



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของเปลือกผลและเมล็ดสละ
The study of free radical scavenging activity and anti-tyrosinase activity of
salak fruit peel and seed extracts

โดย

นสภ.จณิสตา	สามัญ	รหัสบัณฑิต 59210095
นสภ.ศศิมา	ศิริถาวรวงศ์	รหัสบัณฑิต 59210205
นสภ.ชัตติยา	บุญรอง	รหัสบัณฑิต 59210239

โครงการวิจัยเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2563
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของเปลือกผลและเมล็ดสะละ
The study of free radical scavenging activity and anti-tyrosinase activity of
salak fruit peel and seed extracts

โดย

นสภ.จณิสตา	สามัญ	รหัสบัณฑิต 59210095
นสภ.ศศิมา	ศิริถาวรวงศ์	รหัสบัณฑิต 59210205
นสภ.ชัตติยา	บุญรอง	รหัสบัณฑิต 59210239

โครงการวิจัยเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2563
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

รายงานวิจัยเรื่องการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของเปลือกผลและเมล็ดสละ (The study of free radical scavenging activity and antityrosinase activity of Salak fruit peel and seed extracts) คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษากฎดังกล่าว เนื่องจากเปลือกผลและเมล็ดสละเป็นผลไม้พื้นถิ่น พบได้มากในภาคตะวันออกของประเทศไทย มีการใช้ประโยชน์ในหลาย ๆ ด้านไม่ว่าจะเป็นการนำเนื้อผลมาประกอบอาหาร ใช้รับประทานเป็นผลไม้ ทำน้ำผลไม้หรือขนมหวาน เช่น สลสลอยแก้ว การนำใบสละมาทำเป็นเครื่องจักรสาน รวมถึงการนำเปลือกสละที่เหลือทิ้งมาทำปุ๋ย

สำหรับการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและองค์ประกอบทางเคมีของส่วนเปลือกผลและเมล็ดสละยังพบการศึกษาน้อย จึงทำให้ผู้วิจัยสนใจนำส่วนเปลือกผลและเมล็ดสละมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและองค์ประกอบทางเคมี เพื่อพัฒนาต่อยอดแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับการบำรุงผิวเพื่อลดริ้วรอยและความหมองคล้ำต่อไป

คณะผู้วิจัย

นสภ.จณิสตา สามัญ รหัสบัณฑิต 59210095

นสภ.ศศิมา ศิริถาวรวงศ์ รหัสบัณฑิต 59210205

นสภ.ชัตติยา บุญรอง รหัสบัณฑิต 59210239

22 มีนาคม 2564

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2563

เรื่อง การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของเปลือกผลและเมล็ดสละ

ผู้จัดทำโครงการวิจัย

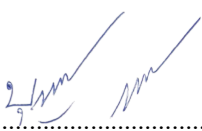
1. นสภ.จณิสตา สามัญ รหัสสนิต 59210095
2. นสภ.ศศิมา ศิริถาวรวงศ์ รหัสสนิต 59210205
3. นสภ.ชัตติยา บุญรอง รหัสสนิต 59210239

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

ภก.ผศ.ดร. บุญดิศย์ วงศ์ศักดิ์

บทคัดย่อ

สละเป็นพืชในวงศ์ Arecaceae ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ดังกล่าวของเปลือกผลและเมล็ดสละ ในสารสกัดจากสละ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์เนินวง สายพันธุ์สุมาลี สายพันธุ์หม้อ และสายพันธุ์อินโดนีเซีย ที่มีเมทานอลเป็นตัวทำละลาย นำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS DPPH และ FRAP assay และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส รวมทั้งตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมี ด้วยวิธีรังสีเอกซ์ฟลูออเรสเซนซ์ หลังจากนั้นคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดีที่สุด นำไปสกัดด้วยวิธีสกัดสีเขียว (green extraction) โดยใช้ choline chloride ผสมกับ urea (DES1), choline chloride ผสมกับ ethylene glycol (DES2) และ choline chloride ผสมกับ propanoic acid (DES3) เป็นตัวทำละลาย จากผลการศึกษา พบว่าสารสกัดเปลือกสละสายพันธุ์หม้อมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด และสารสกัดเมล็ดสละสายพันธุ์เนินวงมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสดีที่สุด เมื่อนำไปตรวจสอบโดยใช้วิธีรังสีเอกซ์ฟลูออเรสเซนซ์ พบว่ามีสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกอยู่ จึงเลือกเปลือกสละสายพันธุ์หม้อ ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด และเมล็ดสละสายพันธุ์เนินวง ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสดีที่สุด นำไปสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล และตัวทำละลาย DES ผลการทดลองพบว่าสารสกัดของเปลือกสละสายพันธุ์หม้อที่สกัดด้วยตัวทำละลาย choline chloride ผสมกับ urea (DES1) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด และสารสกัดจากเมล็ดสละสายพันธุ์เนินวงที่สกัดด้วย choline chloride ผสมกับ Propanoic acid (DES3) มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสดีที่สุด และดีกว่าสารมาตรฐานกรดโคจิก ดังนั้นจึงควรศึกษาสารที่ออกฤทธิ์ และกลไกที่ออกฤทธิ์ในการศึกษาต่อไป


.....
(อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัย)

Senior Project Academic Year 2020

: The study of free radical scavenging activity and anti-tyrosinase activity of Salak fruit peel and seed extracts

By

1. Miss. Janista Samun ID 59210095
2. Miss. Sasima Sirithawornwong ID 59210205
3. Miss. Khattiya Boonrong ID 59210239

Advisor:

Assist. Prof. Dr. Boonyadist Vongsak Ph.D

ABSTRACT

Salak is a plant of the Arecaceae that has antioxidant and antityrosinase activities. In this study, the peel and seed of salak in 4 cultivars, including Noen Wong, Sumalee, Mor and Indonesia using methanol as solvent were tested by ABTS, DPPH and FRAP methods for free radical scavenging activity and tyrosinase inhibition activity. The thin layer chromatography method was also examined. The species that exhibited the best antioxidant and antityrosinase activities were selected and extracted with ethanol and green extraction (choline chloride (ChCl)-urea (DES1), choline chloride (ChCl)-ethylene glycol (DES2) and choline chloride (ChCl)-Propanoic acid (DES3)). The result showed that the Mor peel extract has the strongest antioxidant activity and the extract of Noen Wong seeds has the highest antityrosinase activity and the caffeoylquinic acids were detected by thin layer chromatography. These samples were selected to extract with ethanol and DES solvents. The Mor peel extract with DES1 exhibited the highest antioxidant activity and the Noen Wong seeds extract with DES3 has the highest inhibitory activity of tyrosinase comparable with kojic acid, a positive control. In further study, the active compounds and biological mechanism of salak could be elucidated.

B. Vongsak

(Advisor)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้สำเร็จลงด้วยดีด้วยความช่วยเหลือจาก ภญ.ดร.เนตรชนก เจียงสืบชาติวิระ ภญ.ดร.ชฎาพร พรหมปัญญา และภก.ผศ.ดร.บุญดิศย์ วงศ์ศักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษา ที่ให้คำปรึกษาและแนะแนวทางในการค้นคว้าหาข้อมูล ความรู้ และแนวทางการแก้ปัญหา ให้ความช่วยเหลือ ให้กำลังใจ รวมถึงคอยดูแลและช่วยในการตรวจสอบความถูกต้องตลอดการทำงานโครงการวิจัย และช่วยแก้ไขข้อบกพร่องในการเขียนโครงการวิจัยทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จตามความคาดหวัง

ขอขอบพระคุณผู้ทรงคุณวุฒิผู้เชี่ยวชาญที่ให้คำแนะนำ กรุณาเป็นคณะกรรมการสอบโครงการวิจัยนี้ที่คอยชี้แนะแนวทาง ขอขอบพระคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ผู้ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย ขอขอบพระคุณคุณกนกพร ก้อนทรัพย์ ที่คอยให้คำปรึกษาและช่วยเหลือในการทำโครงการวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาที่คอยให้กำลังใจ ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่คณะเภสัชศาสตร์และเพื่อน ๆ รวมถึงผู้ที่เกี่ยวข้องทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือ และกำลังใจในการทำโครงการวิจัยนี้ตลอดมา จนทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้ด้วย

คณะผู้จัดทำ

นสภ.จณิสตา สามัญ รหัสนิสิต 59210095

นสภ.ศศิมา ศิริถาวรวงศ์ รหัสนิสิต 59210205

นสภ.ชัตติยา บุญรอง รหัสนิสิต 59210239

22 มีนาคม 2564

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
คำนำ	ข
บทคัดย่อ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ช
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญรูปภาพ	ณ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	
1. ข้อมูลทั่วไปของสละ	3
2. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ	7
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	
1. พืชที่ใช้ในการศึกษา	18
2. เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี	18
3. วิธีวิจัย	20
4. การทดสอบฤทธิ์	23
5. การวิเคราะห์ทางสถิติ	26
บทที่ 4 ผลการทดลอง	
1. การสกัดสารสำคัญจากเปลือกผลและเมล็ดสละทั้ง 4 สายพันธุ์	27
2. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล	27
3. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส	31
4. การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากเปลือกสละสายพันธุ์หม้อที่สกัดด้วยตัวทำละลาย DES และตัวทำละลายเอทานอล	33
5. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจาก เมล็ดสละสายพันธุ์เนาว์ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย DES และตัวทำละลายเอทานอล	34
6. การตรวจสอบด้วยรังคเลขฝิวบาง (Thin layer chromatography)	35
บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย	38
เอกสารอ้างอิง	41

เรื่อง	หน้า
ภาคผนวก	
1. การเตรียมสารทดสอบ	44
2. ผลการทดลอง	46
3. อักษรวิสุทธิ	49

สารบัญตาราง

เรื่อง	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะสละทั้ง 4 สายพันธุ์	6
ตารางที่ 2 แสดงสารประกอบที่สกัดด้วยระบบตัวทำละลาย deep eutectic solvent (DES)	17
ตารางที่ 3 แสดงปริมาณสารสกัดเปลือกผลและเมล็ดสละทั้ง 4 สายพันธุ์	27
ตารางที่ 4 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay	28
ตารางที่ 5 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay	29
ตารางที่ 6 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay	30
ตารางที่ 7 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส	31
ตารางที่ 8 แสดงผลการทดสอบปริมาณสารฟีนอลิก ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส	32
ตารางที่ 9 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจากเปลือกสละสายพันธุ์หม้อ	33
ตารางที่ 10 แสดงค่า IC_{50} ของสารสกัดจากเมล็ดสละสายพันธุ์เนินวงต่อฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส	34

สารบัญภาพ

เรื่อง	หน้า
ภาพที่ 1 สละ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สละเนืวนาง สละสุมาลี สละหม้อ และสละอินโดนีเซีย	3
ภาพที่ 2 ลักษณะราก ลำต้น ใบของสละ	4
ภาพที่ 3 เปลือกผลและเมล็ดสละสายพันธุ์เนืวนาง	5
ภาพที่ 4 เปลือกผลและเมล็ดสละสายพันธุ์สุมาลี	5
ภาพที่ 5 เปลือกผลและเมล็ดสละสายพันธุ์หม้อ	5
ภาพที่ 6 เปลือกผลและเมล็ดสละสายพันธุ์อินโดนีเซีย	6
ภาพที่ 7 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของ DPPH assay	10
ภาพที่ 8 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของ ABTS assay	11
ภาพที่ 9 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของ FRAP assay	11
ภาพที่ 10 กลไกการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส	13
ภาพที่ 11 การไหลซึม (percolator)	14
ภาพที่ 12 การสกัดด้วยวิธี soxhlet	14
ภาพที่ 13 แสดงโครงสร้างตัวทำละลาย DES	17
ภาพที่ 14 : แผนผังขั้นตอนงานวิจัย	20
ภาพที่ 15 โครมาโตแกรมของสารสกัดเปลือกสละในระบบที่ 1	35
ภาพที่ 16 โครมาโตแกรมของสารสกัดเมล็ดสละในระบบที่ 1	36
ภาพที่ 17 โครมาโตแกรมของสารสกัดเปลือกสละในระบบที่ 2	36
ภาพที่ 18 โครมาโตแกรมของสารสกัดเมล็ดสละในระบบที่ 1	37

บทที่ 1

บทนำ

1. ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

ประเทศไทยมีที่ตั้งอยู่ในเขตร้อนใต้เส้นศูนย์สูตร ทำให้มีสภาพภูมิอากาศเป็นแบบร้อนชื้น อากาศโดยทั่วไปร้อนอบอ้าวตลอดเกือบทั้งปี โดยเฉพาะช่วงฤดูร้อนมีอุณหภูมิสูงถึงราว ๆ 40 องศาเซลเซียส และมีแดดค่อนข้างจัด แสงแดดในช่วงฤดูร้อนนั้นมักมาพร้อมกับรังสี UVA และรังสี UVB ซึ่งเป็นตัวการสำคัญในการทำลายผิวหนัง โดยประเทศไทยมีค่า UV index หรือ ดัชนีรังสีอัลตราไวโอเล็ตเฉลี่ยอยู่ในช่วง 11–12 ซึ่งเป็นระดับความรุนแรงที่สูงมาก หากได้รับแสงแดดแบบนี้เป็นเวลานาน จะทำให้เสี่ยงเกิดมะเร็งผิวหนังและปัญหาผิวต่าง ๆ ที่ตามมาได้ เช่น กระ ฝ้า สิวหนังหมองคล้ำ นอกจากนี้ยังทำให้คอลลาเจนใต้ชั้นผิวหนังเสื่อมสภาพและก่อให้เกิดอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ผิวมีความหยابกร้าน มีริ้วรอย และมีความหมองคล้ำ (1)

ปัจจุบันจึงได้มีการศึกษาหาสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและศึกษาหาสารยับยั้งหรือขัดขวางกลไกการสร้างเม็ดสีจากสารสกัดธรรมชาติ เพื่อนำมาสกัดหาสารสำคัญที่มีฤทธิ์มาใช้และนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์บำรุงผิวป้องกันริ้วรอย ความเหี่ยวย่น และผลิตภัณฑ์เพื่อความขาวกระจ่างใส ซึ่งได้มีงานวิจัยชิ้นหนึ่งที่ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของเปลือกผลสละที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสถึงร้อยละ 85.98 (2) อีกทั้งยังพบงานวิจัยหนึ่งที่ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดของเปลือกผลสละ พบว่ามีค่า $EC_{50} = 15.26$ ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม (3)

สละ (Salak) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Salacca zalacca* (Gaertn.) Voss จัดเป็นพืชในสกุลระกำ (Salacca) วงศ์ Arecaceae มีถิ่นกำเนิดในทวีปเอเชีย พบมากในจีน ไทย พม่า มาเลเซีย เวียดนาม อินโดนีเซีย และอินเดีย เป็นพืชประจำถิ่นในแถบพื้นที่ติดทะเลจึงพบเห็นได้มากแถวจังหวัดที่ติดชายทะเล ต้นมีลักษณะเป็นพุ่มเตี้ย ก้านใบมีหนามแข็ง ผลมีสีน้ำตาลอมแดงลักษณะเป็นทรงรี เปลือกแข็ง ผิวขรุขระมีเกล็ดเล็ก ๆ อยู่เหนือมีลักษณะเป็นกลีบสีเหลืองอ่อน มีรสชาติเปรี้ยวอมหวาน มีกลิ่นเฉพาะตัว ส่วนต่าง ๆ ของสละสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้มากมาย เช่น ผลของสละสามารถรับประทานได้ ยอดอ่อนสามารถนำมาปรุงอาหาร ใบสละสามารถใช้มุงหลังคาหรือห่อขนมได้ และเมล็ดสละสามารถนำมาสกัดน้ำมันใช้ทาหวดกล่อมเนื้อและบำรุงเส้นผมได้ (4)

งานวิจัยนี้จึงได้นำสละ (*Salacca zalacca* (Gaertn.) Voss) โดยเลือกใช้ส่วนเปลือกผลและเมล็ดของสละทั้งหมด 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สละเนืวนาง สละสุมาลี สละหม้อ และสละอินโดนีเซีย มาใช้เปรียบเทียบการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินใต้ชั้นผิวหนัง โดยมุ่งหวังเพื่อให้ได้สารสกัดจากสละที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

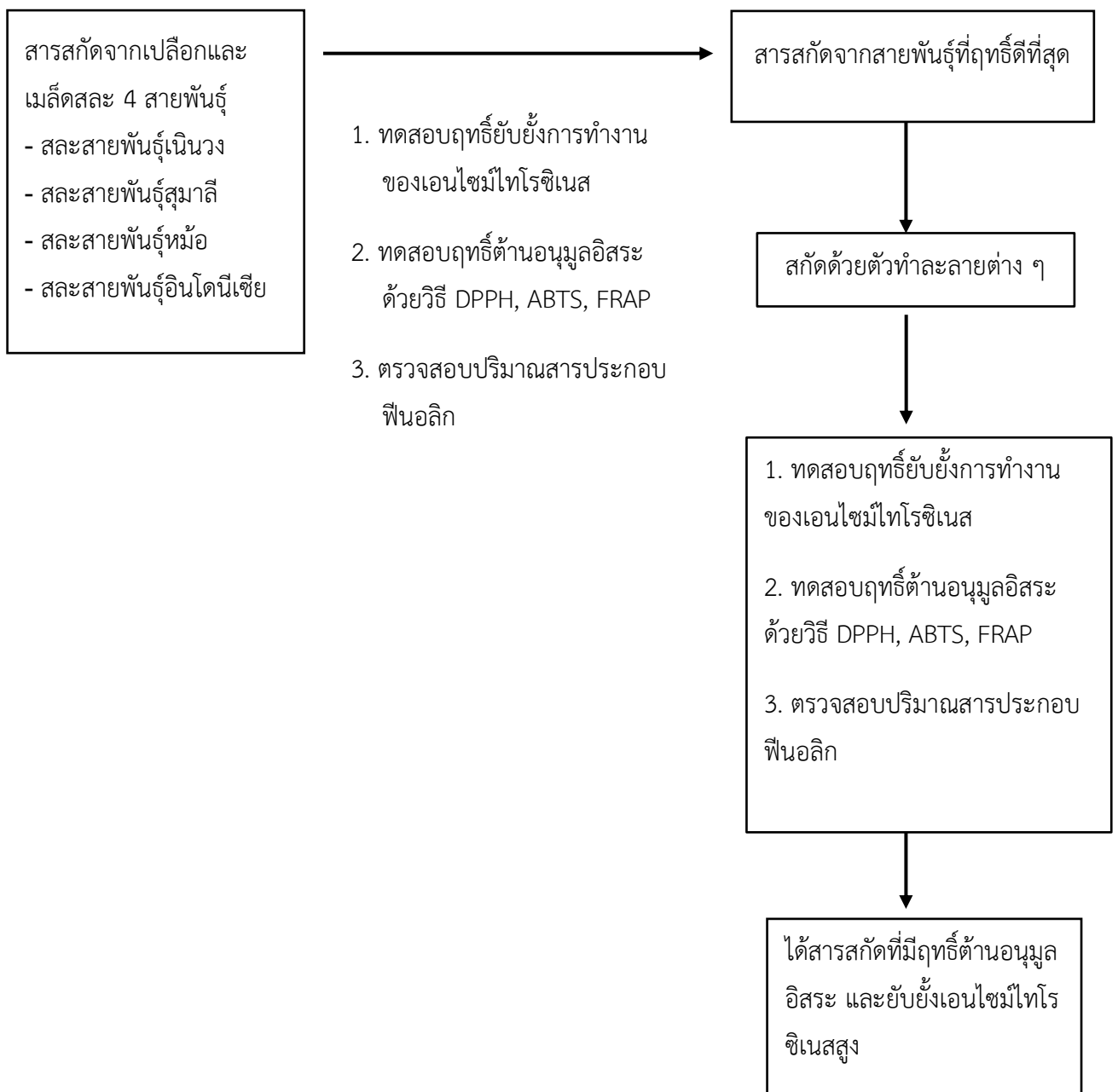
1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดของเปลือกผลและเมล็ดสละสายพันธุ์ต่าง ๆ

2. เพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารจากสละ

3. สมมติฐานของงานวิจัย

การสกัดสารจากเปลือกผลและเมล็ดสละแต่ละสายพันธุ์มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่แตกต่างกัน

4. กรอบแนวคิดของงานวิจัย



บทที่ 2

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

1. ข้อมูลทั่วไปของสละ



ภาพที่ 1 : สละ 4 สายพันธุ์ (ก) สละเนินวง, (ข) สละสุมาลี, (ค) สละหม้อ, (ง) สละอินโดนีเซีย

(ที่มา (ก) : อาทิตย์ สมโภช.สละเนินวง.[ออนไลน์].[สืบค้นเมื่อวันที่ 2 กรกฎาคม 2563].เข้าถึงได้จาก:

<https://greenspace.market/shop/สละเนินวง/>

(ข) : อาทิตย์ สมโภช.สละสุมาลี.[ออนไลน์].[สืบค้นเมื่อวันที่ 2 กรกฎาคม 2563].เข้าถึงได้จาก:

<https://greenspace.market/shop/สละสุมาลี/>

(ค) : ประกายดาว อำพันธ์ทอง.สละหม้อ.[ออนไลน์].[สืบค้นเมื่อวันที่ 2 กรกฎาคม 2563].เข้าถึงได้จาก:

