ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดเมทานอลจากดอกพิกุล (*Mimusops elengi*)

ANTIOXIDANT AND CYTOTOXIC ACTIVITIES OF METHANOLIC EXTRACTS FROM *Mimusops elengi* FLOWERS

กฤษฎา นาทุ่งนุ้ย

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดเมทานอลจากดอกพิกุล (*Mimusops elengi*)

ANTIOXIDANT AND CYTOTOXIC ACTIVITIES OF METHANOLIC EXTRACTS FROM *Mimusops elengi* FLOWERS

กฤษฎา นาทุ่งนุ้ย

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ANTIOXIDANT AND CYTOTOXIC ACTIVITIES OF METHANOLIC EXTRACTS FROM *Mimusops elengi* FLOWERS

KRISSADA NATUNGNUY

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดเมทานอลจากดอกพิกุล (*Mimusops elengi*) Antioxidant and cytotoxic activities of methanolic extracts from *Mimusops elengi* flowers
ชื่อนักศึกษา	นายกฤษฎา นาทุ่งนุ้ย รหัสประจำตัว 56050799
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2559

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการ	
ดร.วิมลมาศ บุญมี กรรมการ	
ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดเมทานอลจากดอกพิกุล (*Mimusops elengi*)
ชื่อนักศึกษา	นายกฤษฎา นาทุ่งนุ้ย รหัสนักศึกษา 56050799
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2559
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอก และกลีบเลี้ยงของดอกพิกุล จากการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu โดยใช้กรดแกลลิคเป็นสารมาตรฐาน พบว่าสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอก และกลีบเลี้ยงของพิกุลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 49.32±3.04 และ 93.36±3.58 mgGAE/g extract ตามลำดับ และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) วิธี 2,2′-azino-bis[3-ethylbenzothiazoneline-6-sulfonic acid] (ABTS) และวิธี Ferric-reducing antioxidant power (FRAP) พบว่าสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอกของพิกุลมีค่า IC_{50} (50% Inhibitory concentration) จากการทดสอบด้วยวิธี DPPH และ ABTS เท่ากับ 151.79 และ 280.96 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีค่าความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+}-TPTZ ในวิธี FRAP เท่ากับ 34.50 mgAAE/g extract ในขณะที่สารสกัดเมทานอลจากกลีบเลี้ยงของพิกุลมีค่า IC_{50} จากการทดสอบด้วยวิธี DPPH และ ABTS เท่ากับ 98.20 และ 236.13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีค่าความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+}-TPTZ ในวิธี FRAP เท่ากับ 63.11 mgAAE/g extract และจากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) พบว่าสารสกัดเมทานอลจากกลีบเลี้ยงมีความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่ากลีบดอกของพิกุล และมีความเป็นพิษสูงสุดกับเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa รองลงมาคือ เซลล์ไตลิงปกติชนิด Vero และเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 379.06, 413.69 และ 517.47 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

คำสำคัญ : ความเป็นพิษต่อเซลล์ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด พิกุล ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Antioxidant and cytotoxic activities of methanolic extracts from *Mimusops elengi* flowers
Students	Mr. Krissada Natungnuy Student ID 56050799
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2016
Advisor	Asst. Prof. Dr. Supattra Poeaim

Abstract

The purpose of this study was to investigate the total phenolic content, antioxidant and cytotoxic activity of methanolic extracts from the petals and sepals of *Mimusops elengi* flowers. The total phenolic content was estimated using Folin-Ciocalteu method. The result showed that methanolic extracts from petals and sepals had total phenolic content of 49.32 ± 3.04 and 93.36 ± 3.58 mgGAE /g extract, respectively. The antioxidant activity was evaluated by using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2-azino-bis [3-ethylbenzothiazoneline-6-sulfonic acid] (ABTS) and Ferric reducing antioxidant power (FRAP) method. The IC_{50} (50% Inhibitory concentration) values of methanolic extracts from petals by using DPPH and ABTS method were 151.79 and 280.96 ug/ml, respectively and the Fe^{3+}-TPTZ reduction in FRAP method was 34.50 mgAAE /g extract. The IC_{50} values of methanolic extracts from sepals were 98.20 and 236.13 ug/ml, respectively and the Fe^{3+}-TPTZ reduction in FRAP method was 63.11 mgAAE / g extract. The cytotoxic activity of the extracts against the cancerous cell lines (human cervical carcinoma cell line : HeLa and human breast cancer cell line : MCF-7) compared with normal cell (African green monkey kidney cell line : Vero) were assessed using 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. The results showed that methanolic extract of sepals had a higher cytotoxicity than methanolic extract of petals, exhibited the highest cytotoxic activity against the HeLa cell line followed by Vero and MCF-7 cell line with IC_{50} values of 379.06, 413.69 and 517.47 ug/ml, respectively.

Keywords : Cytotoxic activity, Total phenolic content, *Mimusops elengi*, Antioxidant activity

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งสามารถลุล่วงไปได้ด้วยดีนั้น ทางผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ที่ได้ให้ความความรู้ คำแนะนำ คอยให้ความช่วยเหลือ และช่วยแก้ปัญหา รวมถึงข้อบกพร่องต่างๆ ในทุกขั้นตอนของการทำโครงงานพิเศษ เพื่อให้โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้อย่างมีประสิทธิภาพ ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการ และ ดร.วิมลมาศ บุญมี กรรมการที่ให้ข้อคิดเห็น และคำแนะนำช่วยเหลือในการทำโครงงานพิเศษนี้ ทางผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ภาควิชาชีววิทยา ที่คอยให้ความช่วยเหลือและเอื้ออำนวยในการเบิกสารเคมี และอุปกรณ์ที่ใช้ในการทำโครงพิเศษ ตลอดจนคำแนะนำ ความช่วยเหลือ และกำลังใจจากพี่ระดับปริญญาโท และเพื่อนระดับปริญญาตรี โดยเฉพาะ คุณพฤษวรรษ หลอดเข็ม คุณเกษรา คงกล้า และ คุณสุภานัน สุขสิริ

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัว ที่มีส่วนช่วยสนับสนุนในด้านการศึกษา และคอยให้กำลังใจตลอดจนคำแนะนำต่างๆ จนกระทั่งโครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

กฤษฎา นาทุ่งนุ้ย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ฉ
สารบัญรูป ..... ช
คำย่อ/สัญลักษณ์ ..... ซ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1
1.2 วัตถุประสงค์ 2
1.3 ขอบเขต 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 พิกุล 3
2.1.1 ข้อมูลทั่วไปของพิกุล 3
2.1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ 4
2.1.3 ประโยชน์ของพิกุล 5
2.1.4 องค์ประกอบทางเคมีของพิกุล 6
2.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 6
2.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT 7
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 9
3.1 ตัวอย่างพืช 9
3.2 อุปกรณ์ 9
3.3 สารเคมี 9
3.4 เซลล์ไลน์ 10
3.5 วิธีการทดลอง 10
3.5.1 การเตรียมตัวอย่าง 10
3.5.2 การสกัดสาร 10
3.5.3 การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 11
3.5.4 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 11
3.5.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ 13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 14
4.1 สารสกัดเมทานอลจากดอกพิกุล 14
4.2 ผลการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 15
4.3 ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ 16
4.3.1 ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH 16
4.3.2 ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS 18
4.3.3 ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ FRAP 19
4.4 ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ 20
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 22
5.1 สรุปผลการวิจัย 22
5.2 ข้อเสนอแนะ 23
เอกสารอ้างอิง 24
ภาคผนวก 27
ภาคผนวก ก 28
ภาคผนวก ข 32
ภาคผนวก ค 39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ชื่อเรียกของของพิกุล (*Mimusops elengi*) ในภาษาต่างๆ 3

2.2 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยาของพิกุล 5

4.1 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และค่า IC_{50} ของสารสกัดเมทานอลจากดอกพิกุล 17

4.2 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS และค่า IC_{50} ของสารสกัดเมทานอลจากดอกพิกุล 19

ข-1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแกลลิคความเข้มข้นต่างๆ ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร สำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 32

ข-2 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอกและกลีบเลี้ยงของพิกุลความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร สำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัด 33

ข-3 สารมาตรฐานโทรล็อกซ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ และค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH 34

ข-4 สารมาตรฐานโทรล็อกซ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ และค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS 35

ข-5 สารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่างๆ และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร สำหรับวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+}-TPTZ ในวิธี FRAP 37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	ส่วนต่างๆ ของพิกุล (*Mimusops elengi*)	4
2.2	รูปแสดงโครงสร้างของ saponin และ mimusopic acid ที่พบในพิกุล	6
2.3	รูปแสดงการเปลี่ยนแปลงของ tetrazolium ที่ถูกรีดิวซ์เป็นผลึกของ formazan	8
4.1	ส่วนที่ใช้สกัดสารและลักษณะของสารสกัดเมทานอล	14
4.2	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอกและกลีบเลี้ยงของพิกุล	15
4.3	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอก และกลีบเลี้ยงของพิกุลกับค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH	17
4.4	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอก และกลีบเลี้ยงของพิกุลกับค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS	18
4.5	ลักษณะของเซลล์ชนิดต่างๆเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ในหลุมควบคุม (ซ้าย) และเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอลจากกลีบเลี้ยงของพิกุลที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ขวา) หลังจากบ่มเป็นระยะเวลา 20 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ Phase contrast ที่กำลังขยาย 100 เท่า	20
4.6	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดเมทานอลจากกลีบเลี้ยงพิกุลกับร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์	21
ข-1	กราฟมาตรฐานกรดแกลลิคสำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด	32
ข-2	กราฟมาตรฐานโทรล็อกซ์สำหรับวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH	34
ข-3	กราฟมาตรฐานโทรล็อกซ์สำหรับวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS	36
ข-4	กราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก สำหรับวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+}-TPTZ ในวิธี FRAP	38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

$Abs_{control}$	Control absorbance
Abs_{sample}	Sample absorbance
ABTS	2,2'-azino-bis[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
FBS	Fetal bovine serum
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
IC_{50}	50 % Inhibitory concentration
mgAAE	milligram ascorbic acid equivalent
mgGAE	milligram gallic acid equivalent
mgTE	milligram trolox equivalent
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
PBS	Phosphate buffer saline
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TPTZ	2,4,6-tris(2-pyridyl)-*s*-triazine

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

พิกุลเป็นพืชในวงศ์ Sapotaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Mimusops elengi* Linn. เป็นไม้ยืนต้น สูง 10-15 เมตร ที่แผ่กิ่งก้านสาขา ใบเดี่ยวรูปหอก ปลายแหลม ผิวเรียบมัน ขอบเรียบ ดอกเล็กกลีบเล็กสีขาวนวล กลิ่นหอม ผลรูปไข่ ผลสุกสีแสด เจริญได้ดีในดินที่หลากหลาย และขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด (วัฒนา, 2547) ต้นพิกุลมีต้นกำเนิดมาจากประเทศอินเดีย เมียนมา ศรีลังกา และสามารถพบได้ตามภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย เช่น ในป่าดิบทางภาคใต้ ภาคกลาง และภาคตะวันออก โดยแต่ละภูมิภาคจะมีชื่อเรียกพื้นเมืองที่แตกต่างกันไป เช่น พิกุล แก้ว มะเมา กุน ชากุล ซางดง และตันหยงแก้ว เป็นต้น จากตำรับยาไทยพบว่าเกือบทุกส่วนของพิกุลสามารถนำมาใช้เป็นยาสมุนไพรเพื่อรักษาโรคต่างๆ ได้ทั้งดอก ใบ เปลือก เมล็ด แก่น และราก โดยกมลวรรณ (2552) ได้กล่าวว่า ส่วนของพิกุลที่สามารถนำมาใช้เป็นยาได้แก่ ดอกมีสรรพคุณเป็นยาแก้โรคลม และบำรุงเลือดให้การทำงานของเลือดไหลเวียนดีขึ้น ดอกแห้งป่นแล้วสูดดมคล้ายยานัตถุ์ แก่นมีสรรพคุณใช้บำรุงเลือดให้การทำงานของเลือดไหลเวียนดีขึ้น และช่วยลดไข้ เมล็ดมีสรรพคุณขับปัสสาวะในผู้ป่วยที่เกี่ยวกับระบบปัสสาวะติดขัด กระพี้มีสรรพคุณรักษาอาการกลาก เกลื้อน โรคผิวหนัง เปลือกต้นมีสรรพคุณรักษาอาการอักเสบของเหงือกและฟันผุ รากมีสรรพคุณใช้บำรุงเลือด แก้โรคลมและขับเสมหะ และใบมีสรรพคุณรักษาโรคหืดหอบ และกามโรค

