96 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ชุดควบคุมเชิงบวกกับสภาวะการทดลองพบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูชนิด L929 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเพิ่มขึ้น ประมาณ 18 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการบ่มเซลล์ร่วมกันระหว่างสารมาตรฐานกรดแอสคอบิกที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ (ชุดควบคุมมาตรฐาน) เป็นเวลา 20 ชั่วโมงพบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูชนิด L929 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 78.41 ± 5.47 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์สภาวะการทดลองกับชุดควบคุมมาตรฐานพบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูชนิด L929 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตไม่แตกต่างกับชุดควบคุมมาตรฐาน แสดงดังรูปที่ 4.5

เมื่อเหนี่ยวนำให้เซลล์แมคโครฟาจของหนูชนิด RAW 264.7 เกิดภาวะเครียด ออกซิเดชันด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ (ชุดควบคุมเชิงบวก) เป็นเวลา 20 ชั่วโมงพบว่า เซลล์แมคโครฟาจของหนูชนิด RAW 264.7 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 58.72 ± 0.67 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการบ่มเซลล์ร่วมกันระหว่างสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ (สภาวะการทดลอง) เป็นเวลา 20 ชั่วโมงพบว่า เซลล์แมคโครฟาจของหนูชนิด RAW 264.7 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 63.58 ± 3.40 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ชุดควบคุมเชิงบวกกับสภาวะการทดลองพบว่า เซลล์แมคโครฟาจของหนูชนิด RAW 264.7 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเพิ่มขึ้น ประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการบ่มเซลล์ร่วมกันระหว่างสารมาตรฐานกรดแอสคอบิกที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ (ชุดควบคุมมาตรฐาน) พบว่า เซลล์แมคโครฟาจของหนูชนิด RAW 264.7 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 46.54 ± 2.88 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์สภาวะการทดลองกับชุดควบคุมมาตรฐานพบว่า เซลล์แมคโครฟาจของหนูชนิด RAW 264.7 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากกว่าชุดควบคุมมาตรฐาน แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทสามารถปกป้องเซลล์จากสภาวะความเครียดออกซิเดชันได้ แสดงดังกราฟรูปที่ 4.5

เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การปกป้องเซลล์จากสภาวะความเครียดออกซิเดชันของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทกับสารสกัดจากผลของมะขามป้อม โดย Wongpradabchai *et al.* (2013) ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากน้ำของผลสดมะขามป้อมซึ่งอาจปกป้องการตายของเซลล์เยื่อหุ้มหลอดเลือดชนิด EA.hy926 จากสภาวะเครียดออกซิเดชันด้วยการเหนี่ยวนำจากสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เมื่อทำการบ่มเซลล์ร่วมกันระหว่างสารสกัดจากน้ำของผลสดมะขามป้อมที่ความเข้มข้น 0.1-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกับ

สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์พบว่า สารสกัดน้ำของผลสดมะขามป้อมมีประสิทธิภาพช่วยให้เซลล์เยื่อหุ้มหลอดเลือดชนิด EA.hy926 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเพิ่มขึ้นประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ และงานวิจัยของ Chansriniyom *et al.* (2018) ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากผลของมะขามป้อมในการปกป้องเซลล์เยื่อหุ้มมนุษย์ชนิด ECV304 จากสภาวะเครียดออกซิเดชัน เมื่อทำการบ่มเซลล์ร่วมกันระหว่างสารสกัดหยาบเอทานอลจากผลของมะขามป้อม ความเข้มข้น 20 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์พบว่า เซลล์เยื่อหุ้มมนุษย์ชนิด ECV304 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเพิ่มขึ้นประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ จากงานวิจัยที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากผลของมะขามป้อมมีฤทธิ์ช่วยปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชันได้ โดยสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทช่วยให้เซลล์มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากกว่าสารสกัดหยาบเอทานอลจากผลของมะขามป้อม แต่น้อยกว่าสารสกัดจากน้ำของผลสดมะขามป้อม อาจมาจากน้ำของผลสดมะขามป้อมมีปริมาณวิตามินซีสูง โดยน้ำสดของผลของมะขามป้อมปริมาตร 100 มิลลิลิตร มีกรดแอสคอร์บิกประมาณ 1 กรัม และยังมีเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระประมาณ 40-70 เปอร์เซ็นต์ (Scartezini *et al.*, 2006) ส่งผลให้ลดสภาวะเครียดออกซิเดชันในเซลล์ได้สูง จึงทำให้เซลล์มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากกว่าสารสกัดในการศึกษาครั้งนี้ นอกจากนี้สารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทยังช่วยส่งเสริมให้เซลล์ทั้ง 2 ชนิด คือ เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูชนิด L929 และเซลล์แมคโครฟาจของหนูชนิด RAW 264.7 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเพิ่มขึ้นประมาณ 18 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทั้งนี้การศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์การปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชันครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นเท่านั้น ซึ่งควรทำการศึกษาเพิ่มเติมด้วยวิธีอื่นๆ เช่น การศึกษาการแตกหักของดีเอ็นเอด้วยวิธี Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) การศึกษาการตายแบบอะพอโทซิสของเซลล์ด้วยการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์จากการย้อมสี Annexin V/ PI binding หรือการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับยีนด้วยวิธี Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) เป็นต้น เพื่อยืนยันประสิทธิภาพของสารสกัดเกี่ยวกับการปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูชนิด L929 และเซลล์แมคโครฟาจของหนูชนิด RAW 264.7 ซึ่งเปรียบเทียบกับเซลล์ชุดควบคุม (Control) □ กับเซลล์ที่ปนร่วมกับสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตท (ScE) ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ■ สารมาตรฐานกรดแอสคอบิก (ACB) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ■ สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ ■ สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์กับสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ■ สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์กับสารมาตรฐานกรดแอสคอบิก ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ■ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง และวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT

4.2.4 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

การศึกษากิจกรรมการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นต่างๆ ต่อเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. subtilis* ATCC 6633, *B. cereus* DMST 5040, *M. luteus* ATCC 9341, *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. aureus* TISTR 1466 และ *P. acnes* DMST 14916 โดยเชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ ยกเว้นเชื้อ *P. acnes* DMST 14916 ทดสอบด้วยวิธี paper disc diffusion ซึ่งใช้สารสกัดความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อดิสก์ และใช้ยาปฏิชีวนะ gentamycin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ เป็นตัวควบคุมเชิงบวก และใช้สารละลาย DMSO : น้ำ (1 : 1 โดยปริมาตร) เป็นตัวควบคุมเชิงลบพบว่า สารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อมในตัวทำละลายทุกชั้นมีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ โดยสารสกัดในตัวทำละลายชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และบิวทานอล มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียมากกว่าชั้นน้ำ โดยเฉพาะสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ATCC 6633, *B. cereus* DMST 5040, *M. luteus* ATCC 9341, *S. epidermidis* ATCC 12228 และ *S. aureus* TISTR 1466 ซึ่งมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณวงใสเท่ากับ 15.27 ± 0.56 , 14.76 ± 1.92 , 16.80 ± 2.21 , 15.51 ± 2.17 และ 16.57 ± 1.59 มิลลิเมตร ตามลำดับ โดยแสดงค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าน

ศูนย์กลางบริเวณวงใสดังตารางที่ 4.4 โดยแสดงตัวอย่างการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อมต่อเชื้อ *B. subtilis* ATCC 6633 ใช้สารสกัดความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อดิสก์ ในรูปที่ 4.6ก และ ข และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์พบว่า สารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นต่างๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดในการศึกษาครั้งนี้กับงานวิจัยของ Priya *et al.* (2012) ที่ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบเมทานอลที่สกัดจากเมล็ดของมะขามป้อม โดยใช้ความเข้มข้น 50-200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่า สารสกัดหยาบเมทานอลที่สกัดจากเมล็ดของมะขามป้อมมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ด้วยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสอยู่ในช่วง 12.50-21.00 มิลลิเมตร ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสมากกว่าสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อมในการศึกษาครั้งนี้ที่มีต่อเชื้อ *S. aureus* (เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสอยู่ในช่วง 7.17-16.30 มิลลิเมตร) และการศึกษาของ Dinesh *et al.* (2017) ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบเมทานอลจากเมล็ดของมะขามป้อม โดยใช้ความเข้มข้น 50-100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่า สารสกัดหยาบเมทานอลจากเมล็ดของมะขามป้อมมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* (10.4-14.9 มิลลิเมตร) และ *S. aureus* (12.4-14.2 มิลลิเมตร) ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสมากกว่าสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อมในการศึกษาครั้งนี้ที่มีต่อเชื้อ *B. subtilis* (เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสอยู่ในช่วง 6.74-15.27 มิลลิเมตร) และ *S. aureus* (เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสอยู่ในช่วง 7.17-16.30 มิลลิเมตร) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นที่ใช้ในงานวิจัยและการศึกษาครั้งนี้พบว่า ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอในตัวทำละลายชั้นต่างๆ ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อดิสก์ (เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสอยู่ในช่วง 6.34-16.30 มิลลิเมตร) มีเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสน้อยกว่าสารสกัดหยาบของเมทานอล อาจเนื่องมาจากการสกัดสารด้วยตัวทำละลายเมทานอลจะได้สารทั้งหมด ซึ่งเป็นการรวมตัวกันของสารทั้งที่ไม่มีขั้วและมีขั้ว เมื่อทำการแยกตามขั้วโดยใช้ตัวทำละลายต่างชนิดกันอาจจะทำให้สารบางชนิดมีประสิทธิภาพในการทำงานลดต่ำลง กล่าวคือ สารบางชนิดเมื่ออยู่ร่วมกันอาจจะมีประสิทธิภาพการทำงานไปในลักษณะทิศทางเดียวกัน (มีฤทธิ์หรือประสิทธิภาพส่งเสริมกัน) ทำให้ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียสูง แต่เมื่อทำการแยกตามขั้วของสารอาจจะทำให้ประสิทธิภาพของสารลดลง (Kuate *et al.*, 2011; Njeru *et al.*, 2015) ด้วยเหตุนี้สารสกัดในการศึกษาครั้งนี้จึงมีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่น้อยกว่าสารสกัดหยาบเมทานอลในงานวิจัยก่อนหน้านี้

เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของตัวทำละลายในการสกัดสารในการศึกษาครั้งนี้พบว่า สารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับ Anbuselvi and Jha (2015) ซึ่งศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของสารสกัดจากเมล็ดของมะขามป้อมต่อเชื้อ *S. aureus* ทำการสกัดสารด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ เบนซีน เมทานอล เอทิลอะซิเตท และ คลอโรฟอร์ม เมื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียพบว่า สารสกัดจากเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ดีที่สุด ด้วยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสเท่ากับ 17.0 มิลลิเมตร จะเห็นได้ว่าตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* เช่นเดียวกับการศึกษาครั้งนี้ อาจจะเป็นไปได้ว่าตัว

ทำลายเอทิลอะซิเตทสามารถสกัดสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (Tajkarimi *et al.*, 2010) แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดจากเมล็ดของมะขามป้อมในงานวิจัยที่ผ่านมาก็ยังมีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ *S. aureus* น้อยกว่าสารสกัดของการศึกษาครั้งนี้

นอกจากนี้แล้วเมื่อนำฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อมเปรียบเทียบกับสารสกัดของพืชในสกุลเดียวกันกับมะขามป้อมพบว่า สารสกัดของพืชในสกุลเดียวกันกับมะขามป้อม เช่น ลูกใต้ใบ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นได้ (Mathur *et al.*, 2012) และเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากเมล็ดของพืชชนิดอื่นพบว่า สารสกัดจากเมล็ดของพืชชนิดอื่นมีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียน้อยกว่าสารสกัดในงานวิจัยนี้ ยกตัวอย่างเช่น ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*, *B. subtilis* และ *S. aureus* ของสารสกัดจากเมล็ดละมุด (Shanmugapriya *et al.*, 2011) มีเพียงสารสกัดจากเมล็ดละมุดในตัวทำลายชั้นเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และ *B. subtilis*

สำหรับการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อมต่อเชื้อที่ก่อให้เกิดสิว *P. acnes* DMST 14916 ทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion ใช้ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อหลุม และใช้ยาปฏิชีวนะ clindamycin ความเข้มข้น 1.25 ไมโครกรัมต่อหลุม เป็นตัวควบคุมเชิงบวก และใช้สารละลาย DMSO : น้ำ (1 : 1 โดยปริมาตร) เป็นตัวควบคุมเชิงลบพบว่า สารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อมในตัวทำลายทุกชั้นมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* DMST 14916 โดยสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำลายชั้นบิวทานอลมีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* DMST 14916 ดีที่สุด ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสเท่ากับ 27.77 ± 0.64 มิลลิเมตร รองลงมาคือ ชั้นเอทิลอะซิเตท มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสเท่ากับ 25.96 ± 0.59 มิลลิเมตร ส่วนชั้นน้ำมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสเท่ากับ 18.41 ± 0.80 มิลลิเมตร และเฮกเซนมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสเท่ากับ 14.01 ± 0.83 มิลลิเมตร และสารสกัดจากเอ็มบริโอของมะขามป้อมในตัวทำลายชั้นเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acnes* DMST 14916 ดีที่สุด มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใส เท่ากับ 25.09 ± 0.53 มิลลิเมตร รองลงมาคือ ชั้นบิวทานอล มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใส เท่ากับ 21.00 ± 0.84 มิลลิเมตร ส่วนชั้นเฮกเซน มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใส เท่ากับ 9.93 ± 0.45 มิลลิเมตร และชั้นน้ำ มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใส เท่ากับ 9.63 ± 0.91 มิลลิเมตร โดยแสดงลักษณะของบริเวณวงใสของการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อมต่อเชื้อ *P. acnes* DMST 14916 ใช้สารสกัดความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อหลุมในรูปที่ ก และ ค คือ สารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อม ส่วน ข และ ง คือ สารสกัดจากเอ็มบริโอของมะขามป้อม และเมื่อเปรียบเทียบค่าความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์พบว่า สารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อมในตัวทำลายชั้นต่างๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสดังตารางที่ 4.4 ซึ่งมีความสอดคล้องกับการทดลองก่อนหน้านี้ที่พบว่า เมล็ดฝิ่นมีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* โดยใช้สารสกัดความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อหลุมพบว่า สารสกัดหยาบจากเมล็ดฝิ่นในตัวทำลายเอทานอล เอทานอลความเข้มข้น

50 เปอร์เซ็นต์ และน้ำ มีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* วัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสได้เท่ากับ 14 ± 1.80 , 13 ± 1.70 และ 13 ± 1.04 มิลลิเมตร ตามลำดับ (Chaudhary *et al.*, 2013) เช่นเดียวกับสารสกัดจากเมล็ดลำไยในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* ซึ่งวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสได้เท่ากับ 13 มิลลิเมตร (Tseng *et al.*, 2014) จากการเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว *P. acnes* ของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อมกับงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า สารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อมมีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* มากกว่าสารสกัดจากเมล็ดพืชชนิดอื่น เนื่องจากในงานวิจัยนี้ใช้สารสกัดความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อหลุม ก็สามารถทำให้เกิดบริเวณวงใสซึ่งยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* มากกว่างานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ใช้สารสกัดความเข้มข้นถึง 2 มิลลิกรัมต่อหลุม



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อม

สารสกัด	ตัวทำละลายในชั้นต่างๆ	ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใส (มิลลิเมตร)±SD					
		<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>B. cereus</i> DMST 5040	<i>M. luteus</i> ATCC 9341	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	<i>S. aureus</i> TISTR 1466	<i>P. acnes</i> DMST 14916
เปลือกเมล็ด	เฮกเซน	7.83 ^b ±0.57	10.01 ^c ±1.66	8.76 ^c ±0.95	9.53 ^c ±0.53	11.25 ^b ±1.98	14.01 ^e ±0.83
	เอทิลอะซิเตท	15.27 ^a ±0.56	14.76 ^a ±1.92	16.57 ^a ±1.59	16.80 ^a ±2.21	15.51 ^a ±2.17	25.96 ^b ±0.59
	บิวทานอล	12.47 ^a ±1.02	12.35 ^b ±1.22	13.5 ^b ±1.05	14.25 ^b ±2.50	16.30 ^a ±2.40	27.77 ^a ±0.64
	น้ำ	7.22 ^b ±0.65	6.62 ^d ±0.35	7.04 ^d ±0.14	-	9.15 ^c ±0.80	18.41 ^d ±0.80
เอ็มบริโอ	เฮกเซน	6.77 ^b ±0.41	9.23 ^b ±1.05	7.34 ^d ±0.32	8.26 ^c ±0.83	7.17 ^d ±1.15	9.93 ^f ±0.45
	เอทิลอะซิเตท	14.22 ^a ±1.12	14.61 ^a ±1.00	16.19 ^a ±1.46	16.34 ^a ±2.62	16.25 ^a ±1.56	25.09 ^b ±0.53
	บิวทานอล	13.91 ^a ±1.39	11.73 ^b ±0.74	13.63 ^b ±0.89	13.42 ^b ±0.78	15.48 ^a ±0.79	21.00 ^c ±0.84
	น้ำ	6.74 ^b ±0.33	6.76 ^d ±0.22	6.35 ^d ±0.22	-	10.95 ^b ±0.36	9.63 ^a ±0.91
ยาปฏิชีวนะ		23.53±0.54 [#]	29.08±1.99 [#]	23.16±1.24 [#]	30.01±0.83 [#]	29.47±0.93 [#]	23.31±0.59 [*]