<https://dreamprakaydao.wordpress.com/สละ/>

(ง) : จตุพล ยอดวงศ์พะเนา.สละอินโด.[ออนไลน์].[สืบค้นเมื่อวันที่ 2 กรกฎาคม 2563].เข้าถึงได้จาก

<https://www.kasetkaoklai.com/home/2018/09/ลุงไหว-เกษตรกรหัวใจเนก/>

1.1 ข้อมูลพฤกษศาสตร์ (5)

1.1.1 ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Salacca zeyheri* (Gaertn.) Voss

1.1.2 ชื่อพ้อง : *Calamus zeyheri*, *Salacca edulis*

1.1.3 อาณาจักร : Plantae

1.1.4 อันดับ : Arecales

1.1.5 วงศ์ : Arecaceae

1.1.6 สกุล : *Salacca*

1.1.7 สปีชีส์ : *S. zeyheri*

1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (6)

1.2.1 ราก

รากสละเป็นระบบรากฝอย (fibrous root) ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-2 เซนติเมตร รากสละจะแตกออกจากบริเวณโคนเหง้าเหนือดินพร้อมกันหลาย ๆ ราก มีขนาดและความยาวเท่าๆ กัน

1.2.2 ลำต้น

ลำต้นสละมีลักษณะเป็นทรงพุ่ม ลำต้นตั้งตรง และถูกหุ้มด้วยกาบใบเป็นข้อ ๆ ภายนอกลำต้นมีหนามแหลมแข็งปกคลุม และลำต้นมีความสูงประมาณ 3-7 เมตร

1.2.3 ใบ

ใบประกอบด้วยใบย่อยที่แตกออกจากก้านใบ คล้ายใบมะพร้าว มีลักษณะอ่อน และถี่ มีความยาวประมาณ 2-3 เมตร ใบมีลักษณะเป็นใบประกอบแบบขนนก มีลักษณะโค้งลงบริเวณกลางใบจนถึงปลายใบ และขอบใบส่วนปลายมีหนามขนาดเล็ก

1.2.4 ช่อดอก

ช่อดอกประกอบด้วยดอกย่อยจำนวนมาก ดอกจะติดกับแกนช่อดอก ช่อดอกจะแทงออกจากกาบใบ หรือระหว่างชั้นของโคนกาบใบ ช่อดอกมีลักษณะยาวลู่ลงสู่ดิน เรียกว่า ทะลายดอก



ภาพที่ 2 : (ก) ราก, (ข) ช่อดอก, (ค) ลำต้น, (ง) ใบ

(ที่มา (ก) : เลิน บ้านสวน.รากสละ.[ออนไลน์].[สืบค้นเมื่อวันที่ 2 กรกฎาคม 2563].เข้าถึงได้จาก

<https://www.bansuanporpeang.com/node/29675>

(ข) : จตุพร พุทธิศา.ช่อดอกสละ.[ออนไลน์].[สืบค้นเมื่อวันที่ 2 กรกฎาคม 2563].เข้าถึงได้จาก:

<https://puechkaset.com/สละ/>

(ค) : กุลวิษ จันทร์ดอน.ลำต้นสละ.[ออนไลน์].[สืบค้นเมื่อวันที่ 2 กรกฎาคม 2563].เข้าถึงได้จาก:

<https://www.palangaset.com/เมืองไม้ผล/ต้นสละ-1/attachment/6-ต้นตัวผู้ของสละ/>

(ง) : เลิน บ้านสวน.รากสละ.[ออนไลน์].[สืบค้นเมื่อวันที่ 2 กรกฎาคม 2563].เข้าถึงได้จาก:

<https://www.baanlaesuan.com/plants/annual/137887.html>

1.3 สละในประเทศไทยมี 4 ชนิด ดังนี้ (6)

1.3.1 สละสายพันธุ์เนินวง

สละเนินวงมีลำต้นมีขนาดเล็กอยู่ใต้ดิน ถูกหุ้มด้วยกาบใบ กาบใบมีสีน้ำตาล ใบมีลักษณะยาว และอ่อน หนามของยอดมีสีขาวยังไม่คล้อยออก ผลรูปทรงยาวจากหัวท้ายคล้ายกระสวย เนื้อผลหนานุ่ม มีสีเหลืองนวล มีรสฝาด และหวานอมเปรี้ยว เปลือกมีลักษณะเป็นเกล็ดเรียงซ้อนกัน ปกคลุมด้วยหนาม และเมล็ดมีขนาดเล็ก ไม่ทนต่อสภาพแวดล้อมแสงแดดจัด



ภาพที่ 3 : เปลือกผลและเมล็ดสละสายพันธุ์เนินวง

1.3.2 สละสายพันธุ์สุมาลี

สละสุมาลีมีลักษณะลำต้นขนาดเล็ก ใบสีเขียวอมเหลือง ใบมีลักษณะใหญ่และปลายใบสั้น หนามของยอดอ่อนที่ยังไม่คลี่มีสีส้มอ่อน ช่อดอกมีขนาดใหญ่และยาว เปลือกมีลักษณะเป็นเกล็ดเรียงซ้อนกัน และปกคลุมด้วยหนาม เนื้อผลมีสีเหลือง รสหวาน ผลมีรูปร่างป้อมสั้น เมล็ดมีขนาดเล็ก และทนต่อสภาพแวดล้อมแสงแดดจัดได้ดี



ภาพที่ 4 : เปลือกผลและเมล็ดสละสายพันธุ์สุมาลี

1.3.3 สละสายพันธุ์หม้อ

สละหม้อมีลำต้นขนาดเล็ก ใบมีลักษณะสั้นและสีใบเข้ม ผลมีรูปร่างยาวและมีจะงอย ช่อดอกมีลักษณะยาว เปลือกมีสีน้ำตาลแดงเข้มลักษณะเป็นเกล็ดเรียงซ้อนกัน และปกคลุมด้วยหนาม เนื้อผลหนานุ่ม มีสีน้ำตาล รสหวาน เมล็ดมีลักษณะกลมขนาดเล็ก และทนต่อสภาพแวดล้อมแสงแดดจัดได้ดี



ภาพที่ 5 : เปลือกผลและเมล็ดสละสายพันธุ์หม้อ

1.3.4 สล่สายพันธุ์อินโดนีเซีย

สล่อินโดนีเซียมีลำต้นขนาดเล็ก ใบมีลักษณะใหญ่และสั้น ช่อดอกมีลักษณะยาว เปลือกมีลักษณะเป็นเกล็ดเรียงซ้อนกัน และปกคลุมด้วยหนาม เนื้อผลเมื่อสุกจะมีสีดำ รสหวานและเปรี้ยว ผลมีขนาดใหญ่กว่าสล่สายพันธุ์อื่น ๆ เมล็ดมีขนาดเล็ก และทนต่อสภาพแวดล้อมแสงแดดจัดได้ดี



ภาพที่ 6 : เปลือกผลและเมล็ดสล่สายพันธุ์อินโดนีเซีย

ตารางที่ 1 : แสดงเปรียบเทียบลักษณะสล่ทั้ง 4 สายพันธุ์

สายพันธุ์ ลักษณะ	สล่เนืงวง	สล่สุมาลี	สล่หม้อ	สล่อินโดนีเซีย
ลำต้น	เล็ก	เล็ก	เล็ก	เล็ก
หนามของยอดอ่อน	หนามสีขาวยังไม่คลี่	หนามสีส้มยังไม่คลี่	หนามยาวเล็กและอ่อน	หนามยาว
ใบ	ทางใบยาว ปลายใบยาว กาบใบสีน้ำตาล	ทางใบยาว ใบใหญ่ กว้าง ปลายใบสั้น กาบใบสีเหลือง	ข้อทางใบสั้น	ทางใบใหญ่และสั้น
ดอก	ช่อดอกยาว	ช่อดอกยาวและใหญ่	ช่อดอกยาว	ช่อดอกยาว
รูปร่างผล	ยาว หัวท้ายเรียว คล้ายกระสวย	ป้อมสั้น	ยาว	ป้อมสั้น
เนื้อ	สีเหลืองนวล หนา และแน่น	สีน้ำตาล เนื้อหนา	สีน้ำตาล เนื้อหนา	สีดำ เนื้อหนา
เมล็ด	เล็ก	เล็ก	เล็ก	เล็ก
รสชาติ	หวานหรือหวานอมเปรี้ยว	หวานมีกลิ่นเฉพาะ	หวานมีกลิ่นเฉพาะ	หวานหรือหวานอมเปรี้ยว
การเจริญเติบโต	ไม่ทนแดด	ทนแดด	ทนแดด	ทนแดด

1.4 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสละ

ในปี 2016 Suica-Bunghez ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และสารพฤกษเคมีจากสละ โดยได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างเนื้อผลกับเปลือกของสละ จากการศึกษา พบว่าฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในเนื้อผลของสละมีค่าเท่ากับ 82.68 เปอร์เซ็นต์ และในเปลือกสละมีค่าเท่ากับ 73.14 เปอร์เซ็นต์ ผลการศึกษาฟลาโวนอยด์ โดยทำทั้งหมด 5 ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อกรัม พบสารฟลาโวนอยด์ในเนื้อสละมีค่าเท่ากับ 129.8 ± 0.003 มิลลิกรัมต่อกรัม และในเปลือกสละมีค่าเท่ากับ 124.9 ± 0.004 มิลลิกรัมต่อกรัม เมื่อเทียบกับแคทีชิน (catechin) ผลการศึกษาแทนนินพบว่าในเนื้อสละมีสารแทนนินมีค่าเท่ากับ 109.1 ± 0.0003 มิลลิกรัมต่อกรัม และในเปลือกสละมีค่าเท่ากับ 63 ± 0.0005 มิลลิกรัมต่อกรัม ผลการศึกษาฟีนอลิก พบว่าในเนื้อสละมีค่าเท่ากับ 1067.796 ± 0.0002 มิลลิกรัมต่อกรัม และในเปลือกสละมีค่าเท่ากับ 946.610 ± 0.042 มิลลิกรัมต่อกรัม จึงสรุปว่าเนื้อสละพบสารต้านอนุมูลอิสระ และสารพฤกษเคมีมากกว่าเปลือกสละ (7)

ในปี 2017 Astrid Tilaar และคณะ ได้ทำการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการทดสอบประสิทธิภาพฤทธิ์ในการทำให้ผิวขาวจากสารสกัดสละ โดยทดสอบด้วยสารสกัดจากเนื้อผลสละด้วยตัวทำละลายเอทานอล 96 เปอร์เซ็นต์ มีการทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ ascorbic acid เป็นสารมาตรฐาน และจากการศึกษาพบว่าสารสกัดจากสละมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ดีเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน โดยสารสกัดสละความเข้มข้นที่ 5, 3 และ 1 เปอร์เซ็นต์ สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ 99.50 เปอร์เซ็นต์ 85.70 เปอร์เซ็นต์ และ 47.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสพบว่าที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสดีที่สุดคือ 18.71 เปอร์เซ็นต์ และจากการเปรียบเทียบในกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ระหว่างครีมเบสกับครีมที่มีสารสกัด พบว่าหลังจากการใช้ไปแล้ว 28 วัน ครีมที่มีสารสกัดสามารถทำให้ผิวขาวขึ้นได้แตกต่างจากครีมเบส ดังนั้นสารสกัดสละจึงเหมาะสมที่จะนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อทำให้ผิวขาวต่อไป (8)

ในปี 2017 Elok Zubaidah และคณะ ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพการรักษาภาวะที่มีน้ำตาลในเลือดสูงและโรคไขมันในเลือดสูงจากส่วนเนื้อผลของสละทั้งหมด 5 สายพันธุ์ได้แก่ Pondoh, Swaru, Gula Pasir, Madu, และ Madura โดยทดสอบในหนูทดลอง ซึ่งพบว่าสละทั้ง 5 สายพันธุ์ มีการลดระดับน้ำตาลและไขมันในเลือดและสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ที่ดีที่สุดคือ Swaru ซึ่งสามารถลดระดับ low density lipoprotein, triglyceride, total cholesterol, blood glucose, และ high density lipoprotein โดยมีค่าเท่ากับ 9.5 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร 58.25 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร 56.25 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร blood glucose 61.69 เปอร์เซ็นต์ และ 60 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ตามลำดับ เมื่อเทียบกับหนูสุขภาพดีซึ่งเป็นตัวแปรควบคุม (9)

2. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

2.1 อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ หมายถึง สารที่มีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยว (unpaired electrons) ในอะตอม หรือโมเลกุล พบได้ทั้งในสิ่งแวดล้อม สิ่งมีชีวิต และเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกระบวนการผลิตพลังงานภายในเซลล์

หรือจากกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) โดยมีการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนออกจากโมเลกุลของออกซิเจน ทำให้อิเล็กตรอนในโมเลกุลออกซิเจนไม่สมดุล กลายเป็นอนุมูลอิสระที่ว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยามาก และสามารถดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่อิเล็กตรอนที่ขาดหายไปเพื่อให้ตัวเองเกิดความสมดุลหรือเสถียร ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ และเกิดขึ้นในเซลล์ตลอดเวลา (10)

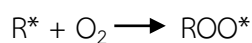
2.1.1 ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระ (11)

การเกิดอนุมูลอิสระมีทั้งหมด 3 ระยะ

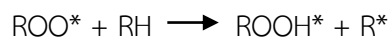
1) Initiation เป็นระยะแรกเริ่มในการเกิดอนุมูลอิสระโดยมีตัวกระตุ้นคือ ความร้อน แสงรังสีที่มีพลังงานสูงและโลหะหนักต่าง ๆ ซึ่งจะเกิดจากการที่อะตอมไฮโดรเจนหลุดออกมาแล้วทำปฏิกิริยากับออกซิเจน ดังสมการ



2) Propagation เป็นระยะเพิ่มจำนวนของสารอนุมูลอิสระ โดยสารอนุมูลอิสระไปจับกับออกซิเจนกลายเป็นอนุมูลเปอร์ออกซี (peroxyl radical) ดังสมการ



3) Termination เป็นระยะสิ้นสุดของกระบวนการเกิดสารอนุมูลอิสระโดยอนุมูลเปอร์ออกซี (peroxyl radical) จะไม่เกิดปฏิกิริยากับสารอนุมูลอิสระแต่จะเข้าไปแย่งจับไฮโดรเจนทำให้โมเลกุลเสถียร ดังสมการ



2.2 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารที่สามารถยับยั้งกระบวนการออกซิไดซ์อนุมูลอิสระ หรือสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยในสิ่งมีชีวิตจะมีระบบการป้องกันการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อจากอนุมูลอิสระ ซึ่งประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระมากมายหลายชนิดที่ทำหน้าที่แตกต่างกันไป มีทั้งที่เป็นเอนไซม์ และไม่เป็นเอนไซม์ สารประกอบที่ละลายในน้ำ และสารประกอบที่ละลายในไขมัน โดยสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มีกลไกการทำงานต้านอนุมูลอิสระด้วยกันหลายแบบ เช่น ดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging), การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (singlet oxygen quenching), จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (metal chelation), หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain-breaking), เสริมฤทธิ์ (synergism) และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme inhibition) ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ เป็นต้น (10)

2.2.1 ประเภทของสารต้านอนุมูลอิสระ (12)

สารต้านอนุมูลอิสระ แบ่งได้เป็น 2 ประเภทตามลักษณะการออกฤทธิ์ คือ สารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิ (primary antioxidant) และสารต้านอนุมูลอิสระทุติยภูมิ (secondary antioxidant)

1) สารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิ (primary antioxidant) เป็นสารที่หยุดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ โดยการให้อนุมูลไฮโดรเจน ($H^{\bullet}$) หรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระโดยตรง เป็นผลให้อนุมูลนั้นกลายเป็นสารที่มีความเสถียรขึ้น สารที่ออกฤทธิ์ในลักษณะดังกล่าว ได้แก่ สารประกอบกลุ่มฟีนอลิก เช่น flavonoid, eugenol และ vanillin เป็นต้น

2) สารต้านอนุมูลอิสระทุติยภูมิ (secondary antioxidant) สารต้านอนุมูลอิสระประเภทนี้ ไม่ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับอนุมูลอิสระ แต่จะช่วยการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิในลักษณะต่างๆ เช่น ดักจับออกซิเจน, จับกับ Fe^{2+} และดูดซับรังสียูวีไว้ เป็นต้น

2.2.2 กลไกการต้านอนุมูลอิสระ (13)

กลไกการต้านอนุมูลอิสระ 4 กลไก ดังนี้

1) Free radical scavenging

สารต้านอนุมูลอิสระจะให้ไฮโดรเจน หรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ และทำให้อนุมูลอิสระมีความเสถียรมากขึ้น เมื่อสารต้านอนุมูลอิสระได้ให้ไฮโดรเจน หรืออิเล็กตรอนไปแล้ว จะเกิดเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่มีความรุนแรงน้อยกว่าอนุมูลอิสระเดิม อาจจะไปรวมตัวกับอนุมูลอิสระอีกโมเลกุลหนึ่งเกิดผลิตภัณฑ์ที่เสถียร หรือมีสารต้านอนุมูลอิสระตัวอื่น ๆ มาให้อิเล็กตรอน หรือไฮโดรเจน เพื่อเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่เสถียรต่อไป สารที่ออกฤทธิ์ผ่านกลไกนี้ เช่น butylated hydroxyl anisole (BHA), vitamin E (alpha-tocopherol)

2) Singlet oxygen quenching

ออกฤทธิ์โดยไปยับยั้งการทำงานของ singlet oxygen โดยการเปลี่ยน singlet oxygen ให้อยู่ในรูป triplet oxygen และปล่อยพลังงานที่ได้รับออกไปในรูปความร้อน สารที่ออกฤทธิ์ผ่านกลไกนี้ เช่น carotenoid เป็นต้น

3) Metal chelating

โลหะหนัก เช่น Fe^{2+} และ Cu^{2+} มีผลเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกาย ซึ่งโลหะหนักดังกล่าวจะไปเร่งการเกิดอนุมูลอิสระหลายประเภท เช่น peroxy radical, hydroxyl radical และ alkyl radical รวมถึง singlet oxygen ดังนั้น การที่มีสารไปจับกับโลหะหนักเหล่านี้จะช่วยชะลอการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกายได้ สารที่ออกฤทธิ์ผ่านกลไกนี้ เช่น flavonoids, phosphoric acid, citric acid และ ascorbic acid เป็นต้น

4) Enzyme inhibitors

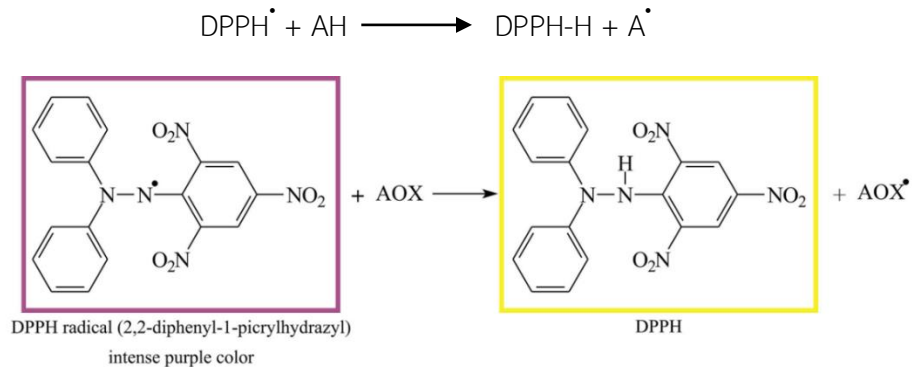
สารประกอบฟีนอลิกบางชนิด เช่น flavonoid, phenolic acid และ gallate สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ lipoxygenase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เร่งการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ โดยจะสามารถเข้าจับกับไอออนของเหล็กที่เป็น cofactor ซึ่งส่งผลให้เอนไซม์ดังกล่าวไม่สามารถทำงานได้

2.2.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีหลายวิธี ยกตัวอย่างเช่น

1) การวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH assay (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay) (14)

เป็นการทดสอบด้วยวิธีทางเคมี โดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระ คือ DPPH radical ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัวและมีสีม่วง สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เมื่อ DPPH radical ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลจะทำให้สีม่วงจางลงจนเป็นสีเหลือง ดังสมการ



ภาพที่ 7 : กลไกการเกิดปฏิกิริยาของ DPPH assay

(ที่มา : Magda M. Becker และคณะ. Chemicals reactions involved in the DPPH spectrophotometric assays.[ออนไลน์].

