



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

เปรียบเทียบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส
ของฝาดดอกขาวและฝาดดอกแดง

Comparison of antioxidant and tyrosinase inhibitory activity of
Lumnitzera racemosa Wild. and *Lumnitzera littorea* (Jack) Voigt.

โดย

นสภ. รุจิรา	คำจันทร์ดี	รหัส 59210197
นสภ. ชลนิภา	อัศวสันติชัย	รหัส 59210155
นสภ. วิภาดา	ชูอารมย์	รหัส 59210200

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
บัณฑิต

ปีการศึกษา 2563

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

เปรียบเทียบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส
ของฝาดดอกขาวและฝาดดอกแดง

Comparison of antioxidant and tyrosinase inhibitory activity of
Lumnitzera racemosa Wild. and *Lumnitzera littorea* (Jack) Voigt.

โดย

นสภ. รุจิรา	คำจันทร์ดี	รหัส 59210197
นสภ. ชลนิภา	อัครสันติชัย	รหัส 59210155
นสภ. วิภาดา	ชูอารมย์	รหัส 59210200

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
บัณฑิต

ปีการศึกษา 2563

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของฝาดดอกขาวและฝาดดอกแดง ซึ่งเหตุผลที่ทางคณะผู้จัดทำได้เลือกหัวข้อนี้เนื่องจากเห็นว่าต้นฝาดดอกขาวและฝาดดอกแดง มีการกระจายในหลายประเทศ และกระจายอยู่มากในพื้นที่ของป่าชายเลน ภาคตะวันออกของประเทศไทย และข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับการศึกษาวิจัยฝาดดอกแดง และฝาดดอกขาวในไทยยังมีน้อย นอกจากนี้ยังไม่มีการศึกษาเรื่องความสัมพันธ์ของตำแหน่งที่เกิดตามธรรมชาติกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ หรือฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในต้นฝาดมากนัก ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาต้นฝาดดอกแดงเพราะเล็งเห็นความสำคัญว่าสารพฤษาเคมีในต้นฝาดมีประโยชน์ใช้ในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่เป็นตัวก่อให้เกิดความเสียหายกับร่างกายของเรา

คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่า โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้ได้รวบรวมเนื้อหาที่เป็นประโยชน์แก่ผู้ที่สนใจและสามารถนำผลในการศึกษาไปต่อยอดในการศึกษาอื่นๆได้หากพบข้อผิดพลาดประการใด คณะผู้วิจัยขออภัยมา ณ โอกาสนี้ด้วย

คณะผู้จัดทำ

31 มีนาคม 2564

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2563

เรื่อง เปรียบเทียบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของฝาดดอกขาวและฝาดดอกแดง

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

- | | |
|-----------------------------|---------------|
| 1. นสภ. รุจิรา คำจันทร์ดี | รหัส 59210197 |
| 2. นสภ. ชลนิภา อัครสันติชัย | รหัส 59210155 |
| 3. นสภ. วิภาดา ชูอารมย์ | รหัส 59210200 |

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. ญญ.อ.ดร.ภัทรวดี ศรีคุณ

บทคัดย่อ

ฝาด (*Lumnitzera* sp.) เป็นพืชป่าชายเลน มี 2 สายพันธุ์ คือ ฝาดดอกแดง (*L. littorea*, LL) และฝาดดอกขาว (*L. racemosa*, LR) ซึ่งพบการกระจายตัวที่แตกต่างกันในพื้นที่ประเทศแถบเส้นศูนย์สูตร โดยเฉพาะ LL ที่พบในบางพื้นที่เท่านั้นรวมทั้งบริเวณป่าชายเลนของประเทศไทย เช่น ศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบนฯ จ. จันทบุรี และมีรายงานฤทธิ์ในหลอดทดลอง เช่น ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ยับยั้งเซลล์มะเร็ง และต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งการศึกษาฤทธิ์ใน LL ยังมีข้อมูลที่จำกัด งานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเปรียบเทียบระหว่าง LL และ LR และตำแหน่งที่เกิด โดยทำการสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเมทานอล และวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี Ferric chloride test ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP และ DPPH และฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยทั้ง LL และ LR พบสารประกอบฟีนอลิก โดยผลการวิเคราะห์พบ ซึ่งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใน LR พบมากกว่า LL พบตัวทำละลายน้ำดีกว่าเมทานอลในส่วนกิ่ง แต่ตัวทำละลายเมทานอลดีกว่าน้ำในส่วนใบ และตำแหน่งบกตีกว่าทะเล ยกเว้น LL ตำแหน่งทะเลที่ส่วนใบที่มีฤทธิ์ดีกว่า และวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสใช้ตัวทำละลายเมทานอล พบว่า LR ดีกว่า LL พบส่วนกิ่งฤทธิ์ดีกว่าส่วนใบ และฤทธิ์ของตำแหน่งบกตีกว่าทะเลในช่วง $IC_{50} > 10$ mg/ml ทั้งใน LL และ LR (ส่วนกิ่ง, 0.3 mg/ml: %inhibition เท่ากับ 9.90 ± 0.86 และ 14.45 ± 4.78 ตามลำดับ, $p=0.005$) จากผลการศึกษาทั้งหมดพบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของ LR ดีกว่า LL และตำแหน่งที่เกิดสัมพันธ์กับปริมาณสารออกฤทธิ์โดยตำแหน่งบกจะมีฤทธิ์ดีกว่าทะเล และเพื่อศึกษาปัจจัยต่อการสร้างสารออกฤทธิ์อย่างละเอียด จำเป็นที่จะต้องตรวจวัดค่าตัวแปรที่เกี่ยวข้องเพื่อนำมาวิเคราะห์ร่วมกับตัวแปรตำแหน่งที่เกิดของต้นฝาดต่อไป

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก.....

Senior Project Academic Year 2020

: Comparison of antioxidant and tyrosinase inhibitory activity of *Lumnitzera racemosa* Wild. and *Lumnitzera littorea* (Jack) Voigt.

By 1. Miss.Rujira Kamjandee ID 59210197
 2. Miss.Chonipa Asavasontichai ID 59210155
 3. Miss.Wipada Chooarom ID 59210200

Advisor: Dr. Pattaravadee Srikoon (Advisor)

ABSTRACT

Black mangrove is a mangrove plant with two species: *L. littorea* (LL) and *L. racemosa* (LR) which is found in different distributions throughout equatorial countries. Especially, the LL is found in certain areas, including the mangrove forests of Thailand, such as the Kung Kraben Bay Development Study Center, located in Chanthaburi Province. It has been reported that *in vitro* activity such as antibacterial, anticancer and antioxidant however the study of activity in LL have had limited data. This research is to investigate the antioxidant and tyrosinase inhibitory activity, comparing LL and LR and the location where they occur. By extraction with a solvent, water and methanol. Phenolic compounds were analyzed by FeCl_3 tests, antioxidant activity by FRAP and DPPH assay, and tyrosinase inhibition activity by both LL and LR. The analysis results found the antioxidant activity in LR was greater than LL. Solvent was found in the water than methanol within the branch, but methanol solvent was present more than water in the leaves. And its position on land is more prevalent than at sea, except LL in the position of the sea where the leaf is more active. And analyzing the inhibitory activity of tyrosinase using methanol solvent, LR was found to be more prevalent than LL. branches was found more prevalent than the leaves, and the activity on land is more prevalent than the sea. In the $\text{IC}_{50} > 10$ mg/ml range, both LL and LR (branch segment, 0.3 mg/ml: % inhibitions were 9.90 ± 0.86 and 1.74 ± 2.32 , respectively, $p = 0.005$). All studies found that the antioxidant and tyrosinase activity of LR was better than that of LL. And the position of occurrence is related to the amount of active substance by the land positions which were stronger than the sea. Additionally, to study the factors for the creation of active ingredients it is necessary to measure the related variables for further analysis with the resulting location variables of the Black mangroves.

Major Advisor.....

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์เรื่อง เปรียบเทียบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้ง เอนไซม์ไทโรซิเนสของฝาดดอกขาว และฝาดดอกแดง สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องมาจากความช่วยเหลือของ ญ.อ.ดร.ภัทรวดี ศรีคุณ อาจารย์ที่ปรึกษา ที่ได้ให้คำปรึกษาคอยช่วยเหลือชี้แนะแนวทางในการค้นคว้าความรู้ ช่วยดูแลการทำงานวิจัยให้เป็นไปอย่างราบรื่น และช่วยตรวจทาน และแก้ไขข้อบกพร่องให้ความถูกต้องแก่นิสิิต จึงทำให้โครงการวิจัยฉบับนี้บรรลุตามวัตถุประสงค์

ขอขอบพระคุณ Prof.Takashi Watanabe และ ญ.ดร.ภัทรวดี ศรีคุณ ที่ได้อนุเคราะห์ข้อมูลจากโครงการวิจัยทุนรัฐบาลญี่ปุ่น Grant-in-aid ร่วมกับ Kumamoto University

ขอขอบพระคุณพี่นักวิทยาศาสตร์ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ ช่วยจัดหาเครื่องมืออุปกรณ์ในการทำแลปของงานวิจัยนี้ รวมไปถึงผู้ให้การสนับสนุนท่านอื่น ๆ ที่ได้ให้การช่วยเหลือมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณคณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยบูรพา ที่อนุเคราะห์สถานที่ วัสดุอุปกรณ์ ในการทำโครงการครั้งนี้

ท้ายที่สุดนี้ ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ขอขอบพระคุณผู้ที่มีส่วนรวมที่ไม่ได้กล่าวถึงทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือจนทำให้โครงการฉบับนี้สำเร็จ และสมบูรณ์ตามวัตถุประสงค์

คณะผู้จัดทำ

31 มีนาคม 2564

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
คำนำ	ข
บทคัดย่อ	ค
ABSTRACT	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูปภาพ	ฉ
บทที่ 1.....	1
บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์	3
1.3 สมมติฐาน	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
1.5 กรอบแนวคิด	3
1.6 นิยามศัพท์	4
บทที่ 2.....	5
ทบทวนวรรณกรรม	5
2.1 ฝ้า.....	5
2.2 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา.....	8
2.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส: บทบาทของสารต้านอนุมูลอิสระในการทำให้ผิวขาว (Skin whitening).....	14

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทที่ 3.....	28
ระเบียบและวิธีวิจัย.....	28
3.1 พืชตัวอย่างและการสกัด	28
3.2 การเก็บข้อมูลทางภูมิศาสตร์ของแหล่งกำเนิดตามธรรมชาติ.....	28
3.3 วิธีทดสอบ.....	29
3.4 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล.....	31
บทที่ 4.....	32
ผลการวิจัย.....	32
4.1 การทดสอบกลุ่มสารทางเคมี.....	32
4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	37
4.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Tyrosinase inhibition assay	70
บทที่ 5.....	75
สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย.....	75
เอกสารอ้างอิง.....	77
ภาคผนวก.....	81

สารบัญตาราง

เรื่อง	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของฝาดดอกขาว และฝาดดอกแดงจากการทบทวนวรรณกรรม.....	12
ตารางที่ 2 เปรียบเทียบผลการทดสอบ Ferric chloride test ของสารสกัดฝาดดอกขาว (LR) เทียบกับฝาดดอกแดง (LL) ในตัวทำละลายเมทานอลและน้ำ ส่วนกิ่งและส่วนใบ ตำแหน่งบกและตำแหน่งทะเล.....	34
ตารางที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระระหว่างสารสกัดฝาดดอกขาว (LR) และฝาดดอกแดง (LL) และส่วนกิ่งและใบ ที่ตำแหน่งใกล้เคียงกัน (บก, ทะเล) โดยใช้ตัวทำละลายเมทานอลและน้ำ ด้วยวิธี FRAP assay.....	38
ตารางที่ 4 แสดงการเปรียบเทียบสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระระหว่างตำแหน่งบกกับทะเล ที่สปีชีส์ต่างๆ ส่วนของพืชต่างๆ โดยใช้ตัวทำละลายเมทานอลและน้ำ ด้วยวิธี FRAP assay.....	50
ตารางที่ 5 แสดงการเปรียบเทียบสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระระหว่างสารสกัดฝาดดอกขาว (L.racemosa) และฝาดดอกแดง (L.littorea) และส่วนกิ่งและใบ ที่ตำแหน่งใกล้เคียงกัน (บก, ทะเล) โดยใช้ตัวทำละลายเมทานอลและน้ำ ด้วยวิธี DPPH assay.....	54
ตารางที่ 6 แสดงการเปรียบเทียบสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระระหว่างตำแหน่งบกกับทะเล ที่สปีชีส์ต่างๆ ส่วนของพืชต่างๆ โดยใช้ตัวทำละลายเมทานอลและน้ำ ด้วยวิธี DPPH assay.....	64
ตารางที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระระหว่างสารสกัดฝาดดอกขาว (LR) และฝาดดอกแดง (LL) และส่วนกิ่ง ที่ตำแหน่งใกล้เคียงกัน (บก, ทะเล) โดยใช้ตัวทำละลายเมทานอล ด้วยวิธี Tyrosinase inhibition assay.....	70
ตารางที่ 8 แสดงการเปรียบเทียบสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระระหว่างตำแหน่งบกกับทะเล ที่สปีชีส์ต่างๆ ส่วนของกิ่ง โดยใช้ตัวทำละลายเมทานอล ด้วยวิธี Tyrosinase inhibition assay.....	72

สารบัญรูปภาพ

เรื่อง	หน้า
รูปภาพที่ 1 ฝาดดอกขาว.....	5
รูปภาพที่ 2 การกระจายตัวของฝาดดอกขาว.....	6
รูปภาพที่ 3 ฝาดดอกแดง.....	7
รูปภาพที่ 4 การกระจายตัวของฝาดดอกแดง.....	8
รูปภาพที่ 5 สารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากธรรมชาติ และสารสังเคราะห์.....	15
รูปภาพที่ 6 เอนไซม์ superoxide dismutase, SOD.....	16
รูปภาพที่ 7 เอนไซม์ superoxide dismutase, SOD.....	16
รูปภาพที่ 8 เอนไซม์ glutathione peroxidase (GPX)	16
รูปภาพที่ 9 อนุพันธ์ของวิตามินอี.....	17
รูปภาพที่ 10 กลไกหลักในการออกฤทธิ์ของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ หยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ในการกำจัด อนุมูลอิสระ.....	17
รูปภาพที่ 11 กลไกหลักในการออกฤทธิ์ของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ทำหน้าที่ regenerates วิตามินอี.....	18
รูปภาพที่ 12 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	19
รูปภาพที่ 13 ABTS radical scavenging assay.....	20
รูปภาพที่ 14 Reaction for ABTS assay.....	20
รูปภาพที่ 15 A representative calibration curve of ABTS•+ inhibition by Trolox standards.....	21
รูปภาพที่ 16 Reaction mechanism of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) with antioxidant.....	22
รูปภาพที่ 17 Reaction for DPPH assay.....	22
รูปภาพที่ 18 Reaction for FRAP assay.....	23
รูปภาพที่ 19 กระบวนการสร้าง melanin.....	25
รูปภาพที่ 20 กระบวนการสร้างเอนไซม์ไทโรซิเนส.....	26

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
รูปภาพที่ 21 แสดงภูมิศาสตร์ของศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดจันทบุรี (A), แสดงตำแหน่งของผาดใน braun-blancquet ภายในพื้นที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดจันทบุรี.....	32
รูปภาพที่ 22 เปรียบเทียบผลการตรวจสอบสารประกอบกลุ่มฟลาโวนอยด์โดยอาศัยปฏิกิริยาทางเคมี Ferric chloride test ของสารสกัด LR ในตัวทำละลายเมทานอลระหว่าง ส่วนกิ่ง ตำแหน่งบก (A), ส่วนกิ่ง ตำแหน่งทะเล (B), ส่วนใบ ตำแหน่งบก (C) และส่วนใบ ตำแหน่งทะเล (D).....	35
รูปภาพที่ 23 เปรียบเทียบผลการตรวจสอบสารประกอบกลุ่มฟลาโวนอยด์โดยอาศัยปฏิกิริยาทางเคมี Ferric chloride test ของสารสกัด LR ในตัวทำละลายน้ำระหว่าง ส่วนกิ่ง ตำแหน่งบก (A), ส่วนกิ่ง ตำแหน่งทะเล (B), ส่วนใบ ตำแหน่งบก (C) และส่วนใบ ตำแหน่งทะเล (D).....	35
รูปภาพที่ 24 เปรียบเทียบผลการตรวจสอบสารประกอบกลุ่มฟลาโวนอยด์โดยอาศัยปฏิกิริยาทางเคมี Ferric chloride test ของสารสกัด LL ในตัวทำละลายเมทานอลระหว่าง ส่วนกิ่ง ตำแหน่งบก (A), ส่วนกิ่ง ตำแหน่งทะเล (B), ส่วนใบ ตำแหน่งบก (C) และส่วนใบ ตำแหน่งทะเล (D).....	36
รูปภาพที่ 25 เปรียบเทียบผลการตรวจสอบสารประกอบกลุ่มฟลาโวนอยด์โดยอาศัยปฏิกิริยาทางเคมี Ferric chloride test ของสารสกัด LL ในตัวทำละลายน้ำระหว่าง ส่วนกิ่ง ตำแหน่งบก (A), ส่วนกิ่ง ตำแหน่งทะเล (B), ส่วนใบ ตำแหน่งบก (C) และส่วนใบ ตำแหน่งทะเล (D).....	36
รูปภาพที่ 26 กราฟสารมาตรฐาน trolox โดยวิธี FRAP assay.....	37
รูปภาพที่ 27 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay ของสารสกัด LR (■) เทียบกับ LL (□) ในตัวทำละลายเมทานอล (A; สารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งบก, B; สารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของใบ ตำแหน่งบก, C; สารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งทะเล, D; สารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของใบ ตำแหน่งทะเล) (Independent t- test, *, $p\text{-value} < 0.05$).....	40
รูปภาพที่ 28 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay ของสารสกัด LR (■) เทียบกับ LL (□) ในตัวทำละลายน้ำ (A; สารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งบก, B; สารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของใบ ตำแหน่งบก, C; สารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งทะเล, D; สารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของใบ ตำแหน่งทะเล) (Independent t- test, *, $p\text{-value} < 0.05$).....	41

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
รูปภาพที่ 29 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay ของสารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอล (■) เทียบกับน้ำ (□) (A; สารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำ ของ LR ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งบก, B; สารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำ ของ LR ส่วนของใบ ตำแหน่งบก, C; สารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำ ของ LR ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งทะเล, D; สารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำ ของ LR ส่วนของใบ ตำแหน่งทะเล) (Independent t- test, *; <i>p-value</i> < 0.05).....	43
รูปภาพที่ 30 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay ของสารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอล (■) เทียบกับน้ำ (□) (A; สารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำ ของ LL ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งบก, B; สารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำ ของ LL ส่วนของใบ ตำแหน่งบก, C; สารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำ ของ LL ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งทะเล, D; สารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำ ของ LL ส่วนของใบ ตำแหน่งทะเล) (Independent t- test, *; <i>p-value</i> < 0.05)	45
รูปภาพที่ 31 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay ของสารสกัดจากส่วนกิ่ง (■) เทียบกับส่วนใบ (□) ในตัวทำละลายเมทานอล (A; สารสกัดจากส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ ของ LR ในตัวทำละลายเมทานอล ตำแหน่งบก, B; สารสกัดจากส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ ของ LR ในตัวทำละลายเมทานอล ตำแหน่งทะเล, C; สารสกัดจากส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ ของ LL ในตัวทำละลายเมทานอล ตำแหน่งบก, D; สารสกัดจากส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ ของ LL ในตัวทำละลายเมทานอล ตำแหน่งทะเล) (Independent t- test, *; <i>p-value</i> < 0.05).....	46
รูปภาพที่ 32 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay ของสารสกัดจากส่วนกิ่ง (■) เทียบกับส่วนใบ (□) ในตัวทำละลายน้ำ (A; สารสกัดจากส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ ของ LR ในตัวทำละลายน้ำ ตำแหน่งบก, B; สารสกัดจากส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ ของ LR ในตัวทำละลายน้ำ ตำแหน่งทะเล, C; สารสกัดจากส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ ของ LL ในตัวทำละลายน้ำ ตำแหน่งบก, D; สารสกัดจากส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ ของ LL ในตัวทำละลายน้ำ ตำแหน่งทะเล) (Independent t- test, *; <i>p-value</i> < 0.05).....	48

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
รูปภาพที่ 33 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay ของสารสกัดจากตำแหน่งบก (■) เทียบกับทะเล (□) ในตัวทำละลายเมทานอล (A; สารสกัดจากตำแหน่งบกเทียบกับทะเล ของ LR ในตัวทำละลายเมทานอล ส่วนกึ่ง, B; สารสกัดจากตำแหน่งบกเทียบกับทะเล ของ LR ในตัวทำละลายเมทานอล ส่วนใบ (ไม่มีข้อมูลตำแหน่งทะเล), C; สารสกัดจากตำแหน่งบกเทียบกับทะเล ของ LL ในตัวทำละลายเมทานอล ส่วนกึ่ง, D; สารสกัดจากตำแหน่งบกเทียบกับทะเล ของ LL ในตัวทำละลายเมทานอล ส่วนใบ) (Independent t- test, *, $p\text{-value} < 0.05$).....	51
รูปภาพที่ 34 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay ของสารสกัดจากตำแหน่งบก (■) เทียบกับทะเล (□) ในตัวทำละลายน้ำ (A; สารสกัดจากตำแหน่งบกเทียบกับทะเล ของ LR ในตัวทำละลายน้ำส่วนกึ่ง, B; สารสกัดจากตำแหน่งบกเทียบกับทะเล ของ LR ในตัวทำละลายน้ำส่วนใบ (ไม่มีข้อมูลตำแหน่งทะเล), C; สารสกัดจากตำแหน่งบกเทียบกับทะเล ของ LL ในตัวทำละลายน้ำ ส่วนกึ่ง, D; สารสกัดจากตำแหน่งบกเทียบกับทะเล ของ LL ในตัวทำละลายน้ำ ส่วนใบ) (Independent t- test, *, $p\text{-value} < 0.05$).....	52
รูปภาพที่ 35 กราฟแสดง % Inhibition ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของสารมาตรฐาน trolox ($\mu\text{g/ml}$) โดยวิธี DPPH assay.....	54
รูปภาพที่ 36 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ของสารสกัด LR (■) เทียบกับ LL (□) ในตัวทำละลายเมทานอล (A; สารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของกึ่ง ตำแหน่งบก, B; สารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของใบ ตำแหน่งบก, C; สารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของกึ่ง ตำแหน่งทะเล, D; สารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของใบ ตำแหน่งทะเล) (Independent t- test, *, $p\text{-value} < 0.05$)	55
รูปภาพที่ 37 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ของสารสกัด LR (■) เทียบกับ LL (□) ในตัวทำละลายน้ำ (A; สารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของกึ่ง ตำแหน่งบก, B; สารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของใบ ตำแหน่งบก, C; สารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของกึ่ง ตำแหน่งทะเล, D; สารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของใบ ตำแหน่งทะเล) (Independent t- test, *, $p\text{-value} < 0.05$)	57

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
รูปภาพที่ 38 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ของสารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอล (■) เทียบกับน้ำ (□) (A; สารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำ ของ LR ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งบก, B; สารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำ ของ LR ส่วนของใบ ตำแหน่งบก, C; สารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำ ของ LR ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งทะเล, D; สารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำ ของ LR ส่วนของใบ ตำแหน่งทะเล) (Independent t- test, *; <i>p-value</i> < 0.05).....	59
รูปภาพที่ 39 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ของสารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอล (■) เทียบกับน้ำ (□) (A; สารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำ ของ LL ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งบก, B; สารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำ ของ LL ส่วนของใบ ตำแหน่งบก, C; สารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำ ของ LL ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งทะเล, D; สารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำ ของ LL ส่วนของใบ ตำแหน่งทะเล) (Independent t- test, *; <i>p-value</i> < 0.05).....	60
รูปภาพที่ 40 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ของสารสกัดจากส่วนกิ่ง (■) เทียบกับส่วนใบ (□) ในตัวทำละลายเมทานอล (A; สารสกัดจากส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ ของ LR ในตัวทำละลายเมทานอล ตำแหน่งบก, B; สารสกัดจากส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ ของ LR ในตัวทำละลายเมทานอล ตำแหน่งทะเล, C; สารสกัดจากส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ ของ LL ในตัวทำละลายเมทานอล ตำแหน่งบก, D; สารสกัดจากส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ ของ LL ในตัวทำละลายเมทานอล ตำแหน่งทะเล) (Independent t- test, *; <i>p-value</i> < 0.05).....	62
รูปภาพที่ 41 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ของสารสกัดจากส่วนกิ่ง (■) เทียบกับส่วนใบ (□) ในตัวทำละลายน้ำ (A; สารสกัดจากส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ ของ LR ในตัวทำละลายน้ำตำแหน่งบก, B; สารสกัดจากส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ ของ LR ในตัวทำละลายน้ำตำแหน่งทะเล, C; สารสกัดจากส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ ของ LL ในตัวทำละลายน้ำ ตำแหน่งบก, D; สารสกัดจากส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ ของ LL ในตัวทำละลายน้ำ ตำแหน่งทะเล) (Independent t- test, *; <i>p-value</i> < 0.05).....	64

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
รูปภาพที่ 42 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ของสารสกัดจากตำแหน่งบก (■) เทียบกับทะเล (□) ในตัวทำละลายเมทานอล (A; สารสกัดจากตำแหน่งบกเทียบกับทะเล ของ LR ในตัวทำละลายเมทานอล ส่วนกึ่ง, B; สารสกัดจากตำแหน่งบกเทียบกับทะเล ของ LR ในตัวทำละลายเมทานอล ส่วนใบ (ไม่มีข้อมูลตำแหน่งทะเล), C; สารสกัดจากตำแหน่งบกเทียบกับทะเล ของ LL ในตัวทำละลายเมทานอล ส่วนกึ่ง, D; สารสกัดจากตำแหน่งบกเทียบกับทะเล ของ LL ในตัวทำละลายเมทานอล ส่วนใบ) (Independent t- test, *, $p\text{-value} < 0.05$).....	66
รูปภาพที่ 43 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ของสารสกัดจากตำแหน่งบก (■) เทียบกับทะเล (□) ในตัวทำละลายน้ำ (A; สารสกัดจากตำแหน่งบกเทียบกับทะเล ของ LR ในตัวทำละลายน้ำ ส่วนกึ่ง, B; สารสกัดจากตำแหน่งบกเทียบกับทะเล ของ LR ในตัวทำละลายน้ำ ส่วนใบ (ไม่มีข้อมูลตำแหน่งทะเล), C; สารสกัดจากตำแหน่งบกเทียบกับทะเล ของ LL ในตัวทำละลายน้ำ ส่วนกึ่ง, D; สารสกัดจากตำแหน่งบกเทียบกับทะเล ของ LL ในตัวทำละลายน้ำ ส่วนใบ) (Independent t- test, *, $p\text{-value} < 0.05$).....	67
รูปภาพที่ 44 กราฟสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส Epigallocatechin gallate (EGCG) โดยวิธี Tyrosinase inhibition assay.....	70
รูปภาพที่ 45 กราฟแสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยใช้ Tyrosinase inhibition assay ของสารสกัด LR (■) กับ LL (□) ในตัวทำละลายเมทานอล ส่วนกึ่ง ตำแหน่งบก และ ตำแหน่งทะเล (Independent t- test, *, $p\text{-value} < 0.05$).....	71
รูปภาพที่ 46 กราฟแสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยใช้ Tyrosinase inhibition assay ของตำแหน่งบก (■) เทียบกับตำแหน่งทะเล (□) ของสารสกัด LR และสารสกัด LL ในตัวทำละลายเมทานอล ส่วนกึ่ง (Independent t- test, *, $p\text{-value} < 0.05$).....	73

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ฝาดเป็นพืชสกุล *Lumnitzera* เป็นสกุลของไม้ป่าชายเลนในบริเวณอินโด-แปซิฟิกตะวันตก อยู่ในวงศ์ Combretaceae ชื่อสามัญในภาษาอังกฤษคือ black mangrove แบ่งออกเป็นสองชนิดซึ่งมีความแตกต่างกันที่สีของดอก คือ ฝาดดอกแดง (*Lumnitzera littorea*, LL) มีดอกสีแดง ส่วนฝาดดอกขาว (*Lumnitzera racemosa*, LR) มีดอกสีขาว สำหรับต้นฝาดดอกแดง บางพื้นที่อาจจะเรียกชื่อแตกต่างกันออกไปตามแต่ละท้องถิ่น เช่น ตำเสาทะเล (พังงา, กระบี่, ตรัง) ฝาดแดง (ภาคกลาง, ภาคใต้) เป็นพันธุ์ไม้ชายเลนที่เราสามารถพบได้ตามขอบป่าชายเลนที่เปิดโล่ง และมักจะขึ้นเป็นกลุ่มบริเวณปากแม่น้ำที่มีดินเลนแข็งหรือปนทราย และสามารถเจริญเติบโตได้ในแหล่งน้ำจืด โดยต้นฝาดดอกแดงจะออกดอกในช่วงเดือน สิงหาคม - มีนาคม เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ นอกจากนี้เนื้อไม้ของต้นฝาดดอกแดงยังใช้ประโยชน์ในการสร้างบ้าน ทำพื้น และทำถ่าน ส่วนเปลือก นำมาทุบแช่น้ำให้สีฝาดใช้ย้อมผ้าได้ ฝาดดอกขาว เป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็กถึงไม้พุ่ม สามารถพบได้ตามพื้นที่ราบที่มีน้ำขึ้น - ลงหรือน้ำท่วมถึงสม่ำเสมอ ออกดอกและผลในช่วงเดือนสิงหาคม - มีนาคม เหมือนต้นฝาดดอกแดง ขยายพันธุ์ได้ง่ายด้วยวิธีการเพาะเมล็ด โดยฝาดดอกขาวจะขยายพันธุ์ได้ค่อนข้างง่ายกว่าฝาดดอกแดง และเจริญเติบโตได้ดีในพื้นที่ระบายน้ำดี หรือพื้นที่ดินทราย

มีการศึกษาเกี่ยวกับองค์ประกอบของสารพฤกษเคมีที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง และฤทธิ์ต้านการแข็งตัวของเลือด ของสารสกัดจากใบ *Lumnitzera racemosa* การตรวจหาสารพฤกษเคมีเบื้องต้นพบว่ามีสารประกอบออกฤทธิ์ทางชีวภาพประเภทต่อไปนี้ phenols, flavonoids, alkaloids, terpenoids, sterols, tannins, carbohydrates, cardiac glycosides, saponins และ quinones มีรายงานปริมาณ total phenolic ส่วนใหญ่อยู่ในสารสกัดจากใบของ *L. racemosa* ซึ่งส่วนใหญ่มีส่วนช่วยในการต้านอนุมูลอิสระ (1) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับ “ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปส อะไมเลส และแอลฟา-กลูโคซิเดสของพืชสมุนไพรไทย” จากผลการทดลองฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าในสารสกัดหยาบเมทานอลให้ผลการกำจัดอนุมูลอิสระได้ดีกว่า ในส่วนสารสกัดไดคลอโรมีเทนในพืชทั้งฝาดดอกขาว (*Lumnitzera racemosa*) และฝาดดอกแดง (*Lumnitzera littorea*) เนื่องจากเมทานอลเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูงกว่าไดคลอโรมีเทน (2)