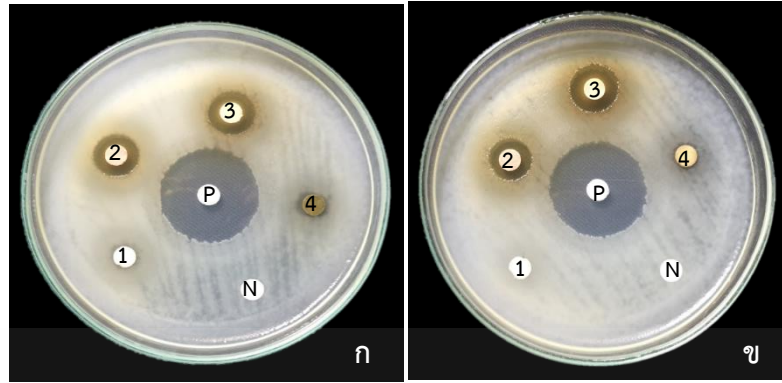
หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษ a-e ที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสจากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี DMRT อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และ

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

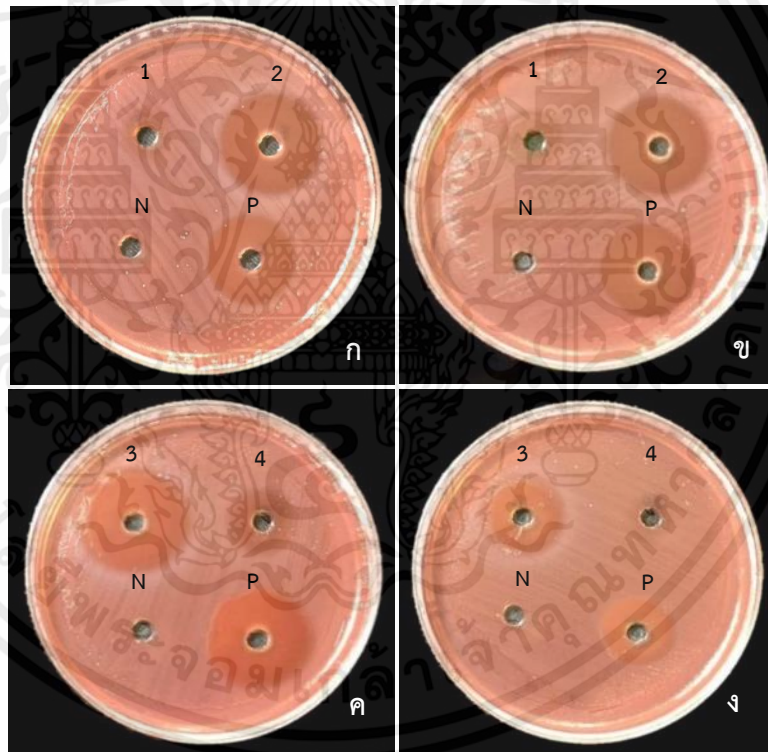
- คือ ไม่มีบริเวณวงใสเกิดขึ้น

ใช้ยาปฏิชีวนะเจนตรามัยซิน (Gentamycin) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์

* ใช้ยาปฏิชีวนะคลินดามัยซิน (clindamycin) ความเข้มข้น 1.25 ไมโครกรัมต่อหลุม



รูปที่ 4.6 แสดงผลตัวอย่างการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกเมล็ด (ก) และเอ็มบริโอ (ข) ของมะขามป้อมต่อเชื้อ *B. subtilis* ATCC 6633 ใช้สารสกัดความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อดิสก์ : หมายเลข 1 คือสารสกัดในตัวทำละลายชั้นเฮกเซน 2 คือ ชั้นเอทิลอะลกอฮอล์ 3 คือ ชั้นบิวทานอล 4 คือ ชั้นน้ำ N คือ negative control และ P คือ positive control



รูปที่ 4.7 แสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกเมล็ด (ก และ ค) และเอ็มบริโอ (ข และ ง) ของมะขามป้อมต่อเชื้อ *P. acnes* DMST 14916 ใช้สารสกัดความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อหลุม : หมายเลข 1 คือสารสกัดในตัวทำละลายชั้นเฮกเซน 2 คือ ชั้นเอทิลอะลกอฮอล์ 3 คือ ชั้นบิวทานอล 4 คือ ชั้นน้ำ N คือ negative control และ P คือ positive control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่มอบให้สำหรับการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

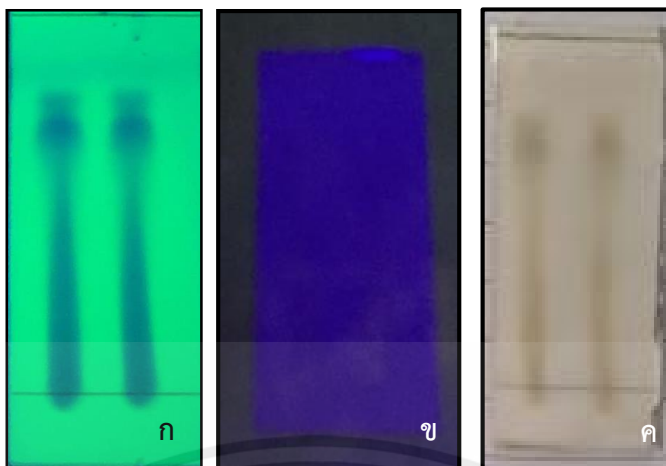
4.3 ผลการแยกสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

จากการทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำพบว่า สารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียดีที่สุด อีกทั้งยังมีฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์จากภาวะเครียดออกซิเดชันได้ ดังนั้นจึงนำสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทมาทำการหาระบบตัวทำละลาย (solvent system) ที่เหมาะสมด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin layer chromatography: TLC) เพื่อนำสารสกัดดังกล่าวไปใช้ในการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) ต่อไป

4.3.1 ผลการหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตท

จากการหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม โดยนำสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทซึ่งมีขั้วปานกลางจนถึงขั้วสูง ซึ่งตัวทำละลายที่เหมาะสมควรเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลางถึงขั้วสูง ได้แก่ สารละลายเอทิลอะซิเตท และเมทานอล การหาระบบตัวทำละลายนั้นจะเริ่มจากอัตราส่วนที่แตกต่างกัน โดยเริ่มต้นด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน 2 ชนิด คือ เอทิลอะซิเตท : เมทานอล ในอัตราส่วน 50 : 50 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจึงค่อยเพิ่มขั้วของตัวทำละลายด้วยเมทานอลครั้งละ 5 เปอร์เซ็นต์ เช่น เอทิลอะซิเตท : เมทานอล ในอัตราส่วน 45 : 55 เปอร์เซ็นต์ หรือลดความมีขั้วของตัวทำละลายด้วยเอทิลอะซิเตทครั้งละ 5 เปอร์เซ็นต์ เช่น เอทิลอะซิเตท : เมทานอล ในอัตราส่วน 55 : 45 เปอร์เซ็นต์ จนได้อัตราส่วนของระบบตัวทำละลายที่ทำให้แถบสารเกิดการแยกกันอย่างชัดเจน นำแผ่น TLC ที่ spot สารเรียบร้อยแล้วมาจุ่มลงในระบบตัวทำละลายที่เตรียมไว้ใน TLC tank เมื่อสารเคลื่อนที่ขึ้นมาถึง front line ของแผ่น TLC ให้นำแผ่น TLC มาทำการตรวจสอบด้วยการส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร หากเกิดการเรืองแสงของสารขึ้น โดยหากเกิดการเรืองแสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เป็นจุดสีดำหรือม่วงดำ แสดงว่าสารนั้นเป็นสารที่มีพันธะคู่ (double bond) (นลินภัสร์ และคณะ, 2554) แต่ไม่สามารถระบุชนิดของสารได้ นอกจากนี้ถ้าสเปรย์ด้วยสารละลาย anisaldehyde reagent และให้ความร้อน การปรากฏของแถบสารจะชัดเจนขึ้น ถ้าแถบสารที่ปรากฏบนแผ่น TLC แยกเป็นจุดชัดเจน แสดงว่า อัตราส่วนนั้นเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นระบบตัวทำละลายในการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีต่อไปได้

จากการหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตท คือ การลดความมีขั้วของระบบตัวทำละลายด้วยการเพิ่มเอทิลอะซิเตทครั้งละ 5 เปอร์เซ็นต์ จนทำให้สารเกิดการแยกเป็นแถบชัดเจน ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม คือ เอทิลอะซิเตท : เมทานอล ในอัตราส่วน 80 : 20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงลักษณะสารที่ปรากฏบนแผ่น TLC ของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทเมื่อส่องด้วยแสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 รูปที่ 4.8ก และ 366 รูปที่ 4.8ข นาโนเมตร และเมื่อสเปรย์ด้วยสารละลาย anisaldehyde reagent รูปที่ 4.8ค



รูปที่ 4.8 ลักษณะของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทที่ปรากฏบนแผ่น TLC โดยจุ่มลงในระบบตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท : เมทานอล ในอัตราส่วน 80 : 20 เปอร์เซ็นต์ และส่องด้วยแสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 (ก) และ 366 (ข) นาโนเมตร และเมื่อสเปรย์ด้วยสารละลาย anisaldehyde reagent (ค)

จากรูปที่ 4.8 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตท เมื่อนำมาแยกด้วยวิธี TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท : เมทานอล ในอัตราส่วน 80 : 20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อส่องด้วยแสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรพบว่า สารปรากฏเป็นแถบยาวสีม่วงเข้ม 1 จุดใหญ่ และ 2 จุดเล็ก ในขณะที่เมื่อส่องด้วยแสง UV ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตรพบว่า สารเกิดการเรืองแสงสีฟ้า 2 จุดเล็ก และเมื่อสเปรย์ด้วยสารละลาย anisaldehyde reagent พบว่า การปรากฏของสารจะมีลักษณะเป็นแถบยาวสีน้ำตาล 1 จุดใหญ่ สีเขียวปนน้ำตาล 1 จุดเล็ก และสีเขียวอ่อน 2 จุดเล็ก จากลักษณะของสารที่ปรากฏบนแผ่น TLC ที่สเปรย์ด้วยสารละลาย anisaldehyde reagent สารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทให้ผลบวกซึ่งมีสีน้ำตาล และสีเขียว อาจกล่าวได้ว่า สารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทมีสารสำคัญในกลุ่มฟีนอลิก (phenolic compounds) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) สเตียรอยด์ (steroids) และเทอร์ปีนอยด์ (terpenoids) (ปราณี และวาสนา, 2549; ปันตดา, 2552) โดยสารกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็นสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ เช่น ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย เป็นต้น

4.3.2 ผลการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

เมื่อได้อัตราส่วนของระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้ว คือ เอทิลอะซิเตท : เมทานอล นำสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทมาทำการแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี เริ่มจากบรรจุคอลัมน์ด้วยซิลิกาเจล โดยผสมซิลิกาเจลด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท 100 เปอร์เซ็นต์จนมีลักษณะเป็น slurry ก่อนเพื่อลดการเกิดปัญหาการเกิดฟองอากาศ และการรอยแตกภายในคอลัมน์แก้ว จากนั้นเริ่มใช้ตัวทำละลายเมทานอลซึ่งผสมกับเอทิลอะซิเตทขะสารออกจากคอลัมน์ โดยเพิ่มความเป็นขั้วของตัวทำละลายด้วยเมทานอลครั้งละ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท : เมทานอล ในอัตราส่วน 95 : 5 ปริมาตร 400 มิลลิลิตร (เอทิลอะซิเตท

ปริมาตร 380 มิลลิลิตรผสมกับเมทานอล ปริมาตร 20 มิลลิลิตร) ชะสารออกจากคอลัมน์ในรอบแรก เมื่อสารละลายภายในคอลัมน์ใกล้หมด เปลี่ยนระบบตัวทำละลายเป็นเอทิลอะซิเตท : เมทานอล ในอัตราส่วน 90 : 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 400 มิลลิลิตร (เอทิลอะซิเตท ปริมาตร 360 มิลลิลิตรผสมกับเมทานอล ปริมาตร 40 มิลลิลิตร) จากนั้นเพิ่มความเข้มข้นด้วยเมทานอลไปเรื่อยๆ จนถึงระบบของตัวทำละลายใช้เมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บสารที่ชะออกจากคอลัมน์ใส่ในหลอดทดลอง และบันทึกระบบตัวทำละลายที่ใช้ในการแยกสาร นำมาตรวจสอบสารด้วยวิธี TLC โดยทำการรวมสารที่ปรากฏบนแผ่น TLC (โดยใช้อัตราส่วนในระบบตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท : เมทานอล ในอัตราส่วน 80 : 20 เปอร์เซ็นต์ตามข้อที่ 4.3.1) ที่เหมือนกันไว้ด้วยกัน นำสารสกัดส่วนย่อย (fraction) ที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออก และจดบันทึกน้ำหนักแห้งที่ได้ แสดงดังตารางที่ 4.5

เมื่อนำสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทมาทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีจะได้สารออกมาเป็นสารสกัดส่วนย่อย โดยเรียกว่า สารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate fraction; EF) ทั้งหมด 9 สารสกัดส่วนย่อย เมื่อนำสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ได้มาทำการชั่งน้ำหนักแห้งพบว่า สารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 3 (EF3) มีน้ำหนักแห้งมากที่สุด มีปริมาณเท่ากับ 3.90 กรัม ส่วนสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 1 (EF1) มีน้ำหนักแห้งน้อยที่สุด เท่ากับ 0.06 กรัม แสดงดังตารางที่ 4.5 จากนั้นนำสารสกัดส่วนย่อย EF ทั้งหมดยกเว้นสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 1 เนื่องการตรวจสอบสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 1 ด้วยวิธี TLC พบว่า ไม่มีแถบของสารปรากฏบนชั้นบนแผ่น TLC และสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 1 ที่แยกได้มีน้ำหนักแห้งน้อยมาก ซึ่งไม่เพียงพอต่อการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ ดังนั้นจึงไม่นำสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 1 มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเหลือเพียงสารสกัดส่วนย่อย 8 ส่วนย่อย คือ สารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 2-9 (EF2-EF9) มาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์การปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชัน และฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียต่อไป

ตารางที่ 4.5 แสดงระบบตัวทำละลาย จำนวน และน้ำหนักแห้งของสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่แยกได้จากสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทด้วยวิธีคอลัมน์ โครมาโทกราฟี

สารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตท	หลอดที่	ระบบตัวทำละลาย*	น้ำหนักแห้ง (กรัม)
EF1	1-31	ตั้งแต่ E100% : M0% ถึง E95% : M5%	0.06
EF2	32-50	ตั้งแต่ E90% : M10% ถึง E80% : M20%	0.95
EF3	51-80	ตั้งแต่ E75% : M25% ถึง E70% : M30%	3.90
EF4	81-90	ตั้งแต่ E65% : M35% ถึง E60% : M40%	0.62
EF5	91-180	ตั้งแต่ E55% : M45% ถึง E50% : M45%	1.25
EF6	181-210	ตั้งแต่ E45% : M55% ถึง E40% : M60%	0.30
EF7	211-250	ตั้งแต่ E35% : M65% ถึง E30% : M70%	0.34
EF8	251-290	ตั้งแต่ E25% : M75% ถึง E20% : M80%	0.46
EF9	291-710	ตั้งแต่ E15% : M85% ถึง E0% : M100%	0.27

หมายเหตุ : *ระบบตัวทำละลาย กำหนดให้ E คือ เอทิลอะซิเตท และ M คือ เมทานอล

4.4 ผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตท

4.4.1 ผลการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ผลการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตททั้งหมด 8 ส่วนย่อย ซึ่งเปรียบเทียบกับกราฟสารมาตรฐานกรดแกลลิก โดยใช้สมการ $y=0.0085x$, $R^2=0.9959$ (แสดงรูปและวิธีการคำนวณในภาคผนวก ก-1) พบว่า สารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดอยู่ในช่วง 273.76 ถึง 546.17 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมสารสกัด โดยสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 2 (EF2) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 546.17 ± 7.38 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมสารสกัด ส่วนสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 9 (EF9) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดน้อยที่สุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 273.76 ± 6.90 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมสารสกัด และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์พบว่า สารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงข้อมูลดังตารางที่ 4.6