[สืบค้นเมื่อวันที่ 1 กรกฎาคม 2563]. เข้าถึงได้จาก:

https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532019000501108)

สามารถหาการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้จากการคำนวณสีที่จางลงจากการยับยั้งของ $\text{DPPH}^\bullet$ โดยคำนวณจากการนำค่าดูดกลืนแสงเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น ดังสมการ

$$\text{DPPH radical scavenging (\%)} = [(A_0 - A_s) / A_0] \times 100$$

โดย A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น

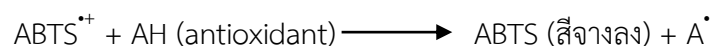
A_s = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่างสารมาตรฐานที่ใช้ในการเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

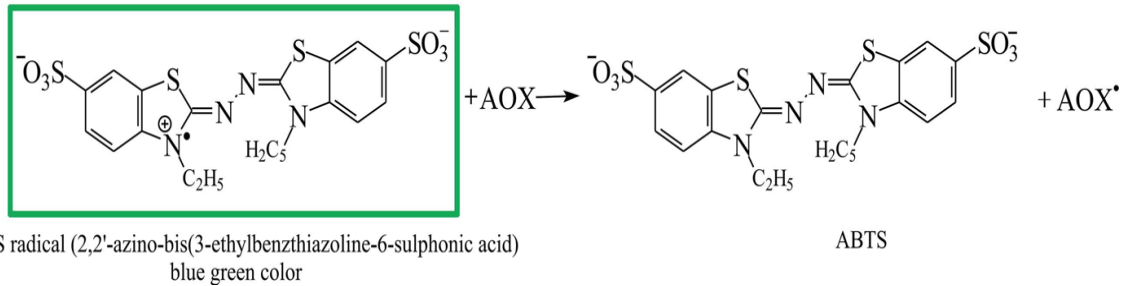
ข้อดีของวิธีนี้ คือ ง่าย สะดวก และรวดเร็ว

ข้อเสียของวิธีนี้ คือ $\text{DPPH}^\bullet$ ค่อนข้างเสถียร ไม่ไวต่อการทำปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลอิสระในร่างกายจริง ทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ช้า

2) การวิเคราะห์ด้วยวิธี ABTS assay (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) assay) (15)

เป็นวิธีการวัดความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส โดยอนุมูลอิสระเอบีทีเอส เป็นสารสังเคราะห์ที่มีสีเขียวปนน้ำเงิน สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เนื่องจากสีของ $\text{ABTS}^{+\bullet}$ ปกติจะมีค่าการดูดกลืนแสงสูง จึงต้องทำการเจือจาง $\text{ABTS}^{+\bullet}$ ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นนำ $\text{ABTS}^{+\bullet}$ ไปทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่าง ซึ่งจะทำให้สีจางลง ดังสมการ





ภาพที่ 8 : กลไกการเกิดปฏิกิริยาของ ABTS assay

(ที่มา : Magda M. Becker และคณะ. Chemicals reactions involved in the DPPH and ABTS spectrophotometric assays.[ออนไลน์].

[สืบค้นเมื่อวันที่ 1 กรกฎาคม 2563]. เข้าถึงได้จาก:

https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532019000501108)

สามารถหาการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้จากการคำนวณสีที่จางลงจากการยับยั้งของ $ABTS^{•+}$ โดยคำนวณจากการนำค่าดูดกลืนแสงเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น ดังสมการ

$$ABTS^{•+} \text{ radical scavenging (\%)} = [(A_0 - A_s) / A_0] \times 100$$

โดย A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น

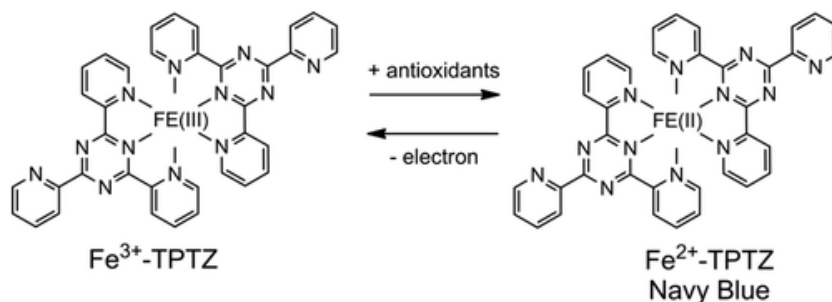
A_s = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่างสารมาตรฐานที่ใช้ในการเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ข้อดีของวิธีนี้ คือ $ABTS^{•+}$ ละลายได้ดีในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ จึงเกิดปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว และปฏิกิริยาได้ในช่วง pH ที่กว้าง

ข้อเสียของวิธีนี้ คือ $ABTS^{•+}$ ไม่พบในร่างกายของสิ่งมีชีวิต และต้องมีการทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อนจึงจะเกิดเป็นอนุมูลอิสระ

3) การวิเคราะห์ด้วยวิธี Ferric reducing-antioxidant power (FRAP) assay (15)

เป็นการอาศัยหลักการของสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถถ่ายเทอิเล็กตรอนให้กับสารประกอบเชิงซ้อนได้ในรูป $[Fe(III) (TPTZ)_2]^3$ ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปเป็น $[Fe(II) (TPTZ)_2]^{2+}$ ซึ่ง $[Fe(II) (TPTZ)_2]^{2+}$ เป็นสารสีน้ำเงินและมีความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ปริมาณของ $[Fe(II) (TPTZ)_2]^{2+}$ ที่เกิดขึ้นสามารถประมาณความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ในรูป FRAP value เทียบกับกราฟมาตรฐานของเฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4$) ดังสมการ



ภาพที่ 9 : กลไกการเกิดปฏิกิริยาของ FRAP assay

(ที่มา : Fan Xiao และคณะ. Guidelines for antioxidant assays for food components.[ออนไลน์].

[สืบค้นเมื่อวันที่ 1 กรกฎาคม 2563]. เข้าถึงได้จาก: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/fft.2.10>)

ข้อดีของวิธีนี้ คือ เป็นวิธีที่ง่าย ใช้เวลาน้อย ไม่แพง และสามารถทำซ้ำแล้วให้ผลเหมือนเดิม

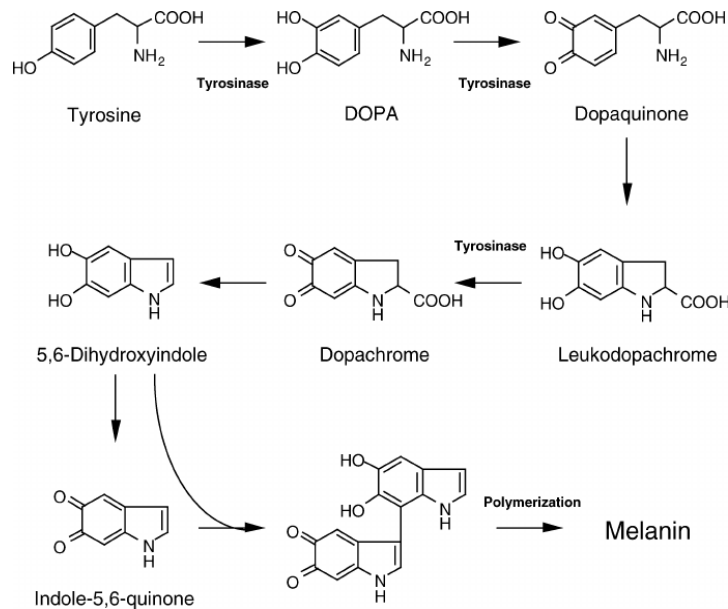
ข้อเสียของวิธีนี้ คือ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นปฏิกิริยาเคมีที่ไม่เกี่ยวข้องกับสภาวะร่างกายและสารละลายที่ใช้อ้างอิงต้องใช้น้ำปราศจากไอออน

2.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase)

ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลาย L-DOPA ให้กลายเป็นเมลานิน ซึ่งเป็นเม็ดสีที่สร้างจากเซลล์ผิวหนังซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดการหมองคล้ำ กลไกการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการสร้างเม็ดสีเมลานินของผิวหนัง โดยทำหน้าที่เร่งการเปลี่ยนกรดอะมิโนชนิดไทโรซีน (tyrosine) ไปเป็นสาร DOPA ด้วยปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน และเปลี่ยนจาก DOPA ไปเป็น dopaquinone ด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน จากนั้น dopaquinone จะถูกเปลี่ยนผ่านสารตัวกลาง จนเกิดโพลีเมอร์เซชันไปเป็นเม็ดสีเมลานินจนได้เม็ดสี 2 ชนิด คือ ชนิดสีดำ หรือสีน้ำตาล เรียกว่า eumelanin และชนิดสีเหลือง หรือสีส้ม เรียกว่า pheomelanin สัดส่วนของยูเมลานินและฟีโอมเมลานิน ในแต่ละคนจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับเชื้อชาติ และพันธุกรรม รวมถึงการได้รับรังสียูวีจากแสงแดด ส่งผลต่อการกระตุ้นการเกิดเม็ดสีเมลานินให้เพิ่มมากขึ้น (16)

ดังนั้นการป้องกันไม่ให้เกิดการสร้างเมลานินได้วิธีหนึ่งก็คือ การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส เอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ที่มีโลหะคอปเปอร์ (Cu) เป็นองค์ประกอบ โดยโลหะ Cu จะใช้ตำแหน่งที่ว่างอยู่อีกหนึ่งตำแหน่งไปจับกับ L-DOPA ซึ่งเป็น substrate ของเอนไซม์ชนิดนี้เพื่อย่อยสลาย และเกิดเป็นเมลานินในที่สุด ดังนั้นหากมีสารที่สามารถจับกับโลหะ Cu ได้ดีกว่า L-DOPA จะทำให้โลหะ Cu ของเอนไซม์ไทโรซิเนสไม่สามารถจับกับ L-DOPA หรือจับได้ไม่ดี จึงทำให้ไม่สามารถเกิดการย่อยสลายได้ และทำให้เกิดการสร้างเมลานินได้ลดลง (17)

สารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เป็นได้ทั้งสารสังเคราะห์ และสารที่พบในธรรมชาติซึ่งอาจเป็นสารในกลุ่มโพลีฟีนอล ฟลาโวนอยด์ โกลโคไซด์ เทอร์ปีน สเตอรอยด์ กรดคาร์บอกซิลิก กรดไขมัน คูมาริน สติลบิน ไบโอฟเอดริน ไอโซคูมาริน รวมถึงสารต้านอนุมูลอิสระที่อยู่ในรูปวิตามินซี และวิตามินอีในทางชีวเคมี ซึ่งสารเหล่านี้มีกลไกการยับยั้งที่อาจเป็นได้ทั้งตัวยับยั้งเอนไซม์แบบผันกลับได้ 2 ชนิดคือ ชนิดแข่งขัน (competitive inhibition) และชนิดไม่แข่งขัน (non-competitive inhibition) ขึ้นกับลักษณะโครงสร้างของสารยับยั้งชนิดนั้น จึงทำให้สารเหล่านี้ถูกนำมาใช้เป็นสารช่วยให้ผิวขาวในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์สุขภาพหลายรูปแบบ (18)



ภาพที่ 10 : A pathway to form melanin by tyrosinase

(ที่มา : TadzhiKistan Kajiwaru และคณะ. Antimicrobial browning-inhibitory effect of flavor compounds in seaweeds.[ออนไลน์].

[สืบค้นเมื่อวันที่ 4 กุมภาพันธ์ 2564].เข้าถึงได้จาก:https://www.researchgate.net/profile/Kenji_Matsui/publication/225918117

Antimicrobial Browning-Inhibitory Effect of Flavor Compounds in Seaweeds

2.4 การสกัดสารตัวอย่าง

การสกัดสารตัวอย่างมีหลายวิธีดังนี้

2.4.1 การเตรียมตัวอย่างพืช

ในการเตรียมตัวอย่างพืชนับเป็นขั้นตอนแรกที่สำคัญ ซึ่งต้องคำนึงถึงสิ่งที่มีผลต่อความแตกต่างของสารสำคัญในพืช การตรวจเอกลักษณ์ที่ถูกต้องของพืช เพื่อให้ได้ตัวอย่างที่ถูกต้อง ไม่มีพืชอื่นปน เพราะจะทำให้ได้สารแปลกปลอม ซึ่งอาจเป็นอันตรายได้ นอกจากนี้ยังทำให้ผลการวิจัยผิดพลาดได้ (19)

2.4.2 การเลือกตัวทำละลาย

ตัวทำละลายที่ดีควรมีสมบัติเป็นตัวทำละลายที่ละลายสารที่ต้องการได้ดีพอ ไม่ระเหยง่าย หรือยากเกินไป ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่เราต้องการ ไม่เป็นพิษ และมีราคาไม่แพง ตัวทำละลายที่นิยมใช้ เช่น คลอโรฟอร์ม อีเทอร์ เฮกเซน และแอลกอฮอล์ เป็นต้น ซึ่งในการเลือกใช้ตัวทำละลายอาศัยหลักการ คือ สารละลายและตัวทำละลายมีคุณสมบัติขั้วคล้ายคลึงกัน จะละลายสารที่ต้องการออกมาได้มากที่สุด (19)

2.4.3 วิธีการสกัดแยกสารสำคัญออกจากพืชโดยทั่วไป

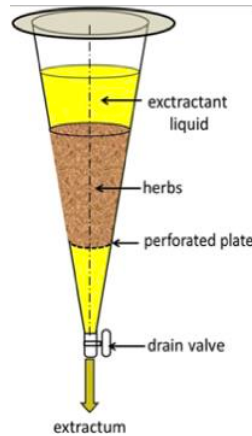
การสกัดแยกสารสำคัญออกจากพืชมีหลายวิธี ตัวอย่างเช่น

1) การหมัก (Maceration)

เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญจากพืช โดยวิธีหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายในภาชนะปิด เช่น ขวดปากกว้าง, ขวดรูปชมพู่ เป็นต้น ทิ้งไว้ 7 วัน หมั่นเขย่าหรือคนบ่อย ๆ เมื่อครบกำหนดเวลาจึงค่อย ๆ รินเอาสารสกัดออก พยายามบีบเอาสารละลายออกจากกากให้มากที่สุด แล้วรวมสารสกัดที่ได้นำไปกรอง โดยการสกัดถ้าจะสกัดให้หมดจด (exhausted) อาจจำเป็นต้องสกัดซ้ำหลาย ๆ ครั้ง วิธีนี้มีข้อดีคือ สารไม่ถูกความร้อน แต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก (19)

2) การไหลซึม (Percolation)

เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญแบบต่อเนื่องโดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า percolator นำผงสมุนไพรมาหมักกับสารละลายพอลิเมอร์ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เพื่อให้ผงตัวเต็มที่แล้วค่อย ๆ บรรจุที่ละน้อยเป็นชั้น ๆ ลงใน percolator เติมตัวทำละลายลงไปในระดับตัวทำละลายสูงเหนือสมุนไพร (solvent head) ประมาณ 30 นาที ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จึงเริ่มไหลเอาน้ำสกัดออก โดยค่อย ๆ เติมตัวทำละลายลงไปเหนือสมุนไพรอย่าให้สมุนไพรแห้ง เก็บสารสกัดจนสารสกัดสมบูรณ์ บีบกากเอาน้ำสกัดออกให้หมด นำสารสกัดที่เก็บได้ทั้งหมดรวมกันแล้วนำไปกรอง (19)

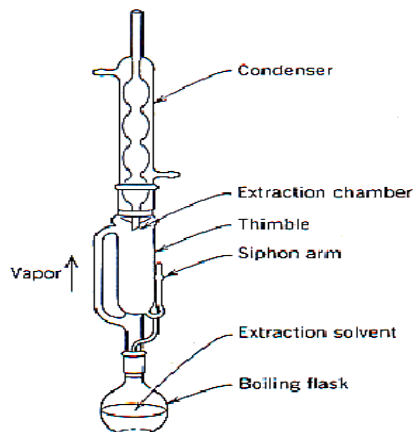


ภาพที่ 11 : การไหลซึม (percolator)

(ที่มา: Dr. Mohammed Sattar. percolator. [ออนไลน์]. [สืบค้นเมื่อวันที่ 1 กรกฎาคม 2563]. เข้าถึงได้จาก: http://pharmacy.uobasrah.edu.iq/images/stage_three/Pharmaceutical_Technology_I/4%20Extraction.pdf)

3) การสกัดแบบต่อเนื่อง (Soxhlet extraction)

เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่องโดยใช้ตัวทำละลายซึ่งมีจุดเดือดต่ำ การสกัดทำได้โดยใช้ความร้อนทำให้ตัวทำละลายใน flask ระเหยไป แล้วกลั่นตัวลงใน thimble ซึ่งบรรจุสมุนไพรไว้ เมื่อตัวทำละลายใน extracting chamber สูงถึงระดับสารสกัดจะไหลกลับลงไปใน flask ด้วยวิธีการกลั่นตัวทำละลาย เมื่อกระทบ condenser จะกลั่นตัวกลับลงมาสกัดใหม่วนเวียนเช่นนี้จนกระทั่งการสกัดสมบูรณ์ (19)



ภาพที่ 12 : soxhlet extraction

(ที่มา: Dr. Mohammed Sattar. soxhlet extraction. [ออนไลน์]. [สืบค้นเมื่อวันที่ 1 กรกฎาคม 2563]. เข้าถึงได้จาก: http://pharmacy.uobasrah.edu.iq/images/stage_three/Pharmaceutical_Technology_I/4%20Extraction.pdf.)

4) Liquid-liquid extraction

การสกัดแยกองค์ประกอบของสารละลายที่อยู่ในสถานะของเหลวด้วยตัวทำละลายที่เป็นของเหลว ซึ่งไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งเป็น 2 ชนิดคือ extractant lighter และ raffinate lighter โดย extractant lighter เป็น liquid-liquid extractor ที่ตัวทำละลายที่ใช้สกัด เบากว่าตัวทำละลายที่ละลายสาร และ raffinate lighter เป็น liquid-liquid extractor ที่ตัวทำละลายที่ใช้สกัด หนักกว่าตัวทำละลายที่ใช้ละลายสาร (20)

2.4.4 การสกัดสีเขียว (Green extraction)

การสกัดสีเขียว (green extraction) คือ กระบวนการสกัดที่ลดการใช้พลังงาน ใช้ตัวทำละลายทางเลือกที่นำกลับมาใช้ใหม่ได้ ปลอดภัย และได้สารสกัดหรือผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพสูง

จุดประสงค์หลักในการทำการสกัดสีเขียว คือ เป็นการสกัดที่ให้สารสกัดที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด โดยลดเวลาและขั้นตอนการสกัด มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อย ลดการเกิดขยะ และมีความคุ้มค่ามากที่สุด การเลือกใช้ตัวทำละลายในการสกัดสีเขียวหรือตัวทำละลายสีเขียว ควรเลือกตัวทำละลายที่ได้จากธรรมชาติ สามารถสลายตัวได้เอง หรือเป็นตัวทำละลายหมุนเวียน หลีกเลี่ยงการใช้ตัวทำละลายที่เป็นพิษต่อสุขภาพ สิ่งแวดล้อม และต้องไม่เป็นสารที่ก่อให้เกิดอาการแพ้ (21)

หลักการของการสกัดสีเขียวมี 6 ข้อ ดังนี้ (22)

1. การเลือกใช้วัตถุดิบที่หลากหลาย และสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้
2. การเลือกใช้ตัวทำละลายทางเลือกอื่น ๆ แทนการใช้ตัวทำละลายที่เป็นพิษ
3. การลดการใช้พลังงานในกระบวนการสกัด โดยการนำพลังงานกลับมาใช้
4. การผลิตผลิตภัณฑ์จากของเสียที่เกิดขึ้นในกระบวนการสกัด
5. การลดขั้นตอนในกระบวนการสกัด เพิ่มประสิทธิภาพและความปลอดภัยในการสกัด
6. มุ่งเน้นสารสกัดที่ย่อยสลายได้และปราศจากการเจือปน

วิธีการสกัดที่นิยมใช้ในการสกัดสีเขียว ได้แก่ Ultrasonic sonication เป็นการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง เป็นวิธีที่ใช้คลื่นเสียงความถี่สูงหรืออัลตราโซนิก ร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์หรือน้ำในการสกัด โดยเครื่องจะปล่อยคลื่นเสียงความถี่สูงออกมาในตัวพา ซึ่งในที่นี้คือน้ำ กระบวนการดังกล่าวจะทำให้เกิดฟองก๊าซ ซึ่งเกิดการหดตัวและขยายตัวเป็นวัฏภาค เมื่อฟองก๊าซขยายตัวจะดึงสารที่อยู่ภายในฟองออกมาละลายในตัวทำละลาย โดยทั่วไปวิธีนี้จะใช้สกัดสารกลุ่มเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ วิธีนี้ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพทำให้สกัดสารได้ปริมาณมาก (23)

การสกัดอัลตราโซนิกมีข้อดีหลายอย่าง เช่น ผลตอบแทนสูง สะดวก อัตราการสกัดรวดเร็ว และใช้พลังงานต่ำ การสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงสามารถนำมาใช้กับระบบตัวทำละลายต่าง ๆ เพื่อให้ผลลัพธ์ที่เหนือกว่าสำหรับสารสกัดจากเป้าหมาย (24)

อีกวิธีการสกัดที่ได้รับความนิยมคือ Supercritical fluid extraction เมื่ออยู่ในจุดที่อุณหภูมิและความดันเหมาะสม สารจะควบแน่น (condense) และอยู่ในลักษณะเป็นของเหลว เรียกสภาวะนี้ว่า critical state เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ มี critical state ที่ 1 องศาเซลเซียส และ 72.9 atm ต่อ 7.39 MPa ซึ่งในทางปฏิบัติ ถ้าสารอยู่เหนือ critical temperature สารจะอยู่ในสภาวะที่มีคุณสมบัติระหว่างของเหลว และก๊าซ จึงทำให้สามารถกระจายตัวได้ดี และละลายสารได้ดี เช่น ก๊าซ ซึ่งก๊าซที่ใช้ในการสกัดสาร

จากพืชที่นิยม คือ คาร์บอนไดออกไซด์ เมื่อสกัดสารเรียบร้อยแล้ว การเปลี่ยนสถานะอุณหภูมิ และแรงดันจะทำให้คาร์บอนไดออกไซด์ เปลี่ยนเป็นก๊าซ ข้อดี คือ ทำให้ลดมลภาวะจากตัวทำละลายอินทรีย์ และลดอันตรายที่เกิดจากตัวทำละลายอินทรีย์ต่อสุขภาพ เช่น คลอโรฟอร์ม และมีข้อจำกัด คือ เหมาะสำหรับสารไม่มีขั้ว การจะเพิ่มความเข้มข้น ทำได้โดยเติมเมทานอลลงไปผสมด้วย (20)