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) สารที่ใช้ป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระที่ทำให้เกิดความเสียหายแก่องค์ประกอบของเซลล์ภายในร่างกาย สารเหล่านี้มีกลไกในการต้านอนุมูลอิสระหลายแบบ โดยทั่วไปสารต้านอนุมูลอิสระสามารถพบได้ในธรรมชาติจากสารหลายชนิด เช่น สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) สารประกอบไนโตรเจน (nitrogen compounds) และแคโรทีนอยด์ (carotinoid) ในภาวะปกติของร่างกายจะมีการป้องกันการสะสมสารอนุมูลอิสระอยู่แล้วซึ่งแบ่งออกเป็นสองส่วน คือ ส่วนแรกเกิดจากร่างกายสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในภาวะที่สมดุล และส่วนที่สองคือ กลุ่มของสารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากวิตามินเอ ซี อี หรือ เบต้าแคโรทีน (β - carotinoid) รวมทั้งสารประกอบโพลีฟีนอล ซึ่งเป็นพฤษเคมีที่สามารถพบได้ในพืชผัก และผลไม้ เพื่อเข้าไปช่วยเสริมสร้างระบบการต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกายให้มีประสิทธิภาพในการทำลายอนุมูลอิสระได้ดียิ่งขึ้น (3) ส่วนเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) หรือ Monophenol oxidase, Monophenol monooxygenase, Phenolase และ Cresolase เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) ของสารประกอบฟีนอล (Phenolic compound) เอนไซม์ไทโรซิเนสถูกสังเคราะห์ขึ้นใน Rough endoplasmic reticulum ภายในโครงสร้างของเอนไซม์มีทองแดง (Cu) ซึ่งมีหน้าที่ทำงานร่วมกับออกซิเจนเพื่อเร่งให้ปฏิกิริยาเกิดได้เร็วขึ้น ในกระบวนการสร้างเม็ดสี (Melanogenesis) เอนไซม์ชนิดนี้จะเร่งปฏิกิริยาในขั้นเริ่มต้นของกระบวนการคือเร่งปฏิกิริยาของ L-Tyrosine และ 3, 4-Dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA) ให้เป็น DOPAquinone ซึ่งทำให้ผิวหนังมีสีหมองคล้ำลง ดังนั้นการป้องกันไม่ให้เกิดการสร้างเมลานิน วิธีหนึ่งคือ การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (4)

เนื่องจากว่าคณะผู้วิจัยอยู่ในแถบภาคตะวันออก ซึ่งเป็นพื้นที่ของป่าชายเลน ในการหาสารที่ออกฤทธิ์จากธรรมชาติได้มีนักวิจัยท่านอื่นศึกษาไว้อย่างมากมาย แต่ด้วยข้อจำกัดทางภูมิศาสตร์ทำให้นักวิจัยไม่ได้ทำการศึกษาอย่างแพร่หลาย ผู้วิจัยเลือกศึกษาต้นฝาดดอกแดง (*Lumnitzera littorea*) และฝาดดอกขาว (*Lumnitzera racemosa*) เนื่องจากกลุ่มพืชตระกูลฝาด พบมากโดยเฉพาะในพื้นที่ป่าชายเลนภาคตะวันออกของประเทศไทย และมีรายงานการออกฤทธิ์ทั้งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แต่ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับการศึกษาวิจัยฝาดดอกแดง และฝาดดอกขาวในไทยยังมีน้อย นอกจากนี้ยังไม่มีการศึกษาเรื่องความสัมพันธ์ของตำแหน่งที่เกิดตามธรรมชาติกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสภาพแวดล้อมโดยทั่วไปของป่าชายเลนมีความแตกต่างออกไปอย่างมากจากป่าชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะดิน ดินในป่าชายเลนมีความอุดมสมบูรณ์สูงจากธาตุอาหารที่มาจากสารอินทรีย์จากซากพืชซากสัตว์ในบริเวณป่าชายเลน โดยเฉพาะใบไม้ที่ร่วงหล่นทับถมกันเป็นจำนวนมาก น้ำบริเวณนี้มีความเค็มค่อนข้างต่ำ ระดับความเค็มของน้ำเปลี่ยนแปลงตลอดเวลาตามระดับน้ำที่ขึ้นลงและปริมาณน้ำจืดไหลมาจากแม่น้ำลำคลอง งานวิจัย

นี้จึงสนใจฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ของฝัสดอกแดง และฝัสดอกขาวของไทย รวมถึงความแตกต่างของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตำแหน่งที่ตั้งที่เกิดของต้นฝาด

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ของสารสกัดฝัสดอกแดงและฝัสดอกขาว

1.2.2 เพื่อเปรียบเทียบตำแหน่งในการเกิดของต้นฝาดต่อฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของฝัสดอกแดงและฝัสดอกขาว

1.3 สมมติฐาน

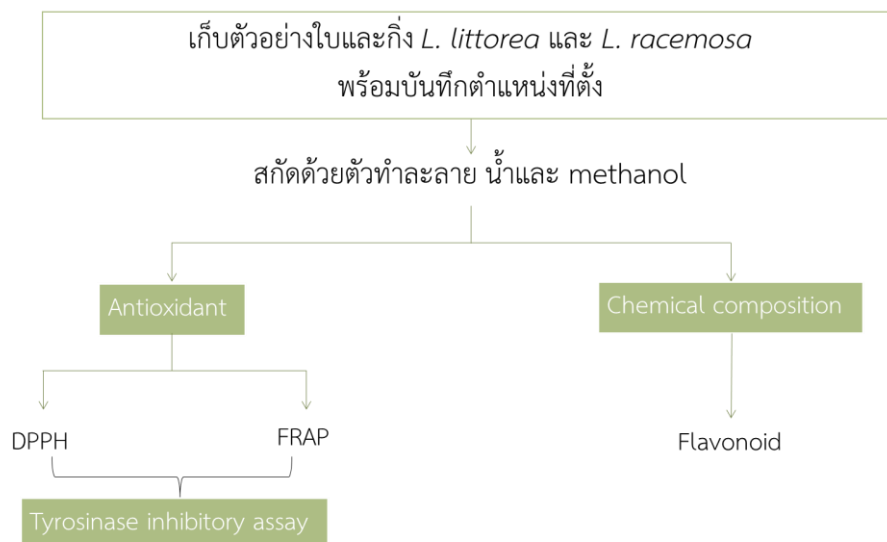
1.3.1 ฝัสดอกแดงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส มากกว่าฝัสดอกขาว

1.3.2 ตำแหน่งที่เกิดของต้นฝาดทำให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบข้อมูลการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของฝัสดอกแดงและฝัสดอกขาว รวมทั้งตำแหน่งที่เกิดตามธรรมชาติ

1.5 กรอบแนวคิด



1.6 นิยามศัพท์

ตำแหน่งในการเกิด : ตำแหน่งที่ตั้งที่แสดงระยะที่สิ่งใดสิ่งหนึ่งอยู่ห่างจากแกนอ้างอิงที่กำหนดไว้แล้ว โดยเป็นสิ่งที่ไม่ได้ถูกสร้างขึ้นโดยมนุษย์และรวมถึงการสร้างโดยมนุษย์ที่มีวัตถุประสงค์เพื่อฟื้นฟูป่าให้กลับมาอุดมสมบูรณ์

ตำแหน่งทะเล คือ ตำแหน่งของต้นฝาดที่ขึ้นอยู่ในบริเวณที่น้ำทะเลท่วมถึง

ตำแหน่งบก คือ ตำแหน่งของต้นฝาดที่ขึ้นอยู่ห่างจากบริเวณที่น้ำทะเลท่วมถึง

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

งานวิจัยเรื่องเปรียบเทียบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ด้านการอักเสบของฝาดดอกขาว และฝาดดอกแดง ผู้วิจัยทำการศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ดังนี้

2.1 ฝาด

2.2 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

2.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส: บทบาทของสารต้านอนุมูลอิสระในการทำให้ผิวขาว (Skin whitening)

2.1 ฝาด

สกุลฝาด (*Lumnitzera*) เป็นสกุลของไม้ป่าชายเลนในบริเวณอินโด-แปซิฟิกตะวันตก อยู่ในวงศ์ Combretaceae ชื่อสามัญในภาษาอังกฤษคือ black mangrove สกุลนี้มีสมาชิกสองชนิดที่สีดอกต่างกัน คือ ฝาดดอกแดง (*Lumnitzera littorea*, LL) มีดอกสีแดง ส่วนฝาดดอกขาว (*Lumnitzera racemose*, LR) มีดอกสีขาว พืชสามสกุลในวงศ์ Combretaceae, *Laguncularia*, *Conocarpus* และ *Lumnitzera* พบในป่าชายเลนแต่ *Lumnitzera* เป็นสกุลเดียวที่พบในป่าชายเลนแถบอินโด-แปซิฟิกตะวันตกจนถึงออสเตรเลีย (5)

2.1.1 ลักษณะโดยทั่วไปของพืช

1) ฝาดดอกขาว



รูปภาพที่ 1 ฝาดดอกขาว (6)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Lumnitzera racemosa* Willd. **ชื่อท้องถิ่น** ฝาดขาว (ภาคกลาง) กะลุง (ชุมพร) ขวด (สมุทรสาคร) ฝาด (ภาคกลาง ภาคใต้) ลำแพน ลำแพนหิน (ตราด) **ชื่อวงศ์** COMBRETACEAE **ลักษณะ** เป็นไม้ต้นขนาดเล็ก สูงถึง 8 เมตร มีลักษณะคล้ายกับฝาดดอกแดง แต่มีความแตกต่างที่โคนต้นจะไม่มีรากหายใจรูปเข่า ใบจะขึ้นกระจัดกระจายบนกิ่ง ส่วนดอกสีขาวไม่มีก้านดอก เกสรตัวผู้มีความยาวโดยเฉลี่ยเท่ากับ ความยาวของกลีบดอก **นิเวศวิทยา** ขึ้นอยู่ตามป่าชายเลน จะออกดอกช่วงระยะเวลาเดียวกันกับฝาดดอกแดง (6) และมีการกระจายมากกว่าฝาดดอกแดงมาก เป็นสายพันธุ์พื้นเมืองของ SE Kenya ถึง KwaZulu-Natal, W. Indian Ocean, Tropical & Subtropical Asia ถึง SW แปซิฟิก โดยจะครอบคลุมพื้นที่ Aldabra, Andaman Isand, Bangladesh, Borneo, Cambodia, Chagos Archipelago, China Southeast, Hainan, India, Jawa, Kenya, Korea, KwaZulu-Natal, Lesser Sunda Isand, Madagascar, Malaya, Maldives, Maluku, Mozambique, Myanmar, Nansei-shoto, New Caledonia, New Guinea, Nicobar Isand, Philippines, Seychelles, South China Sea, Sri Lanka, Sulawesi, Sumatera, Taiwan, Tanzania, Thailand, Vietnam (7)



รูปภาพที่ 2 การกระจายตัวของฝาดดอกขาว (7)

2) ฝาดดอกแดง



รูปภาพที่ 3 ฝาดดอกแดง (8)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Lumnitzera littorea* (Jack) Voigt ชื่อท้องถิ่น ตำเสาทะเล
 ชื่อวงศ์ COMBRETACEAE ลักษณะ เป็นไม้พุ่มหรือยืนต้นมีขนาดกลาง สูงได้ถึง 20
 เมตร เปลือกไม้สีน้ำตาลแตกเป็นร่องลึก มีรากช่วยหายใจรูปคล้ายเข่า ใบเป็นแบบเดี่ยว
 ออกใบหนาแน่นที่ปลายกิ่ง แผ่นใบหนาโคนใบรูปรีปลายใบกลมเว้าตื้นๆ ขอบใบหยัก
 มีต่อมขนาดเล็ก ก้านใบมีขนาดสั้น ดอกเป็นช่อที่ปลายกิ่ง นิเวศวิทยา เจริญเติบโตได้ดี
 ด้านในบริเวณป่าชายเลน ที่ดินร่วนๆที่มีความเค็ม มักพบเป็นกลุ่มบริเวณปากแม่น้ำที่เป็น
 ดินเลนแข็งหรือดินทราย ออกดอก และผลช่วงเดือนพฤศจิกายน และเมษายน (8) เป็น
 สายพันธุ์พื้นเมืองของ S. Hainan ไปจนถึงเขตร้อนเอเชียและ W. Pacific โดยจะ
 ครอบคลุมพื้นที่ Andaman Isand, Borneo, Cambodia, Caroline Isand, Fiji,
 Gilbert Isand, Hainan, India, Jawa, Lesser Sunda Isand, Malaya, Maldives,
 Maluku, Myanmar, New Guinea, Nicobar Isand, Philippines, Solomon Isand,
 Sri Lanka, Sulawesi, Sumatera, Thailand, Tonga, Tuvalu, Vanuatu, Vietnam
 (9)



รูปภาพที่ 4 การกระจายตัวของฝาดดอกแดง (9)

2.2 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

จากการทบทวนวรรณกรรมพบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของฝาด มีทั้งหมด 5 ฤทธิ์ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย, ฤทธิ์ต้านโรคเบาหวาน, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ต้านมะเร็ง และฤทธิ์ต้านการแข็งตัวของเลือด โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

2.2.1 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial)

ในปีค.ศ. 2020 มีการศึกษาการวิเคราะห์สารพฤกษเคมีที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และการต้านจุลชีพ ของพืชในป่าโกงกาง ได้แก่ *Suaeda nudiflora*, *Lumnitzera racemosa* (ฝาดดอกขาว), *Ipomoea tuba* และ *Avicennia alba* สารสกัดจากใบของฝาดดอกขาวแสดงถึงเขตยับยั้งการเจริญเชื้อที่สูงที่ความเข้มข้นสูงสุด (200 ไมโครกรัม) ต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* และมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ได้อย่างมีนัยสำคัญ สารสกัดอะซิโตนจากใบแสดงถึงเขตยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* แบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ สารสกัดเฮกเซนจากใบพบว่ามีประสิทธิภาพในการต้านจุลชีพน้อยที่สุดกับสารสกัดตัวทำละลายอื่น ๆ (10) และจากงานวิจัยประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากฝาดดอกแดง (*Lumnitzera littorea*) ต่อการยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio* sp. ในปีเดียวกัน สารสกัดหยาบจากเปลือกของฝาดดอกแดง จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* sp. ได้ดีมาก ขณะที่ในระดับความเข้มข้นเดียวกันของสารสกัดจากใบ กลับไม่แสดงผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย เมื่อทบทวนเอกสารพบว่าสารชีวภาพที่พืชสร้างขึ้น และละลายน้ำได้ดีคือแทนนิน (tannins) ซึ่งจัดเป็น

สารประกอบในกลุ่ม polyphenolic compound ชนิดละลายน้ำได้ (hydrolysable tannins) พบในเปลือกมากกว่าในใบ และรายงานที่ผ่านมามีรายงานว่าแทนนินสามารถใช้ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ (11) ก่อนหน้านี้นี้มีรายงานว่าสารสกัดเมทานอลจากใบของ *Lumnitzera littorea* แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจำพวก *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Escherichia coli* แต่จนถึงขณะนี้ยังไม่พบรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดใบ *Lumnitzera racemosa* ด้วยตัวทำละลายเมทานอล, อะซิโตน และเฮกเซน (12)

2.2.2 ฤทธิ์ต้านโรคเบาหวาน (antidiabetic)

Ranjana, B., et al. (2019). (13) เป็นการศึกษาเพื่อประเมินคุณสมบัติในการต้านโรคเบาหวาน จาก *Lumnitzera racemosa* (ฝาดดอกขาว) โดยการทดสอบใช้ส่วนของใบของต้นฝาดดอกขาว และตัวทำละลายในการสกัด คือ เมทานอล เอทานอล เอทิลอะซิเตท และอีเทอร์ ในการทดสอบหาฤทธิ์ต้านโรคเบาหวานในหลอดทดลองใช้การทดสอบการยับยั้ง α -amylase และ α -glucosidase และใช้ acarbose เป็นสารมาตรฐาน ผลการวิเคราะห์สารพฤกษเคมีที่อยู่ในต้นฝาดดอกขาวในตัวทำละลายสกัดเมทานอลพบสกัดสารพฤกษเคมีได้มากที่สุด ตามด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท เอทานอล และอีเทอร์ตามลำดับ โดยพบว่ามีสารพฤกษเคมีในต้นฝาดดอกขาว ได้แก่ ฟลาโวนอยด์, ซาโปนิน, น้ำมันหอมระเหย, อัลคาลอยด์, แอนทราควิโนน, ฟีนอล, ไตรเทอร์พีนอยด์, คูมาริน และแทนนิน มีศักยภาพในการต้านโรคเบาหวานอย่างมีนัยสำคัญ (13)

2.2.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

มีการศึกษาโดยวิเคราะห์สารพฤกษเคมีในการต้านอนุมูลอิสระ และการต้านจุลชีพ ของต้นป่าโกงกาง โดยเลือกใช้พันธุ์ต้นโกงกาง ได้แก่ *Suaeda nudiflora*, *Lumnitzera racemosa* (ฝาดดอกขาว), *Ipomoea tuba* และ *Avicennia alba* โดยจะกล่าวถึงฝาดดอกขาวเป็นหลัก ฝาดดอกขาวใช้ส่วนของใบในการสกัด และตัวทำละลายในการสกัดที่ใช้คือ เมทานอล ในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยใช้การทดสอบวิธี TLC พบว่าส่วนใบของต้นฝาดดอกขาวพบสารกลุ่ม carotenoids และสาร phenolic ตัวต่างๆ และการค้นพบสาร phenolic ในต้นฝาดดอกขาวจะเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีศักยภาพสูงสุดเมื่อเทียบกับพันธุ์ต้นโกงกางที่นำมาทดสอบ (10)

มีการศึกษาเกี่ยวกับการประเมินและองค์ประกอบของสารพฤกษเคมีที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง และฤทธิ์ต้านการแข็งตัวของเลือด ของสารสกัดจากราก *Acanthus ilicifolius* และสารสกัดจากใบ *Lumnitzera racemosa* (ฝาดดอกขาว) ของชายฝั่งตะวันออกเฉียงใต้ประเทศอินเดีย ในส่วนของใบฝาดดอกพบสารประกอบออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฟีนอล, ฟลาโวนอยด์, อัลคาลอยด์, เทอร์ปีนอยด์, สเตอรอล, แทนนิน, คาร์โบไฮเดรต, ไกลโคไซด์หัวใจ, ซาโปนิน และ quinones มีรายงานปริมาณสารฟีนอลิกที่พบทั้งหมดในฝาดดอกขาวมีส่วนช่วยในการต้านอนุมูลอิสระ และได้มีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH FRAP และ ABTS assay พบว่าในสารสกัดใบฝาดดอกขาวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (1)

มีการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในใบของพืช *Aegiceras corniculatum* (แสมแดง), *Excoecaria agallocha* (ตาตุ่มทะเล) และ *Lumnitzera racemosa* (ฝาดดอกขาว) ด้วยตัวทำละลาย methanol โดยใช้วิธี DPPH พบว่าสารสกัดฝาดดอกขาวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด รวมทั้งพบว่าฝาดดอกขาวมีปริมาณ Total phenolics สูงที่สุด เมื่อประเมินด้วยวิธี spectrophotometric (14)

มีการศึกษา “ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปส อะไมเลส และแอลฟา-กลูโคซิเดสของพืชสมุนไพรไทย” จากผลการทดลองฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยศึกษาฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระชนิด DPPH พบว่าในสารสกัดหยาดเมทานอลให้ผลการกำจัดอนุมูลอิสระได้ดีกว่า ในส่วนสารสกัดไดคลอโรมีเทนในพืชทั้งฝาดดอกขาว (*Lumnitzera racemosa*) และฝาดดอกแดง (*Lumnitzera littorea*) เนื่องจากเมทานอลเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูงกว่าไดคลอโรมีเทน (2)

2.2.4 ต้านโรคมะเร็ง (anticancer)

มีการศึกษาเกี่ยวกับการประเมิน และองค์ประกอบของสารพฤกษเคมีที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง และฤทธิ์ต้านการแข็งตัวของเลือด ของสารสกัดจากราก *Acanthus ilicifolius* (เหงือกปลาหมอ) และสารสกัดจากใบ *Lumnitzera racemosa* (ฝาดดอกขาว) ของชายฝั่งตะวันออกเฉียงใต้ประเทศอินเดีย ในส่วนของใบฝาดดอกขาวฤทธิ์ในการต้านโรคมะเร็ง ใช้วิธีทดสอบ MTT โดยดูความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (Hep G₂) พบว่าในสารสกัดของใบฝาดดอกขาวเมื่อมีความเข้มข้นที่สูงขึ้นจะสามารถสร้างความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (Hep G₂) ได้มากขึ้น เนื่องจากมีสารในการต้านอนุมูลอิสระที่เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดมะเร็งได้ (1)

2.2.5 ด้านการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant)

มีการศึกษาเกี่ยวกับการประเมิน และองค์ประกอบของสารพฤษเคมีที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง และฤทธิ์ด้านการแข็งตัวของเลือด ของสารสกัดจากราก *Acanthus ilicifolius* (เหงือกปลาหมอ) และสารสกัดจากใบ *Lumnitzera racemose* (ฝาดดอกขาว) ของชายฝั่งตะวันออกเฉียงใต้ประเทศอินเดีย ในส่วนของสารสกัดใบฝาดดอกขาวในฤทธิ์ด้านการแข็งตัวของเลือดใช้วิธีการทดสอบ PT และ APTT พบว่าใบฝาดดอกขาวมีฤทธิ์ในการต้านการแข็งตัวของเลือดแต่มีผลน้อยกว่าตัว *Acanthus ilicifolius* (1)

จากการทบทวนวรรณกรรมจะพบฤทธิ์ในฝาดดอกขาว 5 ฤทธิ์ คือ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย, ฤทธิ์ต้านโรคเบาหวาน, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ต้านโรคมะเร็ง และฤทธิ์ด้านการแข็งตัวของเลือด ในส่วนของฝาดดอกแดง จะพบฤทธิ์เพียงสองฤทธิ์ คือ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากการกระจายตัวของฝาดดอกแดงที่มีการกระจายตัวที่น้อยกว่าฝาดดอกขาว ทำให้มีการศึกษาฤทธิ์ในฝาดดอกขาวมากกว่าฝาดดอกแดง แต่ในประเทศไทยพบทั้งฝาดดอกขาว และฝาดดอกแดง และยังไม่มีการศึกษาที่ทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ระหว่างพืชทั้งสอง ทำให้ผู้วิจัยเห็นความสำคัญในการนำฝาดดอกขาว และฝาดดอกแดงมาเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของฝาดดอกขาว และฝาดดอกแดงจากการทบทวนวรรณกรรม

ชื่อผู้แต่ง	ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	ชื่อพืช	ส่วนของพืช	ตัวทำละลาย	สารที่พบ
Antibacterial					
Eswaraiah G, 2020	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>L. racemosa</i>	ใบ	Hexane, Acetone	Terpenoid
จีรวิมล เลิศสุทธิवाल, 2009	<i>Vibrio sp.</i>	<i>L. littorea</i>	เปลือก	น้ำ	Tannins
Saad S, 2011	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> และ <i>Escherichia coli</i>	<i>L. littorea</i>	ใบ	methanol	alkaloids, steroids, triterpenoids, flavonoids
Antidiabetic					
Ranjana, 2019	α -amylase, α -glucosidase	<i>L. racemosa</i>		Methanol > Ethyl Acetate > ethanol > ethers	flavonoid, saponin, น้ำมันหอมระเหย, Alkaloids, anthraquinones, phenol, triterpenoid, coumarin, tannin

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของฝาดดอกขาว และฝาดดอกแดงจากการทบทวนวรรณกรรม (ต่อ)

ชื่อผู้แต่ง	Assay	ชื่อพืช	ส่วนของพืช	ตัวทำละลาย	สารที่พบ
Anticancer					
Paul T, 2017	MTT	<i>L. racemosa</i>	ใบ	DSMO	Total phenolics
Anticoagulant					
Paul T, 2017	PT, APTT	<i>L. racemosa</i>	ใบ	น้ำ	
Antioxidant					
Eswaraiah G, 2020	DPPH	<i>L. racemosa</i>	ใบ	methanol	carotenoids, phenolic
Paul T, 2017	DPPH, ABTS, FRAP	<i>L. racemosa</i>	ใบ		Phenols, flavonoids, alkaloids, Terpenoids, sterols, tannins, carbohydrates, cardiac glycosides, saponins, and quinones.
Ark R, 2016	DPPH	<i>L. racemosa</i>	ใบ	methanol	Total phenolics
ชุตินา แก้วพิบูลย์, 2018	DPPH	<i>L. racemosa</i> <i>L. littorea</i>		methanol	Phenolic

2.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส: บทบาทของสารต้านอนุมูลอิสระในการทำให้ผิวขาว (Skin whitening)

2.3.1 อนุมูลอิสระ

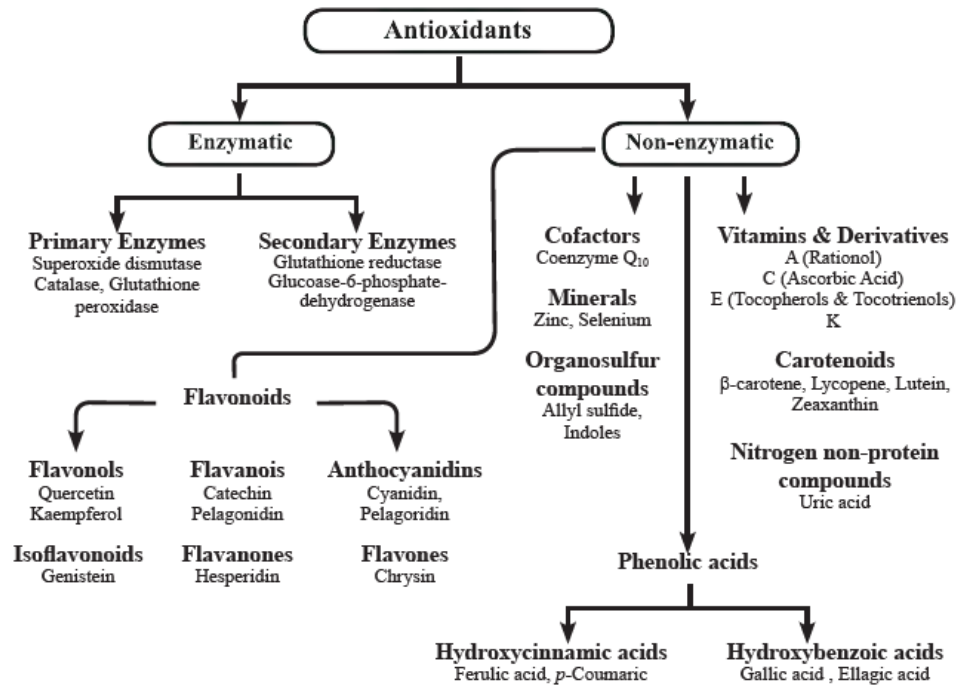
อนุมูลอิสระ (free radical) หมายถึง อะตอมหรือโมเลกุลที่มี unpaired electron อย่างน้อย 1 electron เกิดขึ้นได้เมื่อพันธะระหว่างอะตอมแตกออก อนุมูลอิสระนั้นไม่เสถียรและไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลข้างเคียงเพื่อทำให้ตัวเองเสถียรขึ้น ผลที่ตามมาคือโมเลกุลข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ ซึ่งจะเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นต่อไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) สารที่มีความสามารถในการ oxidized สารชีวโมเลกุลในร่างกายเรียกว่า Reactive species (RS) ซึ่งส่วนใหญ่แล้วจะอยู่ในรูปของ reactive oxygen species (ROS) เมื่อโมเลกุลของ oxygen รับ electron จากโมเลกุลอื่น เช่น โลหะหนัก (Fe, Cu) หรือ lipid free radical จะเกิดเป็น superoxide radical anion ซึ่งเป็น oxidizing agent ที่แรงกว่า oxygen และพร้อมที่จะเปลี่ยนไปเป็น hydrogen peroxide และ hydroxyl radical ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อโมเลกุล oxygen ถูกกระตุ้นด้วยแสง UV จะเกิดเป็น singlet oxygen ซึ่งเป็น oxidizing agent ที่แรงกว่า superoxide radical anion อีกด้วย จะเห็นได้ว่า ROS เหล่านี้เกิดปฏิกิริยาได้ง่าย และนำไปสู่การเกิดผลิตภัณฑ์สุดท้ายในการเกิดปฏิกิริยาของ ROS คือ น้ำ (H_2O) เนื่องจากน้ำไม่เป็นพิษต่อเซลล์ซึ่งเป็นการป้องกันตัวเองของระบบการทำงานภายในเซลล์ ROS นั้นเกิดจากการเผาผลาญอาหาร สารต่างๆ กระบวนการสร้างพลังงาน การหายใจระดับเซลล์ รวมไปถึงเกิดขึ้นในกลไกการป้องกันตัวเองของร่างกายจากเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ หากร่างกายมีกระบวนการดังกล่าวที่มากเกินไป หรือการที่ร่างกายขาดสารต้านอนุมูลอิสระจะทำให้มีการสะสมของ ROS มากขึ้น และทำให้เกิดภาวะ oxidative stress ขึ้นได้ ภาวะ oxidative stress นั้นหากเกิดขึ้นในระยะเวลสั้นๆ เพียงชั่วขณะนั้นจะไม่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพมากนัก แต่หากเกิดภาวะดังกล่าวเป็นเวลานานจะทำให้มีความเสี่ยงที่จะมีผลไปทำลายเนื้อเยื่อต่างๆ และจะนำไปสู่โรคในหลายระบบ รวมไปถึงมีผลต่อความยืดหยุ่นของผิวหนัง อนุมูลอิสระนอกจากจะเกิดภายในสิ่งมีชีวิตสามารถเกิดจากภายนอกสิ่งมีชีวิตหรือในสิ่งแวดล้อม เช่น การได้รับเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรีย โรคเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกัน จากรังสี หรือฝุ่นจากการประกอบอาหาร (15)

2.3.2 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระคือ สารที่ช่วยยับยั้งหรือชะลอปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งเป็นปฏิกิริยาเคมีที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระในร่างกาย สามารถช่วยลดความเป็นพิษของสารพิษที่ร่างกายได้รับและช่วยลดการทำลายเซลล์จากอนุมูลอิสระ จึงช่วยชะลอความทรุดโทรมของร่างกาย และป้องกันการเปลี่ยนแปลงเซลล์ปกติไปเป็นเซลล์มะเร็ง

2.3.2.1 ชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระที่มีการนำมาใช้ในปัจจุบัน มีทั้งสารที่ได้จากธรรมชาติ และสารสังเคราะห์ มีลักษณะ 2 แบบ



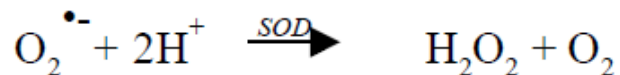
รูปภาพที่ 5 สารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากธรรมชาติ และสารสังเคราะห์ (16)

1) Enzymatic สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในร่างกาย และจัดเป็นเอนไซม์ (3)

(1) Primary enzymatic: superoxide dismutase (SOD), catalases and glutathione peroxidase (GPX)

ก. เอนไซม์ superoxide dismutase, SOD

ทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระเริ่มต้นที่เกิดขึ้นในร่างกาย
คือ ซุปเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน $O_2^{\bullet-}$ โดยเปลี่ยนอนุมูล $O_2^{\bullet-}$
ให้เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ดังสมการ



รูปภาพที่ 6 เอนไซม์ superoxide dismutase, SOD (3)

ข. เอนไซม์ catalases

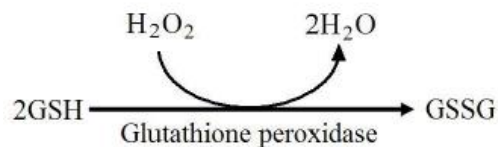
ทำหน้าที่เปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นน้ำและ
ออกซิเจน ดังสมการ



รูปภาพที่ 7 เอนไซม์ superoxide dismutase, SOD (3)

ค. เอนไซม์ glutathione peroxidase (GPX)

ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยารีดักชันของสารประกอบ
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ได้แก่ ลิพิดเปอร์ออกไซด์ และ
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยที่กลูตาไธโอนร่วมในปฏิกิริยา
เอนไซม์ชนิดนี้ช่วยป้องกันเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมไม่ให้
ถูกทำลายหรือเสียหายจากภาวะที่ร่างกายถูกออกซิไดซ์หรือมี
อนุมูลอิสระมากเกินไป



รูปภาพที่ 8 เอนไซม์ glutathione peroxidase (GPX) (3)

(2) Secondary enzymatic: glutathione reductase, glucose-6-phosphatedehydrogenase

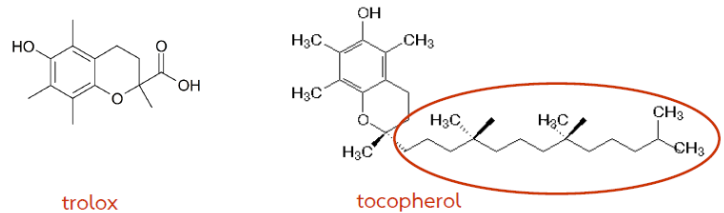
2) Non-enzymatic สารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ได้ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ (3)

(1) Vitamin E

วิตามินอีไม่ใช่สารเดี่ยวแต่เป็นกลุ่มสาร ซึ่งจำแนกออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ tocopherol และ tocotrienol วิตามินอีตัวที่สำคัญและมีประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดคือ d-alpha tocopherol

(2) Trolox

Trolox เป็นอนุพันธ์ของวิตามินอีที่ดัดแปลงโครงสร้างโดยการเปลี่ยนแปลงสายอัลเคนให้เป็นหมู่คาร์บอกซิลิก ทำให้สามารถละลายน้ำได้ดีขึ้นจึงทำให้ออกฤทธิ์ได้เร็วกว่าวิตามินอี ซึ่งในการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนิยมใช้ trolox เป็นสารมาตรฐาน



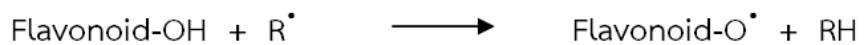
รูปภาพที่ 9 อนุพันธ์ของวิตามินอี (3)

3) Flavonoids

กลไกหลักในการออกฤทธิ์ของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์รวมถึงสารกลุ่มโพลีฟีนอลมี 3 กลไก ได้แก่

(1) เป็นสารคีเลต

(2) หยุดปฏิกิริยาถูกใช้ในการกำจัดอนุมูลอิสระ เช่น lipid alkoxyalkoxy และ peroxy radicals เป็นต้น โดยทำหน้าที่เป็นตัวให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูลเหล่านั้น ดังสมการ



รูปภาพที่ 10 กลไกหลักในการออกฤทธิ์ของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์

หยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ในการกำจัดอนุมูลอิสระ (3)

(3) ทำหน้าที่ regenerates วิตามินอี

โดยจะรีดิวซ์อนุมูล alpha tocopheral กลับเป็น alpha tocopheral เหมือนเดิม เพื่อให้สามารถทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระต่อไปได้

ดังสมการ



รูปภาพที่ 11 กลไกหลักในการออกฤทธิ์ของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์
ทำหน้าที่ regenerates วิตามินอี (3)

2.3.2.2 หน้าที่การทำงานและกลไกของสารต้านอนุมูลอิสระ

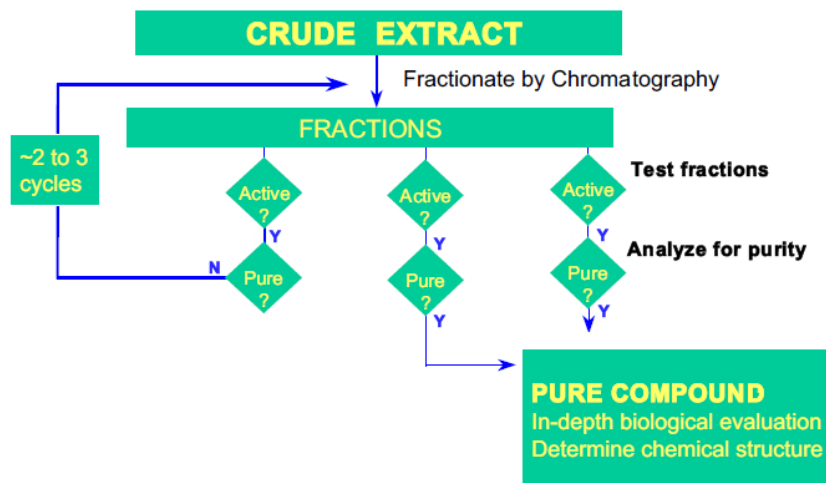
สารต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งตามกลไกการยับยั้งได้เป็น 3 ชนิด คือ

1) Preventive anti-oxidant ป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ สารตัวอย่างที่พบตามธรรมชาติ เช่น Vitamin C, Vitamin E, alpha-tocopherol, Vitamin A, carotenes, ubiquinones และ ubiquinol (17)

2) Scavenging anti-oxidant ทำลายหรือยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น สารตัวอย่างที่พบตามธรรมชาติ เช่น vitamin E, Vitamin C, catechin, curcumin, ellagic acid, gallic acid, malvidin, quercetin, resveratrol, rosmarinic acid รวมทั้ง phenolic compounds (18) ซึ่งเป็นสารที่พบมากในพืชผักดอกขาว (1)

3) Chain breaking anti-oxidant ทำให้ลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระสิ้นสุดลง หรือการช่วยชะลอการเกิดออกซิเดชัน ซึ่งเป็นตัวทำให้แก่เร็ว เกิดริ้วรอยมากขึ้น และเจ็บป่วยได้ง่าย สารตัวอย่างที่พบตามธรรมชาติ เช่น Vitamin E และ beta-carotene (17)

2.3.2.3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (Screening for bioactive metabolites)



รูปภาพที่ 12 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (3)

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพใช้วิธี Bioassay-guided fraction นำมาใช้ในการแยกสารโดยอาศัยฤทธิ์ทางชีวภาพในการแยกสาร โดยสารสกัดหยาบจะอาศัยกระบวนการทาง chromatography เพื่อให้ได้ออกมาเป็น fraction หลังจากนั้นนำ fraction ที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพว่ามีฤทธิ์หรือไม่ หากมีฤทธิ์จึงทำซ้ำเพื่อให้ได้ pure compound โดยวิธีการทดสอบมี 2 วิธีการหลัก (3)

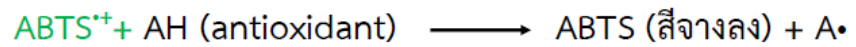
- 1) Primary screening assays เป็นการทดสอบเบื้องต้น ไม่ต้องอาศัยความเชี่ยวชาญ องค์ประกอบไม่ยุ่งยาก สามารถทำได้ง่าย
- 2) Specialized screening assays ใช้องค์ประกอบเยอะ ต้องอาศัยความเชี่ยวชาญ

2.3.2.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activities)

การวัดความสามารถโดยรวมในการต้านอนุมูลอิสระหรือต้านออกซิเดชัน (total antioxidation capacity, TAC) เป็นการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างประเภทต่างๆ วิธีที่นิยมได้แก่ (19)

- 1) ABTS radical scavenging assay
 - (1) Indirect method
 - (2) Basic principle: ABTS oxidized ด้วย potassium persulfate ได้เป็น radical cation form $ABTS^{\bullet+}$ (greenish blue) ถูก reduction of

ABTS^{•+} by antioxidant ผลทดสอบ คือ สีเขียว-น้ำเงินจางลง หรือสารละลายไม่มีสี

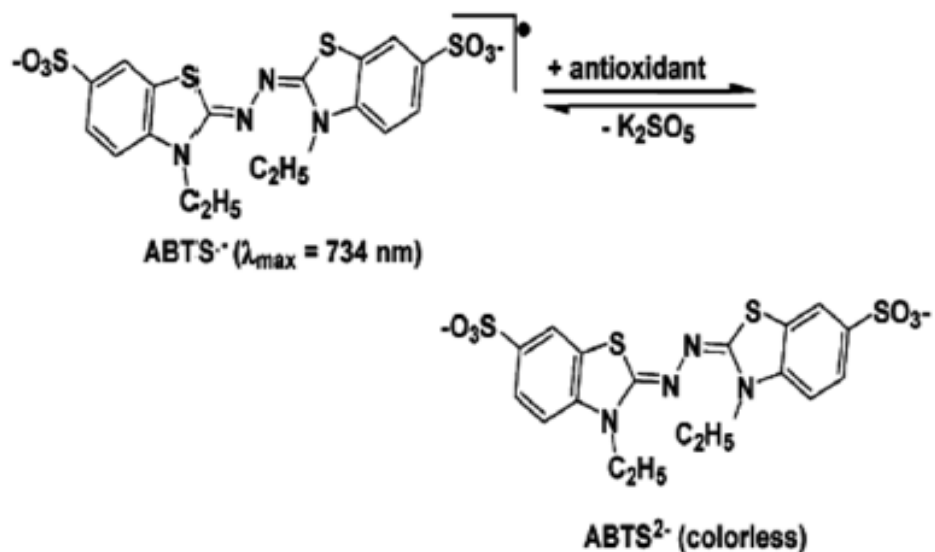


รูปภาพที่ 13 ABTS radical scavenging assay (3)

เป็นสารสังเคราะห์ที่มีสีเขียวปนน้ำเงินสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร

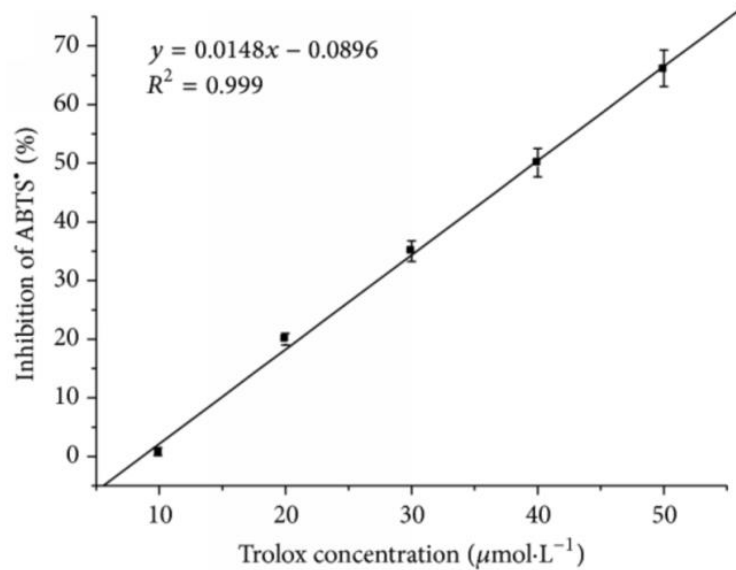
(3) Positive control: Trolox, Ascorbic acid

(4) ลักษณะปฏิกิริยา;



รูปภาพที่ 14 Reaction for ABTS assay (3)

(5) การรายงานผล; mg TEAC/g คือ สารที่วิเคราะห์ 1 g มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับที่ mg ของ Trolox หรือ mg VCEC/g คือสารที่วิเคราะห์ 1 g มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับที่ mg ของ Ascorbic acid

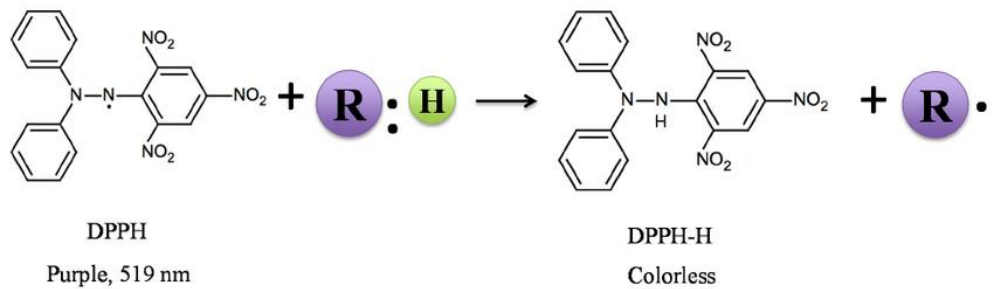


รูปภาพที่ 15 A representative calibration curve of ABTS•+ inhibition by Trolox standards (20)

วัดค่าการดูดกลืนแสงหลังการวิเคราะห์ และคำนวณออกมาเป็น % Inhibition ทำการ Plot กราฟเพื่อทำกราฟมาตรฐาน หาสมการเส้นตรง หา % Inhibition ของสารที่ต้องการวัดเทียบกับ Standard curve ได้เป็นความเข้มข้นออกมา

2) DPPH radical scavenging capacity assay

(1) Basic principle: DPPH เป็น radical ที่มีความคงตัว (DPPH•) ทำการรับ e^- จาก anti-oxidant ได้ออกมาเป็น reduced form (DPPH-H) จากสีม่วงเป็นสีเหลือง ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

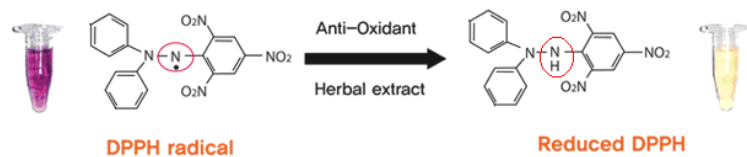


R• represents antioxidant

รูปภาพที่ 16 Reaction mechanism of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) with antioxidant (21)

(2) Positive control: Trolox, Ascorbic acid

(3) ลักษณะปฏิกิริยา;



รูปภาพที่ 17 Reaction for DPPH assay (22)

(4) การรายงานผล;

ผลการทดสอบ คือ ถ้ามีฤทธิ์ anti-oxidant สีม่วงจะจางลง และถ้ามีฤทธิ์ anti-oxidant มากขึ้น จะกลายเป็นสีเหลือง

(5) วิธีการทดลอง;

20 μ L of sample + 180 μ L of DPPH in Ethanol
 (0.0066%w/v) ลงใน 96 well-plate Incubate ในที่มืด 30 นาที
 สีจะเปลี่ยนไป นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

DPPH solution = negative control

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_c - A_s) / A_c] * 100$$

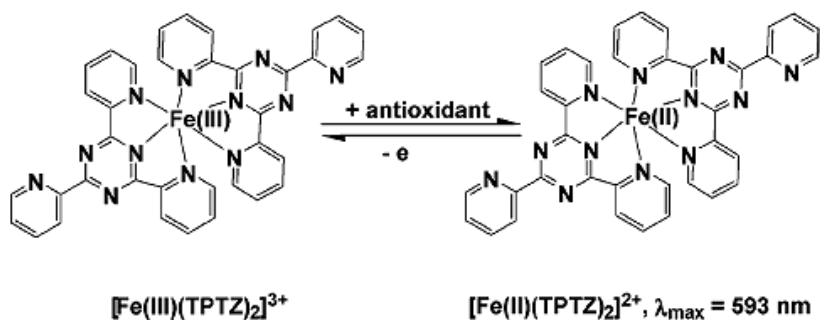
โดย A_c = ค่าการดูดกลืนแสงของ control

A_s = ค่าการดูดกลืนแสงของ sample

3) FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

(1) Basic principle: Fe^{3+} จะถูก reduced ให้เป็น Fe^{2+} เปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็นสีน้ำเงิน

(2) ลักษณะปฏิกิริยา;



รูปภาพที่ 18 Reaction for FRAP assay (23)

(3) การรายงานผล;

รายงานผลเป็น μM ของ ferrous ที่ equivalent กับ Fe^{2+} ต่อ 1 g ของ sample

(4) วิธีการทดลอง;

200 μL of sample + 3 mL FRAP reagent ใส่ลงใน test tube แล้วนำไป vortex Blank sample ถูกเตรียมในเมทานอล และ DI water Incubate ใน water bath เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร Aqueous solution of $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ เป็น Standard curve

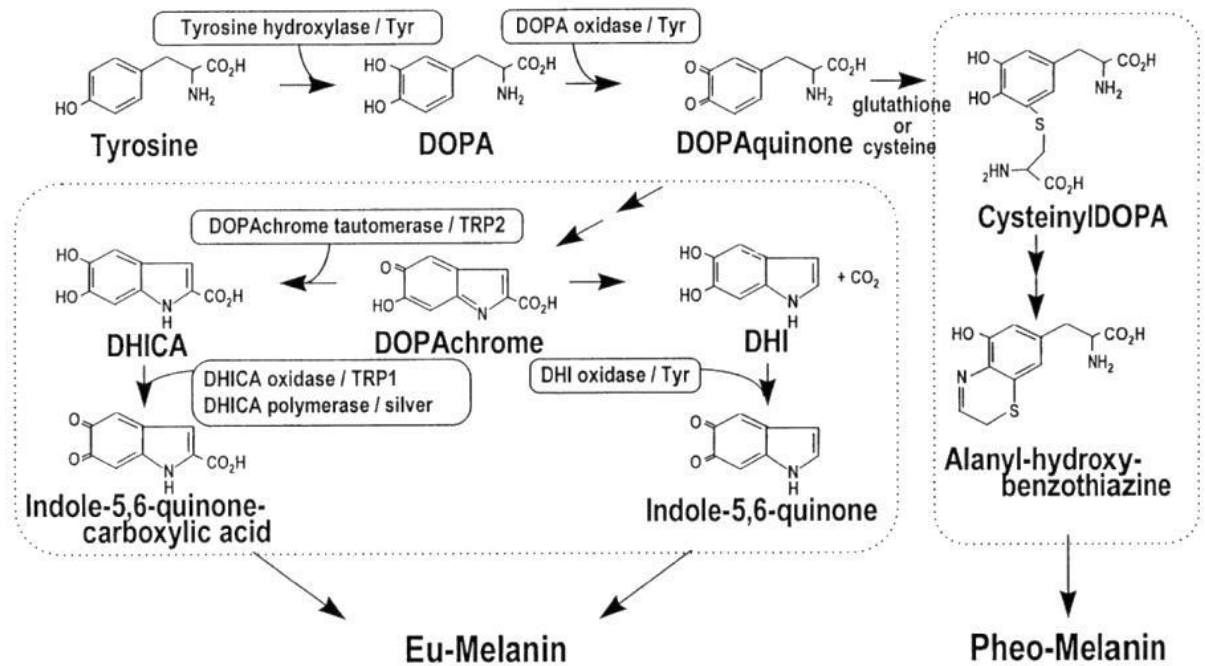
2.3.3 กระบวนการสร้างเมลานิน

Melanocytes เป็นเซลล์ dendritic ทำหน้าที่ผลิตเมลานินที่เป็นเม็ดสีผิว ส่วนใหญ่พบที่ผิว เส้นผม ดวงตาและผิวหนัง มีบทบาทสำคัญในการปกป้องเซลล์ผิวจากรังสี UV โดยเมลานินถูกผลิตและเก็บไว้ในถุง melanosome (24)

เมลานินมี 2 ชนิด คือ eumelanin ซึ่งเป็นสีน้ำตาลหรือดำ และ pheomelanin สีเหลืองหรือแดง eumelanin สามารถป้องกันเซลล์จากรังสี UV ได้มากกว่า โดยเชื่อชาติจะเป็นตัวกำหนดการสร้าง eumelanin และ pheomelanin โดยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเมลานินคือ (24)

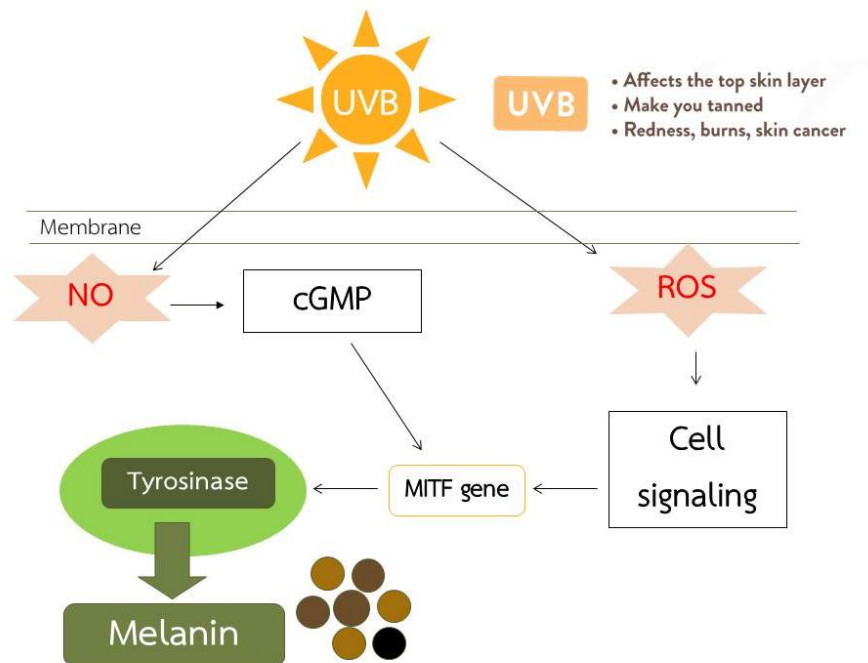
- 1) Tyrosinase (Tyr) มีบทบาทสำคัญในระยะแรกของการสังเคราะห์เมลานิน
- 2) tyrosinase - related protein 1 (Tyrp1)
- 3) tyrosinase - related protein 2 (Tyrp2)

กระบวนการสร้างเมลานินแบ่งออกเป็น 2 ระยะ ในระยะแรก tyrosine หรือ dihydroxy phenylalanine (DOPA) ถูกเปลี่ยนไปเป็น dopaquinone โดยปฏิกิริยา oxidation ซึ่งมีเอนไซม์ tyrosinase (TYR) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา dopaquinone ที่สร้างขึ้นนี้จะถูกเปลี่ยนไปเป็น dopachrome ได้ด้วยปฏิกิริยา cyclization โดยหมู่ NH จะทำหน้าที่เป็น nucleophile ได้เป็น leucodopachrome ซึ่งจะถูกรีดออกซิไดซ์ (oxidized) ต่อไปให้ dopachrome ส่วนในระยะที่สอง dopachrome ที่เกิดขึ้นสูญเสีย CO, แล้วถูกเปลี่ยนเป็น 5,6-dihydroxyindole (DHI) และต่อไปเป็น 5,6-indolequinone (IQ) ในอีกทางหนึ่ง dopachrome อาจเกิดปฏิกิริยา tautomerization ได้เป็น 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็น indole-2-carboxylic acid-5,6-quinone (ICAQ) โครงสร้าง IQ และ ICAQ จัดเป็นหน่วยย่อย ซึ่งเมื่อเกิดปฏิกิริยา polymerization ต่อไปได้เป็น eumelanin ที่มีสีดำหรือน้ำตาล ในกระบวนการสร้าง pheomelanin นั้น หลังจาก tyrosine หรือ DOPA ถูกเปลี่ยนเป็น dopaquinone แล้วจะเกิดปฏิกิริยากับหมู่ SH ของ cysteine (Cys) หรือ glutathione ได้เป็น cysteinyl-dopa จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยา cyclization และ decarboxylation ได้เป็น 5-hydroxy-1,4-benzothiazinylalanine (HBTA) ซึ่งต่อมาเกิดปฏิกิริยา polymerization ได้เป็น pheomelanin ซึ่งมีสีเหลืองแดง กระบวนการสร้างเม็ดสีทั้งหมดนี้เกิดในส่วน melanosome และเม็ดสีที่ถูกผลิตขึ้นนี้จะถูกส่ง หรือขนย้ายไปยังเซลล์ keratinocyte ด้วย melanosome dendrites (24)



รูปภาพที่ 19 กระบวนการสร้าง melanin (25)

การสร้างเอนไซม์ไทโรซิเนสเพื่อสังเคราะห์เมลานินที่ผิวหนัง สามารถถูกกระตุ้น reactive species ได้แก่ ROS และ NO (RNS) ซึ่งการสังเคราะห์เมลานินของผิวหนังจะเกี่ยวข้องกับ MITF เนื่องจากเป็นยีนที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ไทโรซิเนส หากมีปริมาณยีนนี้มาก จะส่งผลให้มีการผลิตเอนไซม์ไทโรซิเนสมากขึ้น โดย ROS จะทำให้เกิดการส่งสัญญาณภายในเซลล์ (cell signaling pathway) เหนี่ยวนำให้ MITF เพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มากขึ้น ในขณะที่ NO (RNS) แสดงให้เห็นถึงการทำงานที่เพิ่มขึ้นของเอนไซม์ไทโรซิเนส และการเพิ่มขึ้นของ cyclic guanosine monophosphate (cGMP) โดยมีการตั้งสมมติฐานว่า cGMP จะกระตุ้น protein kinase G (PKG) ทำให้เกิดการสร้าง MITF ปริมาณมากในเซลล์เมลานोไซต์ จึงทำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มากขึ้น



รูปภาพที่ 20 กระบวนการสร้างเอนไซม์ไทโรซิเนส(25)

2.3.3.1 ผลของสารต้านอนุมูลอิสระต่อเอนไซม์ไทโรซิเนส

ได้มีการศึกษากลไกการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยแบ่งประเภทการยับยั้งเอนไซม์เป็น 2 กลไก คือ ตามลักษณะของสารประกอบ และตามกลไกการยับยั้งเอนไซม์ (26)

1) กลไกการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ตามลักษณะของสารประกอบ

(1) Specific tyrosinase inactivators (suicide substrates) สารเกิดพันธะกับ covalent กับเอนไซม์ไทโรซิเนส จึงทำให้เอนไซม์เสียสภาพไม่สามารถทำงานได้

(2) Specific tyrosinase inhibitor สารประกอบที่จับเอนไซม์ไทโรซิเนส แบบผันกลับได้ทำให้ลดความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนส

2) กลไกการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ตามกลไกการยับยั้งเอนไซม์

(1) Competitive inhibitor คือสารที่ไปจับเอนไซม์ เพื่อไม่ให้สารตั้งต้นไปจับกับเอนไซม์ที่ active site ที่เดียวกันกับ inhibitor สารที่พบได้ใน

ธรรมชาติ เช่น สารกลุ่ม flavone ที่ได้จากส่วนเปลือกของลำต้นของต้น *Morus lhou* (S.) ได้แก่ mormin, cyclomorusin, kuwanon C และ norartocarpetin (26), Kojic acid ที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ monophenolase ของ mushroom tyrosinase (27)

(2) Uncompetitive inhibitor คือสารที่ไปจับ enzyme-substrate complex โดย สารที่พบได้ในธรรมชาติ เช่น bi-pyridine derivatives, two thiadiazole derivatives barbarine, chlorocinnamic acids, propanoic acid, some N-(mono-or dihydroxy benzyl)-N-nitrosohydroxylamines และ p-alkylbenzaldehydes (26)

(3) Mixed type inhibitor คือสารที่จับเอนไซม์ที่ตำแหน่งออกฤทธิ์ และสามารถจับกับ Enzyme-substrate complex ได้โดยมี equilibrium binding constants ในการจับต่างกัน สารที่พบได้ในธรรมชาติ เช่น Kojic acid ที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ diphenolase ของ mushroom tyrosinase (27), Phthalic acid and cinnamic acid hydroxypyridinone derivatives ที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ monophenolase (26)

(4) Non-competitive inhibitor คือสารที่จับเอนไซม์แบบอิสระ และสามารถจับกับ Enzyme-substrate complex ได้โดยมี equilibrium binding constants ในการจับเหมือนกัน และศึกษาสารในธรรมชาติที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส สารที่พบได้ในธรรมชาติ เช่น Flavonoids, Coumarins, Chalcones, Phenolic acid, Terpenoid derivative, Quinone derivatives, Azole, Xanthate, Hydroxyflavones รวมทั้ง trisin และ thysal derivatives (26)

บทที่ 3

ระเบียบและวิธีวิจัย

3.1 พืชตัวอย่างและการสกัด

3.1.1 การเตรียมพืชตัวอย่าง

ฝาดดอกแดง (*Lumnitzera littorea*, LL) และฝาดดอกขาว (*Lumnitzera racemose*, LR) โดยเก็บส่วนกิ่ง (branch) และใบ (leaf) เก็บตัวอย่างในวันที่ 8 กุมภาพันธ์ 2563 เก็บที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดจันทบุรี

3.1.2 การเตรียมสารสกัดพืชตัวอย่าง

นำตัวอย่างพืชฝาดดอกแดง และฝาดดอกขาวที่เก็บได้มาตากให้แห้ง แล้วอบต่อที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาบดลดให้มีขนาดเล็ก นำส่วนที่บดลดขนาดมา 100 กรัม สกัดด้วยตัวทำละลาย 30% เมทานอล 200 มิลลิลิตร โดยวิธีการแช่หมัก (Maceration) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เหย้าโดยใช้เครื่อง Horizontal Shakers หลังจากนั้นนำมาสกัดต่อด้วยเครื่อง Sonicator bath เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วทำการกรองสารละลาย โดยใช้การกรองด้วยสุญญากาศ นำสารที่กรองได้ไประเหยด้วยเครื่อง Rotary evaporator ขุดสารนำมาระเหยให้แห้งด้วย water bath เก็บรักษาสารสกัดในภาชนะปิดสนิทที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตลอดการทดลอง

3.2 การเก็บข้อมูลทางภูมิศาสตร์ของแหล่งกำเนิดตามธรรมชาติ

มีการเก็บข้อมูลตำแหน่งของพืชตัวอย่างจาก GPS เป็นเครื่องมือหาตำแหน่งพิกัดภูมิศาสตร์บนพื้นผิวโลกโดยอาศัยสัญญาณอ้างอิงจากระบบดาวเทียม ได้รับความอนุเคราะห์ข้อมูลจากโครงการวิจัยทุนรัฐบาลญี่ปุ่น Grant-in-aid ร่วมกับ Kumamoto University ภายใต้ความร่วมมือของ Prof. Takashi Watanabe และ ญ.ดร.ภัทรวดี ศรีคุณ เพื่อเก็บข้อมูลลักษณะทางกายภาพอื่น ๆ เช่น พื้นที่ที่น้ำทะเลท่วมถึง เป็นการบันทึกของนักวิจัย และมีการเก็บค่า pH และความชื้น ที่ดำเนินการในช่วงเดือนกุมภาพันธ์