เมื่อเปรียบเทียบแนวโน้มปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตท (EF) กับสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตท (ScE) พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตท (273.76 ถึง 546.17 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมสารสกัด) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากกว่าสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตท (439.09 ± 5.49 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมสารสกัด) โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีแนวโน้มลดลงตามระบบของตัวทำละลายที่ชะสารออกจากคอลัมน์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดอาจจะเป็นสารระดับชีวปานกลาง ซึ่งอาจจะอยู่ระหว่างสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 1-2 (EF1-EF2) ซึ่งจากงานวิจัยของ Liu *et al.* (2008) ศึกษาปริมาณสารสำคัญของสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทจากผลของมะขามป้อมซึ่งแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี และนำสารสกัดส่วนย่อยที่ได้มาวิเคราะห์หาสารสำคัญด้วยวิธี HPLC พบว่า สารสำคัญของสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทเป็นสารสำคัญชนิด เจรานิน (geranin) เคอร์ซีติน (quercetin) และคอร์ริลาจिन (corilagin) และงานวิจัยของ Mishra and Mahanta (2014) ได้นำสารสกัดจากเปลือกเมล็ด และเมล็ดของมะขามป้อมมาศึกษาหาสารสำคัญพบว่า สารสำคัญของเปลือกเมล็ด และเมล็ดของมะขามป้อมส่วนใหญ่จะเป็นสารประกอบฟีนอลิก เช่น กรดแกลลิก (gallic acid) นอกจากนี้ Mishra *et al.* (2015) นำสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมซึ่งสกัดจากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทมาทำการแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี และนำสารสกัดส่วนย่อยมาวิเคราะห์หาสารสำคัญพบว่า สารสำคัญส่วนใหญ่ของสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทนั้นจะมีขั้วระดับปานกลาง ซึ่งอาจเป็นสารประกอบจำพวกโพลีฟีนอล เช่น กรดแกลลิก คาทชิน (catechin) กรดคาเฟอิก (caffeic acid) เคอร์ซีติน กรดคูมาริก (*p*-coumaric acid) กรดวานิลลิก (vanillic acid) และคลอโรจินิก (chlorogenic acid) ซึ่งสารสำคัญเหล่านี้มีคุณสมบัติในการต่อต้านสารอนุมูลอิสระ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตท

สารสกัดส่วนย่อย เอทิลอะซิเตท	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด) \pm SD
EF2	546.17 ^a \pm 7.38
EF3	443.63 ^b \pm 8.69
EF4	421.15 ^c \pm 3.77
EF5	377.10 ^e \pm 5.38
EF6	398.93 ^d \pm 3.93
EF7	425.93 ^c \pm 3.86
EF8	322.63 ^f \pm 5.89
EF9	273.76 ^g \pm 6.90

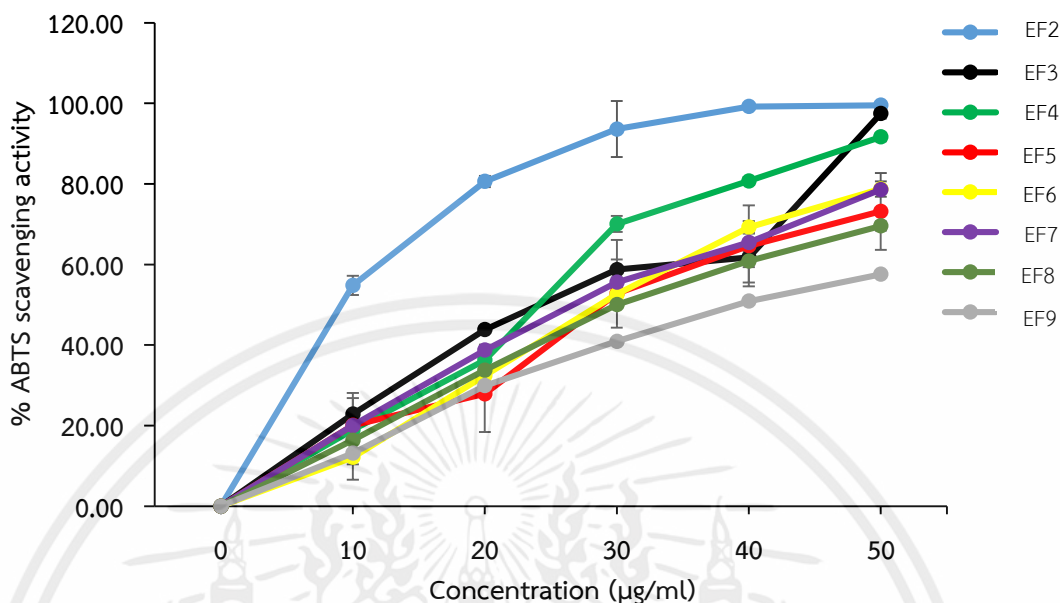
หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษ a-g ที่แตกต่างกันแสดงค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี DMRT อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

4.4.2 ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตททั้งหมด 8 สารสกัดส่วนย่อยด้วยวิธี ABTS, DPPH และ FRAP ซึ่งการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS จากการทดลองหาความเข้มข้นของสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทพบว่า ช่วงระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการหาเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS อยู่ในช่วงระหว่าง 0-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงดังรูปที่ 4.9 เมื่อคำนวณค่า IC₅₀ พบว่า สารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทมีค่า IC₅₀ อยู่ในช่วงระหว่าง 8.90 ถึง 39.35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 2 มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS ดีที่สุด มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 8.90 \pm 0.47 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 9 มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS น้อยที่สุด มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 39.35 \pm 4.08 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อเปรียบเทียบค่า IC₅₀ ของสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 2 กับสารมาตรฐานกรดแอสคอบิก (IC₅₀ เท่ากับ 34.35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) พบว่า สารส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 2 มีค่า IC₅₀ น้อยกว่าสารมาตรฐานกรดแอสคอบิก ประมาณ 4 เท่า แสดงให้เห็นว่า สารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 2 มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารมาตรฐานกรดแอสคอบิก แสดงข้อมูลดังตารางที่ 4.7

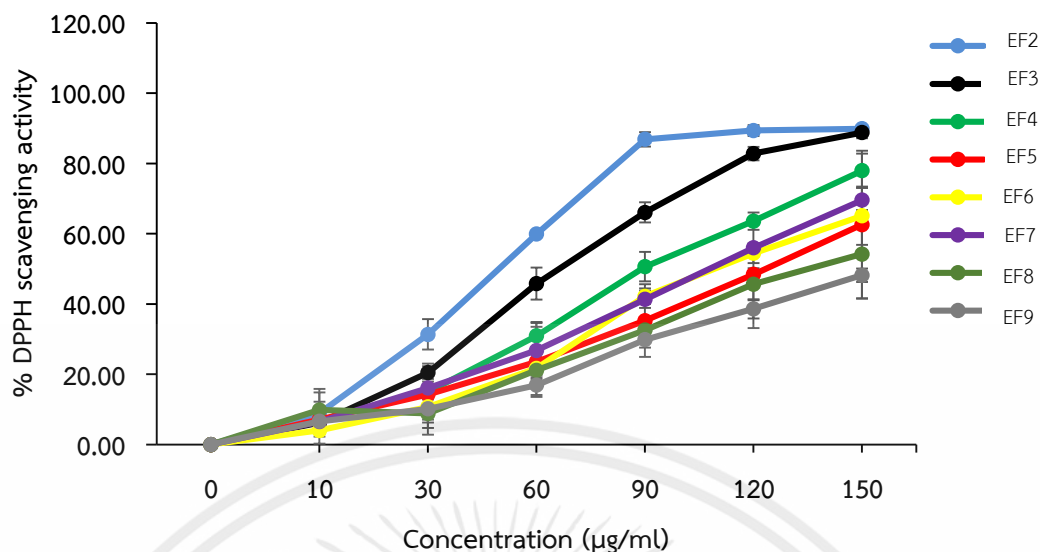
เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS ระหว่างสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตท (IC₅₀ เท่ากับ 31.53 \pm 0.36 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) กับสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตท ถ้าพิจารณาผลการทดลองพบว่า โดยรวมสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตท (IC₅₀ อยู่ในช่วงระหว่าง 8.90 ถึง 35.35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS ดีกว่าสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตท จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS อาจอยู่ระหว่างสารขั้วปานกลาง กล่าวคือ อาจอยู่ในสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 1 และ 2 ซึ่งใช้ทำการชะด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท : เมทานอล ในอัตราส่วน 100 : 0 ถึง 80 : 20 เปอร์เซ็นต์ โดยทั่วไปแล้วสารที่ชะออกจากคอลัมน์ด้วยอัตราส่วนนี้มักจะมีขั้วปานกลาง ซึ่งสารขั้วปานกลางที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระอาจจะเป็นสาร

ประเภทฟลาโวนอยด์ แอนโทไซยานิน (anthocyanin) เทอร์ปีนอยด์ และโพลีฟีนอล (Cowan, 1999; Yu *et al.*, 2009; Dehkharghanian *et al.*, 2010; Widyawati *et al.* 2015)



รูปที่ 4.9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS กับความเข้มข้นของสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตท (ไม่โครกรัมต่อมิลลิลิตร)

ส่วนการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทด้วยวิธี DPPH จากการทดลองหาความเข้มข้นของสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทพบว่า ช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมในการหาเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH อยู่ในช่วงระหว่าง 0-150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงดังรูปที่ 4.10 เมื่อคำนวณหาค่า IC_{50} พบว่า สารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 2 มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 49.34 ± 0.93 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อพิจารณาค่า IC_{50} เทียบกับสารมาตรฐานโพลีฟีนอลพบว่า มีค่า IC_{50} น้อยกว่าสารมาตรฐานโพลีฟีนอล (IC_{50} เท่ากับ 63.69 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ดังนั้นสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 2 มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารมาตรฐานโพลีฟีนอลถึง 1.3 เท่า ส่วนสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH น้อยที่สุด โดยมีค่า IC_{50} สูงที่สุด ซึ่งมีค่ามากกว่า 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คือ สารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 9 แสดงข้อมูลดังตารางที่ 4.7 เมื่อเปรียบเทียบค่า IC_{50} ระหว่างสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทกับสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทพบว่า ค่า IC_{50} เพิ่มขึ้นจากเดิม คือ 31.98 ± 0.32 เป็น 49.34 ± 0.93 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อาจเนื่องจากวิธี DPPH มีข้อจำกัด คือ มีความคงตัวและไม่ไวต่อปฏิกิริยาต่อสารที่มีฤทธิ์แรงและโครงสร้างขนาดใหญ่ ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่สามารถวัดความไวในการจับกันของสารต้านอนุมูลอิสระได้ (โสภา และคณะ, 2550) แสดงให้เห็นว่า สารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่แยกได้จากวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี อาจจะเป็นสารประกอบโพลีฟีนอลที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างแรงและโครงสร้างขนาดใหญ่ ส่งผลให้อนุมูล DPPH เข้าไปทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างได้ช้าจึงทำให้ค่า IC_{50} มีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม



รูปที่ 4.10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH กับความเข้มข้นของสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตท (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)

ตารางที่ 4.7 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตท

สารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตท	IC ₅₀ (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)±SD	
	ABTS	DPPH
EF2	8.90 ^a ±0.47	49.34 ^a ±0.93
EF3	23.82 ^b ±1.89	65.75 ^b ±6.01
EF4	24.03 ^b ±0.36	84.75 ^c ±1.78
EF5	29.67 ^{bc} ±4.75	107.36 ^d ±2.63
EF6	28.68 ^c ±0.73	106.93 ^d ±4.78
EF7	26.22 ^c ±0.93	107.27 ^d ±1.09
EF8	30.07 ^c ±0.89	124.56 ^e ±7.11
EF9	39.35 ^d ±4.08	>150
สารมาตรฐาน	34.35 [*]	63.69 [#]

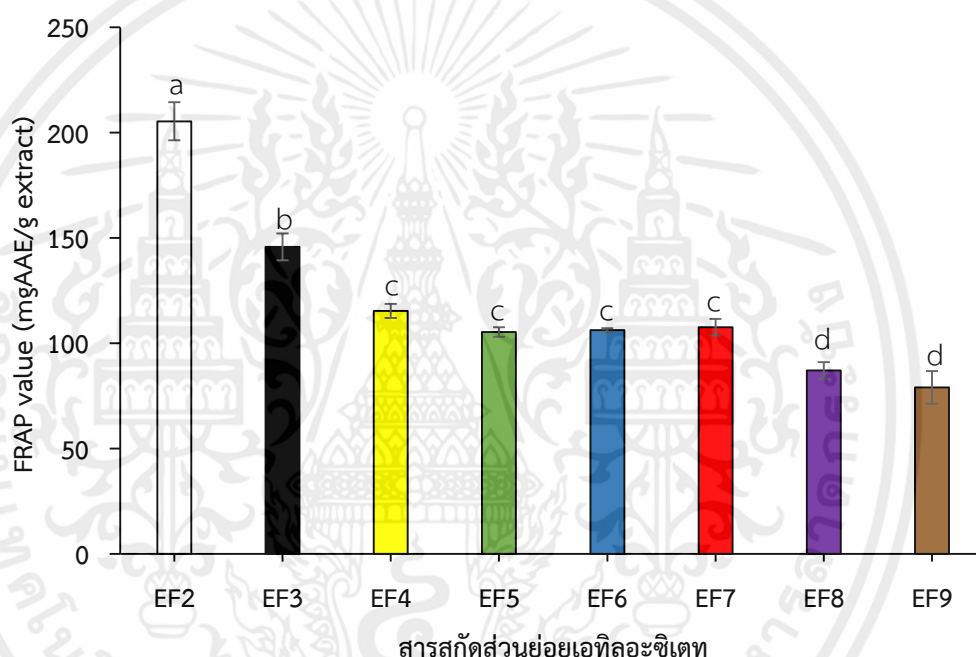
หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษ a-e ที่แตกต่างกันแสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี

DMRT อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

* ใช้กรดแอสคอบิกเป็นสารมาตรฐาน และ # ใช้โทรลิกซ์เป็นสารมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP จากการทดลองหาความเข้มข้นของสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทระหว่าง 0-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ใช้ในการหาความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} -TPTZ เป็น Fe^{2+} -TPTZ ของสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตท คือ 62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบกับกราฟของสารมาตรฐานกรดแอสคอบิก ($y=0.0152x$, $R^2=0.9940$) แสดงรูปและวิธีการคำนวณในภาคผนวกที่ ก-4 ซึ่งแสดงในหน่วยมิลลิกรัมแอสคอบิกต่อกรัมสารสกัด (mgAAE/g extract) พบว่า สารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 2 มีความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} -TPTZ สูงที่สุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 205.33 ± 9.09 มิลลิกรัมแอสคอบิกต่อกรัมสารสกัด ในขณะที่สารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 9 มีความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} -TPTZ ต่ำที่สุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 78.96 ± 7.69 มิลลิกรัมแอสคอบิกต่อกรัมสารสกัด แสดงดังรูปที่ 4.11



รูปที่ 4.11 กราฟแสดงความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} -TPTZ เป็น Fe^{2+} -TPTZ ของสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตท

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษ a-d ที่แตกต่างกันแสดงถึงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระซึ่งได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี DMRT แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เมื่อพิจารณาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระทั้ง 3 วิธีพบว่า สารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 2 มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระทั้ง 3 อนุกรม (ABTS, DPPH และ FRAP) ดีที่สุด และเมื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระพบว่า มีความสอดคล้องกัน กล่าวคือ สารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 2 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด ดังนั้นจึงส่งผลให้มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงเช่นกัน เมื่อสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 2 มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ดังนั้นจึงเลือกสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 2 มาทำการศึกษาฤทธิ์การปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชันต่อไป

4.4.3 ผลการศึกษาฤทธิ์การปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชัน

การศึกษาฤทธิ์การปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชันของสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตท และวัตเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT ในงานวิจัยนี้เลือกสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 2 เนื่องจากมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดมาใช้ในการศึกษา โดยศึกษาเซลล์ทั้งหมด 2 ชนิด ได้แก่ เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูชนิด L929 และเซลล์แมคโครฟาจของหนูชนิด RAW 264.7 จากการศึกษาฤทธิ์การปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชันของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตท ใช้ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นในการศึกษาฤทธิ์การปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชันของสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 2 จึงเลือกใช้ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทและสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทในการปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชัน

เมื่อเหนี่ยวนำให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูชนิด L929 เกิดสภาวะเครียดออกซิเดชันด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ (ชุดควบคุมเชิงบวก) เป็นเวลา 20 ชั่วโมงพบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูชนิด L929 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 62.75 ± 1.32 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการบ่มเซลล์ร่วมกันระหว่างสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 2 ที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ (สภาวะการทดลอง) เป็นเวลา 20 ชั่วโมงพบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูชนิด L929 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 100.24 ± 3.84 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ชุดควบคุมเชิงบวกกับสภาวะการทดลองพบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูชนิด L929 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเพิ่มขึ้นประมาณ 38 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการบ่มเซลล์ร่วมกันระหว่างสารมาตรฐานกรดแอสคอบิกที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ (ชุดควบคุมมาตรฐาน) เป็นเวลา 20 ชั่วโมงพบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูชนิด L929 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 101.69 ± 6.45 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์สภาวะการทดลองกับชุดควบคุมมาตรฐานพบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูชนิด L929 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเทียบเท่าชุดควบคุมมาตรฐาน แสดงดังรูปที่ 4.12

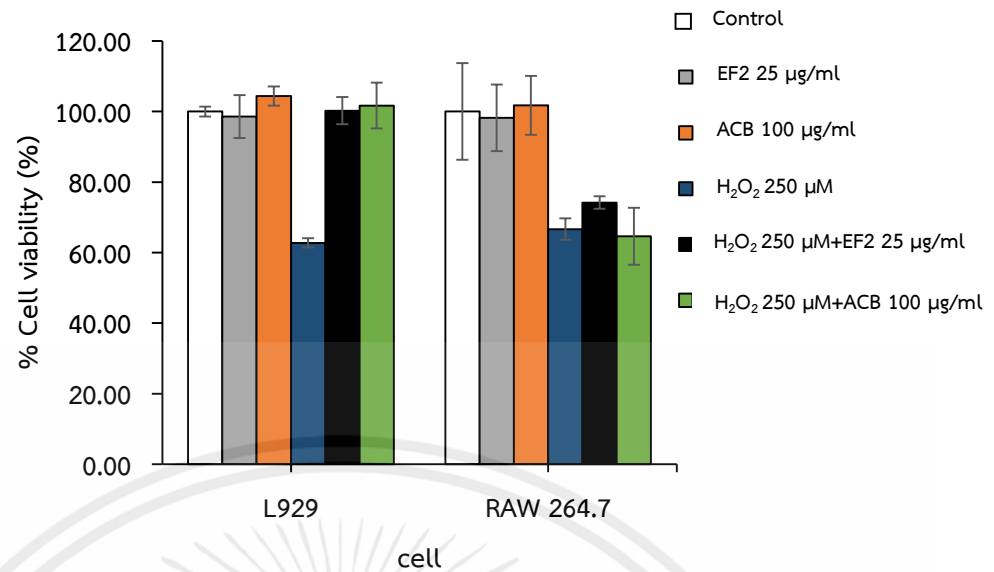
เมื่อเหนี่ยวนำให้เซลล์แมคโครฟาจของหนูชนิด RAW 264.7 เกิดสภาวะเครียดออกซิเดชันด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ (ชุดควบคุมเชิงบวก) เป็นเวลา 20 ชั่วโมงพบว่า เซลล์แมคโครฟาจของหนูชนิด RAW 264.7 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 66.64 ± 3.07 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการบ่มเซลล์ร่วมกันระหว่างสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 2 ที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ (สภาวะการทดลอง) เป็นเวลา 20 ชั่วโมงพบว่า เซลล์แมคโครฟาจของหนูชนิด RAW-264.7 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 74.19 ± 1.81 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ชุดควบคุมเชิงบวกกับสภาวะการทดลองพบว่า เซลล์แมคโครฟาจของหนูชนิด RAW-264.7 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเพิ่มขึ้น ประมาณ 8 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการบ่มเซลล์ร่วมกันระหว่างสารมาตรฐานกรดแอสคอบิกที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ (ชุดควบคุมมาตรฐาน) เป็นเวลา 20 ชั่วโมงพบว่า เซลล์แมคโครฟาจของหนูชนิด RAW 264.7 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 64.61 ± 8.10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์สภาวะการทดลองกับชุดควบคุมมาตรฐาน

พบว่า เซลล์แมคโครฟาจของหนูชนิด RAW 264.7 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากกว่าชุดควบคุมมาตรฐาน แสดงดังรูปที่ 4.12

จากการศึกษาฤทธิ์การปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชันของสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 2 แสดงให้เห็นว่า สารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 2 มีประสิทธิภาพในการปกป้องเซลล์ทั้งสองชนิดจากสภาวะเครียดออกซิเดชันได้ โดยทั้งเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูชนิด L929 และเซลล์แมคโครฟาจของหนูชนิด RAW 264.7 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเพิ่มขึ้นประมาณ 38 และ 8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทกับสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 2 พบว่า สารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 2 มีฤทธิ์ช่วยส่งเสริมให้เซลล์ทั้งสองชนิดมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากกว่าสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตท

จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระทั้ง 3 วิธี (ABTS, DPPH และ FRAP) พบว่า สารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 2 อาจจะเป็นสารที่มีขั้วระดับขั้วปานกลาง ดังนั้นสารกลุ่มนี้มีแนวโน้มเป็นสารประเภทฟลาโวนอยด์ แอนโทไซยานิน เทอร์ปีนอยด์ และโพลีฟีนอล ซึ่งจากงานวิจัยเกี่ยวกับสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ หรือโพลีฟีนอลที่ช่วยปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชันได้ เช่น สารเคออสิทินโดยเป็นสารประเภทฟลาโวนอยด์จาก *Echinophora cinerea* มาศึกษาฤทธิ์การปกป้องเซลล์เนื้อเยื่อหมวกไตของหนูชนิด PC12 จากสภาวะเครียดออกซิเดชัน โดยเมื่อบ่มสารเคออสิทินที่ความเข้มข้น 3-25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์พบว่า เซลล์เนื้อเยื่อหมวกไตของหนูชนิด PC12 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเพิ่มขึ้นจาก 45.94 เปอร์เซ็นต์ เป็น 50-75 เปอร์เซ็นต์ (Shokoohinia *et al.*, 2017) และสารแอนโทโรไซยานินซึ่งเป็นสารจำพวกโพลีฟีนอลจาก *Aronia melanocarpa* ที่สามารถปกป้องเซลล์ตับอ่อนของหนูชนิด β TC3 จากสภาวะเครียดออกซิเดชัน เมื่อทำการบ่มสารแอนโทโรไซยานินที่ความเข้มข้น 1-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์พบว่า เซลล์มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเพิ่มขึ้นจาก 45 เปอร์เซ็นต์ เป็น 70-100 เปอร์เซ็นต์ (Rugina *et al.*, 2015) เช่นเดียวกับสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 2 ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ช่วยส่งเสริมและมีประสิทธิภาพในการปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชันได้ ซึ่งทำให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูชนิด L929 และเซลล์แมคโครฟาจของหนูชนิด RAW264.7 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเพิ่มขึ้นประมาณ 38 และ 8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูชนิด L929 และเซลล์แมคโครฟาจของหนูชนิด RAW 264.7 ซึ่งเปรียบเทียบกับเซลล์หลุมควบคุม (Control) □ กับเซลล์ที่บ่มร่วมกับสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 2 (EF2) ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร □ สารมาตรฐานกรดแอสคอบิก (ACB) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ■ สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ ■ สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์กับสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 2 ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ■ สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์กับสารมาตรฐานกรดแอสคอบิก ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ■ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง และวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT

4.4.4 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทต่อเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. subtilis* ATCC 6633, *B. cereus* DMST 5040, *M. luteus* ATCC 9341, *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. aureus* TISTR 1466 และ *P. acnes* DMST 14916 โดยเชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ ยกเว้นเชื้อ *P. acnes* DMST 14916 ทดสอบด้วยวิธี paper disc diffusion ใช้สารสกัดความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อดิสก์ และใช้ยาปฏิชีวนะ gentamycin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ เป็นตัวควบคุมเชิงบวก และใช้สารละลาย DMSO : น้ำ (1 : 1 โดยปริมาตร) เป็นตัวควบคุมเชิงลบพบว่า สารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตททุกสารสกัดส่วนย่อยมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ โดยพบว่า สารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 3 (EF3) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ *M. luteus* ATCC 9341, *S. epidermidis* ATCC 12228 และ *S. aureus* TISTR 1466 ได้ดีที่สุด ซึ่งวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสเท่ากับ 16.05 ± 1.15 , 8.52 ± 1.24 และ 12.79 ± 0.67 มิลลิเมตร ตามลำดับ

ในขณะที่สารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 4 (EF4) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ATCC 6633 และ *B. cereus* DMST 5040 ได้ดีที่สุด ซึ่งวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสเท่ากับ 12.30 ± 0.90 และ 13.89 ± 0.71 มิลลิเมตร ตามลำดับ แสดงดังตารางที่

4.8 โดยแสดงตัวอย่างการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทต่อเชื้อ *B. subtilis* ATCC 6633 ใช้สารสกัดความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อดิสก์ในรูปที่ 4.13

จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าแนวโน้มของฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียอยู่ระหว่างสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 3 ถึง 5 (EF3-EF5) ซึ่งถ้าพิจารณาระบบตัวทำละลายที่ชะสารออกจากคอลัมน์แล้วพบว่า เป็นระบบตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท : เมทานอล ในอัตราส่วน 75 : 25 ถึง 50 : 50 เปอร์เซ็นต์ มีแนวโน้มเป็นสารที่มีขั้วค่อนข้างสูง เช่น น้ำตาล (sugar) กรดอะมิโน (amino acid) ไกลโคไซด์ (glycoside compounds) และอัลคาลอยด์ (alkaloid) (Houghton and Raman, 1998) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Jasim *et al.* (2015) ที่สกัดสารอัลคาลอยด์จากใบของมะแว้งนก (*Solanum nigrum*) จากนั้นวิเคราะห์หาสารสำคัญด้วยวิธี gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) และศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* พบว่า สารอัลคาลอยด์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ได้ ซึ่งวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสได้เท่ากับ 6.90 ± 0.61 มิลลิเมตร (ดิสก์มีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 5 มิลลิเมตร) เช่นเดียวกับกับรายงานวิจัยของ Tseng *et al.* (2014) ได้กล่าวว่าสารสกัดจากเมล็ดลำไยที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่จะเป็นสาร bioactive compound เช่น เอทิลแกลเลท กรดแกลลิก กรดแอลลาจิก และกรดคลอริลาจिन เป็นต้น

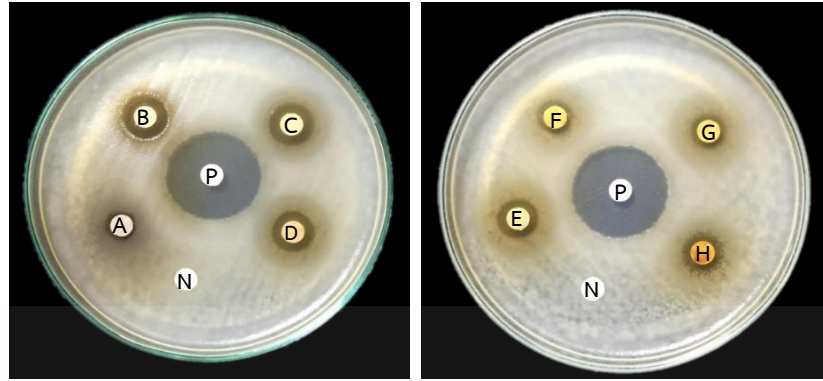
สำหรับการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทต่อเชื้อที่ก่อให้เกิดสิว *P. acnes* DMST 14916 ทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion ใช้ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อหลุม ใช้ยาปฏิชีวนะ clindamycin ความเข้มข้น 1.25 ไมโครกรัมต่อหลุม เป็นตัวควบคุมเชิงบวก และใช้สารละลาย DMSO : น้ำ (1 : 1 โดยปริมาตร) เป็นตัวควบคุมเชิงลบพบว่า สารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acnes* DMST 14916 ได้ทุกสารสกัดส่วนย่อย โดยเฉพาะสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 4 มีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acnes* DMST 14916 ได้ดีที่สุด ซึ่งวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสได้เท่ากับ 26.41 ± 1.99 มิลลิเมตร ซึ่งแสดงค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสดังตารางที่ 4.8 แสดงลักษณะของบริเวณวงใสของการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทต่อเชื้อ *P. acnes* DMST 14916 ใช้สารสกัดความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อหลุมในรูปที่ 4.14 และจากผลการทดลองพบว่า ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acnes* DMST 14916 เพิ่มขึ้นจากสารส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 2-4 (EF2-EF4) ซึ่งส่วนใหญ่อาจมาจากสารสำคัญที่มีความเป็นขั้วระดับปานกลาง โดยสารที่มีขั้วปานกลางถึงขั้วสูงนั้นอาจจะมีน้ำหนักและมวลโมเลกุลที่ต่ำ ทำให้สารมีการแพร่กระจายตัวของได้ดี (Yu *et al.*, 2009) ดังนั้นอาจมีผลทำให้ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ *P. acnes* DMST 14916 ได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

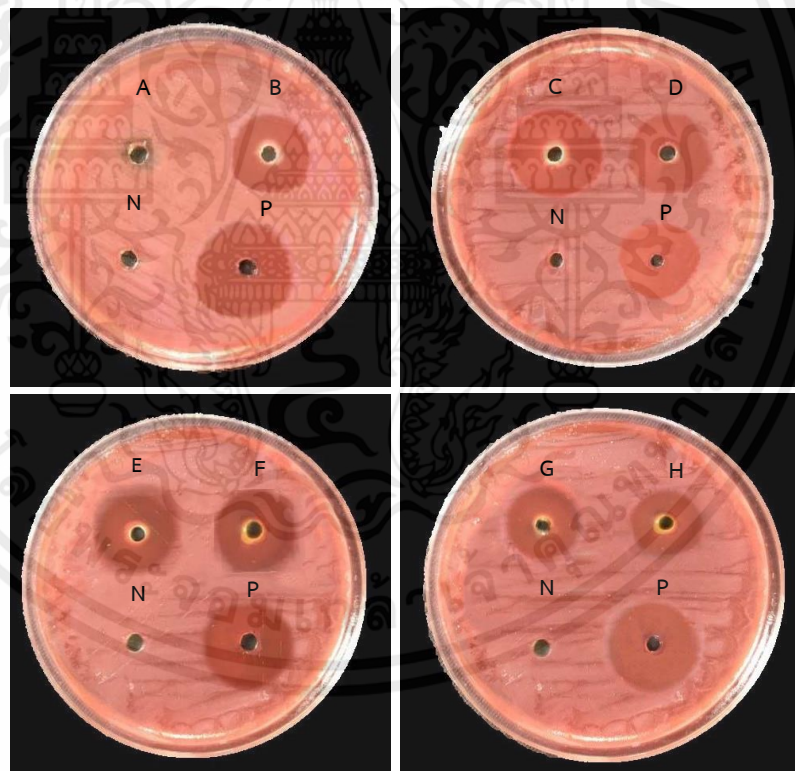
ตารางที่ 4.8 แสดงเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตท

สารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตท	ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใส (มิลลิเมตร)±SD					
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>B. cereus</i> DMST 5040	<i>M. luteus</i> ATCC 9341	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	<i>S. aureus</i> TISTR 1466	<i>P. acnes</i> DMST 14916
EF2	7.52 ^d ±0.45	7.42 ^h ±0.44	16.07 ^a ±0.58	6.56 ^c ±0.26	9.42 ^e ±0.25	7.47 ^f ±0.72
EF3	12.27 ^a ±0.44	12.10 ^{bc} ±0.90	16.05 ^a ±1.15	8.52 ^a ±1.24	12.79 ^a ±0.67	21.55 ^{cd} ±0.43
EF4	12.30 ^a ±0.90	13.89 ^a ±0.71	15.17 ^{ab} ±1.00	8.06 ^{ab} ±0.21	12.09 ^a ±0.33	26.41 ^a ±1.99
EF5	11.57 ^a ±1.14	12.83 ^{ab} ±0.89	14.92 ^c ±0.36	7.44 ^{bc} ±0.85	11.01 ^b ±0.54	23.15 ^{bc} ±1.06
EF6	10.26 ^b ±0.32	11.19 ^{cd} ±1.44	12.16 ^d ±0.34	6.59 ^c ±0.38	10.73 ^{bc} ±0.84	23.21 ^{bc} ±0.94
EF7	7.90 ^d ±0.46	10.27 ^{de} ±0.86	9.81 ^e ±0.37	6.54 ^c ±0.22	9.73 ^{de} ±0.73	24.62 ^{ab} ±2.24
EF8	8.62 ^{cd} ±1.30	9.58 ^{ef} ±0.57	12.69 ^d ±0.57	6.88 ^c ±0.37	9.16 ^e ±0.61	20.79 ^c ±0.73
EF9	9.25 ^{bc} ±0.90	8.55 ^{gh} ±1.30	12.14 ^d ±0.69	6.82 ^c ±0.42	9.31 ^e ±1.19	18.05 ^e ±0.79
ยาปฏิชีวนะ	24.79±0.50 [#]	27.95±1.26 [#]	29.52±1.64 [#]	27.91±0.66 [#]	24.85±1.20 [#]	26.23±1.66 [*]

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษ a-h ที่แตกต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสจากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี DMRT อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ และค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
 # ใช้ยาปฏิชีวนะเจนตรามัยซิน ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์
 * ใช้ยาปฏิชีวนะคลินดามัยซิน ความเข้มข้น 1.25 ไมโครกรัมต่อหลุม



รูปที่ 4.13 แสดงผลตัวอย่างการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตตต่อเชื้อ *B. subtilis* ATCC 6633 โดยใช้ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อดิสก์ : ตัวอักษร A แทนสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตตที่ 2 (EF2), B คือ EF3, C คือ EF4, D คือ EF5, E คือ EF6, F คือ EF7, G คือ EF8, H คือ EF9, N คือ negative control และ P คือ positive control