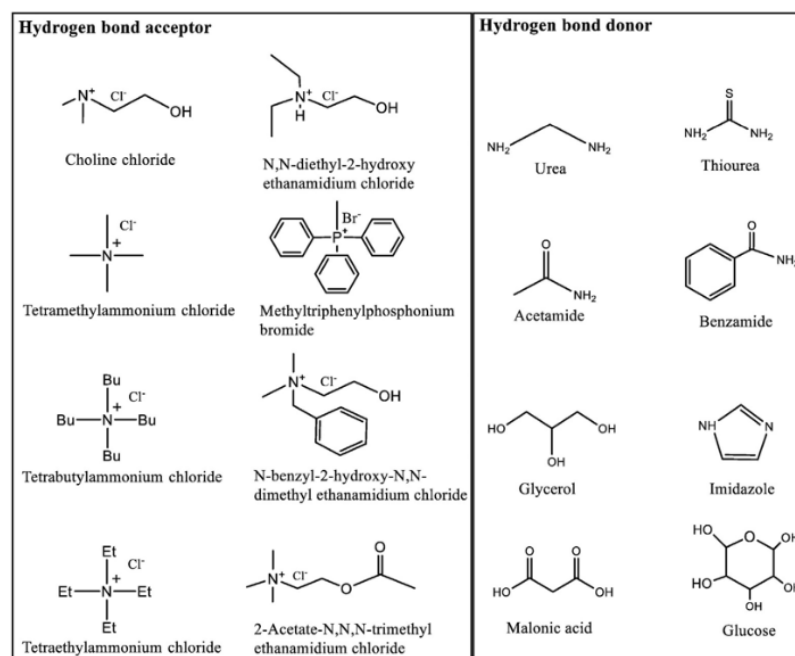
ปัจจุบันการสกัดสีเขียวได้นำมาประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรมมากมาย เช่น ใช้ในการสกัดน้ำหอม ใช้ในการทำอาหาร หรือว่าใช้เป็นเชื้อเพลิง โดยตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดแบบ green extraction ต้องมีความสามารถในการทำละลายสูง ความเป็นพิษต่ำ มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อย สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ และราคาสมเหตุสมผล (25)

2.4.4.1 Deep eutectic solvents : DES

ยูเทกติก (eutectic) เป็นระบบตัวทำละลายประกอบด้วยสารสองชนิดหรือมากกว่า ที่มีจุดหลอมเหลวของระบบต่ำกว่าสารบริสุทธิ์ที่เป็นองค์ประกอบ มีสถานะเป็นของเหลวที่อุณหภูมิต่ำ ซึ่งระบบยูเทกติกมีคุณสมบัติเป็นตัวทำละลายมีชื่อเรียกว่า deep eutectic solvent (DES) คุณสมบัติโดยทั่วไปของ deep eutectic solvent (DES) จะเป็นสารที่มีความหนืด อัตราการระเหยต่ำ ไม่ก่อให้เกิดการอักเสบ และทนต่ออุณหภูมิ ดังนั้น DES จึงเป็นตัวทำละลายสีเขียวที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและมีพิษต่อสิ่งมีชีวิต (26)

Deep eutectic solvent (DES) จัดเป็น ionic solvent ที่ประกอบด้วยสารในกลุ่ม quaternary ammonium salts เช่น choline chloride ($C_5H_{14}NOCl$) กับสารอินทรีย์ที่มีหมู่ให้อิโตรเจน (hydrogen donor) เช่น amine, amide, alcohol และ carboxylic acid โดยสามารถใช้ระบบดังกล่าวเพื่อเพิ่มการละลายของสารจำพวก กลีโอกซิน, aromatic acid และ amino acid ได้ ข้อดีของระบบ DES คือ สามารถเตรียมได้ง่าย ราคาถูก ไม่ติดไฟ บางชนิดมีคุณสมบัติย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ และมีความเป็นพิษต่ำและมีข้อเสียคือเป็นสารที่มีความหนืดและนำไฟฟ้าต่ำ (26)

จากงานวิจัยของ Bárbara Socas-Rodríguez และคณะ กล่าวว่า DES เป็นการผสมกันอย่างน้อย 2 ตัว ของ hydrogen bond donor (HBD) และ a hydrogen bond acceptor (HBA) โดยต้องมีตัวใดตัวหนึ่งเป็นของแข็ง HBDs ที่ใช้ส่วนใหญ่จะเป็นสารพวก amides, thiourea, urea, amines, imidazole, azole, alcohols, carboxylic acids, น้ำ, และ phenol และ HBAs ที่ใช้ส่วนใหญ่จะเป็น quaternary ammonium salts, quaternary phosphonium salts, imidazolium-based salts, dication-based salts, inner salts, และ molecular imidazole (27)



ภาพที่ 13 แสดงโครงสร้างตัวทำละลาย DES

(ที่มา: Bárbara Socas-Rodríguez. Common HBAs and HBDs used in the preparation of DES. [ออนไลน์]. [สืบค้นเมื่อวันที่ 1 กุมภาพันธ์ 2564]. เข้าถึงได้จาก:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128173862000056>

ตารางที่ 2 ตัวอย่างสารประกอบที่สกัดด้วยระบบตัวทำละลาย deep eutectic solvent (DES) (26)

สารประกอบ	คู่ตัวทำละลาย	วิธีสกัด
Flavonoid, flavonoid glycosides	Choline chloride-lactic acid Choline chloride-ethylene glycol	Ultrasound
Phenolic compounds	Choline chloride-malic acid Choline chloride-glucose	Ultrasound
Phenolic acids	Choline chloride-lactic acid	Ultrasound

ตัวอย่างงานวิจัยที่มีตัวทำละลาย DES ได้แก่ งานวิจัยของ Farid Chemat และคณะ ได้รายงานประสิทธิภาพของ p-toluenesulfonic acid-based DES ในการสกัดสารสำคัญจากโกจิเบอร์รี่ โดยผสมระหว่าง choline chloride และ p-toluenesulfonic acid ในอัตราส่วนโมล 1:2 ว่าเป็นระบบตัวทำละลายที่ดีที่สุดในการสกัดสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิก การสกัดภายใต้ ultrasound-assisted extraction โดย conditions ในการผสมกันระหว่าง choline chloride กับ urea (ChCl:U) ในอัตราส่วนโมล 1:2 สามารถสกัดสารประกอบ Phenolic acids, flavonoids และ volatile compounds จาก safflower ได้ และมีข้อจำกัดคือ สารมีความหนืดสูง ปัจจุบัน DES จึงได้รับความนิยมอย่างมาก เนื่องจากเป็นสารที่มาจากธรรมชาติ มีความเสถียร และมีความสามารถในการทำละลายสูง (21)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. พืชที่ใช้ในการศึกษา

เปลือกผลและเมล็ดสละ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สละสายพันธุ์เนืวนาง สละสายพันธุ์สุมาลี สละสายพันธุ์หม้อ จากบ้านสวนหอมทรัพย์ ตำบลพลับพลา อำเภอมะนัง จังหวัดจันทบุรี และสละสายพันธุ์อินโดนีเซีย จากสวนสละชูยู ตำบลปิตุภูมิ อำเภอยะรัง จังหวัดปัตตานี

2. เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

2.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์

1. ถาดอะลูมิเนียม
2. เครื่องอบลมร้อน (hot air oven) ยี่ห้อ Memmert
3. เครื่องบด (hammer mill)
4. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร
5. ปีกเกอร์ ขนาด 100, 250 มิลลิลิตร
6. เครื่องชั่งตวงวัด 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ shimadzu
7. เครื่องชั่งตวงวัด 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ shimadzu
8. ซ้อนตักสาร
9. กระบอกตวง ขนาด 10, 50, 1000 มิลลิลิตร
10. กรวยแก้ว
11. เครื่องเขย่าสารโดยคลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonic sonicator) ยี่ห้อ Elma
12. ฟอยล์
13. เครื่องระเหยสารสกัดแบบสูญญากาศ (evaporators) ยี่ห้อ Greatwall
14. ขวดวงกลม (round bottle)
15. ขวดแก้วสำหรับใส่สารสกัดขนาด 500 มิลลิลิตร
16. เครื่องวัดค่า pH (pH meter) ยี่ห้อ Labsp
17. จานหลุม (96 wellplate)
18. หลอดพลาสติกขนาด 15, 20 มิลลิลิตร
19. หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
20. ไมโครปิเปต micropipette ขนาด 20, 100, 1000 ไมโครลิตร
21. ทิปพลาสติกขนาด 10, 20, 1000 ไมโครลิตร
22. เครื่องบ่มเชื้อ (incubator) ยี่ห้อ memmert
23. เครื่อง microplate reader ยี่ห้อ clariostar plus

2.2 สารเคมี

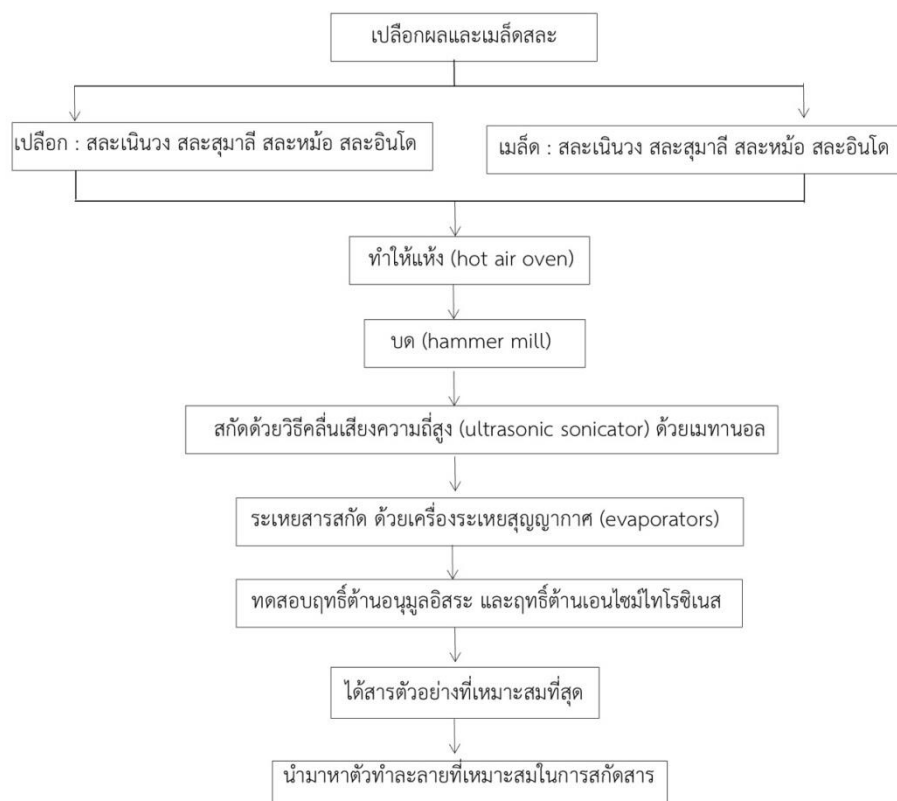
1. Sodium hydrogen-phosphate (NaH_2PO_4) : Analytical reagent grade บริษัท sigma aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

2. Disodium hydrogen-phosphate (Na_2HPO_4) : Analytical reagent grade บริษัท EMD millipore ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. 3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA) : ACS reagent grade บริษัท Acros ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. Kojic acid : -ACS reagent grade บริษัท sigma aldrich ประเทศอังกฤษ
5. Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) : AR grade บริษัท RCI labscan ประเทศไทย
6. Methanol (CH_3OH) : AR grade บริษัท RCI labscan ประเทศไทย
7. Quercetin : ACR grade บริษัท sigma aldrich ประเทศอินเดีย
8. Tyrosinase enzymerease : Analytical reagent บริษัท sigma aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา
9. ABTS Chromophore Diammonium Salt (ABTS) : ACS grade บริษัท calbiochem ประเทศเยอรมันนี
10. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) : ACS grade บริษัท sigma aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา
11. L-Ascorbic acid (vitamin C) : Analytical reagent grade บริษัท Fisher chemical ประเทศสหรัฐอเมริกา
12. Sodium Acetate (trihydrate) : AR/ACS grade บริษัท LOBA chemical ประเทศอินเดีย
13. 2,4,6-tri (2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) : ACS grade บริษัท ACROS organic ประเทศสหรัฐอเมริกา
14. Iron (III) Chloride hexahydrate (FeCl_3) : ACS grade บริษัท sigma aldrich ประเทศเยอรมันนี
15. Iron (II) Sulphate 7-Hydrate (FeSO_4) : Analytical reagent grade บริษัท Kemaus ประเทศสหรัฐอเมริกา
16. Folin-ciocalteu's Phenol reagent : ACS grade บริษัท sigma aldrich ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
17. Sodium hydrogen carbonate (NaHCO_3) : ACS reagent grade บริษัท VWR international bvbaประเทศเบลเยียม
18. Gallic acid : ACS grade บริษัท ACROS organics ประเทศสหรัฐอเมริกา
19. Urea Analytical : ACS grade บริษัท Carlo erba ประเทศฝรั่งเศส
20. Chlorine Chloride : ACS grade บริษัท Acros organic ประเทศจีน
21. Propanoic acid (2-propanol) : ACS grade บริษัท sigma aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา
22. 4,5-Dicaffeoyquinic acid : Analytical reagent grade บริษัท biopurify ประเทศจีน
23. 4-O-Dicaffeoyquinic acid : Analytical reagent grade บริษัท biopurify ประเทศจีน
24. 5-O-Dicaffeoyquinic acid : Analytical reagent grade บริษัท biopurify ประเทศจีน

3. วิธีวิจัย

การเตรียมตัวอย่างพืชจากเปลือกผลและเมล็ดสละทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยทำการปอกเปลือกและเมล็ดสละ แล้วนำเปลือกและเมล็ดสละไปตากแดดเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ ส่วนของเปลือกสละจะนำมาอบให้แห้งด้วยเครื่องอบลมร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบดด้วยเครื่องบด (hammer mill) ส่วนของเมล็ดสละจะถูกนำไปแช่น้ำทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อให้เมล็ดนิ่ม และนำเมล็ดมาตำให้มีขนาดเล็กลงด้วยครกหิน ต่อมานำเมล็ดมาอบให้แห้งด้วยเครื่องอบลมร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปบดด้วยเครื่องบด (hammer mill)

วิธีการสกัดสารสำคัญจากเปลือกผลและเมล็ดสละ นำผงของเปลือกและเมล็ดสละทั้ง 4 สายพันธุ์มาสกัดด้วยวิธีคลื่นเสียงความถี่สูง (sonicator) โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย โดยชั่งผงตัวอย่าง 10 กรัม ผสมกับตัวทำละลายเมทานอล 200 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปสกัดด้วยเครื่อง ultrasonic sonicator ด้วยความถี่ 40 กิโลเฮิร์ตซ์ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมารองด้วยกระดาษกรองจนได้สารละลายใส แล้วนำสารละลายใสไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบสูญญากาศ (evaporator) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และส่วนที่เป็นตะกอนนำไปสกัดซ้ำด้วยตัวทำละลายเดิมอีกครั้ง จากนั้นนำสารสกัดทั้งหมดที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส จากนั้นนำสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ดีที่สุด มาสกัดตัวทำละลายต่าง ๆ เพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสม แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส



ภาพที่ 14 : แผนผังขั้นตอนงานวิจัย

3.1 การเตรียมตัวอย่าง

3.1.1 ปลอกเปลือกและเมล็ดสละทั้ง 4 สายพันธุ์

3.1.2 นำเปลือกและเมล็ดสละทั้ง 4 สายพันธุ์ไปตากแดด 6 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 1 สัปดาห์

3.1.3 ส่วนของเปลือกสละทั้ง 4 สายพันธุ์นำไปให้ความร้อนด้วยเครื่อง hot air oven ที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วนำไปบดด้วยเครื่องบด (hammer mill)

3.1.4 ส่วนของเมล็ดสละนำไปแช่น้ำทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นนำมาทำให้มีขนาดเล็กลงด้วยครกหิน แล้วนำไปอบให้ความร้อนด้วยเครื่อง hot air oven ที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง และนำไปบดด้วยเครื่องบด (hammer mill)

3.2 การสกัดสารด้วยตัวทำละลายเมทานอล โดยใช้วิธีคลื่นเสียงความถี่สูงด้วยเครื่อง ultrasonic sonicator

3.2.1 นำผงของเปลือกและเมล็ดสละทั้ง 4 สายพันธุ์ 10 กรัม มาเติมตัวทำละลายเมทานอล 200 มิลลิลิตร

3.2.2 นำส่วนที่ผสมตัวทำละลายแล้วมาสกัดด้วยเครื่อง ultrasonic sonicator ด้วยความถี่ 40 กิโลเฮิร์ตซ์ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3.2.3 นำมารองด้วยกระดาษกรอง เก็บส่วนสารละลายใส

3.2.4 นำกากที่ได้มาเติมตัวทำละลายเมทานอลอีกครั้ง แล้วนำไปสกัดด้วยเครื่อง ultrasonic sonicator ต่ออีก 30 นาที

3.2.5 นำมารองด้วยกระดาษกรอง เก็บสารละลายใสที่ได้รวมกับสารละลายใสในข้อ 3.2.3

3.2.6 นำสารละลายใสของเปลือกและเมล็ดสละแต่ละสายพันธุ์มาระเหยด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (evaporators) จนสารสกัดแห้ง

3.2.7 นำสารสกัดแห้งไปชั่งน้ำหนัก และบันทึกน้ำหนักที่ได้

3.3 เลือกนำสละสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ดีที่สุดมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล โดยใช้วิธีคลื่นเสียงความถี่สูงด้วยเครื่อง ultrasonic sonicator

3.3.1 นำผงของเปลือกสละพันธุ์หม้อและเมล็ดสละพันธุ์เนิน 10 กรัม มาเติมตัวทำละลายเอทานอล 200 มิลลิลิตร

3.3.2 นำส่วนที่ผสมตัวทำละลายแล้วมาสกัดด้วยเครื่อง ultrasonic sonicator ด้วยความถี่ 40 กิโลเฮิร์ตซ์ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3.3.3 นำมารองด้วยกระดาษกรอง เก็บส่วนสารละลายใส

3.3.4 นำกากที่ได้มาเติมตัวทำละลายเอทานอลอีกครั้ง แล้วนำไปสกัดด้วยเครื่อง ultrasonic sonicator ต่ออีก 30 นาที

3.3.5 นำมารองด้วยกระดาษกรอง เก็บสารละลายใสที่ได้รวมกับสารละลายใสในข้อ 3.3.3

3.3.6 นำสารละลายใสของเปลือกและเมล็ดสละแต่ละสายพันธุ์มาระเหยด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (evaporators) จนสารสกัดแห้ง

3.3.7 นำสารสกัดแห้งไปชั่งน้ำหนัก และบันทึกน้ำหนักที่ได้

3.4 นำสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ดีที่สุดไปสกัดตัวทำละลาย Deep eutectic solvent (DES) และเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.4.1 การเตรียมตัวทำละลาย DES

3.4.1.1 Choline chloride (ChCl)-urea (DES1)

นำ Choline chloride (ChCl) 1 โมล ผสมกับ urea 2 โมล ในขวดแก้ว จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดย hot plate และใช้ magnetic bar ช่วยคนสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน

3.4.1.2 Choline chloride (ChCl)-EG (DES2)

นำ Choline chloride (ChCl) 1 โมล ผสมกับ ethylene glycol (EG) 2 โมล ในขวดแก้ว จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดย hot plate และใช้ magnetic bar ช่วยคนสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน

3.4.1.3 Choline chloride (ChCl)-PA (DES3)

นำ Choline chloride (ChCl) 1 โมล ผสมกับ propanoic acid (PA) 2 โมล ในขวดแก้ว จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดย hot plate และใช้ magnetic bar ช่วยคนสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน

3.4.2 การสกัดด้วยตัวทำละลาย DES

3.4.2.1 ชั่งผงของเปลือกสละพันธุ์หม้อและผลของเมล็ดสละพันธุ์เนืวมะอย่างละ 0.2 กรัม ผสมกับตัวทำละลาย DES ในข้อที่ 3.5.1.1 – 3.5.1.3 โดยดูดสารละลาย DES มา 3600 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำ 400 ไมโครลิตร แล้วนำมาสกัดด้วยเครื่อง ultrasonic sonicator ด้วยความถี่ 40 กิโลเฮิร์ตซ์ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3.4.2.2 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm เป็นเวลา 10 นาที

3.4.2.3 ดูนําส่วนของ supernatant ไปใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

3.5 นำสารสกัดมาทำ Thin Layer Chromatography : TLC

3.5.1 ละลาย crude extract ของสารสกัดสละทั้ง 4 สายพันธุ์ด้วยตัวทำละลายเมทานอล

3.5.2 ใช้ capillary spot ลงบนแผ่น silica gel GF254

3.5.3 นำไปจุ่มในตัวทำละลาย ethyl acetate : water : formic acid อัตราส่วน 17:2:1 และ ethyl acetate:acetic acid:formic acid:water อัตราส่วน 100:11:11:26 ซึ่งทำหน้าที่เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ และใช้ 4,5-Dicaffeoylquinic acid, 4-O-caffeoylquinic acid และ 5-O-caffeoylquinic acid เป็นสารมาตรฐาน