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การทดสอบกลุ่มสารทางเคมี

3.3.1.1 การทดสอบหาสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิก เป็นสารที่พบได้ในพืชซึ่งปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก ในอาหาร และเครื่องดื่มที่มาจากพืชผัก และผลไม้จะแตกต่างกันออกไปตามชนิดของพืช สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารประกอบที่เป็นวงแหวนอะโรมาติก และมีหมู่ไฮดรอกซิล อย่างน้อย 1 หมู่ รวมไปถึงอนุพันธ์ของสารประกอบฟีนอล ซึ่งมีการแทนที่ด้วยหมู่ ฟังก์ชันต่างๆ เช่น ฟลาโวนอยด์ ลิกนิน กรดซินนามิก และโคเอ็นไซม์คิว เป็นต้น สารประกอบกลุ่มฟีนอลิกสามารถตรวจสอบได้โดยอาศัยปฏิกิริยาทางเคมีได้หลายวิธี ซึ่ง ในงานวิจัยเลือก Ferric chloride test เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการตรวจสอบ สารประกอบกลุ่มฟีนอลิก มีขั้นตอนในการทดลองที่สะดวก ง่าย รวดเร็ว และใช้ งบประมาณในการทดลองน้อย แต่มีข้อจำกัดคือไม่สามารถระบุกลุ่มสารที่ออกฤทธิ์อย่าง จำเพาะได้ หากมีสารกลุ่มฟีนอลิกอื่นๆ เช่น flavonoid, tannin, coumarin และ xanthones ก็จะทำให้ผลบวกเช่นกัน ซึ่งงานวิจัยเพียงทดลองเพื่อตรวจสอบว่าสารสกัดมี สารประกอบกลุ่มฟีนอลิกหรือไม่ Ferric chloride test จึงเพียงพอที่จะตอบคำถาม งานวิจัย และเพียงพอต่อจำนวนสารสกัด หากต้องการทราบผลการทดสอบหา สารประกอบกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่จำเพาะต่อกลุ่มสารมากขึ้น สามารถทำการทดสอบด้วย วิธีอื่นๆ เพิ่มเติมได้ เช่น Shinoda's reaction หรือ Cyaniding test, Pew test และ Molisch's test สำหรับ Ferric chloride test ผลบวกของการทดสอบ คือ สีของสาร สกัดเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน เขียว น้ำตาล หรือสีดำ วิธีการทดสอบดัดแปลงมาจากวิธีของ Evans, WC. (28) โดยการนำสารสกัดความเข้มข้น 100 mg/ml ปิเปตสารสกัดลงใน หลอดทดลอง หลอดละ 500 μ l หลอดที่ 1 เป็น Blank, หลอดที่ 2 เป็นหลอดที่เติม สารละลาย FeCl_3 หลังจากนั้นค่อย ๆ หยดสารละลาย FeCl_3 T.S. 1-2 หยด ให้ไหลลง ข้างหลอดทดลองที่มีสารสกัด สังเกตผลโดยไม่ต้องเขย่าหลอดทดลอง (28)

ในงานวิจัยไม่ได้ทำการทดลองหา Total flavonoid เพื่อหาปริมาณ ฟลาโวนอยด์รวม เนื่องจากว่าสารสกัดไม่เพียงพอต่อการทดลอง

3.3.2 การทดสอบหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

การทดสอบหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีวิธีวิเคราะห์หลายวิธี ได้แก่ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS, การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ในงานวิจัยเลือก FRAP assay และ DPPH assay เนื่องจากว่าเป็นวิธีวิเคราะห์ที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว ไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ ใช้เวลาน้อยในการทดลอง นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ

3.3.2.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

ในการวิเคราะห์ด้วย Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay เป็นการวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการให้อิเล็กตรอนแก่สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระ ตรวจวัดการเปลี่ยนสีเมื่อสารอนุมูลอิสระนั้นได้รับอิเล็กตรอนระดับของสีที่เปลี่ยนไปมีความสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ ดัดแปลงมาจากวิธีของ molecule (2016) (29) โดยปีเปตสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลาย FRAP reagent 190 ไมโครลิตร เก็บในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยเครื่อง Microplate reader (นำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง โดยอาศัยการคำนวณจากสมการมาตรฐาน Trolox ซึ่งค่าที่ได้แสดงเป็น mg TE / g extract

3.3.2.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

ในการวิเคราะห์คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity assay ดัดแปลงมาจากวิธีของ Journal of Natural Remedies. (2016) (30) นำสารสกัดที่สกัดได้มา 20 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย DPPH 180 ไมโครลิตร ลงในสารสกัดและเขย่าแรงๆให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยมีสารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้เป็น positive control คือ Standard Trolox ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้งจากนั้นนำไปคำนวณ % radical scavenging effect ต่อจากนั้นนำสารสกัดที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในการทำ DPPH ดีที่สุดไปทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการต้านอนุมูลอิสระร้อยละ 50 (IC_{50}) จากผลการทดลองที่ได้ คำนวณหา % radical scavenging effect จากสมการ

$$\% \text{ radical scavenging effect} = [A_{\text{control}} - A_{\text{sample}} / A_{\text{control}}] \times 100$$

โดย A_{sample} คือค่าดูดกลืนแสงของสารสกัดที่เติมสารละลาย DPPH

และ A_{control} คือค่าดูดกลืนแสงของ DPPH ที่ไม่ได้เติมสารสกัด

3.3.3 การทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase inhibitory assay)

การวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยใช้สาร Tyrosine เป็นสารตั้งต้น ดัดแปลงมาจากวิธีของ Witheethummasak, Limsuwan (31) โดยเจือจางสารสกัดด้วย 5% DMSO จนมีความเข้มข้น 0, 10, 30, 100, 300 mg/mL ปิเปตสารละลายออกมา 10 μL ใส่ลงใน 96-well plate เติม 50 mM ของ Phosphate buffer pH 6.8 และ 200 Unit/mL ของ Tyrosinase ลงในทุกหลุม หลังจากนั้นนำไป Incubate 37 °C เป็นเวลา 12 นาที แล้วนำมาเติม 2 mM ของ L-tyrosine ลงในทุกหลุม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader (ทำการวัด 11 ซ้ำทุก 2 นาที) หา Tyrosinase inhibition (%) จากสูตรดังต่อไปนี้ (31)

$$\text{สูตร Tyrosinase inhibition (\%)} = [1 - \Delta s / \Delta c] \times 100$$

โดย Δs คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไปของสารละลายตัวอย่าง

Δc คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไปของสารละลายควบคุม

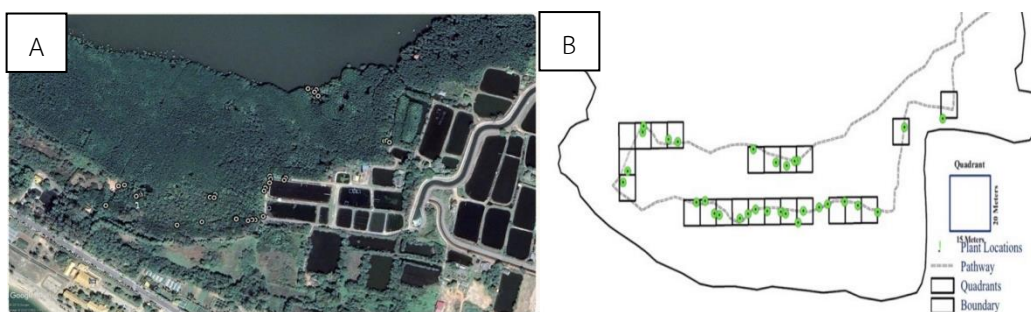
3.4 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้โปรแกรม SPSS ลิขสิทธิ์ 1 license ในการวิเคราะห์ทางสถิติแบบพาราเมตริก (IBM SPSS version 25) โดยใช้สถิติ Student T Test ในการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของฝัสดอกแดงและฝัสดอกขาวตามตำแหน่งภูมิศาสตร์ที่ใกล้เคียงกัน รวมทั้งใช้ในการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตามตำแหน่งที่เกิดตามธรรมชาติของฝัสด และมึระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 (P value < 0.05)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

ผลการศึกษาของตัวอย่างผาดทั้งหมด ซึ่งประกอบไปด้วยผาดดอกขาว (*L. racemosa*, LR) และผาดดอกแดง (*L. littorea*, LL) ในพื้นที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ โดยระบุตำแหน่งที่มาของแต่ละตัวอย่างด้วยระบบ Global positioning system (GPS) จากนั้นเลือกตัวอย่างที่เหมาะสมมาทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ 30% methanol และน้ำ จากนั้นทำการวิเคราะห์การทดสอบกลุ่มสารทางเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส



รูปภาพที่ 21 แสดงภูมิศาสตร์ของศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดจันทบุรี (A), แสดงตำแหน่งของผาดใน braun-blancquet ภายในพื้นที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดจันทบุรี (B)

4.1 การทดสอบกลุ่มสารทางเคมี

4.1.1 การทดสอบหาสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก

การทดสอบหาสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก เป็นการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างผาดทุกต้น โดยอาศัยปฏิกิริยาทางเคมี คือ Ferric chloride test พบว่าสารสกัด LR และ LL ให้ผลการทดสอบเป็นบวก คือ สีของสารสกัดเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน เขียว น้ำตาล หรือสีดำ มีผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 2 และรูปภาพที่ 22-25

จากผลการวิเคราะห์ Ferric chloride test พบว่า ทุกตัวอย่างมีสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก และเมื่อเปรียบเทียบส่วนของพีชะหว่างกิ่งกับใบ ในตัวทำละลายเมทานอล ตำแหน่งบกพบว่า สารสกัด LR จำนวน 4 ตัวอย่าง ส่วนกิ่งให้ผลระดับ 4 และส่วนใบให้ผลระดับ 5 ตำแหน่งทะเล พบว่า LR ส่วนกิ่ง 2 ตัวอย่าง ให้ผลระดับ 3, 5 ส่วนใบ 1 ตัวอย่าง ให้ผลระดับ 4

จากผลการวิเคราะห์ Ferric chloride test พบว่า ทุกตัวอย่างมีสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก และเมื่อเปรียบเทียบส่วนของพีชะหว่างกิ่งกับใบ ในตัวทำละลายเมทานอล ตำแหน่งบกพบว่า สารสกัด LL จำนวน 3 ตัวอย่าง ส่วนกิ่งให้ผลระดับ 4 มี 1 ตัวอย่างที่ให้ผลระดับ 2 และส่วนใบให้ผลระดับ 5 ตำแหน่งทะเล พบว่า LL จำนวน 1 ตัวอย่าง ส่วนกิ่งให้ผลระดับ 4 และส่วนใบให้ผลระดับ 5

จากผลการวิเคราะห์ Ferric chloride test พบว่า ทุกตัวอย่างมีสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก และเมื่อเปรียบเทียบส่วนของพีชะหว่างกิ่งกับใบ ในตัวทำละลายน้ำ ตำแหน่งบกพบว่า สารสกัด LR จำนวน 4 ตัวอย่าง ส่วนกิ่งให้ผลระดับ 4 และส่วนใบให้ผลระดับ 5 มี 1 ตัวอย่างที่ให้ผลระดับ 3 ตำแหน่งทะเล พบว่า LR ส่วนกิ่งให้ผลระดับ 5 ส่วนใบให้ผลระดับ 5

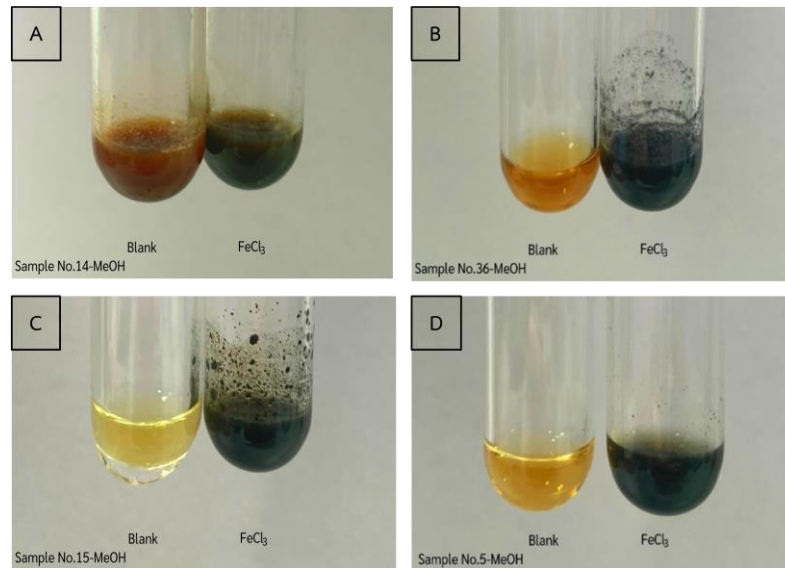
จากผลการวิเคราะห์ Ferric chloride test พบว่า ทุกตัวอย่างมีสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก และเมื่อเปรียบเทียบส่วนของพีชะหว่างกิ่งกับใบ ในตัวทำละลายน้ำ ตำแหน่งบกพบว่า สารสกัด LL จำนวน 3 ตัวอย่าง ส่วนกิ่งให้ผลระดับ 4 และส่วนใบให้ผลระดับ 5 มี 1 ตัวอย่างที่ให้ผลระดับ 4 ตำแหน่งทะเล พบว่า LL จำนวน 1 ตัวอย่าง ส่วนกิ่งให้ผลระดับ 3 และส่วนใบให้ผลระดับ 5

รายงานผลงานวิจัยของ Malik, et al. (2017).(1) พบว่าสารสกัดส่วนใบของฝาดดอกขาว (LR) ตัวทำละลายเมทานอลมีปริมาณสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกสูงกว่าตัวทำละลายน้ำและเฮกเซน ตามลำดับ และจากงานวิจัยของ Vittaya L, Charoendat U, Janyong S, Leesakul (2020).(2) พบว่าสารสกัดเมทานอลของฝาดดอกแดง (LL) ในส่วนของเปลือกต้น ใบ กิ่ง และดอก มีปริมาณสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก $2,361.11 \pm 98.63$, 567.22 ± 31.90 , $2,160 \pm 31.90$, $1,320.56 \pm 49.90$ mg GAE/g CE (mg gallic acid equivalents/g of dry crude extract) ตามลำดับ จากรายงานผลการวิจัยที่พบคาดว่าส่วนของพืชที่จะมีปริมาณสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกมากที่สุดคือ เปลือกต้น ในตัวทำละลายเมทานอล

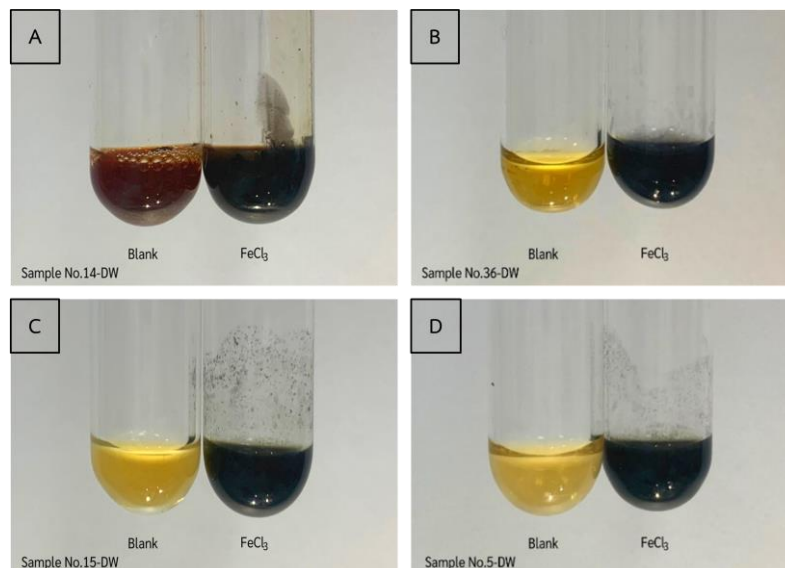
ตารางที่ 2 เปรียบเทียบผลการทดสอบ Ferric chloride test ของสารสกัดฝาดดอกขาว (LR) เทียบกับ ฝาดดอกแดง (LL) ในตัวทำละลายเมทานอลและน้ำ ส่วนกึ่งและส่วนใบ ตำแหน่งบกและตำแหน่งทะเล

LR				LL			
ตำแหน่ง	GPS	ผลการทดสอบ		ตำแหน่ง	GPS	ผลการทดสอบ	
		กึ่ง	ใบ			กึ่ง	ใบ
ตัวทำละลาย 30% methanol							
บก	1219	4	5	บก	1224	2	5
	1244	4	5		1248	4	5
	1247	4	5		1251	4	5
	1250	3	5				
ทะเล	1229	3	4	ทะเล	1225	4	5
	1230	5	nd				
ตัวทำละลายน้ำ							
บก	1219	4	5	บก	1224	4	5
	1244	4	3		1248	4	4
	1247	4	5		1251	4	5
	1250	4	5				
ทะเล	1229	5	5	ทะเล	1225	3	5
	1230	5	nd				

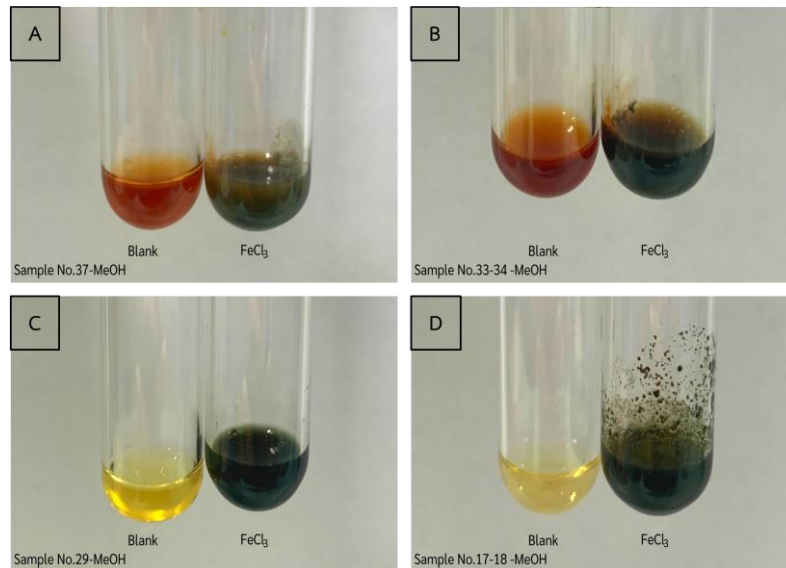
หมายเหตุ 1-5, ระดับสีเขียวของสารทดสอบ; nd, ไม่มีข้อมูล (no data)



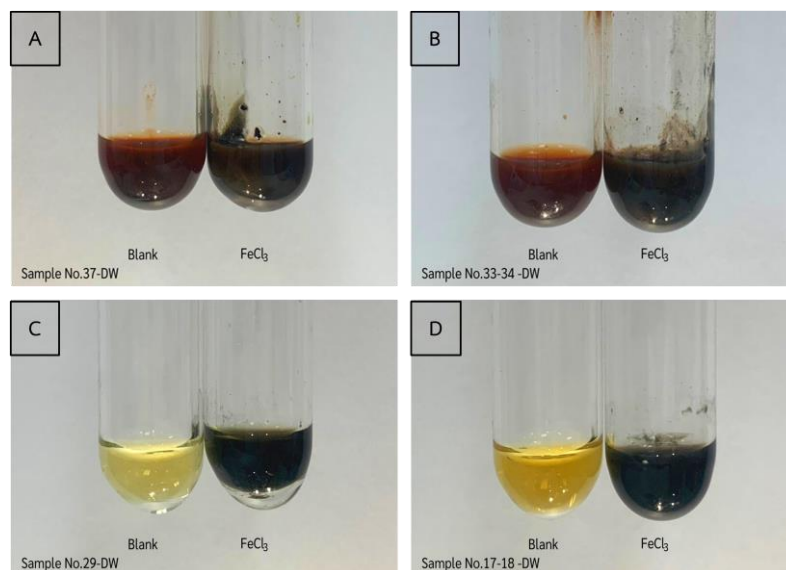
รูปภาพที่ 22 เปรียบเทียบผลการตรวจสอบสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก โดยอาศัยปฏิกิริยาทางเคมี Ferric chloride test ของสารสกัด LR ในตัวทำละลายเมทานอลระหว่าง ส่วนกิ่ง ตำแหน่งบก (A), ส่วนกิ่ง ตำแหน่งทะเล (B), ส่วนใบ ตำแหน่งบก (C) และส่วนใบ ตำแหน่งทะเล (D)



รูปภาพที่ 23 เปรียบเทียบผลการตรวจสอบสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก โดยอาศัยปฏิกิริยาทางเคมี Ferric chloride test ของสารสกัด LR ในตัวทำละลายน้ำระหว่าง ส่วนกิ่ง ตำแหน่งบก (A), ส่วนกิ่ง ตำแหน่งทะเล (B), ส่วนใบ ตำแหน่งบก (C) และส่วนใบ ตำแหน่งทะเล (D)



รูปภาพที่ 24 เปรียบเทียบผลการตรวจสอบสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก โดยอาศัยปฏิกิริยาทางเคมี Ferric chloride test ของสารสกัด LL ในตัวทำละลายเมทานอลระหว่าง ส่วนกิ่ง ตำแหน่งบก (A), ส่วนกิ่ง ตำแหน่งทะเล (B), ส่วนใบ ตำแหน่งบก (C) และส่วนใบ ตำแหน่งทะเล (D)

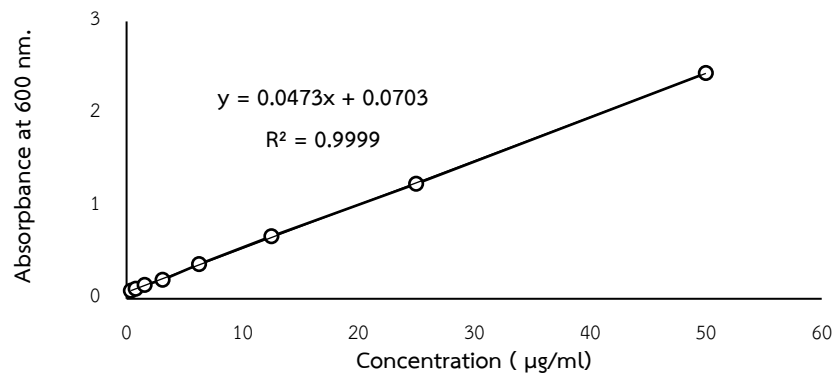


รูปภาพที่ 25 เปรียบเทียบผลการตรวจสอบสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก โดยอาศัยปฏิกิริยาทางเคมี Ferric chloride test ของสารสกัด LL ในตัวทำละลายน้ำระหว่าง ส่วนกิ่ง ตำแหน่งบก (A), ส่วนกิ่ง ตำแหน่งทะเล (B), ส่วนใบ ตำแหน่งบก (C) และส่วนใบ ตำแหน่งทะเล (D)

4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

4.2.1 การวิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP assay

ในการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP เป็นการวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการให้อิเล็กตรอนให้ ferric iron (Fe^{3+}) สีเหลือง เปลี่ยนเป็น Ferric ion (Fe^{2+}) ซึ่งมีสีน้ำเงิน และตรวจวัด Ferric iron (Fe^{2+}) ที่เพิ่มขึ้น โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่มีความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และคำนวณหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเทียบกับ Trolox ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน แล้วรายงานค่าที่คำนวณได้เป็น Trolox equivalent ดังแสดงใน **รูปภาพที่ 26**



รูปภาพที่ 26 กราฟสารมาตรฐาน trolox โดยวิธี FRAP assay

ตารางที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระระหว่างสารสกัดฝาดดอกขาว (LR) และฝาดดอกแดง (LL) และส่วนกิ่งและใบ ที่ตำแหน่งใกล้เคียงกัน (บก, ทะเล) โดยใช้ตัวทำละลายเมทานอลและน้ำ ด้วยวิธี FRAP assay

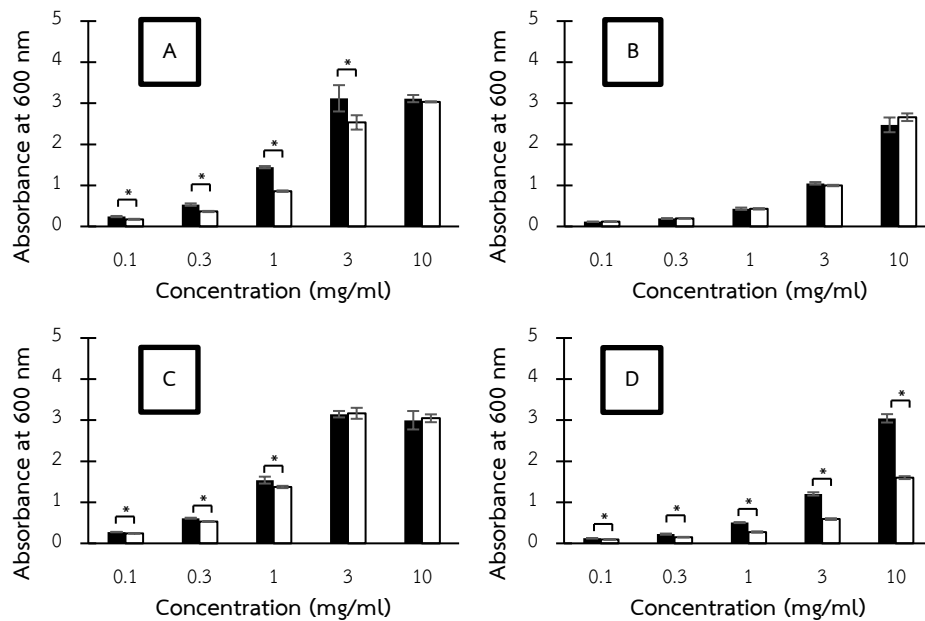
ตำแหน่ง	ส่วน	ความเข้มข้น ของสารสกัด (mg/ml)	Trolox (mean $\pm$ S.D.)			
			MeOH		DW	
			LR	LL	LR	LL
บก	กิ่ง	0.1	3.60 $\pm$ 0.31	2.21 $\pm$ 0.23	5.46 $\pm$ 0.08	4.99 $\pm$ 0.66
		0.3	9.77 $\pm$ 0.62	6.21 $\pm$ 0.30	14.84 $\pm$ 0.11	12.95 $\pm$ 0.04
		1	29.04 $\pm$ 0.56	16.69 $\pm$ 0.38	44.12 $\pm$ 0.57	38.13 $\pm$ 0.57
		3	64.48 $\pm$ 6.77	52.07 $\pm$ 3.69	78.18 $\pm$ 2.62	70.27 $\pm$ 0.36
		10	64.33 $\pm$ 1.86	62.65 $\pm$ 0.28	71.44 $\pm$ 1.65	61.83 $\pm$ 4.12
	ใบ	0.1	0.94 $\pm$ 0.02	0.97 $\pm$ 0.08	1.47 $\pm$ 0.01	1.09 $\pm$ 0.00
		0.3	2.59 $\pm$ 0.01	2.70 $\pm$ 0.13	3.11 $\pm$ 0.07	2.21 $\pm$ 0.02
		1	7.65 $\pm$ 0.59	7.58 $\pm$ 0.35	8.50 $\pm$ 0.05	6.28 $\pm$ 0.03
		3	20.71 $\pm$ 0.66	19.59 $\pm$ 0.35	20.62 $\pm$ 0.20	16.20 $\pm$ 0.24
		10	50.81 $\pm$ 3.80	54.74 $\pm$ 1.97	56.70 $\pm$ 0.38	45.65 $\pm$ 0.65
ทะเล	กิ่ง	0.1	4.32 $\pm$ 0.11	3.67 $\pm$ 0.01	5.11 $\pm$ 0.17	4.64 $\pm$ 0.06
		0.3	11.45 $\pm$ 0.26	9.76 $\pm$ 0.24	15.08 $\pm$ 0.13	12.19 $\pm$ 0.43
		1	31.06 $\pm$ 1.78	27.53 $\pm$ 0.58	46.27 $\pm$ 0.21	34.21 $\pm$ 0.10
		3	65.00 $\pm$ 1.66	65.46 $\pm$ 2.83	67.23 $\pm$ 0.56	70.75 $\pm$ 0.49
		10	61.90 $\pm$ 4.74	62.90 $\pm$ 2.01	63.28 $\pm$ 0.44	62.45 $\pm$ 4.24
	ใบ	0.1	1.11 $\pm$ 0.11	0.54 $\pm$ 0.06	1.11 $\pm$ 0.02	1.21 $\pm$ 0.07
		0.3	3.25 $\pm$ 0.30	1.71 $\pm$ 0.15	2.61 $\pm$ 0.09	2.26 $\pm$ 0.06
		1	9.20 $\pm$ 0.25	4.35 $\pm$ 0.34	7.86 $\pm$ 0.13	6.04 $\pm$ 0.20
		3	23.97 $\pm$ 0.85	11.00 $\pm$ 0.43	20.95 $\pm$ 0.22	15.24 $\pm$ 0.31
		10	62.88 $\pm$ 2.15	32.35 $\pm$ 0.74	60.57 $\pm$ 0.41	39.21 $\pm$ 1.83

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นของสารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งบก พบว่าในตัวทำละลายเมทานอล สารสกัด LR มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่า LL ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 3 mg/ml โดยมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (LR; 0.24 ± 0.01 , 0.53 ± 0.03 , 1.44 ± 0.03 , 3.12 ± 0.32 และ LL; 0.18 ± 0.01 , 0.36 ± 0.01 , 0.86 ± 0.02 , 2.53 ± 0.17 mg/ml ตามลำดับ) (รูปภาพที่ 27-A) ส่วนในช่วงความเข้มข้น 10 mg/ml จะเป็นช่วงที่เกินกราฟมาตรฐานไป ทำให้ความสัมพันธ์อาจไม่เป็นเส้นตรง จึงไม่นำมาใช้เปรียบเทียบ

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นของสารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของใบ ตำแหน่งบก พบว่าในตัวทำละลายเมทานอล สารสกัด LL มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่า LR ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 0.3 mg/ml โดยมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (LR; 0.11 ± 0.00 , 0.19 ± 0.00 และ LL; 0.12 ± 0.00 , 0.20 ± 0.01 ตามลำดับ) ในช่วงความเข้มข้น 1 ถึง 10 mg/ml ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งสารสกัด LR และ LL (รูปภาพที่ 27-B)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นของสารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งทะเล พบว่าในตัวทำละลายเมทานอล สารสกัด LR มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่า LL ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 1 mg/ml โดยมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (LR; 0.27 ± 0.01 , 0.61 ± 0.01 , 1.54 ± 0.08 และ LL; 0.24 ± 0.00 , 0.53 ± 0.01 , 1.37 ± 0.03 ตามลำดับ) ในช่วงความเข้มข้น 3 ถึง 10 mg/ml ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งสารสกัด LR และ LL (รูปภาพที่ 27-C)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นของสารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของใบ ตำแหน่งทะเล พบว่าในตัวทำละลายเมทานอล สารสกัด LR มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่า LL ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 10 mg/ml โดยมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (LR; 0.12 ± 0.01 , 0.22 ± 0.01 , 0.51 ± 0.01 , 1.20 ± 0.04 , 3.04 ± 0.01 และ LL; 0.10 ± 0.00 , 0.15 ± 0.01 , 0.28 ± 0.02 , 0.59 ± 0.02 , 1.60 ± 0.04 ตามลำดับ) ในทุกความเข้มข้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งสารสกัด LR และ LL (รูปภาพที่ 27-D)



รูปภาพที่ 27 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay ของสารสกัด LR (■) เทียบกับ LL (□) ในตัวทำละลายเมทานอล (A; สารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งบก, B; สารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของใบ ตำแหน่งบก, C; สารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งทะเล, D; สารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของใบ ตำแหน่งทะเล) (Independent t- test, *, p -value < 0.05)

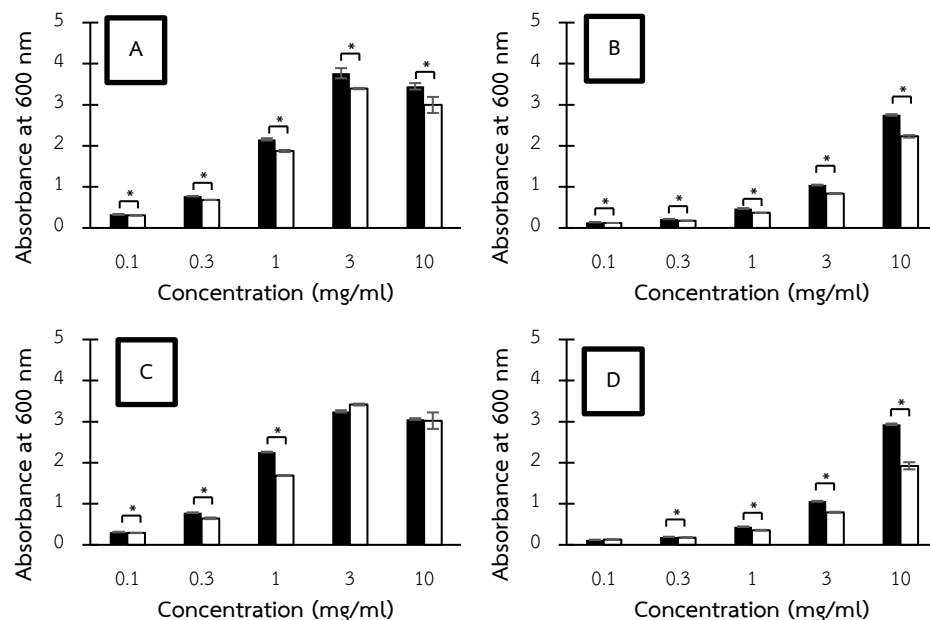
เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นของสารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งบก พบว่าในตัวทำละลายน้ำ สารสกัด LR มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่า LL ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 10 mg/ml โดยมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (LR; 0.33 ± 0.00 , 0.77 ± 0.01 , 2.16 ± 0.03 , 3.77 ± 0.12 , 3.45 ± 0.08 และ LL; 0.31 ± 0.00 , 0.68 ± 0.00 , 1.87 ± 0.03 , 3.39 ± 0.02 , 3.00 ± 0.20 ตามลำดับ) ในทุกช่วงความเข้มข้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งสารสกัด LR และ LL (รูปภาพที่ 28-A)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นของสารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของใบ ตำแหน่งบก พบว่าในตัวทำละลายน้ำ สารสกัด LR มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่า LL ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 10 mg/ml โดยมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (LR; 0.14 ± 0.00 , 0.22 ± 0.00 , 0.47 ± 0.00 , 1.05 ± 0.01 , 2.75 ± 0.02

และ LL; 0.12 ± 0.00 , 0.18 ± 0.00 , 0.37 ± 0.00 , 0.84 ± 0.01 , 2.23 ± 0.03 ตามลำดับ) ในทุกช่วงความเข้มข้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งสารสกัด LR และ LL (รูปภาพที่ 28-B)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นของสารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งทะเล พบว่าในตัวทำละลายน้ำ สารสกัด LR มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่า LL ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 1 mg/ml โดยมีค่า TEAC (LR; 5.11 ± 0.17 , 15.08 ± 0.13 , 46.27 ± 0.21 และ LL; 4.64 ± 0.06 , 12.19 ± 0.43 , 34.21 ± 0.10 mg/ml ตามลำดับ) ในช่วงความเข้มข้น 3 ถึง 10 mg/ml ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งสารสกัด LR และ LL (รูปภาพที่ 28-C)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นของสารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของใบ ตำแหน่งทะเล พบว่าในตัวทำละลายน้ำ สารสกัด LR มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่า LL ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml มีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (LR; 0.12 ± 0.00 และ LL; 0.13 ± 0.00 ตามลำดับ) แต่สารสกัด LR มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่า LL ในช่วงความเข้มข้น 0.3 ถึง 10 mg/ml ในทุกความเข้มข้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งสารสกัด LR และ LL (รูปภาพที่ 28-D)



รูปภาพที่ 28 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay ของสารสกัด LR (■) เทียบกับ LL (□) ในตัวทำละลายน้ำ (A; สารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งบก, B; สารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของใบ ตำแหน่งบก, C; สารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งทะเล, D; สารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของใบ ตำแหน่งทะเล)
(Independent t- test, *, p -value < 0.05)

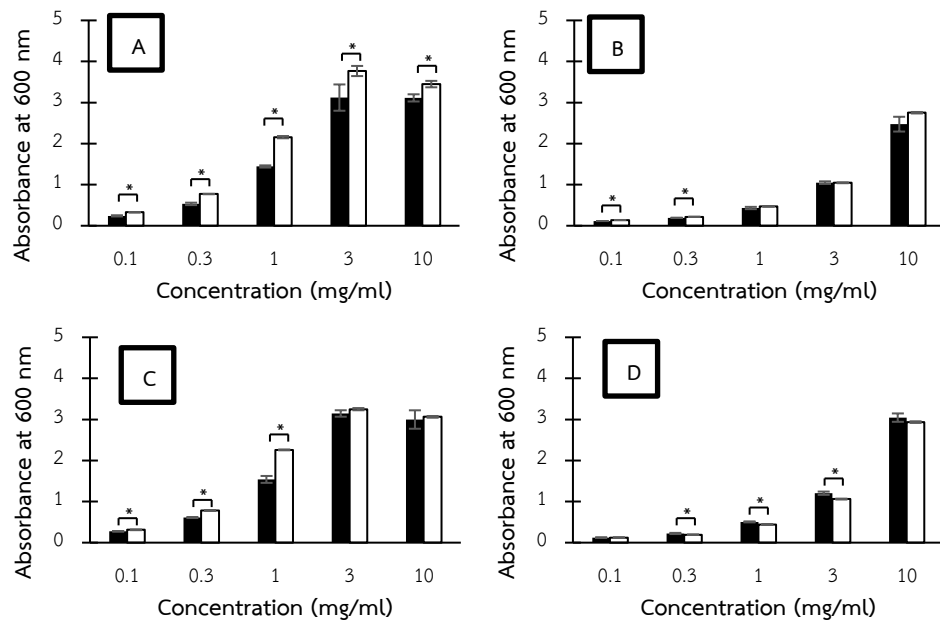
เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นของสารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำ ของ LR ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งบก พบว่าในตัวทำละลายเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าน้ำ ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 10 mg/ml โดยมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (เมทานอล; 0.24 ± 0.01 , 0.53 ± 0.03 , 1.44 ± 0.03 , 3.12 ± 0.32 , 3.11 ± 0.09 และ น้ำ; 0.33 ± 0.00 , 0.77 ± 0.01 , 2.16 ± 0.03 , 3.77 ± 0.12 , 3.45 ± 0.08 ตามลำดับ) ในทุกความเข้มข้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งตัวทำละลายเมทานอลและน้ำ (**รูปภาพที่ 29-A**)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นของสารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำ ของ LR ส่วนของใบ ตำแหน่งบก พบว่าในตัวทำละลายเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าน้ำ ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 1 mg/ml โดยมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (เมทานอล; 0.11 ± 0.00 , 0.19 ± 0.00 , 0.43 ± 0.03 และ น้ำ; 0.14 ± 0.00 , 0.22 ± 0.00 , 0.47 ± 0.00 ตามลำดับ) ในช่วงความเข้มข้น 3 ถึง 10 mg/ml ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งตัวทำละลายเมทานอลและน้ำ (**รูปภาพที่ 29-B**)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นของสารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำ ของ LR ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งทะเล พบว่าในตัวทำละลายเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าน้ำ ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 10 mg/ml โดยมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (เมทานอล; 0.27 ± 0.01 , 0.61 ± 0.01 , 1.54 ± 0.08 , 3.15 ± 0.08 , 3.00 ± 0.22 และ น้ำ; 0.31 ± 0.01 , 0.78 ± 0.01 , 2.26 ± 0.01 , 3.25 ± 0.03 , 3.06 ± 0.02 ตามลำดับ) ในทุกความเข้มข้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งตัวทำละลายเมทานอลและน้ำ (**รูปภาพที่ 29-C**)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นของสารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำ ของ LR ส่วนของใบ ตำแหน่งทะเล พบว่าในตัวทำ

ละลายเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าน้ำ ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 10 mg/ml โดยมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (เมทานอล; 0.12 ± 0.01 , 0.22 ± 0.01 , 0.51 ± 0.01 , 1.20 ± 0.04 , 3.04 ± 0.10 และ น้ำ; 0.12 ± 0.00 , 0.19 ± 0.00 , 0.44 ± 0.01 , 1.06 ± 0.01 , 2.94 ± 0.02 ตามลำดับ) ในทุกความเข้มข้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งตัวทำละลายเมทานอลและน้ำ (รูปภาพที่ 29-D)



รูปภาพที่ 29 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay ของสารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอล (■) เทียบกับน้ำ (□) (A; สารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำของ LR ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งบก, B; สารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำของ LR ส่วนของใบ ตำแหน่งบก, C; สารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำของ LR ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งทะเล, D; สารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำของ LR ส่วนของใบ ตำแหน่งทะเล) (Independent t- test, *, p -value < 0.05)

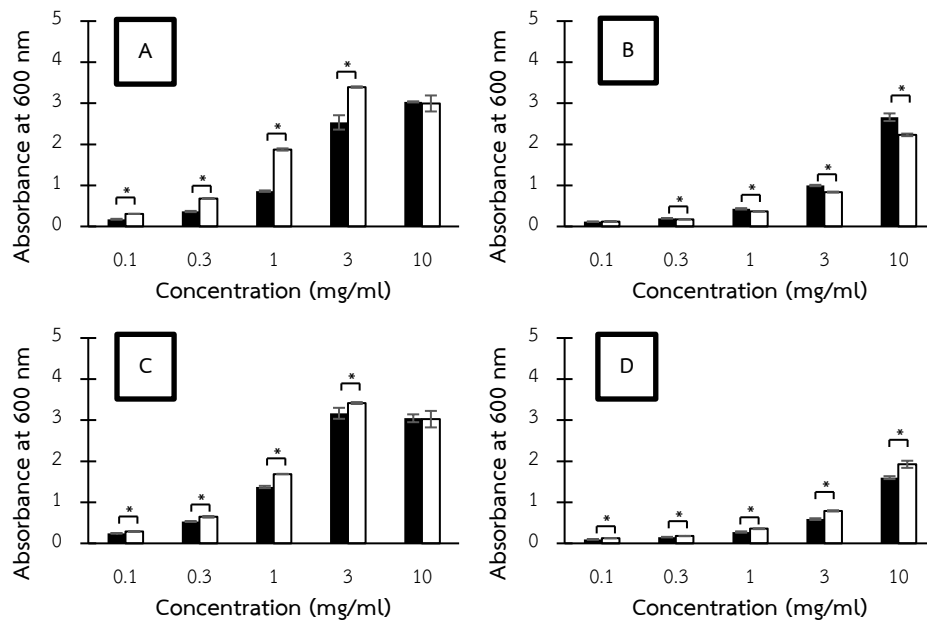
เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นของสารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำ ของ LL ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งบก พบว่าในตัวทำ

ละลายเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าน้ำ ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 3 mg/ml โดยมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (เมทานอล; 0.18 ± 0.01 , 0.36 ± 0.01 , 0.86 ± 0.02 , 2.53 ± 0.17 และ น้ำ; 0.31 ± 0.00 , 0.68 ± 0.00 , 1.87 ± 0.03 , 3.39 ± 0.02 ตามลำดับ) ในทุกความเข้มข้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งตัวทำละลายเมทานอลและน้ำ (รูปภาพที่ 30-A)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นของสารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำ ของ LL ส่วนของใบ ตำแหน่งบก พบว่าในตัวทำละลายเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับน้ำ ในช่วงความเข้มข้น 0.1 mg/ml โดยมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (เมทานอล; 0.12 ± 0.00 และ น้ำ; 0.12 ± 0.00 ตามลำดับ) แต่ในตัวทำละลายเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าน้ำ ในช่วงความเข้มข้น 0.3 ถึง 10 mg/ml ในทุกความเข้มข้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งตัวทำละลายเมทานอลและน้ำ (รูปภาพที่ 30-B)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นของสารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำ ของ LL ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งทะเล พบว่าในตัวทำละลายเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าน้ำ ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 3 mg/ml โดยมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (เมทานอล; 0.24 ± 0.00 , 0.53 ± 0.01 , 1.37 ± 0.03 , 3.17 ± 0.13 และ น้ำ; 0.29 ± 0.00 , 0.65 ± 0.02 , 1.69 ± 0.00 , 3.42 ± 0.02 ตามลำดับ) ในทุกความเข้มข้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งตัวทำละลายเมทานอลและน้ำ (รูปภาพที่ 30-C)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นของสารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำ ของ LL ส่วนของใบ ตำแหน่งทะเล พบว่าในตัวทำละลายเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าน้ำ ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 10 mg/ml โดยมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (เมทานอล; 0.10 ± 0.00 , 0.15 ± 0.01 , 0.28 ± 0.02 , 0.59 ± 0.02 , 1.60 ± 0.04 และ น้ำ; 0.13 ± 0.00 , 0.18 ± 0.00 , 0.36 ± 0.01 , 0.79 ± 0.01 , 1.93 ± 0.09 ตามลำดับ) ในทุกความเข้มข้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งตัวทำละลายเมทานอลและน้ำ (รูปภาพที่ 30-D)



รูปภาพที่ 30 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay ของสารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอล (■) เทียบกับน้ำ (□) (A; สารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำ ของ LL ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งบก, B; สารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำ ของ LL ส่วนของใบ ตำแหน่งบก, C; สารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำ ของ LL ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งทะเล, D; สารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำ ของ LL ส่วนของใบ ตำแหน่งทะเล) (Independent t- test, *; p -value < 0.05)

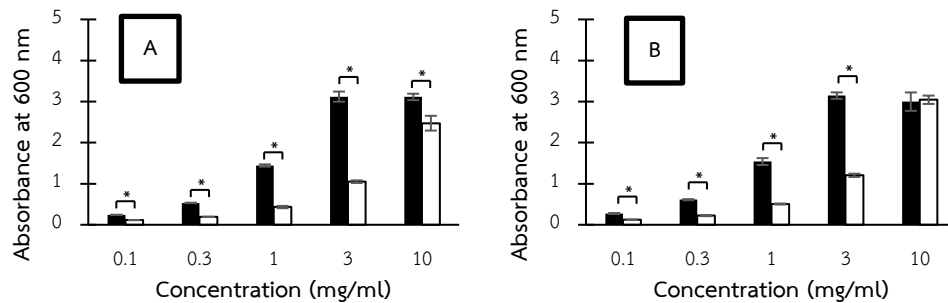
เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นของสารสกัดจากส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ ของ LR ในตัวทำละลายเมทานอล ตำแหน่งบก พบว่าในส่วนกิ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าส่วนใบ ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 10 mg/ml โดยมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (ส่วนกิ่ง; 0.24 ± 0.01 , 0.53 ± 0.03 , 1.44 ± 0.03 , 3.12 ± 0.32 , 3.11 ± 0.09 และ ส่วนใบ; 0.11 ± 0.00 , 0.19 ± 0.00 , 0.43 ± 0.03 , 1.05 ± 0.03 , 2.47 ± 0.18 ตามลำดับ) ในทุกความเข้มข้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งส่วนกิ่งและส่วนใบ (รูปภาพที่ 31-A)

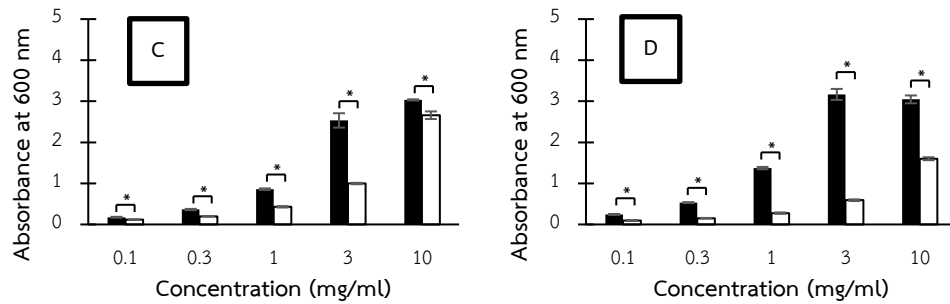
เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นของสารสกัดจากส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ ของ LR ในตัวทำละลายเมทานอล ตำแหน่งทะเล พบว่าในส่วนกิ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าส่วนใบ ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 3 mg/ml โดยมีค่าดูดกลืน

แสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (ส่วนกิ่ง; 0.27 ± 0.01 , 0.61 ± 0.01 , 1.54 ± 0.08 , 3.15 ± 0.08 และ ส่วนใบ; 0.12 ± 0.01 , 0.22 ± 0.01 , 0.51 ± 0.01 , 1.20 ± 0.04 ตามลำดับ) ในทุกความเข้มข้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งส่วนกิ่งและส่วนใบ (รูปภาพที่ 31-B)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นของสารสกัดจากส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ ของ LL ในตัวทำละลายเมทานอล ตำแหน่งบก พบว่าในส่วนกิ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าส่วนใบ ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 10 mg/ml โดยมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (ส่วนกิ่ง; 0.18 ± 0.01 , 0.36 ± 0.01 , 0.86 ± 0.02 , 2.53 ± 0.17 , 3.03 ± 0.01 และ ส่วนใบ; 0.12 ± 0.00 , 0.20 ± 0.01 , 0.43 ± 0.02 , 1.00 ± 0.02 , 2.66 ± 0.09 ตามลำดับ) ในทุกความเข้มข้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งส่วนกิ่งและส่วนใบ (รูปภาพที่ 31-C)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นของสารสกัดจากส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ ของ LL ในตัวทำละลายเมทานอล ตำแหน่งทะเล พบว่าในส่วนกิ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าส่วนใบ ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 10 mg/ml โดยมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (ส่วนกิ่ง; 0.24 ± 0.00 , 0.53 ± 0.01 , 1.37 ± 0.03 , 3.17 ± 0.13 , 3.05 ± 0.10 และ ส่วนใบ; 0.10 ± 0.00 , 0.15 ± 0.01 , 0.28 ± 0.02 , 0.59 ± 0.02 , 1.60 ± 0.04 ตามลำดับ) ในทุกความเข้มข้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งส่วนกิ่งและส่วนใบ (รูปภาพที่ 31-D)





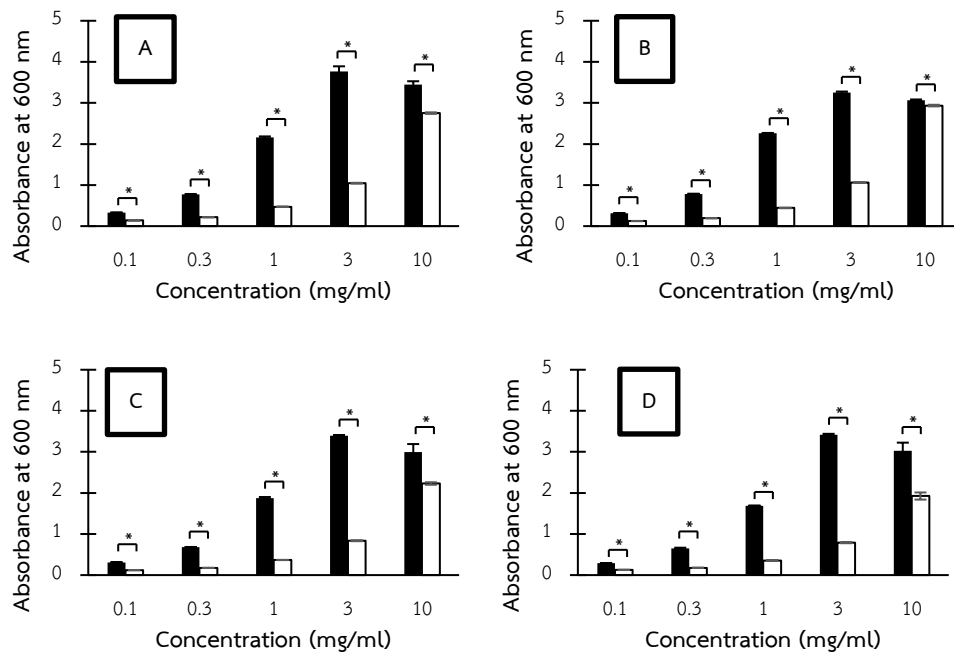
รูปภาพที่ 31 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay ของสารสกัดจากส่วนกิ่ง (■) เทียบกับส่วนใบ (□) ในตัวทำละลายเมทานอล (A; สารสกัดจากส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ ของ LR ในตัวทำละลายเมทานอล ตำแหน่งบก, B; สารสกัดจากส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ ของ LR ในตัวทำละลายเมทานอล ตำแหน่งทะเล, C; สารสกัดจากส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ ของ LL ในตัวทำละลายเมทานอล ตำแหน่งบก, D; สารสกัดจากส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ ของ LL ในตัวทำละลายเมทานอล ตำแหน่งทะเล) (Independent t- test, *, p -value < 0.05)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นของสารสกัดจากส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ ของ LR ในตัวทำละลายน้ำ ตำแหน่งบก พบว่าในส่วนกิ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าส่วนใบ ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 10 mg/ml โดยมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (ส่วนกิ่ง; 0.33 ± 0.00 , 0.77 ± 0.01 , 2.16 ± 0.03 , 3.77 ± 0.12 , 3.45 ± 0.08 และ ส่วนใบ; 0.14 ± 0.00 , 0.22 ± 0.00 , 0.47 ± 0.00 , 1.05 ± 0.01 , 2.75 ± 0.02 ตามลำดับ) ในทุกความเข้มข้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งส่วนกิ่งและส่วนใบ (**รูปภาพที่ 32-A**)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นของสารสกัดจากส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ ของ LR ในตัวทำละลายน้ำ ตำแหน่งทะเล พบว่าในส่วนกิ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าส่วนใบ ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 10 mg/ml โดยมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (ส่วนกิ่ง; 0.13 ± 0.01 , 0.78 ± 0.01 , 2.26 ± 0.01 , 3.25 ± 0.03 , 3.06 ± 0.02 และส่วนใบ; 0.12 ± 0.00 , 0.19 ± 0.00 , 0.44 ± 0.01 , 1.06 ± 0.01 , 2.94 ± 0.02 ตามลำดับ) ในทุกความเข้มข้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งส่วนกิ่งและส่วนใบ (**รูปภาพที่ 32-B**)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นของสารสกัดจากส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ ของ LL ในตัวทำละลายน้ำ ตำแหน่งบก พบว่าในส่วนกิ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าส่วนใบ ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 10 mg/ml โดยมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (ส่วนกิ่ง; 0.31 ± 0.00 , 0.68 ± 0.00 , 1.87 ± 0.03 , 3.39 ± 0.02 , 3.00 ± 0.20 และ ส่วนใบ; 0.12 ± 0.00 , 0.18 ± 0.00 , 0.37 ± 0.00 , 0.84 ± 0.01 , 2.23 ± 0.03 ตามลำดับ) ในทุกความเข้มข้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งส่วนกิ่งและส่วนใบ (รูปภาพที่ 32-C)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นของสารสกัดจากส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ ของ LL ในตัวทำละลายน้ำ ตำแหน่งทะเล พบว่าในส่วนกิ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าส่วนใบ ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 10 mg/ml โดยมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (ส่วนกิ่ง; 0.29 ± 0.00 , 0.65 ± 0.02 , 1.69 ± 0.00 , 3.42 ± 0.02 , 3.02 ± 0.20 และ ส่วนใบ; 0.13 ± 0.00 , 0.18 ± 0.00 , 0.36 ± 0.01 , 0.79 ± 0.01 , 1.93 ± 0.09 ตามลำดับ) ในทุกความเข้มข้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งส่วนกิ่งและส่วนใบ (รูปภาพที่ 32-D)



รูปภาพที่ 32 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay ของสารสกัดจาก ส่วนกิ่ง (■) เทียบกับส่วนใบ (□) ในตัวทำละลายน้ำ (A; สารสกัดจากส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ ของ LR ในตัวทำละลายน้ำ ตำแหน่งบก, B; สารสกัดจากส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ ของ LR ในตัวทำละลายน้ำ ตำแหน่งทะเล, C; สารสกัดจากส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ ของ LL ในตัวทำละลายน้ำ ตำแหน่งบก, D; สารสกัดจากส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ ของ LL ในตัวทำละลายน้ำ ตำแหน่งทะเล) (Independent t- test, *, $p\text{-value} < 0.05$)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นของสาร สกัดจากตำแหน่งบกเทียบกับทะเล ของ LR ในตัวทำละลายเมทานอล ส่วนกิ่ง พบว่าตำแหน่งบก มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตำแหน่งบกมากกว่าตำแหน่งทะเล ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 3 mg/ml โดยมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (ตำแหน่งบก; 0.24 ± 0.01 , 0.53 ± 0.03 , 1.44 ± 0.03 , 3.12 ± 0.32 และ ตำแหน่งทะเล; 0.20 ± 0.01 , 0.39 ± 0.01 , 0.09 ± 0.02 , 1.95 ± 0.18 ตามลำดับ) ในทุกความเข้มข้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นมี แนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งตำแหน่งบกและตำแหน่งทะเล (**รูปภาพที่ 33-A**)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นของสาร สกัดจากตำแหน่งบกเทียบกับทะเล ของ LR ในตัวทำละลายเมทานอล ส่วนใบ พบว่าไม่สามารถ เปรียบเทียบกันได้ เนื่องจากไม่มีข้อมูลในส่วนของตำแหน่งทะเล (**รูปภาพที่ 33-B**)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นของสาร สกัดจากตำแหน่งบกเทียบกับทะเล ของ LL ในตัวทำละลายเมทานอล ส่วนกิ่ง พบว่าตำแหน่งบก มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตำแหน่งบกน้อยกว่าตำแหน่งทะเล ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 3 mg/ml โดยมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (ตำแหน่งบก; 0.17 ± 0.01 , 0.38 ± 0.02 , 0.95 ± 0.14 , 2.65 ± 0.04 และ ตำแหน่งทะเล; 0.24 ± 0.00 , 0.53 ± 0.01 , 1.37 ± 0.03 , 3.17 ± 0.13 ตามลำดับ) ในทุกความเข้มข้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นมี แนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งตำแหน่งบกและตำแหน่งทะเล (**รูปภาพที่ 33-C**)

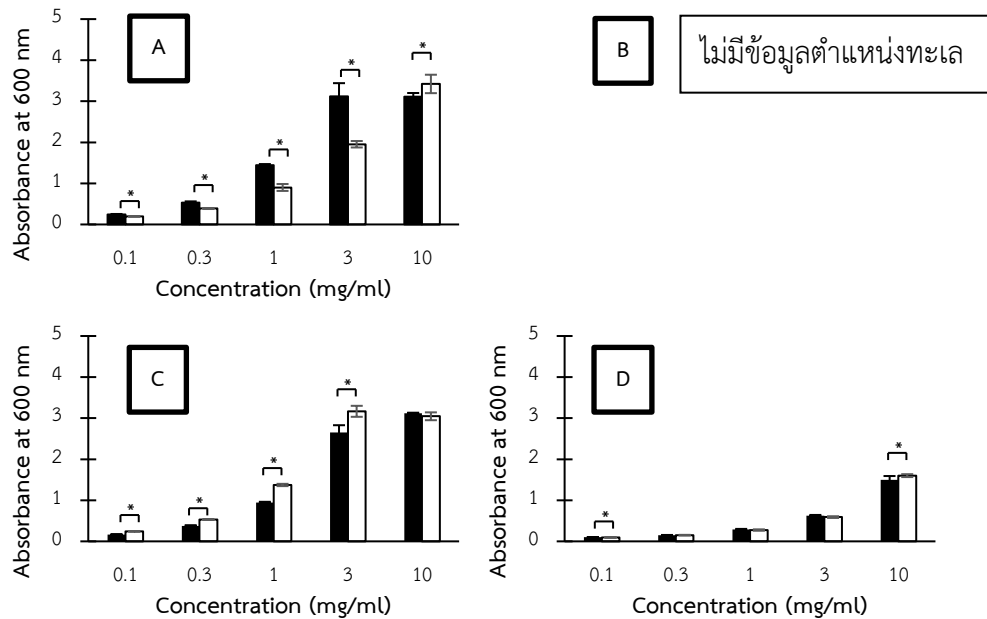
เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นของสาร สกัดจากตำแหน่งบกเทียบกับทะเล ของ LL ในตัวทำละลายเมทานอล ส่วนใบ พบว่าตำแหน่งบก มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตำแหน่งบกมากกว่าตำแหน่งทะเล ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 3 mg/ml โดยมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (ตำแหน่งบก; 0.10 ± 0.00 , 0.15 ± 0.01 , 0.29 ± 0.02 , 0.63 ± 0.03 และ ตำแหน่งทะเล; 0.10 ± 0.00 , 0.15 ± 0.01 , 0.28 ± 0.02 , $0.59 \pm$

0.02 ตามลำดับ) ในทุกความเข้มข้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นมี
แนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งตำแหน่งบกและตำแหน่งทะเล (รูปภาพที่ 33-D)

ตารางที่ 4 แสดงการเปรียบเทียบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระระหว่างตำแหน่งบกกับทะเล
ที่สปีชีส์ต่างๆ ส่วนของพืชต่างๆ โดยใช้ตัวทำละลายเมทานอลและน้ำ ด้วยวิธี FRAP assay