รูปที่ 4.14 แสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตตต่อเชื้อ *P. acnes* DMST 14916 โดยใช้สารสกัดความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อหลุม : ตัวอักษร A คือสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตตที่ 2 (EF2), B คือ EF3, C คือ EF4, D คือ EF5, E คือ EF6, F คือ EF7, G คือ EF8, H คือ EF9, N คือ negative control และ P คือ positive control

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

นำสารสกัดหยาบเมทานอลจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อมมาสกัดด้วยวิธี liquid-liquid extraction โดยใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ เมื่อนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดพบว่า สารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด เมื่อศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระทั้ง 3 วิธี คือ ABTS, DPPH และ FRAP พบว่า สารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดทั้ง 3 วิธี และศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทในการปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชันพบว่า สารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทที่ระดับความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการปกป้องเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูชนิด L929 และเซลล์แมคโครฟาจของหนูชนิด RAW 264.7 จากสภาวะเครียดออกซิเดชันจากการเหนี่ยวนำจากสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ได้ โดยทั้งเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูชนิด L929 และเซลล์แมคโครฟาจของหนูชนิด RAW 264.7 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเพิ่มขึ้น ประมาณ 18 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ สารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *B. subtilis* ATCC 6633, *B. cereus* DMST 5040, *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. aureus* TISTR 1466 และ *M. luteus* ATCC 9341 ได้ ในขณะที่ สารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นบิวทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acnes* DMST 14916 ได้ดีที่สุด จากการทดลองพบว่า สารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์การปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชัน และฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียดีที่สุด ดังนั้นจึงนำสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตทมาทำการแยกให้บริสุทธิ์วิธีคือคอลลัมน์โครมาโทกราฟี สามารถแยกเป็นสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate fraction; EF) ได้ทั้งหมด 9 สารสกัดส่วนย่อย เมื่อนำสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตททั้งหมด ยกเว้นสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 1 (EF1) มาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอีกครั้งพบว่า สารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 2 (EF2) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระทั้ง 3 วิธี คือ ABTS, DPPH และ FRAP ดีที่สุด และยังมีประสิทธิภาพในการช่วยปกป้องเซลล์เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูชนิด L929 และเซลล์แมคโครฟาจของหนูชนิด RAW 264.7 จากสภาวะเครียดออกซิเดชันได้ ในขณะที่สารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 3 (EF3) มีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *M. luteus* ATCC 9341, *S. epidermidis* ATCC 12228 และ *S. aureus* TISTR 1466 ดีที่สุด ส่วนสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทที่ 4 (EF4) มีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ATCC 6633, *B. cereus* DMST 5040 และ *P. acnes* DMST 14916 ดีที่สุด จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า EF2 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระดีที่ที่สุด และยังมีฤทธิ์การปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชันได้ ส่วน

EF4 มีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ดีที่สุด ดังนั้นจึงมีความสนใจที่จะนำ EF2 และ EF4 ไปศึกษาองค์ประกอบของสารสำคัญ และพัฒนาต่อไปเป็นผลิตภัณฑ์ทางยา เช่น ผลิตภัณฑ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดสิว หรือผลิตภัณฑ์อาหารเสริมช่วยในชะลอความชราภาพ เป็นต้น

5.2 ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยฉบับนี้เป็นเพียงการทดสอบเบื้องต้นในระดับห้องปฏิบัติการซึ่งศึกษาเกี่ยวกับการหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์การปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชัน และฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียเท่านั้น ซึ่งจากการทดลองพบว่า สารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามป้อมมีฤทธิ์ดังกล่าวทั้งหมดดีที่สุด หากจะนำสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตท หรือสารสกัดส่วนย่อยเอทิลอะซิเตทไปต่อยอด ควรศึกษาเกี่ยวกับการหาค่าประเภททางเคมีและสูตรโครงสร้างของสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ หรือหากจะพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ทางยาควรศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ เพิ่มเติม เช่น ฤทธิ์การต้านการอักเสบ ฤทธิ์การระคายเคืองต่อผิวหนัง หรือฤทธิ์การสมานแผล เป็นต้น



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กาญจนา ตีวิเศษ, ไฉน น้อยแสง, ลักข์ชัย โปรดธนสาร และศิริพร ประทีปอรุโณทัย. 2544.

น้ำสมุนไพร 108. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก.

กล่าวขวัญ ศรีสุข. 2556. **หลักการและเทคนิคพื้นฐานการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์.** กรุงเทพฯ : โอ.เอส.พรินติ้ง เฮ้าส์.

ชนิดา กานต์ประชา, ชาญณรงค์ นาคจำรัสศรี และวิศรุต บุรณสังจะ. 2548. **การแยกสารสำคัญในสารสกัดมะขามป้อม.** กรุงเทพฯ : คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ธนภุต แก้วสงวน, พรพรรณ น้าวิไลเจริญ และพรหมพร มะโนนิก. 2559. “เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SRAP และฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของสารสกัดเมล็ดมะขามป้อม.” โครงการงานพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

บุหรัน พันธุ์สุวรรณ. 2556. “อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ.” *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.* 21 : 275-286.

นลินภัทร์ ศักดิ์ดีสุนทร, อ้อมบุญ วัลลิสุต, ธิดารัตน์ บุญรอด, อัศวชัย ช่วยพรหม, นงนุช มณีฉาย, ปิยะวรรณ บุชา, บุญญาณี ศุภผล, ณรงค์ชัย พ่วงปาน และธิดารัตน์ อินถาวร. 2554. **การวิเคราะห์คุณภาพสมุนไพรด้วยวิธีทีแอลซี.** นนทบุรี : สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ.

เนตรนภา เมยกลาง และเฉลิม เรื่องวิริยะชัย. 2557. “การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ในเครื่องดื่มน้ำผลไม้.” *Khon Kaen University research journal.* 14 : 69-79.

ประสาทพร บริสุทธิ์เพชร, พิทัย กาญจนบุตร และสาธิต พรตระกูลพิพัฒน์. 2551. “การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ.” *ประชุมวิชาการสัตวแพทย์.* 91-101.

ปริยพันธ์ บัวสด. 2549. “การตรวจสอบความสามารถในการเป็นสารแอนตีออกซิแดนท์ของเครื่องดื่มชาโดยวิธีไซคลิกโวลแทมเมตรี.” *วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยศิลปากร.*

ปราณี นันทศรี และวาสนา ภาวะเวช. 2549. **แผนที่โครมาโทกราฟีผิวบางของพฤษเคมีในสมุนไพร 24 ชนิด.** กรุงเทพฯ : สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

ปนัดดา พัฒนาคิน. 2552. **รงค์เลขผิวบาง (Thin layer chromatography) การประยุกต์ใช้ในงานวิจัยยาและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ.** ปทุมธานี : มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

พยุงค์ศักดิ์ ตันติไพบูลย์วงศ์ และสุรศักดิ์ ใจเขียนดี. 2555. **การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลตีพีพีเอชและการฟอกสีอนุมูลเอบีทีเอส.** เชียงใหม่ : นพบุรีการพิมพ์.

พัชวรรณ ชูศิลป์กุล. 2558. “การพัฒนาสารสกัดฟ้าทะลายโจรเพื่อใช้ในตำรับเจลแต้มสิว.” *วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง คณะวิทยาศาสตร์ เครื่องสำอาง, มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง.*

มูลนิธิการแพทย์แผนไทยพัฒนา. 2549. **พฤษชาติสมุนไพร.** นนทบุรี : ศูนย์พัฒนาตำราการแพทย์ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น แผนไทย. มิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วันดี ญาณไพศาล. 2543. “มะขามป้อม: ตัวแทนผลิตภัณฑ์สมุนไพรใหม่.” *วารสารมหาวิทยาลัยศิลปากร.*

- สุภกร บุญยืน, ธนัทภัทร เพชรรัตน์, ละมัย พวงบุรี และอริคุณ ศรีไพร. 2558. “การต้านอนุมูลอิสระและการต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากโบทัน.” *Thai journal of science and technology*. 4 : 37-45.
- สุภาภรณ์ ปิติพร. 2548. “มะขามป้อมสมุนไพรที่ไม่ควรมองข้าม.” *นิตยสารหมอชาวบ้าน*. 6 : 309-312.
- ศรีสุดา ไททอง, สุนิตรา คามิศักดิ์, จอมใจ ชลาเขต, อนัญญา เอกพันธ์ และไพโรจน์ อ่อนบุญ. 2559. “การศึกษาคุณลักษณะทางกายภาพของผลมะขามป้อมในสายพันธุ์ต่างๆ” *วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์*. 3 : 13-22.
- อธิป ลิขิตลิลิต. 2557. **อนุมูลอิสระแหล่งกำเนิดและการเกิดโรค**. กรุงเทพฯ : ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล.
- อธิป สุกุลเผือก. 2559. **อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ**. สงขลา : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- อุดมลักษณ์ สุขอืดตะ, ประภัสสร รักถาวร, นคร เหลืองประเสริฐ, นवलปรารค์ ไชยตะขบ และนิภา เชื้อนควบ. 2553. “สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากมะขามป้อม 12 สายพันธุ์.” *วารสารสำนักการแพทย์ทางเลือก*. 3 : 20-27.
- โอภา วัชรคุปต์, ปรีชา บุญจุง, จันทนา บุญยะรัตน์ และมาลีรักษ์ อัดต์สินทอง. 2549. **สารต้านอนุมูลอิสระ Radical Scavenging Agent**. กรุงเทพฯ : พี.เอส.พี.รินทร์.
- โอภา วัชรคุปต์, ปรีชา บุญจุง, จันทนา บุญยะรัตน์ และมาลีรักษ์ อัดต์สินทอง. 2550. **สารต้านอนุมูลอิสระ**. กรุงเทพฯ : นิวไทยมิตรการพิมพ์.
- Abu, F., Taib, C.N., Moklas, M.A. and Akhir, S.M. 2017. “Antioxidant properties of crude extract, partition extract, and fermented medium of *Dendrobium sabin* flower.” *Evidence-based complementary and alternative medicine*. 29 : 1-9.
- Adetutu, A., Morgan, W.A. and Corcoran, O. 2011. “Antibacterial, antioxidant and fibroblast growth stimulation activity of crude extracts of *Bridelia ferruginea* leaf, a wound-healing plant of Nigeria.” *Journal of ethnopharmacology*. 133 : 116-119.
- Anbuselvi, S. and Jha, M. 2015. “Phytochemical and antimicrobial activity of *Emblica officinals* seed extract.” *Journal of pharmaceutical research*. 4 : 1336-1341.
- Armania, N., Yazan, L.S., Musa, S.N., Ismail, I.S., Foo, J.B., Chan, K.W., Noreen, H., Hisyam, A. H. , Zulfahmi, S. and Ismail, M. 2013. “*Dillenia suffruticosa* exhibited antioxidant and cytotoxic activity through induction of apoptosis and G2/M cell cycle arrest.” *Journal of ethnopharmacology*. 146 : 525-535.
- Beedessee, G., Ramanjooloo, A., Aubert, G. and Eloy, L. 2012. “Cytotoxic activities of hexane, ethyl acetate and butanol extracts of marine sponges from mauritian waters on human cancer cell line.” *Environmental toxicology and pharmacology*. 34 : 397-408.
- Block, G. 1992. “The data support a role for antioxidants in reducing cancer risk.” *Nutrition reviews*. 50 : 207-213.

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์ของศูนย์วิจัยสมุนไพรและผลิตภัณฑ์สุขภาพ มหาวิทยาลัยบูรพา
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกหรือเผยแพร่และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M. and Cork, H. 2004. "Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer." *Life sciences*. 74 : 2157-2184.
- Chansriniyom, C., Bunwatcharaphansakun, P., Eaknai, W., Nalinratana, N., Ratanawong, A., Khongkow, M. and Luechapudiporn, R. 2018. "A synergistic combination of *Phyllanthus emblica* and *Alpinia galanga* against H₂O₂- induced oxidative stress and lipid peroxidation in human ECV304 cells." *Journal of functional foods*. 43 : 44-54.
- Chaudhary, S.S., Tariq, M., Zaman, R. and Imtiyaz, S. 2013. "The *in vitro* anti-acne activity of two unani drugs." *Ancient science of life*. 33 : 35-38.
- Choi, J.Y., Kim, H. and Ishihara, A. 2010. "Cytoprotective activities of hydroxycinnamic acid amides of serotonin against oxidative stress-induced damage in Hep G2 and HaCaT cells." *Fitoterapia*. 81 : 1134-1141.
- Clinical and laboratory standards institute (CLSI). 2012. **M02- A11- Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard**. 11th ed. Wayne, Pennsylvania: Clinical and laboratory standards institute.
- Cowan, M.M. 1999. "Plant product as antimicrobial agents." *Journal of microbiology reviews*. 12 : 564-582.
- Dehkharghanian, M., Adenier, H. and Vijayalakshmi, M.A. 2010. "Analytical methods study of flavonoids in aqueous spinach extract using positive electrospray ionisation tandem quadrupole mass spectrometry." *Food chemistry*. 121 : 863-870.
- Dinesh, M., Roopan, S.M. and Selvaraj, C.I. 2016. "Photocatalytic degradation of nitrophenol using biologically active *Phyllanthus emblica* seed extract." *Journal of phytochemistry and phytobiology B*. 161 : 273-278.
- Dinesh, M., Roopan, S.M., Selvaraj, C.I. and Arunachalam, P. 2017. "*Phyllanthus emblica* seed extract mediated synthesis of PdNPs against antibacterial, hemolytic and cytotoxic studies." *Photochemistry and photobiology*. 167 : 64-71.
- Heo, S.J., Ko, S.C., Kang, S.M., Kang, H.S., Kim, J.P., Kim, S.H., Lee, K.W., Cho, M.G. and Jeon, Y.J. 2008. "Cytoprotective effect of fucoxanthin isolated from brown algae *Sargassum siliquastrum* against H₂O₂-induced cell damage." *European food research and technology*. 228 : 145-151.
- Iamsaard, S., Arun, S., Burawat, J., Sukhorum, W., Wattanathorn, J., Nualkaew, S. and Sripanidkulchai, B. 2014. "Phenolic contents and antioxidant capacities of Thai-Makham Pom (*Phyllanthus emblica* L.) aqueous extracts." *Journal Zhejiang University science B*. 15 : 405-408.

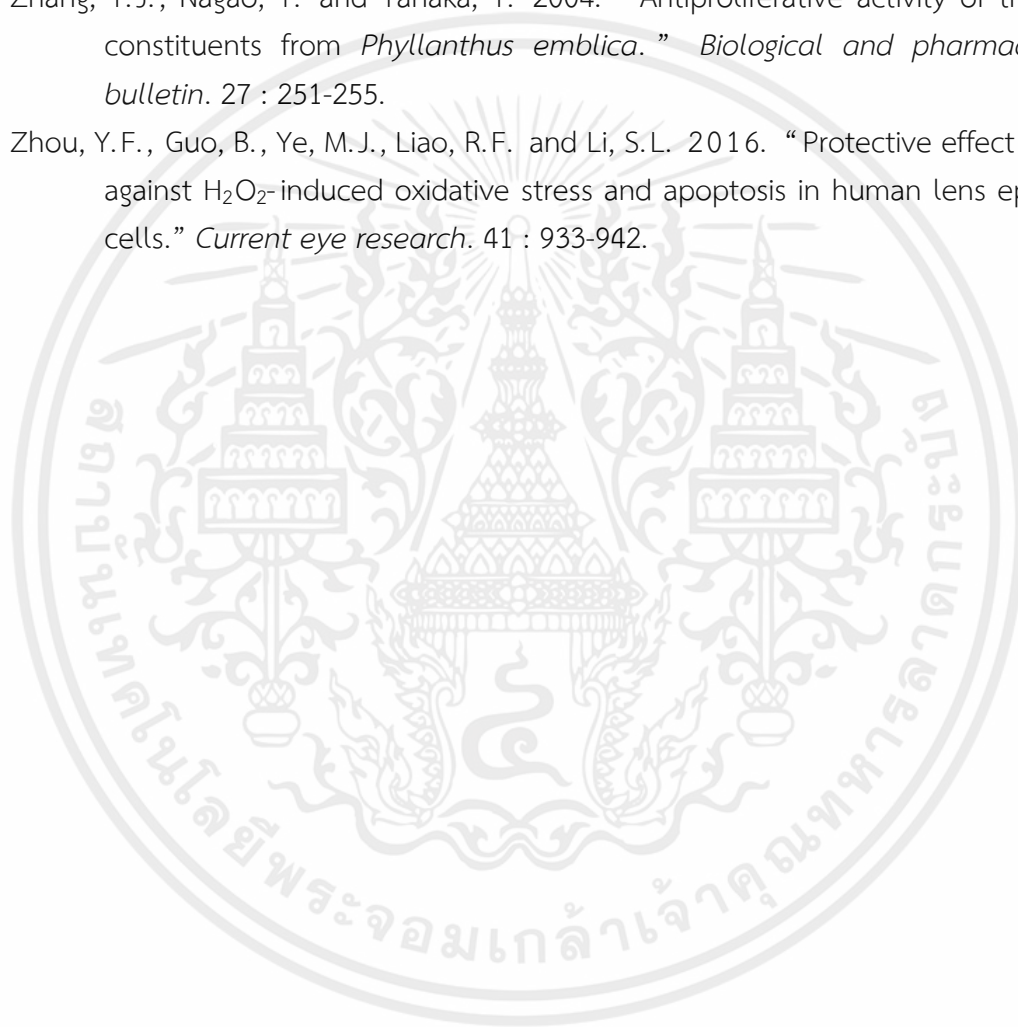
- Jamshidzadeh, A. and Mehrabadi, A.R. 2010. "Protective effect of quercetin on oxidative stress in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient erythrocytes *in vitro*." *Iranian journal of pharmaceutical research*. 9 : 169-175.
- Jasim, H., Hussein, A.O., Hameed, I.H. and Kareem, M.A. 2015. "Characterization of alkaloid constitution and evaluation of antimicrobial activity of *Solanum nigrum* using gas chromatography mass spectrometry (GC-MS)." *Journal of pharmacognosy and phytotherapy*. 7 : 56-72.
- Kumar, A., Singh, A. and Singh, B. 2014. "Assessment of therapeutic potential of *Phyllanthus emblica* (amla): a natural godsend." *International journal of cell science and biotechnology*. 3 : 4-13.
- Kaur, J.M. 2017. "Chemistry and biological activities of phenolic compounds from amla (*Phyllanthus emblica*) seed coat." Master of Science, Department of Chemistry, College of Basic sciences and Humanities, Punjab Agricultural University.
- Kuete, V., Kanga, J., Sadjo, L.P., Ngameni, B., Poumale, H.M., Ambassa, P. 2011. "Antimicrobial activity of methanol extract, fractions and compounds from *Ficus polita* Vahl. (Moraceae)." *BMC complementary and alternative medicine*. 11 : 1-6.
- Liu, X., Cui, C., Zhao, M., Wang, J., Luo, W., Yang, B., and Jiang, Y. 2008. "Identification of phenolics in the fruit of emblica (*Phyllanthus emblica* L.) and their antioxidant activities." *Food chemistry*. 109 : 909-915.
- Liu, X., Zhao, M., Wu, K., Chai, K., Yu, H., Tao, Z. and Wang, J. 2012. "Immunomodulatory and anticancer activities of phenolics from emblica fruit (*Phyllanthus emblica* L.)." *Food chemistry*. 131 : 685-690.
- Luo, X., Zhang, H., Duan, Y. and Chen, G. 2018. "Protective effects of radish (*Raphanus sativus* L.) leaves extract against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in human fetal lung fibroblast (MRC-5) cells." *Biomedicine and pharmacotherapy*. 103 : 406-414.
- Mathur, M., Sharma, R., Sharma, J., Pareek, R. and Kamal, R. 2012. "Phytochemical screening and antimicrobial activity of *Phyllanthus niruri* Linn." *Applied botany*. 46 : 8487-8489.
- Meerungrueang, W. and Panichayupakaranant, P. 2014. "Antimicrobial activities of some Thai traditional medical longevity formulations from plants and antibacterial compounds from *Ficus foveolata*." *Pharmaceutical biology*. 52 : 1104-1109.
- Meyer, J.J., Kooy, F.V. and Joubert, A. 2007. "Identification of plumbagin epoxide as a germination inhibitory compound through a rapid bioassay on TLC." *South african journal of botany*. 73 : 654-656.

- Mishra, P. and Mahanta, C.L. 2014. "Comparative analysis of functional and nutritive values of amla (*Emblica officinalis*) fruit, seed and seed coat powder." *American journal of food technology*. 9 : 151-161.
- Mishra, P., Dutta, N. and Mahanta, C.L. 2015. "Partial extraction and identification of phenolics in Amla (*Emblica officinalis*) seed coat powder." *Journal of food science and technology*. 52 : 6990-7001.
- Mondal, R., Polash, S.A., Saha, T., Islam, Z., Siklder, M.M., Alam, N. and Sarker, S.R. 2017. "Investigation of the phytoconstituents and bioactivity of various parts of wild type and cultivated *Phyllanthus emblica* L." *Advance in bioscience and biotechnology*. 8 : 211-227.
- Morton, J.F. 1960. "The Emblic (*Phyllanthus emblica* L.)." *Economic botany*. 14 : 119-128.
- Nadheesha, M., bamunuarachchi, A., Edirisinghe, E. and Weerasinghe, W. 2007. "Studies on antioxidant activity of Indian gooseberry fruit and seed." *Journal of science of the University of Kelaniya Sri Lanka*. 3 : 83-92.
- Nambiar, S. S. , Paramesha, M. and Shetty, N.P. 2015. "Comparative analysis of phytochemical profile, antioxidant activities and foam prevention abilities of whole fruit, pulp and seeds of *Emblica officinalis*." *Journal of food science and technology*. 52 : 7254-7262.
- Namiesnik, J., Vearasilp, K., Kupska, M., Ham, K.S., Kang, S.G., Park, Y.K., Barasch, D., Nemirovski, A. and Gorinstein, S. 2013. "Antioxidant activities and bioactive components in some berries." *European journal of food research and technology*. 237 : 819-829.
- Njeru, S.N., Obonyo, M.A., Nyambati, S.O. and Ngari, S.M. 2015. "Antimicrobial and cytotoxicity properties of the crude extracts and fractions of *Premna resinosa* (Hochst.) Schauer (Compositae): Kenyan traditional medicinal plant." *BMC complementary and alternative medicine*. 15 : 295-304.
- Priya, G., Parminder, N. and Jaspreet, S. 2012. "Antimicrobial and antioxidant activity on *Emblica officinalis* seed extract." *International journal of research in ayurveda and pharmacy*. 3 : 591-596.
- Quy, D.D., Artik, E.A., Phuong, L.T., Lien, H.H., Felycia, E.S., Suryadi, I. and Yihsu, J. 2014. "Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content and antioxidant activity of *Limnophila aromatic*." *Journal of food and drug analysis*. 22 : 296-302.
- Rahman, S., Akbor, M.M., Howlader, A. and Jabbar, A. 2009. "Antimicrobial and cytotoxic activity of the alkaloids of amlaki (*Emblica officinalis*)." *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*. 12 : 1152-1155.

- Rawal, S., Singh, P., Gupta, A. and Mohanty, S. 2014. "Dietary intake of *Curcuma longa* and *Embllica officinalis* increases life span in *Drosophila melanogaster*." *Biomedical research international*. 1 : 1-7.
- Rugina, D., Diaconeasa, Z., Coman, C., Bunea, A., Socaciu, C. and Pinteau, A. 2015. "Chokeberry anthocyanin extract as pancreatic β -cell protectors in two models of induced oxidative stress." *Oxidative medicine and cellular longevity*. 42 : 1-10.
- Saeed, S. and Tariq, P. 2007. "Antibacterial activities of *Embllica officinalis* and *Coriandrum sativum* against gram negative urinary pathogens." *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*. 20 : 32-35
- Saeed, N., Khun, M. and Shabbir, M. 2012. "Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L." *Complementary and alternative medicine*. 12 : 221-230.
- Safaeian, L., Sajjadi, S.E., Javanmard, S.H., Montazeri, H. and Samani, F. 2016. "Protective effect of *Melissa officinalis* extract against H_2O_2 -induced oxidative stress in human vascular endothelial cells." *Research in pharmaceutical sciences*. 11 : 383-389.
- Saini, A., Sharma, S. and Chhibber, S. 2008. "Protective efficacy of *Embllica officinalis* against *Klebsiella pneumoniae* induced pneumonia in mice." *Indian journal of medical research*. 128 : 188-193.
- Scartezzini, P., Antognoni, F. and Raggi, M.A. 2006. "Vitamin C content and antioxidant activity of the fruit and of the ayurvedic preparation of *Embllica officinalis* Gaertn." *Journal of ethnopharmacology*. 104 : 113-118.
- She, G., Cheng, R. and Sha, L. 2013. "A novel phenolic compound from *Phyllanthus emblica*." *Natural product communications*. 8 : 461-462.
- Sharma, K.R., Chatterji, S., Rai, D.K., Mehta, S., Rai, P.K., Singh, R.K., Watal, G. and Sharma, B. 2009. "Antioxidant activities and phenolic contents of the aqueous extracts of some Indian medicinal plants." *Journal of medicinal plants research*. 3 : 944-948.
- Shanmugapriya, K., Saravana, P.S., Payal, H., Mohammed, P.S. and Bennai, W. 2011. "A comparative study of antimicrobial potential and phytochemical analysis of *Artocarpus heterophyllus* and *Manilkara zapota* seed extracts." *Journal of pharmacy research*. 4 : 2587-2589.
- Shokoohinia, Y., Khajouei, S., Ahmadi, F., Ghiasvand, N. and Hosseinzadeh, L. 2017. "Protective effect of bioactive compounds from *Echinophora cinerea* against cisplatin-induced oxidative stress and apoptosis in the PC12 cell line." *Iranian journal of basic medical sciences*. 4 : 438-445.

- Singh, M.K., Dwivedi, S., Yadav, S.S., Sharma, P. and Khattri, S. 2014. "Arsenic-induced hepatic toxicity and its attenuation by fruit extract of *Emblica officinalis* (amla) in mice." *Indian journal of clinical biochemistry*. 29 : 29-37.
- Smyth, W.F., Smyth, T.J., Ramachandran, V.N., Donnell, F. and Brooks, P. 2012. "Dereplication of phytochemicals in plants by LC-ESI-MS and ESI-MSn." *Trends in analytical chemistry*. 33 : 46-54.
- Srikumar, R., Parthasarathy, N.J., Shankar, E.M., Manikandan, S., Vijayakumar, R., Thangaraj, R., Vijayananth, K., Sheela, D.R. and Rao, U.A. 2007. "Evaluation of the growth inhibitory activities of *Triphala* against common bacterial isolates from HIV infected patients." *Phytotherapy research*. 21 : 476-480.
- Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A. and Cliver, D.O. 2010. "Antimicrobial herb and spice compound in food." *Food chemistry*. 21 : 1199-1218.
- Tian, X., Guo, L.P., Hu, K.L., Huang, J., Fan, Y.H., Ren, T.S. and Zhao, Q.C. 2015. "Protective effects of *Arctium lappa* L. roots against hydrogen peroxide-induced cell injury and potential mechanisms in SH-SY5Y cells." *Cellular and molecular neurobiology*. 35 : 335-344.
- Tseng, H.C., Wu, W.T., Huang, H. and Wu, M.C. 2014. "Antimicrobial activities of various fractions of longan (*Dimocarpus longan* Lour. Fen Ke) seed extract." *International journal of food sciences and nutrition*. 65 : 589-593.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M., Mazur, M. and Telser, J. 2007. "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." *The international journal of biochemistry and cell biology*. 39 : 44-84.
- Verma, R.C. and Gupta, A. 2004. "Effect of pre-treatments on quality of solar-dried amla." *Journal of food engineering*. 65 : 397-402.
- Widyawati, P.S., Budianta, T.D., Kusuma, F.A. and Wijaya, E.L. 2015. "Difference of solvent polarity to phytochemical content and antioxidant activity of *Pluchea indica* less leaves extracts." *International journal of pharmacognosy and phytochemical research*. 6 : 850-855.
- Wong, C.C., Li, H.B., Cheng, K.W. and Chen, F. 2006. "A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay." *Food chemistry*. 97 : 705-711.
- Wongpradabchai, S., Chularojmontri, L., Phornchirasilp, S. and Wattanapitayakul, S.K. 2013. "Protective effect of *Phyllanthus emblica* fruit extract against hydrogen peroxide-induced endothelial cell death." *Journal of the medical association of Thailand journal*. 96 : 40-48.

- Yu, L.H., Kuo, Y.H., Lin, Y.L. and Chiang, W. 2009. "Antioxidative effect and active component from leaves of lotus (*Nelumbo nucifera*).” *Journal of agricultural and food chemistry*. 57 : 6623-6629.
- Yoshihara, D., Fujiwara, N. and Suzuki, K. 2010. "Antioxidants: benefits and risks for long-term health.” *Maturitas*. 67 : 103-107.
- Zagmutt, S., Legmutt, E., Mujica, V. and Wehinger, S. 2016. "Protective effect of propolis extract on pancreatic β cell under oxidative stress *in vitro*.” *Journal of food and nutrition research*. 4 : 400-407.
- Zhang, Y.J., Nagao, T. and Tanaka, T. 2004. "Antiproliferative activity of the main constituents from *Phyllanthus emblica*.” *Biological and pharmaceutical bulletin*. 27 : 251-255.
- Zhou, Y.F., Guo, B., Ye, M.J., Liao, R.F. and Li, S.L. 2016. "Protective effect of rutin against H_2O_2 -induced oxidative stress and apoptosis in human lens epithelial cells.” *Current eye research*. 41 : 933-942.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

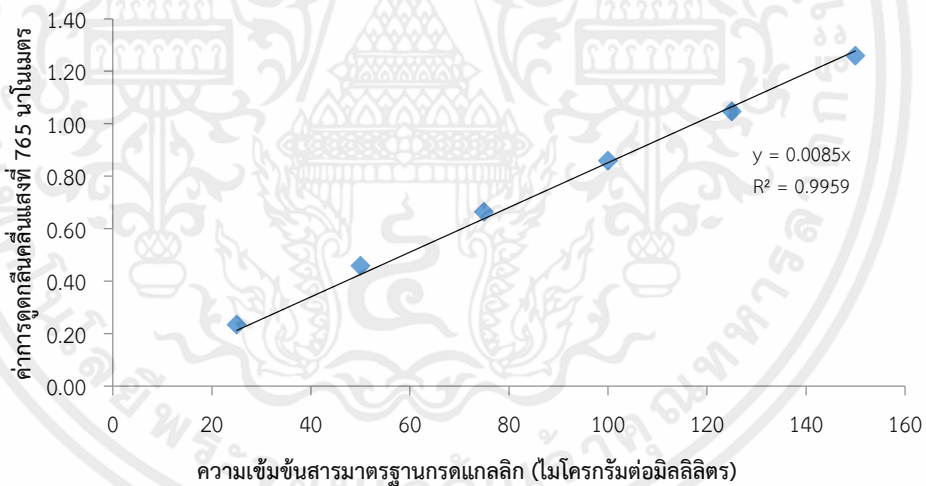
การคำนวณเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดและเอ็มบริโอของมะขามป้อม

1. การคำนวณเกี่ยวกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

การสร้างกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตรของสารมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังตารางภาคผนวกที่ 1 ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Folin-cioalteu ได้กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกดังรูปภาคผนวกที่ 1

ตารางภาคผนวกที่ 1 สารมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นต่างๆ และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร±SD
25	0.24±0.00
50	0.46±0.01
75	0.66±0.01
100	0.86±0.01
125	1.05±0.01
150	1.26±0.02



รูปภาคผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

จากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (รูปภาคผนวกที่ 1) ได้สมการสารมาตรฐานดังนี้

$$y = 0.0085x$$

โดย y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

x คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

สารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อม ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-ciocalteu วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.552

หาค่า x จากสมการ

$$x = y/0.0085$$

จากแทนค่า y ในสมการ

$$x = 0.552/0.0085$$

$$x = 64.94 \mu\text{gGAE/ml}$$

นำค่า x ที่ได้หารด้วยความเข้มข้นของสารสกัดที่นำมาทดสอบซึ่งในตัวอย่างนี้ใช้สารสกัดความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าที่ได้จะอยู่ในหน่วย $\mu\text{gGAE/g extract}$ จากนั้นคูณด้วย 1000 เพื่อเปลี่ยนหน่วยให้เป็น 129.38 mgGAE/g extract

ดังนั้นสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 129.88 mgGAE/g extract ทำเช่นนี้ในแต่ละซ้ำ แล้วนำค่ามาคำนวณค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และสารสกัดตัวอย่างอื่นๆ ก็คำนวณเช่นเดียวกัน

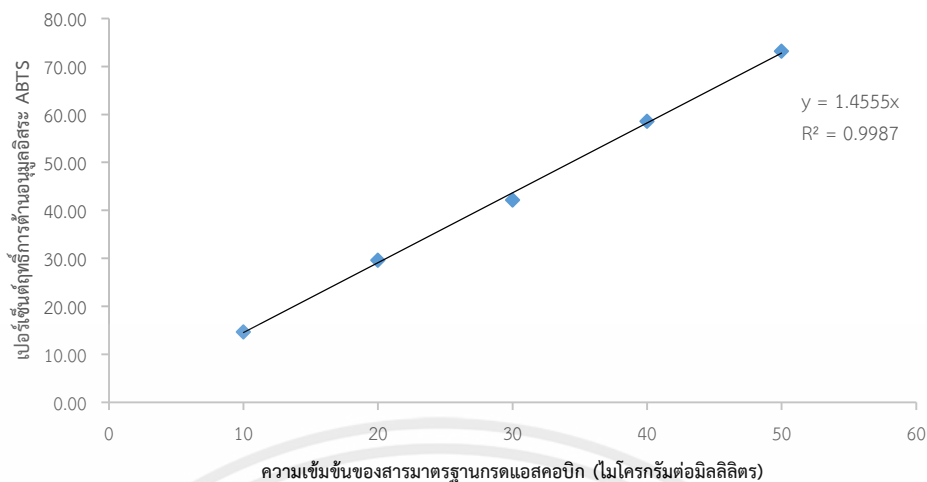
2. การคำนวณฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

การสร้างกราฟมาตรฐานกรดแอสคอบิกจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตรของสารมาตรฐานกรดแอสคอบิกที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังตารางภาคผนวกที่ 2 ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี ABTS ได้กราฟมาตรฐานกรดแอสคอบิก แสดงดังรูปภาคผนวกที่ 2

ตารางภาคผนวกที่ 2 สารมาตรฐานกรดแอสคอบิกที่ความเข้มข้นต่างๆ และเปอร์เซ็นต์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS

ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน กรดแอสคอบิก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS \pm SD
10	14.68 \pm 0.55
20	29.65 \pm 0.83
30	42.17 \pm 0.90
40	58.54 \pm 1.27
50	73.18 \pm 0.80

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปภาคผนวกที่ 2 กราฟมาตรฐานกรดแอสคอบิกสำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS

จากกราฟมาตรฐานกรดแอสคอบิก (รูปภาคผนวกที่ 2) ได้สมการมาตรฐานดังนี้

$$y = 1.4555x$$

โดย y คือ เปอร์เซ็นต์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS

x คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอบิก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

ตัวอย่างการคำนวณฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS

สารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมความเข้มข้น 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS คำนวณเปอร์เซ็นต์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS เฉลี่ยเท่ากับ 41.26

เมื่อคำนวณหาค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานกรดแอสคอบิกที่ได้จากสมการของสารมาตรฐานกรดแอสคอบิก โดยแทนค่า y เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์

แทนค่า y ในสมการ

$$x = 50/1.4555$$

$$x = 34.35 \mu\text{g/ml}$$

ค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานกรดแอสคอบิกที่ได้จากการคำนวณเท่ากับ 34.35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานกรดแอสคอบิกที่ได้จากโปรแกรม GraphPad Prism 5.0 เท่ากับ 34.94 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า มีค่าไม่แตกต่างกันมาก ซึ่งในบทที่ 4 ได้รายงานค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานกรดแอสคอบิกซึ่งคำนวณได้จากโปรแกรม GraphPad Prism 5.0

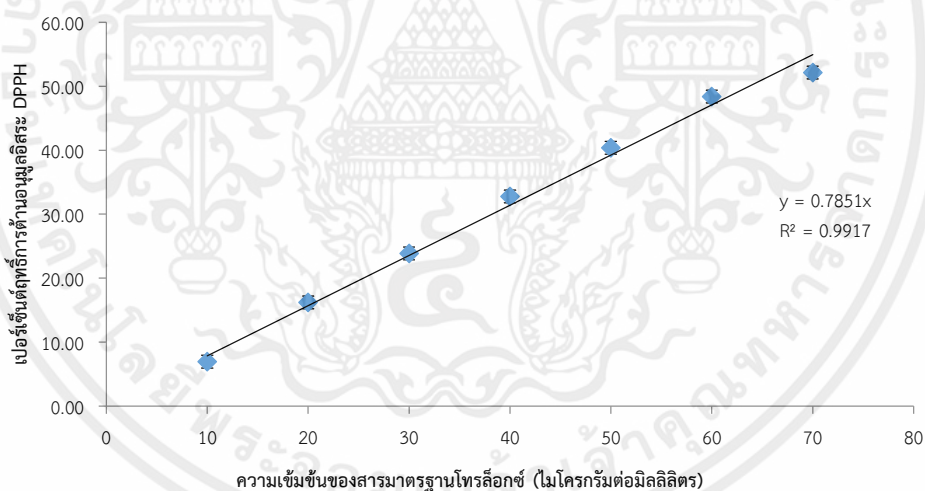
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การคำนวณฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

การสร้างกราฟมาตรฐานไทรลือกซ์จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรของสารมาตรฐานไทรลือกซ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังตารางภาคผนวกที่ 3 ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH ได้กราฟมาตรฐานไทรลือกซ์ ดังรูปภาคผนวกที่ 3

ตารางภาคผนวกที่ 3 สารมาตรฐานไทรลือกซ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ และเปอร์เซ็นต์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH

ความเข้มข้นของสารมาตรฐานไทรลือกซ์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH±SD
10	6.96±0.78
20	16.22±1.13
30	23.87±1.00
40	32.77±0.88
50	40.37±0.85
60	48.40±0.97
70	52.12±0.98



รูปภาคผนวกที่ 3 กราฟมาตรฐานไทรลือกซ์สำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH

จากกราฟมาตรฐานไทรลือกซ์ (รูปภาคผนวกที่ ก-3) ได้สมการสารมาตรฐานดังนี้

$$y = 0.7851x$$

โดย y คือ เปอร์เซ็นต์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่สามารถนำไปใช้เพื่อการค้า หรือการเผยแพร่ข้อมูลใดๆ ได้โดยไม่ได้รับอนุญาตจากทางมหาวิทยาลัยราชภัฏวชิรเวศน์บุรีรัมย์

ตัวอย่างการคำนวณฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH

สารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมความเข้มข้น 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และคำนวณเปอร์เซ็นต์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH เฉลี่ยเท่ากับ 15.93

เมื่อคำนวณหาค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานโทรลล็อกซ์ที่ได้จากสมการของสารมาตรฐานดังกล่าว โดยแทนค่า y เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์

$$\begin{aligned} \text{แทนค่า } y \text{ ในสมการ} \quad x &= 50/0.7851 \\ x &= 63.69 \mu\text{g/ml} \end{aligned}$$

ค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานกรดแอสคอบิกที่ได้จากการคำนวณเท่ากับ 63.69 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานกรดสคอบิกที่ได้จากโปรแกรม GraphPad Prism 5.0 เท่ากับ 63.30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า มีค่าไม่แตกต่างกันมาก ซึ่งในบทที่ 4 ได้รายงานค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานกรดแอสคอบิกซึ่งคำนวณได้จากโปรแกรม GraphPad Prism 5.0

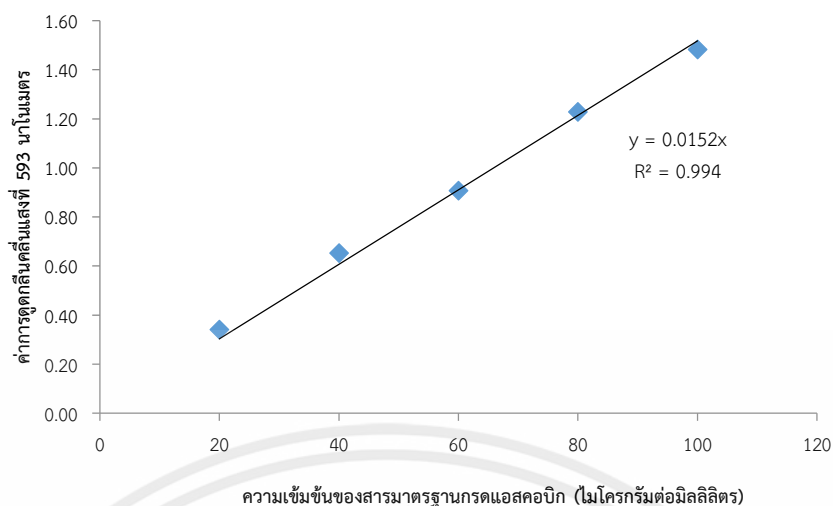
4. การคำนวณฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

การสร้างกราฟมาตรฐานกรดแอสคอบิกจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ของสารมาตรฐานกรดแอสคอบิกที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังตารางภาคผนวกที่ 4 ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP ได้กราฟมาตรฐานกรดแอสคอบิกดังรูปภาคผนวกที่ 4

ตารางภาคผนวกที่ 4 สารมาตรฐานกรดแอสคอบิกที่ความเข้มข้นต่างๆ และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร สำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ FRAP

ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน กรดแอสคอบิก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร \pm SD
20	0.34 \pm 0.01
40	0.65 \pm 0.02
60	0.91 \pm 0.02
80	1.23 \pm 0.03
100	1.48 \pm 0.04

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปภาคผนวกที่ 4 กราฟมาตรฐานกรดแอสคอบิกสำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ FRAP

จากกราฟมาตรฐานกรดแอสคอบิก (รูปภาคผนวกที่ 4) ได้สมการมาตรฐานดังนี้

$$y = 0.0152x$$

โดย y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร

x คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอบิก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

ตัวอย่างการคำนวณฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ FRAP

สารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ตามวิธี FRAP วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.745

หาค่า x จากสมการ

$$x = y/0.0152$$

จากแทนค่า y ในสมการ

$$x = 0.745/0.0152$$

$$x = 49.01 \mu\text{gAAE/ml}$$

นำค่า x ที่ได้หารด้วยความเข้มข้นของสารสกัดที่นำมาทดสอบซึ่งในตัวอย่างนี้ใช้สารสกัดความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าที่ได้จะอยู่ในหน่วย $\mu\text{gAAE/g extract}$ จากนั้นคูณด้วย 1000 เพื่อเปลี่ยนหน่วยให้เป็น mgAAE/g extract

ดังนั้นสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามป้อมมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 196.04 mgAAE/g extract ทำเช่นนี้ในแต่ละซ้ำ แล้วนำค่ามาคำนวณค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และสารสกัดตัวอย่างอื่นๆ ก็คำนวณเช่นเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ผลงานทางวิชาการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

The Bioactivities of Seed Coat and Embryo Extracts from Indian Gooseberry (*Phyllanthus emblica*)

Jaiboonma, A.¹, Janvikul, W.² and Poeaim, S.^{1*}

¹Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand, 10520; ²Biomedical Engineering Research Unit, National Metal and Materials Technology Center, Pathumthani, Thailand.

Jaiboonma, A., Janvikul, W. and Poeaim, S. (2018). The bioactivities of seed coat and embryo extracts from Indian gooseberry (*Phyllanthus emblica*). International Journal of Agricultural Technology 14(2):183-191.

Abstract The research evaluated the bioactivities of seed coat and embryo extracts from Indian gooseberry (*Phyllanthus emblica* Linn). The crude methanolic extract was further successively extracted with hexane, ethyl acetate, *n*-butanol and water by liquid-liquid partitioning method. The total phenolic content (TPC) in each solvent-extracted fraction was determined by Folin-Ciocateu method. The ethyl acetate seed coat extract possessed the highest TPC with values of 439.09±5.49 milligrams gallic acid equivalent (mgGAE)/g extract. The antioxidant activity of each extract was examined using ferric-reducing antioxidant power (FRAP) and 2, 2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS⁺⁺) assay. The ethyl acetate seed coat extract revealed 50% inhibitory concentration (IC₅₀ value) at a concentration of 31.53±0.36 microgram/milliliter (µg/ml) and ferric-reducing antioxidant power with 751.92±5.22 milligrams ascorbic acid equivalent (mgAAE)/g extract. The antibacterial activity of each extract was performed using disc diffusion method. The ethyl acetate seed coat extract demonstrated the greatest bacterial inhibition against *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* DMST 5040, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* TISTR 1466, and *Micrococcus luteus* ATCC 9341. These results suggested that the seed coat extracted with ethyl acetate could be served as a natural source of the bioactive compounds and used in the preparations of products such as drugs, anti-aging supplements, and cosmetics.

Keywords: Bioactivity, Indian gooseberry, *Phyllanthus emblica*, Seed coat and Embryo

Introduction

Phyllanthus emblica Linn., commonly found in Indian gooseberry or makham pom in Thailand, belongs to the family Euphorbiaceae. The Indian gooseberry is widely grown in South-East Asia, especially in tropical forests (Dinesh *et al.*, 2016). The fruits are generally used in herbal medicine as fever reducer, wound healing promoter, cough and sore throat reliever, and immune system inducer. It has been known that this fruit contains a high level of

* **Corresponding author:** Poeaim, S.; **Email:** poeaim@hotmail.com

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์และห้ามมิให้คัดลอกหรือเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

vitamin C, an effective antioxidant. (Verma and Gupta, 2004; Namiesnik *et al.*, 2013). In addition, the fruit, leaves, bark, and branch were sources of many bioactive compounds, including polyphenols, flavonoids, gallic acid, ellagic acid, and other bioactive compounds, which were found to inhibit the oxidation most efficiently (Kumar *et al.*, 2014; Patel *et al.*, 2016). Furthermore, the plant materials were scientifically reported for its anticancer, antitumor, antibacterial and anti-inflammatory activities (Ngamkitidechakul *et al.*, 2010), and found to decrease dangerous diseases such as diabetes, coronary heart disease and rheumatoid (Baliga and Dsouza, 2011). However, there have been only a few reports on the bioactivities of Indian gooseberry seed coat and embryo extracts. Hence, the aims of this research were to investigate the total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of Indian gooseberry seed coat and embryo extracts. In addition, the total phenolic content in the extracts was quantified. The results obtained from this preliminary study would be beneficial to the developments of novel medical products.

Materials and methods

Preparation of extracts from Indian gooseberry

Fresh Indian gooseberries were collected from Phrae province, Thailand. The whole fruits were dried, and fleshy parts were then grated. The seeds were dried at 40°C, which the seed coat were physically detached from the embryo. The dried seeds were ground and soaked three times with methanol by maceration at room temperature. After 7 days, the methanolic extract was filtered through a filter paper (Whatman No. 1), and the solution was subsequently concentrated using a rotary evaporator. The crude methanolic seed coat and embryo extract was dissolved with sterilized water and partitioned successively with hexane, ethyl acetate, *n*-butanol and water (Beedessee *et al.*, 2012). Each of partitions was evaporated using a rotary evaporator and then stored in a desiccator until used.

Determination of total phenolic content

The total phenolic content (TPC) was determined by Folin–Ciocalteu method with some modifications (Quy *et al.*, 2014). Twenty five microliter (μl) of each extract sample at a concentration of 500 microgram/milliliter ($\mu\text{g}/\text{ml}$) was mixed with 125 μl of 10% Folin–Ciocalteu reagent solution in a well of a 96-well plate and incubated for 5 min. To each solution, 100 μl of 7.5% Na_2CO_3 solution was then added immediately, and the whole solutions were incubated for 60 min in the dark. The absorbances of the solutions were finally

measured at 765 nm. Gallic acid was used as standard compound, and total phenolic content was expressed as mgGAE (milligrams gallic acid equivalent)/g extract.

Antioxidant assays

Ferric-reducing antioxidant power (FRAP) assay

The FRAP assay was prepared followed by Saeed *et al.* (2012) with some modifications. Twenty μl of each sample extract (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was mixed with 180 μl of freshly prepared FRAP-TPTZ solution, and the whole solution was then incubated in the dark at room temperature for 6 min. The absorbances of the solutions were measured at 593 nm. The standard curve was constructed using ascorbic acid (0-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), and the reducing antioxidant power activity was expressed as mgAAE (milligrams ascorbic acid equivalent)/g extract.

ABTS^{•+} scavenging activity assay

2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS^{•+}) scavenging activity assay was performed according to Saeed *et al.* (2012). ABTS^{•+} scavenging activity was measured by mixing 20 μl of each extract (0-150 $\mu\text{g}/\text{ml}$) with 180 μl of ABTS^{•+} solution, and the solution was incubated for 6 min. The absorbances of the solutions were subsequently measured at 734 nm. The ABTS^{•+} scavenging activity was calculated using the following equation:

$$\text{The ABTS}^{\bullet+} \text{ scavenging activity (\%)} = [(\text{absorbance of the control} - \text{absorbance of the sample}) / (\text{absorbance of the control})] \times 100$$

The data were presented as mean of triplicate. The concentration required for 50% inhibition of ABTS^{•+} (IC₅₀ value) was determined graphically.

Assessment of antibacterial activity

Microorganisms, i.e., *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* DMST 5040, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* TISTR 1466, and *Micrococcus luteus* ATCC 9341, were obtained from the Department of Biology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL), Thailand. The antibacterial activities of the extracts were performed by the disc diffusion method (Meerungrueang *et al.*, 2014). The extract solutions (1,000 $\mu\text{g}/\text{disc}$) were loaded on sterilized filter paper discs of 6 mm in diameter and dried for 10 min. The discs were placed on the surface of the previous inoculated Mueller-Hinton agar (MHA) and incubated for 24 h

at 37°C. DMSO: deionized water (1:1 v/v) and gentamycin (10 µg/disc) were used as a negative control and a positive control, respectively. The clear zones of bacterial inhibition around the discs were to be observed.

Statistical analysis

The data were expressed as means±standard deviations (SD) of measurements from three independent replicates (n=3). The data were statistically analyzed by a statistical package program version 20.0 (SPSS 20.0) using Duncan's multiple range test (DMRT); $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

Results

Total phenolic content

The total phenolic contents of the seed coat and embryo extracts were estimated using gallic acid (0-150 µg/ml) as a standard compound. A linear calibration curve of gallic acid showed $y = 0.0085x$, where x is the explanatory variable, y is the dependent variable and the slope of the line is 0.0085 with R^2 value of 0.99 (the square of the correlation coefficient is R). The Indian gooseberry extracts were found to have various total phenolic contents, ranging from 64.52 to 439.09 mgGAE/g extract. As revealed in Table 1, the ethyl acetate extract prepared from the seed coat had the highest total phenolic content, with an average value of 439.09 ± 5.49 mgGAE/g extract. The lowest content was observed in the hexane extract prepared from the embryo, with an average value of 83.00 ± 4.50 mgGAE/g extract.

Antioxidant activities

Ferric-reducing antioxidant power (FRAP)

The ferric-reducing antioxidant power assay was used to determine the antioxidant activities of the extracts, which were calculated using the standard curve of ascorbic acid ($y=0.0152x$, $R^2=0.99$). It was found that the seed coat and embryo extracts from Indian gooseberry had the FRAP activities, ranging from 83 to 751 and 86 to 688 mgAAE/g extract, respectively. The ethyl acetate extract prepared from the seed coat possessed the highest FRAP activity that was 751.92 ± 5.22 mgAAE/g extract, as revealed in Table 1.

ABTS⁺ scavenging activity

The ABTS⁺ scavenging activities of the extracts (0-150 $\mu\text{g/ml}$) are expressed as IC₅₀ value at which the ABTS⁺ scavenging activities of the seed coat and embryo extracts were found in the ranges of 31-134 and 37-67 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The ethyl acetate extract prepared from the seed coat exhibited the highest ABTS⁺ scavenging activity with IC₅₀ value at 31.53 ± 0.36 $\mu\text{g/ml}$ (Table 1 and Figure 1).

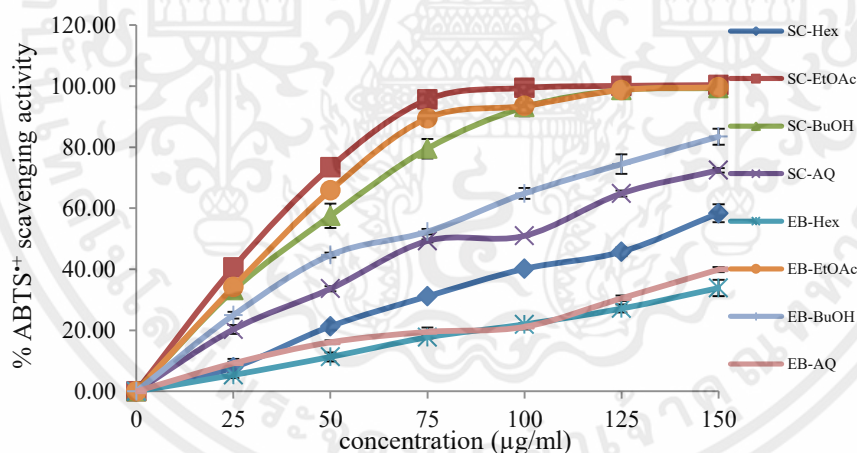


Figure 1. The ABTS⁺ scavenging activity of the partitioning extracts from Indian gooseberry seed coat and embryo.

Antibacterial activity

The clear zones of bacterial inhibition of eighth extracts prepared in different solvents are presented in Table 2. All the extraction has overall

potential antibacterial activity. Apparently, the ethyl acetate extract prepared from the seed coat exhibited the greatest antibacterial activity against all bacteria tested, i.e., *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* DMST 5040, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* TISTR 1466, and *Micrococcus luteus* ATCC 9341, with the clear zone diameters of 15.27±0.56, 14.76±1.92, 16.80±2.21, 15.51±2.17, and 16.57±1.59 mm, respectively.

Table 1. Total phenolic contents, ferric-reducing antioxidant power and 50% inhibited concentration of ABTS^{•+} scavenging activities of seed coat and embryo extracts from Indian gooseberry

Indian gooseberry	TPC (mgGAE/g extract) [*]	FRAP (mgAAE/g extract) [*]	IC ₅₀ value (µg/ml) ^{*#}
			ABTS ^{•+} scavenging activity
Seed coat-Hexane	126.41±2.60 ^c	83.86±1.90 ^g	134.71±4.61
Seed coat-EtOAc	439.09±5.49 ^a	751.92±5.22 ^a	31.53±0.36
Seed coat-BuOH	260.77±5.45 ^c	525.87±5.93 ^c	41.82±0.39
Seed coat-Aqueous	130.70±5.58 ^c	114.59±3.19 ^c	78.74±1.83
Embryo-Hexane	83.00±4.50 ^f	86.45±3.59 ^g	>150
Embryo-EtOAc	399.40±4.39 ^b	688.16±6.69 ^b	37.15±0.36
Embryo-BuOH	198.60±3.28 ^d	305.82±5.13 ^d	67.06±0.92
Embryo-Aqueous	64.52±3.44 ^g	97.44±1.59 ^f	>150

^{*}The data are expressed as means±standard deviation (SD), three replicates (n=3).

[#]IC₅₀ value was the inhibited concentration scavenged by 50%.

The letters a-g within the same column indicate the statistical significances at *p*<0.05.

Table 2. The clear zones of bacterial inhibition of the extracts prepared from the seed coat and embryo of Indian gooseberry.

Indian gooseberry	The clear zone diameters observed around test discs (mm)±SD [*]				
	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>S. epidermis</i>	<i>S. aureus</i>
Seed coat-Hexane	7.83±0.57 ^b	10.01±1.66 ^c	8.76±0.95 ^c	9.53±0.53 ^c	11.25±1.98 ^b
Seed coat-EtOAc	15.27±0.56 ^a	14.76±1.92 ^a	16.57±1.59 ^a	16.80±2.21 ^a	15.51±2.17 ^a
Seed coat-BuOH	12.47±1.02 ^a	12.35±1.22 ^b	13.59±1.05 ^b	14.25±2.50 ^b	16.30±2.40 ^a
Seed coat-Aqueous	7.22±0.65 ^b	6.62±0.35 ^d	7.04±0.14 ^d	NA	9.15±0.80 ^c
Embryo-Hexane	6.77±0.41 ^b	9.23±1.05 ^b	7.34±0.32 ^d	8.26±0.83 ^c	7.17±1.15 ^d
Embryo-EtOAc	14.22±1.12 ^a	14.61±1.00 ^a	16.19±1.46 ^a	16.34±2.62 ^a	16.25±1.56 ^a
Embryo-BuOH	13.91±1.39 ^a	11.73±0.74 ^b	13.63±0.89 ^b	13.42±0.78 ^b	15.48±0.79 ^a
Embryo-Aqueous	6.74±0.33 ^b	6.76±0.22 ^d	6.35±0.22 ^d	NA	10.95±0.36 ^b
Gentamycin (10 µg/disc)	23.53±0.54	29.08±1.99	23.16±1.24	30.01±0.83	29.47±0.93

^{*}Each value was presented as mean±standard deviation (SD), three replicates (n= 3).

The letters a-d within the same column indicate the statistical significances at *p*<0.05.

NA represented no the clear zone inhibition

Discussion

The obtained results were in good accordance with the findings reported by Mishra and Mahanta (2014) that was the extracts from the seed coat of Indian gooseberry possessed high total phenolic contents. In addition, the ethyl acetate extract prepared from the seed coat had the highest total phenolic content, similar to the result disclosed in the literature (Mishra *et al.*, 2015). The antioxidant activity of Indian gooseberry was previously researched by Nadheesha *et al.* (2007); it was reported that its seed had a higher antioxidant activity its fruit. The polyphenolic compounds present in the seed were likely contributed to the high antioxidant activity.

From these obtained results, the relationship between the total phenolic content and antioxidant activity of the seed coat and embryo extracts were determined, to confirm that the polyphenolic compounds were really attributed to the antioxidant activity found in Indian gooseberry, as reported previously (Cai *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2005). In addition, the major compound of the seed coat might contain polyphenols compounds, such as catechin acid, caffeic acid, chlorogenic acid, *p*-coumaric acid, gallic acid, quercetin acid, and vanillic acid (Mishra *et al.*, 2015).

Antimicrobial activity of the extracts from seed coat and embryo of Indian gooseberry, was measured against selected bacteria, including bacterial food poisoning and an intestinal pathogen. It was previously reported that the extract from the Indian gooseberry seed possessed the the antimicrobial activity against *S. aureus* and *B. cereus* (Dabur *et al.*, 2007; Priya *et al.*, 2012).

In this study, the total phenolic content, antioxidant activity, and antibacterial property of the seed coat and embryo of Indian gooseberry were investigated. The bioactivities of the extracts prepared from the seed coat were found to be higher than those of the extracts prepared from the embryo. Furthermore, among all the solvents used, the ethyl acetate extract from the seed coat was found to be the most potent. Further studies on the identification of polyphenolic compounds present in the extracts are to be conducted to confirm the functionality present in Indian gooseberry.

Acknowledgements

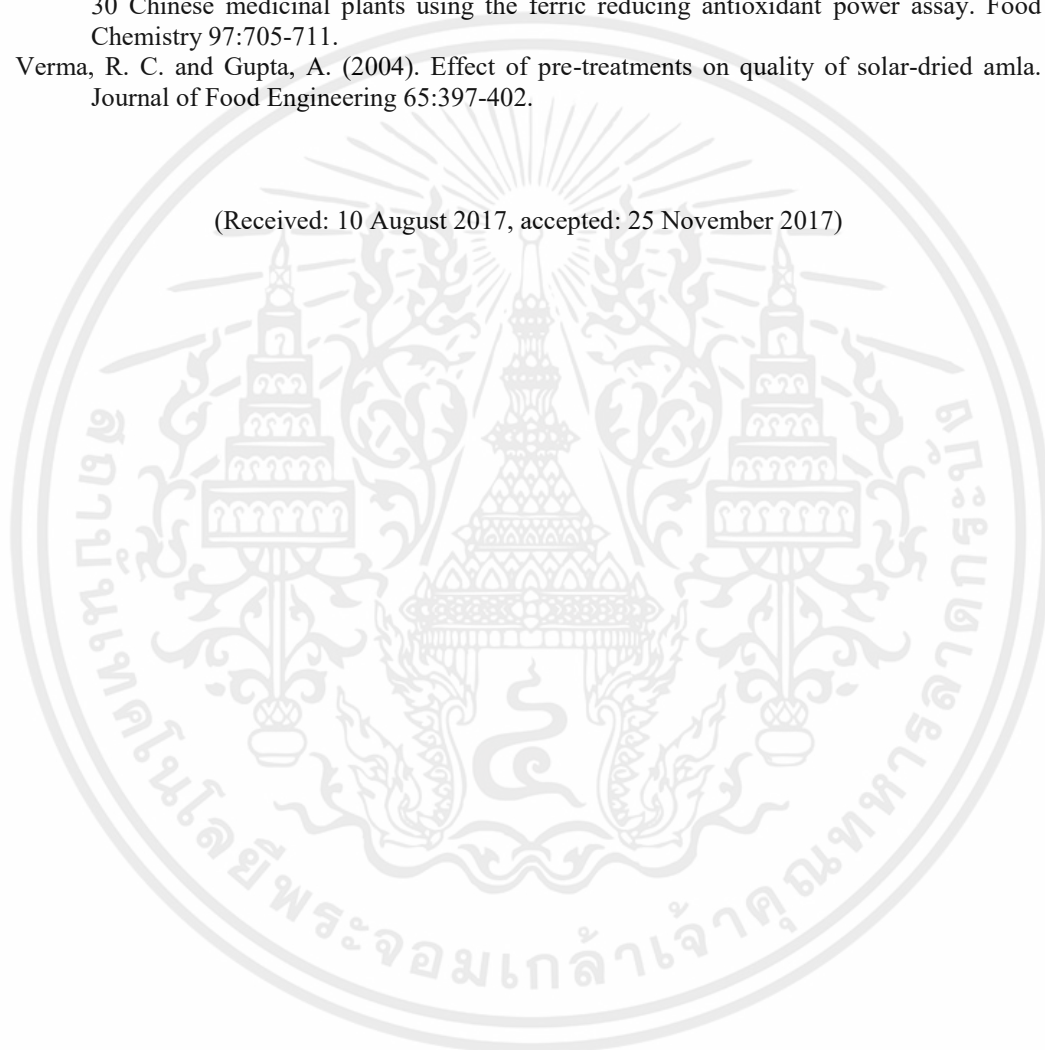
This study was supported by King Mongkut's Institute Technology of Ladkrabang (KMITL), National Metal and Materials Technology Center (MTEC), and partially funded by Graduate Institute of Science and Technology (TGIST), Thailand.

References

- Baliga, M. S. and Dsouza, J. J. (2011). Amla (*Emblica officinalis* Gaertn), a wonder berry in the treatment and prevention of cancer. *European Journal of Cancer Preventio* 20:225-239.
- Beedessee, G., Ramanjooloo, A., Aubert, G. and Eloy, L. (2012). Cytotoxic activities of hexane, ethyl acetate and butanol extracts of marine sponges from mauritian waters on human cancer cell line. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 34:397-408.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M. and Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life sciences* 74:2157-2184.
- Dabur, R., Gupta, A., Mandal, T. K., Singh, D. D., Bajpai, V., Gurav, A. M. and Lavekar, G. S. (2007). Antimicrobial activity of some Indian medicinal plants. *African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines* 4:313-318.
- Dinesh, M., Roopan, S. M. and Selvaraj, C. I. (2016). Photocatalytic degradation of nitrophenol using biologically active *Phyllanthus emblica* seed extract. *Journal of Phytocemistry and Phytobiology B* 161:273-278.
- Kumar, A., Singh, A. and Singh, B. (2014). Assessment of therapeutic potential of *Phyllanthus emblica* (Amla): a natural godsend. *International Journal of Cell Science and Biotechnology* 3:4-14.
- Meerungrueang, W. and Panichayupakaranant, P. (2014). Antimicrobial activities of some Thai traditional medical longevity formulations from plants and antibacterial compounds from *Ficus foveolata*. *Pharmaceutical Biology* 52:1104-1109.
- Mishra, P., Dutta, N. and Mahanta, C. L. (2015). Partial extraction and identification of phenolics in Amla (*Emblica officinalis*) seed coat powder. *Journal of Food Science and Technology* 52:6990-7001.
- Mishra, P. and Mahanta, C. L. (2014). Comparative analysis of functional and nutritive values of amla (*Emblica officinalis*) fruit, seed and seed coat powder. *American Journal of Food Technology* 9:151-161.
- Nadheesha, M. K. F., bamunuarachchi, A., Edirisinghe, E. M. R. K. B. M. and Weerasinghe, W. M. S. K. (2007). Studies on antioxidant activity of Indian gooseberry fruit and seed. *Journal of Science of the University of Kelaniya Sri Lanka* 3:83-92.
- Namiesnik, J., Vearasilp, K., Kupska, M., Ham, K. S., Kang, S. G., Park, Y. K., Barasch, D., Nemirovski, A. and Gorinstein, S. (2013). Antioxidant activities and bioactive components in some berries. *European Journal of Food Research and Technology* 237:819-829.
- Ngamkitidechakul, C., Jaijoy, K., Hansakul, P., Soonthornchareonnon, N. and Sireeratawong, S. (2010). Antitumour effects of *Phyllanthus emblica* L.: induction of cancer cell apoptosis and inhibition of *in vivo* tumour promotion and *In vitro* invasion of human cancer cells. *Phytotherapy Research*. 24:1405-1413.
- Quy, D. D., Artik, E. A., Phuong, L. T., Lien, H. H., Felycia, E. S., Suryadi, I. and Yi-hsu, J. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content and antioxidant activity of *Limnophila aromatic*. *Journal of Food and Drug Analysis* 22:296-302.
- Patel, S. S. and Goyal, R. K. (2012). *Emblica ofcinalis* Geart: A comprehensive review on phytochemistry, pharmacology and ethnomedicinal uses. *Research Journal of Medicinal Plant* 6:6-16.

- Priya, G., Parminder, N. and Jaspreet, S. (2012). Antimicrobial and antioxidant activity on *Emblca officinalis* seed extract. International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy 3:591-596.
- Saeed, N., Khun, M. and Shabbir, M. (2012). Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. Complementary and Alternative Medicine 12:221.
- Wong, C., Li, H., Cheng, K. and Chen, F. (2006). A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. Food Chemistry 97:705-711.
- Verma, R. C. and Gupta, A. (2004). Effect of pre-treatments on quality of solar-dried amla. Journal of Food Engineering 65:397-402.

(Received: 10 August 2017, accepted: 25 November 2017)



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวอัจฉรา ใจบุญมา
วัน เดือน ปีเกิด	14 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2536
ที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 33/2 หมู่ที่ 4 ตำบลมิตรภาพ อำเภอสีคิ้ว จังหวัดนครราชสีมา 30140
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2558 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง พ.ศ. 2561 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	โครงการทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย (Thailand Graduate Institute of Science and Technology; TGIST)
ผลงานทางวิชาการ	Jaiboonma, A. , Janvikul, W. and Poeaim, S. 2018. “ The bioactivities of seed coat and embryo extracts from Indian gooseberry (<i>Phyllanthus emblica</i>).” International journal of agricultural technology . 14 (2) : 183-191.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้