4.การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

4.1 การตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (28)

4.1.1 การเตรียมสาร

- การเตรียมสาร Folin-Ciocalteu reagent working solution โดยการเจือจาง Folin-Ciocalteu reagent 1 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่เย็นปราศจากแสงรบกวน
- การเตรียม 7.5% (กรัมต่อมิลลิลิตร) sodium hydrocarbonate (NaHCO_3) โดยการชั่ง NaHCO_3 จำนวน 7.5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
- การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก ทำโดยการชั่งกรดแกลลิก 2 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร
- การเตรียมสารละลายตัวอย่างโดยเจือจางให้มีความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.1.2 วิธีการทดสอบ

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ทำได้โดยปิเปตสารตัวอย่างเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent 50 ไมโครลิตร และสารละลาย 7.5% (กรัมต่อมิลลิลิตร) sodium hydrocarbonate (NaHCO_3) 80 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาทีในที่มืด จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร คำนวณค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

4.2.1 DPPH assay (2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl free radical) (28)

- เตรียมสารละลาย DPPH โดยการชั่ง DPPH จำนวน 3 มิลลิกรัม มาละลายด้วยเมทานอล ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในที่เย็นปราศจากแสง
- เตรียมสารละลาย ascorbic acid ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่ง ascorbic acid 1 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายมา 50 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 950 ไมโครลิตร จะได้สารละลาย ascorbic acid เข้มข้นเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- เตรียมตัวควบคุมผลบวก คือ สารละลาย ascorbic acid 100 ไมโครลิตร + สารละลาย DPPH 100 ไมโครลิตร
- เตรียมตัวควบคุมผลลบ คือ เมทานอล 100 ไมโครลิตร + สารละลาย DPPH 100 ไมโครลิตร
- นำสารละลาย DPPH radical (3 มิลลิกรัมต่อ 30 มิลลิลิตรในเมทานอล) ทำให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.7 ± 0.2 และเจือจางสารละลายสละที่ใช้ทดสอบ เติมสารละลาย DPPH ลงไป 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาทีในที่มืด แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณ %inhibition และค่า IC_{50} จาก

$$\% \text{inhibition} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

เมื่อ A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH
 A_1 = ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

4.2.2 ABTS assay (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6- sulfonic acid) assay) (28)

- เตรียมสารละลาย ABTS stock solution โดยการชั่ง ABTS salt มา 7.68 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร และชั่ง potassium persulfate ($K_2O_8S_2$) มา 1.32 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร แบ่งสารละลายทั้งสองมาอย่างละ 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายทั้ง 2 มาผสมกันในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในที่มืดนานประมาณ 18 ชั่วโมง

- เตรียมสารละลาย ABTS working solution โดยการนำ ABTS stock solution มาเจือจางด้วยเมทานอลในอัตราส่วน 1:50 ของเมทานอล คือ ABTS stock solution 1 มิลลิลิตร และเมทานอล 50 มิลลิลิตร เก็บสารละลายนี้ไว้ในที่เย็นปราศจากแสง

- เตรียมตัวควบคุมผลบวก คือ สารละลาย ascorbic acid 100 ไมโครลิตร + สารละลาย ABTS 100 ไมโครลิตร

- เตรียมตัวควบคุมผลลบ คือ เมทานอล 100 ไมโครลิตร + สารละลาย ABTS 100 ไมโครลิตร

- เตรียมสารละลายด้วยการทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย ABTS เข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์ และสารละลาย 4.9 มิลลิโมลาร์ $K_2S_2O_8$ ด้วยน้ำกลั่นในปริมาตรเท่า ๆ กัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 16-20 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้ หลังจากนั้นเจือจางสารละลาย stock ABTS ด้วยเมทานอล (1:50 เมทานอล) ให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.7-0.9 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร แล้วปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ใช้ทดสอบมา 100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย ABTS 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 6 นาทีในที่มืด แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง คำนวณ %inhibition และหาค่า IC_{50} จาก

$$\%inhibition = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$$

เมื่อ A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงของ ABTS
 A_1 = ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

4.2.3 FRAP assay (28)

- เตรียมสารละลาย 300 มิลลิโมลาร์ acetate buffer pH 3.6 ละลายด้วย glacial acetic acid 80 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH ให้เป็น 3.6 ด้วย 1N HCl หรือ 1N NaOH แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

- เตรียมสารละลาย 40 มิลลิโมลาร์ HCl จากสารละลาย 12N HCl โดยการปิเปต 12N HCl ปริมาตร 167 ไมโครลิตร นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น 49,833 ไมโครลิตร

- เตรียมสารละลาย 10 มิลลิโมลาร์ TPTZ ใน 40 มิลลิโมลาร์ HCl ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มประมาณ 30 นาที จากนั้นนำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

- เตรียมสารละลาย 20 มิลลิโมลาร์ FeCl_3 โดยชั่ง FeCl_3 5.41 กรัม นำมาละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

- เตรียม FRAP working solution โดยการผสมสารละลายในอัตราส่วน 10:1:1 ดังนี้

300 มิลลิโมลาร์ acetate buffer pH 3.6	10	มิลลิลิตร
10 มิลลิโมลาร์ TPTZ in 40 มิลลิโมลาร์ HCl	1	มิลลิลิตร
20 มิลลิโมลาร์ FeCl_3	1	มิลลิลิตร

- เตรียมตัวควบคุมผลบวก คือ สารละลาย ascorbic acid 50 ไมโครลิตร และ สารละลาย FRAP 150 ไมโครลิตร

- เตรียมตัวควบคุมผลลบ คือ เมทานอล 50 ไมโครลิตร และสารละลาย FRAP 150 ไมโครลิตร

- เตรียมสารตัวอย่างเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 3000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับ FRAP reagent 150 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 8 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร คำนวณความสามารถในการให้ e^- (FRAP value) โดยเปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานของเฟอรัสซัลเฟต แสดงค่าในรูปมิลลิกรัมสมมูลเฟอรัสซัลเฟตต่อสารสกัด 1 กรัม

4.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) (29)

4.3.1 วิธีการทดสอบ

เตรียมสารละลายตัวอย่างเจือจางให้มีความเข้มข้นในช่วงตั้งแต่ 500 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ขึ้นไป นำมาเจือจางให้ได้ 8 ความเข้มข้น ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วนำมาผสมกับ 20 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.8 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนสเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วทำการเติมซับสเตรท 0.85 มิลลิโมลาร์ L-DOPA ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มทิ้งไว้ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกรดโคจิกที่ใช้เป็นตัวควบคุมผลบวก คำนวณ %inhibition และค่า IC_{50} จาก

$$\%inhibition = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

เมื่อ A_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ negative control

A_1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองแสดงข้อมูลในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดสอบอย่างละ 3 ซ้ำของการทดลองโดยใช้ one way ANOVA สำหรับวิเคราะห์ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบโดยใช้โปรแกรม Minitab version 16

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การสกัดสารสำคัญจากเปลือกผลและเมล็ดสละทั้ง 4 สายพันธุ์

การสกัดสารสำคัญจากเปลือกผลและเมล็ดสละทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สละสายพันธุ์เนินวง สละสายพันธุ์สุมาลี สละสายพันธุ์หม้อ และสละสายพันธุ์อินโดนีเซีย โดยชั่งสารตัวอย่าง 10 กรัม สกัดด้วยวิธีคลื่นเสียงความถี่สูงด้วยตัวทำละลายเมทานอล และระเหยสารสกัดด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ และนำมาคำนวณหาปริมาณสารสกัดมีค่าปริมาณร้อยละของสารสกัดดังนี้ เปลือกสละสายพันธุ์เนินวงเท่ากับ 15.4 ± 2.39 เปอร์เซ็นต์ เปลือกสละสายพันธุ์สุมาลีเท่ากับ 14.7 ± 6.05 เปอร์เซ็นต์ เปลือกสละสายพันธุ์หม้อเท่ากับ 27.6 ± 3.08 เปอร์เซ็นต์ เปลือกสละสายพันธุ์อินโดนีเซียเท่ากับ 10.83 ± 5.29 เปอร์เซ็นต์ เมล็ดสละสายพันธุ์เนินวงเท่ากับ 7.90 ± 0.36 เปอร์เซ็นต์ เมล็ดสละสายพันธุ์สุมาลีเท่ากับ 6.63 ± 1.16 เปอร์เซ็นต์ เมล็ดสละสายพันธุ์หม้อเท่ากับ 4.83 ± 0.47 เปอร์เซ็นต์ เมล็ดสละสายพันธุ์อินโดนีเซียเท่ากับ 6.50 ± 0.36 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 3 : ปริมาณสารสกัดเปลือกผลและเมล็ดสละทั้ง 4 สายพันธุ์

สารตัวอย่าง	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ปริมาณร้อยละของสารที่สกัดได้ (เปอร์เซ็นต์)
เปลือกสละสายพันธุ์เนินวง	1.54 ± 0.24	15.37 ± 2.39
เปลือกสละสายพันธุ์สุมาลี	1.47 ± 0.61	14.73 ± 6.05
เปลือกสละสายพันธุ์หม้อ	2.76 ± 0.31	27.60 ± 3.08
เปลือกสละสายพันธุ์อินโดนีเซีย	1.08 ± 0.53	10.83 ± 5.29
เมล็ดสละสายพันธุ์เนินวง	0.79 ± 0.04	7.90 ± 0.36
เมล็ดสละสายพันธุ์สุมาลี	0.66 ± 0.12	6.63 ± 1.16
เมล็ดสละสายพันธุ์หม้อ	0.48 ± 0.05	4.83 ± 0.47
เมล็ดสละสายพันธุ์อินโดนีเซีย	0.65 ± 0.04	6.50 ± 0.36

หมายเหตุ: ข้อมูลที่แสดงผลค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

4.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ด้วยตัวทำละลายเมทานอล

4.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

จากผลการทดสอบโดยนำเอาสารสกัดเปลือกผลและเมล็ดสละทั้ง 4 สายพันธุ์ มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกพบว่า สารสกัดจากเปลือกผลสละสายพันธุ์หม้อมีปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกมากที่สุดเท่ากับ 158.59 ± 6.77 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัด 1 กรัม แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ เมื่อทำการเปรียบเทียบกับสารสกัดจากเปลือกผลและเมล็ดสละทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบ โดยเปลือกผลสละสายพันธุ์เนินวง เปลือกผลสละสายพันธุ์สุมาลี เปลือกผลสละ

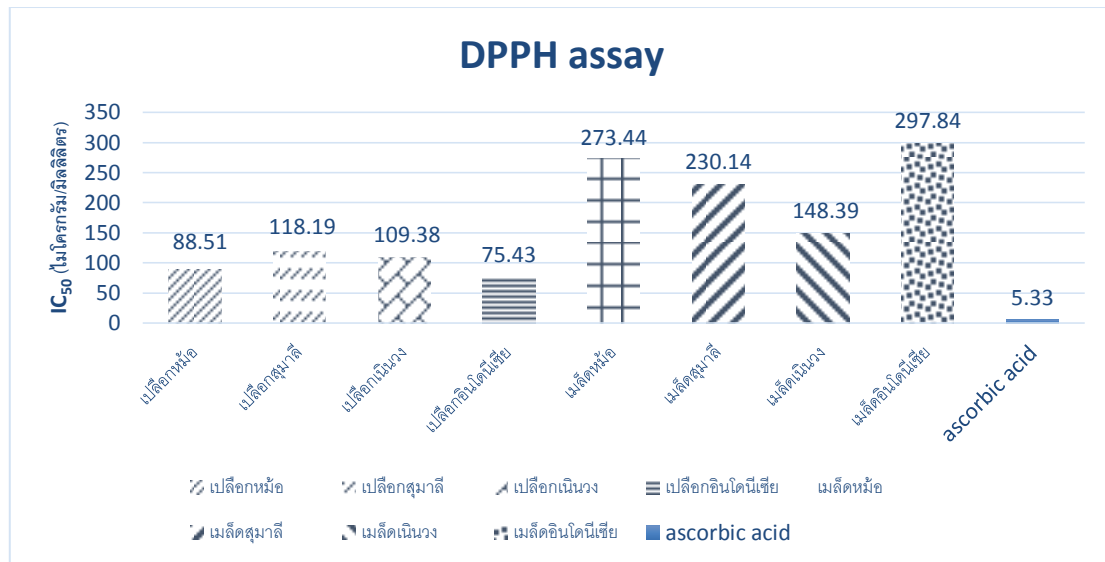
สายพันธุ์อินโดนีเซีย และเมล็ดสายสะพันธุ์เนินวง เมล็ดสละสายพันธุ์สุมาลี เมล็ดสละสายพันธุ์หม้อ เมล็ดสละสายพันธุ์อินโดนีเซีย มีปริมาณฟีนอลิกเท่ากับ 13.45 ± 0.59 , 32.39 ± 0.88 , 27.28 ± 0.18 , 13.63 ± 0.28 , 9.18 ± 0.07 , 15.97 ± 0.52 , 9.25 ± 0.21 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัด 1 กรัม ตามลำดับ

4.2.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ของสารสกัดจากเปลือกผลและเมล็ดสละทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่าสารสกัดเปลือกผลสละสายพันธุ์อินโดนีเซียมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 75.43 ± 2.72 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากสละสายพันธุ์อื่น ๆ ที่ใช้ทดสอบ โดยสารสกัดจากเปลือกผลสละสายพันธุ์หม้อและเปลือกผลสละสายพันธุ์เนินวงมีฤทธิ์ไม่แตกต่างกัน มีค่า IC_{50} เท่ากับ 88.51 ± 2.82 , 109.38 ± 4.83 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสกัดจากเปลือกสละสายพันธุ์สุมาลี, เมล็ดสละสายพันธุ์เนินวง, เมล็ดสละสายพันธุ์สุมาลี, เมล็ดสละสายพันธุ์หม้อ, เมล็ดสละสายพันธุ์อินโดนีเซีย มีค่า IC_{50} เท่ากับ 118.19 ± 4.23 , 148.39 ± 2.67 , 230.14 ± 1.63 , 273.44 ± 5.29 , 297.84 ± 3.85 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารมาตรฐาน ascorbic acid มีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.33 ± 0.10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4 : ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

ชนิดตัวอย่าง	DPPH assay IC_{50} (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
เปลือกสละสายพันธุ์หม้อ	88.51 ± 2.82 ^f
เปลือกสละสายพันธุ์สุมาลี	118.19 ± 4.23 ^e
เปลือกสละสายพันธุ์เนินวง	109.38 ± 4.83 ^f
เปลือกสละสายพันธุ์อินโดนีเซีย	75.43 ± 2.72 ^g
เมล็ดสละสายพันธุ์หม้อ	273.44 ± 5.29 ^b
เมล็ดสละสายพันธุ์สุมาลี	230.14 ± 1.63 ^c
เมล็ดสละสายพันธุ์เนินวง	148.39 ± 2.67 ^d
เมล็ดสละสายพันธุ์อินโดนีเซีย	297.84 ± 3.85 ^a
Ascorbic acid (Positive)	5.33 ± 0.10 ^h



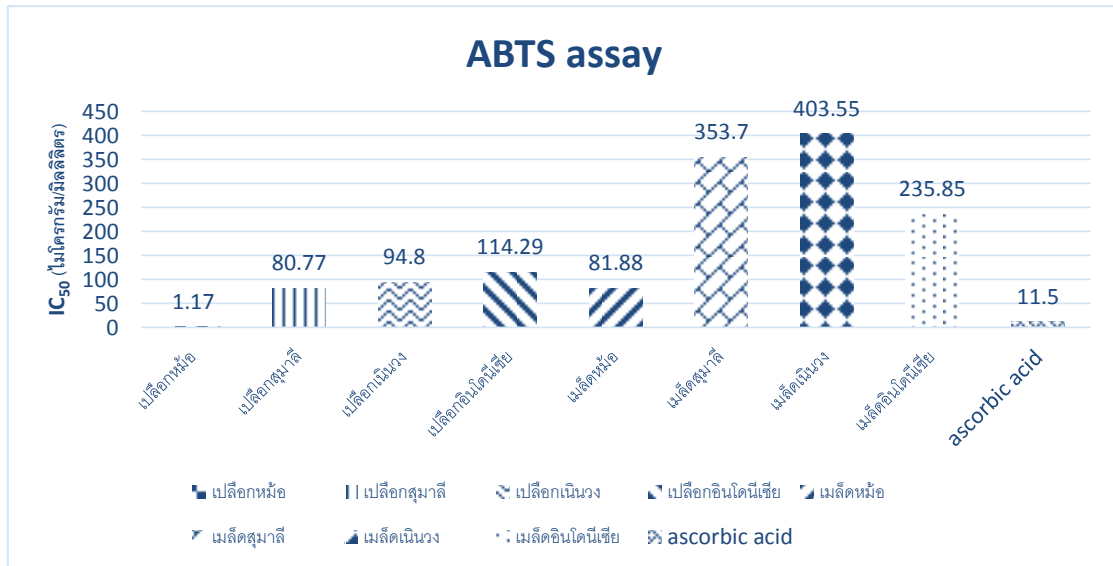
แผนภูมิที่ 1 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

4.2.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay

จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay ของสารสกัดจากเปลือกผล และเมล็ดสละทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่าสารสกัดจากเปลือกสละสายพันธุ์ห่อมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระดีที่สุด โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 1.17 ± 0.17 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากสละทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยสารสกัดจากเปลือกผลสละสายพันธุ์เนืง เปลือกผลสละสายพันธุ์สุมาลี เปลือกผลสละสายพันธุ์อินโดนีเซีย เมล็ดสละสายพันธุ์เนืง เมล็ดสละสายพันธุ์สุมาลี, เมล็ดสละสายพันธุ์ห่อ และเมล็ดสละสายพันธุ์อินโดนีเซีย โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 94.80 ± 2.34 , 80.77 ± 6.17 , 114.29 ± 1.87 , 403.55 ± 14.76 , 353.70 ± 6.05 , 81.88 ± 1.82 , 235.85 ± 5.57 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารมาตรฐาน ascorbic acid มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 11.50 ± 0.45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 5 : ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay

ชนิดตัวอย่าง	ABTS assay IC ₅₀ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
เปลือกสละสายพันธุ์ห่อ	1.17 ± 0.17^f
เปลือกสละสายพันธุ์สุมาลี	80.77 ± 6.17^e
เปลือกสละสายพันธุ์เนืง	94.80 ± 2.34^e
เปลือกสละสายพันธุ์อินโดนีเซีย	114.29 ± 1.87^d
เมล็ดสละสายพันธุ์ห่อ	81.88 ± 1.82^e
เมล็ดสละสายพันธุ์สุมาลี	353.70 ± 6.05^b
เมล็ดสละสายพันธุ์เนืง	403.55 ± 14.76^a
เมล็ดสละสายพันธุ์อินโดนีเซีย	235.85 ± 5.57^c
Ascorbic acid (Positive)	11.50 ± 0.45^g



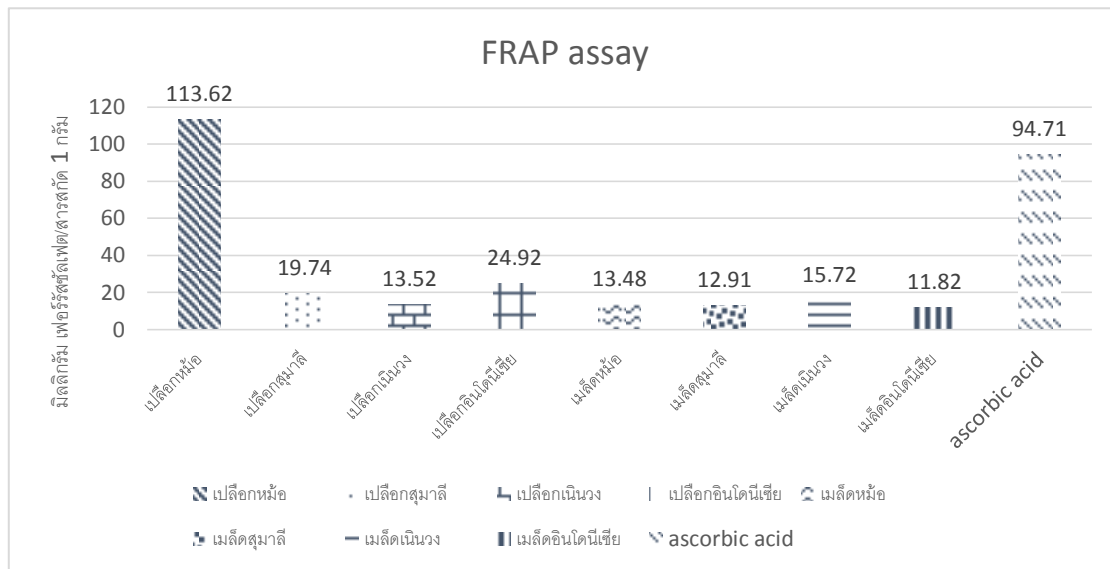
แผนภูมิที่ 2 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay

4.2.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay

จากผลการทดสอบโดยนำเอาสารสกัดเปลือกผลและเมล็ดสะทั้ง 4 สายพันธุ์ มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay พบว่า สารสกัดจากเปลือกผลสะสายพันธุ์ห่มื้อมีปริมาณสารยับยั้งอนุมูลอิสระดีที่สุดเท่ากับ 113.62 ± 3.25 มิลลิกรัมสมมูลของเฟอรอสซัลเฟตต่อสารสกัด 1 กรัม แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ เมื่อทำการเปรียบเทียบกับสารสกัดจากเปลือกผลและเมล็ดสะสายพันธุ์อื่น ๆ ที่ใช้ทดสอบ โดยเปลือกผลสะสายพันธุ์เนืง เปลือกผลสะสายพันธุ์สุมาลีเปลือกผลสะสายพันธุ์อินโดนีเซีย เมล็ดสะสายพันธุ์เนืง เมล็ดสะสายพันธุ์สุมาลี เมล็ดสะสายพันธุ์ห่มื้อ และเมล็ดสะสายพันธุ์อินโดนีเซีย มีปริมาณสารยับยั้งอนุมูลอิสระเท่ากับ 13.52 ± 0.83 , 19.74 ± 0.46 , 24.92 ± 3.59 , 15.72 ± 0.10 , 12.91 ± 0.26 , 13.48 ± 0.79 , 11.82 ± 0.38 มิลลิกรัมสมมูลของเฟอรอสซัลเฟตต่อสารสกัด 1 กรัม ตามลำดับ

ตารางที่ 6 : ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay

ชนิดตัวอย่าง	FRAP assay (มิลลิกรัมสมมูลของเฟอรอสซัลเฟตต่อสารสกัด 1 กรัม)
เปลือกสะสายพันธุ์ห่มื้อ	113.62 ± 3.25^a
เปลือกสะสายพันธุ์สุมาลี	19.74 ± 0.46^c
เปลือกสะสายพันธุ์เนืง	13.52 ± 0.83^d
เปลือกสะสายพันธุ์อินโดนีเซีย	24.92 ± 3.59^b
เมล็ดสะสายพันธุ์ห่มื้อ	13.48 ± 0.79^d
เมล็ดสะสายพันธุ์สุมาลี	12.91 ± 0.26^d
เมล็ดสะสายพันธุ์เนืง	15.72 ± 0.10^d
เมล็ดสะสายพันธุ์อินโดนีเซีย	11.82 ± 0.38^d
Ascorbic acid (Positive)	94.71 ± 2.62



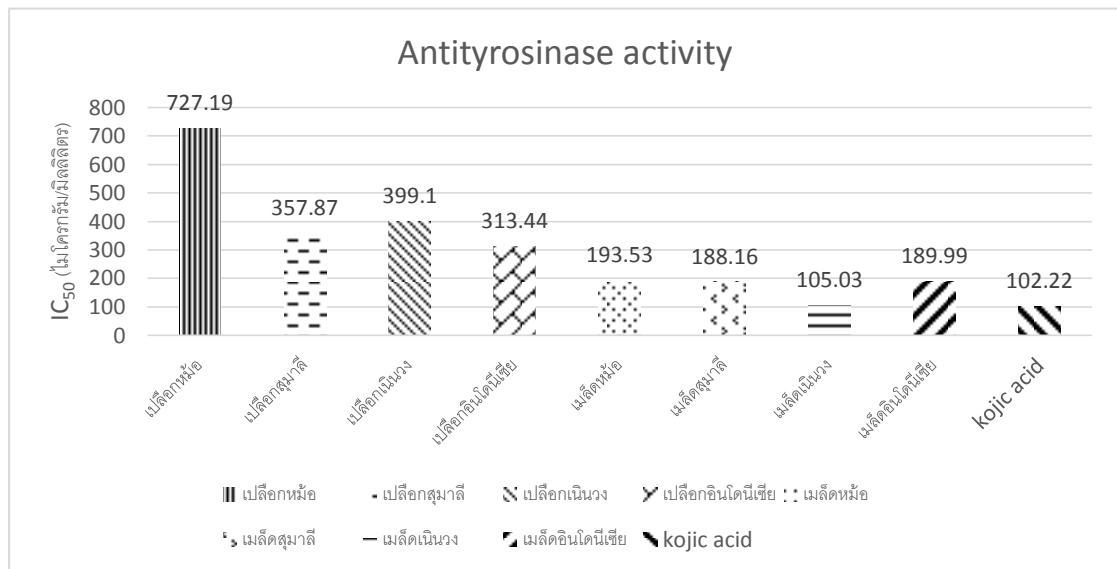
แผนภูมิที่ 3 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay

4.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากเปลือกผลและเมล็ดสละทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่าสารสกัดจากเมล็ดสละสายพันธุ์เนนงมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 105.03 ± 6.72 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากเปลือกผลและเมล็ดสละสายพันธุ์อื่น ๆ โดยสารสกัดจากเปลือกผลสละสายพันธุ์เนนง, เปลือกผลสละสายพันธุ์สุมาลี, เปลือกผลสละสายพันธุ์ห่มื่อ, เปลือกผลสละสายพันธุ์อินโดนีเซีย เมล็ดสละสายพันธุ์สุมาลี เมล็ดสละสายพันธุ์ห่มื่อ เมล็ดสละสายพันธุ์เนนง และเมล็ดสละสายพันธุ์อินโดนีเซีย โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 399.10 ± 20.15 , 357.87 ± 36.89 , 727.19 ± 20.65 , 313.44 ± 15.52 , 188.16 ± 9.86 , 193.53 ± 4.96 , 189.99 ± 12.28 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารมาตรฐานกรดโคจิก มีค่า IC_{50} เท่ากับ 102.22 ± 5.46 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 7 : ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

ชนิดตัวอย่าง	ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส IC_{50} (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
เปลือกสละสายพันธุ์ห่มื่อ	727.19 ± 20.65^a
เปลือกสละสายพันธุ์สุมาลี	357.87 ± 36.89^b
เปลือกสละสายพันธุ์เนนง	399.10 ± 20.15^b
เปลือกสละสายพันธุ์อินโดนีเซีย	313.44 ± 15.52^c
เมล็ดสละสายพันธุ์ห่มื่อ	193.53 ± 4.96^d
เมล็ดสละสายพันธุ์สุมาลี	188.16 ± 9.86^d
เมล็ดสละสายพันธุ์เนนง	105.03 ± 6.72^e
เมล็ดสละสายพันธุ์อินโดนีเซีย	189.99 ± 12.28^d
Kojic acid (Positive)	102.22 ± 5.46^e



แผนภูมิที่ 4 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

ตารางที่ 8 : แสดงผลการทดสอบปริมาณสารฟีนอลิก ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

ชนิดตัวอย่างสายพันธุ์สละ	DPPH assay IC ₅₀ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ABTS assay IC ₅₀ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	FRAP assay (มิลลิกรัมเฟอรัสซัลเฟตต่อสารสกัด 1 กรัม)	Antityrosinase IC ₅₀ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ฟีนอลิก (มิลลิกรัมเทียบเท่ากรดแกลลิกต่อสารสกัด 1 กรัม)
เปลือกสละส้ม	88.51±2.82 ^f	1.17±0.17 ^f	113.62±3.25 ^a	727.19±20.65 ^a	158.59±6.77 ^a
เปลือกสละสุก	118.19±4.23 ^e	80.77±6.17 ^e	19.74±0.46 ^c	357.87±36.89 ^b	32.39±0.88 ^b
เปลือกสละเนืง	109.38±4.83 ^f	94.80±2.34 ^e	13.52±0.83 ^d	399.10±20.15 ^b	13.45±0.59 ^c
เปลือกสละอินโดนีเซีย	75.43±2.72 ^g	114.29±1.87 ^d	24.92±3.59 ^b	313.44±15.52 ^c	27.28±0.18 ^b
เมล็ดสละส้ม	273.44±5.29 ^b	81.88±1.82 ^e	13.48±0.79 ^d	193.53±4.96 ^d	15.97±0.52 ^c
เมล็ดสละสุก	230.14±1.63 ^c	353.70±6.05 ^b	12.91±0.26 ^d	188.16±9.86 ^d	9.18±0.07 ^c
เมล็ดสละเนืง	148.39±2.67 ^d	403.55±14.76 ^a	15.72±0.10 ^d	105.03±6.72 ^e	13.63±0.28 ^c
เมล็ดสละอินโดนีเซีย	297.84±3.85 ^a	235.85±5.57 ^c	11.82±0.38 ^d	189.99±12.28 ^d	9.25±0.21 ^c
Ascorbic acid (Positive)	5.33±0.10 ^h	11.50±0.45 ^g	94.71±2.62 ^e	-	-
Kojic acid (Positive)	-	-	-	102.22±5.46 ^e	-

หมายเหตุ : ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

ค่าที่อยู่ในตาราง ตามตัวอักษร (a-g) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

จากผลการทดสอบของสารสกัดเปลือกผลและเมล็ดสละสายพันธุ์ทั้ง 4 สายพันธุ์จะเห็นว่า สารสกัดเปลือกผลสายพันธุ์หม้อมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระดีที่สุดในการทดสอบ 2 วิธีจากทั้งหมด 3 วิธีการทดสอบและมีปริมาณสารฟีนอลิกมากที่สุดในการทดสอบ และสารสกัดเมล็ดสละสายพันธุ์เนินงมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสดีที่สุดในที่สุด จึงนำสารสกัดทั้ง 2 ชนิด มาทำการสกัดด้วยวิธี DES และสกัดด้วยคลื่นเสียง (sonicated) ด้วยเอทานอล เพื่อหาวิธีการสกัดและตัวทำละลายที่เหมาะสม

4.4 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกสละสายพันธุ์หม้อที่สกัดด้วยตัวทำละลาย DES และตัวทำละลายเอทานอล

ตารางที่ 9 : แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจากเปลือกสละสายพันธุ์หม้อ

สารตัวอย่าง	ฟีนอลิกจาก มิลลิกรัมสมมูล ของกรดแกลลิกต่อ สารสกัด 1 กรัม	DPPH assay IC ₅₀ (ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร)	ABTS assay IC ₅₀ (ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร)	FRAP assay มิลลิกรัมสมมูลของ เฟอร์รัสซัลเฟตต่อสาร สกัด 1 กรัม
เปลือกสละสายพันธุ์ หม้อ สกัดด้วยตัวทำ ละลาย ethanol	316.69±24.54 ^a	15.45±1.85 ^c	6.12±0.28 ^c	70.07±2.95 ^d
เปลือกสละสายพันธุ์ หม้อ สกัดด้วยตัวทำ ละลาย DES 1	193.49±14.84 ^b	11.98±0.53 ^c	5.66±0.27 ^c	387.52±9.15 ^a
เปลือกสละสายพันธุ์ หม้อ สกัดด้วยตัวทำ ละลาย DES 2	104.31±5.75 ^c	33.20±0.73 ^b	14.91±0.08 ^a	77.21±7.57 ^d
เปลือกสละสายพันธุ์ หม้อ สกัดด้วยตัวทำ ละลาย DES 3	97.27±11.98 ^c	29.98±2.68 ^b	12.04±0.05 ^b	337.82±9.62 ^b
Ascorbic acid (Positive control)	-	6.53±0.43	3.21±0.04	-

หมายเหตุ : ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

ค่าที่อยู่ในตาราง ตามตัวอักษร (a-g) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

DES1 : Choline chloride- urea

DES2 : Choline chloride- ethylene glycol (EG)

DES3 : Choline chloride- propanoic acid (PA)

จากผลการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกสละสายพันธุ์หม้อที่สกัดด้วยตัวทำละลาย DES และตัวทำละลายเอทานอล พบว่า สารสกัดจากเปลือกสละสายพันธุ์หม้อที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดด้วยตัวทำละลายอื่น ๆ โดยมีค่าเท่ากับ 316.69 ± 24.54 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัด 1 กรัม และการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay จากสารสกัดของเปลือกสละสายพันธุ์หม้อที่สกัดด้วยวิธีการสกัดสีเขียวด้วยตัวทำละลาย DES 1 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดด้วยตัวทำละลายอื่น ๆ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 11.98 ± 0.53 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay จากสารสกัดของเปลือกสละสายพันธุ์หม้อที่สกัดด้วยตัวทำละลาย DES ด้วยตัวทำละลาย DES 1 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดด้วยตัวทำละลายอื่น ๆ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.66 ± 0.27 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay จากสารสกัดของเปลือกสละสายพันธุ์หม้อที่สกัดด้วยวิธีการสกัดสีเขียวด้วยตัวทำละลาย DES 1 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดด้วยตัวทำละลายอื่น ๆ โดยมีค่า 387.52 ± 9.15 มิลลิกรัมสมมูลของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อสารสกัด 1 กรัม ดังตารางที่ 9

4.5 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากเมล็ดสละสายพันธุ์เนินวงที่สกัดด้วยตัวทำละลาย DES และตัวทำละลายเอทานอล

ตาราง 10 : แสดงค่า IC_{50} ของสารสกัดจากเมล็ดสละสายพันธุ์เนินวงต่อฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

สารตัวอย่าง	IC_{50} (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
เมล็ดสละสายพันธุ์เนินวงสกัดด้วยตัวทำละลาย DES 1	418.62 ± 16.43^a
เมล็ดสละสายพันธุ์เนินวงสกัดด้วยตัวทำละลาย DES 2	390.71 ± 5.82^b
เมล็ดสละสายพันธุ์เนินวงสกัดด้วยตัวทำละลาย DES 3	57.38 ± 0.22^d
เมล็ดสละสายพันธุ์เนินวงสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล	IN
Kojic acid (Positive)	103.24 ± 0.51

หมายเหตุ : ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

IN คือ Inactivity

ค่าที่อยู่ในตาราง ตามตัวอักษร (a-g) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

DES1 : Choline chloride-urea

DES2 : Choline chloride-ethylene glycol (EG)

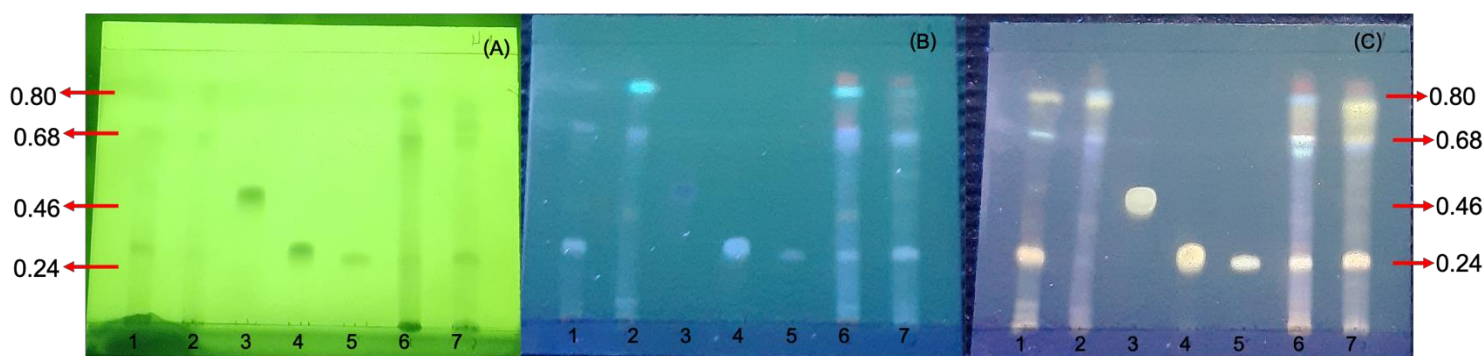
DES3 : Choline chloride-propanoic acid (PA)

จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากเมล็ดสละสายพันธุ์เนินวงที่สกัดด้วยตัวทำละลาย DES และตัวทำละลายเอทานอล พบว่า สารสกัดจากเมล็ดสละสายพันธุ์เนินวงที่สกัดด้วยตัวทำละลาย DES 3 (ChCl-Propanoic acid) มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสดีที่สุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดด้วยตัวทำละลายอื่น ๆ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 57.38 ± 0.22 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดจากเมล็ดสละสายพันธุ์เนินวงที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสน้อยที่สุด ดังตารางที่ 10

4.6 การตรวจสอบด้วยรังคเลขผิบบาง (Thin layer chromatography)

การศึกษาคุณสมบัติทางพิษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดเปลือกผลและเมล็ดของสละ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์เนินวง สายพันธุ์สุมาลี สายพันธุ์หม้อ และ สายพันธุ์อินโดนีเซีย เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน 4,5-Dicaffeoylquinic acid, 4-O-caffeoylquinic acid และ 5-O-caffeoylquinic acid โดยมีระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เป็น ethyl acetate : water : formic acid อัตราส่วน 17:2:1 (ระบบที่ 1) และ ethyl acetate : acetic acid : formic acid : water อัตราส่วน 100:11:11:26 (ระบบที่ 2)

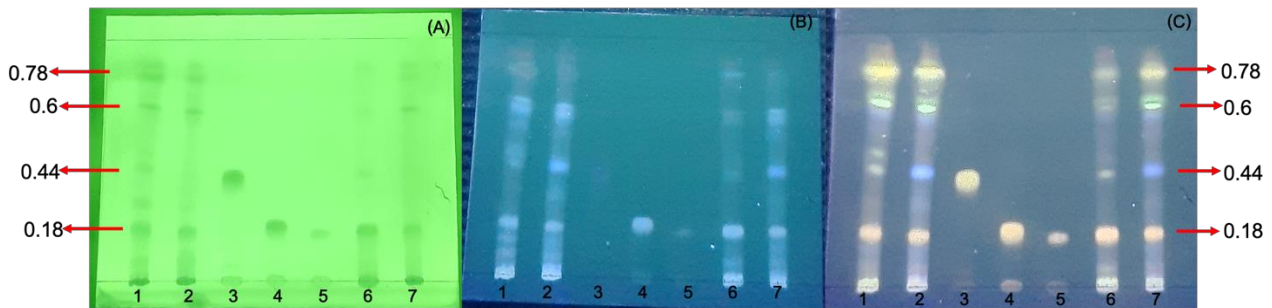
4.6.1 โครมาโตแกรม TLC ของสารสกัดจากเปลือกสละสายพันธุ์ต่าง ๆ โดยมีวัฏภาคเคลื่อนที่ในระบบที่ 1 คือ ethyl acetate : น้ำ : formic acid อัตราส่วน 17:2:1



ภาพที่ 15 โครมาโตแกรมของสารสกัดเปลือกสละสายพันธุ์ต่าง ๆ ในระบบที่ 1 เมื่อนำมาส่องภายใต้แสงยูวี 254 nm (A) ส่อง 366 (B) และ พ่นด้วย 1% NP (C)

- | | |
|-------------------------------|---------------------------------|
| 1 = สารสกัดเปลือกสละหม้อ | 5 = 5-O-Caffeoylquinic acid |
| 2 = สารสกัดเปลือกสละเนินวง | 6 = สารสกัดเปลือกสละสุมาลี |
| 3 = 4,5-Dicaffeoylquinic acid | 7 = สารสกัดเปลือกสละอินโดนีเซีย |
| 4 = 4-O-Caffeoylquinic acid | |

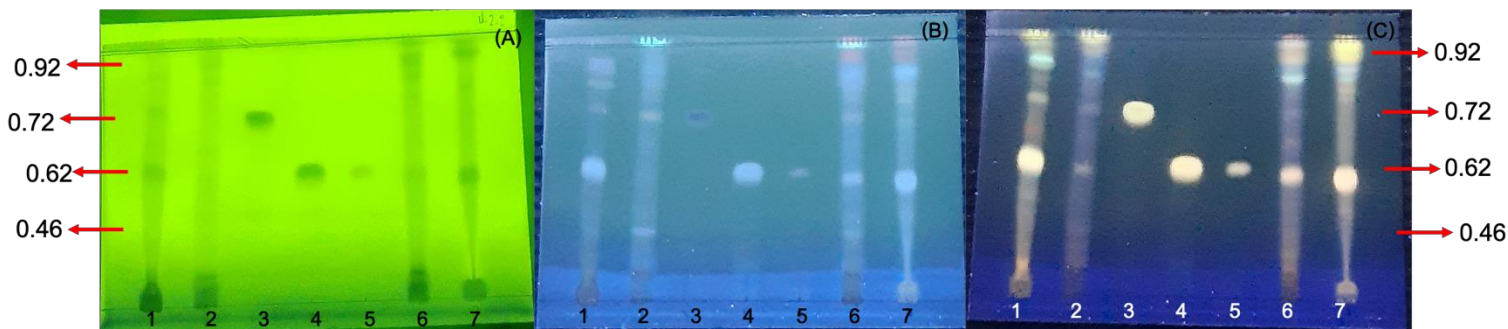
4.6.2 โครมาโตแกรม TLC ของสารสกัดจากเมล็ดสละสายพันธุ์ต่าง ๆ โดยมีวัฏภาคเคลื่อนที่ในระบบที่ 1 คือ ethyl acetate : น้ำ : formic acid อัตราส่วน 17:2:1



ภาพที่ 16 โครมาโตแกรมของสารสกัดเมล็ดสละสายพันธุ์ต่าง ๆ ในระบบที่ 1 เมื่อนำมาส่องภายใต้แสงยูวี 254 nm (A) ส่อง 366 (B) และ ฟ่นด้วย 1% NP (C)

- | | |
|-------------------------------|--------------------------------|
| 1 = สารสกัดเมล็ดสละหม้อ | 5 = 5-O-Caffeoylquinic acid |
| 2 = สารสกัดเมล็ดสละเนินวง | 6 = สารสกัดเมล็ดสละสุมาลี |
| 3 = 4,5-Dicaffeoylquinic acid | 7 = สารสกัดเมล็ดสละอินโดนีเซีย |
| 4 = 4-O-Caffeoylquinic acid | |