ตำแหน่ง	ส่วน	ความเข้มข้น ของสารสกัด (mg/ml)	Trolox (mean $\pm$ S.D.)			
			บก		ทะเล	
			LR	LL	LR	LL
MeOH	กิ่ง	0.1	3.60 $\pm$ 0.31	2.03 $\pm$ 0.16	2.66 $\pm$ 0.11	3.67 $\pm$ 0.01
		0.3	9.77 $\pm$ 0.62	6.53 $\pm$ 0.50	6.72 $\pm$ 0.13	9.76 $\pm$ 0.24
		1	29.04 $\pm$ 0.56	18.50 $\pm$ 2.92	17.55 $\pm$ 0.47	27.53 $\pm$ 0.58
		3	64.48 $\pm$ 6.77	54.61 $\pm$ 0.87	39.80 $\pm$ 3.90	65.46 $\pm$ 2.83
		10	64.33 $\pm$ 1.86	64.47 $\pm$ 0.97	70.85 $\pm$ 1.51	62.90 $\pm$ 2.01
	ใบ	0.1	0.94 $\pm$ 0.02	0.67 $\pm$ 0.04	nd	0.54 $\pm$ 0.06
		0.3	2.59 $\pm$ 0.01	1.68 $\pm$ 0.11	nd	1.71 $\pm$ 0.15
		1	7.65 $\pm$ 0.59	4.57 $\pm$ 0.43	nd	4.35 $\pm$ 0.34
		3	20.71 $\pm$ 0.66	11.76 $\pm$ 0.61	nd	11.00 $\pm$ 0.43
		10	50.81 $\pm$ 3.80	30.18 $\pm$ 0.70	nd	32.35 $\pm$ 0.74
DW	กิ่ง	0.1	5.46 $\pm$ 0.08	3.64 $\pm$ 0.08	2.31 $\pm$ 0.05	4.64 $\pm$ 0.06
		0.3	14.84 $\pm$ 0.11	9.59 $\pm$ 0.13	5.25 $\pm$ 0.03	12.19 $\pm$ 0.43
		1	44.12 $\pm$ 0.57	29.22 $\pm$ 0.28	14.59 $\pm$ 0.05	34.21 $\pm$ 0.10
		3	78.18 $\pm$ 2.62	65.77 $\pm$ 0.94	36.21 $\pm$ 0.30	70.75 $\pm$ 0.49
		10	71.44 $\pm$ 1.65	65.64 $\pm$ 0.32	66.08 $\pm$ 0.46	62.45 $\pm$ 4.24
	ใบ	0.1	1.47 $\pm$ 0.01	0.94 $\pm$ 0.03	nd	1.21 $\pm$ 0.07
		0.3	3.11 $\pm$ 0.07	1.76 $\pm$ 0.01	nd	2.26 $\pm$ 0.06
		1	8.50 $\pm$ 0.05	4.40 $\pm$ 0.09	nd	6.04 $\pm$ 0.20
		3	20.62 $\pm$ 0.20	11.24 $\pm$ 0.26	nd	15.24 $\pm$ 0.31
		10	56.70 $\pm$ 0.38	31.03 $\pm$ 0.41	nd	39.21 $\pm$ 1.83

หมายเหตุ nd, ไม่มีข้อมูล (no data)



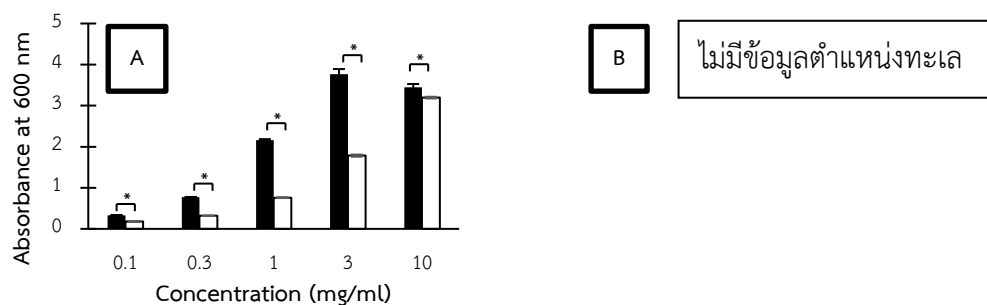
รูปภาพที่ 33 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay ของสารสกัดจากตำหน่งบก (■) เทียบกับทะเล (□) ในตัวทำละลายเมทานอล (A; สารสกัดจากตำหน่งบกเทียบกับทะเล ของ LR ในตัวทำละลายเมทานอล ส่วนกึ่ง, B; สารสกัดจากตำหน่งบกเทียบกับทะเล ของ LR ในตัวทำละลายเมทานอล ส่วนใบ (ไม่มีข้อมูลตำหน่งทะเล), C; สารสกัดจากตำหน่งบกเทียบกับทะเล ของ LL ในตัวทำละลายเมทานอล ส่วนกึ่ง, D; สารสกัดจากตำหน่งบกเทียบกับทะเล ของ LL ในตัวทำละลายเมทานอล ส่วนใบ) (Independent t- test, *, p -value < 0.05)

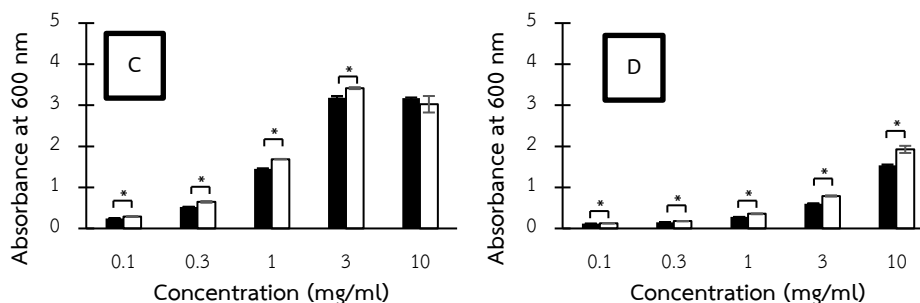
เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นของสารสกัดจากตำหน่งบกเทียบกับทะเล ของ LR ในตัวทำละลายน้ำ ส่วนกึ่ง พบว่าตำหน่งบกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตำหน่งบกมากกว่าตำหน่งทะเล ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 10 mg/ml โดยมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (ตำหน่งบก; 0.33 ± 0.00 , 0.77 ± 0.01 , 2.16 ± 0.03 , 3.77 ± 0.12 , 3.45 ± 0.08 และ ตำหน่งทะเล; 0.18 ± 0.00 , 0.32 ± 0.00 , 0.76 ± 0.00 , 1.78 ± 0.01 , 3.20 ± 0.02 ตามลำดับ) ในทุกความเข้มข้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งตำหน่งบกและตำหน่งทะเล (รูปภาพที่ 34-A)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นของสารสกัดจากตำแหน่งบกเทียบกับทะเล ของ LR ในตัวทำละลายน้ำ ส่วนไบ พบว่าไม่สามารถเปรียบเทียบกันได้ เนื่องจากไม่มีข้อมูลในส่วนของตำแหน่งทะเล (รูปภาพที่ 34-B)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นของสารสกัดจากตำแหน่งบกเทียบกับทะเล ของ LL ในตัวทำละลายน้ำ ส่วนกึ่ง พบว่าตำแหน่งบกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตำแหน่งบกน้อยกว่าตำแหน่งทะเล ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 3 mg/ml โดยมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (ตำแหน่งบก; 0.24 ± 0.00 , 0.52 ± 0.01 , 1.45 ± 0.01 , 3.18 ± 0.04 และ ตำแหน่งทะเล; 0.29 ± 0.00 , 0.65 ± 0.02 , 1.69 ± 0.00 , 3.42 ± 0.02 ตามลำดับ) ในทุกความเข้มข้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งตำแหน่งบกและตำแหน่งทะเล (รูปภาพที่ 34-C)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นของสารสกัดจากตำแหน่งบกเทียบกับทะเล ของ LL ในตัวทำละลายน้ำ ส่วนไบ พบว่าตำแหน่งบกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตำแหน่งบกน้อยกว่าตำแหน่งทะเล ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 10 mg/ml โดยมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (ตำแหน่งบก; 0.11 ± 0.00 , 0.15 ± 0.00 , 0.28 ± 0.00 , 0.60 ± 0.01 , 1.54 ± 0.02 และ ตำแหน่งทะเล; 0.13 ± 0.00 , 0.18 ± 0.00 , 0.36 ± 0.01 , 0.79 ± 0.01 , 1.93 ± 0.09 ตามลำดับ) ในทุกความเข้มข้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ FRAP มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งตำแหน่งบกและตำแหน่งทะเล (รูปภาพที่ 34-D)

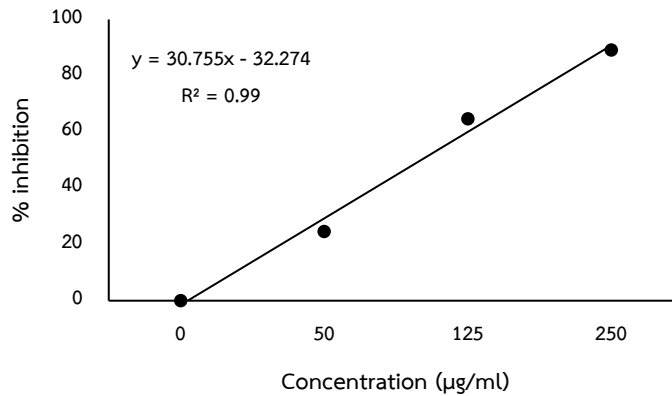




รูปภาพที่ 34 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay ของสารสกัดจากตำแห่งบก (■) เทียบกับทะเล (□) ในตัวทำละลายน้ำ (A; สารสกัดจากตำแห่งบกเทียบกับทะเล ของ LR ในตัวทำละลายน้ำส่วนกึ่ง, B; สารสกัดจากตำแห่งบกเทียบกับทะเล ของ LR ในตัวทำละลายน้ำส่วนใบ (ไม่มีข้อมูลตำแห่งทะเล), C; สารสกัดจากตำแห่งบกเทียบกับทะเล ของ LL ในตัวทำละลายน้ำ ส่วนกึ่ง, D; สารสกัดจากตำแห่งบกเทียบกับทะเล ของ LL ในตัวทำละลายน้ำ ส่วนใบ) (Independent t- test, *; p -value < 0.05)

4.2.2 การวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH assay

ในการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เป็นการทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยให้สารสกัดที่คาดว่าจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับ DPPH ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่เสถียรสีม่วง DPPH จะได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านอนุมูลอิสระทำให้ได้สารละลาย DPPH ที่เสถียรขึ้นและมีสีจางลง และเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเมื่อมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น ตรวจวัด DPPH ที่ลดลง ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.3, 1, 3 และ 10 mg/ml โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร และคำนวณหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเทียบกับ Trolox ซึ่งเป็นสารมาตรฐานแล้วรายงานค่าที่คำนวณได้เป็น % Inhibition (mean $\pm$ S.D.)



รูปภาพที่ 35 กราฟแสดง % Inhibition ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของสารมาตรฐาน trolox (µg/ml) โดยวิธี DPPH assay

ตารางที่ 5 แสดงการเปรียบเทียบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระระหว่างสารสกัดฟาดดอกขาว (LR) และฟาดดอกแดง (LL) และส่วนกิ่งและใบ ที่ตำแหน่งใกล้เคียงกัน (บก, ทะเล) โดยใช้ตัวทำละลายเมทานอลและน้ำ ด้วยวิธี DPPH assay

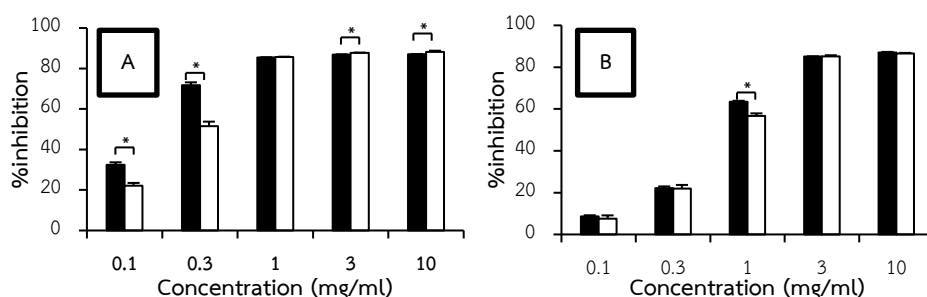
ตำแหน่ง	ส่วน	IC ₅₀ (mg/ml)			
		MeOH		DW	
		LR	LL	LR	LL
บก	กิ่ง	19.89	28.47	17.89	17.94
	ใบ	77.44	86.15	167.97	195.8
ทะเล	กิ่ง	21.25	22.26	17.73	20.12
	ใบ	58.43	187.86	96.69	214.79

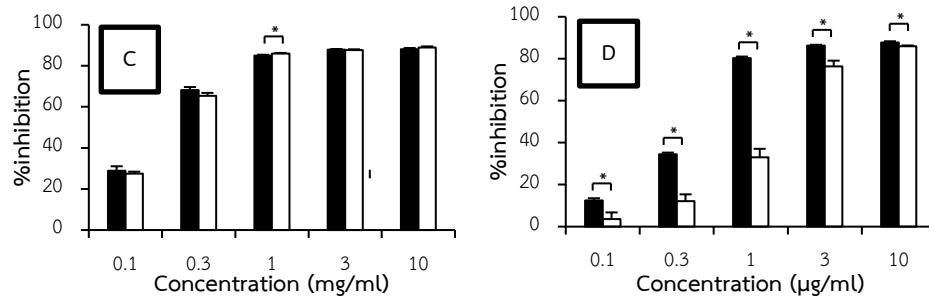
เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นของสารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งบก พบว่าในตัวทำละลายเมทานอล สารสกัด LR มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่า LL ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 0.3 mg/ml โดยมีค่า %Inhibition (LR; $32.43\% \pm 1.25$, $71.75\% \pm 1.42$ และ LL; $22.10\% \pm 1.39$, $51.52\% \pm 2.25$ ตามลำดับ) ในช่วงความเข้มข้น 1 ถึง 10 mg/ml ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งสารสกัด LR และ LL (**รูปภาพที่ 36-A**)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นของสารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของใบ ตำแหน่งบก พบว่าในตัวทำละลายเมทานอล สารสกัด LR มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่า LL ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 1 mg/ml โดยมีค่า %Inhibition (LR; $8.63\% \pm 0.55$, $22.16\% \pm 0.82$, $63.47\% \pm 0.47$ และ LL; $7.54\% \pm 1.59$, $21.95\% \pm 1.74$, 56.76 ± 1.16 ตามลำดับ) ในช่วงความเข้มข้น 3 ถึง 10 mg/ml ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งสารสกัด LR และ LL (รูปภาพที่ 36-B)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นของสารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งทะเล พบว่าในตัวทำละลายเมทานอล สารสกัด LR มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่า LL ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 1 mg/ml โดยมีค่า %Inhibition (LR; $28.88\% \pm 2.19$, $68.17\% \pm 1.5$, $84.98\% \pm 0.42$ และ LL; $27.50\% \pm 0.93$, $65.30\% \pm 1.52$, $85.99\% \pm 0.29$ ตามลำดับ) ในช่วงความเข้มข้น 3 ถึง 10 mg/ml ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งสารสกัด LR และ LL (รูปภาพที่ 36-C)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นของสารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของใบ ตำแหน่งทะเล พบว่าในตัวทำละลายเมทานอล สารสกัด LR มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่า LL ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 3 mg/ml โดยมีค่า %Inhibition (LR; $12.48\% \pm 1.04$, $34.49\% \pm 0.78$, $80.30\% \pm 0.74$, $86.26\% \pm 0.4$ และ LL; $3.58\% \pm 3.19$, $12.18\% \pm 3.21$, $32.96\% \pm 4.11$, 76.31 ± 2.78 ตามลำดับ) ในความเข้มข้น 10 mg/ml ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งสารสกัด LR และ LL (รูปภาพที่ 36-D)





รูปภาพที่ 36 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ของสารสกัด LR (■) เทียบกับ LL (□) ในตัวทำละลายเมทานอล (A; สารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งบก, B; สารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของใบ ตำแหน่งบก, C; สารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งทะเล, D; สารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของใบ ตำแหน่งทะเล) (Independent t- test, *, *p-value* < 0.05)

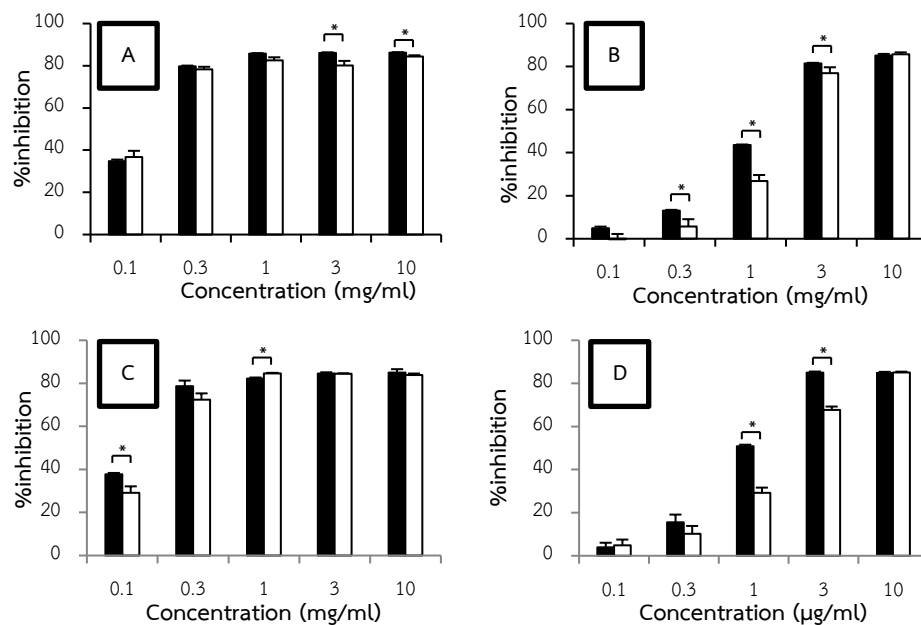
เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นของสารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งบก พบว่าในตัวทำละลายน้ำ สารสกัด LR มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่า LL ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 0.3 mg/ml โดยมีค่า %Inhibition (LR; $34.78\% \pm 0.75$, $79.72\% \pm 0.35$ และ LL; $36.70\% \pm 2.98$, $78.29\% \pm 1.21$ ตามลำดับ) ในช่วงความเข้มข้น 1 ถึง 10 mg/ml ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งสารสกัด LR และ LL (รูปภาพที่ 37-A)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นของสารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของใบ ตำแหน่งบก พบว่าในตัวทำละลายน้ำ สารสกัด LR มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่า LL ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 3 mg/ml โดยมีค่า %Inhibition (LR; $4.89\% \pm 0.32$, $13.07\% \pm 2.34$, $43.58\% \pm 1.87$, $81.48\% \pm 0.28$ และ LL; $-0.26\% \pm 2.47$, $5.68\% \pm 3.4$, 26.77 ± 2.84 , 76.92 ± 2.76 ตามลำดับ) ในความเข้มข้น 10 mg/ml ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งสารสกัด LR และ LL (รูปภาพที่ 37-B)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นของสารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งทะเล พบว่าในตัวทำละลายน้ำ สารสกัด LR มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่า LL ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 0.3 mg/ml โดยมีค่า %Inhibition (LR; $37.76\% \pm 0.60$, $78.69\% \pm 2.6$ และ LL; $29.20\% \pm 2.94$, $72.40\% \pm 2.94$ ตามลำดับ)

ในช่วงความเข้มข้น 1 ถึง 10 mg/ml ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งสารสกัด LR และ LL (รูปภาพที่ 37-C)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นของสารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของใบ ตำแหน่งทะเล พบว่าในตัวทำละลายน้ำ สารสกัด LR มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่า LL ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 3 mg/ml โดยมีค่า %Inhibition (LR; $3.92\% \pm 2.14$, $15.54\% \pm 3.58$, $50.86\% \pm 0.69$, $84.73\% \pm 0.51$ และ LL; $4.88\% \pm 2.65$, $10.18\% \pm 3.66$, $29.26\% \pm 2.37$, $67.75\% \pm 1.52$ ตามลำดับ) ในความเข้มข้น 10 mg/ml ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งสารสกัด LR และ LL (รูปภาพที่ 37-D)



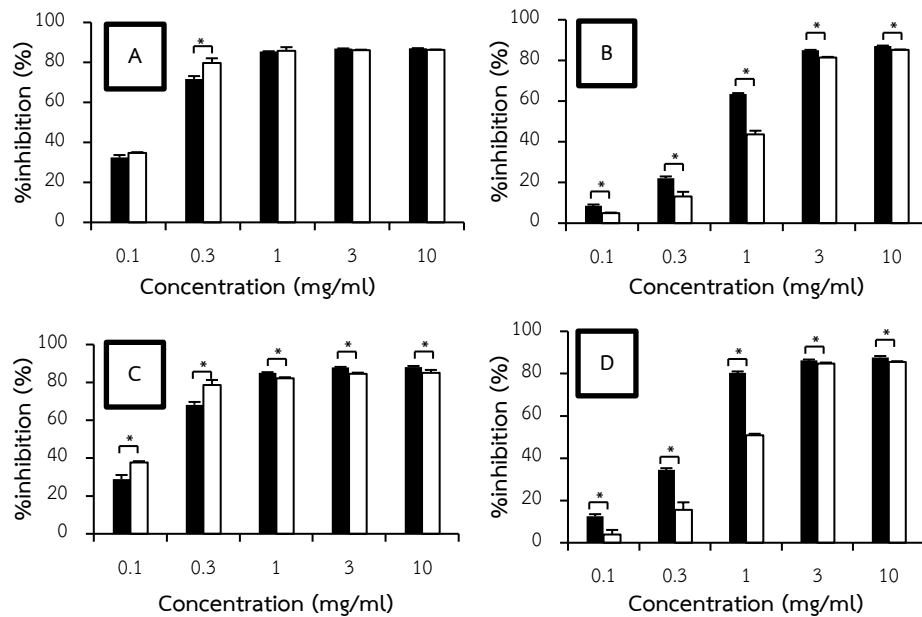
รูปภาพที่ 37 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ของสารสกัด LR (■) เทียบกับ LL (□) ในตัวทำละลายน้ำ (A; สารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งบก, B; สารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของใบ ตำแหน่งบก, C; สารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งทะเล, D; สารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนของใบ ตำแหน่งทะเล) (Independent t-test, *, $p\text{-value} < 0.05$)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นของสารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำของ LR ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งบก พบว่าในตัวทำละลายน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าเมทานอลในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 0.3 mg/ml โดยมีค่า %Inhibition (เมทานอล; $32.43\% \pm 1.25$, $71.75\% \pm 1.42$ และ น้ำ; $34.78\% \pm 0.75$, $79.72\% \pm 0.35$ ตามลำดับ) ในช่วงความเข้มข้น 1 ถึง 10 mg/ml ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งตัวทำละลายเมทานอลกับน้ำ (รูปภาพที่ 38-A)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นของสารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำของ LR ส่วนของใบ ตำแหน่งบก พบว่าในตัวทำละลายเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าน้ำในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 1 mg/ml โดยมีค่า %Inhibition (เมทานอล; $8.63\% \pm 0.55$, $22.16\% \pm 0.82$, 63.47 ± 0.47 และ น้ำ; $12.48\% \pm 1.04$, $34.49\% \pm 0.78$, $80.3\% \pm 0.74$ ตามลำดับ) ในช่วงความเข้มข้น 3 ถึง 10 mg/ml ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งตัวทำละลายเมทานอลกับน้ำ (รูปภาพที่ 38-B)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นของสารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำของ LR ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งทะเล พบว่าในตัวทำละลายน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าเมทานอลในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 0.3 mg/ml โดยมีค่า %Inhibition (เมทานอล; $28.88\% \pm 2.19$, $68.17\% \pm 1.5$ และ น้ำ; $37.76\% \pm 0.60$, $78.69\% \pm 2.60$ ตามลำดับ) ในช่วงความเข้มข้น 1 ถึง 10 mg/ml ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งตัวทำละลายเมทานอลกับน้ำ (รูปภาพที่ 38-C)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นของสารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำของ LR ส่วนของใบ ตำแหน่งทะเล พบว่าในตัวทำละลายเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าน้ำในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 1 mg/ml โดยมีค่า %Inhibition (เมทานอล; $12.48\% \pm 1.04$, $34.49\% \pm 0.78$, $80.3\% \pm 0.74$ และ น้ำ; $3.92\% \pm 2.14$, $15.54\% \pm 3.58$, $50.86\% \pm 0.69$ ตามลำดับ) ในช่วงความเข้มข้น 3 ถึง 10 mg/ml ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งตัวทำละลายเมทานอลกับน้ำ (รูปภาพที่ 38-D)



รูปภาพที่ 38 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ของสารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอล (■) เทียบกับน้ำ (□) (A; สารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำของ LR ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งบก, B; สารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำ ของ LR ส่วนของใบ ตำแหน่งบก, C; สารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำ ของ LR ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งทะเล, D; สารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำ ของ LR ส่วนของใบ ตำแหน่งทะเล) (Independent t- test, *, p -value < 0.05)

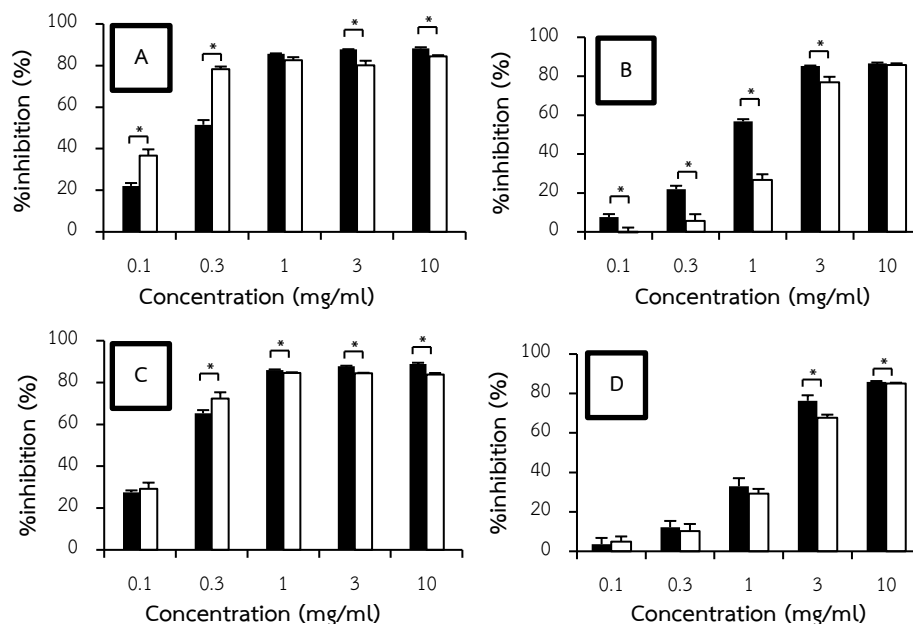
เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นของสารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำของ LL ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งบก พบว่าในตัวทำละลายน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าเมทานอลในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 0.3 mg/ml โดยมีค่า %Inhibition (เมทานอล; $22.1\% \pm 1.39$, $51.52\% \pm 2.25$ และ น้ำ; $36.70\% \pm 2.98$, $78.29\% \pm 1.21$ ตามลำดับ) ในช่วงความเข้มข้น 1 ถึง 10 mg/ml ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งตัวทำละลายเมทานอลกับน้ำ (รูปภาพที่ 39-A)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นของสารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำของ LL ส่วนของใบ ตำแหน่งบก พบว่าในตัวทำละลายเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าน้ำในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 3 mg/ml โดยมีค่า %Inhibition (เมทานอล; $7.54\% \pm 1.59$, $21.95\% \pm 1.74$, $56.76\% \pm 1.16$, $85.18\% \pm$

0.29 และ น้ำ; $-0.26\% \pm 2.47$, $5.68\% \pm 3.4$, $26.77\% \pm 2.84$, $76.92\% \pm 2.76$ ตามลำดับ) ในความเข้มข้น 10 mg/ml ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งตัวทำละลายเมทานอลกับน้ำ (รูปภาพที่ 39-B)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นของสารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำของ LL ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งทะเล พบว่าในตัวทำละลายน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าเมทานอลในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 0.3 mg/ml โดยมีค่า %Inhibition (เมทานอล; $27.50\% \pm 0.93$, $65.30\% \pm 1.52$ และ น้ำ; $29.2\% \pm 2.94$, $72.4\% \pm .4$ ตามลำดับ) ในช่วงความเข้มข้น 1 ถึง 10 mg/ml ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งตัวทำละลายเมทานอลกับน้ำ (รูปภาพที่ 39-C)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นของสารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำของ LL ส่วนของใบ ตำแหน่งทะเล พบว่าในตัวทำละลายเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าน้ำในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 3 mg/ml โดยมีค่า %Inhibition (เมทานอล; $3.58\% \pm 3.19$, $12.18\% \pm 3.21$, $32.96\% \pm 4.11$, $76.31\% \pm 2.78$ และ น้ำ; $4.88\% \pm 2.65$, $10.18\% \pm 3.66$, $29.26\% \pm 2.37$, $67.75\% \pm 1.52$ ตามลำดับ) ในความเข้มข้น 10 mg/ml ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งตัวทำละลายเมทานอลกับน้ำ (รูปภาพที่ 39-D)



รูปภาพที่ 39 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ของสารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอล (■) เทียบกับน้ำ (□) (A; สารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำ ของ LL ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งบก, B; สารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำ ของ LL ส่วนของใบ ตำแหน่งบก, C; สารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำ ของ LL ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งทะเล, D; สารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเทียบกับน้ำ ของ LL ส่วนของใบ ตำแหน่งทะเล) (Independent t- test, *, $p\text{-value} < 0.05$)

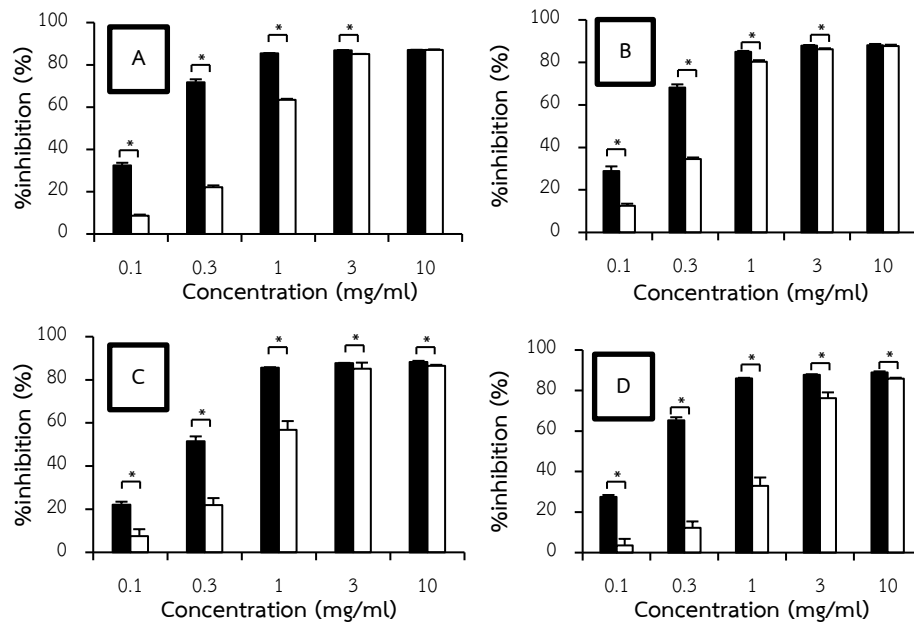
เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นของสารสกัดส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบของ LR ในตัวทำละลายเมทานอล ตำแหน่งบก พบว่าส่วนกิ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าส่วนใบในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 1 mg/ml โดยมีค่า %Inhibition (ส่วนกิ่ง; $32.43\% \pm 1.25$, $71.75\% \pm 1.42$, $85.44\% \pm 0.14$ และ ส่วนใบ; $8.63\% \pm 0.55$, $22.16\% \pm 0.82$, $63.47\% \pm 0.47$ ตามลำดับ) ในความเข้มข้น 3 ถึง 10 mg/ml ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ (รูปภาพที่ 40-A)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นของสารสกัดส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบของ LR ในตัวทำละลายเมทานอล ตำแหน่งทะเล พบว่าส่วนกิ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าส่วนใบในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 0.3 mg/ml โดยมีค่า %Inhibition (ส่วนกิ่ง; $28.88\% \pm 2.19$, $68.17\% \pm 1.50$ และ ส่วนใบ; $12.48\% \pm 1.04$, $34.49\% \pm 0.78$ ตามลำดับ) ในความเข้มข้น 1 ถึง 10 mg/ml ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ (รูปภาพที่ 40-B)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นของสารสกัดส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบของ LL ในตัวทำละลายเมทานอล ตำแหน่งบก พบว่าส่วนกิ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าส่วนใบในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 1 mg/ml โดยมีค่า %Inhibition (ส่วนกิ่ง; $22.1\% \pm 1.39$, $51.52\% \pm 2.25$, $85.62\% \pm 0.22$ และ ส่วนใบ; $7.54\% \pm 1.59$, $21.95\% \pm 1.74$, $56.76\% \pm 1.16$ ตามลำดับ) ในความเข้มข้น 3 ถึง 10 mg/ml ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ (รูปภาพที่ 40-C)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นของสารสกัดส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบของ LL ในตัวทำละลายเมทานอล ตำแหน่งทะเล พบว่าส่วนกิ่งมีฤทธิ์

ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าส่วนใบในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 3 mg/ml โดยมีค่า %Inhibition (ส่วนกิ่ง; $27.5\% \pm 0.93$, $65.3\% \pm 1.52$, $85.99\% \pm 0.29$, $87.75\% \pm 0.29$ และ ส่วนใบ; $3.58\% \pm 3.19$, $12.18\% \pm 3.21$, $32.96\% \pm 4.11$ ตามลำดับ) ในความเข้มข้น 10 mg/mlฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ (รูปภาพที่ 40-D)



รูปภาพที่ 40 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ของสารสกัดจากส่วนกิ่ง (■) เทียบกับส่วนใบ (□) ในตัวทำละลายเมทานอล (A; สารสกัดจากส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ ของ LR ในตัวทำละลายเมทานอล ตำแหน่งบก, B; สารสกัดจากส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ ของ LR ในตัวทำละลายเมทานอล ตำแหน่งทะเล, C; สารสกัดจากส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ ของ LL ในตัวทำละลายเมทานอล ตำแหน่งบก, D; สารสกัดจากส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ ของ LL ในตัวทำละลายเมทานอล ตำแหน่งทะเล) (Independent t- test, *; $p\text{-value} < 0.05$)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นของสารสกัดส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบของ LR ในตัวทำละลายน้ำ ตำแหน่งบก พบว่าส่วนกิ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าส่วนใบในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 1 mg/ml โดยมีค่า %Inhibition (ส่วนกิ่ง; $34.78\% \pm 0.75$, $79.72\% \pm 0.35$, $85.76\% \pm 0.21$ และ ส่วนใบ; $4.89\% \pm 0.32$,

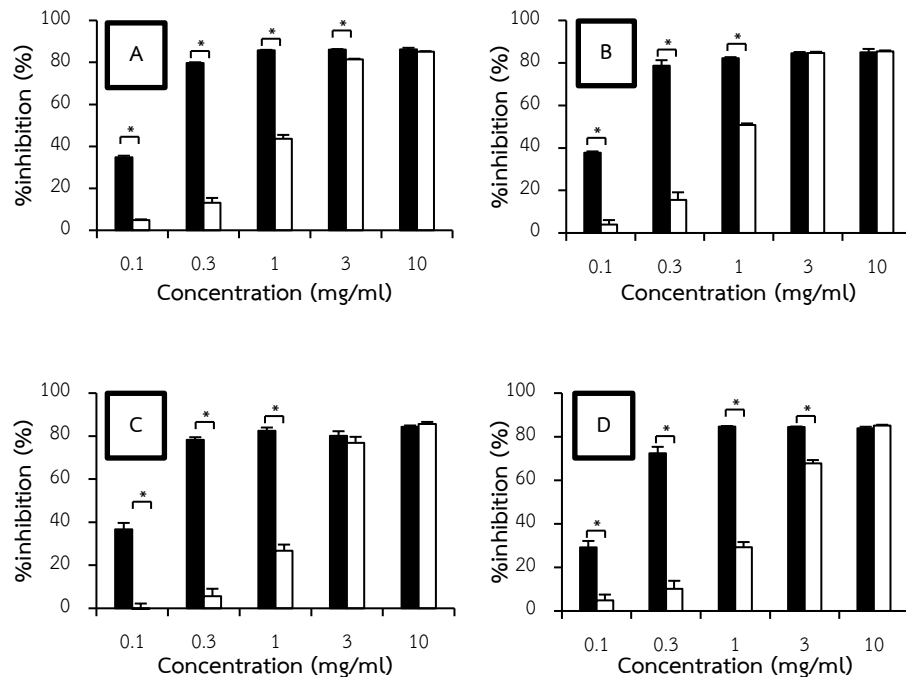
13.07% $\pm$ 2.34, 43.58% $\pm$ 1.87 ตามลำดับ) ในความเข้มข้น 3 ถึง 10 mg/ml ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ

(รูปภาพที่ 41-A)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นของสารสกัดส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบของ LR ในตัวทำละลายน้ำ ตำแหน่งทะเล พบว่าส่วนกิ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าส่วนใบในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 1 mg/ml โดยมีค่า %Inhibition (ส่วนกิ่ง; 37.76% $\pm$ 0.6, 78.69% $\pm$ 2.6, 82.23% $\pm$ 0.49 และ ส่วนใบ; 3.92% $\pm$ 2.14, 15.54% $\pm$ 3.58, 50.86% $\pm$ 0.69 ตามลำดับ) ในความเข้มข้น 3 ถึง 10 mg/ml ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ **(รูปภาพที่ 41-B)**

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นของสารสกัดส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบของ LL ในตัวทำละลายน้ำ ตำแหน่งบก พบว่าส่วนกิ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าส่วนใบในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 1 mg/ml โดยมีค่า %Inhibition (ส่วนกิ่ง; 36.7% $\pm$ 2.98, 78.29% $\pm$ 1.21, 82.49% $\pm$ 1.52 และ ส่วนใบ; -0.26% $\pm$ 2.47, 5.68% $\pm$ 3.40, 26.77% $\pm$ 2.84 ตามลำดับ) ใน=ช่วงความเข้มข้น 3 ถึง 10 mg/ml ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ **(รูปภาพที่ 41-C)**

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นของสารสกัดส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบของ LL ในตัวทำละลายน้ำ ตำแหน่งทะเล พบว่าส่วนกิ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าส่วนใบในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 3 mg/ml โดยมีค่า %Inhibition (ส่วนกิ่ง; 29.2% $\pm$ 2.94, 72.4% $\pm$ 2.94, 84.64% $\pm$ 0.25, 84.44% $\pm$ 0.23 และ ส่วนใบ; 4.88% $\pm$ 2.65, 10.18% $\pm$ 3.66, 29.26% $\pm$ 2.37, 67.75% $\pm$ 1.52 ตามลำดับ) ในความเข้มข้น 10 mg/ml ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ **(รูปภาพที่ 41-D)**



รูปภาพที่ 41 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ของสารสกัดจากส่วนกิ่ง (■) เทียบกับส่วนใบ (□) ในตัวทำละลายน้ำ (A; สารสกัดจากส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ ของ LR ในตัวทำละลายน้ำตำแหน่งบก, B; สารสกัดจากส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ ของ LR ในตัวทำละลายน้ำตำแหน่งทะเล, C; สารสกัดจากส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ ของ LL ในตัวทำละลายน้ำ ตำแหน่งบก, D; สารสกัดจากส่วนกิ่งเทียบกับส่วนใบ ของ LL ในตัวทำละลายน้ำ ตำแหน่งทะเล) (Independent t- test, *; p -value < 0.05)

ตารางที่ 6 แสดงการเปรียบเทียบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระระหว่างตำแหน่งบกกับทะเล ที่สปีชีส์ต่างๆ ส่วนของพืชต่างๆ โดยใช้ตัวทำละลายเมทานอลและน้ำ ด้วยวิธี DPPH assay

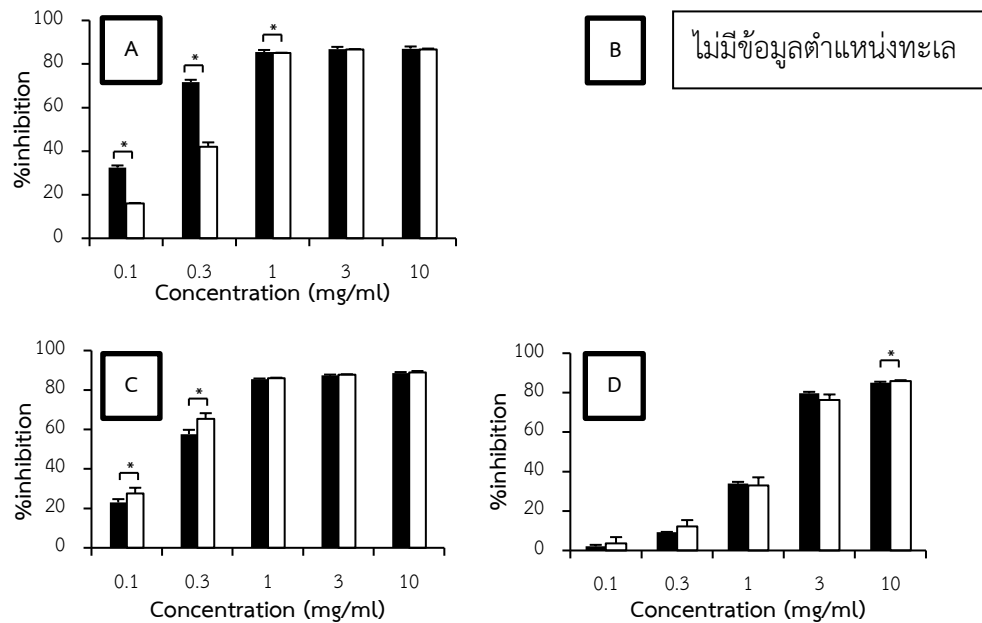
ตำแหน่ง	ส่วน	IC50 (mg/ml)			
		บก		ทะเล	
		LR	LL	LR	LL
MeOH	กิ่ง	19.89	25.53	52.62	22.26
	ใบ	77.44	181.89	ไม่มีข้อมูล	187.86
DW	กิ่ง	17.89	23.93	66.38	20.12
	ใบ	167.97	250.9	ไม่มีข้อมูล	214.79

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ของตำแหน่งบก เทียบกับตำแหน่งทะเลของสารสกัด LR ส่วนของกิ่ง พบว่าในตัวทำละลายเมทานอล ตำแหน่งบก มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าตำแหน่งทะเล ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 0.3 mg/ml โดยมีค่า %Inhibition (ตำแหน่งบก; $32.43\% \pm 1.25$, $71.75\% \pm 1.42$ และตำแหน่งทะเล; $16.03\% \pm 0.17$, $42.01\% \pm 2.01$ ตามลำดับ) ในช่วงความเข้มข้น 1 ถึง 10 mg/ml ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งตำแหน่งบกและตำแหน่งทะเล (รูปภาพที่ 42-A)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำแหน่งบก เทียบกับตำแหน่งทะเลของสารสกัด LR ส่วนของใบ พบว่าในตัวทำละลายเมทานอล ไม่สามารถเปรียบเทียบกันได้เนื่องจากตำแหน่งทะเลขาดข้อมูล (รูปภาพที่ 42-B)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำแหน่งบก เทียบกับตำแหน่งทะเลของสารสกัด LL ส่วนของกิ่ง พบว่าในตัวทำละลายเมทานอล ตำแหน่งบก มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าตำแหน่งทะเล ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 0.3 mg/ml โดยมีค่า %Inhibition (ตำแหน่งบก; $22.99\% \pm 1.68$, $57.65\% \pm 2.15$ และ ตำแหน่งทะเล; $27.50\% \pm 0.93$, $65.30\% \pm 1.52$ ตามลำดับ) ในช่วงความเข้มข้น 1 ถึง 10 mg/ml ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งตำแหน่งบกและตำแหน่งทะเล (รูปภาพที่ 42-C)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำแหน่งบก เทียบกับตำแหน่งทะเลของสารสกัด LL ส่วนของใบ พบว่าในตัวทำละลายเมทานอล ตำแหน่งบกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าตำแหน่งทะเล ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 0.3 mg/ml โดยมีค่า %Inhibition (ตำแหน่งบก; $22.99\% \pm 1.68$, $57.65\% \pm 2.15$ และ ตำแหน่งทะเล; $27.50\% \pm 0.93$, $65.30\% \pm 1.52$ ตามลำดับ) ในช่วงความเข้มข้น 1 ถึง 10 mg/ml ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ DPPH มีความเสถียรขึ้นมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งตำแหน่งบกและตำแหน่งทะเล (รูปภาพที่ 42-D)



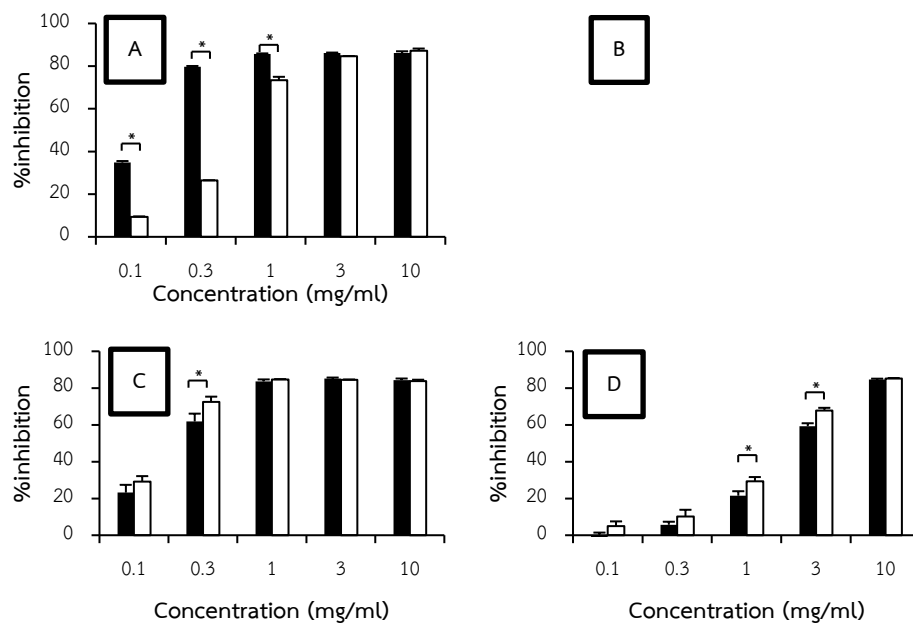
รูปภาพที่ 42 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ของสารสกัดจากตำแหน่งบก (■) เทียบกับทะเล (□) ในตัวทำละลายเมทานอล (A; สารสกัดจากตำแหน่งบกเทียบกับทะเล ของ LR ในตัวทำละลายเมทานอล ส่วนกึ่ง, B; สารสกัดจากตำแหน่งบกเทียบกับทะเล ของ LR ในตัวทำละลายเมทานอล ส่วนใบ (ไม่มีข้อมูลตำแหน่งทะเล), C; สารสกัดจากตำแหน่งบกเทียบกับทะเล ของ LL ในตัวทำละลายเมทานอล ส่วนกึ่ง, D; สารสกัดจากตำแหน่งบกเทียบกับทะเล ของ LL ในตัวทำละลายเมทานอล ส่วนใบ) (Independent t- test, *, p -value < 0.05)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำแหน่งบก เทียบกับตำแหน่งทะเล ของสารสกัด LR ส่วนของกึ่ง พบว่าในตัวทำละลายน้ำ ตำแหน่งบก มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าตำแหน่งทะเล ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 1 mg/ml โดยมีค่า %Inhibition (ตำแหน่งบก; $34.78\% \pm 0.75$, $79.72\% \pm 0.35$, $85.76\% \pm 0.21$ และ ตำแหน่งทะเล; $9.40\% \pm 0.17$, $26.43\% \pm 0.08$, $73.47\% \pm 1.52$ ตามลำดับ) ในช่วงความเข้มข้น 3 ถึง 10 mg/ml ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งตำแหน่งบกและตำแหน่งทะเล (รูปภาพที่ 43-A)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำแหน่งบก เทียบกับตำแหน่งทะเล ของสารสกัด LR ส่วนของใบ พบว่าในตัวทำละลายน้ำ ไม่สามารถเปรียบเทียบกันได้ เนื่องจากตำแหน่งทะเลขาดข้อมูล (รูปภาพที่ 43-B)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำแหน่งบก เทียบกับตำแหน่งทะเลของสารสกัด LL ส่วนของกิ่ง พบว่าในตัวทำละลายน้ำ ตำแหน่งบก มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าตำแหน่งทะเล ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 0.3 mg/ml โดยมีค่า %Inhibition (ตำแหน่งบก; $23.18\% \pm 4.21$, $61.85\% \pm 4.26$ และ ตำแหน่งทะเล; $29.20\% \pm 2.94$, $72.40\% \pm 2.94$ ตามลำดับ) ในช่วงความเข้มข้น 1 ถึง 10 mg/ml ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งตำแหน่งบกและตำแหน่งทะเล (รูปภาพที่ 43-C)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำแหน่งบก เทียบกับตำแหน่งทะเลของสารสกัด LL ส่วนของใบ พบว่าในตัวทำละลายน้ำ ตำแหน่งบกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าตำแหน่งทะเล ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 3 mg/ml โดยมีค่า %Inhibition (ตำแหน่งบก; $1.20\% \pm 2.63$, $5.70\% \pm 1.64$, $21.51\% \pm 2.42$, $59.30\% \pm 1.59$ และ ตำแหน่งทะเล; $4.88\% \pm 2.65$, $10.18\% \pm 3.66$, $29.26\% \pm 2.37$, $67.75\% \pm 1.52$ ตามลำดับ) ในช่วงความเข้มข้น 10 mg/ml ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีแนวโน้มที่สูงขึ้นทั้งตำแหน่งบกและตำแหน่งทะเล (รูปภาพที่ 43-D)



รูปภาพที่ 43 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ของสารสกัดจากตำแหน่งบก (■) เทียบกับทะเล (□) ในตัวทำละลายน้ำ (A; สารสกัดจากตำแหน่งบกเทียบกับทะเล ของ LR ในตัวทำละลายน้ำ ส่วนกิ่ง, B; สารสกัดจากตำแหน่งบกเทียบกับทะเล ของ LR ใน

ตัวทำละลายน้ำ ส่วนใบ (ไม่มีข้อมูลตำแหน่งทะเล), C; สารสกัดจากตำแหน่งบกเทียบกับทะเล ของ LL ในตัวทำละลายน้ำ ส่วนกิ่ง, D; สารสกัดจากตำแหน่งบกเทียบกับทะเล ของ LL ในตัวทำละลายน้ำ ส่วนใบ) (Independent t- test, *, $p\text{-value} < 0.05$)

สรุปผลการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay พบว่าในการเปรียบเทียบสปีชีส์ของพืช สารสกัด LR มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารสกัด LL ในทั้งสองตัวทำละลาย สองส่วนของพืช และสองตำแหน่งที่ตั้ง และจากผลการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay พบว่าผลไปในทิศทางเดียวกันกับการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay โดยในการเปรียบเทียบสปีชีส์ของพืช LR มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่า LL ในทั้งสองตัวทำละลาย สองส่วนของพืช สารและสองตำแหน่งที่ตั้ง โดยจากงานวิจัยของ Vittaya L, Charoendat U, Janyong S, Leesakul (2020). (32) สารสกัด LL ส่วนของใบ เก็บตัวอย่างจาก Trang, Thailand มีค่า IC_{50} 28.17 mcg/ml และงานวิจัยของ Tanvira Paul, (2017). (33) สารสกัด LR ส่วนของใบ เก็บตัวอย่างจาก Pichavaram mangrove forest located along the southeastern coastline, in the state of Tamil Nadu, India มีค่า IC_{50} 38.89 mcg/ml จะเห็นได้ว่าสารสกัด LL มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่า LR จากรายงานผลงานวิจัยจะเห็นได้ว่างานวิจัยของเรามีความชัดเจนมากกว่า เนื่องจากเก็บสารสกัดมาจากตำแหน่งเดียวกัน ซึ่งจะควบคุมปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการสร้างสารออกฤทธิ์

ในการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay ของระบบตัวทำละลาย ตัวทำละลายน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าตัวทำละลายเมทานอล ยกเว้นของ LL ตำแหน่งบก ส่วนของใบ และ LR ตำแหน่งทะเล ส่วนของใบ ในการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ของระบบตัวทำละลาย สารสกัดส่วนกิ่งจากตัวทำละลายน้ำ ทั้งสองสปีชีส์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าเมทานอล ยกเว้น สารสกัดส่วนใบด้วยตัวทำละลายเมทานอลที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าน้ำ ในทั้งสองสปีชีส์ และสองตำแหน่งที่ตั้ง โดยจากงาน วิจัยของ Nguyen, et al. (2015). (34) ในการศึกษาผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดฝาดดอกขาว (LR) โดยใช้ตัวทำละลายเมทานอล ไดคลอโรมีเทน และบิวทานอล ด้วยวิธีวิเคราะห์ reducing capacity ซึ่งคล้ายกับหลักการวิเคราะห์ของ FRAP และ DPPH คือการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากปริมาณของสารที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันลดลง ประเมินจากการส่งผ่านอิเล็กตรอนให้กับอนุมูลอิสระ พบว่าสารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลมีความสามารถในการ reducing ที่ดีกว่าไดคลอโรมีเทนและบิวทานอล ตามลำดับ ในทางตรงกัน

ข้ามหาวิเคราะห์ด้วยวิธี ORAC ที่มีหลักการประเมินจากการส่งผ่านอะตอมไฮโดรเจนกับอนุมูลอิสระ ผลที่ได้จะตรงข้ามกับวิธีข้างต้นดังนั้นความมีขั้วของตัวทำละลายไม่สัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ อาจขึ้นกับวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ เนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระมีกลไกการออกฤทธิ์ที่หลากหลาย

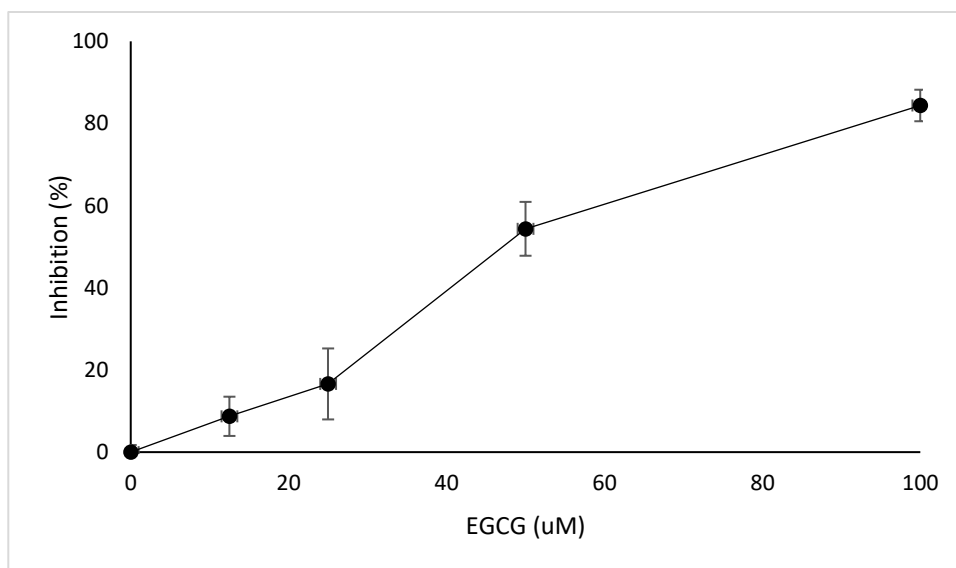
ในการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay ของส่วนของพืชพบว่าส่วนกิ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าส่วนใบ ในทั้งสองสปีชีส์ สองตัวทำละลาย และสองตำแหน่งที่ตั้ง เช่นเดียวกันกับการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ส่วนของพืชพบว่า ส่วนของกิ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าส่วนใบ ในทั้งสองสปีชีส์ สองตัวทำละลาย และสองตำแหน่งที่ตั้ง โดยมีค่า IC_{50} สูงสุดคือ 17.73 mg/mL เป็นของสารสกัดจากตัวทำละลายน้ำ ส่วนกิ่ง ตำแหน่งทะเล จากงานวิจัยของ Vittaya L, Charoendat U, Janyong S, Leesakul (2020). (32) สารสกัดฝาดดอกขาว (LR) จากตัวทำละลายเมทานอลของเปลือกต้นและกิ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าใบ โดยมีค่า IC_{50} = 6.49 ± 0.53 , 7.38 ± 0.04 , 28.17 ± 0.18 mg/mL ตามลำดับ

ในการเปรียบเทียบตำแหน่งของพืช ผลการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ FRAP assay ใน LR ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งบกมีฤทธิ์มากกว่าตำแหน่งทะเล คล้อยตามกับผลของ DPPH assay ที่พบว่า LR ที่ตำแหน่งบกมีฤทธิ์มากกว่าตำแหน่งทะเล ในทั้งสองตัวทำละลาย และสองส่วนของพืช แต่ผลของ FRAP มีข้อแตกต่างตรง LL ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งบกมีฤทธิ์น้อยกว่าตำแหน่งทะเล ผลของส่วนใบมีความไม่ชัดเจนทั้งในตัวทำละลายน้ำ และเมทานอล

จากการค้นคว้างานวิจัยอื่นยังไม่มีการระบุตำแหน่งที่มาที่ชัดเจน แต่จากงานวิจัยอื่นมีการศึกษาฝาดดอกขาว ซึ่งฝาดดอกขาวมีการกระจายตัวอย่างแพร่หลายในแต่ละภูมิภาค ซึ่งเป็นภูมิภาคที่ไม่ติดทะเล ทำให้เห็นว่าทั้งสารสกัด LR และสารสกัด LL ตำแหน่งในการเกิดต่างกันมีผลต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ และสารที่ออกฤทธิ์ที่สกัดออกมาเป็นกลุ่มเดียวกัน จากผลของตัวทำละลาย โดยที่สารสกัด LR มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารสกัด LL ซึ่งมาจากปริมาณสารที่มากกว่า

4.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Tyrosinase inhibition assay

การทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดฝาดดอกขาว (LR) และฝาดดอกแดง (LL) ในตัวทำละลายเมทานอล ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.3, 1, 3 และ 10 mg/ml และคำนวณหาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเทียบกับสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส Epigallocatechin gallate (EGCG) แล้วรายงานค่าที่คำนวณได้เป็น % Inhibition (mean $\pm$ S.D.)



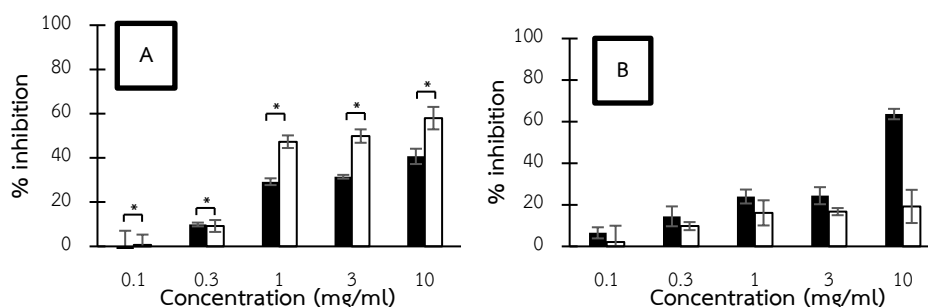
รูปภาพที่ 44 กราฟสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส Epigallocatechin gallate (EGCG) โดยวิธี Tyrosinase inhibition assay

ตารางที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระระหว่างสารสกัดฝาดดอกขาว (LR) และฝาดดอกแดง (LL) และส่วนกิ่ง ที่ตำแหน่งใกล้เคียงกัน (บก, ทะเล) โดยใช้ตัวทำละลายเมทานอล ด้วยวิธี Tyrosinase inhibition assay

ตำแหน่ง	ส่วน	IC ₅₀ (μg/ml)	
		MeOH	
		LR	LL
บก	กิ่ง	>10	1.06
ทะเล	กิ่ง	1.65	>10

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนกิ่ง ตำแหน่งบก ทั้งหมด 5 ความเข้มข้น พบว่าในตัวทำละลายเมทานอล สารสกัด LR มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสน้อยกว่าสารสกัด LL ได้ค่า % Inhibition $-9.40\% \pm 16.47$, $29.24\% \pm 1.53$, $31.48\% \pm 0.85$, $40.69\% \pm 3.46$ และ $0.64\% \pm 4.69$, $47.33\% \pm 2.85$, $49.87\% \pm 3.03$, $57.98\% \pm 5.08$ ตามลำดับ แต่พบความแตกต่างที่ความเข้มข้น 0.3 mg/ml พบว่าสารสกัด LR มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากกว่าสารสกัด LL ได้ค่า % Inhibition $9.90\% \pm 0.86$ และ $9.22\% \pm 2.69$ ตามลำดับ (รูปภาพที่ 45-A)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัด LR เทียบกับ LL ส่วนกิ่ง ตำแหน่งทะเล ทั้งหมด 5 ความเข้มข้น พบว่าในตัวทำละลายเมทานอล ทุกความเข้มข้น สารสกัด LR มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากกว่าสารสกัด LL ได้ค่า % Inhibition $6.52\% \pm 2.67$, $14.45\% \pm 4.78$, $24.00\% \pm 3.35$, $24.38\% \pm 4.11$, $63.67\% \pm 2.50$ และ $2.09\% \pm 7.86$, $9.75\% \pm 1.94$, $16.12\% \pm 6.05$, $16.72\% \pm 1.72$, $19.23\% \pm 7.99$ ตามลำดับ (รูปภาพที่ 45-B)



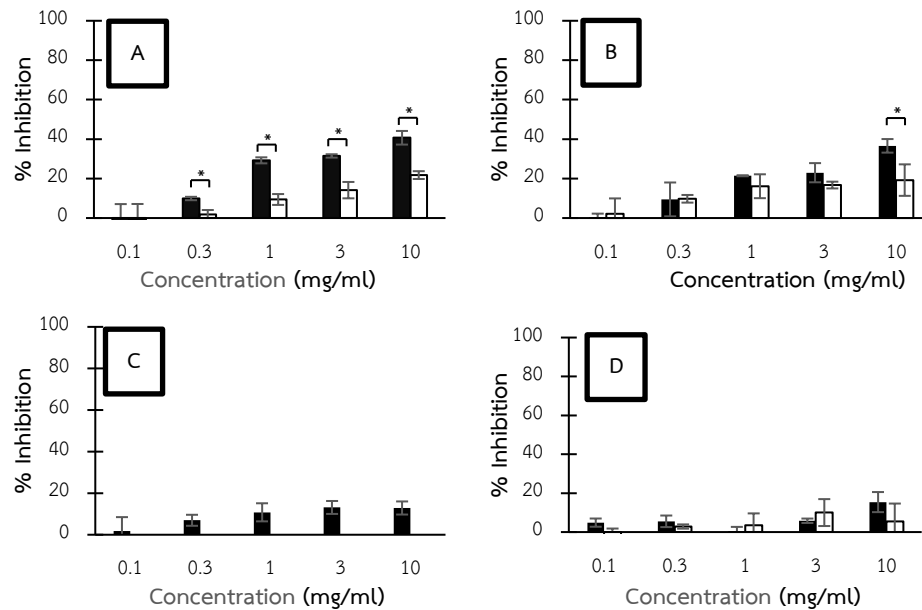
รูปภาพที่ 45 กราฟแสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยใช้ Tyrosinase inhibition assay ของสารสกัด LR (■) กับ LL (□) ในตัวทำละลายเมทานอล ส่วนกิ่ง ตำแหน่งบก และตำแหน่งทะเล (Independent t- test, *; p -value < 0.05)

ตารางที่ 8 แสดงการเปรียบเทียบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระระหว่างตำแหน่งบกกับทะเลที่สปีชีส์ต่างๆ ส่วนของกิ่ง โดยใช้ตัวทำละลายเมทานอล ด้วยวิธี Tyrosinase inhibition assay

ตำแหน่ง	ส่วน	IC ₅₀ (µg/ml)	
		MeOH	
		LR	LL
บก	กิ่ง	>10	>10
	ใบ	>10	>10
ทะเล	กิ่ง	>10	>10
	ใบ	>10	>10

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของตำแหน่งบกเทียบกับตำแหน่งทะเล ในสารสกัด LR ส่วนกิ่ง ทั้งหมด 5 ความเข้มข้น พบว่าในตัวทำละลายเมทานอล ตำแหน่งบกมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากกว่าตำแหน่งทะเล ได้ค่า % Inhibition $9.90\% \pm 0.86$, $29.24\% \pm 1.53$, $31.48\% \pm 0.85$, $40.69\% \pm 3.46$ และ $1.74\% \pm 2.32$, $9.4\% \pm 2.75$, $14.14\% \pm 4.15$, $21.77\% \pm 1.98$ ตามลำดับ แต่พบความแตกต่างที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml พบว่าตำแหน่งบกมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสน้อยกว่าตำแหน่งทะเล ได้ค่า % Inhibition $-9.40\% \pm 16.47$ และ $-0.8\% \pm 7.92$ ตามลำดับ (รูปภาพที่ 46-A)

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของตำแหน่งบกเทียบกับตำแหน่งทะเล ในสารสกัด LL ส่วนกิ่ง ทั้งหมด 5 ความเข้มข้น พบว่าในตัวทำละลายเมทานอล ที่ความเข้มข้น 5, 15 µg/ml ตำแหน่งบกมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสน้อยกว่าตำแหน่งทะเล ได้ค่า % Inhibition $0.46\% \pm 1.77$, $9.44\% \pm 8.58$ และ $2.09\% \pm 7.86$, 9.75 ± 1.94 ตามลำดับ แต่พบความแตกต่างที่ความเข้มข้น 1, 3, 10 mg/ml พบว่าตำแหน่งบกมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากกว่าตำแหน่งทะเล ได้ค่า % Inhibition $21.43\% \pm 0.26$, $22.98\% \pm 4.86$, $36.59\% \pm 3.44$ และ $16.12\% \pm 6.05$, $16.72\% \pm 1.72$, $19.23\% \pm 7.99$ ตามลำดับ (รูปภาพที่ 46-B)



รูปภาพที่ 46 กราฟแสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยใช้ Tyrosinase inhibition assay ของตำแหน่งบก (■) เทียบกับตำแหน่งทะเล (□) ของสารสกัด LR และสารสกัด LL ในตัวทำละลายเมทานอล (A; สารสกัดจากตำแหน่งบกเทียบกับทะเล ของ LR ในตัวทำละลายเมทานอล ส่วนกึ่ง, B; สารสกัดจากตำแหน่งบกเทียบกับทะเล ของ LL ในตัวทำละลายเมทานอล ส่วนกึ่ง, C; สารสกัดจากตำแหน่งบกเทียบกับทะเล ของ LR ในตัวทำละลายเมทานอล ส่วนใบ, D; สารสกัดจากตำแหน่งบกเทียบกับทะเล ของ LL ในตัวทำละลายเมทานอล ส่วนใบ) (Independent t- test, *, p -value < 0.05)

สรุปการเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสพบว่าในการเปรียบเทียบสปีชีส์ของพืช สารสกัด LR ในตัวทำละลายเมทานอล ส่วนของกึ่ง ตำแหน่งที่ตั้งบก มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสน้อยกว่าสารสกัด LL แตกต่างจากตำแหน่งที่ตั้งทะเล ส่วนของกึ่ง สารสกัด LR มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากกว่าสารสกัด LL ทั้งนี้ยังไม่มีการวิจัยใดที่ศึกษาในการเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสระหว่าง LR และ LL

ในการเปรียบเทียบตำแหน่งที่ตั้งบก และทะเล สารสกัด LL ในตัวทำละลายเมทานอล ส่วนของกึ่ง ตำแหน่งทะเลมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากกว่าตำแหน่งบก ส่วนในสารสกัด LR ในตัวทำละลายเมทานอล ส่วนของกึ่ง ตำแหน่งบกมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากกว่าตำแหน่งทะเล

จากผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจึงเลือกสารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอล มาใช้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าในการเปรียบเทียบสปีชีส์ LR มีฤทธิ์ดีกว่า LL ใน ส่วนของกิ่ง ตำแหน่งทะเล ซึ่งแตกต่างจากส่วนของกิ่ง ตำแหน่งบก, ส่วนของกิ่งและใบ ตำแหน่ง ทะเล ที่ LL มีฤทธิ์ดีกว่า LR ในการเปรียบเทียบส่วนของพืช พบว่าส่วนกิ่งฤทธิ์ดีกว่าส่วนใบ ในทั้ง สองสปีชีส์ และสองตำแหน่งที่ตั้ง และฤทธิ์ของตำแหน่งบกดีกว่าทะเล โดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง >10 mg/ml ทั้งใน LL และ LR (LR ส่วนกิ่ง, 0.3 mg/ml: %inhibition เท่ากับ 9.90 ± 0.86 และ 1.74 ± 2.32 ตามลำดับ, $p=0.005$) แต่ไม่ชัดเจนในส่วนของใบเนื่องจากขาดข้อมูลในการ วิเคราะห์ ซึ่งผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมีความขัดแย้งกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอยู่ บางส่วน จากหลักการวิเคราะห์ของ FRAP และ DPPH assay ที่สามารถวัดได้เฉพาะสารต้าน อนุมูลอิสระที่มี reducing power ทำให้งานวิจัยฉบับนี้ไม่สามารถบอกได้ว่าสารที่มีฤทธิ์ต้าน อนุมูลอิสระที่ดีจะมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเช่นเดียวกัน ดังนั้นในการวิเคราะห์ในครั้งถัดไป การประเมินค่าความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ควรใช้การทดสอบที่สามารถหาฤทธิ์ ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ทั้งหมด เนื่องจากพืชมีความซับซ้อนของสารพฤษเคมีแตกต่างกัน

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

การทดสอบเพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ระหว่างสารสกัดฝาดดอกขาว (*L. racemosa*, LR) และฝาดดอกแดง (*L. littorea*, LL) โดยศึกษาระบบตัวทำละลายระหว่างน้ำและเมทานอล ส่วนของกิ่งและใบ และตำแหน่งในการเกิดระหว่างบกและทะเล โดยมีการวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี Ferric chloride test พบว่า ทั้งใน LL และ LR มีสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกเช่นเดียวกับกับรายงานวิจัยอื่นๆ สำหรับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทำการทดสอบโดยใช้ DPPH assay และ FRAP assay พบว่าผลการทดสอบไปในทิศทางเดียวกันทั้งสองวิธี โดยเมื่อเปรียบเทียบแต่ละตัวแปร (ชนิดฝาด ตัวทำละลาย ส่วนของพืช และตำแหน่งที่เกิดของพืช) โดยทำการวิเคราะห์สารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วเปรียบเทียบผลที่ได้ที่ความเข้มข้นที่เท่ากันทางสถิติ พบว่า ในส่วนของชนิดฝาด พบ LR มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่า LL ในส่วนของตัวทำละลายน้ำมีฤทธิ์ดีกว่าเมทานอลในส่วนกิ่ง แต่ตัวทำละลายเมทานอลมีฤทธิ์ดีกว่าน้ำในส่วนใบ และในส่วนของตำแหน่งบกมีฤทธิ์ดีกว่าทะเล ยกเว้น LL ตำแหน่งทะเลที่ส่วนใบที่มีฤทธิ์ดีกว่า

จึงทำการเลือกสารสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล เพื่อมาวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เนื่องจากพบฤทธิ์ที่ดีกว่าในส่วนใบ ซึ่งง่ายต่อการประยุกต์ใช้เพื่อการพัฒนาต่อยอดต่อไป กอปรด้วยข้อจำกัดของปริมาณสารสกัดทดสอบในครั้งนี้ ไม่เพียงพอ โดยใช้วิธี Tyrosinase inhibition assay ในการวิเคราะห์ พบว่า LL มีฤทธิ์มากกว่า LR ยกเว้น ในส่วนของกิ่ง ตำแหน่งทะเล LR มีฤทธิ์มากกว่า LL พบว่าส่วนของกิ่งมีฤทธิ์มากกว่าใบ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องผลของ FRAP และ DPPH assay และตำแหน่งบกจะมีฤทธิ์มากกว่าตำแหน่งทะเล จากการทดสอบแสดงให้เห็นว่าทั้งสารสกัด LR และสารสกัด LL ตำแหน่งในการเกิดที่ต่างกันมีผลต่อการสร้างปริมาณสารออกฤทธิ์ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากในงานวิจัยนี้เป็นการทดสอบเกี่ยวกับ Bioassay เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีววิทยา คือ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเท่านั้น ไม่ครอบคลุมถึงการทดสอบหา chemical compounds จึงควรทำการทดสอบ phytochemical screening เพิ่มเติม เพื่อหา กลุ่มสารที่มีฤทธิ์อย่างเจาะจง และควรศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารออกฤทธิ์อย่างละเอียด โดยเก็บข้อมูลทางกายภาพของ

ตำแหน่งที่เกิดของต้นฝาดที่อาจเป็นตัวแปรที่เกี่ยวข้องเพื่อนำมาวิเคราะห์ร่วมกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อไป เช่น ค่าความเป็นกรดต่าง ค่าความชื้น ปริมาณแสงแดดที่ได้รับ ซึ่งสอดคล้องกับตำแหน่งที่เกิดของต้นฝาด เป็นต้น และจากงานวิจัยศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์ดูแลสุขภาพ และเครื่องสำอางสำหรับต้านอนุมูลอิสระที่มีส่วนผสมจากธรรมชาติ ข้อมูลจากงานวิจัยอาจใช้ในการประกอบการตัดสินใจในการศึกษาเบื้องต้นก่อนตั้งตำรับ และช่วยลดระยะเวลาในการดำเนินงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. Paul T, Ramasubbu S. The antioxidant, anticancer and anticoagulant activities of *Acanthus ilicifolius* L. roots and *Lumnitzera racemosa* Willd. leaves, from southeast coast of India. *Journal of applied pharmaceutical science*. 2017;7:81-7.
2. ชุติมา แก้วพิบูลย์, พงษ์ฐิกร ศุภพล.ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปส อะไมเลส และแอลฟา-กลูโคซิเดสของพืชสมุนไพรไทย. 2018(ปีที่ 27 ฉบับที่ 3 พฤษภาคม - มิถุนายน 2562).
3. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพและปริมาณสารสำคัญของสมุนไพรด้วยการเกิดปฏิกิริยาทางเคมี [Internet]. 2016 [cited 3 July 2020]. Available from: [http://kpi.msu.ac.th/upload/ag_tor_ref_byval/ag_16_in_1.2.7_99\(2559\).pdf](http://kpi.msu.ac.th/upload/ag_tor_ref_byval/ag_16_in_1.2.7_99(2559).pdf).
4. ณพัฐอร บัวฉุน. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบใบฝรั่ง. วารสารวิจัยและพัฒนา วไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์. 2019(ปีที่ 15 ฉบับที่ 1 (มกราคม - เมษายน พ.ศ. 2563)).
5. Plants.usda.gov. Plants Profile For *Lumnitzera* (Black Mangrove) [Available from: <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=LUMNI>,.
6. Thaikasetsart. ฝาดดอกขาว 2013 [Available from: <https://www.thaikasetsart.com/ฝาดดอกขาว/>.
7. Plants of the World Online. *Lumnitzera Racemosa* Willd. [updated 29 October 2020. Available from: <http://www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:170681-1#bibliography>.
8. Thaikasetsart. ฝาดดอกแดง 2013 [Available from: <https://www.thaikasetsart.com/ฝาดดอกแดง/>.
9. Plants of the World Online. *Lumnitzera littorea* [updated 29 October 2020. Available from: <http://www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:170675-1>.

10. Eswaraiah G, Peele KA, Krupanidhi S, Kumar RB, Venkateswarulu TC. Studies on phytochemical, antioxidant, antimicrobial analysis and separation of bioactive leads of leaf extract from the selected mangroves. *Journal of King Saud University - Science*. 2020;32(1):842-7.
11. อีรวุฒิ เลิศสุทธิवाल, อุไรวรรณ วัฒนกุล, วันเพ็ญ สายน้ำ. ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจาก ฝาดดอกแดง (*Lumnitzera littorea*) ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* sp. 2009;ปีที่ 3(ฉบับที่ 1 มกราคม - มิถุนายน 2552).
12. Saad S, Taher M, Susanti D, Qaralleh H, Rahim NABA. Antimicrobial activity of mangrove plant (*Lumnitzera littorea*). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2011;4(7):523-5.
13. Ranjana B, Jadhav B, Dhavan P, Patel P. IN VITRO ANTIDIABETIC ACTIVITY AND PHYTOCHEMICAL ANALYSIS OF *Lumnitzera racemosa* LEAVES. *International Research Journal of Pharmacy*. 2019;10:1-8.
14. Ark R, Jr G. In Vitro Evaluation of Antioxidant Activity of Methanolic Extracts of Selected Mangrove Plants. *Medicinal & Aromatic Plants*. 2016;05.
15. บุ ห รัน พันธุ์ สวรรค์. อนุมูล อิสระ สาร ต้าน อนุมูล อิสระ และ การ วิเคราะห์ ฤทธิ์ ต้าน อนุมูล อิสระ. *Thai Science and Technology Journal*. 2013;21(3):275-86.
16. Moharram H, Youssef M. Methods for Determining the Antioxidant Activity: A Review. *Alex J Fd Sci & Technol*. 2014;11:31-42.
17. Scheibmeir H, Christensen K, Whitaker S, Jegaethesan J, Clancy R, Pierce J. A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive & critical care nursing : the official journal of the British Association of Critical Care Nurses*. 2005;21:24-8.
18. สุริวัลย์ ดวงจิตต์, กรกนก สุวรรณราช, กุลภัสสร กิตติพินิจนันท, พิษณุณี องค์กรวิสุทธิ, สุริวัลย์ บำรุงไทย, ณะเศรษฐ์ จ้าวหิรัญพัฒน์, et al. บทบาทของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติสำหรับ ประยุกต์ใช้ทางผิวหนัง: คุณสมบัติประสิทธิภาพ ความปลอดภัย และระบบนำส่งรูปแบบใหม่. 2018(Vol. 15 No. 1 January – March 2019).
19. สุขาดา มานอก, ปวีณา ลีเมธี. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดสมุนไพรในตำรับยาหอมเทพจิตร. 2015(Vol. 15 No.1 January-june 2015).

20. Zhang X-L, Zhang Y-D, Wang T, Guo H-Y, Liu Q-M, Su H-X. Evaluation on Antioxidant Effect of Xanthohumol by Different Antioxidant Capacity Analytical Methods. *Journal of Chemistry*. 2014;2014:1-6.
21. Liang N, Kitts D. Antioxidant Property of Coffee Components: Assessment of Methods that Define Mechanisms of Action. *Molecules* (Basel, Switzerland). 2014;19:19180-208.
22. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*. 1995;28(1):25-30.
23. Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*. 1996;239(1):70-6.
24. D'Mello SAN, Finlay GJ, Baguley BC, Askarian-Amiri ME. Signaling Pathways in Melanogenesis. *Int J Mol Sci*. 2016;17(7):1144.
25. finnaly. ผลิตภัณฑ์เวชสำอางสำหรับผิวหน้า 2014 [Available from: http://finie-finnaly.blogspot.com/2014/01/blog-post_10.html].
26. Samaneh Zolghadri, Asieh Bahrami, Mahmud Tareq Hassan Khan, J. Munoz-Munoz, F. Garcia-Molina, F. Garcia-Canovas, et al. A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2019;34(1):279-309.
27. Chang T-S. An updated review of tyrosinase inhibitors. *Int J Mol Sci*. 2009;10(6):2440-75.
28. Evans WC. Trease and Evans' Pharmacognosy. 2009;China: Saunders Ltd.
29. Csepregi K NS, Schreiner M, Hideg É. Comparative Evaluation of Total Antioxidant Capacities of Plant Polyphenols. *molecules* 2016;208:1420-3049.
30. Wahyu Widowati NF HH, Merry Afni , Ervi Afifah , Hanna Sari W. Kusuma , Hayatun Nufus , Seila Arumwardana , Dwi Davidson Rihibiha. Antioxidant and Anti Aging Assays of *Oryza Sativa* Extracts, Vanillin and Coumaric Acid. *Journal of Natural Remedies*. 2016:88-99.
31. Witheethummasak N, Limsuwan A. ปริมาณ ฟีนอลิก รวม และฤทธิ์ ในการ ยับยั้ง เอนไซม์ ไทโรซิเนส ใน สารสกัด เกสรบัวหลวง Total phenolic compounds and Tyrosinase inhibitory activity of *Nelumbo nucifera* stamens extracts. 2017.

32. Vittaya L RS, Charoendat U, Janyong S, Leesakul N. Bio-Activity Investigations of Extracts of Different Parts of *Lumnitzera littorea* Voigt. *Tropical Journal of Natural Product Research*. 2020;4(7):365-71.

33. Tanvira Paul SR. The antioxidant, anticancer and anticoagulant activities of *Acanthus*

ilicifolius L. roots and *Lumnitzera racemosa* Willd. leaves, from

southeast coast of India. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2017;7 (03): 081-7.

34. Nguyen PT, Bui TT, Chau ND, Bui HT, Kim EJ, Kang HK, et al. In vitro evaluation of the antioxidant and cytotoxic activities of constituents of the mangrove *Lumnitzera racemosa* Willd. *Arch Pharm Res*. 2015;38(4):446-55.

ภาคผนวก

ภาคผนวก (1) แบบฟอร์มรายงานสรุปการเงิน

ภาคผนวก (2) อักษรวิสุทธิ

ภาคผนวก (1)

แบบฟอร์มรายงานสรุปการเงิน

รายงานสรุปการเงิน

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณการเงินรายได้คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2563 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ เปรียบเทียบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของฝาดดอกขาว และฝาดดอกแดง

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ภาณุ.ดร.อ. ภัทรวิดี ศรีคุณ

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 เมษายน 2563 ถึงวันที่ 28 กุมภาพันธ์ 2564

ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี ตั้งแต่วันที่ 1 เมษายน 2563

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ (100%) 9,000 บาท เมื่อวันที่ เดือน ปี 3 กุมภาพันธ์ 2564

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/ เกิน
1. ค่าสารเคมี	8850 บาท	8850 บาท	0 บาท
2. ค่าโปสเตอร์	250 บาท	250 บาท	0 บาท
รวม	9000 บาท	9000 บาท	0 บาท

(.....)

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัย

ภาคผนวก (2)

อักขรวิสุทธิ

Plagiarism Checking Report

Created on Apr 8, 2021 at 18:38 PM

Submission Information

ID	SUBMISSION DATE	SUBMITTED BY	ORGANIZATION	FILENAME	STATUS	SIMILARITY INDEX
2023640	Apr 8, 2021 at 18:38 PM	59210200@go.buu.ac.th	มหาวิทยาลัยบูรพา	โครงร่างโครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ประจำ สมบูรณ์.pdf	Completed	0.95 %

Match Overview

NO.	TITLE	AUTHOR(S)	SOURCE	SIMILARITY INDEX
1	การพัฒนาตัวพอลิเมอร์นาโนไขมันที่บรรจุสารสกัดดอกดาวเรืองเพื่อยับยั้งฤทธิ์เอนไซม์ไทโรซิเนส	ทักษอร รัตนสุวรรณ	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	0.72 %
2	สกุลผาด	วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี	Wikipedia	0.23 %

Match Details

TEXT FROM SUBMITTED DOCUMENT	TEXT FROM SOURCE DOCUMENT(S)
ภาษาอังกฤษคือ black mangrove สกุลนี้มีสมาชิกสองชนิดที่แตกต่างกันคือ ลำต้นและราก Lumnitzera littorea LL มีดอกสีแดงส่วนลำต้นและราก Lumnitzera racemosa LR มีดอกสีขาวพืชสกุลในวงศ์ Combretaceae Laguncularia Conocarpus และ Lumnitzera พบในป่าชายเลนและ Lumnitzera เป็นสกุลเดียวที่พบในป่าชายเลนแถบอินโด-แปซิฟิกตะวันตกจนถึงออสเตรเลีย 5 2 1 1 ลักษณะโดยทั่วไปของพืช 1 ลำต้นและรากรูปทรงแท่ง 1 ลำต้นและราก 6	สกุลลำต้นและราก (Lumnitzera) เป็นสกุลของไม้ป่าชายเลนในบริเวณอินโด-แปซิฟิกตะวันตกอยู่ในวงศ์ Combretaceae ชื่อสามัญในภาษาอังกฤษคือ black mangrove. " Lumnitzera " ซึ่งตามชื่อของนักพฤกษศาสตร์ชาวเยอรมัน Stephan Lumnitzer (1750 - 1806) พบในป่าชายเลนจากแอฟริกาตะวันตกจนถึงแปซิฟิกตะวันตกจนถึงฟิลิปปินส์และฮ่องกงและออสเตรเลียเหนือ สกุลนี้มีสมาชิกสองชนิดที่ต่างกันคือลำต้นและราก Lumnitzera littorea " มีดอกสีแดงส่วนลำต้นและราก " Lumnitzera racemosa " มีดอกสีขาวพืชสกุลในวงศ์ Combretaceae , " Laguncularia " , " Conocarpus " และ Lumnitzera " พบในป่าชายเลนและ Lumnitzera " เป็นสกุลเดียวที่พบในป่าชายเลนแถบอินโด-แปซิฟิกตะวันตกจนถึงออสเตรเลีย Lumnitzera racemosa var . racemosa (Tonga mangrove) เป็นพืชชนิดหนึ่งในแอฟริกาใต้ทั่วโลกมีพืชในสกุลนี้เพียง 3 ชนิดคือ " L . littorea " , " L . racemosa " และลูกผสม " L . " X " rosea " ที่เหลือเป็นชื่อของพืชชื่อที่ตั้งอย่างไม่ดีผลลดา:
หน้าที่เป็น nucleophile ได้เป็น leucodopachrome ซึ่งจะถูกลดออกซิไดซ์ oxidized ต่อมาให้เป็น dopachrome ส่วนในระหว่างที่ dopachrome ที่เกิดขึ้นสูญเสีย CO แล้วถูกเปลี่ยนเป็น 5,6-dihydroxyindole (DHI) และต่อไปเป็น 5,6-indolequinone (IQ) ในอีกทางหนึ่ง dopachrome อาจเกิดปฏิกิริยา tautomerization ได้เป็น 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็น indole-2-carboxylic acid 5,6-quinone (ICAQ) โครงสร้าง IQ และ ICAQ จัดเป็นหน่วยย่อยซึ่งเมื่อเกิดปฏิกิริยา polymerization ต่อไปได้เป็น eumelanin ที่มีสีน้ำตาล	extracellular signal-regulated kinase (ERK) ซึ่งอยู่นอกเซลล์ในเวลาในไซโตพลาซึมแล้ว ERK ถ้ามีปริมาณมากจะหลั่ง MITF ที่อยู่ในเซลล์ในเวลาในไซโตพลาซึม ERK มีปริมาณลดลงส่งผลให้การสร้างเอนไซม์ไทโรซิเนสปริมาณมากขึ้น [26] 13 แผนภาพที่ 2.1 เส้นทางของการผลิตเอนไซม์ไทโรซิเนสจากการที่ผิวหนึ่งถูกกระตุ้นด้วยรังสี UV [26] 1.2) การสังเคราะห์เมลานินกระบวนการสร้างเมลานินดังแสดงในแผนภาพที่ 2.2 เมื่อดอกเป็น 2 ระยะในระยะเวลา tyrosine หรือ dihydroxyphenylalanine (DOPA) ถูกเปลี่ยนไปเป็น dopaquinone โดยปฏิกิริยา oxidation ซึ่งมีเอนไซม์ tyrosinase (TYR) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา dopaquinone ที่สร้างขึ้นจะถูกเปลี่ยนไปเป็น dopachrome ได้ด้วยปฏิกิริยา cyclization โดยหมู่ NH 2 จะทำหน้าที่เป็น nucleophile ได้เป็น leucodopachrome ซึ่งจะถูกลดออกซิไดซ์ oxidized ต่อมาให้เป็น dopachrome ส่วนในระหว่างที่ dopachrome ที่เกิดขึ้นสูญเสีย CO 2 14 แล้วถูกเปลี่ยนเป็น 5,6-dihydroxyindole (DHI) และต่อไปเป็น 5,6-indolequinone (IQ) ในอีกทางหนึ่ง dopachrome อาจเกิดปฏิกิริยา tautomerization ได้เป็น 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) ซึ่งจะถูกลดเปลี่ยนเป็น indole-2-carboxylic acid -5,6-quinone
น้ำตาลในกระบวนการสร้าง pheomelanin นั้นหลังจาก tyrosine หรือ DOPA ถูกเปลี่ยนเป็น dopaquinone แล้วจะเกิดปฏิกิริยากับหมู่ SH ของ cysteine Cys หรือ glutathione ได้เป็น cysteinyl-dopa จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยา cyclization และ decarboxylation ได้เป็น 5-hydroxy-1,4-benzothiazinylalanine (HBT) ซึ่งต่อมาเกิดปฏิกิริยา polymerization ได้เป็น pheomelanin ซึ่งมีสีเหลืองแดงกระบวนการสร้างเม็ดสีทั้งหมดเกิดขึ้นในส่วน melanosome และเม็ดสีที่ถูกผลิตขึ้นนี้จะถูกส่งหรือขนถ่ายไปยังเซลล์ keratinocyte ด้วย melanosome dendrites 24	ในอีกทางหนึ่ง dopachrome อาจเกิดปฏิกิริยา tautomerization ได้เป็น 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) ซึ่งจะถูกลดเปลี่ยนเป็น indole-2-carboxylic acid -5,6-quinone (ICAQ) โครงสร้าง IQ และ ICAQ จัดเป็นหน่วยย่อยซึ่งเมื่อเกิดปฏิกิริยา polymerization ต่อไปได้เป็น eumelanin ที่มีสีน้ำตาลเหมือนน้ำตาล [3 - 5] ในกระบวนการสร้าง pheomelanin นั้นหลังจาก tyrosine หรือ DOPA ถูกเปลี่ยนเป็น dopaquinone แล้วจะเกิดปฏิกิริยากับหมู่ SH ของ cysteine (Cys) หรือ glutathione ได้เป็น cysteinyl-dopa จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยา cyclization และ decarboxylation ได้เป็น 5-hydroxy-1,4-benzothiazinylalanine (HBT) ซึ่งต่อมาเกิดปฏิกิริยา polymerization ได้เป็น pheomelanin ซึ่งมีสีเหลืองแดงกระบวนการสร้างเม็ดสีทั้งหมดเกิดขึ้นในส่วน melanosome และเม็ดสีที่ถูกผลิตขึ้นนี้จะถูกส่งหรือขนถ่ายไปยังเซลล์ keratinocyte ด้วย melanosome dendrites [3 - 5 , 27] แผนภาพที่ 2.2 ขีดเส้นแสดงของเมลานิน [24] 15 2) กลไกการสร้างเม็ดสีที่ผิวที่ปรากฏให้เห็นนั้นเป็นองค์ประกอบของสารต่างๆในผิวโดยเฉพาะจากสีของเมลานินซึ่งขึ้นกับการขจัดสีผิว (depigmentation) จึงมุ่งเน้นที่กระบวนการสร้างเมลานินซึ่งสามารถทำได้หลายขั้นตอนดังนี้ 1 . การทำลายเซลล์สร้างเม็ดสีผิว
สารประกอบที่จับเอนไซม์ไทโรซิเนสแบบผันกลับได้ทำให้ลดความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนส 2. กลไกการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสตามกลไกการยับยั้งเอนไซม์ 1. Competitive inhibitor คือสารที่ไปจับเอนไซม์เพื่อไม่ให้สารตั้งต้นไปจับกับเอนไซม์ที่ active site ที่เดียวกันกับ inhibitor สารที่พบได้มี	. specific tyrosinase inhibitor ได้แก่สารประกอบที่สามารถจับกับเอนไซม์ไทโรซิเนสแบบผันกลับได้และลดความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ 2.3.2) แบ่งตามกลไกการยับยั้งเอนไซม์จากแบบสารที่ให้อิทธิพลต่อการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสตามกลไกการยับยั้งเอนไซม์สามารถแบ่งออกเป็น 4 ชนิดได้แก่ competitive inhibitors , uncompetitive inhibitors , mixed type (competitive / uncompetitive) inhibitors และ non-competitive inhibitors [3] ดังแสดงในแผนภาพที่ 2.3 1 . competitive inhibitor คือสารที่ไปจับกับเอนไซม์เพื่อไม่ให้สารตั้งต้นไปจับกับเอนไซม์ที่ active site ที่เดียวกันกับ inhibitor ชนิดนี้เป็น copper chelator , non-metabolizable analogs หรืออนุพันธ์ของสารตั้งต้นอื่นๆ 2 . uncompetitive