พิกุลเป็นสมุนไพรธรรมชาติที่ออกดอกตลอดทั้งปี (กมลวรรณ, 2552) ดอกพิกุลส่วนใหญ่จะเก็บเฉพาะดอกที่ร่วงหล่นตามโคนต้นมาใช้ประโยชน์ทำให้ไม่เกิดปัญหาการทำลายต้นไม้ในธรรมชาติ โดยสามารถนำดอกที่ร่วงมาล้างให้สะอาดแล้วนำมาตากแห้งใช้เป็นยาหรือเครื่องหอมต่างๆได้ จากการศึกษาของ Singh และคณะ (2014) พบว่าพิกุลมีสารออกฤทธิ์ที่สำคัญหลายชนิด เช่น แทนนิน เควอซิทิน อัลคาลอยด์ และเกลืออนินทรีย์ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากดอกพิกุลมีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ (บุษยมาศ, 2551) และจากการทดลองทางคลินิกพบว่าสารสกัดจากดอกพิกุลแห้งมีฤทธิ์ขับปัสสาวะในสุนัขที่สลบช่วยทำให้ความดันโลหิตและการเต้นของหัวใจลดลง (เพ็ญนภา, 2540) นอกจากนี้พิกุลยังเป็นสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น ฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อรา ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเบาหวานลดระดับน้ำตาลในเลือด และฤทธิ์การต้านมะเร็ง (Baliga และคณะ, 2011) และมีงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าสารสกัดเอทานอลจากดอกพิกุลมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเมื่อนำสารสกัดจากดอกพิกุลที่ความเข้มข้น 1.95-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบกับเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด CL-6 เซลล์มะเร็งกล่องเสียงในมนุษย์ชนิด Hep-2 และเซลล์มะเร็งตับในมนุษย์ชนิด HepG2 เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งได้ร้อยละ 50 หรือ 50% Inhibitory concentration เท่ากับ 48.84, 109.99 และ 54.44 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Mahavorasirikul และคณะ, 2010)

ปัจจุบันมนุษย์มีแนวโน้มเป็นโรคมะเร็งเพิ่มมากขึ้นจากปัจจัยต่างๆ และหนึ่งในสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งเกี่ยวข้องกับอนุมูลอิสระ โดยประสงค์ (2553) ได้กล่าวถึงบทบาทของอนุมูลอิสระกับการทำให้เกิดมะเร็งและทำให้เซลล์มะเร็งเจริญเติบโตมากขึ้น โดยอนุมูลอิสระเป็นสารที่ไม่เสถียรและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาจึงสามารถจับกับโมเลกุลภายในร่างกาย และส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อองค์ประกอบของเซลล์ และเป็นสาเหตุของโรคหลายชนิด โดยเฉพาะโรคมะเร็ง อนุมูลอิสระจะถูกทำลายด้วยสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งทำหน้าที่ให้โมเลกุลของอนุมูลอิสระเกิดความเสถียร ปกติแล้วร่างกายมนุษย์จะมีสารต้านอนุมูลอิสระคอยดักจับอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น แต่หากอนุมูลอิสระมีปริมาณมากเกินไปร่างกายจำเป็นต้องได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอกซึ่งมีทั้งชนิดสังเคราะห์ และมาจากธรรมชาติโดยเฉพาะผักผลไม้ (เจนจิรา และประสงค์, 2554) ดังนั้นโครงงานพิเศษนี้จึงสนใจศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจากดอกพิกุล เพื่อหาแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ และสารต้านเซลล์มะเร็งที่มาจากธรรมชาติ ซึ่งอาจมีความสำคัญ และเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการพัฒนายาสมุนไพรจากธรรมชาติเพื่อใช้ทดแทนยาทางเคมีบำบัดที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งในปัจจุบัน

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมทานอลจากดอกพิกุล
2) ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดเมทานอลจากดอกพิกุล

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1) สกัดสารจากดอกพิกุลโดยใช้ตัวทำละลายเมทานอล
2) ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดยใช้วิธี Folin - Ciocalteu
3) ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมทานอลจากดอกพิกุลโดยใช้วิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) วิธี 2,2´-azino-bis[3-ethylbenzothiazoneline--6-sulfonic acid] (ABTS) และวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP)
4) ศึกษาผลความเป็นพิษต่อเซลล์ชนิดต่างๆ ของสารสกัดหยาบจากดอกพิกุล โดยใช้วิธี 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ทราบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ฤทธิ์ทางชีวภาพด้านการต้านอนุมูลอิสระ และความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดเมทานอลจากดอกพิกุล
2) สามารถนำข้อมูลที่ได้มาใช้ในการพัฒนายาสมุนไพรที่มาจากสารสกัดของดอกพิกุลได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 พิกุล

2.1.1 ข้อมูลทั่วไปของพิกุล

พิกุลเป็นพืชสมุนไพรที่ถิ่นกำเนิดมาจากอินเดีย เมียนมา ศรีลังกา ในประเทศไทยพบได้ทั่วไปในป่าดิบทางภาคใต้ ภาคกลาง และภาคตะวันออก จัดอยู่ในวงศ์ Sapotaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Mimusops elengi* Linn. ชื่อสามัญคือ Bullet Wood Tanjong Tree และมีชื่อเรียกพื้นเมืองที่แตกต่างกันไปตามภูมิภาคต่างๆ เช่น พิกุล (ไทยภาคกลาง) มะเมา แก้ว (ภาคเหนือ) พิกุลป่า (ภาคใต้) พิกุลเขา พิกุลเถื่อน (นครศรีธรรมราช) (เพ็ญนภา, 2540) และมีชื่อเรียกในแต่ละประเทศแตกต่างกัน ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ชื่อเรียกของของพิกุล (*Mimusops elengi*) ในภาษาต่างๆ

ภาษา	ชื่อ
อังกฤษ	Spanish cherry, Medlar, Bullet wood
สันสกฤต	Bakula, Bramarananda, Stri-mukhamadhu, Anankantha, Madhuparijara
ฮินดี	Maulseri, Molchari, Maulsiri, Bakula
เบงกาลี	Bakul
มาลายาลัม	Elengi, Ilanni, Ilenji
มราฐี	Bakula, Barsoli, Avalli
ทมิฬ	Alagu, Kesaram, Magilam, Mogadam, Nakum, Magizham Magizhamboo
อูรดู	Molsari, Kirakuli
มาเลย์	Tanjong
เมียนมา	Kha-Yay
สิงหล	Munnamal,Muhula, Muhuma
ไทย	Pikul

(ที่มา : ดัดแปลงจาก Baliga และคณะ, 2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

พิกุลหรือพิกุลทองจัดเป็นไม้มงคลที่มีกลิ่นหอม และมีประโยชน์มากมาย ลำต้นสูง ทรงพุ่มใหญ่ มีกิ่งก้านแน่น (a) ลักษณะใบทรงรีเรียงสลับกันความกว้างประมาณ 3 ถึง 5 เซนติเมตร และความยาวประมาณ 5 ถึง 6 เซนติเมตร มีปลายใบแหลมโคนใบมนสอบ ขอบโค้งมีคลื่น ใบสีเขียวเข้มผิวมัน (b) ลักษณะดอกจากแตกออกจากง่ามใบ และยอดออกดอกเป็นกระจุก (c) ในแต่ละดอกมีกลีบดอกประมาณ 8 กลีบ อยู่ในลักษณะซ้อน สีดอกเป็นสีขาว (d) ผลทรงไข่ ผลแก่สีแสด ภายในมีเมล็ดเนื้อด้านในมีรสหวาน ผลกว้าง 1 ถึง 2 เซนติเมตร ยาวประมาณ 2 ถึง 3 เซนติเมตร (e) (กมลวรรณ, 2552) ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพิกุลแสดงดังรูปที่ 2.1 a-e

รูปที่ 2.1 ส่วนต่างๆ ของพิกุล (*Mimusops elengi*)
a) ต้นพิกุล b) ใบพิกุล c) ช่อดอก d) ดอกพิกุล และ e) ผล
(ที่มา : ดัดแปลงจาก http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=251)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 ประโยชน์ของพิกุล

2.1.3.1 ประโยชน์ด้านสมุนไพร

พิกุลเป็นพืชสมุนไพรที่สามารถนำส่วนต่างๆมาใช้เป็นยาได้หลากหลายทั้ง ใบ ดอก เมล็ด เปลือกต้น แก่น และราก โดยแต่ละส่วนมีสรรพคุณดังต่อไปนี้

ใบ	รักษากามโรค พยาธิไส้เดือน
ดอก	แก้ลม บำรุงโลหิต เข้ายาหอม บำรุงหัวใจ แก้เจ็บคอ ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ
เมล็ด	มีฤทธิ์ขับปัสสาวะ
เปลือกต้น	ต้มอมกลั้วคอ แก้โรคเหงือกอักเสบ
แก่น	ใช้บำรุงหัวใจและโลหิต
ราก	บำรุงโลหิต ขับเสมหะ แก้ลม (วัฒนา, 2547)

2.1.3.2 ประโยชน์ด้านเภสัชวิทยา

พิกุลจัดเป็นพืชที่มีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาที่หลากหลายทั้งด้านเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งเชื้อราและแบคทีเรีย มีคุณสมบัติในการต้านฟันผุ ป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร ลดความดันโลหิต ป้องกันโรคเบาหวาน ช่วยขับปัสสาวะ และมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Baliga และคณะ, 2011) โดยแต่ละส่วนของพิกุลจะมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่แตกต่างกันออกไป Singh และคณะ (2014) ได้รวบรวมฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยาของพิกุลไว้ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยาของพิกุล

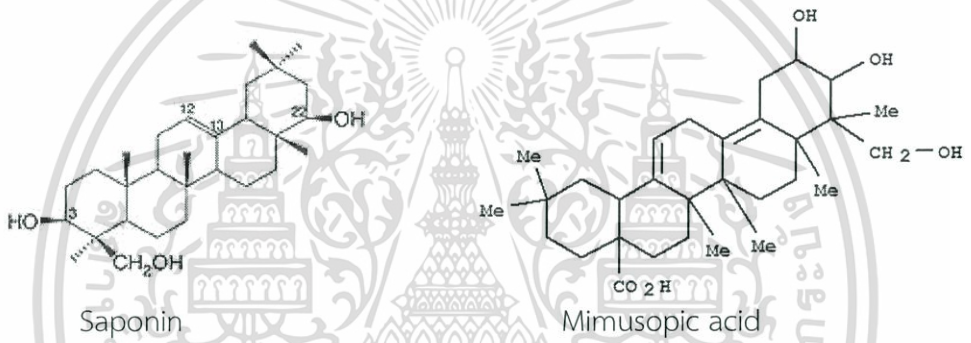
ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยา	ส่วนที่ใช้
ยับยั้งโปรโตซัว	ลำต้น
ยับยั้งแบคทีเรีย	เปลือกไม้
ยับยั้งไวรัส	เปลือกไม้
ต้านการอักเสบ	ใบ และเปลือกไม้
ลดระดับน้ำตาล	เปลือก
ต้านอนุมูลอิสระ	ใบ และผล
ลดความดันโลหิต	ใบ
ลดเบาหวาน	เปลือกลำต้น และใบ
แก้ปวด	ใบ
ความเป็นพิษต่อเซลล์	ใบ และเปลือกไม้
ขับปัสสาวะ	เปลือกไม้

(ที่มา : ดัดแปลงจาก Singh และคณะ, 2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.4 องค์ประกอบทางเคมีของพิกุล

Singh และคณะ (2014) พบว่าพิกุลมีองค์ประกอบทางเคมีหลายชนิดในส่วนต่างๆ ของพิกุล เช่น tannin, saponin, quercitol, d-mannitol, quercetin, alkaloids, taraxerol และเกลืออนินทรีย์ โดยพบว่าองค์ประกอบหลักของสารสกัดเอทานอลในส่วนประกอบต่างๆของพิกุล ประกอบด้วยสารเคมีต่างๆ คือ ใบประกอบด้วยสาร quercitol, hentriacontane, B-carotene, และกลูโคส เปลือกไม้ประกอบด้วยสาร alkaloids, แป้ง, saponin, tannin, caoutchoue, wax และเกลืออนินทรีย์ต่างๆ นอกจากนี้ยังพบว่าในเปลือกไม้ของต้นพิกุลประกอบด้วยสารกลุ่มไตรเทอร์ปีนชนิดใหม่ คือ 3B-hydroxy-lup-20(29)-ene-23, 28-dioic acid, B-amyrin และ lupeol ส่วนในผล และเมล็ดของพิกุลพบสารสำคัญคือ quercitol, quercitol, urosolic acid, dihydroquercetin, quercetin, B-d glycosides และพบว่าในเมล็ดของพิกุลมีสาร mimusopic acid ซึ่งมีฤทธิ์สำคัญในการยับยั้ง HIV reverse transcriptase activity โดยโครงสร้างทางเคมีของ Saponin และ Mimusopic acid แสดงดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 รูปแสดงโครงสร้างของ saponin และ mimusopic acid ที่พบในพิกุล
(ที่มา : Singh และคณะ, 2014)

2.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

กลไกในการต้านอนุมูลอิสระมีหลายรูปแบบ เช่น การดักจับอนุมูลอิสระ การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน การจับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน การหยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ การเสริมฤทธิ์ และการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระมีทั้งจากธรรมชาติและจากการสังเคราะห์ ทั้งนี้การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพและปริมาณมีหลายวิธีด้วยกัน แต่ละวิธีมีความจำเพาะแตกต่างกัน ปกติมักใช้หลายวิธีร่วมกันในการตรวจสอบและสรุปผลทั้งนี้เพื่อให้ผลการทดสอบมีความถูกต้องและแม่นยำ วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพที่นิยม ได้แก่ การทำให้เกิดสีโครมาโตกราฟีแบบชั้นบางและเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ส่วนวิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณที่นิยม ได้แก่ การตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระDPPH การฟอกสีอนุมูลอิสระABTS และการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (บุหรัน, 2556)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารสกัดจากส่วนต่างๆของพิกุลทั้ง ใบ เปลือก ผล และเมล็ด มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ โดย Saha และคณะ (2008) พบว่าสารสกัดเมทานอลจากใบของพิกุลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิระได้ดี จากการทดสอบด้วยวิธี DPPH พบว่ามีค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 50 หรือ IC_{50} เท่ากับ 43.26 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบสารมาตรฐานวิตามินซีซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 58.92 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลของพิกุล Boonyuen และคณะ (2009) มีการรายงานว่า เมื่อศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากของผลของพิกุลทั้งหมด 3 ระยะ คือผลอ่อน ผลแก่ และผลสุก โดยใช้ตัวทำละลายเมทานอลกับอะซีโตนในอัตราส่วน 1:1 พบว่า สารสกัดหยาบจากผลของพิกุลทั้ง 3 ระยะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และพบว่าผลอ่อนจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้สูงกว่าผลแก่ และผลสุก ตามลำดับ โดยแสดงผลในค่า Gallic acid equivalent (GAE) ในหน่วยมิลลิกรัมกรดแกลลิคต่อกรัมของสารสกัด พบว่าสารสกัดจาก ผลอ่อน ผลแก่ และผลสุกมีค่า GAE เท่ากับ 318.5±12.3, 234.1±9.2 และ 111.9±4.9 มิลลิกรัมกรดแกลลิคต่อกรัมของสารสกัด ตามลำดับ นอกจากนี้ Shahwar และ Raza (2012) ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในเปลือกไม้ และเมล็ดของพิกุล พบว่าเมื่อสกัดสารฟีนอลิกจากเปลือกไม้ และเมล็ดของพิกุลโดยใช้ตัวทำละลายเมทานอล และอะซีโตนผสมกับน้ำ แล้วนำสารสกัดที่ได้มาทำ partition ด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตท และบิวทานอล พบว่าเปลือกไม้มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดสูงกว่าในเมล็ด โดยค่าความสามารถการต้านอนุมูลอิสระของตัวทำละลายต่างๆของสารสกัดจากเปลือกไม้มีค่าอยู่ในช่วง 494±13 ถึง 771±12 มิลลิกรัมกรดแกลลิคต่อกรัมสารสกัด และมีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 72±0.7 ถึง 92±0.5 ส่วนสารสกัดจากเมล็ดของพิกุลมีค่าอยู่ในช่วง 94±5 ถึง 396±14 มิลลิกรัมกรดแกลลิคต่อกรัมสารสกัด และมีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 9.5±0.7 ถึง 88±1.1

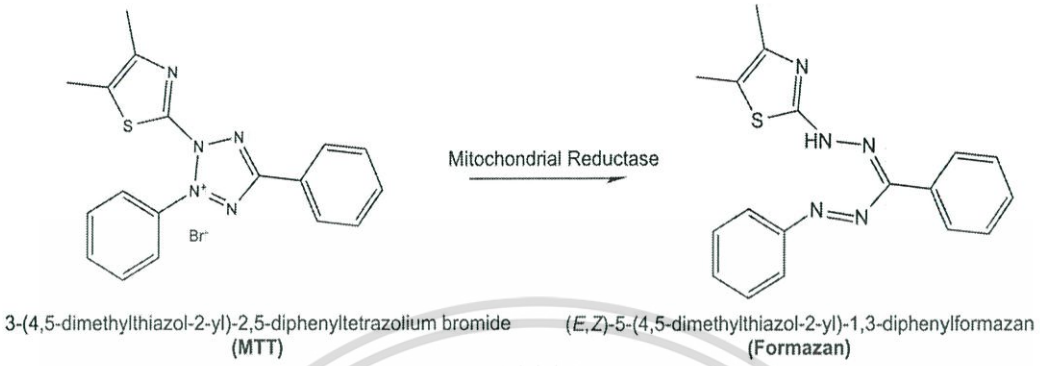
2.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT

การทดสอบความเป็นพิษของสารที่มีต่อร่างกายของคน และสัตว์ (*in vivo*) จะมีความซับซ้อนมากกว่าการทดสอบกับเซลล์และที่เพาะเลี้ยงภายนอกร่างกาย โดยวิธีการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์จะแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มคือ การตรวจสอบเซลล์ที่มีชีวิตจากการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการยอมให้สารบางอย่างผ่านเข้าออกเยื่อหุ้มเซลล์หรือการเปลี่ยนแปลงกระบวนการเมตาบอลิซึม กลุ่มต่อมาคือการตรวจสอบการรอดตายแบบ long term survival จากความสามารถในการเพิ่มจำนวน และกลุ่มสุดท้ายคือการตรวจสอบการรอดตายของเซลล์จากการกลายพันธุ์ หรือการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์มะเร็ง (อุ่นเรือน และสุพัตรา, 2555)

การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธีนี้เป็นการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์จากการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการเมตาบอลิซึม เช่น การตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ โดยนิยมใช้ MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ซึ่งมีสีเหลืองละลายน้ำได้ และสามารถเข้าไปยังไมโตคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิตได้ โดยจะถูกรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์ succinate dehydrogenase ในไมโตคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิตให้อยู่ในรูปของผลึก formazan ดังรูปที่ 2.3 ซึ่งเป็นผลึกสีม่วงไม่ละลายน้ำอยู่ภายในเซลล์ที่มีชีวิต ดังนั้นจึงต้องละลายผลึกของ formazan ออกมาด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) หรือสารผสมระหว่าง sodium-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

decdocyl sulfate กับกรดไฮโดรคลอริก แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตรด้วยเครื่อง microtiter plate reader (อุ่นเรือน และสุพัตรา, 2555)



รูปที่ 2.3 รูปแสดงการเปลี่ยนแปลงของ Tetrazolium ที่ถูกรีดิวซ์เป็นผลึกของ formazan (ที่มา : http://www.wikiwand.com/en/MTT_assay)

จากข้อมูลที่ผ่านมาพบว่าสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของพิกุล เช่น ใบ เปลือกไม้ และดอกของพิกุลมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ โดย Ganesh และคณะ (2013) พบว่าสารสกัดเมทานอลจากใบ และเปลือกไม้ของพิกุลมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกในคนชนิด SiHa จากการทดสอบด้วยวิธี MTT และจากการตรวจสอบการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส พบว่าสารสกัดจากใบ และเปลือกไม้ของพิกุลมีค่า IC_{50} เท่ากับ 35.08±2.92 และ67.46±4.21 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสามารถทำให้เซลล์มะเร็งดังกล่าวเกิด apoptotic bodies เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 0.24 เป็นร้อยละ 60 และ 69 ตามลำดับ หลังจากที่ทดสอบด้วยสารสกัดดังกล่าว นอกจากนี้ Mahavorasirikul และคณะ (2010) ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสมุนไพรไทยจำนวน 28 ชนิดด้วยวิธี MTT โดยนำสารสกัดจากดอกพิกุลที่ความเข้มข้น 1.95-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบกับเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด CL-6 เซลล์มะเร็งกล่องเสียงในมนุษย์ชนิด Hep-2 และเซลล์มะเร็งตับในมนุษย์ชนิด HepG2 เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดหยาบเอทานอลจากดอกพิกุลมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 48.84, 109.99 และ 54.44 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ตัวอย่างพืช

ดอกพิกุลจากจังหวัดราชบุรี

3.2 อุปกรณ์

3.2.1 96-well plate
3.2.1 Aluminium foil
3.2.2 Autopipette
3.2.3 Balance
3.2.4 Buchner flask
3.2.5 Buchner funnel
3.2.6 Carrel flask
3.2.7 Centrifuge
3.2.8 Cuvette
3.2.9 Duran
3.2.10 Erlenmeyer flask
3.2.11 Hot air oven
3.2.12 Incubator
3.2.13 Inverted microscope
3.2.14 Lamina air flow
3.2.15 Magnetic bar
3.2.16 Microplate reader
3.2.17 Pipette
3.2.18 Pipette boy
3.2.19 Pipette tip
3.2.20 Rotary evaporator
3.2.21 Spectrophotometer
3.2.22 Stirrer
3.2.23 Vortex mixture

3.3 สารเคมี

3.3.1 2,2′-azino-bis[3-ethylbenzothiazoneline-6-sulfonic acid] (ABTS)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

3.3.3 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)

3.3.4 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox)

3.3.5 Dimethyl sulfoxide (DMSO)

3.3.6 Ethanol

3.3.7 Fetal bovine serum (FBS)

3.3.8 Folin-Ciocalteau reagent

3.3.9 Gallic acid

3.3.10 Gentamycin

3.3.11 Methanol

3.3.12 Mitomycin C

3.3.13 Phosphate Buffer Solution (PBS)

3.3.14 Potessium persulphate

3.3.15 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium

3.3.16 Sodium carbonate

3.3.17 Trypan blue stain

3.3.18 Trypsin

3.4 เซลล์ไลน์

เซลล์ไลน์ที่ใช้ในการศึกษามีทั้งหมด 3 ชนิด ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์มาจาก ดร.พรทิพา พิชางานวิจัยสารบำบัดมะเร็ง สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ดังนี้

3.4.1 เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa (Human cervical carcinoma cell)

3.4.2 เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (Human breast cancer)

3.4.3 เซลล์ไตลิงปกติชนิด Vero (African green monkey kidney cell line)

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การเตรียมตัวอย่าง

ดอกพิกุลสดอบแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3-4 วัน จนแห้ง จากนั้นทำการแยกองค์ประกอบของดอกพิกุลออกเป็นสองส่วน คือกลีบดอกและกลีบเลี้ยง เพื่อนำมาใช้ในการสกัดสาร

3.5.2 การสกัดสาร

กลีบดอกและกลีบเลี้ยงของพิกุลที่ผ่านการแยก บดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น ใส่ในผ้าขาวบางมัดให้แน่น จากนั้นนำมาสกัดสารโดยวิธีการหมัก (Maceration) ในตัวทำละลายเมทานอล เป็นระยะเวลา 7 วัน ที่อุณภูมิห้อง นำสารสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระเหยสุญญากาศแบบหมุนจนได้สารสกัดเมทานอลจากกลีบดอกและกลีบเลี้ยงของพิกุล เก็บไว้ในเดซิกเคเตอร์จนแห้ง

3.5.3 การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ดัดแปลงจาก Magalhaes และคณะ (2010) โดยละลายสารสกัดด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หยอดสารสกัดปริมาตร 50 ไมโครลิตร และสารละลาย Folin-Ciocalteu (อัตราส่วน1:5) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate และเขย่าให้เข้ากัน บ่มในที่มืดเป็นระยะเวลา 6 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร เทียบกับชุดควบคุม โดยใช้กรดแกลลิคที่ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารมาตรฐาน ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ เทียบผลจากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิค โดยแสดงผลในหน่วย mg Gallic acid equivalent (mgGAE)/g extract

3.5.4 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.5.4.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1- picrylhydrazyl (DPPH)

ดัดแปลงตามวิธีของ Shahwar และ Raza (2012) โดยนำสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอกและกลีบเลี้ยงพิกุลมาละลายด้วยเมทานอลให้ได้ความเข้มข้น 50, 100, 150 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วหยอดลงใน 96 well-plate ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ลงไปในแต่ละหลุม ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มไว้ในที่มืดเป็นระยะเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของ blank (เมทานอล) และชุดควบคุม (เมทานอล+DPPH) และใช้สารละลายโทรล็อกซ์ที่ความเข้มข้น 10, 15, 20, 25 และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นสารมาตรฐาน ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำแล้ว นำค่าเฉลี่ยที่ได้มาคำนวณร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดังสมการด้านล่าง จากนั้นนำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ร้อยละ 50 (50 % Inhibitory concentration : IC_{50}) ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 6.0 และความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดเทียบกับสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ (Trolox equivalent antioxidant capacity) และแสดงผลในหน่วย mg trolox equivalent (mgTE)/g extract

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

โดยที่ $A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม (เมทานอล + DPPH)

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง (สารตัวอย่าง + DPPH)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.4.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2′-azino-bis[3-ethylbenzothiazone-line-6-sulfonic acid] (ABTS)

ดัดแปลงจากวิธีของ Re และคณะ (1999) โดยการกระตุ้นสารละลาย ABTS ด้วยโปแตสเซียมเปอร์ซัลเฟตจนได้เป็น $ABTS^{\cdot+}$ ที่มีสีฟ้าเขียวและสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ก่อนใช้งานให้นำมาเจือด้วยเมทานอลให้มีค่าดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.7 ±0.02 และเตรียมสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอก และกลีบเลี้ยงของพิกุลโดยละลายด้วยเมทานอลให้ได้ความเข้มข้น 100, 200, 300, 400 และ500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นผสมสารสกัดกับสารละลาย $ABTS^{\cdot+}$ ในอัตราส่วน 1:10 โดยปริมาตร และตั้งทิ้งไว้ 6 นาที ที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เทียบกับ blank (ไม่มีการเติม $ABTS^{\cdot+}$) และชุดควบคุม (เมทานอล + $ABTS^{\cdot+}$) และใช้สารละลายโทรล็อกซ์ความเข้มข้น 20, 40, 60 และ 80ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารมาตรฐาน ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณดังสมการด้านล่างเพื่อหาร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัด วิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS ร้อยละ 50 (50 % Inhibitory concentration : IC_{50}) ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 6.0 และความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดเทียบกับสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ (Trolox equivalent antioxidant capacity) และแสดงผลในหน่วย mg trolox equivalent (mgTE)/g extract

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

โดยที่ $A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม (เมทานอล + $ABTS^{\cdot+}$)

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

3.5.4.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

ดัดแปลงจากวิธีของ Benzie และ Strain (1996) โดยเตรียมสารละลาย FRAP reagent จากการผสมสารละลาย acetate buffer ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ pH 3.6 : สารละลาย TPTZ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ในกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ : สารละลายเฟอริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วน 10:1:1 โดยเตรียมสารใหม่ทุกครั้งก่อนใช้งาน ในการทดสอบทำการผสมสารสกัดที่ละลายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร กับสารละลาย FRAP reagent ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ เทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น 15, 25, 35, 45 และ 55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำและเทียบความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+}-TPTZ โดยแสดงผลในหน่วย mg ascorbic acid equivalent (mg AAE)/g extract

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์จะใช้วิธี MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ดัดแปลงตามวิธีของ Mahavorasirikul และคณะ (2010) โดยทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ที่ต้องการทดสอบจากฟลาสก์เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยการ Trypsinization แล้วนำมานับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ผ่านกล้องจุลทรรศน์ จากนั้นทำการเจือจางเซลล์แต่ละชนิดที่ต้องการทดสอบด้วยอาหาร RPMI1640 ที่เสริมด้วย FBS 5 เปอร์เซ็นต์ให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นที่ต้องการปลูกในแต่ละเซลล์ โดยแต่ละเซลล์มีความเข้มข้นเริ่มต้นดังนี้ เซลล์ Vero $1.8x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เซลล์ MCF-7 $1.5x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเซลล์ Hela $1.5x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการปลูกเซลล์แต่ละชนิดลงใน 96-well plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

การเตรียม Stock สารสกัดความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำได้โดยนำสารสกัดเมทานอลของกลีบดอกและกลีบเลี้ยงของพิกุลมาละลายด้วย DMSO 1 มิลลิลิตร และนำมาละลายด้วย PBS ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปกรองด้วยแผ่นกรองขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร เมื่อต้องการทดสอบนำ Stock ของสารสกัดมาเจือจางด้วยอาหารที่เพาะเลี้ยงเซลล์ RPMI1640 ที่เสริมด้วย FBS 5 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัดที่ต้องการและคำนวณความเข้มข้นของ DMSO ในสารสกัดเพื่อใช้เป็นตัวควบคุมเชิงลบ

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัด ทำได้โดยหยดสารสกัดความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ลงไปในหลุมของเซลล์ที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม โดยใช้ไมโตมัยซิน ซี เป็นตัวควบคุมเชิงบวก และใช้ DMSO เป็นตัวควบคุมเชิงลบ โดยการนำสารสกัดมาบ่มกับกับเซลล์ชนิดต่างๆ ไว้ในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 20 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม และบ่มต่อเป็นระยะเวลาอีก 4 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายออกในแต่ละหลุมแล้วเติมสารละลาย DMSO:เอทานอล ในอัตราส่วน 1/1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม เพื่อละลายผลึก formazan แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร คำนวณร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ (%Cytotoxicity) เพื่อประเมินความเป็นพิษเบื้องต้นของสารสกัดทั้ง 2 ชนิดกับเซลล์ไลน์ชนิดต่างๆ ของสารสกัด จากสมการด้านล่าง และทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยสารสกัด ความเข้มข้นต่างๆ คือ 125, 250, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารสกัดที่เป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50 (50% Inhibitory concentration: IC_{50}) โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 6.0

$$\% \text{ Inhibition of cell growth} = [(A - B)/A] \times 100$$

โดยที่ A = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมชุดควบคุม (เซลล์+อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์)

B = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมหลังจากเติมสารตัวอย่าง (เซลล์+สารสกัด)

โดย A และ B จะต้องหักลบค่าการดูดกลืนแสงของ blank ออกก่อนนำมาใช้คำนวณในสมการด้านบน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 สารสกัดเมทานอลจากดอกพิกุล

ดอกพิกุลอบแห้งที่นำมาแยกองค์ประกอบของดอกออกเป็นสองส่วนคือ กลีบดอก และกลีบเลี้ยงเมื่อนำมาบดเป็นผงละเอียด โดยใช้กลีบดอกจำนวน 450 กรัม และกลีบเลี้ยงจำนวน 480 กรัม หลังจากการสกัดโดยการหมักในตัวทำละลายเมทานอลเป็นระยะเวลา 7 วัน ที่อุณภูมิห้อง และนำสารสกัดที่ได้ไประเหยเมทานอลออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศแบบหมุน เก็บไว้ในเดซิกเคเตอร์จนแห้ง พบว่าได้สารสกัดเมทานอลจากกลีบดอกจำนวน 26.12 กรัม คิดเป็นผลได้ร้อยละ 5.80 และได้สารสกัดเมทานอลจากกลีบเลี้ยงจำนวน 21.74 กรัม คิดเป็นผลได้ร้อยละ 4.53 โดยลักษณะของสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอกจะมีสีน้ำตาลแดง และหนืด ส่วนสารสกัดเมทานอลจากกลีบเลี้ยงจะมีสีน้ำตาลเข้ม เป็นผงแข็ง ดังรูปที่ 4.1 ซึ่งสารสกัดทั้งสองส่วนจะนำมาใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

จากการศึกษาของ Patil และคณะ (2016) โดยได้สกัดสารจากเปลือกไม้ และผลของพิกุล โดยใช้ตัวทำละลายแตกต่างกันคือ คลอโรฟอร์ม อะซิโตน เมทานอล และน้ำ พบว่าตัวทำละลายที่สกัดสารแล้วได้สารสกัดที่มีค่าผลได้สูงสุดคือ เมทานอล ทั้งในเปลือกไม้ และผลของพิกุลโดยมีค่าผลได้ร้อยละ 12.80 และ 9.56 ตามลำดับ

รูปที่ 4.1 ส่วนที่ใช้สกัดสารและลักษณะของสารสกัดเมทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

จากการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอก และกลีบเลี้ยงของพิกุล ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu โดยใช้กรดแกลลิคเป็นสารมาตรฐาน เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแกลลิคที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังตารางภาคผนวกที่ ข-1 มาสร้างกราฟมาตรฐานกรดแกลลิคดังรูปภาคผนวกที่ ข-1 ได้สมการที่ใช้คำนวณคือ y = 0.0125X ผลการทดลองพบว่า สารสกัดเมทานอลจากดอกพิกุลทั้งสองส่วนมีองค์ประกอบของสารประกอบฟีนอลิก โดยสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอก และกลีบเลี้ยงของพิกุลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 49.32±3.04 และ 93.36±3.58 mgGAE/g extract ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.2 และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดทั้งสองส่วนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อทดสอบด้วย T-Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

รูปที่ 4.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอกและกลีบเลี้ยงของพิกุล

นอกจากนี้ Shahwar และ Raza (2012) ได้ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดเมทานอลจากเมล็ดและเปลือกไม้ของพิกุล พบว่าสารสกัดเมทานอลจากเมล็ดของพิกุลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 21.0±0.5 mgGAE/g of dry weight และสารสกัดเมทานอลจากเปลือกไม้ของพิกุลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 98.0±1.2 mgGAE/g of dry weight และจากการศึกษาของ Patil และคณะ (2016) พบว่าสารสกัดเมทานอลจากเปลือกไม้ของพิกุลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 160.3±3.20 mgGAE/g extract เมื่อเทียบกับผลการศึกษาของ Shanmugaprita และคณะ (2011) ซึ่งได้ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดจากละมุด (*Manilkara zapota*) ซึ่งเป็นพืชในวงศ์เดียวกันกับพิกุลพบว่า สารสกัดจากเมล็ดของละมุดที่สกัดด้วยเอทานอล อะซิโตน เอทิลอะซิเตท และน้ำ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 4.0±0.01, 2.26±0.01, 2.54±0.02 และ1.21±0.01 mgGAE/g extract ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้จะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดน้อยกว่าสารสกัดเมทานอลจากดอกของพิกุลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในดอกไม้ชนิดอื่นๆ เช่น จากการศึกษาของ เรณู (2015) พบว่า สารสกัดเอทานอลจากดอกปีบมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 30.22±2.1 mgGAE/g extract และจากการศึกษาของ สุรพงศ์ และ บันลือ (2015) เกี่ยวกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเมทานอลจากดอกไม้หอม 5 ชนิด พบว่า สารสกัดเมทานอลจากดอกกุหลาบมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด รองมาคือสารสกัดเมนานอลจากดอกดาหลา ดอกบัวหลวง ดอกพิกุล และดอกแก้ว ตามลำดับ

4.3 การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

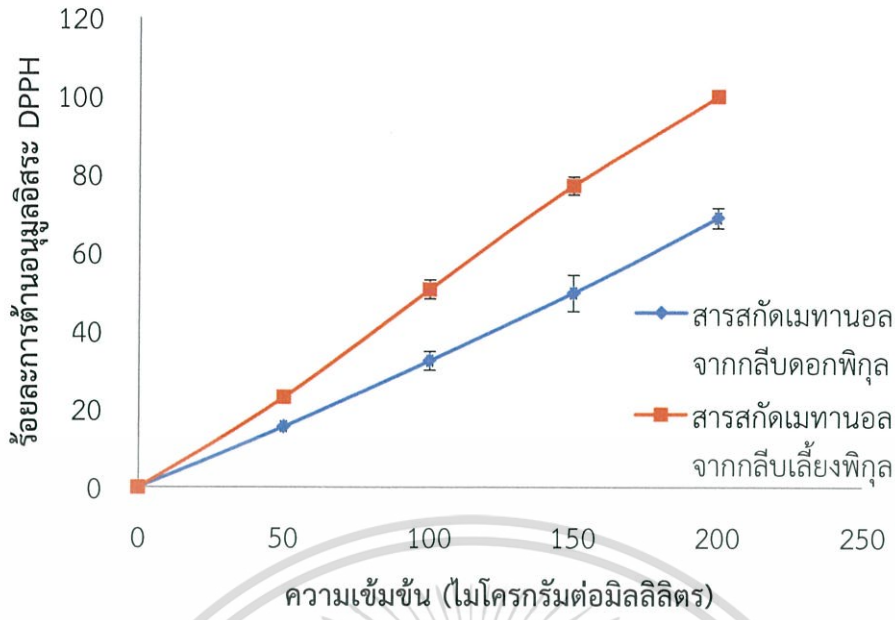
จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมทานอลจากดอกพิกุล ด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP พบว่าสารสกัดเมทานอลจากดอกพิกุลทั้งสองส่วนมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแต่ละวิธีดังต่อไปนี้

4.3.1 การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมทานอลจากดอกพิกุลทั้งสองส่วน โดยใช้สารละลายโทรล็อกซ์ที่ความเข้มข้น 10, 15, 20, 25 และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารมาตรฐาน ผลการทดลองสามารถคำนวณร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารมาตรฐานได้ดังตารางภาคผนวกที่ ข-3 เมื่อนำค่ามาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารโทรล็อกซ์กับร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH จะได้กราฟมาตรฐานของสารโทรล็อกซ์ และได้สมการที่ใช้คำนวณคือ y= 2.4455X ดังรูปภาคผนวกที่ ข-2 จากนั้นนำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ร้อยละ 50 (50 % Inhibitory concentration : IC_{50}) ด้วยโปรแกรมGraphPadPrism 6.0 พบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 20.78 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดเมทานอลจากดอกพิกุลทั้งสองส่วน โดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดความเข้มข้นต่างๆกับร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากดอกพิกุลทั้งสองส่วนคือ สารสกัดจากกลีบดอก และสารสกัดจากกลีบเลี้ยงได้ผลดังรูปที่ 4.3 เมื่อนำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาค่า IC_{50} ของสารสกัดด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 6.0 พบว่าสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอก และกลีบเลี้ยงของพิกุลมีค่า IC_{50} เท่ากับ 151.79 และ 98.20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเทียบค่า IC_{50} กับสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ พบว่าของสารสกัดสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอก และกลีบเลี้ยงของพิกุลมีฤทธิ์น้อยกว่าสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ประมาณ 7.30 และ 4.73 เท่าตามลำดับ และมีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดเทียบกับสารมาตรฐานโทรล็อกซ์เท่ากับ 135.03 ±5.64 และ 206.72±10.38 mgTE/g extract ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.1 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทดสอบด้วย T-Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอก และกลีบเลี้ยงของพิกุลกับค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH

เมื่อเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากส่วนอื่นๆ ของพิกุล พบว่า Saha และคณะ (2008) ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดเมทานอลจากใบของพิกุลโดยใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐาน พบว่า มีค่า IC_{50} เท่ากับ 43.26 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่กรดแอสคอร์บิกมีค่า IC_{50} เท่ากับ 58.92 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และจากการศึกษาของ Boonyuen และคณะ (2009) พบว่าสารสกัดหยาบจากผลของพิกุลสามระยะคือ ผลอ่อน ผลแก่ และผลสุก มีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิค เท่ากับ 183.20 ± 3.60, 140.10 ± 2.80 และ 58.40± 0.90 mg GAE /g extract ตามลำดับ

เมื่อเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากดอกไม้ชนิดอื่น โดยจากการศึกษาของ สุธิรา และประสบอร (2015) พบว่าค่า IC_{50} ของสารสกัดเมทานอลจากดอกถั่วแระและดอกส้มป่อย ที่ได้จากวิธีทดสอบ DPPH เท่ากับ 0.66 ± 0.03 และ 0.94 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐาน

ตารางที่ 4.1 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และค่า IC_{50} ของสารสกัดเมทานอลจากดอกพิกุล

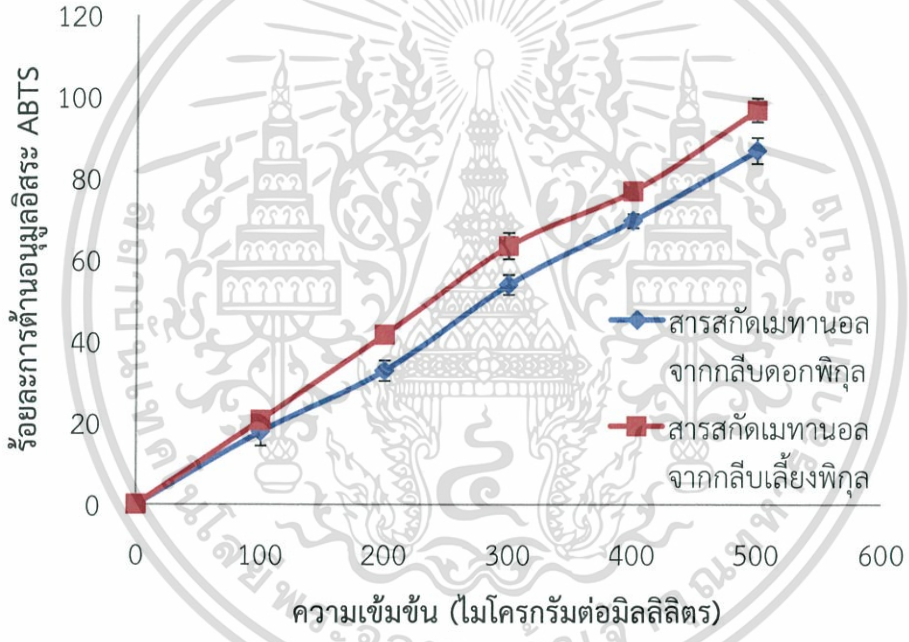
สารสกัดเมทานอล	ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (mgTE/g extract)	IC_{50} (ug/ml)
กลีบดอกพิกุล	135.03±5.64	151.79
กลีบเลี้ยงพิกุล	206.72±10.38	98.20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2 การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมทานอลจากดอกพิกุลทั้งสองส่วน โดยใช้สารละลายโทรล็อกซ์ที่ความเข้มข้น 20, 40, 60 และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นสารมาตรฐาน ผลการทดลองสามารถคำนวณร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารมาตรฐานได้ดังตารางภาคผนวกที่ ข-4 เมื่อนำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารโทรล็อกซ์กับร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS จะได้กราฟมาตรฐานของสารโทรล็อกซ์ และได้สมการที่ใช้คำนวณคือ y= 1.0786X ดังรูปภาคผนวกที่ ข-3 จากนั้นนำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 6.0 พบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 45.87 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดเมทานอลจากดอกพิกุลทั้งสองส่วน โดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดความเข้มข้นต่างๆกับร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดจากดอกพิกุลทั้งสองส่วน ได้ผลดังรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอก และกลีบเลี้ยงของพิกุล กับค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS

เมื่อนำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS ร้อยละ 50 ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 6.0 พบว่าสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอก และกลีบเลี้ยงของพิกุลมีค่า IC_{50} เท่ากับ 280.96 และ 236.13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเทียบค่า IC_{50} กับสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ พบว่าค่าของสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอก และกลีบเลี้ยงของพิกุลมีฤทธิ์น้อยกว่าสารมาตฐานโทรล็อกซ์ประมาณ 6.13 และ 5.15 เท่าตามลำดับ และมีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดเทียบกับสารมาตรฐานโทรล็อกซ์เท่ากับ 161.03 ±5.63 และ 187.67±8.15 mgTE/g extract ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.2 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทดสอบด้วย T-Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS และค่า IC_{50} ของสารสกัดเมทานอลจากดอกพิกุล

สารสกัดเมทานอล	ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS (mgTE/g extract)	IC_{50} (ug/ml)
กลีบดอกพิกุล	161.03±5.63	280.96
กลีบเลี้ยงพิกุล	187.67±8.15	236.13

เมื่อเทียบผลจากการศึกษาของ Patil และคณะ (2016) เกี่ยวกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกไม้ของพิกุล ด้วยวิธี ABTS โดยใช้โทรล็อกซ์เป็นสารมาตรฐานเช่นเดียวกันกับการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าสารสกัดเมทานอลจากเปลือกไม้ของพิกุลมีค่า IC_{50} เท่ากับ 206.58±7.36 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และจากการศึกษาของ Boonyuen และคณะ (2009) พบว่าสารสกัดหยาบจากผลอ่อน และผลแก่ของพิกุลมีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิคอยู่ในช่วง 13.5±0.10 ถึง 441.0 ± 2.80 mgGAE/g extract ส่วนสารสกัดจากผลสุกจะอยู่ในช่วง192.30±1.0 ถึง 212.50±4.6 mgGAE/g extract

เมื่อเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดจากดอกไม้ชนิดอื่น โดยจากการศึกษาของ สุธิรา และประสบอร (2015) พบว่าค่า IC_{50} ของสารสกัดเมทานอลจากดอกถั่วแระ และดอกส้มป่อย ที่ได้จากวิธีทดสอบ ABTS เท่ากับ 0.60 ± 0.02 และ 0.84 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐาน

4.3.3 การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

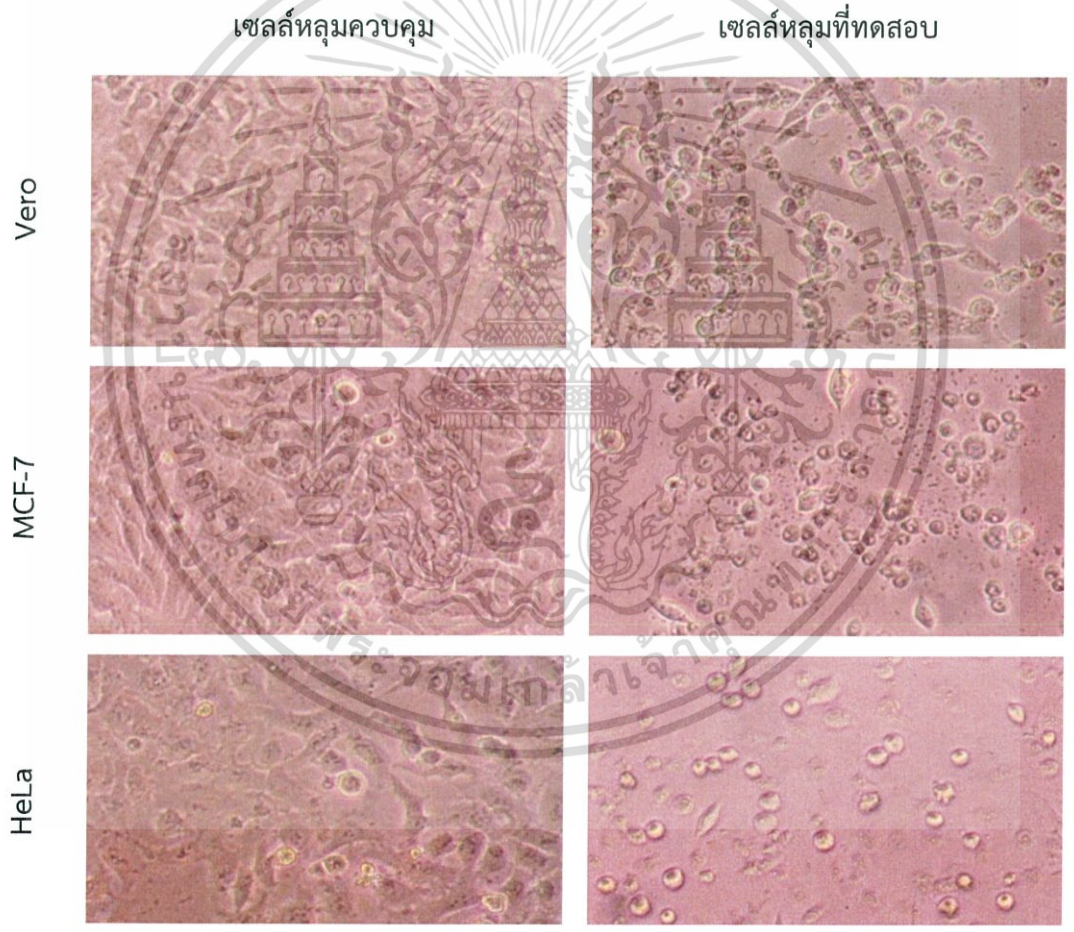
จากการศึกษาโดยใช้กรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น 15, 25, 35, 45 และ 55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารมาตรฐาน และวัดความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+}-TPTZ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตรของความเข้มข้นต่างๆ แสดงผลดังตารางภาคผนวกที่ ข-5 และสร้างกราฟมาตรฐานได้ดังรูปภาคผนวกที่ ข-4 เมื่อนำสารสกัดเมทานอลจากดอกพิกุลทั้งสองส่วนมาทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+}-TPTZ ในวิธี FRAP เทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกพบว่าสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอก และกลีบเลี้ยงพิกุลมีความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+}-TPTZ เท่ากับ 34.50 และ 63.41 mg AAE/g extract ตามลำดับ และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทดสอบด้วย T-Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และจากข้อมูลการศึกษาของ Valvi และคณะ (2011) ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลไม้กินได้ 3 ชนิด หนึ่งในนั้นพบว่าสารสกัดเมทานอลจากผลของพิกุลมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระวิธี FRAP เท่ากับ 25,634.57±0.42 uM AAE/g fresh weight

จากผลการทดลองฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระทั้งสามวิธี พบว่าให้ผลการทดลองไปในทางเดียวกัน และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัด ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าสารสกัดเมทานอลจากดอกพิกุลทั้งสองส่วนมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ดี โดยเฉพาะสารสกัดเมทานอลจากกลีบเลี้ยงของพิกุลซึ่งมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอกของพิกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์

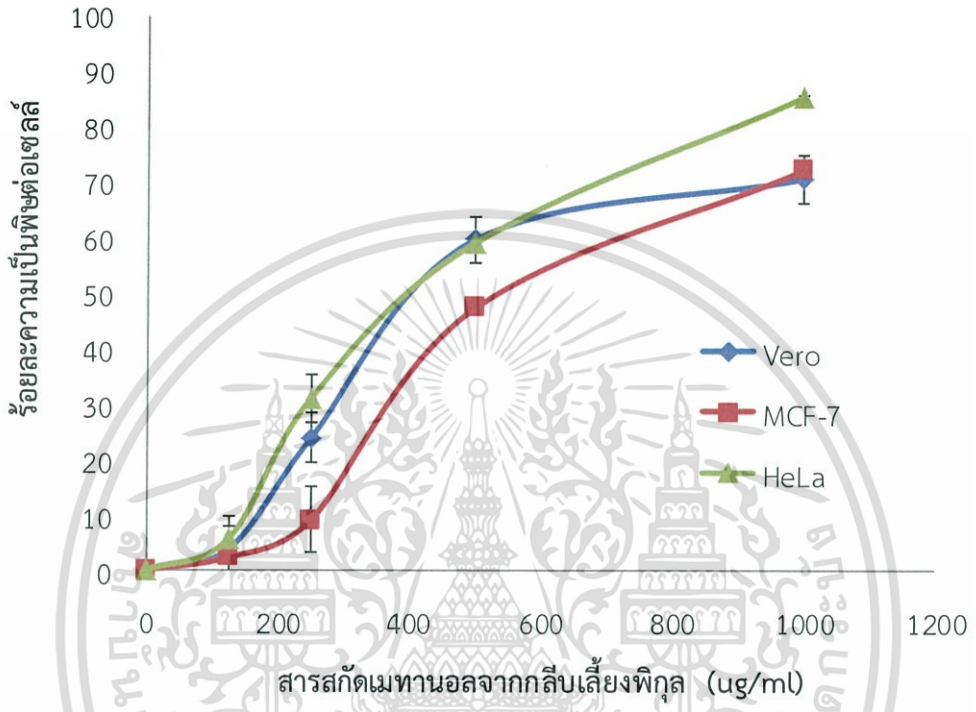
การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอก และกลีบเลี้ยงของพิกุล โดยทำการทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นของสารสกัดดังกล่าวกับเซลล์ 3 ชนิด ได้แก่ เซลล์ไตลิงปกติชนิด Vero เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 และเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa โดยทดสอบด้วยสารสกัดที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอกของพิกุลมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ โดยมีค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ไตลิงปกติชนิด Vero เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 และเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa เท่ากับ 39.36, 14.42 และ 39.81 ตามลำดับ แต่พบว่าสารสกัดเมทานอลจากกลีบเลี้ยงของพิกุลมีความเป็นพิษต่อเซลล์สูง โดยมีค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ทั้ง 3 ชนิด เท่ากับ 89.08, 74.50 และ 97.34 ตามลำดับ และทำให้ลักษณะของเซลล์เปลี่ยนแปลงไปหลังจากทดสอบด้วยสารสกัดดังกล่าวดังรูปที่ 4.5 ในขณะที่ไมโตมัยซิน ซี ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวกมีค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์เซลล์ทั้งสามชนิด เท่ากับ 36.52, 43.16, 65.38 ตามลำดับ



รูปที่ 4.5 ลักษณะของเซลล์ชนิดต่างๆเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ในหลุมควบคุม (ซ้าย) และเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอลจากกลีบเลี้ยงของพิกุลที่ความเข้มข้น 1,000 โครกรัมต่อมิลลิลิตร (ขวา) หลังจากบ่มเป็นระยะเวลา 20 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ Phase contrast ที่กำลังขยาย 100 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นจึงเลือกสารสกัดเมทานอลจากกลีบเลี้ยงของพิกุลมาศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ต่อไป เพื่อวิเคราะห์หาค่าหาความเข้มข้นของสารสกัดที่เป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50 หรือค่า IC_{50} จากผลการทดลองดังรูปที่ 4.6 พบว่าสารสกัดเมทานอลจากกลีบเลี้ยงของพิกุลมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa สูงสุด รองลงมาคือเซลล์ไตลิงปกติชนิด Vero เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ตามลำดับ โดยสามารถวิเคราะห์ค่า IC_{50} ของเซลล์ HeLa Vero และ MCF-7 ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 6.0 ได้เท่ากับ 379.06, 413.69 และ 517.47 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ



รูปที่ 4.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดเมทานอลจากกลีบเลี้ยงพิกุลกับร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์

เมื่อเทียบกับการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารสกัดจากส่วนต่างๆของพิกุล เช่น ใบ เปลือกไม้ และดอกของพิกุลมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ เช่นจากข้อมูลของ Ganesh และคณะ (2013) พบว่าสารสกัดเมทานอลจากใบและเปลือกไม้ของพิกุลมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกในคนชนิด SiHa จากการทดสอบด้วยวิธี MTT และเมื่อตรวจสอบการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซีส พบว่าสารสกัดจากใบและเปลือกไม้ของพิกุลมีค่า IC_{50} เท่ากับ 35.08±2.92 และ67.46±4.21 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสามารถทำให้เซลล์มะเร็งดังกล่าวเกิด apoptotic bodies เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 0.24 เป็นร้อยละ 60 และ 69 ตามลำดับ หลังจากที่ทดสอบด้วยสารสกัดดังกล่าว นอกจากนี้ Mahavorasirikul และคณะ (2010) ศึกษาผลของสารสกัดจากดอกพิกุลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งพบว่า สารสกัดหยาบเอทานอลจากดอกพิกุลมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด CL-6 เซลล์มะเร็งกล่องเสียงในมนุษย์ชนิด Hep-2 และเซลล์มะเร็งตับในมนุษย์ชนิด HepG2 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 48.84, 109.99 และ 54.44 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมทานอลจากดอกของพิกุลพบว่า สารสกัดเมทานอลจากดอกพิกุลทั้งสองส่วน คือ กลีบดอก และกลีบเลี้ยง มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 49.32±3.04 และ 93.36±3.58 mgGAE/g extract ตามลำดับ โดยพบว่าสารสกัดเมทานอลจากกลีบเลี้ยงพิกุล มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอกพิกุล เมื่อนำมาตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยวิธี DPPH, ABTS และความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+}-TPTZ ในวิธี FRAP พบว่า สารสกัดเมทานอลจากดอกพิกุลทั้งสองส่วนมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้ทั้งสามวิธีที่กล่าวมา

โดยสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอก และกลีบเลี้ยงของพิกุล มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 135.03 ±5.64 และ 206.72±10.38 mgTE/g extract ตามลำดับ และสามารถคำนวณค่า IC_{50} ของสารสกัดดังกล่าวได้เท่ากับ 151.79 และ 98.20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 20.78 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าของสารสกัดสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอก และกลีบเลี้ยงของพิกุลมีฤทธิ์น้อยกว่าสารมาตฐานโทรล็อกซ์ประมาณ 7.30 และ 4.73 เท่า ตามลำดับ

เมื่อทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS พบว่า โดยสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอกและกลีบเลี้ยงของพิกุล มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS เท่ากับ 161.03 ±5.63 และ 187.67±8.15 mgTE/g extract ตามลำดับ และคำนวณค่า IC_{50} ของสารสกัดดังกล่าวได้เท่ากับ 280.96 และ 236.13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยที่สารมาตรฐานโทรล็อกซ์มีค่า IC_{50} เท่ากับ 45.87 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบค่า IC_{50} ของสารสกัดทั้งสองส่วนกับสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ พบว่าของสารสกัดสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอก และกลีบเลี้ยงของพิกุลมีฤทธิ์น้อยกว่าสารมาตฐานโทรล็อกซ์ประมาณ 6.13 และ 5.15 เท่า ตามลำดับ

การตรวจสอบความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+}-TPTZ ในวิธี FRAP โดยใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐาน พบว่า สารสกัดเมทานอลจากกลีบดอก และกลีบเลี้ยงพิกุลมีความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+}-TPTZ เท่ากับ 34.33 และ 63.11 mg AAE/ g extract ตามลำดับ ซึ่งจากผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระทั้งสามวิธีพบว่า สารสกัดเมทานอลจากกลีบเลี้ยงของพิกุล มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอกของพิกุล และจากผลในการศึกษานี้พบว่าปริมาสารประกอบฟีนอลิกมีความสัมพันธ์โดยตรงกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด และผลการตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระทั้งสามวิธีให้ผลไปในทางเดียวกัน

เมื่อนำสารสกัดเมทานอลจากดอกพิกุลทั้งสองส่วน ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นกับเซลล์ไตลิงปกติชนิด Vero เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 และเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa พบว่าสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอกของพิกุลมีความเป็นพิษต่อเซลล์ทั้งสามชนิดต่ำ ในขณะที่สารสกัดเมทานอลจากกลีบเลี้ยงของพิกุลมีความเป็นพิษต่อเซลล์สูง ซึ่งมีความเป็นพิษสูงสุดกับเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa ร้อยละ 97.34 รองลงมาคือเซลล์ไตลิงปกติชนิด Vero และเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 โดยสามารถวิเคราะห์ค่า IC_{50} ของสารสกัดต่อเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั้งสามชนิดด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 6.0 ได้เท่ากับ 379.06, 413.69 และ 517.47 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

5.2 ข้อเสนอแนะ

นอกจากฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ศึกษาในการศึกษานี้ ยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆที่น่าสนใจนำมาศึกษาเพิ่มเติม เช่น ฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือด เป็นต้น อย่างไรก็ตามการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษาในระดับหลอดทดลอง ที่เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่บอกได้เพียงแนวโน้มของสารสกัดที่เป็นไปได้ และจำเป็นต้องศึกษาการออกฤทธิ์ให้ละเอียดต่อไปในระดับสัตว์ทดลองและด้านอื่นๆ ก่อนนำไปใช้พัฒนาเป็นยารักษาโรคมะเร็ง หรือยาต้านอนุมูลอิสระต่อไป

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า สารสกัดเมทานอลจากดอกพิกุลทั้งสองส่วนมีฤทธิ์ที่ดีในการต้านอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสารสกัดเมทานอลจากกลีบเลี้ยงของพิกุล เพราะฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่สูง เหมาะสำหรับนำไปศึกษาเพิ่มเติมเพื่อพัฒนาเป็นยารักษาโรคมะเร็ง และเนื่องจากการศึกษาครั้งนี้จะใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายชนิดเดียวในการสกัดสารจึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆของสารสกัด ที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดอื่น เช่น การสกัดด้วยวิธี Partition โดยใช้ตัวทำละลายเรียงตามความมีขั้ว และศึกษาเพิ่มเติมเพื่อศึกษาเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในสารสกัดด้วยเทคนิคต่างๆ เช่น HPLC และ GC/MS เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กมลวรรณ เตชะวณิช. 2552. **ปลูกไม้มงคลเสริมโชคลาภบารมี.** กรุงเทพฯ : พิมพ์ดีการพิมพ์จำกัด

เจนจิรา จิรัมย์ และ ประสงค์ สีหานาม. 2554. "อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ: แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา." *วารสารวิชาการมหาวิยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์.* 1(1) : 59-70.

วัฒนา ณ สงขลา. 2547. **ไม้ประดับที่กินได้และพืชสมุนไพร.** กรุงเทพฯ : ประสานมิตร.

เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ. 2540. **สมุนไพรกับวัฒนธรรมไทย.** กรุงเทพฯ : ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย

บังอร วงศ์รักษ์ และ ศศิลักษณ์ ปิยะสุวรรณ์. 2549. "ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผักพื้นบ้าน." วิทยานิพนธ์ปริญญาเภสัชศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยมหิดล.

บุษยมาศ รัตนดอน. 2551. "คุณภาพของดอกพิกุลแห้ง ฤทธิ์ต้านจุลชีพ และการต้านอนุมูลอิสระ." วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

บุหรัน พันธุ์สวรรค์. 2556. "อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ." *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.* 21(3) : 276-286.

ประสงค์ เทียนบุญ. 2553. "บทบาทของสารต้านอนุมูลอิสระกับสุขภาพ." *วารสารคลินิกอาหารและโภชนาการ.* 4(2) : 69-76.

รัตนา บรรเจิดพงศ์ชัย. 2545. "แอนติออกซิแดนท์และกลไกการป้องกันโรค." *วารสารเชียงใหม่เวชสาร.* 41(2) : 101-108.

เรณู คำหอม. 2559. "การทดสอบสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของปีบ" วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

สุดารัตน์ หอมหวล. ม.ป.ป. **พิกุล-ฐานข้อมูลเครื่องยา.** [Online]. Available : http://www.thaicrudedrug.com/main.php?action=viewpage&pid=92.

สุธิรา มณีฉาย และ ประสบอร รินทอง. 2559. "ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเมทานอลจากดอกถั่วแระและดอกส้มป่อย." *วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น.* 44(1) : 142-152.

สุรพงศ์ รัตนะ และ บันลือ สังข์ทอง. (2559). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเมทานอลจากดอกไม้หอมห้าชนิด. การประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยมหาสารคามวิจัย ครั้งที่12 ประจำปี 2559.(หน้า360-364).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุ่นเรือน เพชราวัลย์ และ สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม. 2555. **การเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ Animal Cell Culture.** กรุงเทพฯ : โครงการตำรา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

Baliga, M.S., Pai, R.J., Bhat, H.P., Palatty, P.L. and Boloor, R. 2011. "Chemistry and medicinal properties of the Bakul (*Mimusops elengi* Linn): A review." *Food Research International* 44 : 1823-1829.

Benzie, I.F.F. and Strain, J.J. 1996. "The ferric reducing ability of plasma as a measure of antioxidant power : The FRAP assay." *Journal of analytical Biochemistry* 293 : 70-76.

Boonyuen, C., Wangkarn, S., Suntornwat, O., and Chaisuksant, R. 2009. "Antioxidant capacity and phenolic content of *Mimusops elengi* fruit extract." *Kasetsart Journal Natural Science* 43 : 21-27.

Ganesh, G., Abhishek, T., Saurabh, M. and Sarada, N.C. 2014. "Cytotoxic and apoptosis induction potential of *Mimusops elengi* L. in human cervical cancer (SiHa) cell line." *Journal of King Saud University–Science* 26 : 333–337.

Magalhaes, L.M., Santos, F.S., Seegundo, M.A., Reis, S. and Lima, J.L. 2010. "Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity." *Talanta* 83 : 441-447.

Mahavorasirikul, W., Viyanant, V., Chaijaroenkul, W., Na-Bangchang, K. 2010. "Activity of Thai medicinal plants against human cholangiocarcinoma, laryngeal and hepatocarcinoma cells in vitro." *BMC Complementary and Alternative Medicine* 10 : 55-62.

Patil, P.S., Tatke, P.A. and Gabhe, S.Y. 2016. " *Mimusops elengi* blark and fruits extracts as potential free radical scavenging agent." *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research* 3(11) : 626-632.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Evan, C. 1999. "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical action decolorization assay." *Free Radical Biology & Medicine* 26 : 1231-1237.

Saha, M.R., Hasan, S.M.R., Aktera, R., Hossain, M.M., Alamb, M.S., Alam, M.A. and Mazumder, M.E.H. 2008. "In vitro free radical scavenging activity of methanol extracts of the leaves of *Mimusops elengi* Linn." *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine* 6(2) : 197- 202.

Shahwar, D. and Raza, M.A. 2012. "Antioxidant potential of phenolic extracts of *Mimusops elengi*." Asian Pacific *Journal of Tropical Biomedicine* 2(7) : 547-550.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Shanmugapriya, K., Saravana, P.S., Payal, H., Mohammed, S.P. and Binnie, W. 2011. "Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents of *Artocarpus heterophllus* and *Manilkara zapota* seeds and its reduction potential." *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 3 : 256-260.

Singh, K.L., Srivastava, P., Kumar, S., Singh, D.K. and Singh, V.K.. 2014. "*Mimusops elengi* Linn. (Maulsari): a potential medicinal plant." *journal of Biomedical Sciences* 2 : 18-29

Shivatare, R.S., Deoda, R.S., Kadam, P.V., Palatty,P.L., Bhusnar, H.U., Narappanawar, N.S. and Patil, M.J. 2013. "Pharmacognostic Standards for *Mimusops elengi* Linn A Review." 2(3) : 12-18.

Valvi, S.R., Rathod, V.S. and Yesane, D.P. 2011. "Screening of three wild edible fruits for their antioxidant potential." *Journal of Current Botany* 2(1) : 48-52.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 (ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร)

สารเคมีที่ใช้

1. อาหาร RPMI 1640 (ชนิดผง)	1	ซอง
2. น้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว	1,000	มิลลิลิตร
3. $NaHCO_3$	2	กรัม

ขั้นตอนการเตรียม

1. ผสมอาหาร RPMI 1640 กับน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 900 มิลลิลิตร
2. เติม $NaHCO_3$ 2 กรัมแล้วผสมให้เข้ากันด้วย Magnetic stirrer
3. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรครบ 1,000 มิลลิลิตร
4. ปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 6.8-7.0
5. กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร ภายในตู้ laminar air flow
6. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การเตรียม complete media

สารเคมีที่ใช้

1. อาหาร RPMI 1640 ที่เตรียมแล้ว	100	มิลลิลิตร
2. Fetal Brovine Serum (FBS)	8%	ปริมาตรต่อปริมาตร
3. Gentamicin	100	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

1. ผสมอาหาร RPMI 1640 กับ FBS แล้วเติมยาปฏิชีวนะ gentamicin ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร
2. กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร ภายในตู้ Laminar air flow
3. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. การเตรียม Fetal Bovine Serum (FBS)

ขั้นตอนการเตรียม

1. นำซีรั่มมาทำการ inactivate ในอุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
2. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก (ต่อ)

4. การนับเซลล์ และการคำนวณเซลล์ที่มีชีวิตด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์

1. เตรียมเซลล์ที่ต้องการนับจำนวน กรณีเซลล์เกาะพื้นผิวต้องทำการย่อยเซลล์ออกจาก flask ก่อน ด้วยเอนไซม์ทริปซิน ถ้าเป็นเซลล์แขวนลอยสามารถดูดเซลล์มานับได้เลย
2. ทำการย้อมสีเซลล์โดยการการผสมเซลล์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร กับสีย้อม trypan blue ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ให้เข้ากัน
3. ดูดเซลล์หยอดลงช่องใน chamber ของฮีมาไซโตมิเตอร์ 2 ฝั่ง ฝั่งละ 10 ไมโครลิตร
4. นำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10 และ 40 เท่า โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะติดสีฟ้า ส่วนเซลล์ที่ไม่มีชีวิตจะติดสีฟ้าของ trypan blue
5. นับจำนวนเซลล์จำนวน 5 ช่องใหญ่ของทั้ง 2 chamber แล้วบันทึกเซลล์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต
6. คำนวณหาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตต่อ 1 มิลลิลิตร จากสูตรต่อไปนี้

จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต/มิลลิลิตร = จำนวนเซลล์มีชีวิตเฉลี่ย x 10^4 x dilution factor

5. การเตรียมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ปริมาตร 25 มิลลิลิตร)

สารเคมีที่ใช้

1. สาร MTT (ชนิดผง)	50	มิลลิกรัม
2. PBS (pH 7.4)	25	มิลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่งสาร MTT ปริมาณ 50 มิลลิกรัม
2. เติม PBS ปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วผสมกันด้วยเครื่อง Megnetic stirrer

6. การเตรียม Phosphate Buffer Saline (PBS) (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

สารเคมีที่ใช้

1. PBS	1	เม็ด
2. น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

1. นำ PBS สำเร็จรูป จำนวน 1 เม็ด ใส่ลงในบีกเกอร์ จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตรเป็น100 มิลลิลิตร
2. ทำให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันด้วย Megnetic stirrer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก (ต่อ)

3. นำสารละลายที่เตรียมได้ไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

7. การเตรียมสารเพื่อทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระ(DPPH) ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ (ปริมาตร 25 มิลลิลิตร)

สารเคมีที่ใช้

1.	สาร DPPH	1.97	มิลลิกรัม
2.	เมทานอล	25	มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

ชั่งสาร DPPH 1.97 มิลลิกรัม ให้เข้ากันด้วยเมทานอล และปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรให้ได้ 25 มิลลิลิตร

8. การเตรียมสาร FolinCiocalteu ร้อยละ 20 (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

สารเคมีที่ใช้

1.	สาร Folin-Ciocalteu (สำเร็จรูป)	20	มิลลิลิตร
2.	น้ำกลั่น	80	มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

1. นำ Folin-Ciocalteu (สำเร็จรูป) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร
2. ใส่ขวดแก้วที่ห่อฟอยล์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

9. การเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ร้อยละ 7.5 (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

สารเคมีที่ใช้

1.	โซเดียมคาร์บอเนต	7.50	กรัม
2.	น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่งสารโซเดียมคาร์บอเนต 7.50 กรัม จะลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร
2. ละลายสารให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง Megnetic stirrer
3. เก็บไว้ในขวดแก้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก (ต่อ)

10. การเตรียมสารละลาย FRAP reagent (ปริมาตร 12 มิลลิลิตร)

สารเคมีที่ใช้

1.	สารละลาย acetate buffer ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ pH 3.6	10	มิลลิลิตร
2.	สารละลาย TPTZ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ในกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์	1	มิลลิลิตร
3.	สารละลายเฟอริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์	1	มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

1. เตรียมสารละลาย FRAP reagent จากการผสมสารละลาย acetate buffer ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ pH 3.6 : สารละลาย TPTZ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ในกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ :สารละลายเฟอริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วน 10:1:1
2. เก็บไว้ในขวดแก้ว (เตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้งาน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

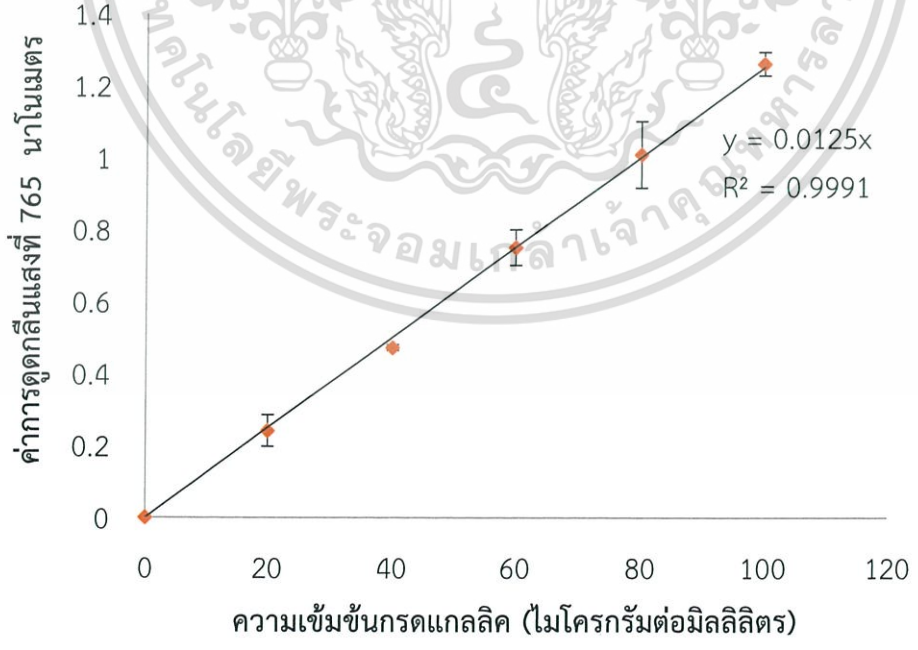
การคำนวณเกี่ยวกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

1. การคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแกลลิคความเข้มข้นต่างๆ ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร จากการวิเคราะห์ตามวิธี Folin-Ciocalteu แสดงดังตารางภาคผนวกที่ ข-1 (หัวข้อที่ 3.5.3) และได้กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกดังรูปภาคผนวกที่ ข-1

ตารางภาคผนวกที่ ข-1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแกลลิคความเข้มข้นต่างๆ ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร สำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแกลลิค (ug/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย
	1	2	3	
20	0.2916	0.2143	0.2175	0.2411
40	0.5430	0.5296	0.5433	0.4720
60	0.7983	0.7530	0.6997	0.7503
80	1.0813	1.0406	0.9049	1.0089
100	1.2626	1.2940	1.2286	1.2617



รูปภาคผนวกที่ ข-1 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกสำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข (ต่อ)

จากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิค (รูปภาคผนวกที่ ข-1) ได้สมการสารมาตรฐานดังนี้

$$Y = 0.0125x \quad \text{(ข-1)}$$

โดยที่ y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

X คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

ตารางภาคผนวกที่ ข-2 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอก และกลีบเลี้ยงของพิกุลความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร สำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัด

สารสกัดเมทานอล ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร		
	1	2	3
กลีบดอกพิกุล	0.5756	0.6507	0.6230
กลีบเลี้ยงพิกุล	1.1736	1.1193	1.2080

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

สารสกัดเมทานอลจากกลีบดอกของพิกุลความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรนำมาวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกทั้งหมด ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu (หัวข้อที่ 3.5.3) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร เฉลี่ยได้เท่ากับ 0.5756

จากสมการที่ ข-1 หาค่า x จะได้ $x = y/0.0125$ (ข-2)

เมื่อแทนค่า y ในสมการที่ ข-2 $x = 0.5756/0.0125$

$x = 46.05$ µgGAE/ml

จากนั้นนำค่าที่ได้มาหารด้วยความเข้มข้นของสารสกัดที่นำมาทดสอบคือ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าที่ได้จะอยู่ในหน่วย µgGAE/mg extract หรือเท่ากับ mgGAE/g extract ดังนั้นสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอกของพิกุล มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 46.08 mgGAE/g extract ทำเช่นนี้ในแต่ละซ้ำ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และในสารสกัดเมทานอลจากกลีบเลี้ยงของพิกุลก็คำนวณเช่นเดียวกัน

2. การคำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH

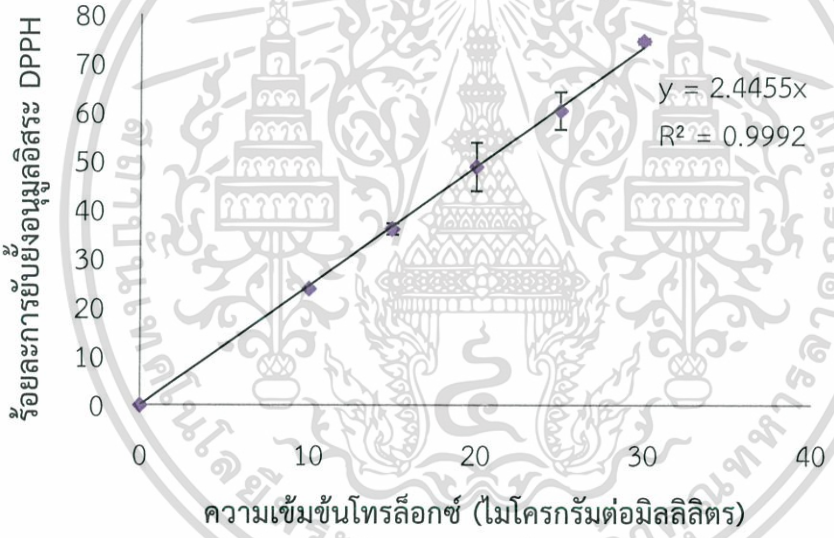
นำค่าร้อยละการต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH ของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังตารางภาคผนวกที่ ข-3 มาสร้างกราฟมาตรฐานโทรล็อกซ์ระหว่างความเข้มข้นของสารโทรล็อกซ์กับค่าเฉลี่ยร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดังรูปภาคผนวกที่ ข-2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ ข-3 สารมาตรฐานโทรล็อกซ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ และค่าร้อยละการต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH

ความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH			ค่าเฉลี่ย±SE
	1	2	3	
10	23.6691	23.5993	24.2486	23.83±0.35
15	34.8591	36.2274	37.1346	36.07±1.14
20	46.1243	45.8317	54.5903	48.84±4.97
25	59.7083	56.8190	64.4709	60.33±3.86
30	74.6354	75.1440	73.9810	74.58±0.58



รูปภาคผนวกที่ ข-2 กราฟมาตรฐานโทรล็อกซ์สำหรับวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH

จากกราฟมาตรฐานโทรล็อกซ์ (รูปภาคผนวกที่ ข-2) ได้สมการสารมาตรฐานดังนี้

$$Y = 2.4455x \qquad \text{(ข-3)}$$

โดยที่ y คือ ร้อยละฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH

X คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข (ต่อ)

ตัวอย่างการคำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH

ตัวอย่างสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอกของพิกุลที่ความเข้มข้น 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำมาศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH (หัวข้อที่ 3.5.4.1) คำนวณค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH เฉลี่ยได้เท่ากับร้อยละ 49.69

จากสมการที่ ข-3 หาค่า x จะได้ x = y/2.4455 (ข-4)

เมื่อแทนค่า y ในสมการที่ ข-2 x = 49.69/2.4455

x = 20.32 µgTE/ml

นำค่าที่ได้หารด้วยความเข้มข้นของสารสกัดที่นำมาทดสอบคือ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และคูณด้วย 1,000 ค่าที่ได้จะอยู่ในหน่วย mgTE/g extract ดังนั้นสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอกของพิกุลมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 135.45 mgTE/g extract ทำเช่นนี้ในแต่ละซ้ำ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และในสารสกัดเมทานอลจากกลีบเลี้ยงของพิกุลก็คำนวณเช่นเดียวกัน

นอกจากนี้ยังสามารถหาค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ได้จากสมการของสารมาตรฐานดังกล่าว โดยแทนค่า y เท่ากับร้อยละ 50 ในสมการที่ ข-4 ได้ดังนี้

x = 50/2.4455

x = 20.45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ที่ได้จากการคำนวณ เท่ากับ 20.45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนค่า IC_{50}ของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ที่ได้จากโปรแกรม GraphPad Prism 6.0 เท่ากับ 20.78 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งพบว่าค่าไม่แตกต่างกันมาก โดยในบทที่ 4 ได้รายงานค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ที่ได้จากโปรแกรม GraphPad Prism 6.0

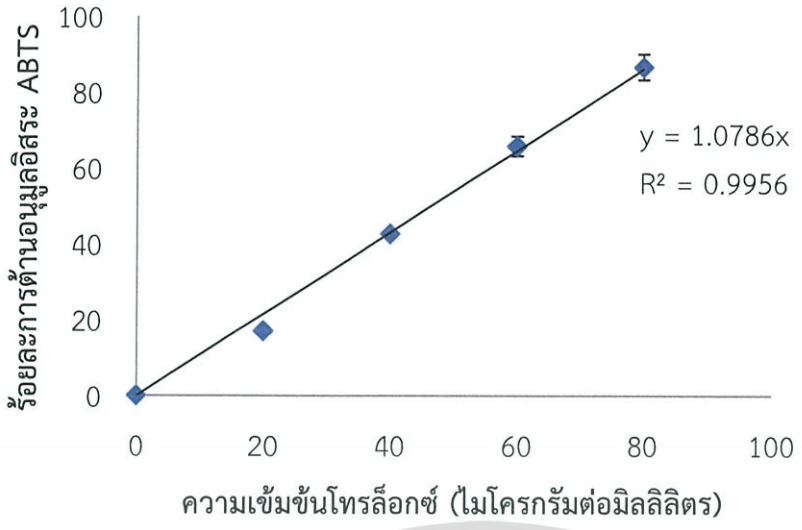
3. การคำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS

นำค่าร้อยละการต้านสารอนุมูลอิสระ ABTS ของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดัง ตารางภาคผนวกที่ ข-4 มาสร้างกราฟมาตรฐานโทรล็อกซ์ระหว่างความเข้มข้นของสารโทรล็อกซ์กับค่าเฉลี่ยร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ดังรูปภาคผนวกที่ ข-3

ตารางภาคผนวกที่ ข-4 สารมาตรฐานโทรล็อกซ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ และค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS

ความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS			ค่าเฉลี่ย±SE
	1	2	3	
20	16.7401	16.8803	17.6601	17.09±0.50
40	42.7203	43.2801	42.1905	42.73±0.55
60	67.6102	67.0303	62.9111	65.85±2.56
80	85.6101	90.6102	84.0801	86.76±3.42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปภาคผนวกที่ ข-3 กราฟมาตรฐานโทรล็อกซ์สำหรับวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS

จากกราฟมาตรฐานโทรล็อกซ์ (รูปภาคผนวกที่ ข-3) ได้สมการสารมาตรฐานดังนี้

$$Y = 1.0786x \quad \text{(ข-5)}$$

โดยที่ y คือ ร้อยละฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS

X คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

วิธีการคำนวณเช่นเดียวกับการคำนวณความสามารภในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH

<u>ตัวอย่างการคำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS</u>

ตัวอย่างสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอกของพิกุลที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำมาศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS (หัวข้อที่ 3.5.4.2) คำนวณค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS เฉลี่ยได้เท่ากับร้อยละ 17.76

จากสมการที่ ข-5 หาค่า x จะได้ $x = y/1.0786$ (ข-6)

เมื่อแทนค่า y ในสมการที่ ข-6 $x = 17.76/1.0786$

$x = 16.47$ µgTE/ml

นำค่าที่ได้หารด้วยความเข้มข้นของสารสกัดที่นำมาทดสอบคือ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และคูณด้วย 1,000 ค่าที่ได้จะอยู่ในหน่วย mgTE/g extract ดังนั้นสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอกของพิกุลมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS เท่ากับ 164.66 mgTE/g extract ทำเช่นนี้ในแต่ละซ้ำ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และในสารสกัดเมทานอลจากกลีบเลี้ยงของพิกุลก็คำนวณเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังสามารถหาค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ได้จากสมการของสารมาตรฐานดังกล่าว โดยแทนค่า y เท่ากับร้อยละ 50 ในสมการที่ ข-5 ได้ดังนี้

$x = 50/1.0786$

$x = 46.35$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

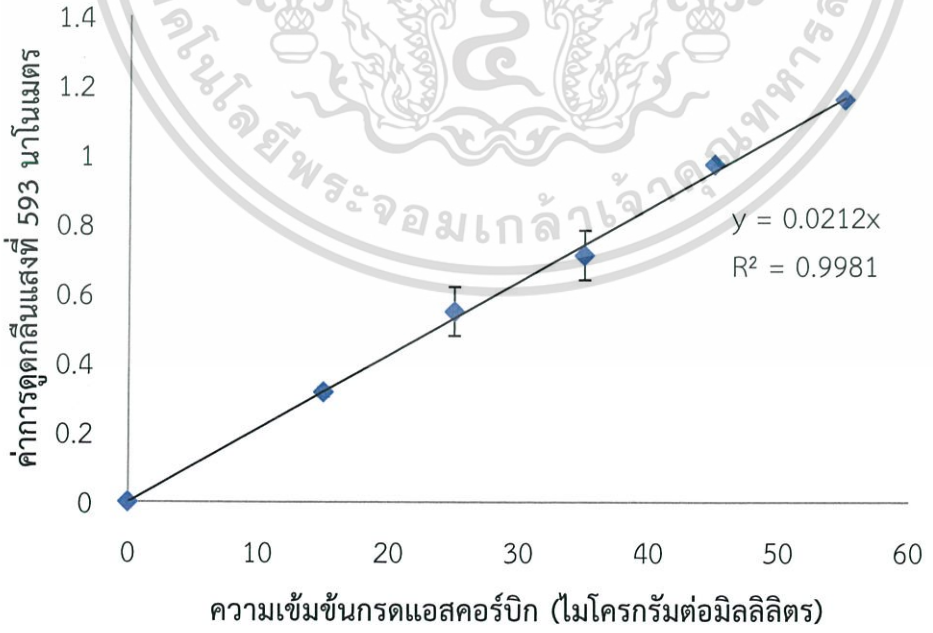
ค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ที่ได้จากการคำนวณ เท่ากับ 46.35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนค่า IC_{50}ของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ที่ได้จากโปรแกรม GraphPad Prism 6.0 เท่ากับ 45.87 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งพบว่าค่าไม่แตกต่างกันมาก โดยในบทที่ 4 ได้รายงานค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ที่ได้จากโปรแกรม GraphPad Prism 6.0

4. การคำนวณความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+}-TPTZ ในวิธี FRAP

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังตารางภาคผนวกที่ ข-5 มาสร้างกราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก ระหว่างความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิกกับค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย ดังรูปภาคผนวกที่ ข-4

ตารางภาคผนวกที่ ข-5 สารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่างๆ และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร สำหรับวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+}-TPTZ ในวิธี FRAP

ความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความคลื่น 593 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย±SE
	1	2	3	
15	0.3293	0.3020	0.3190	0.3168±0.01
25	0.4783	0.6200	0.5490	0.5491±0.07
35	0.6400	0.7830	0.7115	0.7115±0.07
45	0.9760	0.9820	0.9639	0.9740±0.01
55	1.1559	1.1670	1.1640	1.1623±0.01



รูปภาคผนวกที่ ข-4 กราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก สำหรับวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+}-TPTZ ในวิธี FRAP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากกราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (รูปภาคผนวกที่ ข-4) ได้สมการสารมาตรฐานดังนี้

$$Y = 0.0212x \quad \text{(ข-7)}$$

โดยที่ y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร

X คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

ตัวอย่างการคำนวณความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+}-TPTZ ในวิธี FRAP

ตัวอย่างสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอกของพิกุลความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำมาศึกษาความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+}-TPTZ ในวิธี FRAP (หัวข้อที่ 3.5.4.3) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ได้เท่ากับร้อยละ 0.366

จากสมการที่ ข-7 หาค่า x จะได้ $x = y/0.0212$ (ข-8)

เมื่อแทนค่า y ในสมการที่ ข-8 $x = 0.366/0.0212$

$x = 17.25$ µgAAE/ml

นำค่าที่ได้หารด้วยความเข้มข้นของสารสกัดที่นำมาทดสอบคือ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และคูณด้วย 1,000 ค่าที่ได้จะอยู่ในหน่วย mgTE/g extract ดังนั้นสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอกของพิกุลมีความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+}-TPTZ ในวิธี FRAP เท่ากับ 34.50 mgAAE/g extract ทำเช่นนี้ในแต่ละซ้ำแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และในสารสกัดเมทานอลจากกลีบเลี้ยงของพิกุลก็คำนวณเช่นเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics23

การวิเคราะห์ผลความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และความเป็นพิษต่อเซลล์ ระหว่างส ารสกัดเมทานอลจากกลีบดอกและกลีบเลี้ยงของพิกุลโดยใช้ T-Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ได้ผลดังต่อไปนี้

1. **การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด**

ตารางภาคผนวกที่ ค-1 ตารางการวิเคราะห์ผลความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดระหว่างสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอกและกลีบเลี้ยงของพิกุล โดยใช้ T-Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

Group Statistics

	Group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Total phenolic content	Petals extract	3	49.31778	3.037194	1.753525
	Sepals extract	3	93.35911	3.578037	2.065781

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	T	Df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Total phenolic content	Equal variances assumed	.077	.795	-16.253	4	.000	-44.041333	2.709668	-51.564577	-36.518090
	Equal variances not assumed			-16.253	3.897	.000	-44.041333	2.709668	-51.643506	-36.439160

ภาคผนวก ค (ต่อ)

2. **การวิเคราะห์ปริมาณฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ**

ตารางภาคผนวกที่ ค-2 ตารางการวิเคราะห์ผลความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (mgTE/g extract) ระหว่างสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอกและกลีบเลี้ยงของพิกุลโดยใช้ T-Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

Group Statistics

	group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
DPPH radical scavenging activity	Petals extract	5	135.02884	5.649090	2.526350
	Sepals extract	5	206.71517	10.388114	4.645706

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	T	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
DPPH radical scavenging activity	Equal variances assumed	.772	.405	-13.556	8	.000	-71.686331	5.288197	-83.880935	-59.491728
	Equal variances not assumed			-13.556	6.176	.000	-71.686331	5.288197	-84.537453	-58.835210

ภาคผนวก ค (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ ค-3 ตารางการวิเคราะห์ผลความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS (mgTE/g extract) ระหว่างสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอกและกลีบเลี้ยงของพิกุลโดยใช้ T-Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

Group Statistics

	Group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ABTS radical scavenging activity	Petals extract	5	161.03340	5.628275	2.517041
	Sepals extract	5	187.66799	8.146281	3.643128

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	T	Df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
ABTS radical scavenging activity	Equal variances assumed	2.824	.131	-6.015	8	.000	-26.634593	4.428078	-36.845759	-16.423426
	Equal variances not assumed			-6.015	7.110	.001	-26.634593	4.428078	-37.072556	-16.196630

ภาคผนวก ค (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ ค-4 ตารางการวิเคราะห์ผลความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+}-TPTZ ในวิธี FRAP (mgAAE/g extract) ระหว่างสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอกและกลีบเลี้ยงของพิกุลโดยใช้ T-Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

Group Statistics

	group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Ferric reducing antioxidant power	Petals extract	3	34.49686	2.954469	1.705763
	Sepals extract	3	63.40671	9.542372	5.509291

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
FRAP	Equal variances assumed	5.925	.072	-5.013	4	.007	-28.909853	5.767314	-44.922485	-12.897222
	Equal variances not assumed			-5.013	2.380	.026	-28.909853	5.767314	-50.289375	-7.530332

ภาคผนวก ค (ต่อ)

3. **การวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์**

ตารางภาคผนวกที่ ค-5 ตารางการวิเคราะห์ผลความแตกต่างของค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero ระหว่างสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอกและกลีบเลี้ยงของพิกุลที่ความเข้มข้น1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ T-Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

Group Statistics

	Group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Vero	Petals extract	3	39.3591	6.08711	3.51440
	Sepals extract	3	89.0832	3.00476	1.73480

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	T	Df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Vero	Equal variances assumed	2.637	.180	-12.687	4	.000	-49.72411	3.91925	-60.60569	-38.84253
	Equal variances not assumed			-12.687	2.920	.001	-49.72411	3.91925	-62.39237	-37.05585

ภาคผนวก ค (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ ค-6 ตารางการวิเคราะห์ผลความแตกต่างของค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ HeLa ระหว่างสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอกและกลีบเลี้ยงของพิกุล ที่ความเข้มข้น1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ T-Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

Group Statistics

	group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
HeLa	Petals extract	3	39.8065	9.11337	5.26161
	Sepals extract	3	97.3700	2.99624	1.72988

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
HeLa	Equal variances assumed	3.852	.121	-10.393	4	.000	-57.56349	5.53868	-72.94134	-42.18564
	Equal variances not assumed			-10.393	2.427	.005	-57.56349	5.53868	-77.79268	-37.33430

ภาคผนวก ค (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ ค-7 ตารางการวิเคราะห์ผลความแตกต่างของค่าเฉลี่ยร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7 ระหว่างสารสกัดเมทานอลจากกลีบดอกและกลีบเลี้ยงของพิกุล ที่ความเข้มข้น1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ T-Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

Group Statistics

	Group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
MCF-7	Petals extract	3	14.4191	7.70670	4.44946
	Sepals extract	3	40.6883	.54756	.31613

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	T	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
MCF-7	Equal variances assumed	4.418	.103	-5.889	4	.004	-26.26917	4.46068	-38.65401	-13.88434
	Equal variances not assumed			-5.889	2.020	.027	-26.26917	4.46068	-45.27927	-7.25908