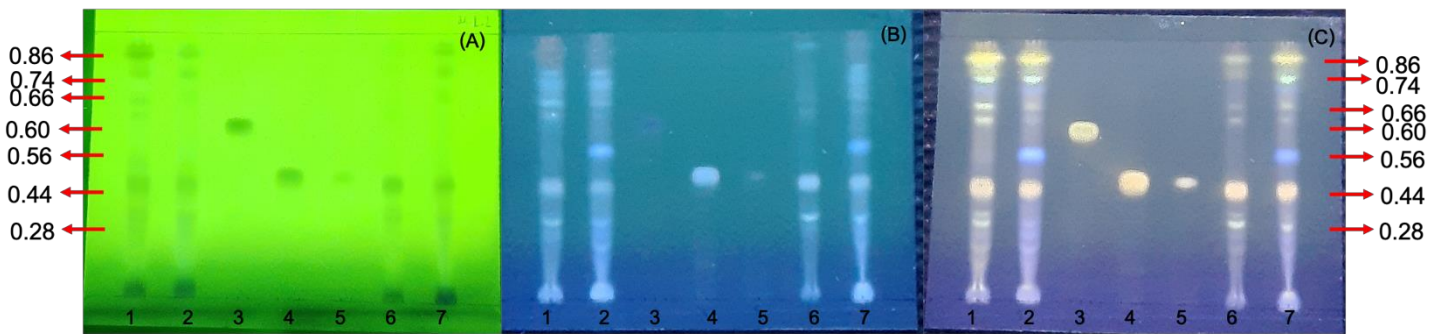
4.6.3 โครมาโตแกรม TLC ของสารสกัดจากเปลือกสละสายพันธุ์ต่าง ๆ โดยมีวัฏภาคเคลื่อนที่ในระบบที่ 2 คือ ethyl acetate : acetic acid : formic acid : น้ำ อัตราส่วน 100:11:11:26



ภาพที่ 17 โครมาโตแกรมของสารสกัดเปลือกสละสายพันธุ์ต่าง ๆ ในระบบที่ 2 เมื่อนำมาส่องภายใต้แสงยูวี 254 nm (A) ส่อง 366 (B) และ ฟ่นด้วย 1% NP (C)

- | | |
|-------------------------------|---------------------------------|
| 1 = สารสกัดเปลือกสละหม้อ | 5 = 5-O-Caffeoylquinic acid |
| 2 = สารสกัดเปลือกสละเนินวง | 6 = สารสกัดเปลือกสละสุมาลี |
| 3 = 4,5-Dicaffeoylquinic acid | 7 = สารสกัดเปลือกสละอินโดนีเซีย |
| 4 = 4-O-Caffeoylquinic acid | |

4.6.3 โครมาโตแกรม TLC ของสารสกัดจากเมล็ดสละสายพันธุ์ต่าง ๆ โดยมีวัฏภาคเคลื่อนที่ในระบบที่ 2 คือ ethyl acetate : acetic acid : formic acid : น้ำ อัตราส่วน 100:11:11:26



ภาพที่ 18 โครมาโตแกรมของสารสกัดเมล็ดสละในระบบที่ 1 เมื่อนำมาส่องภายใต้แสงยูวี 254 nm (A) ส่อง 366 (B) และ ฟันทัว 1% NP (C)

- | | |
|-------------------------------|--------------------------------|
| 1 = สารสกัดเมล็ดสละหม้อ | 5 = 5-O-Caffeoylquinic acid |
| 2 = สารสกัดเมล็ดสละเนืวนาง | 6 = สารสกัดเมล็ดสละสุมาลี |
| 3 = 4,5-Dicaffeoylquinic acid | 7 = สารสกัดเมล็ดสละอินโดนีเซีย |
| 4 = 4-O-Caffeoylquinic acid | |

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า สารสกัดจากเปลือกสละสายพันธุ์เนืวนาง เปลือกสละสายพันธุ์สุมาลี และเปลือกสละสายพันธุ์อินโดนีเซีย น่าจะมีสาร 4-O-caffeoylquinic acid และ 5-O-caffeoylquinic acid เนื่องจากมีค่า R_f ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน มีค่าประมาณ 0.46 และ 0.24 ส่วน สารสกัดเมล็ดสละทั้ง 4 สายพันธุ์ก็น่าจะมีสาร 4-O-caffeoylquinic acid และ 5-O-caffeoylquinic acid เนื่องจากค่า R_f ที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน จึงอาจเป็นเหตุผลที่ทำให้สารสกัดจากเปลือกผลและเมล็ดสละทั้ง 4 สายพันธุ์ มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย

5.1 การตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

จากการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu reagent ของสารสกัดเปลือกและเมล็ดสละที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดจากเปลือกสละสายพันธุ์หม้อมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ เมื่อทำการเปรียบเทียบกับสารสกัดที่ใช้ทดสอบ โดยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 158.59 ± 6.77 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัด 1 กรัม ซึ่งมีงานวิจัยก่อนหน้านี้ในปี 2016 ของ Mayuree Kanlayavattanukul และคณะ (30) ได้ทำการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจากเปลือกผลของสละที่สกัดด้วยตัวทำละลายแอลกอฮอล์และน้ำ พบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 153.00 ± 25.00 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัด 1 กรัม ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับที่ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาและมีทิศทางเดียวกัน

สำหรับการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดเปลือกสละสายพันธุ์หม้อที่นำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย DES และตัวทำละลายเอทานอล จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดเปลือกสละสายพันธุ์หม้อที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ โดยมีปริมาณเท่ากับ 316.69 ± 24.54 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัด 1 กรัม ซึ่งมีงานวิจัยก่อนหน้านี้ในปี 2014 ของ Seri Intan Mokhtar และคณะ (31) ได้ทำการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจากเนื้อผลของสละ ที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ พบว่าสารสกัดจากตัวทำละลายเอทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด เท่ากับ 321.90 ± 3.46 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัด 1 กรัม ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับที่ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาและมีทิศทางเดียวกัน

5.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS, DPPH และ FRAP assay

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระจากเปลือกผลและเมล็ดของสละทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สละสายพันธุ์เนืวนาง สละสายพันธุ์สุมาลี สละสายพันธุ์หม้อ และสละสายพันธุ์อินโดนีเซีย โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย และนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP assays พบว่าการทดสอบด้วยวิธี DPPH assay สารสกัดเปลือกผลสละสายพันธุ์อินโดนีเซียมีฤทธิ์ดีที่สุด แต่ในการทดสอบด้วยวิธี ABTS assay และ FRAP assays พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลสละสายพันธุ์หม้อมีฤทธิ์ดีที่สุด จึงนำสารสกัดเปลือกผลสละสายพันธุ์หม้อมาสกัดด้วยตัวทำละลาย DES และตัวทำละลายเอทานอล แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay พบว่าสารสกัดเปลือกผลสละสายพันธุ์หม้อที่สกัดด้วย DES1 มีฤทธิ์ดีที่สุดในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH assay ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 11.98 ± 0.53 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม เช่นเดียวกับการทดสอบด้วยวิธี FRAP assay ของสารสกัดเปลือกผลสละสายพันธุ์หม้อด้วยตัวทำละลาย DES1 มีค่า FRAP value มากที่สุดเท่ากับ 387.52 ± 9.15 มิลลิกรัมสมมูลของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อสารสกัด 1 กรัม ในขณะที่การทดสอบด้วยวิธี ABTS assay พบว่าสารสกัดเปลือกผลสละสายพันธุ์หม้อสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลมีฤทธิ์ดีที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.17 ± 0.17 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม จาก

การศึกษาในปี 2018 ของ Mohammed S. M. Saleh และคณะ (32) ได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระจากเนื้อผลของสละโดยการสกัดด้วยเอทานอลและน้ำพบว่า การทดสอบด้วยวิธี DPPH assay ได้ค่า IC_{50} เท่ากับ 49.45 ± 3.87 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และการทดสอบด้วยวิธี FRAP assay มีค่าเท่ากับ 144.81 ± 3.72 ไมโครกรัมเทียบเท่ากรดแอสคอร์บิกต่อสารสกัด 1 กรัม ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับที่ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาและมีทิศทางเดียวกัน สำหรับการสกัดด้วยวิธี Deep eutectic solvents ยังไม่พบการวิจัยพืชวงศ์ arecaceae แต่จากการศึกษาในปี 2019 ของ Caroline Goltz และคณะ (33) ได้ศึกษาความคงตัวของสารประกอบฟีนอลิกและสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระจากสารสกัดด้วยตัวทำละลาย Deep eutectic solvents (ChCl:glycerol, ChCl:lactic acid, ChCl:1,2-propanediol, ChCl:oxalic acid) และสารสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลจากใบของต้นโรสแมรี่ พบว่าสารสกัดด้วยตัวทำละลาย Deep eutectic solvents และสารสกัดด้วยเอทานอลเมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธี DPPH assay ได้ค่าเท่ากับ 155.83 ± 1.93 มิลลิโมลาร์เทียบเท่า trolox ต่อสารสกัด 1 กรัม และ 132 ± 1.56 มิลลิโมลาร์เทียบเท่า trolox ต่อสารสกัด 1 กรัม ตามลำดับ และเมื่อนำสารสกัด 2 ชนิดมาทดสอบด้วยวิธี FRAP assay ได้ค่าเท่ากับ 126.23 ± 14.81 มิลลิโมลาร์เทียบเท่า trolox ต่อสารสกัด 1 กรัม และ 49.14 ± 3.47 มิลลิโมลาร์เทียบเท่า trolox ต่อสารสกัด 1 กรัม ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าการสกัดด้วย DES จะได้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระมากกว่าการสกัดด้วยเอทานอล ซึ่งเกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างพันธะไฮโดรเจนของตัวทำละลาย Deep eutectic solvent กับสารประกอบฟีนอลิกในใบต้นโรสแมรี่ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องและมีทิศทางเดียวกันกับผลของการสกัดเปลือกผลสละด้วย deep eutectic solvent กับที่ผู้วิจัยได้ทำการศึกษา

5.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Antityrosinase inhibition assay)

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดสละ ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล พบว่า สารสกัดจากเมล็ดสละสายพันธุ์เนนงมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสดีที่สุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ โดยที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 105.03 ± 6.72 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีงานวิจัยก่อนหน้านี้ในปี 2017 ของ Astrid Tilaar และคณะ (34) ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของเมล็ดสละที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล พบว่าที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เมล็ดสละมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสดีที่สุดที่ร้อยละ 18.17 ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับที่ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาและมีทิศทางเดียวกัน

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากเมล็ดสละสายพันธุ์เนนง ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย DES และตัวทำละลายเอทานอล จากการทดสอบพบว่า สารสกัดจากเมล็ดสละสายพันธุ์เนนงที่สกัดด้วยตัวทำละลาย DES 3 (ChCl-propanoic acid) มีฤทธิ์ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 57.38 ± 0.22 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีงานวิจัยก่อนหน้านี้ในปี 2019 ของ Nina Dewi Oktaviyanti และคณะ (35) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากดอกเข็มทองด้วยตัวทำละลาย DES และตัวทำละลายเมทานอล พบว่าที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากดอกเข็มทองที่สกัดด้วยตัวทำละลาย DES มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสดีที่สุดที่ร้อยละ 48 ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับที่ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการสกัดเมล็ดสละด้วยตัวทำละลาย DES และมีทิศทางเดียวกัน

5.4 การตรวจสอบด้วยรังคเลขผิวนาง (Thin layer chromatography)

จากการทดสอบคุณสมบัติทางพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากเปลือกผลและเมล็ดสละทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ 2 ระบบ ได้แก่ ethyl acetate : water : formic acid (17:2:1) เป็นระบบที่ 1 และ ethyl acetate : acetic acid : formic acid : water (100:11:11:26) เป็นระบบที่ 2 และใช้สารมาตรฐานเป็น 4,5-dicaffeoylquinic acid, 4-O-caffeoylquinic acid และ 5-O-caffeoylquinic acid จากการทดสอบพบว่า สารสกัดจากเปลือกผลและเมล็ดของสละทั้ง 4 สายพันธุ์ คาดว่าน่าจะมีสารประกอบ 4-O-Caffeoylquinic acid และ 5-O-Caffeoylquinic acid เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งเป็นสารประกอบในกลุ่ม caffeoylquinic acid จากการศึกษานี้ในปี 2018 ของ Sandra Gonçalves และคณะ (36) ที่ได้ศึกษาสารประกอบฟีนอลิกของต้นปาล์ม เป็นพืชในวงศ์ Arecaceae ซึ่งเป็นพืชวงศ์เดียวกับสละ พบว่ามีสารประกอบฟีนอลิกในกลุ่ม caffeoylquinic acid ได้แก่ cryptochlorogenic acid และ neochlorogenic acid และจากงานวิจัยของ Ermi Girsang ในปี 2018 (37) พบว่า เปลือกผลของสละมีสารประกอบกลุ่ม caffeic acid และ chlorogenic acid อยู่ ซึ่งจากผลการศึกษาข้างต้น ได้ผลสอดคล้องกับผลที่ผู้วิจัยได้ทำการศึกษา และมีทิศทางเดียวกัน

5.5 ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากผู้วิจัยขาดความชำนาญในการทำการทดลอง ประกอบกับระยะเวลาในการทำการศึกษามีอยู่จำกัด ทำให้ผลการทดลองที่ได้ อาจจะไม่มีความคลาดเคลื่อนเล็กน้อย และในการเก็บตัวอย่างพืช ทางผู้วิจัยได้เก็บตัวอย่างพืชมาจากที่ต่างภูมิภาคกัน จึงอาจทำให้มีผลต่อการทดสอบฤทธิ์ที่ต่างกัน เนื่องจากสภาพการเลี้ยงดูและสภาพภูมิอากาศที่ต่างกัน

เอกสารอ้างอิง

- (1) Dailynew.รู้วิธีป้องกันรังสียูวีแบบที่เอาอยู่.[ออนไลน์].[สืบค้นเมื่อวันที่ 1 กรกฎาคม 2563].เข้าถึงได้จาก: <https://www.dailynews.co.th/women/777155>
- (2) A.Dechakhamphu, Saran Chaweerak, Nattapong Wongchum, S. Wanna, Daungporn Nanthasamroeng, Naramon Amornwong. Tropical Fruit Peel Extracts as Potential Agents for Treatment of Obesity and Inhibitor of Tyrosinase Activity. Thai Journal of Pharmaceutical Science (TJPS). 2017;37-40.
- (3) วรัญญา ชูขาว และ นภาพร รัตนาก. การตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของเปลือกและเนื้อผลไม้. การประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ ”สร้างสรรค์และพัฒนา เพื่อก้าวหน้าสู่ประชาคมอาเซียน”; 18-19 มิถุนายน 2558; วิทยาลัยนครราชสีมา; 2558. หน้า 127-134.
- (4) จตุพร พุทธิศา.สละ.[ออนไลน์].[สืบค้นเมื่อวันที่ 1 กรกฎาคม 2563].เข้าถึงได้จาก: <http://www.eculture.rbru.ac.th/ID119-สละ>
- (5) Wikipedia.thai.ข้อมูลทั่วไปของสละ.[ออนไลน์].[สืบค้นเมื่อวันที่ 3 มิถุนายน 2563].เข้าถึงได้จาก: [https://th.m.wikipedia.org/wiki/สละ_\(ปาล์ม\)](https://th.m.wikipedia.org/wiki/สละ_(ปาล์ม))
- (6) Eculture.rbru.ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของสละ.[ออนไลน์].[สืบค้นเมื่อวันที่ 3 มิถุนายน 2563].เข้าถึงได้จาก: <http://www.eculture.rbru.ac.th/ID119-สละ>
- (7) R Suica-Bunghez. Antioxidant activity and phytochemical compounds of snake fruit (Salacca zalacca). Materials Science and Engineering [Internet]. 2016[cited 2020 Jun 21]. Available from: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1757-899X/133/1/012051/pdf>
- (8) Astrid Tilaar, Anna Ranti, Abdul Mun'im. The efficacy study of snake fruit (Salacca edulis Reinw Var. Bong-kok) extract as skin lightening agent. A multifaceted peer reviewed journal in the field of Pharmacognosy [Internet]. 2017[cited 2020 Jun 20]; 9(2): 235-238. Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/eb00/0dacdd3281e07f4218bb457fe1a9f1983b50.pdf>
- (9) Elok Zubaidah, Widya Dwi Rukmi Putri, Tiara Puspitasari, Umi Kalsum, Dianawati Dianawati. The effectiveness of various salacca vinegars as therapeutic agent for management of hyperglycemia and dyslipidemia on diabetic rats. Hindawi international journal of food science volume [Internet]. 2017[cited 2020 Jun 20]. Available from: <http://downloads.hindawi.com/journals/ijfs/2017/8742514.pdf>
- (10) บุหรัน พันธุ์สุวรรณ. อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2556;3:277-278
- (11) Nawar WF. Lipids. In: Fennema O, editor. Food chemistry. 3rd ed. New York : Marcel Dekker. 1996;10:225-320.
- (12) Varatharajan K, Pushparani D. Screening of antioxidant additives for biodiesel fuels. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2018;82:2017-2028.
- (13) ปณัฏฐา ไชยมติ. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชสมุนไพร 7 ชนิด. วิทยานิพนธ์ ปริญญา

- วิทยาศาสตร์บัณฑิต].สงขลา:มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์;2547
- (14) Buran Phansawan.Free radicals, Antioxidants and Antioxidant Activity Determination. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 2013;3:275-286.
 - (15) ปวีณา พันทอง.การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี CUPRAC โดยใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ[วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต].ชลบุรี:มหาวิทยาลัยบูรพา; 2559.
 - (16) เรณู คำหอม.การทดสอบสารฟลักซ์เคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของดอกปีบ. [วิทยานิพนธ์ปริญญา มหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์]. มหาวิทยาลัยบูรพา;2559
 - (17) สุชาดา จันทรพรหมมา.การสังเคราะห์และฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารอนุพันธ์ chalcones และ bischalcones. [วิทยานิพนธ์ปริญญา มหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์]. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์;2554
 - (18) ประไพพิศ อินเสน.การยับยั้งกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินจากพืชกลุ่มเบอร์รี่ไทย.[วิทยานิพนธ์ ปริญญา มหาบัณฑิต คณะเภสัชศาสตร์].มหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเซีย;2561
 - (19) จันทรเพ็ญ โคตรภูธร.การสกัดสารฟลักซ์เคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านเชื้อแบคทีเรียของสาร สกัดหยาบจากเพกา.[วิทยานิพนธ์ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต].ชลบุรี: มหาวิทยาลัย บูรพา;2559.
 - (20) KM tank.การสกัดแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีจากสมุนไพร. [ออนไลน์].[สืบค้นเมื่อวันที่ 1 กรกฎาคม 2563].เข้าถึงได้จาก : <https://www.tistr.or.th/tistrblog/?p=4737>
 - (21) Farid C. , Maryline A., Anne Sylvie F. , Jochen S. , Lukas U. , Veronika G. and Giancarlo C.Green extraction of natural products. Origins, current status, and future challenges. Trends in Analytical Chemistry. 2019;118:248-263.
 - (22) กรองกาญจน์ กิ่งแก้ว.หลักการของการสกัดสีเขียวของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ.วิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยี.2562:28-31.
 - (23) ดวงมล เรือนงาม.การสกัดต้านอนุมูลอิสระ.วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง.2557;23:120-139
 - (24) hielscher.การสกัดด้วยอัลตราโซนิก.[ออนไลน์].[สืบค้นเมื่อวันที่ 1 กรกฎาคม 2563].เข้าถึงได้จาก: <https://www.hielscher.com/th/solvents-for-ultrasonic-extraction-from-plants.htm>
 - (25) Farid C. , Maryline A. , Harish K.R. , Boutheina K. , Soukaina H. , Sandrine P. and Anne-Sylvie F.T. . Review of Alternative Solvents for Green Extraction of Food and Natural Products: Panorama, Principles, Applications and Prospects. Molecules. 2019
 - (26) ศรัณย์ ตันตะรางศา และ ธวัชชัย แพชะมัต. สารผสมยูเทกติกกับการประยุกต์ทางเภสัชกรรม. วารสารไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ 2554;6(1):66-72.
 - (27) Bárbara Socas-Rodríguez, Álvaro Santana-Mayor, Antonio V. Herrera-Herrera, Miguel Ángel Rodríguez-Delgado. Chapter 5 - Deep eutectic solvents. Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science. 2020;1:123-177.
 - (28) Vongsak B, Kongkiatpaiboon S, Jaisamut S, Machana S, Pattarapanich C. In vitro alpha glucosidase inhibition and free-radical scavenging activity of propolis from Thai stingless bees in mangosteen orchard. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2015 Sep

- 1;25(5):445-450.
- (29) Dej-adisai S. Antityrosinase and antimicrobial activities from Thai medicinal plants. Archives of pharmacal research.37(4):473-4783.
- (30) Mayuree Kanlayavattanakun, Nattaya Lourith, Dusadee Ospondpant. Salak plum peel extract as a safe and efficient antioxidant and Biochemistry.77(5).2013:1070-1071
- (31) Seri Intan Mokhtar, Pheen Chee Leong, Lee Ee Ven, Nur Ain AbdAziz. Total Phenolic Contents, Antioxidant Activities and Organic Acids Composition of Three Selected Fruit Extracts at Different Maturity Stages. Journal of Tropical Resources and Sustain Saience. Volume 2 (2014): 40-46
- (32) Mohammed S. M. Saleh, Mohammed Jamshed Siddiqui, Siti Z. Mat So'ad, Suganya Murugesu, Alfi Khatib, Mokhlesur M. Rahman. Antioxidant and alpha-glucosidase inhibitory activities and gas chromatography-mass spectrometry profile of salak (*Salacca zalacca*) fruit peel extracts. Phcog Res [Internet]. 2018;10:385-90. Available from: https://www.phcogres.com/temp/PhcogRes104385-5482539_151345.pdf
- (33) Júlia B. Barbieri, Caroline Goltz, Flávia Batistão Cavalheiro, Aline Theodoro Toci, Luciana Igarashi-Mafra, Marcos R. Mafra. Deep eutectic solvents applied in the extraction and stabilization of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) phenolic compounds. J.indcrop [Internet]. 2019. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669019310593?via%3Dihub>
- (34) Astrid Tilaar, Anna Ranti, Abdul Mun. The Efficacy Study of Snake Fruit (*Salacca edulis* Reinw Var. Bong- kok) Extract as Skin Lightening Agent Pharmacogn Journal 2017; 9(2): 235-238
- (35) Nina Dewi Oktaviyanti. Application and optimization of ultrasound-assisted deep eutectic solvent for the extraction of new skin-lightening cosmetic materials from *Ixora javanica* flower. Research article 2019.5(11):3-5.
- (36) Sandra Gonçalves, Joana Medronho, Elsa Moreira, Clara Grosso, B. Andrade, Patrícia Valentão and Anabela Romano. Bioactive properties of *Chamaerops humilis* L.: antioxidant and enzyme inhibiting activities of extracts from leaves, seeds, pulp and peel. Biotech. 2018:1-8.
- (37) Ermi Girsang, Chrismis Novalinda Ginting, I Nyoman Ehrich Lister, Wahyu Widowati, Satrio Haryo Benowo Wibowo, Fajar Sukma Perdana and Rizal Rizal. In silico analysis of phytochemical compound found in snake fruit (*Salacca zalacca*) peel as anti-aging agent. Thai Journal of Pharmaceutical Sciences 2019. 43(2): 105-109.

ภาคผนวก

การเตรียมสารทดสอบ

1. การตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

1.1 Folin-Ciocalteu reagent working solution

เจือจาง Folin-Ciocalteu reagent 1 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่เย็นปราศจากแสงรบกวน

1.2 สารละลาย 7.5% sodium hydrocarbonate (NaHCO_3)

ชั่ง NaHCO_3 จำนวน 7.5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

1.3 สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก

ชั่งกรดแกลลิก 2 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

2.1 DPPH assay (2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl free radical)

2.1.1 สารละลาย DPPH

ชั่ง DPPH 3 มิลลิกรัม ละลายด้วยเมทานอล 30 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในที่เย็นปราศจากแสง

2.1.2 สารละลาย ascorbic acid ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่ง ascorbic acid 1 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้น ปิเปตสารละลายมา 50 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 950 ไมโครลิตร จะได้สารละลาย ascorbic acid เข้มข้นเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2 ABTS assay (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6- sulfonic acid) assay)

2.2.1 สารละลาย ABTS stock solution

ชั่ง ABTS salt 7.68 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร และชั่ง potassium persulfate ($\text{K}_2\text{O}_8\text{S}_2$) 1.32 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร แบ่งสารละลายทั้งสองมาอย่างละ 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายทั้ง 2 มาผสมกันในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในที่มีอุณหภูมิประมาณ 18 ชั่วโมง

2.2.2 สารละลาย ABTS working solution

นำ ABTS stock solution มาเจือจางด้วยเมทานอลในอัตราส่วน 1:50 ของเมทานอล คือ ABTS stock solution 1 มิลลิลิตร และเมทานอล 50 มิลลิลิตร เก็บสารละลายนี้ไว้ในที่เย็นปราศจากแสง

2.3 FRAP assay

2.3.1 สารละลาย FRAP reagent

- เตรียมสารละลาย 300 mM acetate buffer pH 3.6 โดยการละลาย acetic acid ด้วย glacial acetic acid 80 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH ให้เป็น 3.6 ด้วย 1N HCl หรือ 1N NaOH แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

- เตรียมสารละลาย 10 mM TPTZ ใน 40 mM HCl ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มประมาณ 30 นาที จากนั้นนำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

- เตรียมสารละลาย 20 mM FeCl_3 โดยชั่ง FeCl_3 5.41 กรัม นำมาละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

- เตรียม FRAP working solution โดยการผสมสารละลายในอัตราส่วน 10:1:1 ดังนี้

300 mM acetate buffer pH 3.6	10	มิลลิลิตร
10 mM TPTZ in 40 mM HCl	1	มิลลิลิตร
20 mM FeCl_3	1	มิลลิลิตร

3. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase)

3.1 Tyrosinase solution

ชั่ง Tyrosinase enzyme 2 มิลลิกรัม ละลายด้วย 20 mM Sodium phosphate buffer 2 มิลลิลิตร จะได้เอนไซม์เข้มข้น 2687 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากนั้นปิเปตมา 1861 ไมโครลิตร ผสมกับ Sodium phosphate buffer 8139 ไมโครลิตร จะได้ Tyrosinase solution เข้มข้น 500 ยูนิตใน 5 มิลลิลิตร

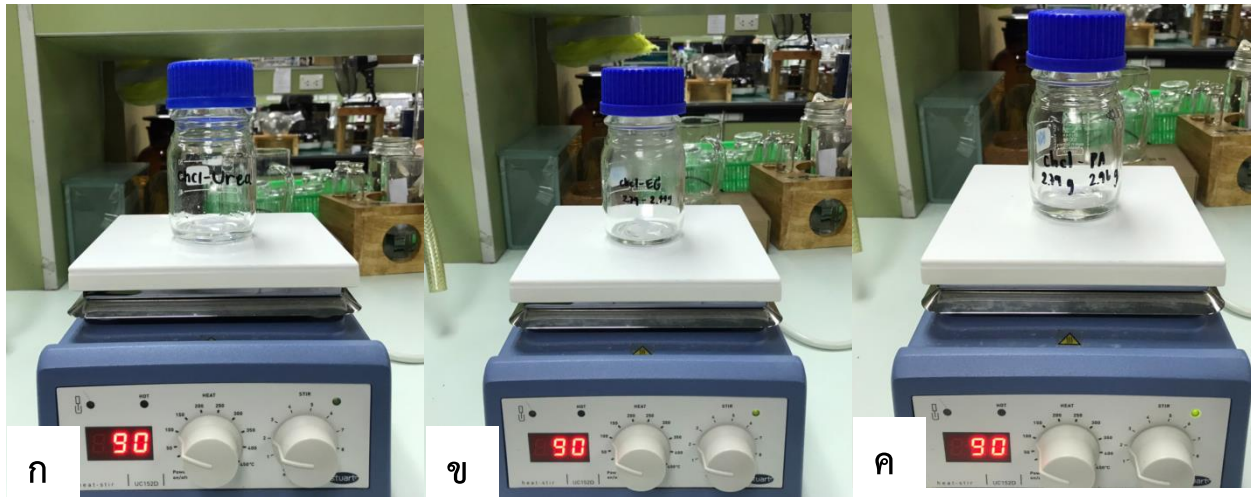
3.2 20 mM Sodium phosphate buffer pH 6.8

ชั่ง NaH_2PO_4 0.55 กรัม ละลายใน deionize water 200 มิลลิลิตร จากนั้นชั่ง Na_2HPO_4 0.34 กรัม ละลายใน deionize water 200 มิลลิลิตร จากนั้นแบ่งสารละลาย NaH_2PO_4 มา 84.6 มิลลิลิตร และสารละลาย Na_2HPO_4 มา 115.4 มิลลิลิตร มาผสมกัน จากนั้นปรับ pH เป็น 6.8 ด้วย 1N HCl หรือ 1N NaOH

3.3 สารละลาย 0.85 mM L-DOPA

ชั่ง L-DOPA 5.04 มิลลิกรัม ละลายด้วย 20 mM Sodium phosphate buffer 30 มิลลิลิตร

4. การสกัดสารด้วยตัวทำละลาย Deep eutectic solvent (DES)



ภาพที่ 1 การขังสารละลาย Deep eutectic solvent (DES)

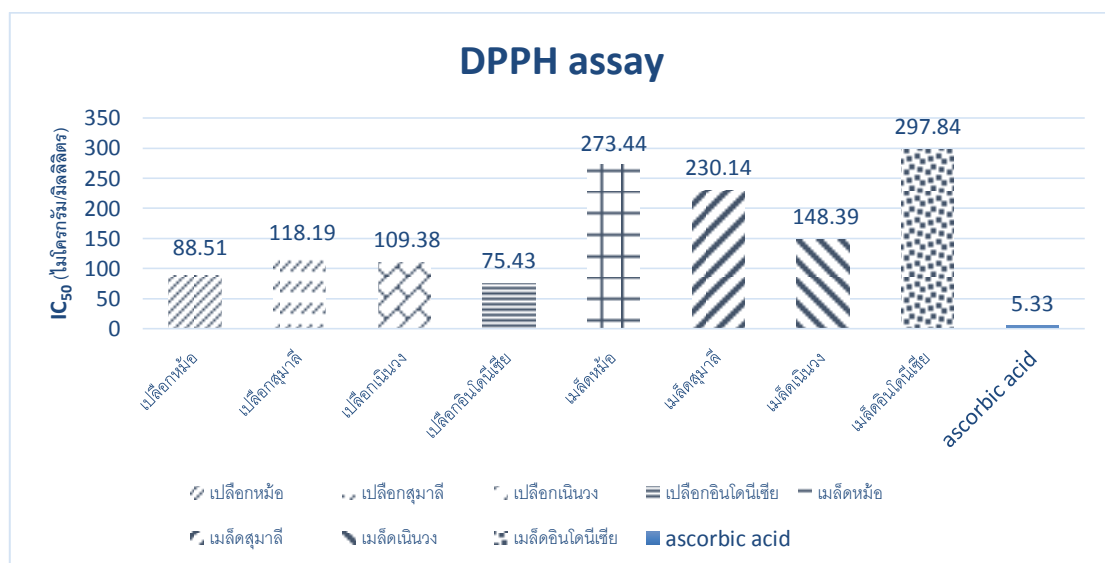
ก : Choline chloride (ChCl)-urea (DES1)

ข : Choline chloride (ChCl)-ethylene glycol (EG) (DES2)

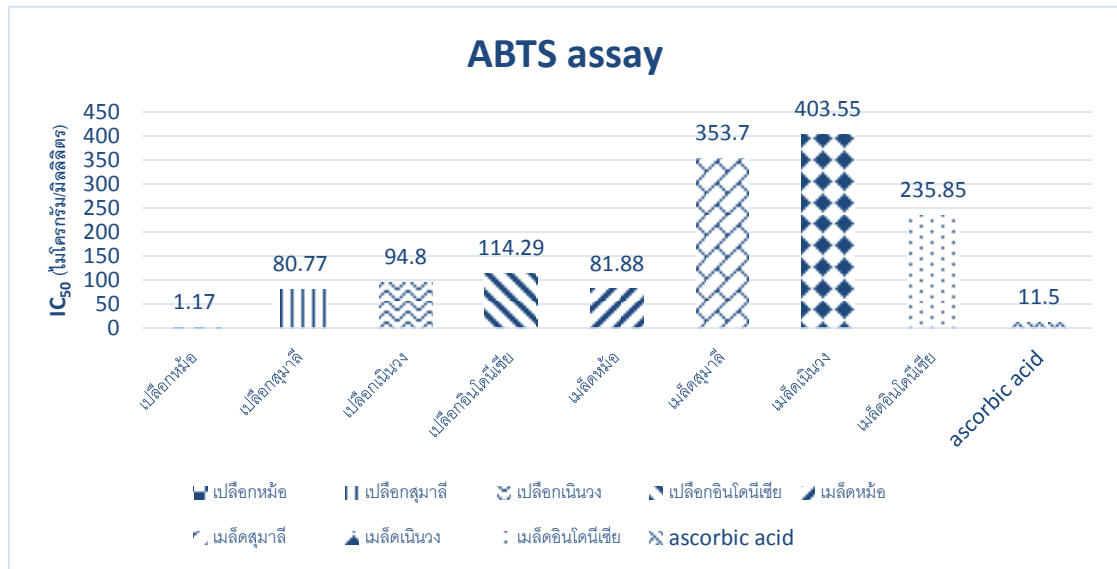
ค : Choline chloride (ChCl)-propanoic acid (PA) (DES3)

ผลการทดลอง

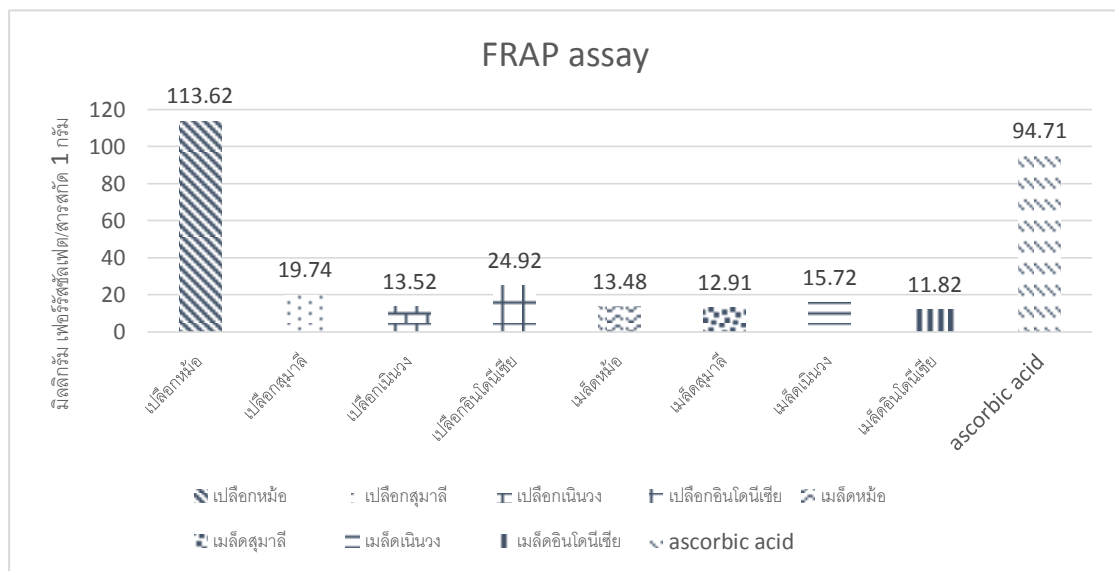
1. แผนภูมิแสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ



แผนภูมิที่ 1 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

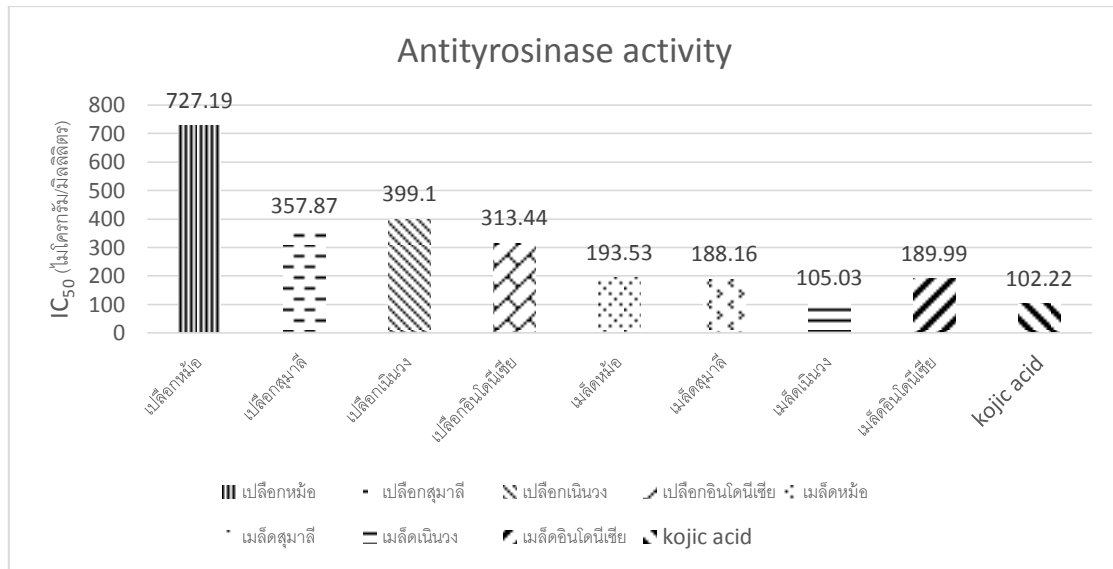


แผนภูมิที่ 2 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay



แผนภูมิที่ 3 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay

2. แผนภูมิแสดงผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส



แผนภูมิที่ 4 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

Match Overview

NO.	TITLE	AUTHOR(S)	SOURCE	SIMILARITY INDEX
1	การสกัดสารสีจากพืชบางชนิด และการหาปริมาณสารสีจากพืชเพื่อพัฒนาเป็น สัมผัสอาหารธรรมชาติ,Extraction of pigments from some plants and antioxidant assays for natural food colorant development	ภัทรพร วงศ์เจนา	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	0.53 %
2	การพัฒนาวิธีดัดแปลงแบบกรดคาซซเพื่อการวิเคราะห์ในแบบรวดเร็วของ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในอาหารและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ	วิมล แสงนาค	มหาวิทยาลัยบูรพา	0.29 %
3	USING PACKED BED EXTRACTOR\การสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากสธ. มะงา โดยใช้อุปกรณ์สกัดแบบแพคเบด,USING PACKED BED EXTRACTOR\การสกัดสาร ประกอบฟีนอลิกจากสธ. มะงาโดยใช้อุปกรณ์สกัดแบบแพคเบด	นายปิย ะพงษ์ศักดิ์สารธรรม\Mr. Piyapong Kittisaratham\,นายปิย ะพงษ์ศักดิ์สารธรรม\,Mr. Piyapong Kittisaratham	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	0.28 %
4	การตรวจสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในขุและผลของระยะเวลาการเก็บรักษาต่อความ สามารถในการออกฤทธิ์,Determination of pharmaceuticals property of Indian Marsh Fleabane leaf and effect of storage time on bioactive potential	กรรณจันทร รัตนประดิษฐ์,สมจิตต์ ปาละเกศ	มหาวิทยาลัยบูรพา	0.27 %

[illegible]

สหกรณ์ผู้ปลูกข้าว (ข้าวปทุมมา) ของจังหวัดอุดรธานีและจังหวัดหนองบัวลำภูมีสมาชิก 734 รายแบ่งเป็นจังหวัดอุดรธานี 687 ราย และจังหวัดหนองบัวลำภู 47 ราย
 *ประวัติการค้าข้าวของสหกรณ์ผู้ปลูกข้าวเมืองจันทบุรี *ด้วยเหตุผลเพื่อประโยชน์ **ก.จากบริษัท ABTS **ที่
 ปฏิบัติงานสำรวจดินฟ้าอากาศและควบคุมคุณภาพของข้าวที่จะทำการส่งออก (ได้ผสมข้าว 10%) และเพื่อให้ได้ผลให้ได้
 ปริมาณข้าวสารมาตรฐานเป็นสารที่ควบคุมดูแลของ ก. สารตัวดังกล่าวที่การควบคุมดูแลของ ก. จะส่งผลกระทบต่อ
 คุณภาพข้าว ABTS **ซึ่งมีลักษณะเด่นชัด ก. การที่บริษัทสามารถนำ exolox มาใช้ในการเติมกับข้าว DPPH ชนิด
 ใหม่หรือที่เรียกอีกชื่อ ABTS +A) ผลที่ได้เป็นน้ำและน้ำใสสะอาดอย่างมีประสิทธิภาพที่ใช้ปฏิบัติงานได้อย่างรวดเร็วมีประสิทธิภาพได้
 ดีกว่าชนิด nphl (การเติมกับน้ำใสสะอาด ABTS +A) เป็นน้ำใสสะอาดอย่างมีประสิทธิภาพที่ใช้ปฏิบัติงานได้อย่างรวดเร็วที่มีชนิด ก.**

[illegible][illegible][illegible]

รายงานสรุปการเงิน

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2563 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของเปลือกผลและเมล็ดสละ

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 9 มิถุนายน 2563 ถึง 19 กุมภาพันธ์ 2564

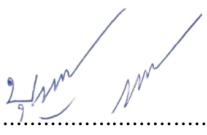
ระยะเวลาดำเนินการ 8 เดือน 10 วัน ตั้งแต่วันที่ 9 มิถุนายน 2563 ถึง 19 กุมภาพันธ์ 2564

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ (100%) 9,000 บาท เมื่อวันที่ 26 มกราคม 2564

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าสารเคมี	5,500 บาท	20,300 บาท	เกิน 14,800 บาท
2. ค่าสละทั้ง 4 สายพันธุ์	2,000 บาท	3,000 บาท	เกิน 1,000 บาท
3. ค่าจัดทำรูปเล่ม	1,000 บาท	1,000 บาท	0 บาท
4. ค่าทำโปสเตอร์	500 บาท	300 บาท	เหลือ 200 บาท
รวม	9,000 บาท	24,600 บาท	เกิน 15,600 บาท



 (ภก.ผศ.ดร. บุญดิศย์ วงศ์ศักดิ์)
 อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัย