โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระระหว่างสารสกัดจากใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล

The study of chemical constituents and free radical scavenging assay from the extracts of *Canavalia rosea* (Sw.) DC. and *Ipomoea pes-caprae* (L.) R.Br. leaves

โดย

นสภ.ณัฐจนันท์ พุทธคุณ	56210010
นสภ.เมฆา วีระวานิช	56210096
นสภ.ชัยกฤต สุทธิ	56210113
นสภ.ศุภวิชญ์ บุนนาค	56210169

โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต
ปีการศึกษา 2560
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระระหว่างสารสกัดจากใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล

The study of chemical constituents and free radical scavenging assay from the extracts of *Canavalia rosea* (Sw.) DC. and *Ipomoea pes-caprae* (L.) R.Br. leaves

โดย

นสภ.ณัฐจนันท์ พุทธคุณ	56210010
นสภ.เมฆา วีระวานิช	56210096
นสภ.ชัยกฤต สุทธิ	56210113
นสภ.ศุภวิชญ์ บุนนาค	56210169

โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต
ปีการศึกษา 2560
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

รายงานการวิจัย เรื่อง การเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ระหว่างสารสกัดจากใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล มีวัตถุประสงค์ เพื่อเปรียบเทียบลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ค้นหาและเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดถั่วทะเล (*Canavalia rosea* (Sw.) DC.) และใบผักบุ้งทะเล (*Ipomoea pes-caprae* (L.) R.Br.) เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการนำผักบุ้งทะเลไปใช้ประโยชน์ ลดความสับสนในการนำไปใช้ในการรักษาพิษแมงกะพรุน และลดอันตรายจากการใช้พืชผิดชนิด ซึ่งอาจจะทำให้ประสิทธิภาพในการรักษาลดลง หรือเกิดพิษจากการใช้พืชผิดชนิดได้ เนื่องจากพืชทั้งสองชนิดเจริญเติบโตในบริเวณใกล้เคียงกันและมีลักษณะทางพฤกษศาสตร์คล้ายคลึงกัน ซึ่งผลการวิจัยและข้อเสนอแนะต่างๆ จะเป็นประโยชน์ต่อผู้เกี่ยวข้องไม่มากก็น้อย ในการนำผลการวิจัยไปใช้หรือประยุกต์ใช้ เพื่อให้เกิดความเหมาะสม ตลอดจนเกิดแนวทางในการปรับปรุงพัฒนางานวิจัยที่เกี่ยวข้องต่อไป

คณะผู้วิจัย

โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ ปีการศึกษา 2560

เรื่อง การเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ระหว่างสารสกัดจากใบถั่วทะเลและใบผักปู่งทะเล

ผู้จัดทำโครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. นสภ.ณัฐจนันท์ พุทธคุณ รหัส 56210010
2. นสภ.เมฆา วีระวานิช รหัส 56210096
3. นสภ.ชัยกฤต สุทธิ รหัส 56210113
4. นสภ.ศุภวิชญ์ บุนนาค รหัส 56210169

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. อาจารย์ ภญ.ดร.นภัสสร ฉันทธำรงศิริ
2. อาจารย์ ภก.ผศ.ดร.บุญดิศย์ วงศ์ศักดิ์
3. อาจารย์ ภญ.ดร.สมาวดี เปลี่ยนวงษ์

บทคัดย่อ

ถั่วทะเลและผักปู่งทะเล เป็นพืชที่เจริญเติบโตในบริเวณใกล้เคียงกันและมีลักษณะทางพฤกษศาสตร์คล้ายคลึงกัน จึงมักเกิดความสับสนในการนำไปใช้ประโยชน์และอาจเกิดอันตรายได้หากใช้พืชผิดชนิด การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ค้นหาและเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดใบถั่วทะเล (*Canavalia rosea* (Sw.) DC.) และใบผักปู่งทะเล (*Ipomoea pes-caprae* (L.) R.Br.) ผลการศึกษา พบว่าลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพืชทั้งสองชนิดมีลักษณะคล้ายกัน แต่พบความแตกต่างทางฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ จากการทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบใบผักปู่งทะเลแสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระดีกว่าใบถั่วทะเล ที่ IC_{50} เท่ากับ 25.58 ± 0.35 µg/ml และ 88.77 ± 3.18 µg/ml ตามลำดับ และสารสกัดหยาบใบผักปู่งทะเลชั้น ethyl acetate แสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระดีกว่าใบถั่วทะเล ที่ IC_{50} เท่ากับ 3.80 ± 0.29 µg/ml และ 27.29 ± 5.76 µg/ml ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS ผลการศึกษาพบความแตกต่างทางโครงสร้าง จำนวนและปริมาณของสาร ชั้น ethyl acetate ของใบผักปู่งทะเล พบโครงสร้างสารประกอบกลุ่มฟีนอล ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระในชั้นดังกล่าว จึงสรุปเบื้องต้นได้ว่าพืชทั้งสองชนิดไม่สามารถนำมาใช้ทดแทนกันได้ในการรักษาพิษแมงกะพรุน นอกจากนี้ ควรมีการศึกษาสารสำคัญในใบถั่วทะเลและใบผักปู่งทะเลรวมถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่นเพิ่มเติม เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคตต่อไป

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก .....

Senior Project Academic Year 2017

: The study of chemical constituents and free radical scavenging assay from the extracts of *Canavalia rosea* (Sw.) DC. and *Ipomoea pes-caprae* (L.) R.Br. leaves

By

1. Miss. Nutjanan Puttakun ID 56210010
2. Mr. Mayka Weerawanich ID 56210096
3. Mr. Chaikrit Suthi ID 56210113
4. Mr. Supawit Boonnak ID 56210169

Advisors:

1. Dr. Naphatson Chanthathamrongsiri
2. Asst.Prof.Dr. Boonyadist Vongsak
3. Dr. Samarwadee Plianwong

ABSTRACT

The beach bean (*Canavalia rosea* (Sw.) DC.; CR) and the beach morning glory (*Ipomoea pes-caprae* (L.) R.Br.; IP) are the plants that often found together on the beach. By their similar characteristics of CR and IP can caused the confusion in jellyfish toxin treatment. This research project aimed to solve this problem by characterize the morphology of both plants and comparison of their antioxidant activity and the chemical constituents by TLC, GC-MS and DPPH radical scavenging assay. The results found that the botanical morphologies of CR and IP are similar but the antioxidant and chemical constituents of methanol crude extracts are different. The methanol crude extract of IP show higher antioxidant activity than CR with IC_{50} 25.58 ± 0.35 µg/ml and 88.77 ± 3.18 µg/ml, respectively and from liquid-liquid extraction, the ethyl acetate extract of IP show higher antioxidant activity than CR with IC_{50} 3.80 ± 0.29 µg/ml and 27.29 ± 5.76 µg/ml, respectively. The results from GC-MS revealed that the phenolic compounds in ethyl acetate extract of IP might be the key compound to exhibit the potent antioxidant. From those preliminary results suggested that CR cannot use for treatment jellyfish toxin. This study will lead to investigate other pharmacological activities from both plants in the future.

Major Advisor .....

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจากอาจารย์ ภญ.ดร.นภัสสร ฉันทธำรงศิริ อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัย ที่กรุณาให้คำแนะนำปรึกษา แนะแนวทางในการศึกษาค้นคว้า คอยแนะนำ ให้ความรู้ ให้ความช่วยเหลือ ตลอดจนตรวจสอบ ปรับปรุง แก้ไข ข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่อย่างยิ่ง ทำให้โครงงานวิจัยนี้สำเร็จตามความคาดหมาย ผู้วิจัยตระหนักถึงความตั้งใจจริงและความทุ่มเทของอาจารย์ และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ภก.ผศ.ดร.บุญดิศย์ วงศ์ศักดิ์ และอาจารย์ ภญ.ดร.สมาวดี เปลี่ยนวงษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้คำแนะนำและคำปรึกษาเพิ่มเติม ในการแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ระหว่างการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการคณะเภสัชศาสตร์ บุคลากรคณะเภสัชศาสตร์ และคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยทุกๆ ด้าน และขอขอบพระคุณที่ได้ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย

อนึ่ง ผู้วิจัยหวังว่า งานวิจัยฉบับนี้จะมีประโยชน์อยู่ไม่น้อย จึงขอมอบส่วนดีทั้งหมดนี้ให้แก่เหล่าคณาจารย์ ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชา จนทำให้ผลงานวิจัยเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่เกี่ยวข้อง และสุดท้ายขอกราบขอพระคุณ บิดา มารดา และเพื่อนๆ รวมถึงผู้เกี่ยวข้องทุกคน ที่คอยสนับสนุนและให้กำลังใจในการศึกษาเล่าเรียนและการทำวิจัยเสมอมา

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญเรื่อง	จ
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญภาพ	ญ
บทที่ 1 บทนำ	
1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
3. กรอบแนวคิด	4
4. สมมติฐาน	4
5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
6. ขอบเขตการวิจัยข้อตกลงเบื้องต้น	5
บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	
1. พืชที่ใช้ในการศึกษา	6
2. ประโยชน์และฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชในงานวิจัย	9
3. การสกัดแยกสารสำคัญจากใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล	17
4. การวิเคราะห์สารสำคัญในสารสกัดจากใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล	21
5. นิยามของการอักเสบและกลไกการอักเสบ	24
6. พิษจากแมงกะพรุนและรักษาพิษจากแมงกะพรุน	27
7. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด	31
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
1. วัสดุและอุปกรณ์	37

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

2. วิธีการเก็บ การเตรียมตัวอย่างพืช และการเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพระหว่างส่วนเหนือดินของถั่วทะเลและผักบุ้งทะเล 38

3. วิธีดำเนินการทดลองการเปรียบเทียบวิธีสกัดสารเบื้องต้นจากใบผักบุ้งทะเล (preliminary study of extraction) 39

4. วิธีดำเนินการทดลองการเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ระหว่างสารสกัดจากใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล 44

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ 52

บทที่ 4 ผลการวิจัย

1. ผลการเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพระหว่างส่วนเหนือดินของถั่วทะเลและผักบุ้งทะเล 53

2. ผลการทดลองการเปรียบเทียบวิธีสกัดสารเบื้องต้นจากใบผักบุ้งทะเล (preliminary study of extraction) 54

    2.1 การเปรียบเทียบน้ำหนักสารสกัดหยาบจากการเตรียมสารสกัดใบผักบุ้งทะเลด้วยวิธี maceration, sonication และ reflux extraction 54

    2.2 การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบใบผักบุ้งทะเลด้วยวิธีธินแลเยอร์โครมาโทกราฟี (thin layer chromatography; TLC) 55

    2.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ (antioxidant) ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay ของสารสกัดหยาบใบผักบุ้งทะเล 58

3. ผลการทดลองการเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ระหว่างสารสกัดจากใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล

    3.1 การเปรียบเทียบน้ำหนักของสารสกัดหยาบของใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล 61

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการวิจัย

3.2 การสกัดสารสกัดหยาบถั่วทะเลและผักบุ้งทะเลโดยวิธีแยกชั้น (partition extraction) 62

3.3 การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นระหว่างสารสกัดด้วยตัวทำละลาย hexane, dichloromethane และ ethyl acetate เปรียบเทียบระหว่างสารสกัดใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล ด้วยวิธีธินแลเยอร์โครมาโทกราฟี (thin layer chromatography; TLC) 64

3.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay เปรียบเทียบระหว่างชั้นสารสกัดที่ผ่านการ partition ของใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล 68

3.5 การเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีระหว่างชั้นสารสกัดที่ผ่านการ partition ของใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (GC-MS) 77

3.6 การเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ ของสารสกัดที่ผ่านการ partition ของใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล ด้วยวิธี DPPH radical scavenging 95

บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

1. สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัยการเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพระหว่างส่วนเหนือดินของถั่วทะเลและผักบุ้งทะเล 96
2. สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัยการเปรียบเทียบวิธีสกัดสารเบื้องต้นจากใบผักบุ้งทะเล (preliminary study of extraction) 96
3. สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัยการเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ระหว่างสารสกัดจากใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล 98

เอกสารอ้างอิง 103

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

4-1 การเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพระหว่างส่วนเหนือดินของถั่วทะเลและผักบุ้งทะเล 53
4-2 ปริมาณสารสกัดและ % yield ของใบผักบุ้งทะเล จากวิธีการสกัดที่ต่างกัน 55
4-3 การตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบของสารพฤกษเคมีของใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล 56
4-4 ผลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดใบผักบุ้งทะเล ด้วยวิธี maceration, sonication และ reflux extraction 57
4-5 ค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบผักบุ้งทะเลที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50% (IC_{50}) 61
4-6 ปริมาณสารสกัดและ % yield ของตัวอย่างพืช จากวิธีการสกัด maceration 62
4-7 ปริมาณสารสกัดและ % yield ของใบผักบุ้งทะเล จากการแยกสารวิธี partition 62
4-8 ปริมาณสารสกัดและ % yield ของใบถั่วทะเล จากการแยกสารวิธี partition 63
4-9 ปริมาณ %yield ของใบถั่วทะเลเปรียบเทียบกับ %yield ของใบผักบุ้งทะเล จากการแยกสารวิธี partition 63
4-10 การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารพฤกษเคมีของใบถั่วทะเลและผักบุ้งทะเลเปรียบเทียบระหว่างชั้นสารสกัด partition ด้วยวิธีธินเลเยอร์โครมาโทรกราฟี ระบบ methanol : dichloromethane ในอัตราส่วน 1:9 65
4-11 ค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบผักบุ้งทะเลและใบถั่วทะเลที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50% (IC_{50}) 69
4-12 ค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากใบผักบุ้งทะเลที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50% (IC_{50}) 73
4-13 ค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากใบถั่วทะเลที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50% (IC_{50}) 76
4-14 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในชั้น hexane ที่ได้จากการ partition ของใบผักบุ้งทะเล โดยเรียงค่า peak area จากปริมาณมากไปน้อย 77
4-15 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในชั้น hexane ที่ได้จากการ partition ของใบถั่วทะเล โดยเรียงค่า peak area จากปริมาณมากไปน้อย 79
4-16 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในชั้น dichloromethane ที่ได้จากการ partition ของใบผักบุ้งทะเล โดยเรียงค่า peak area จากปริมาณมากไปน้อย 82

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4-17 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในชั้น dichloromethane ที่ได้จากการ partition ของใบถั่วทะเล โดยเรียงค่า peak area จากปริมาณมากไปน้อย 84

4-18 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในชั้น ethyl acetate ที่ได้จากการ partition ของใบผักบุ้งทะเล โดยเรียงค่า peak area จากปริมาณมากไปน้อย 87

4-19 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในชั้น ethyl acetate ที่ได้จากการ partition ของใบถั่วทะเล โดยเรียงค่า peak area จากปริมาณมากไปน้อย 88

4-20 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในชั้นน้ำ ที่ได้จากการ partition ของใบผักบุ้งทะเล โดยเรียงค่า peak area จากปริมาณมากไปน้อย 91

4-21 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในชั้นน้ำ ที่ได้จากการ partition ของใบถั่วทะเล โดยเรียงค่า peak area จากปริมาณมากไปน้อย 92

4-22 แสดงผลการทดลองฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ ของสารสกัดที่ผ่านการ partition ของใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล 95

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2-1 ถั่วทะเล (*Canavalia rosea* (Sw.) DC.) 7
2-2 ผักบุ้งทะเล (*Ipomoea pes-caprae* (L.) R.Br.) 8
2-3 โครงสร้างของสารสำคัญใบผักบุ้งทะเลในการรักษาพิษจากแมงกะพรุน 17
2-4 การสกัดสารโดยวิธีการหมักแช่ (maceration) 17
2-5 การสกัดโดยคลื่นเสียงอัลตราโซนิค (sonication) 18
2-6 การสกัดแบบไหลย้อนกลับ (reflux extraction) 19
2-7 การสกัดแยกส่วน (liquid partition) 20
2-8 การวิเคราะห์องค์ประกอบสารด้วยวิธีธินแลเยอร์โครมาโทกราฟฟี 22
2-9 ลักษณะเครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟี่-แมสสเปกโตรเมทรี (GC-MS) 23
2-10 ขั้นตอนการวิเคราะห์องค์ประกอบสารด้วยวิธี GC-MS 24
2-11 กลไกการอักเสบที่เกิดผ่าน oxidative stress 26
2-12 ลักษณะของแผลที่โดนพิษของแมงกะพรุน 27
2-13 ลักษณะเข็มพิษของแมงกะพรุน 28
2-14 ลักษณะแมงกะพรุนที่สามารถบริโภคได้ 29
2-15 ลักษณะแมงกะพรุนที่เป็นพิษ 30
2-16 การรักษาพิษของแมงกะพรุนโดยใช้ผักบุ้งทะเลผสมน้ำส้มสายชู 5% 31
2-17 โครงสร้างของอนุมูล DPPH ก่อนและหลังทำปฏิกิริยากับสารยับยั้งอนุมูลอิสระ 34
3-1 การเตรียมแผ่น TLC ของใบผักบุ้งทะเล 41
3-2 การเจือจางความเข้มข้นสารสกัดหยาบใบผักบุ้งทะเลจาก 1 mg/mL เป็น 200 µg/mL 42
3-3 การเตรียมแผ่น 96-well microplate ของการเปรียบเทียบการสารสกัดหยาบ ใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล 43
3-4 วิธีการสกัดสารสกัดหยาบจากการ partition แยกชั้น 45
3-5 แผนผังการสกัดแยกสารสกัดหยาบของใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล 46
3-6 การเตรียมแผ่น TLC ของใบผักบุ้งทะเลและถั่วทะเล 48
3-7 การเจือจางความเข้มข้นของสารสกัดที่ผ่านการ partition ของใบถั่วทะเลและ ใบผักบุ้งทะเล แต่ละชั้นของวิธีการ partition จาก 1 mg/mL เป็น 200 µg/mL 49

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

3-8 การเตรียมแผ่น 96-well microplate ของการเปรียบเทียบการสกัดสารที่ผ่านการ partition ของใบผักบุ้งทะเลและใบผักบุ้งทะเล 51

4-1 การคำนวณค่า R_f ที่ได้จากวิธีธินแลเยอร์โครมาโทกราฟี 55

4-2 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของใบผักบุ้งทะเลด้วยวิธีธินแลเยอร์โครมาโทกราฟฟีในระบบ methanol : dichloromethane ในอัตราส่วน 1:9 โดย M คือ สารสกัดด้วยวิธี maceration, S = สารสกัดด้วยวิธี sonication, R = สารสกัดด้วยวิธี reflux extraction เมื่อสังเกตผลด้วยตาเปล่า, UV 254 และ 366 nm, และการใช้ anisaldehyde-sulfuric acid ตามลำดับ 56

4-3 แสดงกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระกับความเข้มข้นของ (a) สารมาตรฐาน ascorbic acid (b) สารสกัดหยาบจากใบผักบุ้งทะเลด้วยวิธี maceration (c) สารสกัดหยาบใบผักบุ้งทะเลด้วยวิธี reflux extraction (d) สารสกัดหยาบจากใบผักบุ้งทะเลด้วยวิธี sonication 59

4-4 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของใบผักบุ้งทะเล และใบถั่วทะเลในระบบ methanol : dichloromethane ในอัตราส่วน 1:9 โดย I1 = สารสกัดหยาบใบผักบุ้งทะเล, I2 = สารสกัดชั้น hexane ใบผักบุ้งทะเล, I3 = สารสกัดชั้น dichloromethane ใบผักบุ้งทะเล, I4 = สารสกัดชั้น ethyl acetate ใบผักบุ้งทะเล, C1 = สารสกัดหยาบใบถั่วทะเล, C2 = สารสกัดชั้น hexane ใบใบถั่วทะเล, C3 = สารสกัดชั้น dichloromethane ใบถั่วทะเล, C4 = สารสกัดชั้น ethyl acetate ใบถั่วทะเล โดยสังเกตผลด้วยตาเปล่า, ภายใต้แสง UV 254 และ 366 nm, และ anisaldehyde-sulfuric acid ตามลำดับ 64

4-5 แสดงกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระกับความเข้มข้นของ (a) สารมาตรฐาน ascorbic acid (b) สารสกัดหยาบจากใบผักบุ้งทะเลด้วยวิธีการสกัด maceration (c) สารสกัดหยาบจากใบถั่วทะเลด้วยวิธีการสกัด maceration 69

4-6 แสดงกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระกับความเข้มข้นของ (a) สารมาตรฐาน ascorbic acid (b) สารสกัดจากใบผักบุ้งทะเลชั้น hexane (c) สารสกัดจากใบผักบุ้งทะเลชั้น dichloromethane (d) สารสกัดจากใบผักบุ้งทะเลชั้น ethyl acetate (e) สารสกัดจากใบผักบุ้งทะเลชั้นน้ำ 71

4-7 แสดงกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระกับความเข้มข้นของ (a) สารมาตรฐาน

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

ascorbic acid (b) สารสกัดจากใบถั่วทะเลชั้น hexane (c) สารสกัดจากใบถั่วทะเลชั้น dichloromethane (d) สารสกัดจากใบถั่วทะเลชั้น ethyl acetate (e) สารสกัดจากใบถั่วทะเลชั้นน้ำ 74

4-8 โครงสร้างของสารสำคัญในชั้น hexane ที่ได้จากการ partition ของใบผักบุ้งทะเลที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ 78

4-9 โครงสร้างของสารสำคัญในชั้น hexane ที่ได้จากการ partition ของใบถั่วทะเลที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ 80

4-10 ไอออนโครมาโตแกรมของตัวอย่างชั้นสารสกัดใบผักบุ้งทะเลและใบถั่วทะเลที่ผ่านการ partition ชั้น hexane 81

4-11 โครงสร้างของสารสำคัญในชั้น dichloromethane ที่ได้จากการ partition ของใบผักบุ้งทะเลที่คาดว่าแสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ 83

4-12 โครงสร้างของสารสำคัญในชั้น dichloromethane ที่ได้จากการ partition ของใบผักบุ้งทะเลที่คาดว่าแสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ 85

4-13 ไอออนโครมาโตแกรมของตัวอย่างชั้นสารสกัดใบผักบุ้งทะเลและใบถั่วทะเลที่ผ่านการ partition ชั้น dichloromethane 86

4-14 โครงสร้างของสารสำคัญในชั้น ethyl acetate ที่ได้จากการ partition ของใบผักบุ้งทะเลที่คาดว่าแสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ 88

4-15 โครงสร้างของสารสำคัญในชั้น ethyl acetate ที่ได้จากการ partition ของใบผักบุ้งทะเลที่คาดว่าแสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ 89

4-16 ไอออนโครมาโตแกรมของตัวอย่างชั้นสารสกัดใบผักบุ้งทะเลและใบถั่วทะเลที่ผ่านการ partition ชั้น ethyl acetate 90

4-17 โครงสร้างของสารสำคัญในชั้นน้ำ ที่ได้จากการ partition ของใบผักบุ้งทะเลที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ 92

4-18 โครงสร้างของสารสำคัญในชั้นน้ำ ที่ได้จากการ partition ของใบผักบุ้งทะเลที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ 93

4-19 ไอออนโครมาโตแกรมของตัวอย่างชั้นสารสกัดใบผักบุ้งทะเลและใบถั่วทะเลที่ผ่านการ partition ชั้นน้ำ 94

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบัน รัฐบาลไทยได้ให้ความสนใจในเรื่องสมุนไพรเป็นอย่างมาก เนื่องจากประเทศไทยนั้นตั้งอยู่ในเขตร้อนใกล้เส้นศูนย์สูตร และอยู่ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ทำให้ประเทศไทย อุดมไปด้วยทรัพยากรธรรมชาติ ความหลากหลายทางภูมิศาสตร์ทั้งระบบนิเวศป่าไม้และทะเล สามารถใช้เป็นแหล่งผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่สำคัญในการนำมาผลิตเป็นยา ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และเครื่องสำอาง ช่วยให้ประเทศชาติประหยัดเงินตราในการนำเข้าผลิตภัณฑ์ดังกล่าวจากต่างประเทศ ซึ่งสอดคล้องกับแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 11 ยุทธศาสตร์ที่ 6.2 ซึ่งมีนโยบายในการส่งเสริมการพัฒนาเศรษฐกิจจากทรัพยากร พันธุกรรม และความหลากหลายทางชีวภาพ ให้มีการอนุรักษ์ วิจัย และพัฒนาพืชพื้นบ้าน สร้างนวัตกรรมในการผลิตสินค้า และบริการที่เป็นเอกลักษณ์ของประเทศ การแพทย์พื้นบ้านและการแพทย์ทางเลือก รวมถึงมีการสนับสนุนงานวิจัยสมุนไพร เพื่อประโยชน์ในการนำมาใช้ทางการแพทย์และสาธารณสุข[1]

มหาวิทยาลัยบูรพาเป็นสถาบันอุดมศึกษาของรัฐที่ตั้งอยู่ในส่วนภูมิภาคตะวันออกของประเทศไทย ตั้งอยู่ใกล้กับทะเลบางแสน ซึ่งเป็นชายหาดที่มีชื่อเสียงมาช้านานของจังหวัดชลบุรี และเป็นหนึ่งในสถานที่ท่องเที่ยวที่มักจะมีนักท่องเที่ยวมาพักผ่อนหย่อนใจในวันหยุด นอกจากความสวยงามของทะเลบางแสน พื้นที่ทะเลบางแสนยังจัดเป็นสถานที่ซึ่งมีความหลากหลายทางชีวภาพทางทะเล มีความหลากหลายทางพันธุกรรมท้องถิ่นและพืชพื้นบ้าน อีกทั้ง ทางมหาวิทยาลัยบูรพาได้มีการสนับสนุนให้มีการเรียนการสอนวิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล อันเป็นเอกลักษณ์ของมหาวิทยาลัย และมีการมุ่งเน้นการบูรณาความรู้ทางด้านวิทยาศาสตร์ทางทะเล (marine sciences) มาประยุกต์ใช้ในการเรียนการสอนและงานวิจัยต่างๆ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ซึ่งเป็นคณะหนึ่งทางด้านวิทยาศาสตร์สุขภาพของมหาวิทยาลัยบูรพา ได้มีการบูรณาการความรู้ทางด้านวิทยาศาสตร์สุขภาพและวิทยาศาสตร์ทางทะเล มาใช้ในการเรียนการสอนและงานวิจัย เพื่อสร้างเภสัชกรที่มีคุณภาพอย่างมีอัตลักษณ์ สร้างองค์ความรู้ใหม่จาก

งานวิจัย และนำความรู้ไปใช้ในงานบริหารวิชาการได้อย่างมีประสิทธิภาพ ตามพันธกิจของมหาวิทยาลัย [2]

ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทะเล (marine natural products) เป็นอีกศาสตร์หนึ่งที่ได้รับความสนใจมากเพิ่มขึ้นในปัจจุบัน โดยจากการทบทวนศึกษางานวิจัยวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง พบว่ามีการนำผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเลมาใช้ประโยชน์ทางเภสัชกรรม โดยในปัจจุบันผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทะเลที่ถูกพัฒนาเป็นยาและได้รับการรับรองจาก US FDA ได้แก่ cytarabine และ eribulin mesylate จากฟองน้ำ, trabectedin จากเพรียงหัวหอม, brentuximab vedotin จากมอลลัสกา ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นยาต้านมะเร็ง vidarabine จากฟองน้ำ ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นยาต้านไวรัส และ ziconotide จากหอยเต้าปูน ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นยาแก้ปวด นอกจากนี้ยังพบว่า มีการนำผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเลมาใช้ประโยชน์ด้านอื่นๆ ได้แก่ เป็นเครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เป็นต้น

แมงกะพรุน เป็นสิ่งมีชีวิตที่จัดอยู่ในไฟลัมไนดาเรีย (Cnidaria) และมีถิ่นอาศัยอยู่ในทะเล ซึ่งลักษณะเฉพาะของสิ่งมีชีวิตในไฟลัมไนดาเรีย คือ นิโดไซต์ (cnidocyte) ซึ่งเป็นเข็มพิษที่ใช้ในการล่าเหยื่อและป้องกันตัว ในเข็มพิษของแมงกะพรุนนั้นจะบรรจุโปรตีนและสารอื่นๆ ซึ่งมีความเป็นพิษต่อผู้ที่สัมผัส ทำให้เกิดปัญหาต่อนักท่องเที่ยวที่นิยมเที่ยวทะเลเป็นอย่างยิ่ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณชายหาดจังหวัดชลบุรี ซึ่งมักปรากฏข่าวทางโทรทัศน์ หน้าหนังสือพิมพ์ และในโซเชียลมีเดียในทุกปี โดยพิษสามารถทำให้นักท่องเที่ยวที่สัมผัส เกิดอาการอักเสบและแพ้พิษดังกล่าวได้ จากตำราแพทย์พื้นบ้านของไทย ตำรายาสมุนไพรไทย หรือคำบอกเล่าจากหมอชาวบ้าน พบว่ามีสมุนไพรไทยชนิดหนึ่งที่เป็นองค์ความรู้ของภูมิปัญญาชาวบ้านระบุว่าสามารถใช้ใบผักบุ้งทะเลตำและพอกบริเวณที่มีการอักเสบและการแพ้จากการสัมผัสแมงกะพรุน เพื่อให้สามารถออกฤทธิ์ในการต้านการอักเสบได้

ผักบุ้งทะเล (*Ipomoea pes-caprae* (L.) R.Br.) เป็นพืชที่มีถิ่นอาศัยในแถบชายทะเล จัดอยู่ในวงศ์ผักบุ้ง (Convolvulaceae) ลักษณะทางกายภาพเป็นไม้เลื้อยล้มลุก ทั้งต้นมีน้ำยางสีขาว ใบเดี่ยว แผ่นใบกว้าง โคนใบรูปหัวใจ ปลายใบเว้าลึก ช่อดอก มี 4-6 ดอก กลีบดอกสีชมพูอมม่วง กลีบดอกติดกันปลายบานคล้ายปากแตร (sympetalae) ดอกบานตอนเช้า ช่วงบ่ายจะหุบ ผลแห้งแตกได้ เป็นพืชที่มักจะเติบโตอยู่โดยทอดตัวตามยาวอยู่บนพื้นดิน มักขึ้นตามหาดทรายหรือริมทะเล จากการศึกษา ภูมิปัญญาชาวบ้าน และตำราแพทย์แผนไทย กล่าวถึงประสิทธิภาพของผักบุ้งทะเลในการรักษาอาการอักเสบและการแพ้จากพิษแมงกะพรุน โดยนำมาผสมน้ำส้มสายชู 5% หรือนำมาหมักกับเหล้า 7 วัน ก่อนนำมาประคบบริเวณผิวหนังที่โดนเข็มพิษ นอกจากนี้ พบว่า

บางตำรากล่าวว่าให้นำมาต้มกับน้ำมันมะพร้าว เพื่อทำขี้ผึ้งสำหรับทาผิวแก้แพ้ รักษาแผล และพิษแมงกะพรุน [3] จากการค้นคว้างานวิจัยพบว่า สารสำคัญที่พบในสารสกัดจากผักบุ้งทะเล ที่มีฤทธิ์ในการต้านแพ้และคลายอาการเกร็งตัวของกล้ามเนื้อเรียบ คือ **β**-damascenone และ *E*-phytol รวมถึงสารอื่นๆ ที่มีฤทธิ์ในการลดการอักเสบ ได้แก่ eugenol, 2-hydroxy-4,4,7-trimethyl-1-(4*H*)-naphthalenone, (-)-mellein, 4-vinyl guaiacol, actinidols *Ia* และ *Ib* [4] นอกจากฤทธิ์ในการต้านอักเสบ สารสกัดจากผักบุ้งทะเลด้วย methanol ยังพบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกาะตัวของเกล็ดเลือด (antii-platelet aggregation) [5] ฤทธิ์แก้ปวด [6] และฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ [7]

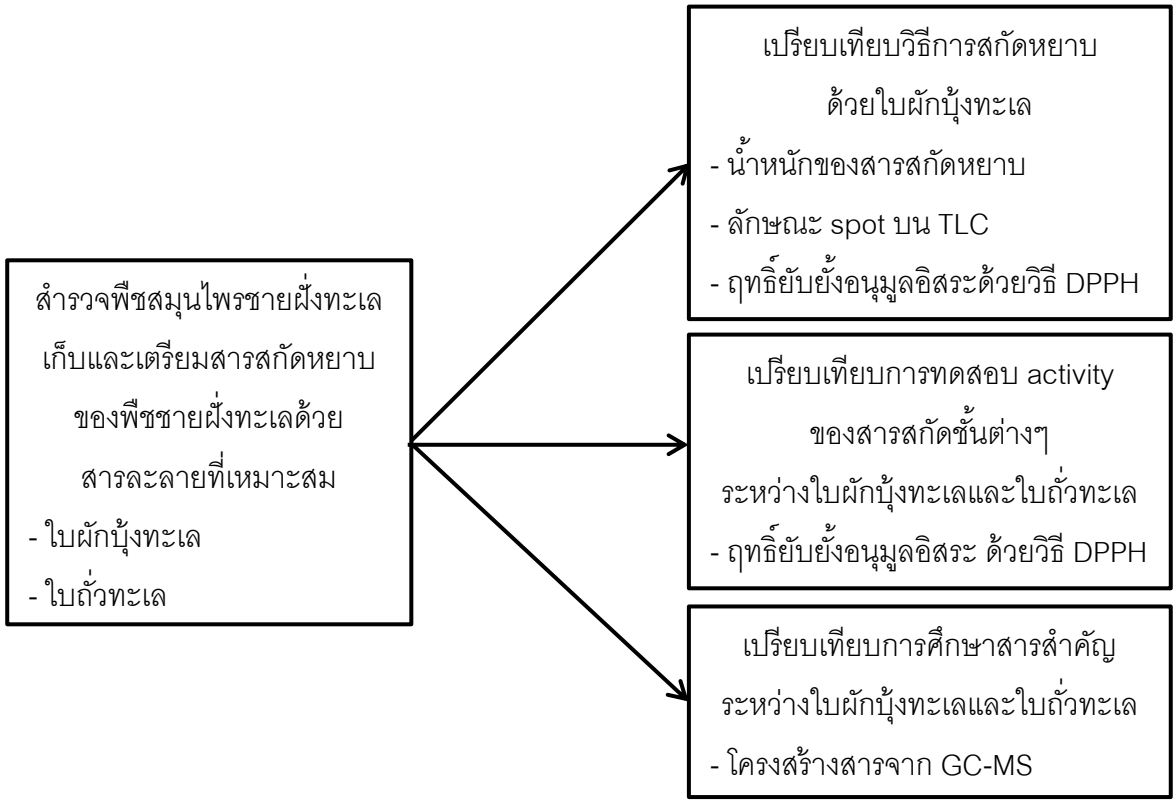
แต่จากการศึกษาลงพื้นที่ในบริเวณชายหาดบางแสนของทีมผู้วิจัย พบว่าในบริเวณเดียวกันที่พบผักบุ้งทะเลเจริญเติบโตนั้น จะพบพืชอีกชนิด คือ ถั่วทะเลเจริญเติบโตอยู่ด้วยกัน พืชทั้งสองชนิดนี้มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์คล้ายคลึงกัน ซึ่งอาจจะทำให้เกิดความสับสนในการนำไปใช้ประโยชน์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการนำมารักษาพิษของแมงกะพรุน

จากปัญหาดังกล่าว งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษา เปรียบเทียบลักษณะทางพฤกษศาสตร์ องค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพ ของสารสกัดระหว่างผักบุ้งทะเลและถั่วทะเล โดยเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพระหว่างส่วนเหนือดิน เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการนำผักบุ้งทะเลไปใช้ประโยชน์ ลดความสับสนในการนำไปใช้ในการรักษาพิษแมงกะพรุน และลดอันตรายจากการใช้พืชผิดชนิด ซึ่งอาจจะทำให้ประสิทธิภาพในการรักษาลดลง หรือเกิดพิษจากการใช้พืชผิดชนิดได้

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพระหว่างส่วนเหนือดินของถั่วทะเลและผักบุ้งทะเล
2. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดสารสกัดใบผักบุ้งทะเลที่ให้ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระดีที่สุด
3. เพื่อค้นหาและเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเลจากการสกัดวิธีเดียวกัน รวมถึงการสกัดที่ได้จากการ partition ด้วยตัวทำละลาย hexane, dichloromethane และ ethyl acetate จากทั้งใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล
4. เพื่อศึกษาศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเลด้วย GC-MS

กรอบแนวคิด



สมมติฐาน

1. ลักษณะทางกายภาพส่วนเหนือดินของถั่วทะเลและผักบุ้งทะเลมีความคล้ายคลึงกัน แต่สามารถแยกออกจากกันได้

2. การสกัดสารสกัดของใบผักบุ้งทะเลด้วยวิธีการ maceration เป็นวิธีการสกัดที่ได้ปริมาณสารสกัดมากที่สุดและให้ฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่านกลไกการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด

3. การสกัดสารสกัดหยาบของใบผักบุ้งทะเลและใบถั่วทะเล ที่ผ่านการ partition ชั้น ethyl acetate น่าจะมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด และถั่วทะเล น่าจะแสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระต่ำกว่าฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระในใบผักบุ้งทะเล

4. สารสกัดระหว่างใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเลมีองค์ประกอบทางเคมีต่างกัน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถจำแนกความแตกต่างทางกายภาพส่วนเหนือดินของถั่วทะเลและผักบุ้งทะเลได้

2. ทราบวิธีการสกัดสารจากใบผักบุ้งทะเล เพื่อให้ได้สารสกัดที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด

3. ทราบวิธีการ partition เพื่อให้ได้สารสกัด ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด

4. ทราบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นในสารสกัดหยาบของใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล

5. ทราบกระบวนการและขั้นตอนในการวิจัย และนำไปสู่การพัฒนางานวิจัยอื่นๆ ต่อไปในอนาคต

ขอบเขตการวิจัยข้อตกลงเบื้องต้น

1. ส่วนของพืชที่ใช้ในการเปรียบเทียบลักษณะทางพฤกษศาสตร์ คือ ราก ลำต้น ใบ ดอก และผล

2. ส่วนของพืชที่ใช้ในการค้นหาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ คือ ส่วนของใบ โดยไม่ทำการศึกษาปัจจัยเรื่องฤดูกาลที่เก็บตัวอย่าง

3. แหล่งของพืชที่ใช้ในการวิเคราะห์

    3.1 ผักบุ้งทะเล จากหาดวอนนภา ชายหาดบางแสน ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี

    3.2 ถั่วทะเล จากหาดนวล เกาะล้าน ต.นาเกลือ อ.บางละมุง จ.ชลบุรี

4. ฤทธิ์ทางชีวภาพที่สนใจในการศึกษาวิจัยคือ ฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระ

บทที่ 2
วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาเพื่อหากลุ่มสารพฤกษศาสตร์เบื้องต้น องค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพ คือ ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ผู้จัดทำได้มีการศึกษาค้นคว้าเนื้อหาและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องเพื่อประกอบการดำเนินการวิจัย ดังต่อไปนี้

1. พืชที่ใช้ในการศึกษา

1.1 ถั่วทะเล

1.1.1 ข้อมูลทั่วไปถั่วทะเล [8]

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Canavalia rosea* (Sw.) DC.

ชื่อพ้องวิทยาศาสตร์: *Canavalia maritima* Thouars*, Canavalia obtusifolia* DC.*, Dolichos maritimus* Aubl., *Dolichos obtusifolius* Lam.*, Dolichos roseus* Sw.

ชื่อภาษาอังกฤษ: beach bean, bay bean, seaside jack-bean, coastal jack-bean, MacKenzie bean

ชื่ออื่น: ถั่วกระเป๋า ถั่วผี ถั่วแขก ถั่วฝรั่ง ถั่วดาบ ถั่วพร้า ไก่เตี้ย ถั่วกำพร้า

ชื่อวงศ์: Papilionaceae – Fabaceae

1.1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ส่วนเหนือดินของถั่วทะเล [8]

ถั่วทะเล จัดเป็นไม้ล้มลุก มีลักษณะลำต้นทอดเลื้อยตามผืนดิน ความยาว 5-15 เมตร ลำต้นมีสีเขียวหรือสีเขียวอมน้ำตาล เป็นมันลักษณะผิวมันแข็งและเหนียว ส่วนของต้นและใบมียางแต่น้อยกว่าผักบุ้งทะเล การขยายพันธุ์ใช้เมล็ดหรือปักชำ เป็นพืชทนแล้งและทนเค็มมักพบบริเวณหาดทรายหรือริมทะเล

ใบถั่วทะเลเป็นใบประกอบแบบฝ่ามือมี 3 ใบย่อย โดยสองใบแรกมีก้านใบสั้น ใบที่สามจะมีก้านใบยาวกว่าใบอื่นๆ สองใบด้านข้างเป็นรูปไข่เบี้ยวไม่สมมาตร แผ่นใบสีเขียวแกมส้ม ขนาดกว้าง 5-10 เซนติเมตร ยาว 7-15 เซนติเมตร ปลายใบมน ขอบใบเรียบ โคนใบสอบ

ดอกถั่วทะเล เป็นดอกช่อแบบดอกถั่ว (papilionaceous form) ดอกสมมาตรด้านข้าง กลีบดอกมีสีม่วงอมชมพู ดอกออกตรงซอกใบ กลีบดอกมี 5 กลีบ กลีบเลี้ยง 5 กลีบที่เชื่อมติดกันเป็นหลอด เกสรตัวผู้ 10 อัน รังไข่มีลักษณะยาวแบนและตั้งตรงจากซอกใบ

ผลถั่วทะเลเป็นผลเดี่ยว (legume) เมื่ออ่อน มีลักษณะแบนเป็นรูปสี่เหลี่ยม ขอบขนานและโค้งเล็กน้อย โดยปลายเฉียงไปข้างใดข้างหนึ่ง ความกว้างของฝัก 3-5 เซนติเมตร ความยาว 5-15 เซนติเมตร ฝักแก่จะพองออกเป็นก้อนเท่าจำนวนเมล็ดภายในฝัก เปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลเข้ม ฝักแก่เต็มที่จะแตก เมล็ดมีรูปร่างแบนรี มีสีเขียวเมื่ออ่อนและมีสีน้ำตาลเมื่อแก่ มีเยื่อสีขาวบางหุ้มเมล็ด แต่ละฝักมีเมล็ด 5-10 เมล็ด สามารถขยายพันธุ์ได้โดยใช้เมล็ดเพาะพันธุ์

1.1.3 แหล่งที่พบถั่วทะเล [8]

บริเวณชายฝั่งทะเลเขตร้อน ลำธารน้ำขึ้นน้ำลง บึงน้ำกร่อย โคลนตม ชายหาดและเนินทราย โดยพบได้ในทุกภูมิภาคทั่วประเทศไทย

ภาพที่ 2-1 ถั่วทะเล (*Canavalia rosea* (Sw.) DC.)

1.2 ผักบุ้งทะเล

1.2.1 ข้อมูลทั่วไปผักบุ้งทะเล [4]

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Ipomoea pes-caprae* (L.) R.Br.

ชื่อพ้องวิทยาศาสตร์: *Ipomoea biloba* Forssk., *Convolvulus pes-caprae*

ชื่อภาษาอังกฤษ: bayhops, beach morning glory, goat's foot

ชื่ออื่น: ผักบุ้งต้น ผักบุ้งขน ผักบุ้งเล ละบูเลาห์ หม่าอานเถิง

ชื่อวงศ์: Convolvulaceae

1.2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ส่วนเหนือดินของผักบุ้งทะเล [4]

ผักบุ้งทะเล เป็นไม้ล้มลุก มีลักษณะลำต้นทอดเลื้อยตามผืนดิน ความยาว 5-30 เมตร ลำต้นมีสีเขียวปนแดง หรือสีม่วงอมแดง ผิวลื่น ตามข้อของลำต้นจะมีรากฝอย ซึ่งภายในมีลักษณะกลวง ต้นและใบมียางสีขาว สามารถขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ดหรือการปักชำ เป็นพืชที่ทนเค็มสามารถทนต่อความเค็มและความแห้งแล้งได้ มักพบอยู่ตามหาดทรายหรือริมทะเล

ใบผักบุ้งทะเลเป็นใบเดี่ยว มีรูปร่างหลายลักษณะ ตั้งแต่รูปร่างไข่ รูปไตหรือรูปเกือกม้า การเรียงตัวของใบเป็นแบบสลับปลายใบเว้าเข้าหากันขอบใบเรียบ ส่วนโคนใบเป็นรูปหัวใจ ใบกว้าง 7-11 เซนติเมตร และยาว 5-8 เซนติเมตร เส้นใบขนนก ผิวใบมันเป็นสีเขียว เนื้อใบค่อนข้างหนา ท้องใบและหลังใบเรียบ

ดอกผักบุ้งทะเล จะออกดอกเป็นช่อรูปร่ม ในช่อดอกจะมีดอกประมาณ 2-6 ดอก ซึ่งทยอยบานทีละดอก ส่วนปลายของดอกบานมีลักษณะเป็นรูปปากแตร (sympetalae) มี 5 กลีบ ดอกเป็นสีชมพูอมม่วง สีชมพูหรือเป็นสีม่วง ลักษณะของกลีบดอกกลมรี แตกออกเป็นแฉก 5 แฉก แต่ละดอกมีเกสรเพศผู้ 5 อัน ผิวเกลี้ยง ด้านในจะมี สีเข้มกว่าด้านนอก ส่วนกลีบดอกเลี้ยงเป็นสีเขียว

ผลผักบุ้งทะเล เป็นรูปมนรี ลักษณะแบบแคปซูล ผิวผลเรียบ มีขนสีน้ำตาลปกคลุม ภายในมีเมล็ดสีเหลือง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 6 มิลลิเมตร

1.2.3 แหล่งที่พบผักบุ้งทะเล [4]

บริเวณชายฝั่งทะเลของประเทศไทยและพบที่ชายฝั่งทะเลสาบเขตร้อนทั่วโลก

ภาพที่ 2-2 ผักบุ้งทะเล (*Ipomoea pes-caprae* (L.) R.Br.)

2. ประโยชน์และฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชในงานวิจัย

2.1 ถั่วทะเล

2.1.1 ข้อมูลการใช้ประโยชน์จากภูมิปัญญา

1) การใช้ประโยชน์จากถั่วทะเลในภูมิปัญญาไทย [9]

(1) ยางจากก้านใบ นำไปใช้ในการสมานแผล ที่เกิดหนาม วัตถุมีคมอื่น

(2) ใบนำมาต้มกับน้ำ นำไปใช้สำหรับรักษาโรคไขข้อหรือนำไปใช้สำหรับรักษาแผลจากน้ำร้อนลวก รักษาอาการปวดเมื่อย และโรคเรื้อน

(3) รากนำไปต้มกับน้ำ นำไปใช้ในการรักษาวัณโรค และใช้ในการรักษาพิษจากปลาทะเล

2) การใช้ประโยชน์จากถั่วทะเลในภูมิปัญญาต่างชาติ [8]

(1) ประเทศซามัวและประเทศตองกา มีรายงานการใช้ใบในการทำคลอดและนำส่วนของใบรวมกับพืชชนิดอื่น เพื่อใช้ในการรักษาการตกเลือดหลังคลอดและภาวะหมดประจำเดือน

(2) ประเทศในทวีปอเมริกาใต้ แอฟริกา และประเทศในบริเวณอ่าวเม็กซิโก มีรายงานการใช้ใบแห้งมาทำเป็นยาสูบ ซึ่งมีฤทธิ์เคลิ้มฝันคล้ายกับกัญชา

2.1.2 การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพจากถั่วทะเล

รายงานการศึกษาฤทธิ์เกี่ยวกับสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบในถั่วทะเลพบว่า

ก. ลำต้น พบกลุ่มสารดังนี้: alkaloids, phenols, saponins [10]

ข. ใบ พบกลุ่มสารดังนี้: saponins, flavonoids, alkaloids, cardiac glycosides, phenolics [10]

ค. เมล็ด พบกลุ่มสารโปรตีน โดยพบในปริมาณสูง รวมถึง ไขมัน คาร์โบไฮเดรต โดย 90% ของชนิดโปรตีนที่สะสมอยู่ในเมล็ดถั่วทะเล เป็นโปรตีนชนิด albumins และ globulins และ ไม่ปรากฏสาร tannins และ trypsins [11]

จากการศึกษาคุณค่าทางอาหารของถั่วทะเล [12] พบว่าการนำส่วนของฝักถั่วทะเลมาประกอบอาหารทำให้คาร์โบไฮเดรตและแคลอรี่ของส่วนฝักถั่วทะเลสูงขึ้น ในขณะที่ไฟเบอร์และกรดอะมิโนที่สำคัญ ได้แก่ threonine, valine, isoleucine, phenylalanine และ lysine ลดลง แต่ปริมาณของกรดอะมิโนยังคงเท่ากับหรือสูงกว่าที่ FAO-WHO-UNU แนะนำ แร่ธาตุที่สามารถพบได้ในส่วนฝัก คือ K, Mg, Zn และ Mn ซึ่งมีค่าสูงกว่าที่ NRC-NAS แนะนำ การประกอบอาหารโดยใช้ความดันจะทำให้คุณค่าทางอาหารดีขึ้น และลดฤทธิ์ hemagglutinin activity ซึ่งเป็น antinutritional

ในการศึกษาวิจัยฤทธิ์ทางชีวภาพของการสกัดจากถั่วทะเล พบว่ายังมีรายงานไม่มากนักและพบว่าการศึกษาส่วนใหญ่เป็นการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดจากเมล็ดถั่วทะเล โดยพบฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังนี้

1) ฤทธิ์ต่อจิตประสาท

จากการศึกษาของ Duangpen Pattamadilok และคณะ [13] พบว่า การหาสารสำคัญในถั่วทะเล พบสาร acyclic alkaloid (guanidine alkaloids) ชนิดใหม่ ที่มีชื่อว่า canarosine ร่วมกับสารอื่นๆ อีก 6 ชนิด ได้แก่ flavonoid glycoside, rutin, epi-inositol 6-O-methyl ether, β-sitosterol glucoside, และสารผสมอัตราส่วน 2:1 ของ β-sitosterol และ stigmasterol. โดย canarosine 100 µg/mL มีฤทธิ์ในการยับยั้ง dopamine D_1 receptor binding ได้ 95% โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 39.4 µM

2) ฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส

จากการศึกษาของ Duangpen Pattamadilok และคณะ [13] พบว่า canarosine มีฤทธิ์ในการยับยั้ง Herpes simplex virus type 1 โดยมีความแรงปานกลาง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.48 µg/mL

3) ฤทธิ์ต้านมะเร็ง

จากการศึกษาของ V. R. Niveditha และคณะ [12] พบว่าสารสกัด methanol ของเมล็ดถั่วทะเลที่สุกแล้ว มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง MCF-7 และ HT-29 แบบ *in vivo* ได้ดีกว่าเมล็ดแบบดิบ แสดงว่า สารสกัดจากเมล็ดถั่วทะเล มีคุณสมบัติในการต้านเซลล์มะเร็งลำไส้

4) ฤทธิ์ต้านเซลล์แบคทีเรีย

จากการศึกษาของ Duangpen Pattamadilok [14] พบว่าสารสกัดจากใบของถั่วทะเล มีฤทธิ์ในการต้านเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus cereus, Bacillus megaterium, Bacillus*

stearothemophilus, Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus และ *Streptococcus faecalis* แต่ไม่มีฤทธิ์ในการต้านเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ

2.2 ผักบุ้งทะเล

2.2.1 ข้อมูลการใช้ประโยชน์จากภูมิปัญญา

1) การใช้ประโยชน์จากผักบุ้งทะเลในภูมิปัญญาไทย [15]

(1) ส่วนของใบ นำมากำจัดเชื้อราที่ได้ นอกจากนั้นยังสามารถนำมาปรุงอาหารรับประทานเพื่อบรรเทาอาการข้อเสื่อม

(2) ส่วนของลำต้น ใช้น้ำที่ต้มจากการต้มเป็นยาขับปัสสาวะได้ ซึ่งสามารถนำไปใช้กับผู้ป่วยที่เป็นโรคทางเดินกระเพาะปัสสาวะอักเสบได้

(3) ส่วนของเมล็ด นำมาใช้รักษาอาการปวดเกร็งช่องท้องได้

2) การใช้ประโยชน์จากผักบุ้งทะเลในภูมิปัญญาต่างชาติ [4]

(1) ประเทศอินเดีย มีรายงานการใช้ใบที่ผ่านการต้มสามารถนำมาใช้เป็นยาบรรเทาอาการจุกเสียด แน่นท้อง นำมาทาเพื่อรักษาตุ่มตามผิวหนังที่ติดเชื้อ

(2) ประเทศบราซิล มีรายงานการใช้ใบเป็นยาแก้อักเสบและยาแก้ปวดที่เกิดขึ้นบริเวณทางเดินกระเพาะอาหารและลำไส้

(3) ประเทศออสเตรเลีย มีรายงานการใช้ใบบรรเทาอาการปวดศีรษะ

2.2.2 การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพจากผักบุ้งทะเล

รายงานการศึกษาฤทธิ์เกี่ยวกับสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบผักบุ้งทะเลพบว่า [16]

ก. ลำต้น พบกลุ่มสารดังนี้: pentasaccharide resins glycosides, benzoic acid, butyric acid, *β*-sitosterol, myristic acid, potassium chloride, sodium chloride, resin และ alkaloid

ข. เมล็ด พบกลุ่มสารดังนี้: cacalol, methyl ether, dehydrocacalohastine, ergotamine, lysergic acid (indole alkaloid), matorin acetate และ matorin

ค. ดอก พบกลุ่มสารสารดังนี้: alkaloids, carbohydrates, glycosides, flavonoids, tannins, sterols และ terpenoids

ง. ใบ พบกลุ่มสารดังนี้: พบสารสกัดเป็นรูปแบบน้ำมันหอมระเหย (essential oil) โดยประกอบไปด้วย behecin acid, melissic acid, myristic acid, citric acid, curcumene, ergotamine, fumaric acid, maleic acid และ succinic acid

ในการศึกษาวิจัยฤทธิ์ทางชีวภาพของการสกัดจากผักบุ้งทะเล พบว่ามีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังนี้

1) ฤทธิ์ต้านอักเสบ (Anti-inflammation)

จากการศึกษาของ พัชรี สุนทรพะลิน และศศิธร วสุวัต [17] ซึ่งเป็นการศึกษาในผู้ป่วยที่เกิดภาวะผิวหนังอักเสบจากพิษแมงกะพรุน จำนวน 12 คน ซึ่งได้รับการรักษาโดยทาครีมสารสกัด ether จากใบเข้มข้น 1% (IPA 1%) โดยแบ่งกลุ่มเป็น ผู้ป่วย 5 คน ถูกแมงกะพรุนมีพิษในวันแรก ให้ทายา IPA ทันที พบว่าในวันแรกของการรักษาอาการคันลดลง และอาการตุ่มแดงและคันหายในวันที่ 2 ส่วนผู้ป่วยอีก 7 คน ถูกแมงกะพรุนมานาน 3-30 วัน หลังจากทายา IPA ผู้ป่วย 50% อาการดีขึ้นภายใน 7 วัน และภายใน 30-45 วัน เหลือแผลเป็นเนื้อนูนน้อย นอกจากนี้มีการนำ IPA มาทาผื่นที่เกิดจากแมลง Paederus 8 คน พบว่า ผื่นจะหายภายใน 5-7 วัน แสดงผลเท่ากับการใช้ corticosteroid cream และทดลองใช้กับผู้ป่วยที่เป็นตุ่มพุพองเรื้อรังจากการแพ้ยุง 3 คน พบว่า IPA ทำให้อาการหายได้ดีกว่า corticosteroid cream

จากการศึกษาของ U. Pongprayoon และคณะ [18] พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบของผักบุ้งทะเล สามารถลดการอักเสบที่หูของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำโดย arachinodic acid มีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.4 mg และสามารถลดการอักเสบที่บริเวณอุ้งเท้าหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำโดย carrageenan มีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.3 mg สามารถลดการอักเสบของหูหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำโดย ethyl phenylpropiolate มีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.3 mg สำหรับกลไกของการลดการอักเสบ พบว่าเกิดจากการยับยั้ง prostaglandin ซึ่งฤทธิ์จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัด

จากการศึกษาของ U. Pongprayoon และคณะ [4, 19] พบว่าสารสกัด petroleum ether จากใบผักบุ้งทะเล มีฤทธิ์ในลดการอักเสบ และให้ผลคล้ายกับ aspirin แต่ออกฤทธิ์น้อยกว่า indomethacin โดยยับยั้งการสังเคราะห์ prostaglandin ในหลอดทดลอง สารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านการอักเสบ ได้แก่ eugenol, 2-hydroxy-4,4,7-trimethyl-1-(4*H*)-naphthalenone, (-)-mellein, 4-vinyl guaiacol, actinidols *Ia* และ *Ib* โดยสาร eugenol ออกฤทธิ์ดีที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 9.2 µmol/mL ส่วนสาร II, III, IV จะมีค่า IC_{50} เท่ากับ 340, 230 และ 18 µmol/mL ตามลำดับ

จากการศึกษาของ N. Deepak Venkataraman และคณะ [20] พบว่าการสกัดผักบุ้งทะเลส่วนที่อยู่เหนือดินด้วยสารละลาย ethanol มีฤทธิ์ต้านการอักเสบอย่างเห็นได้ชัด โดยฤทธิ์นั้นจะอยู่ในรูปแบบ dose-dependent manner ซึ่งหมายความว่าฤทธิ์จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัด โดยน้ำมันหอมระเหยจากใบมีฤทธิ์อ่อนในการยับยั้งการสังเคราะห์

prostaglandin มีค่า IC_{50} เท่ากับ 62.3 µg/mL นอกจากนี้ส่วนอื่น เช่น ก้าน ดอก และใบยังประกอบด้วยสารประกอบ alkaloids, carbohydrates, glycosides, flavonoids, tannins, sterols และ terpenoids

2) ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

จากการศึกษาของ เกสรี กลิ่นสุคนธ์ และคณะ [21] พบว่าการศึกษาฤทธิ์ antioxidant ของสารสกัดหยาบจาก ethanol โดยใช้ตัวอย่างเป็นสมุนไพรแห้งใส่ลง flask ตัวอย่างละ 1000 กรัม และเติมเอทานอล 1000 มิลลิลิตร จากนั้นหมักทิ้งไว้เป็นเวลา 3 วัน และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระในผักบุ้งทะเลด้วยวิธีการ DPPH radical assay ที่ความยาวคลื่นแสง 517 นาโนเมตร แสดงให้เห็นว่ามีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ เท่ากับ 0.0281 ± 0.0032 mg/mL

จากการศึกษาของ Umamaheshwari. G และคณะ [22] พบว่าการศึกษาฤทธิ์ antioxidant ของสารสกัดจาก 80% ethanol ของผักบุ้งทะเลในหลอดทดลอง (*in vitro*) แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระนั้นเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น โดยสารสกัดที่ความเข้มข้น 1,000 mg/mL พบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ %inhibition มีค่าเท่ากับ 56.12 ± 2.4 % ($p < 0.005$)

จากการศึกษาของ Minakshi Ganjir และคณะ [23] พบว่าการศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระระหว่างผักบุ้งทะเลและดอกบานตูม พบว่าผักบุ้งทะเลมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระได้มากกว่าดอกบานตูม

3) ฤทธิ์ต้านแพ้ (Antihistamine)

จากการศึกษาของ Wasuwat S. และคณะ [24] พบว่าสารสกัด petroleum ether ความเข้มข้น 4% ในส่วนสกัดที่เป็นไขมันที่ไม่สามารถทำปฏิกิริยาเกิดเป็นสบู่ได้ (unsaponifiable fraction) จากใบผักบุ้งทะเล และสารที่มีผลึกเป็นรูปเข็มสีขาวที่ได้จากสารสกัดด้วย petroleum ether จากใบผักบุ้งทะเล และน้ำคั้นจากใบผักบุ้งทะเลสดมีฤทธิ์ต้านฮีสตามีนเมื่อทดสอบบนผิวหนัง ส่วนสารสกัดน้ำที่ความเข้มข้น 8.75% ที่เป็นเมือกและส่วนอื่นๆ จากใบผักบุ้งทะเล พบว่าไม่มีผลต้านฮีสตามีนเมื่อทดสอบบนผิวหนัง

จากการศึกษาของ Wasuwat S. และคณะ [25] พบว่า สาร volatile ester จากใบผักบุ้งทะเล มีฤทธิ์ต้านแพ้ โดยมีผลทำให้ลำไส้เล็กของหนูตะเภาบีบตัว แต่ผลของสารให้ผลน้อยกว่ายาต้านฮีสตามีน antistine และ benadryl โดย volatile ester, antistine และ benadryl ออกฤทธิ์ต้านฮีสตามีนได้ 90% ที่ความเข้มข้นเท่ากับ $6X10^{-5}$, $1X10^{-5}$และ $1X10^{-6}$ M ตามลำดับ

4) ฤทธิ์ต้านปวด (Antinociceptive)

จากการศึกษาของ De Souza MM. และคณะ [16] พบว่าเมื่อฉีดสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอล, เมทานอล, ethyl acetate และน้ำจากส่วนเหนือดิน (aerial parts) ของต้นผักบุ้งทะเลขนาด 10 mg/kg เข้าทางช่องท้องของหนู mouse พบว่าจะช่วยลดอาการปวด ลดการบิดตัวของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำโดยกรดอะซิติกและสามารถลดอาการปวดที่อุ้งเท้าที่ถูกเหนี่ยวนำโดยฟอร์มาลิน และการให้หนูกินสารสกัด methanol พบว่าสามารถลดอาการปวดได้ใกล้เคียงกับยาพาราเซตามอลหรือยาแอสไพริน โดยสารที่ออกฤทธิ์ คือ betulinic acid, glochidone, isoquercetrin, α- และ β-amyrin acetate สารสกัดเมทานอลจากส่วนเหนือดิน ฉีดเข้าช่องท้องหนูขนาด 10-60 mg/kg 30 นาที ก่อนที่หนูจะได้รับกรดอะซิติก พบว่าจะลดการหดตัวของช่องท้องหนู ความเข้มข้นของสารที่ลดการหดตัวได้ 50% (ID_{50}) เท่ากับ 33.8 mg/kg ซึ่งผลการยับยั้งได้สูงสุด 58.7% และให้ผลใกล้เคียงกับยาแอสไพรินและพาราเซตามอล เมื่อให้สารสกัดดังกล่าวขนาด 200 mg/kg ทางปากแก่หนูถีบจักร พบว่าสามารถยับยั้งการหดตัวของช่องท้องหนูได้ 68.4±4% ส่วนสกัดที่แยกได้ละลายใน ethyl acetate และส่วนสกัดที่ละลายได้ในน้ำ ในขนาด 10 mg/kg เมื่อฉีดเข้าช่องท้องหนูถีบจักรมีฤทธิ์ยับยั้งการหดตัวของช่องท้องเท่ากับ 63.1±2 และ 71.0±4% ตามลำดับ ทั้งนี้กลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัด ไม่ได้มีความสัมพันธ์กับ opioid receptors และไม่สามารถถูกยับยั้งด้วย naloxone

จากการศึกษาของ S. Bragadeeswaran และคณะ [6] พบว่าสารสกัดจาก methanol ของดอกผักบุ้งทะเลมีฤทธิ์แก้ปวดในหนู mice อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

5) ฤทธิ์ต้านมะเร็งและการเจริญเติบโตของเนื้องอก

จากการศึกษาของ Manigauha A. และคณะ [26] พบว่าการศึกษาในหลอดทดลอง (*in vitro* study) ผักบุ้งทะเลมีความเป็นไปได้ในการป้องกันมะเร็งผิวหนังชนิดเมลาโนมา (melanoma cancer) ได้ ซึ่งผลลัพธ์ที่ได้นั้นแสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ในการต้าน melanoma cancer ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยฤทธิ์ในการต้าน melanoma cancer นั้นจัดเป็นรูปแบบ concentration dependent ซึ่งหมายความว่ายิ่งรับสารที่มีความเข้มข้นมากๆ ยิ่งมีฤทธิ์ในการต้าน melanoma cancer ได้มากขึ้น

จากการศึกษาของ Minakshi Ganjir และคณะ [23] พบว่าการศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ทางพฤกษเคมี (Phytochemical tests) และฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (cytotoxic activity) ระหว่างผักบุ้งทะเลและดอกบานตูม พบว่าสารประกอบ tannins สามารถพบได้ในทุกส่วนของผักบุ้งทะเล ส่วนดอกบานตูมจะพบเฉพาะในสารสกัดที่มีขั้วเท่านั้น นอกจากนี้

ผักบุ้งทะเลยังมีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (มากกว่า 80%) ได้มากกว่าดอกบานตูม (น้อยกว่า 75%)

จากการศึกษาของ Bang-Wei Yu และคณะ [27] พบว่าการศึกษาส่วนเหนือดินของผักบุ้งทะเลที่นำมาผ่านกระบวนการ Isolated pescapreins (XXI-XXX), Pentasaccharide resin glycosides, Pescapreins I-IV และ Stoloniferin III ได้สารประกอบที่มีความเป็นไปได้ในการรักษาโรคมะเร็งเต้านมโดยมี cell line MCF-7/ADR ซึ่งการใช้ร่วมกับสารประกอบใหม่ๆ ที่ 5 μg/mL เพิ่มฤทธิ์การกำจัดเซลล์มะเร็งของยา doxorubicin ได้ 1.5-3.7 เท่า

6) ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ

จากการศึกษาของ S. Bragadeeswaran และคณะ [6] พบว่าสารสกัดจาก methanol ของดอกผักบุ้งทะเลมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพในมนุษย์ ซึ่งไม่ใช่เพียงเชื้อจุลชีพในมนุษย์ แต่ยังรวมถึง bacteria และ fungal pathogens

7) ฤทธิ์ต้านเบาหวาน

จากการศึกษาของ Gurudeeban Selvaraj และคณะ [28] พบว่าการศึกษานี้เป็นการประเมินฤทธิ์ในการยับยั้ง ***α***-Glucosidase ของสารสกัด n-hexane ในพืชที่ใกล้ชายฝั่งทะเลหลายชนิด เพื่อควบคุมผู้ที่มีระดับน้ำตาลในเลือดสูงหลังรับประทานอาหารในตอนกลางวัน ซึ่งในสิบการศึกษานั้นจะใช้พืช ได้แก่ *Citrillus colocynthis*, *Aegle marmelos* และผักบุ้งทะเล ซึ่งสามารถยับยั้ง ***α***-glucosidase โดยมีค่า IC_{50} อยู่ที่ 85.9 ± 0.10 μg/mL, 72.23 ± 0.30 μg/mL และ 67.9 ± 0.11 μg/mL ตามลำดับ จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ผักบุ้งทะเลในการยับยั้ง ***α***-glucosidase ได้และนำไปสู่การรักษาผู้ป่วยเบาหวานได้

8) ฤทธิ์ต้านการแข็งตัวของเกล็ดเลือด

จากการศึกษาของ Rogers KL และคณะ [5] พบว่าสารสกัดจากผักบุ้งทะเลสามารถยับยั้ง ADP induced human platelet [^{14}C] 5-HT release ในหลอดทดลองและยับยั้ง ADP induced platelet aggregation ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

9) ฤทธิ์การทำให้เม็ดเลือดแดงแตกตัว

จากการศึกษาของ N. Deepak Venkataraman และคณะ [20] พบว่าการสกัดผักบุ้งทะเลด้วยตัวทำละลาย methanol นั้นถูกทดสอบในมนุษย์ ไก่ และเลือดของแพะ ซึ่งผลที่ได้แสดงให้เห็นว่ามีฤทธิ์ที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกตัวได้ในไก่ และแพะ โดยที่ตรวจพบเลือดอยู่ที่ 156 HU ในไก่และ 312 HU ในแพะตามลำดับ

10) ฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันร่างกาย

จากการศึกษาของ Marina Elisa Philippi และคณะ [29] พบว่าการศึกษาในหลอดทดลองเพื่อประเมินผลของสารสกัดจาก methanol ของผักบุ้งทะเลในประเทศบราซิล ทำให้มีการสะสมของเซลล์ T-lymphocyte แสดงว่าสารสกัดจากผักบุ้งทะเลมีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้

2.2.3 สารที่พบในใบผักบุ้งทะเลที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งพิษแมงกะพรุน

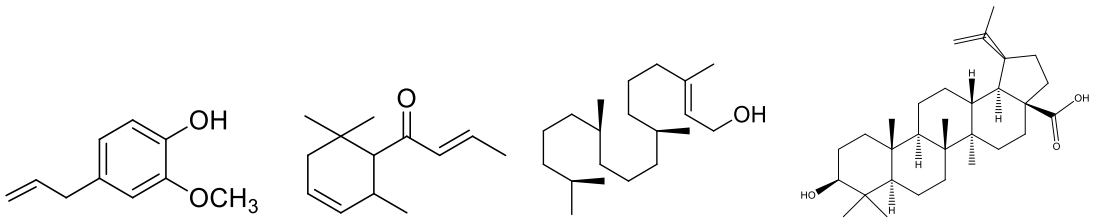
ฤทธิ์ทางชีวภาพที่ถูกคาดว่าเป็นฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับการรักษาพิษของแมงกะพรุน คือ anti-inflammation, antinociceptive และ anti-inflammation ซึ่งกลไกทั้งหมดจะทำงานร่วมกัน ทำให้สามารถการรักษาพิษ การอักเสบ การแพ้ และการเจ็บปวดจากพิษแมงกะพรุนได้

จากการทบทวนวรรณกรรม พบว่าสารสำคัญในการออกฤทธิ์ anti-inflammation ผ่านการยับยั้งการสร้าง prostaglandin อื่นๆ ได้แก่ eugenol, 2-hydroxy-4,4,7-trimethyl-1-(4*H*)-naphthalenone, (-)-mellein, 4-vinyl guaiacol, actinidols *Ia* และ *Ib* [4] โดยสาร eugenol ออกฤทธิ์ดีที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 9.2 µmol/mL ซึ่ง eugenol เป็นสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) ซึ่งมีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวน ที่เป็นอนุพันธ์ของวงแหวนเบนซิน มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH group) ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกมีฤทธิ์เป็นสารยับยั้งอนุมูลอิสระ (antioxidant) ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับ anti-inflammation เนื่องด้วยกลไกในการยับยั้ง prostaglandins โดยยับยั้งเอนไซม์ cyclooxygenase-1, cyclooxygenase-2 และเพิ่มการสังเคราะห์ nitric oxide ซึ่งจัดเป็นอนุมูลอิสระชนิดหนึ่ง นอกจากนี้ eugenol ยังมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ bacteria และ เชื้อราที่ก่อโรคหลายชนิด และสามารถใช้เป็นยาชา ยับยั้งอาการเจ็บปวดและการอักเสบจากพิษของแมงกะพรุนได้

จากการทบทวนวรรณกรรม พบว่าสารสำคัญในการออกฤทธิ์ antihistamine ในสารสกัดจากใบผักบุ้งทะเลดังกล่าว คือ *β*-damascenone และ *E*-phytol โดยสารทั้งสองมีฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดคลายตัวเป็นผลให้การอักเสบลดลงได้

จากการทบทวนวรรณกรรม พบว่าสารสำคัญในการออกฤทธิ์ antinociceptive คือ betulinic acid, glochidone, isoquercetrin, *α*- และ *β*-amyrin acetate โดยพบว่าจะลดอาการปวดได้ใกล้เคียงกับยา มาตรฐานพาราเซตามอลหรือยาแอสไพริน

สำหรับสารบ่งชี้หลักของงานวิจัยนี้ (biomarker) คือ eugenol, *E*-phytol, betulinic acid และ *β*-damascenone เนื่องจากการทบทวนวรรณกรรมพบว่างานวิจัยส่วนใหญ่เลือกเป็นสารบ่งชี้หลัก ของการออกฤทธิ์ต้านพิษแมงกะพรุน



(a) (b) (c) (d)

ภาพที่ 2-3 โครงสร้างของสารสำคัญใบผักบุ้งทะเลในการรักษาพิษจากแมงกะพรุน

(a) ลักษณะโครงสร้างของ eugenol

(b) ลักษณะโครงสร้างของ *β*-damascenone

(c) ลักษณะโครงสร้างของ *E*-phytol

(d) ลักษณะโครงสร้างของ betulinic acid

3. การสกัดแยกสารสำคัญจากใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล

การสกัด(extraction) เป็นเทคนิคในการแยกสารออกจากสารผสมโดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม การสกัดแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ การสกัดของเหลวด้วยของเหลว (liquid – liquid extraction) และการสกัดของแข็งด้วยของเหลว (solid-liquid extraction)

สำหรับการสกัดของแข็งด้วยของเหลว (solid-liquid extraction) เป็นการสกัดของแข็งด้วยตัวทำละลายที่เป็นของเหลว โดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อสารสกัดที่เป็นของแข็ง โดยปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดของแข็งด้วยของเหลว คือ ลักษณะของแข็งที่นำมาสกัด และอุณหภูมิในการสกัด โดยการสกัดของแข็งด้วยของเหลว (solid-liquid extraction) ที่ได้ปฏิบัติในการวิจัยนี้ ได้แก่ maceration, sonication และ reflux extraction

3.1 การหมักแช่ (maceration) [30]

เป็นการสกัดโดยการนำสมุนไพรแช่ไว้ในตัวทำละลายที่เหมาะสมในภาชนะที่ปิดสนิท ทิ้งไว้เป็นเวลาที่เหมาะสม (3-7 วัน) เขย่าหรือคนบ่อยๆ แล้วนำมากรองเอาสารสกัดไปใช้ หากต้องการสกัดสารจนหมดต้องสกัดซ้ำหลายครั้ง จากนั้นนำสารละลายที่กรองได้มาระเหยตัวทำละลายออก (evaporation) จะได้สารสกัดหยาบของสมุนไพรชนิดนั้น (crude extract)

ข้อดี เป็นวิธีการสกัดที่ง่ายใช้อุปกรณ์ไม่ซับซ้อน เหมาะกับพืชที่ไม่ทนความร้อน

ข้อเสีย ใช้เวลานาน สารสำคัญสามารถสลายตัวในระหว่างสกัดได้ ใช้ตัวทำละลายในการสกัดมาก และหากใช้น้ำเป็นตัวทำละลายในการสกัด จะทำให้แบคทีเรียและเชื้อราเจริญเติบโตได้

ภาพที่ 2-4 การสกัดสารโดยวิธีการหมักแช่ (maceration) [30]

3.2 การสกัดโดยคลื่นเสียงอัลตราโซนิค (sonication) [31]

การสกัดสารด้วยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงหรืออัลตราโซนิค (sonication) ร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์หรือน้ำในการสกัดสารการสกัดวิธีนี้อาศัยคลื่นเสียงในการเป็นตัวช่วยสกัดสารในตัวอย่างออกมาในการละลาย เครื่องมือชนิดนี้มีลักษณะเป็นแท่งทรงกระบอกมีขนาดความยาวและมีคลื่นความถี่ที่แตกต่างกันไป โดยปล่อยคลื่นเสียงความถี่สูงออกมาในตัวพา (น้ำหรือตัวทำละลายอินทรีย์) กระบวนการดังกล่าวจะทำให้เกิดฟองก๊าซซึ่งเกิดการหดตัวและขยายตัวเป็นวัฏจักร เมื่อฟองก๊าซขยายตัวจะดึงสารที่อยู่ภายในวัสดุออกมาละลายในตัวทำละลาย และในขณะที่ฟองก๊าซแตกออกจะเกิดความดันและความร้อนอย่างมากในบริเวณนั้นซึ่งจะมีผลทำให้เนื้อเยื่อของพืชฉีกขาด ด้วยอุณหภูมิที่สูงขึ้นทำให้สารยับยั้งอนุมูลอิสระที่ต้องการสกัดละลายในตัวทำละลายได้ดีขึ้น

การสกัดด้วยวิธีนี้จะมีประสิทธิภาพดีหรือไม่ขึ้นกับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ ความถี่ของคลื่นเสียงที่ใช้ ถ้าใช้ความถี่สูงจะใช้เวลาสั้นในการสกัด คุณสมบัติที่แตกต่างกันของตัวทำละลาย ได้แก่ ความดันไอ ตัวทำละลายที่มีความดันไอสูงสามารถสกัดได้ดีกว่าตัวทำละลายที่มีความดันไอต่ำ อุณหภูมิที่ใช้ซึ่งการสกัดเกิดได้ดีเมื่อมีอุณหภูมิสูง และความเข้มของคลื่นเสียงที่ใช้ โดยทั่วไปวิธีนี้จะใช้สกัดสารกลุ่ม secondary metabolites ของพืช และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพทำให้ได้สกัดสารได้ปริมาณมาก

ภาพที่ 2-5 การสกัดโดยคลื่นเสียงอัลตราโซนิค (sonication)

3.3 การสกัดแบบไหลย้อนกลับ (reflux extraction) [32]

การสกัดแบบไหลย้อนกลับ (reflux extraction) ใช้ในการสกัดสารสำคัญออกจากสมุนไพรที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่เป็น alcohol, hexane หรือน้ำ โดยสมุนไพรจะแช่อยู่ในตัวทำละลาย และถูกต้มให้ความร้อน เพื่อทำการสกัดสารสำคัญออกจากสมุนไพร โดยที่ตัวทำละลายจะถูกต้มและระเหยขึ้นไปด้านบน แล้วควบแน่นด้วย condenser ที่หล่อเย็นไว้ด้วยน้ำเย็นตกกลับลงมาเพื่อทำการสกัดอย่างต่อเนื่อง จนได้สารสกัดเข้มข้น แล้วจึงนำไปกรองแยกสารละลายออกมาก่อนนำไประเหยตัวทำละลายออกได้เป็นสารสกัดหยาบ (crude extract)

ข้อดี เป็นวิธีการสกัดสารที่ใช้เวลาสกัดไม่นานใช้ปริมาณตัวทำละลายน้อย ได้ปริมาณสารสกัดปริมาณมากเนื่องจากใช้ความร้อนในการช่วยสกัดสาร

ข้อเสีย ไม่เหมาะกับพืชที่ไม่ทนความร้อน เนื่องจากสารสำคัญจะสลายตัวได้เมื่อเกิดความร้อน

ภาพที่ 2-6 การสกัดแบบไหลย้อนกลับ (reflux extraction)

3.4 การสกัดของเหลวด้วยของเหลว (liquid – liquid extraction) [32]

การสกัดด้วยตัวทำละลายเป็นเทคนิคในการแยกสารออกจากของผสมโดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม การสกัดของเหลวด้วยของเหลว (liquid-liquid extraction)เป็นเทคนิคที่มีประโยชน์มากในเคมีอินทรีย์ เช่น การแยกสารออกจากของผสมที่ได้จากการสังเคราะห์ และแยกสารออกจากของผสมที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โดยจะแยกสารอนินทรีย์ออกจากสารอินทรีย์ ซึ่งนิยมให้ของผสมละลายหรือแขวนลอยในน้ำเรียกว่า ชั้นน้ำ (aqueous layer) และสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) ที่ไม่ละลายน้ำ แยกชั้นอยู่ เรียกว่า ชั้นสารอินทรีย์ (organic layer)

ตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด ควรมีสมบัติละลายสารที่ต้องการสกัดได้ดีและมีจุดเดือดที่ไม่สูงนักเพื่อที่จะกำจัดออกไปจากสารที่ต้องการได้ง่าย หลังการสกัดต้องไม่ทำปฏิกิริยากับสาร หรือกับตัวทำละลายอื่นที่จะใช้ร่วมกัน ไม่ควรติดไฟง่าย ไม่ควรมีพิษและราคาไม่แพง ตัวทำละลายที่นิยมใช้ในการสกัดสาร ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ diethyl ether, dichloromethane, ethyl acetate, 1-butanol และ benzene ในการสกัดวิธีนี้นิยมทำในกรวยแยก (separatory funnel) โดยของผสมจะแยกชั้นอยู่ตามความสามารถในการละลาย คือ สารอนินทรีย์ หรือเกลือที่ละลายน้ำ จะแตกตัวเป็นไอออนอยู่ในชั้นน้ำ ในขณะที่สารอินทรีย์จะละลายอยู่ในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ โดยวิธีนี้สารจะถูกถ่ายเทจากตัวทำละลายหนึ่งไปยังอีกตัวทำละลายหนึ่ง โดยทั่วไปสารหนึ่งๆ จะละลายในตัวทำละลาย 2 ชนิด ในอัตราส่วนที่คงที่ ที่อุณหภูมิหนึ่ง ซึ่งอัตราส่วนนี้ เรียกว่า สัมประสิทธิ์การแจกแจง (distribution coefficient) หรือสัมประสิทธิ์การแบ่งส่วน (partition coefficient) โดยสามารถเขียนสมการแสดงความสัมพันธ์ได้ดังนี้

$$K = C_1 / C_2$$

เมื่อ C_1 เป็นความเข้มข้นของสารที่สนใจในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์

C_2 เป็นความเข้มข้นของสารที่สนใจในชั้นน้ำ

โดยทั่วไปแล้วการสกัดสารจะต้องทำให้ได้สารที่ต้องการมากที่สุดโดยใช้ปริมาณตัวทำละลายน้อยที่สุด ถ้าใช้ตัวทำละลายที่สกัด ในปริมาตรที่เท่าๆ กันการสกัดที่ใช้ตัวทำละลายครั้งละไม่มาก แต่ทำหลายๆ ครั้ง จะมีประสิทธิภาพของการสกัดสูงกว่า เมื่อเทียบกับการสกัดที่ทำ น้อยครั้งแต่ใช้ตัวทำละลายครั้งละมากๆ

ภาพที่ 2-7 การสกัดแยกส่วน (liquid partition)

4. การวิเคราะห์สารสำคัญในสารสกัดจากใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล

เป็นการใช้เทคนิคทาง chromatography และ spectroscopy ต่างๆในการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี และกลุ่มของสารสำคัญโดยเทคนิคต่างๆที่ใช้วิเคราะห์มีดังนี้

4.1 วิธีวิเคราะห์โดยธินแลเยอร์โครมาโทกราฟี (thin layer chromatography; TLC)

Thin layer chromatography (TLC) เป็นเทคนิคการวิเคราะห์องค์ประกอบสารที่รวดเร็ว สะดวก และราคาไม่แพง สามารถใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารระหว่างกระบวนการแยกสาร ใช้ในการยืนยันชนิดของสาร และตรวจหาจำนวนองค์ประกอบในของผสม เนื่องจากใช้สารปริมาณน้อยมากในการแยก เทคนิค TLC จึงเหมาะสมเป็นเครื่องมือวิเคราะห์ มากกว่าที่จะเป็นเครื่องมือในการแยกสารเพื่อเก็บแต่ละองค์ประกอบ ในปัจจุบันมีการผสมสารเรืองแสง เช่น ซิงค์ซัลไฟด์ (ZnS) ไว้ด้วย ซึ่งจะทำให้ สามารถสังเกตตำแหน่งของสารโดยใช้แสง UV ได้

4.1.1 ทฤษฎีของธินแลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin layer chromatography) [33]

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารและวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี โดยอาศัยหลักการเคลื่อนที่ของสารด้วยตัวทำละลายหรือตัวพา (mobile phase) กับการถูกดูดซับโดยตัวดูดซับ (adsorbent หรือ stationary phase) ซึ่งอัตราการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างบนตัวดูดซับ ขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายของสารตัวอย่างกับตัวทำละลาย และความสามารถในการดูดซับของตัวดูดซับที่มีต่อสารตัวอย่างในแต่ละชนิด สารตัวอย่างที่แตกต่างกันจะถูกละลายและถูกดูดซับได้ไม่เท่ากัน โดยสารที่ละลายในตัวทำละลายได้ดีและถูกดูดซับน้อยจะเคลื่อนที่เร็ว ค่า R_f เข้าใกล้ 1.0 (R_f = ระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่/ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่) ส่วนสารที่ละลายในตัวทำละลายได้น้อยและถูกดูดซับได้ดีจะเคลื่อนที่ช้า ค่า R_f จะเข้าใกล้ 0 ซึ่งตัวดูดซับที่นิยมใช้ คือ ซิลิกาเจล ตัวทำละลายหรือตัวพาที่นิยมนำมาใช้ในการแยกสารมีหลายชนิด ทั้งนี้อาจมีการใช้ตัวทำละลายเพียงชนิดเดียวหรือหลายชนิดผสมกันเพื่อให้เกิดการแยกที่ดีที่สุด ตัวอย่างของตัวทำละลาย เช่น ethanol, methanol, ethyl acetate, formic acid และ chloroform สารตัวอย่างบางชนิดสามารถแยกโดยใช้ TLC แล้ว สามารถมองเห็นสีได้ด้วยตาเปล่า ได้แก่ anthocyanin, chalcone และ aurone แต่บางชนิดต้องนำแผ่น TLC ไปส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (UV) หรือฉีดพ่นด้วย reagent ที่จำเพาะกับกลุ่มสาร เช่น สารละลายโฟลินสารละลายวานิลลินในกรดซัลฟูริก สารละลายวานิลลินในกรดไฮโดรคลอริก เป็นต้น

ข้อดีของวิธีนี้ คือ สามารถวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบโดยใช้สารตัวอย่างในปริมาณน้อย สามารถวิเคราะห์สารหลายชนิดได้พร้อมกัน ใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น ขั้นตอนไม่ยุ่งยากซับซ้อน ใช้ต้นทุนต่ำในการวิเคราะห์ตัวอย่าง สามารถแยก

องค์ประกอบต่างๆ ในสารตัวอย่างได้ทั้งที่มีสีและไม่มีสี แต่มีข้อเสีย คือ มีความไวและความแม่นยำต่ำ และในกรณีที่องค์ประกอบต่าง ๆ ในตัวอย่างมีค่า R_f ใกล้เคียงกันมาก จะไม่สามารถแยกองค์ประกอบต่าง ๆ เหล่านั้นออกจากกันได้ หรือแยกได้แต่ไม่บริสุทธิ์

ภาพที่ 2-8 การวิเคราะห์องค์ประกอบสารด้วยวิธีธินแลเยอร์โครมาโทกราฟี

4.1.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบสารด้วยวิธีธินแลเยอร์โครมาโทกราฟี

1) การส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ความยาวช่วงคลื่น 254 nm

เป็นการหาตำแหน่งการเคลื่อนที่ของสารที่ไม่มีสี โดยการใช้แผ่น TLC สำเร็จรูปที่มีการผสมซิงค์ซัลไฟด์ หากพบ double bond หรือ aromatic ring จะปรากฏสีม่วง

2) การส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ความยาวช่วงคลื่น 366 nm

เป็นการหาตำแหน่งการเคลื่อนที่ของสารที่ไม่มีสี โดยการใช้แผ่น TLC สำเร็จรูปที่มีการผสมซิงค์ซัลไฟด์ หากพบสารฟลาโวนอยด์ จะปรากฏสีเหลืองเรืองแสง

3) การแช่ใน Iodine

หากพบสารประกอบออร์แกนิค เช่น unsaturated และ สารประกอบ aromatic จะปรากฏสีน้ำตาลเหลือง

4) การสเปรย์รีเอเจนท์ *p*-anisaldehyde/sulfuric acid

หากพบสารฟีนอล น้ำตาล สเตอรอยด์ และเทอร์พีน จะปรากฏสีม่วง น้ำเงิน แดง เทาและเขียว ตามลำดับ หลังให้ความร้อน ที่ 105 องศาเซลเซียสระยะเวลาหนึ่ง

5) R_f (retention factor)

เป็นการหาระยะทางทั้งหมดที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (จาก spotting ถึง solvent front) และใช้ในการบ่งบอกชนิดของสารได้โดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

4.2 วิธีวิเคราะห์โดยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (GC-MS)

เป็นเครื่องมือสำหรับแยกวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารในสภาวะแก๊ส โดยใช้ตัวตรวจวัด (detector) เป็นแบบเครื่องวิเคราะห์มวลสาร (mass spectrometer) จัดเป็นเครื่องที่ใช้เทคโนโลยีขั้นสูง มีความถูกต้องและความแม่นยำในการวิเคราะห์สูง สามารถวิเคราะห์สารตัวอย่างได้มากมายหลายชนิด โดยเครื่อง GC-MS นั้นประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนของเครื่อง gas chromatography (GC) และส่วนของเครื่อง mass spectrometer (MS)

ภาพที่ 2-9 ลักษณะเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (GC-MS) [34]

4.2.1 ทฤษฎีของ gas chromatography (GC) [34]

หลักการทำงานของเครื่อง gas chromatography (GC) อาศัยเทคนิคแยกองค์ประกอบของสารผสม ด้วยความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของแต่ละองค์ประกอบบนเฟสคงที่ (stationary phase) ภายใต้การพาของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ส่วนเฟสเคลื่อนที่ คือ แก๊สฮีเลียม ส่วนเฟสคงที่ คือ สารที่อยู่ภายในคอลัมน์ เมื่อสารที่ต้องการวิเคราะห์ผ่านเข้าสู่เครื่องสารดังกล่าวจะถูกเปลี่ยนจากสถานะจากของเหลว (liquid) เป็นแก๊ส (gas) และจากนั้นแก๊สของสารผสมจะถูกพาเข้าสู่คอลัมน์โดยแก๊สฮีเลียม ซึ่งภายในคอลัมน์จะเกิดการแยกสาร โดยอาศัยการทำปฏิกิริยา ระหว่างสารที่อยู่ภายในคอลัมน์และสารผสม

4.2.2 ทฤษฎีของ mass spectrometry (MS) [34]

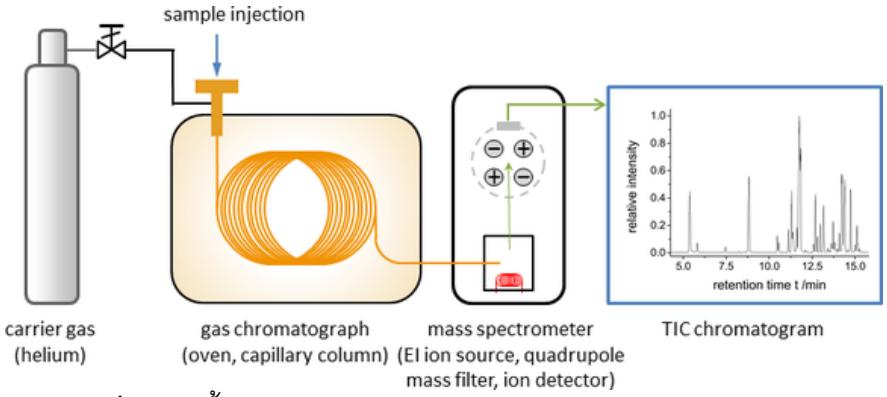
หลักการทำงานของเครื่อง mass spectrometry (MS) อาศัยเทคนิคทำให้สารประกอบเคมีกลายเป็นประจุ (ionize) เพื่อสร้างโมเลกุลที่มีประจุขึ้นมาและวัดสัดส่วนมวลต่อประจุ (mass-to-charge ratio) ของอนุภาคที่มีประจุ

4.2.3 ทฤษฎีของ gas chromatography- mass spectrometry (GC-MS) [34]

GC-MS เป็นเทคนิคที่รวมข้อดีของ 2 เทคนิค รวมกันซึ่งนำมาวิเคราะห์พวกสารผสมที่สามารถระเหยได้ในอุณหภูมิไม่สูงนัก โดยที่ gas chromatography เป็นส่วนที่แยกสารผสมออกจากกัน ซึ่งสารนั้นสามารถกลายเป็นไอได้ง่ายซึ่งวิธี gas chromatography จะมี

ความสามารถในการแยกสารผสมกลายเป็นไอสูง ส่วน mass spectrometer เป็นส่วนที่การวิเคราะห์ชนิดของสารหรือองค์ประกอบของสาร มีความจำเพาะต่อการตรวจวัด มีสภาพไวในการตรวจวัดสูงและให้ข้อมูลแมสสเปกตรัมของสารที่สามารถใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์สารได้อย่างมีประสิทธิภาพ

GC-MS ใช้เทคนิคในการวิเคราะห์สารระเหยได้ขั้นสูงที่สามารถใช้ในการทำนายชนิดขององค์ประกอบที่มีอยู่ในสารได้อย่างค่อนข้างแม่นยำโดยอาศัยการเปรียบเทียบ fingerprint ของเลขมวล (mass number) ของสารตัวอย่างนั้นๆ กับข้อมูลของสารที่มีอยู่ใน library เพื่อการวิเคราะห์ได้ทั้งในเชิงปริมาณ (quantitative analysis) และเชิงคุณภาพ (qualitative analysis) ระหว่างสารตัวอย่างและสารมาตรฐาน



ภาพที่ 2-10 ขั้นตอนการวิเคราะห์องค์ประกอบสารด้วยวิธี GC-MS [34]

5. นิยามของการอักเสบและกลไกการอักเสบ

การอักเสบ หมายถึง ปฏิกิริยาการตอบสนองของร่างกายต่อสิ่งแปลกปลอมที่มากระตุ้นหรือทำลายเนื้อเยื่อให้เกิดความเสียหาย (Injury) หรือตายลง โดยลักษณะสำคัญที่สามารถสังเกตได้ 5 อย่าง คือ อาการปวดบริเวณที่อักเสบ (pain), บริเวณที่อักเสบมีอุณหภูมิที่สูงขึ้น (heat), บวมบริเวณที่อักเสบ (swelling) บริเวณที่อักเสบมีลักษณะแดงขึ้น (redness) และมีการเสียหน้าที่การทำงานของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่เกิดการอักเสบ (loss of function)

5.1 สาเหตุที่ทำให้เกิดการอักเสบ [35]

แบ่งจากสิ่งกระตุ้นได้เป็น 2 ประเภทหลักๆ คือ

5.1.1 การอักเสบจากการติดเชื้อ (infections)

การอักเสบที่เกิดจากการติดเชื้อ เช่น เชื้อแบคทีเรีย เชื้อราและฟังก์ไจ

5.1.2 การอักเสบที่ไม่ได้เกิดจากการติดเชื้อ (non-infections)

การอักเสบที่ไม่ได้เกิดจากการติดเชื้อ เช่น สารเคมี สิ่งแปลกปลอมจากภายนอกร่างกาย ปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกัน การตายของเนื้อเยื่อ อันตรายจากการบาดเจ็บ (trauma) เป็นต้น

5.2 ประเภทของการอักเสบ [36]

สามารถแบ่งจากระยะเวลาที่เกิดการอักเสบแบ่งได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่

5.2.1 การอักเสบแบบเฉียบพลัน (Acute inflammatory)

การอักเสบในช่วงเวลาเป็นนาที ชั่วโมงหรือเป็นวัน สาเหตุที่ทำให้เกิดการอักเสบแบบเฉียบพลันมักจะมาจากสารเคมี อุบัติเหตุ หรือการติดเชื้อ เป็นต้น

ลักษณะเด่น: เป็นหนอง (exudate) ที่มี neutrophil อยู่เป็นจำนวนมาก (neutrophil-rich) ส่วนใหญ่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย (pyogenic bacteria) โดยการอักเสบแบบเฉียบพลันจะเกิดการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญ 3 อย่าง ได้แก่

1) การขยายตัวของหลอดเลือด ทำให้มีเลือดมาเลี้ยงเพิ่มขึ้น

2) การเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของหลอดเลือด ทำให้เซลล์และสารประกอบโปรตีนรั่วไหลออกนอกหลอด เลือดได้

3) การเคลื่อนตัวของเม็ดเลือดขาวออกหลอดเลือด เข้าสู่เนื้อเยื่อที่เกิดอันตราย

5.2.2 การอักเสบแบบเรื้อรัง (Chronic inflammatory)

การอักเสบในช่วงเวลาหลายสัปดาห์ หลายเดือนหรือหลายปี โดยยังคงมีการอักเสบดำเนินอยู่ (active inflammation) ร่วมกับมีการทำลายเนื้อเยื่อ (tissue destruction) และการสมาน (healing) ดำเนินไปพร้อมๆกัน สาเหตุที่ทำให้เกิดการอักเสบแบบเรื้อรังมักจะมาจากการติดเชื้อที่รักษาไม่หาย, การได้รับบาดเจ็บต่อเนื้อเยื่อเป็นเวลานานและโรคทางภูมิคุ้มกันต้านทานตนเอง เป็นต้น โดยการอักเสบแบบเรื้อรังจะเกิดการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญ 3 อย่าง ได้แก่

1) การแทรก (infiltration) ของเซลล์ก่อการอักเสบชนิด mononuclear ได้แก่ macrophage lymphocyte และ plasma cell

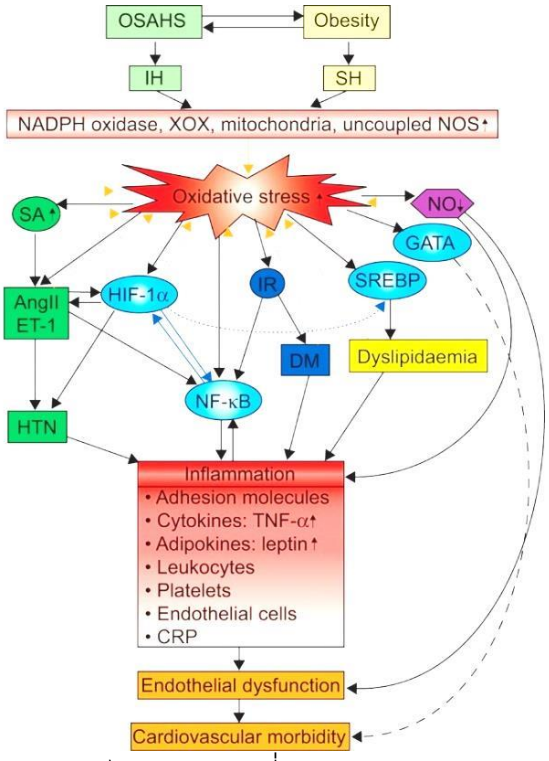
2) การทำลายของเนื้อเยื่อ (tissue destruction)

3) การซ่อมแซม โดยการสร้างพังผืด หรือ connective tissue มาแทนที่

5.3 กลไกการอักเสบผ่าน Oxidative Stress [37]

ภาวะเครียดที่เกิดจากออกซิเดชั่น (oxidative stress) เกิดจากความไม่สมดุลระหว่างอนุมูลอิสระกับระบบต้านออกซิเดชั่นในร่างกาย ส่งผลให้ดีเอ็นเอ โปรตีน ไขมัน ถูกทำลายโดยปฏิกิริยาออกซิเดชั่น

อนุมูลอิสระ (free radical) หมายถึง สารหรือโมเลกุลใดๆ ที่มีอิเลคตรอนโดดเดี่ยว (unpaired electron) ที่ชั้นนอกสุดทำให้มีความไวต่อการทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นๆ อนุมูลอิสระแบ่งออกเป็นหลายประเภท ได้แก่ reactive oxygen species (ROS) เช่น superoxide radical, hydroxyl radical, singlet oxygen ในบางครั้งอาจไม่จัดให้ singlet oxygen เป็นอนุมูลอิสระ แต่โดยคุณสมบัติแล้ว singlet oxygen ก็สามารถทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ได้ การเกิด ROS สามารถเพิ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบหลายชนิดผ่านทางกลไกการกระตุ้น nuclear factor-kappaB (NF-KB) ซึ่งเป็น transcription factor ของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันและการอักเสบ



ภาพที่ 2-11 กลไกการอักเสบที่เกิดผ่าน oxidative stress [36]

6. พิษจากแมงกะพรุนและรักษาพิษจากแมงกะพรุน

แมงกะพรุน (jellyfish) คือ สัตว์น้ำชนิดหนึ่งจัดอยู่ในประเภทสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังมีลักษณะ ใสคล้ายวุ้น ด้านบนเป็นวงโค้งคล้ายร่ม ด้านล่างตอนกลางเป็นอวัยวะทำหน้าที่กินและย่อยอาหาร แมงกะพรุนจัดอยู่ในไฟลัม Colenterata เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีรูปร่างคล้ายร่มหรือกระดิ่งคว่ำ (medusa) ต่อกับหนวดยาว มีลำตัวโปร่งแสงวุ้นเป็นส่วนใหญ่ มีโครงร่างเป็นแบบที่ เรียกว่า hydrostatic skeleton ส่วนประกอบหลักเป็นน้ำ 95% และมีเข็มพิษ (nematocyst) อยู่ทั่วตัว โดยเฉพาะบริเวณหนวด และรอบๆ ปาก อาศัยอยู่ทั้งในน้ำเค็มและน้ำจืด ส่วนมากจะเคลื่อนไหวไปตามกระแสน้ำ แต่บางชนิดก็สามารถว่ายน้ำได้เอง [38]

ภาพที่ 2-12 ลักษณะของแผลที่โดนพิษของแมงกะพรุน [39]

6.1 กลไกการเกิดพิษจากแมงกะพรุน

แมงกะพรุน มีเข็มพิษ (nematocyst) อยู่ที่บริเวณหนวด เข็มพิษสร้างขึ้นจาก นีโดไซท์ (cnidocyte) มีลักษณะเป็นถุงกระเปาะ ซึ่งภายในเข็มพิษจะประกอบไปด้วยพิษและเข็มพิษที่มีปลายเป็นฉมวกยาวคล้ายเส้นด้ายขดอยู่ ซึ่งปกติแมงกะพรุนจะใช้เข็มพิษในการล่าเหยื่อเพื่อจับพวกปลาและสัตว์น้ำขนาดเล็ก เนื่องจากเข็มพิษของแมงกะพรุนไม่มีระบบประสาทควบคุม ดังนั้นหากมีสิ่งเร้าทางกายภาพและเคมีมากระทบ เข็มพิษจะถูกขับออกจากเซลล์และหลั่งพิษที่บรรจุอยู่ออกมาพิษจะออกอย่างรวดเร็ว เมื่อถูกกระตุ้นโดยการกระตุ้น mechanical stimuli, osmotic stimuli, หรือ chemical stimuli เข็มพิษของแมงกะพรุนมีประโยชน์ ใช้สำหรับการฆ่าเหยื่อ หรือทำให้เหยื่อสลบก่อนจับกินเป็นอาหาร โดยเฉพาะ ปลาขนาดเล็ก และใช้ในการป้องกันตัวจากสัตว์ชนิดอื่น ซึ่งปริมาณของเข็มพิษอาจมีจำนวนถึง 80,000 เซลล์ ใน 1 ตารางเซนติเมตร [39]

เมื่อหนวดของแมงกะพรุนสัมผัสกับผิวหนังจะกระตุ้นให้กระเปาะปล่อยเข็มพิษ น้ำพิษซึ่งประกอบไปด้วยสารน้ำเฉื่อย (inert fluid) และเกลือ จะถูกปล่อยออกมาพร้อมกันออกมา พร้อมกับปล่อยพิษออกมาด้วย มีผลยับยั้งหรือรบกวนกระบวนการทางชีวภาพต่างๆ ภายในร่างกายของ

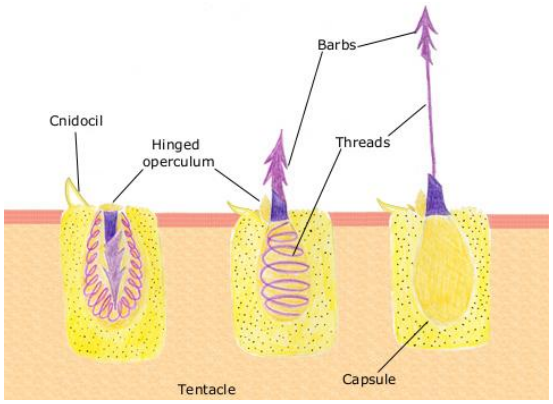
เหยื่อ มีการแพร่กระจายผ่านระบบไหลเวียนโลหิต ซึ่งก่อให้เกิดอาการตอบสนองต่อพิษได้ทั้ง ที่บริเวณผิวหนังที่สัมผัสระบบ metabolism ของร่างกาย

ปัจจุบันองค์ประกอบ และรูปแบบของสารพิษในแมงกะพรุน ไม่มีข้อมูลชัดเจน โดยพบว่าพิษจากแมงกะพรุนประกอบไปด้วยสารในกลุ่มโปรตีน (proteinaceous toxin) ได้แก่ elastases, dnase, histamine, protease, haemoglutinin, alkaline protease และกลุ่มของสารที่ไม่ใช่โปรตีน ได้แก่ สารในกลุ่ม aliphatic long chain molecule (polytoxin) ซึ่งพิษแมงกะพรุนออกฤทธิ์โดย [3]

6.1.1 ทำให้เซลล์ผิวหนังบริเวณที่เข็มพิษแมงกะพรุนสัมผัส เกิดการแพ้และอักเสบของเซลล์ผิวหนัง

6.1.2 ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกจากพิษแมงกะพรุนที่ซึมเข้าสู่กระแสเลือด ทำให้เกิดภาวะไตวายเฉียบพลันได้

6.1.3 ทำให้เกิดผลต่อหัวใจจากโดย ทำให้หัวใจเต้นผิดจังหวะ และกดระบบประสาทส่วนกลางทำให้หยุดหายใจ



ภาพที่ 2-13 ลักษณะเข็มพิษของแมงกะพรุน [39]

6.2 ชนิดของแมงกะพรุนที่พบได้ตามชายฝั่งทะเลไทย

สามารถจำแนกได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่

6.2.1 แมงกะพรุนที่สามารถบริโภคได้

จากการสำรวจของพจณา บุณยเนตร (2521) พบว่าแมงกะพรุนที่สามารถบริโภคได้ในอ่าวไทยประกอบด้วย 3 ชนิด คือ

1) แมงกะพรุนลอดช่อง (*Lobonemasmithii* sp.)

ลักษณะลำตัวใส สีฟ้า ชมพู ขาว หรือ ม่วงคราม ลักษณะผิวภายนอกของร่มมีรยางค์คล้ายเป็นวุ้น เป็นเส้นตรงเหมือนเส้นลอดช่องสิงคโปร์ รยางค์ที่อยู่ตรงกลางใต้ร่มมีขนาดใหญ่ ซึ่งขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางร่มที่พบว่านำมาใช้ทำแมงกะพรุนแห้งอยู่ระหว่าง 20-50 cm

2) แมงกะพรุนหนัง (*Rhopilomahispidum* sp.) หรือแมงกะพรุนส้มโอ

ลักษณะลำตัวสีขาว หรืออาจมีจุดประสีน้ำตาล ผิวหยาบขรุขระค่อนข้างแข็งคล้ายเปลือกส้มโอ

3) แมงกะพรุนหอม (*Mastigas* sp.)

ลักษณะลำตัวสีน้ำตาลไหม้ ผิวนอกเป็นปุ่มนูนยาวคล้ายผิวมะกรูด

ภาพที่ 2-14 ลักษณะแมงกะพรุนที่สามารถบริโภคได้ [39]

(เรียงลำดับจากซ้ายไปขวา: แมงกะพรุนลอดช่อง แมงกะพรุนหนัง และ แมงกะพรุนหอม)

6.2.2 แมงกะพรุนที่เป็นพิษ

สำหรับในอ่าวไทยจะยังไม่มีการจำแนกชนิดของแมงกะพรุนที่เป็นพิษที่แน่นอน แต่แมงกะพรุนที่เป็นพิษที่รู้จักกันดีอยู่แล้ว คือ แมงกะพรุนไฟ (*Physaliaphysalis* sp.) ซึ่งแมงกะพรุนไฟนี้ มีรูปร่างคล้ายแมงกะพรุนหนังแต่มีขนาดเล็กกว่า มีร่างกายส่วนที่เป็นร่มค่อนข้างแบน บริเวณขอบร่มบาง ส่วนที่คล้ายด้ามร่มเป็นสายพันกันไปมา และบางส่วนพองเป็นถุง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของร่มประมาณ 30 cm และมีสีน้ำตาลอมม่วง นอกจากนี้ยังมีแมงกะพรุนสาหร่ายและแมงกะพรุนหวี ซึ่งลักษณะที่คล้ายกัน คือ มีหนวดเป็นสายยาวต่อจากลำตัวหลายเส้น แต่ละเส้นยาวประมาณ 1.5 m ถ้าหนวดนี้ขาดหลุดออกไปก็สามารถทำอันตรายกับผู้ที่สัมผัสหนวดแมงกะพรุนได้

ภาพที่ 2-15 ลักษณะแมงกะพรุนที่เป็นพิษ [39]

(เรียงลำดับจากซ้ายไปขวา: แมงกะพรุนไฟ และ แมงกะพรุนหวี)

6.3 อาการแสดงของผู้ได้รับพิษของแมงกะพรุน [38]

หลังจากได้รับพิษจากแมงกะพรุน พิษจะเข้าสู่ร่างกายทางผิวหนังและผ่านเข้าสู่กระแสเลือดอย่างรวดเร็วโดย ปกติในคนสุขภาพดีจะใช้เวลาไม่เกิน 20 วินาที จะเริ่มแสดงอาการของพิษ อาการของผู้ป่วยที่ได้รับพิษแมงกะพรุนจะแตกต่างกันไปตั้งแต่มีผลเพียงเล็กน้อย คือ เจ็บเหมือนถูกมดกัดบริเวณบาดแผล คัน ระคายเคืองเป็นผื่น บวมแดง แสบร้อนบริเวณที่สัมผัส จนถึงมีอาการรุนแรง เช่น เป็นรอยไหม้บริเวณที่สัมผัสแมงกะพรุน และรอบๆ หรือบริเวณใกล้เคียง มีอาการบวมแดง เป็นผื่น ลมพิษ เกิดบาดแผลที่จะขยายขนาดอย่างรวดเร็วเนื่องจากการอักเสบ มีอาการปวดอย่างรุนแรงซึ่งความเจ็บป่วยอาจแผ่ลามไปถึงต่อมน้ำเหลืองบริเวณใกล้เคียง เซลล์หรือเนื้อเยื่อบริเวณที่สัมผัสเข็มพิษโดยตรงอาจตายได้ ผิวหนังลอกเป็นสะเก็ด ต่อมาตุ่มหรือผื่นลมพิษที่อักเสบเกิดพุพองเป็นหนองหรือเป็นผื่น และอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงของสีผิวเข้มขึ้น (hyperpigmentation) ซึ่งจะคงอยู่นานหลายปีหลังสัมผัสแมงกะพรุน

นอกจากนี้อาการอื่นที่อาจเกิดร่วมด้วยได้แก่เช่น คลื่นไส้อาเจียน อ่อนเพลีย คลื่นไส้อาเจียน ปวดกล้ามเนื้อ ปวดศีรษะ บริเวณท่อทางเดินหดเกร็ง เหงื่อออกมาก น้ำตาและน้ำมูกไหล กล้ามเนื้อบริเวณช่องท้องและหลังเกร็ง สูญเสียการทรงตัว หายใจลำบาก เม็ดเลือดแดงถูกทำลาย การทำงานของไตผิดปกติ และหมดสติอาจเสียชีวิตได้

6.4 วิธีการรักษาพิษของแมงกะพรุนโดยใช้ผักบุ้งทะเล [3]

6.4.1 เมื่อถูกพิษของแมงกะพรุน ให้ล้างพิษด้วยน้ำทะเลตรงผิวหนังที่โดนพิษโดยเร็วที่สุด โดยหลีกเลี่ยงน้ำจืด เพราะน้ำจืดจะกระตุ้นพิษให้กระจายมากขึ้น ใช้ของไม่มีคมบางๆ หรือใช้ทรายขาวสะอาดถูเบาๆเพื่อให้เซลล์เข็มพิษหลุดออกไปให้มากที่สุด

6.4.2 ใช้ผักบุ้งทะเลผสมน้ำส้มสายชูความเข้มข้น 5% หรือหมักกับแอลกอฮอล์เป็นเวลา 7 วัน นำมาประคบบริเวณผิวหนังที่โดนเข็มพิษ แล้วนำผ้าขาวบางห่อทิ้งไว้ ประมาณ 30-60 นาที จนอาการปวดแสบปวดร้อนจากพิษแมงกะพรุนลดลง ผู้ที่โดนพิษแมงกะพรุนอาจจะมี

อาการแสดงแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับภูมิคุ้มกันของแต่ละคน เช่น แพ้พิษทำให้เป็นไข้ หรืออาเจียน หรือเป็นผื่นรุนแรง และปวดแสบปวดร้อน ซึ่งปกติแล้วผู้ป่วยที่โดนพิษแมงกะพรุนชนิดที่ไม่รุนแรง หากรักษาตามอาการและจะหายภายใน 2-3 วัน แต่ยังคงเหลือร่องรอยบาดแผลของการโดนพิษปรากฏอยู่นานเป็นเดือน แต่ถ้าหากเป็นแมงกะพรุนชนิดที่รุนแรง ก็มีโอกาสที่จะเสียชีวิตได้

6.4.3 สำหรับผู้ป่วยที่โดนพิษแมงกะพรุนกล่อง (box jellyfish) หรือ แมงกะพรุนไฟ (Portuguese man-of-war) พิษจะมีความรุนแรงมาก โดยจะมีลักษณะของผิวหนังที่โดนจะเป็นรอยไหม้ ซึ่งต้องนำส่งโรงพยาบาลโดยด่วน เพราะอาจเป็นอันตรายต่อชีวิตได้

ระหว่างทำการปฐมพยาบาลควรจัดให้ผู้ป่วยอยู่ในที่อากาศถ่ายเท หมั่นสังเกตการไหลเวียนเลือด อาการผิดปกติ ในกรณีที่ผู้ป่วยหมดสติหรือหยุดหายใจ ต้องรีบทำการกู้ชีพ (cardio-pulmonary resuscitation; CPR) และนำส่งแพทย์ทันที

ภาพที่ 2-16 การรักษาพิษของแมงกะพรุนโดยใช้ผักบุ้งทะเลผสมน้ำส้มสายชู 5% [3]

7. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด

อนุมูลอิสระ (free radicals) เป็นโมเลกุล หรือไอออนที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวอยู่รอบนอก และมีอายุที่สั้นมาก จึงเป็นสารไม่เสถียร สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ว่องไว และสามารถทำปฏิกิริยากับโมเลกุลต่างๆในร่างกาย เช่น โปรตีน ไขมัน หรือ สารพันธุกรรม เป็นต้น ในบางครั้ง หากภาวะที่อนุมูลอิสระมีมากเกินไปในร่างกาย อาจจะก่ออันตรายแก่ร่างกายของเรา เรียกภาวะนี้ว่า oxidative stress ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในร่างกาย และเกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม

สารต้านออกซิเดชันหรือสารยับยั้งอนุมูลอิสระ (antioxidant) คือ สารที่สามารถชะลอและยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา ออกซิเดชัน ซึ่งนำไปสู่การเกิดสารอนุมูลอิสระ (free radicals) ได้ ซึ่งร่างกายของสิ่งมีชีวิตมีระบบยับยั้งอนุมูลอิสระ แต่สารยับยั้งอนุมูลอิสระในร่างกายมีอยู่อย่างจำกัด

จึงต้องอาศัยสารยับยั้งอนุมูลอิสระจากภายนอกไม่ว่าจะเป็นสารจากธรรมชาติหรือจากการสังเคราะห์เพื่อใช้ในการป้องกันหรือลดการเกิดอนุมูลอิสระ

โดยเมื่อสารประกอบฟีนอลิกให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระไปแล้ว อนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกจะค่อนข้างมีเสถียรภาพ ดังนั้น จึงไม่ทำปฏิกิริยาอื่นๆ ต่อไป

ในปัจจุบัน สารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ ได้รับความสนใจและมีการค้นคว้าอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจาก มีความปลอดภัยมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ ซึ่งสามารถพบได้ทั้งในจุลชีพ สัตว์ และพืช เช่น วิตามินซี วิตามินอี รวมถึง สารที่ไม่ให้คุณค่าทางโภชนาการ ซึ่งมีโครงสร้างเป็นสารประกอบฟีนอลิค โดยเฉพาะกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenols) เช่น แซนโธน (xanthone) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ซึ่งประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิลที่เกาะบนวงเบนซีน (aromatic hydroxyl) ตั้งแต่ 2 หมู่ขึ้นไป ซึ่งหมู่ฟังก์ชั่นเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการดักจับอนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้น หรือก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ โดยการให้อนุมูล $H^{\bullet}$ แก่อนุมูลอิสระเหล่านั้น สารประกอบกลุ่มโพลีฟีนอล สามารถพบได้ ในพืชพรรณธรรมชาตินานาชนิด ซึ่งสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีทั้งในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) และในสิ่งมีชีวิต [42]

7.1 ความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ anti-inflammatory และฤทธิ์ antioxidant ผ่านกลไก nitric oxide production

เซลล์แมคโครฟาจเป็นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันแต่กำเนิด ทำหน้าที่หลักในการกระตุ้นกระบวนการอักเสบ เพื่อกำจัดจุลชีพ สารพิษ และสิ่งแปลกปลอม โดยการสร้างอนุมูลอิสระไนตริก ออกไซด์ (nitric oxide; NO) อนุพันธ์ออกซิเจน (reactive oxygen species; ROS) และสารก่อการอักเสบ ซึ่งการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดใบถั่วทะแลและใบผักบุ้งทะเลที่ถูกกระตุ้นด้วย endotoxin ของแมงกะพรุนซึ่งเมื่อถูกพิษของแมงกะพรุนร่างกายจะเพิ่มการสร้าง NO/ROS เพื่อกระตุ้นให้เกิดการอักเสบเกิดขึ้น ซึ่งไนตริกออกไซด์ นั้นจัดเป็นอนุมูลอิสระชนิดหนึ่ง จึงแสดงให้เห็นว่า antioxidant นั้นมีความสัมพันธ์กับ anti-inflammatory activity ผ่านกลไก nitric oxide production ทำให้สามารถสรุปได้ว่า หากสารสกัดหยาบของถั่วทะเลหรือผักบุ้งทะเลนั้นมีฤทธิ์ antioxidant ก็จะมีฤทธิ์ anti-inflammatory ด้วยเช่นกัน [40]

7.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ [41]

วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ การวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพและการวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ

7.2.1 วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพ

การวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพเป็นการทดสอบเพื่อหาชนิดของสารยับยั้งอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในตัวอย่าง โดยอาศัยหลักการต่าง ๆ เช่น การทำให้เกิดสี การทำให้เกิดตะกอน ความสามารถของการละลายในตัวทำละลาย และการถูกดูดซับโดยตัวดูดซับ วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระที่นิยมได้แก่ การตรวจวัดสารโพลีฟีนอลชนิดต่างๆ เช่น Shinoda test และ Pew test โครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (TLC) และ การตรวจหาสารยับยั้งอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ โดยใช้เครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) ซึ่งวิธีที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยคือ การวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของสารโพลีฟีนอลด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (TLC)

7.2.2 วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ

การวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระเชิงปริมาณเป็นการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณของสารยับยั้งอนุมูลอิสระในตัวอย่างประเภทต่างๆ วิธีที่นิยม ได้แก่ การวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH, วิธีการฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS และการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารยับยั้งอนุมูลอิสระ (FRAP assay) ซึ่งวิธีการดังกล่าวข้างต้น จะมีการสร้างอนุมูลอิสระที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน และวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้ง หรือกำจัดอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างที่สนใจ โดยวัดปริมาณอนุมูลอิสระที่ลดลง หรือที่เหลือจากค่าการดูดกลืนแสง

การคำนวณหาปริมาณสารยับยั้งอนุมูลอิสระ หาได้จากอัตราส่วนของการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน เช่น วิตามินอี (เป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติที่พบบริเวณเมมเบรน), วิตามินซี (เป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติที่พบบริเวณไซโตพลาซึม) และ ferrous sulfate การรายงานผลจากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณแสดงได้ 2 แบบ

1) การรายงานปริมาณความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีในตัวอย่าง ซึ่งค่าตัวเลขสูง แสดงว่ามีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระสูง

2) การรายงานปริมาณความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ทำให้สารอนุมูลอิสระลดลง 50 หรือ IC_{50} โดยค่าตัวเลขต่ำแสดงว่ามีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระสูง

7.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH

DPPH radical scavenging assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารยับยั้งออกซิเดชัน (antioxidation) ซึ่งใช้ reagent คือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl หรือ DPPH

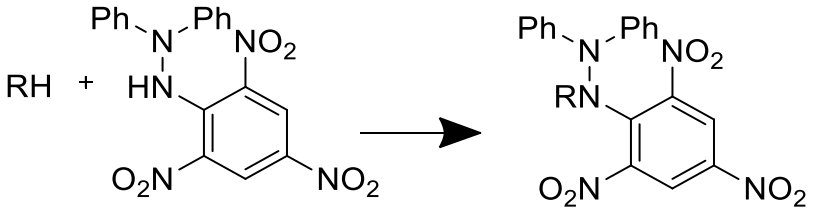
โดย DPPH เป็น stable radical ในตัวทำละลาย methanol ดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 515-517 nm สารละลายของ $DPPH^{\bullet}$ มีสีม่วง และเมื่อได้รับ H จะเปลี่ยนเป็นสารละลายสีเหลืองตามสมการดังนี้

โดย $DPPH^{\bullet}$ จะเกิดปฏิกิริยากับ antioxidant (AH) หรือกับ radical species ($R^{\bullet}$)

$DPPH^{\bullet} + AH$ ---------- $DPPH\text{-}H + A^{\bullet}$

$DPPH^{\bullet} + R^{\bullet}$ ---------- $DPPH\text{-}R$

เมื่อ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารยับยั้งอนุมูลอิสระที่ละลายด้วยตัวทำละลายจะทำให้สีม่วงจางลงๆ จนเป็นสีเหลือง ซึ่งก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงต้องตั้งทิ้งไว้ที่มืดเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา ทำให้สามารถหาการเป็นสารยับยั้งอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงจากการยับยั้งอนุมูลอิสระ สามารถคำนวณความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงจากสารตัวอย่างเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น (ก่อนใส่สารตัวอย่าง) ดังนี้



ภาพที่ 2-17 โครงสร้างของอนุมูล DPPH ก่อนและหลังทำปฏิกิริยากับสารยับยั้งอนุมูลอิสระ

ค่าที่วัดได้จะแสดงความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระออกมาในค่า % inhibition ตามสมการดังนี้

$$\% \text{ inhibition} = [(Abs_{control} - Abs_{test\ sample})/A_{control}] \times 100$$

ข้อดีของวิธีนี้คือ ทำได้ง่าย สะดวก ส่วนมากนิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ

ข้อเสียของวิธีนี้คือ อนุมูล DPPH มีความคงตัวไม่ไวต่อการทำปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลที่เกิดในเซลล์หรือร่างกาย ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่สามารถแยกแยะจัดอันดับอนุมูลที่มีความไวสูงได้ [42]

7.4 การวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธีนอกเหนือจากวิธีการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH [41]

7.4.1 วิธีการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS assay)

ABTS assay เป็นวิธีการทดสอบความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ โดยสารที่ใช้เป็นตัวกำเนิดอนุมูลอิสระจะใช้ reagent เป็นสารประกอบกลุ่มเอโซ เช่น 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ให้สารละลายสีน้ำเงินเขียว (bluish-green) ซึ่งดูดกลืนแสงได้ดีที่ UV 743 nm ในการวิเคราะห์จะวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงของ $ABTS^{\bullet+}$ เมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ จะกลับมาอยู่ในรูป ABTS ซึ่งไม่มีสี การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวมในสารตัวอย่าง ทำได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวตัวอย่าง โดยคำนวณหาค่า %ABTS radical cation scavenging activity และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวมเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox

7.4.2 วิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (FRAP assay)

FRAP assay เป็นวิธีการตรวจสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชัน โดยอาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์ และติดตามการเปลี่ยนแปลงสีของสารประกอบเชิงซ้อน ferric ion-TPTZ (2,4,6-Tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine) เมื่อสารประกอบเชิงซ้อน Ferric tripyridyltriazine(Fe^{3+}-TPTZ) ได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านอนุมูลอิสระ จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อน Ferrous tripyridyltriazine(Fe^{2+}- TPTZ) ที่มีสีน้ำเงินเข้ม (navy blue) โดยวิธี FARP สามารถติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยวัดค่า absorbance ของสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีน้ำเงินเข้ม ซึ่งดูดกลืนแสงได้ดีที่ UV 593 nm โดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ferrous sulfate แล้วรายงานเป็นค่า FRAP value จากกราฟมาตรฐานของ $FeSO_4$ ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ $FeSO_4$ กับค่า absorbance โดยต้องเจือจางสารสกัดตัวอย่างให้อยู่ในช่วงกราฟมาตรฐาน

7.5 กลไกการทำงานของสารยับยั้งอนุมูลอิสระ [40]

จากรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระพบว่ามีหลายกลไกดังนี้

7.5.1 กลไกดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging)

เป็นที่ทราบดีว่า สารต้านอนุมูลอิสระสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้โดยการทำให้โมเลกุลของอนุมูลอิสระนั้นมีความเสถียรขึ้น ซึ่งกลไกของปฏิกิริยานี้เกิดโดยการให้ไฮโดรเจนหรือให้อิเล็คตรอนแก่อนุมูลอิสระ ทำให้อนุมูลอิสระมีความเสถียรมากขึ้น

7.5.2 กลไกยับยั้งการทำงานซิงเกล็ทออกซิเจน (Singlet oxygen quenching)

สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoids) สามารถยับยั้งการทำงานของซิงเกล็ทออกซิเจน โดยการเปลี่ยน ($^1O_2$*) ให้อยู่ในรูปทริปเปร็ท (triplet oxygen ($^3O_2$)) และ ปล่อยพลังงานที่ได้รับออกไปในรูปความร้อน โดยที่แคโรทีนอยด์ (Car) จำนวน 1 โมเลกุล สามารถทำปฏิกิริยากับซิงเกล็ทออกซิเจน ได้ถึง 1,000 โมเลกุล

7.5.3 กลไกจับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (metal chelation)

โลหะที่มีผลต่อการเกิดอนุมูลอิสระ คือ Fe^{2+} และ Cu^{2+} ซึ่งสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ฟอสฟอริกแอซิด (phosphoric acid) และ ซิตริกแอซิด (citric acid) จะสามารถจับกับโลหะที่มีผลต่อการเกิดอนุมูลอิสระ เพื่อลดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้

7.5.4 กลไกหยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain-breaking)

วิตามินอี (***α***-tocopherol; Toc-OH) สามารถป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์ไม่ให้ถูกทำลายจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไขมัน (lipid autoxidation) โดยทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็คตรอน (electron-acceptor antioxidants) จากอนุมูล peroxyl ($ROO^{\bullet}$)

7.5.5 กลไกยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (enzyme inhibition)

สารประกอบฟีนอลิก บางชนิด เช่น ฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิก (phenolic acid) และแกลเลต (gallates) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ลิโพออกซีจีเนส (lipoxygenase) โดยสามารถเข้าจับกับไอออนของเหล็กซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ (cofactor) ส่งผลให้เอ็นไซม์ดังกล่าวไม่สามารถทำงานได้

7.5.6 กลไกการเสริมฤทธิ์ (synergism)

สารชนิดนี้จะช่วยสนับสนุนให้สารต้านอุนมูลอิสระท างานได้ดีขึ้น เช่น การทำงานร่วมกันระหว่าง วิตามินอี (***α***-tocopherol) กับวิตามินซี (ascorbic acid) โดยที่วิตามินซีไม่สามารถทำงานในในสภาวะไม่มีขั้ว (hydrophobic condition) ได้เหมือนกับวิตามินอี แต่จะให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่ อนุมูลแอลฟ่า-โทโคฟีรอลเปอร์ออกซิล (***α***-tocopherol peroxyl) ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง แอลฟ่า-โทโคฟีรอล กับอนุมูลเปอร์ออกซิล ($ROO^{\bullet}$) เพื่อเปลี่ยนรูปกลับไปเป็นแอลฟ่า -โทโคฟีรอล ที่สามารถทำงานได้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 พืชที่ทำการวิจัย

- ใบถั่วทะเล (*Canavalia rosea* (Sw.) DC.)
- ใบผักบุ้งทะเล (*Ipomoea pes-caprae* (L.) R.Br.)

1.2 วัสดุ

- กระดาษกรอง (filter paper)
- กรวยกรอง (funnel)
- ช้อนตักสาร (spatula)
- แท่งแก้วคนสาร (stirring rod)
- ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask)
- หลอดหยด (dropper)
- บีกเกอร์ (beaker)
- กระบอกตวง (cylinder)
- กระจกนาฬิกา (watch glass)
- ไมโครปิเปต (micropipette)
- หลอดเซนติฟิวก์ (eppendorf)
- หลอดแคปิลลารี (capillary tube)
- ไมโครเวลเพลท (96-well microplate)
- โถวางแผ่น TLC (TLC tank)
- แผ่นเพลต TLC SiO_2GF_{254}
- กรวยแยก (separatory funnel)

1.3 อุปกรณ์

- เครื่องชั่งสาร (balance)
- เครื่องโซนิเคเตอร์ (sonicator)
- อุปกรณ์สกัดแบบไหลย้อนกลับ (reflux extractor)
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
- ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
- เครื่องบดแบบค้อนเหวี่ยง (hammer mill)
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-Vis spectrophotometer)
- เครื่องระเหยแบบหมุน (rotary evaporator)
- เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dryer)
- เครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟี่-แมสสเปกโตรเมทรี (GC-MS)

1.4 สารเคมี

- Distilled water
- 95% Ethanol
- Methanol (AR grade)
- Ethyl acetate (AR grade)
- Dichloromethane (AR grade)
- Hexane (AR grade)
- Ascorbic acid
- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
- Anisaldehyde reagent
- Iodine

2. วิธีการเก็บ การเตรียมตัวอย่างพืช และการเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพระหว่างส่วนเหนือดินของถั่วทะเลและผักบุ้งทะเล

2.1 ใบผักบุ้งทะเล

2.1.1 สำรวจหาพื้นที่ที่พบผักบุ้งทะเลในบริเวณชายหาดบางแสน จ.ชลบุรี

2.1.2 เก็บตัวอย่างบริเวณสะพานปลา หาดวอนนภา บางแสน จ.ชลบุรี

2.1.3 จดบันทึกลักษณะทางกายภาพส่วนเหนือดินของผักบุ้งทะเล

2.1.4 คัดแยกส่วน โดยเลือกเฉพาะใบที่สมบูรณ์

2.1.5 ล้างทำความสะอาด และทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

2.1.6 หั่นใบให้มีขนาดเล็กลง แล้วชั่งน้ำหนักใบผักบุ้งทะเลสดที่ได้

2.1.7 อบที่อุณหภูมิไม่เกิน 50°C ใน hot air oven จนแห้งสนิท

2.1.8 ชั่งน้ำหนักใบผักบุ้งทะเลแห้งที่ได้

2.1.9 นำใบผักบุ้งทะเลแห้งที่ได้มาปั่นให้ละเอียดโดยใช้เครื่อง hammer mill และแร่งขนาด 1.0

2.1.10 ชั่งน้ำหนักใบผักบุ้งทะเลแห้งที่ปั่นละเอียดแล้ว

2.1.11 เก็บใส่ถุงและปิดถุงให้สนิท

2.2 ใบถั่วทะเล

2.2.1 สำรวจหาพื้นที่ที่พบถั่วทะเลในบริเวณชายหาดเกาะล้าน จ.ชลบุรี

2.2.2 เก็บตัวอย่างถั่วทะเลบริเวณหาดนวล เกาะล้าน จ.ชลบุรี

2.2.3 จดบันทึกลักษณะทางกายภาพส่วนเหนือดินของถั่วทะเล

2.2.4 คัดแยกส่วน โดยเลือกเฉพาะใบที่สมบูรณ์

2.2.5 ล้างทำความสะอาดและทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

2.2.6 หั่นใบให้มีขนาดเล็กลง แล้วชั่งน้ำหนักใบถั่วทะเลสดที่ได้

2.2.7 อบที่อุณหภูมิไม่เกิน 50°C ใน hot air oven จนแห้งสนิท

2.2.8 ชั่งน้ำหนักใบถั่วทะเลแห้งที่ได้

2.2.9 นำใบถั่วทะเลแห้งที่ได้มาปั่นให้ละเอียดโดยใช้เครื่อง hammer mill และแร่งขนาด 1.0

2.2.10 ชั่งน้ำหนักใบถั่วทะเลแห้งที่ปั่นละเอียดแล้ว

2.2.11 เก็บใส่ถุงและปิดถุงให้สนิท

3. วิธีดำเนินการทดลองการเปรียบเทียบวิธีสกัดสารเบื้องต้นจากใบผักบุ้งทะเล (preliminary study of extraction)

3.1 การเปรียบเทียบน้ำหนักสารสกัดหยาบจากการเตรียมสารสกัดใบผักบุ้งทะเลด้วยวิธี maceration, sonication และ reflux extraction

3.1.1 Maceration

1) ใส่ใบผักบุ้งทะเลแห้งที่ปั่นละเอียดแล้ว 20 g และ methanol 200 mL ลงใน erlenmeyer flask ขนาด 500 mL แล้วปิดปากขวดด้วย aluminum foil

2) ตั้งทิ้งไว้ 9 วัน โดยเขย่าบ่อยๆ

3) เมื่อครบกำหนดแล้วกรองเก็บสารสกัด

4) ระเหยตัวทำละลายจากสารสกัดให้แห้ง โดยการลดความดันด้วยเครื่อง rotary evaporator

3.1.2 Sonication

1) ใส่ใบผักบุ้งทะเลแห้งที่ปั่นละเอียดแล้ว 20 g และ methanol 200 mL ลงใน erlenmeyer flask ขนาด 500 mL

2) sonicate 30 นาที โดยควบคุมอุณหภูมิไม่ให้เกิน 40 °C ความแรงของการ sonicate = 15%

3) เมื่อครบกำหนดแล้วกรองเก็บสารสกัด

4) ระเหยตัวทำละลายจากสารสกัดให้แห้ง โดยการลดความดันด้วยเครื่อง rotary evaporator

3.1.3 Reflux extraction

1) ใส่ใบผักบุ้งทะเลแห้งที่ปั่นละเอียดแล้ว 20 g และ methanol 200 mL ลงใน round bottom flask ขนาด 250 mL

2) ต่ออุปกรณ์ reflux

3) reflux นาน 30 นาที บน water bath โดยจับเวลาเมื่อตัวทำละลายเริ่มควบแน่นตกกลับลงมาใน round bottom flask

4) รอให้เย็นแล้วกรองเก็บสารสกัด

5) ระเหยตัวทำละลายจากสารสกัดให้แห้ง โดยการลดความดันด้วยเครื่อง rotary evaporator

3.1.4 ชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้ และนำมาคำนวน %yield เปรียบเทียบทั้งสามวิธีการ ดังสมการ

%yield = [(น้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้ (g))/(น้ำหนักพืชที่ใช้ในการสกัด (g))]x100

3.2 การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบใบผักบุ้งทะเล ด้วยวิธีธินแลเยอร์โครมาโทกราฟี (thin layer chromatography; TLC)

3.2.1 เตรียมตัวอย่างที่ใช้ในการทำ TLC โดยชั่งสารสกัดหยาบจากใบผักบุ้งทะเลแต่ละวิธีการสกัด ได้แก่ maceration, sonication และ reflux extraction มาชั่งให้ได้ปริมาณ 1 mg ละลายใน methanol 1 mL

3.2.2 เตรียมระบบตัวทำละลายใน TLC tank ดังนี้

Mobile phase : dichloromethane : methanol อัตราส่วน 9:1

Stationary phase : SiO_2GF_{254} on aluminum sheet ขนาด 3x7 cm

3.2.3 นำสารสกัดหยาบจากใบผักบุ้งทะเล (crude extract) ที่ได้จากวิธีการ maceration, sonication และ reflux extraction มา spot บนแผ่น TLC (ภาพที่ 3-1) โดยใช้หลอดแคปิลลารีขนาดเล็กมาดูดสารละลายตัวอย่างแล้ว spot ลงบนแผ่น TLC ขนาด 3x7 cm โดยควรจุดให้ห่างจากขอบด้านข้างประมาณ 0.5 cm เส้นผ่านศูนย์กลางไม่ควรเกินกว่า 2 mL

3.2.4 นำแผ่น TLC ที่ spot สารเสร็จแล้ว และตัวทำละลายระเหยจนแห้งแล้ว ไปวางใน TLC tank ที่บรรจุระบบตัวทำละลาย และมีกระดาษกรองวางไว้ที่ด้านใน เพื่อให้ tank อิ่มตัวด้วยไอของ mobile phase

3.2.5 รอจนกว่าสารละลายจะเคลื่อนที่ขึ้นมาถึง solvent front ที่กำหนดไว้ หลังจากนั้นนำแผ่น TLC ออกจาก tank และทำการสังเกต TLC chromatogram ด้วยวิธีต่อไปนี้

1) สังเกตด้วยตาเปล่า ทำการวงตำแหน่งของ spot ที่สังเกตได้

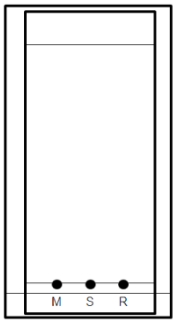
2) สังเกตภายใต้แสง UV chamber ที่มีความยาวคลื่น 254 และ 366 nm ทำการวงตำแหน่งของ spot ที่สังเกตได้

3) แช่ใน Iodine tank เป็นเวลา 3 นาที ทำการวง spot ที่มีสีเหลืองจากการเกิด interaction ระหว่าง iodine กับสารตัวอย่างบน TLC

4) นำแผ่น TLC มา spray anisaldehyde reagent แล้วให้ความร้อนที่ 120°C สังเกตสีและวง spot ที่พบ

3.2.6 คำนวณหาค่า R_f ของแต่ละ spot โดยค่า R_f สามารถคำนวณได้จาก

R_f = ระยะทางที่สารเคลื่อนที่/ระยะทางที่ mobile phase เคลื่อนที่



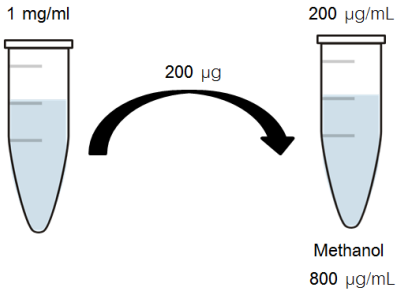
TLC 1 แผ่น ประกอบด้วย 3 จุด
- จุด M เป็นสารสกัดหยาบจากวิธี Maceration
- จุด S เป็นสารสกัดหยาบจากวิธี Sonication
- จุด R เป็นสารสกัดหยาบจากวิธี Reflux extraction

ภาพที่ 3-1 การเตรียมแผ่น TLC ของใบผักบุ้งทะเล

3.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ (antioxidant) ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay ของสารสกัดหยาบใบผักบุ้งทะเล

3.3.1 การเตรียมสารสกัดและ blank

1) ชั่งสารสกัดหยาบของใบผักบุ้งทะเลทั้งสามวิธี ได้แก่ maceration, sonication, reflux extraction ตัวอย่างละ 1 mg ละลายสารสกัดด้วย methanol 1 mL จะมีความเข้มข้นเป็น 1 mg/mL และทำการเจือจางต่อด้วย methanol ให้มีความเข้มข้นเป็น 200 µg/mL (ภาพที่ 3-2)



ภาพที่ 3-2 การเจือจางความเข้มข้นสารสกัดหยาบใบผักบุ้งทะเลจาก 1 mg/mL เป็น 200 µg/mL

2) เตรียมสารสกัดหยาบของใบผักบุ้งทะเลทั้งสามวิธี ที่นำมาตรวจสอบจะใช้ความเข้มข้น 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78 และ 0.39 µg/mL เตรียมโดยนำสารที่มีความเข้มข้น 200 µg/mL มาเจือจางด้วย methanol ให้มีความเข้มข้นเป็น 100 µg/mL และทำการเจือจางความเข้มข้น (serial dilution) 8 ระดับความเข้มข้น ด้วย methanol จาก 50 µg/mL ถึง 0.39 µg/mL

3) ชั่งสารมาตรฐาน ascorbic acid 1 mg ละลายด้วย methanol 1 mL จะมีความเข้มข้นเป็น 1 mg/mL และทำการเจือจางต่อด้วย methanol ให้มีความเข้มข้นเป็น 50 µg/mL

4) เตรียมสารมาตรฐาน ascorbic acid ที่นำมาตรวจสอบจะใช้ความเข้มข้น 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39 และ 0.20 µg/mL เตรียมโดยนำสารที่มีความเข้มข้น 50 µg/mL มาเจือจางด้วย methanol ให้มีความเข้มข้นเป็น 25 µg/mL และทำการเจือจางความเข้มข้น (serial dilution) 8 ระดับความเข้มข้น ด้วย methanol จาก 25 µg/mL ถึง 0.20 µg/mL

3.3.2 การตรวจสอบหาฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ

1) เตรียมสารละลาย DPPH ใน methanol ให้มีความเข้มข้น 60 µg/mL (กำหนดให้ ผลการทดสอบค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH อยู่ในช่วง 0.2-0.8) ปริมาตร 50 ml

2) เตรียมสารสกัดพืชที่ความเข้มข้นต่างๆ นำไมโครปิเปต ปิเปตสารสกัด ปริมาตร 100 µL และสารละลาย DPPH ปริมาตร 100 µL

3) เตรียม blank โดยนำไมโครปิเปต ปิเปตสารสกัดจากพืชที่มีความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 100 µL และ methanol 100 µL แทนการเติมสารละลาย DPPH ปริมาตร 100 µL

4) เตรียม positive control ของ ascorbic acid โดยนำไมโครปิเปต ปิเปต ascorbic acid 100 µL และสารละลาย DPPH ปริมาตร 100 µL

5) ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำสารไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง เปรียบเทียบกับการทดลองชุด positive control นำค่าที่ได้มาคำนวนหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ (% inhibition) จากสมการ

$$\% \text{ inhibition} = [((Abs_{blank} - Abs_{sample})/ Abs_{blank})] \times 100$$

เมื่อ Abs_{blank} = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น

Abs_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงหลังเติมสารตัวอย่าง

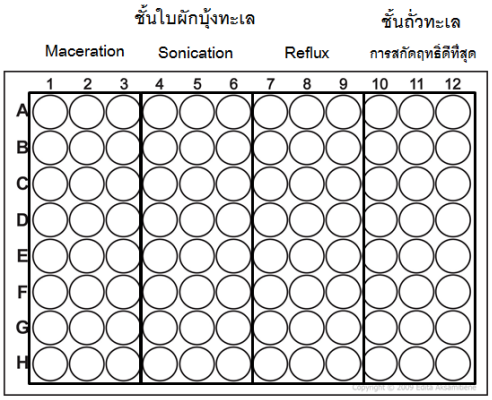
6) คำนวณ IC_{50}±SD (ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ที่ 50% เปอร์เซ็นต์) จากกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่าง ความเข้มข้นของสารกับค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ (% inhibition)

หมายเหตุ เนื่องจากสารสกัดพืชมีสีเหลืองหรือสีน้ำตาลเข้ม ทำให้รบกวนการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ดังนั้นในการทดลอง จึงต้องทำการลบค่าการดูดกลืนแสงของ blank เพื่อกำจัดค่าการดูดกลืนแสงที่เกิดจากสีของสารสกัดพืชตัวอย่าง ดังสมการ

$$A_{sample} = A_{blank} - A_{sample}$$

เมื่อ A_{blank} = ค่าการดูดกลืนแสงทั้งหมดของชุด blank

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงทั้งหมดของสารตัวอย่าง



ภาพที่ 3-3 การเตรียมแผ่น 96-well microplate ของการเปรียบเทียบการสารสกัดหยาบใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล

4. วิธีดำเนินการทดลองการเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ระหว่างสารสกัดจากใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล

4.1 การเปรียบเทียบน้ำหนักของสารสกัดหยาบของใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล

4.1.1 จากผลการทดลองในข้อ 3. คัดเลือกวิธีการสกัดโดยเปรียบเทียบน้ำหนักสารสกัดหยาบ จำนวน spot จาก TLC และฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ จากวิธีการ DPPH radical scavenging assay โดยเลือกวิธีสกัดจากฤทธิ์ ยับยั้งอนุมูลอิสระที่ดีสุดมาทำการสกัดใบผักบุ้งทะเล

4.1.2 สกัดตัวอย่างใบถั่วทะเลแห้งด้วยวิธีการเดียวกับใบผักบุ้งทะเล และชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้ และนำมาคำนวน %yield ดังสมการ

%yield = [(น้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้ (g))/(น้ำหนักพืชที่ใช้ในการสกัด (g))]x100

4.2 การสกัดสารสกัดหยาบถั่วทะเลและผักบุ้งทะเลโดยวิธีแยกชั้น (partition extraction)

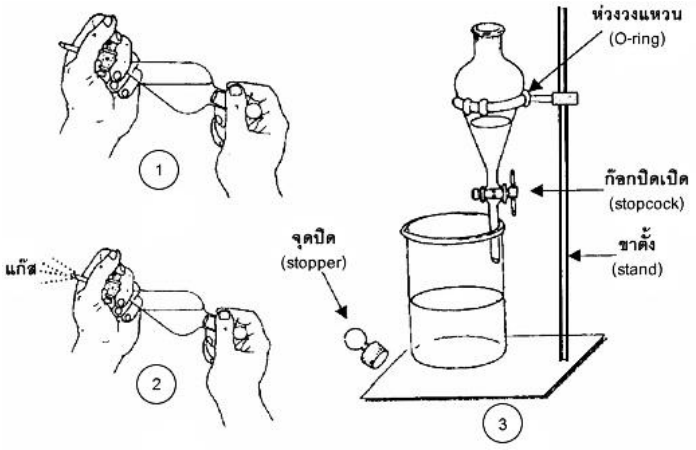
4.2.1 ตรวจสอบกรวยแยกก่อนใส่สารละลาย เพื่อให้แน่ใจว่าจุกด้านบน (stopper) ปิดได้สนิท และก๊อกปิดเปิดด้านล่าง (stopcock) หมุนได้ง่าย อาจทากรีซ (grease) บางๆ ที่ stopper และ stopcock เพื่อให้หมุนง่ายและไม่รั่ว

4.2.2 ปิดก๊อกและวางกรวยแยกบนห่วงวงแหวน (o-ring) ที่ยึดติดกับขาตั้ง (ring stand) ในระดับที่มีขวดรูปชมพู่รองรับอยู่อย่างเหมาะสม (ภาพที่ 3-4)

4.2.3 เปิดจุกด้านบน ละลายสารสกัดหยาบถั่วทะเลและผักบุ้งทะเลด้วย methanol และใส่สารสกัดที่ละลายแล้วลงในกรวยแยก จากนั้นให้ใส่ตัวทำละลาย hexane ลงไป โดยปริมาณของเหลวไม่ควรเกิน 3 ใน 4 ส่วนของปริมาตรของกรวยแยก

4.2.4 ปิด stopper จับกรวยแยกให้แน่นด้วยมือทั้งสอง มือหนึ่งจับกดที่ stopper อีกมือหนึ่งจับที่ stopcock ในลักษณะที่สามารถปิดเปิดก๊อกได้สะดวก (ภาพที่ 3-4) โดยต้องแน่ใจว่าสามารถจับกรวยแยกให้อยู่ในแนวต่างๆ ได้โดยของเหลวไม่รั่ว

4.2.5 เขย่ากรวยแยกให้ของเหลวทั้งสองชั้นผสมกันมากที่สุด ในการเขย่าจะมีแรงดันจากไอระเหยของตัวทำละลายซึ่งต้องปล่อยออกโดยการเอียงกรวยแยกให้ปลายเอียงขึ้นประมาณ 45° แล้วเปิดก๊อก เพื่อลดความดัน ทำเช่นนี้บ่อยๆ ระหว่างการเขย่า ซึ่งในการสกัดแต่ละครั้งควรเขย่าประมาณ 15-20 ครั้ง



ภาพที่ 3-4 วิธีการสกัดสารสกัดหยาบจากการ partition แยกชั้น [32]

(1) การจับกรวยแยกเพื่อสกัด

(2) การปล่อยแก๊สออก

(3) การปล่อยแยกส่วนสกัดออกจากกัน

4.2.6 วางกรวยแยกบนห่วงวงแหวน เปิดจุกออกปล่อยให้ของเหลวแยกชั้น บางครั้งอาจมีอิมัลชั่นเกิดขึ้นระหว่างชั้นของของเหลวทั้งสอง ซึ่งมีวิธีแก้ไขหลายวิธีดังนี้

1) ตั้งกรวยแยกในแนวดิ่ง เขย่าแกว่งเป็นวง

2) กวนอิมัลชันด้วยแท่งแก้วคน

3) ใส่สารละลายอิ่มตัวของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ลงไป เพื่อไปแย่งที่การละลายในน้ำ ทำให้สารอินทรีย์ละลายน้ำได้น้อยลงและแยกตัวไปอยู่ในชั้นสารอินทรีย์ วิธีนี้เรียกว่า salting out ถ้าลองทำหลายวิธีแล้วไม่ได้ผลควรเปลี่ยนตัวทำละลายในการสกัดใหม่

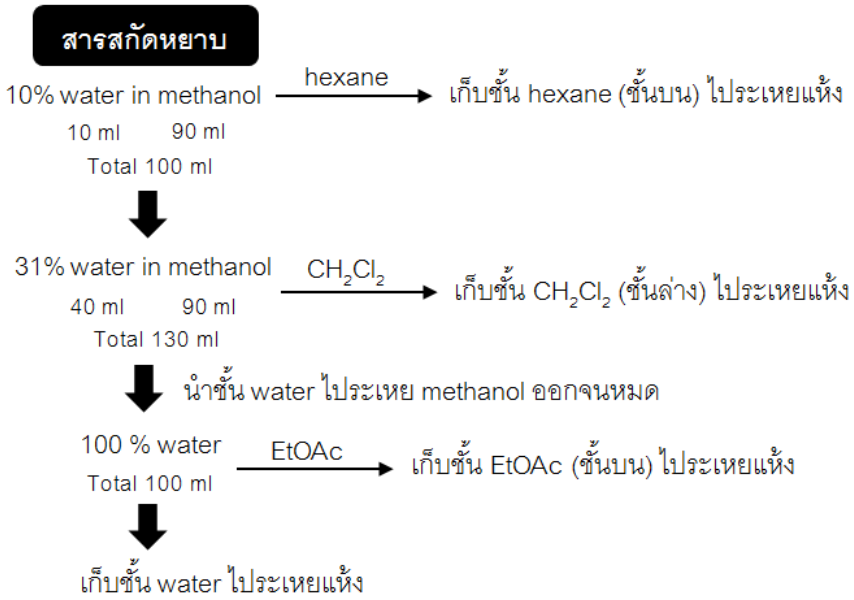
4.2.7 เปิดก๊อกปล่อยให้ของเหลวชั้นล่างไหลออก รองรับด้วยขวดรูปชมพู่ ระมัดระวังช่วงรอยต่อระหว่างชั้นทั้งสอง ส่วนของเหลวชั้นบนให้เทออกทางปากกรวยด้านบน ต้องแน่ใจว่าจะใช้ชั้นใดทำการทดลองต่อ เพื่อป้องกันความผิดพลาด จึงควรเก็บสารละลายทั้งสองชั้นไว้จนกว่าทำการทดลองเสร็จสิ้น

4.2.8 แยกสารสกัดชั้น hexane ซ้ำหลายครั้ง เพื่อให้ได้สารสกัดชั้น hexane ออกมามากที่สุด โดยให้ทำการแยกสารสกัดจนกว่าสีของชั้นที่แยกจะคงที่ จากนั้นเก็บสารละลายชั้น hexane ที่ได้ไประเหยแห้ง

4.2.9 ใส่ตัวทำละลาย dichloromethane ลงไป จากนั้นให้ทำการ partition ซ้ำๆ หลายครั้ง เช่นเดียวกับชั้น hexane เก็บสารละลายชั้น dichloromethane ที่ได้ไประเหยแห้ง

4.2.11 ใส่ตัวทำละลาย ethyl acetate ลงไป จากนั้นให้ทำการ partition ซ้ำๆ หลายครั้ง เช่นเดียวกับชั้น hexane เก็บสารละลายชั้น ethyl acetate ที่ได้ไประเหยแห้ง

4.2.12 นำสารละลายชั้นน้ำที่ได้ไประเหยแห้งเพื่อเก็บชั้นน้ำ (ภาพที่ 3-5)



ภาพที่ 3-5 แผนผังการสกัดแยกสารสกัดหยาบของใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล

4.2.13 สกัดตัวอย่างสารสกัดหยาบของใบถั่วทะเลด้วยวิธีการเดียวกับใบผักบุ้งทะเล และชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้ และนำมาคำนวน %yield ดังสมการ

%yield = [(น้ำหนักสารสกัดชั้นที่สกัดที่ได้ (g))/(น้ำหนักสารสกัดหยาบที่ใช้สกัดเริ่มต้น (g))]x100

4.3 การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นระหว่างสารสกัดด้วยตัวทำละลาย hexane, dichloromethane และ ethyl acetate เปรียบเทียบระหว่างสารสกัดใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเลด้วยวิธีธินแลเยอร์โครมาโทกราฟฟี (thin layer chromatography; TLC)

4.3.1 เตรียมตัวอย่างที่ใช้ในการทำ TLC โดยชั่งสารสกัดจากใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเลแต่ละชั้นของวิธีการ partition ได้แก่

- ชั้น hexane ที่ได้จากการ partition ของใบผักบุ้งทะเล
- ชั้น dichloromethane ที่ได้จากการ partition ของใบผักบุ้งทะเล
- ชั้น ethyl acetate ที่ได้จากการ partition ของใบผักบุ้งทะเล
- ชั้นสารสกัดหยาบ ของใบผักบุ้งทะเล
- ชั้น hexane ที่ได้จากการ partition ของใบถั่วทะเล
- ชั้น dichloromethane ที่ได้จากการ partition ของใบถั่วทะเล
- ชั้น ethyl acetate ที่ได้จากการ partition ของใบถั่วทะเล
- ชั้นสารสกัดหยาบ ของใบถั่วทะเล

นำแต่ละชั้นมาชั่งให้ได้ปริมาณ 1 mg ละลายใน methanol 1 mL

4.3.2 เตรียมระบบตัวทำละลายใน TLC tank ดังนี้

Mobile phase : ethyl acetate : methanol อัตราส่วน 9:1

Stationary phase : SiO_2GF_{254} on aluminum sheet

4.3.3 นำตัวอย่างที่ใช้ในการทำ TLC จากใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล แต่ละชั้นของวิธีการ partition มา spot บนแผ่น TLC (ภาพที่ 3-6) โดยใช้หลอดแคปิลลารีขนาดเล็กมาดูดสารละลายตัวอย่างแล้ว spot ลงบนแผ่น TLC ขนาด 10x10 cm โดยควรจุดให้ห่างจากขอบด้านข้างประมาณ 0.5 cm เส้นผ่านศูนย์กลางไม่ควรเกินกว่า 2 mm

4.3.4 รอจนกว่าสารละลายจะเคลื่อนที่ขึ้นมาถึง solvent front ที่กำหนดไว้ หลังจากนั้นนำแผ่น TLC ออกจาก tank และทำการสังเกต TLC chromatogram ด้วยวิธีต่อไปนี้

1) สังเกตด้วยตาเปล่า ทำการวงตำแหน่งของ spot ที่สังเกตได้

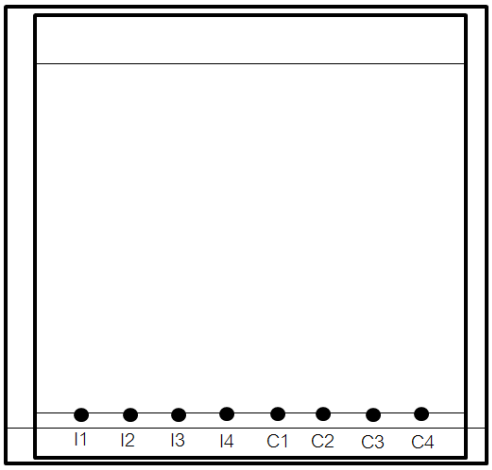
2) สังเกตภายใต้แสง UV chamber ที่มีความยาวคลื่น 254 และ 366 nm ทำการวงตำแหน่งของ spot ที่สังเกตได้

3) แช่ใน Iodine tank เป็นเวลา 3 นาที ทำการวง spot ที่มีสีเหลืองจากการเกิด interaction ระหว่าง iodine กับสารตัวอย่างบน TLC

4) นำแผ่น TLC มา spray anisaldehyde reagent แล้วให้ความร้อนที่ 120°C สังเกตสีและวง spot ที่พบ

4.3.5 คำนวณหาค่า R_f ของแต่ละ spot โดยค่า R_f สามารถคำนวณได้จาก

R_f = ระยะทางที่สารเคลื่อนที่/ระยะทางที่ mobile phase เคลื่อนที่



TLC 1 แผ่น ประกอบด้วย 8 จุด
- จุด I1 สารสกัดหยาบใบผักบุ้งทะเล
- จุด I2 สารสกัดชั้น hexane ใบผักบุ้งทะเล
- จุด I3 สารสกัดชั้น dichloromethane ใบผักบุ้งทะเล
- จุด I4 สารสกัดชั้น ethyl acetate ใบผักบุ้งทะเล
- จุด C1 สารสกัดหยาบใบถั่วทะเล
- จุด C2 สารสกัดชั้น hexane ใบถั่วทะเล
- จุด C3 สารสกัดชั้น dichloromethane ใบถั่วทะเล
- จุด C4 สารสกัดชั้น ethyl acetate ใบถั่วทะเล

ภาพที่ 3-6 การเตรียมแผ่น TLC ของใบผักบุ้งทะเลและถั่วทะเล

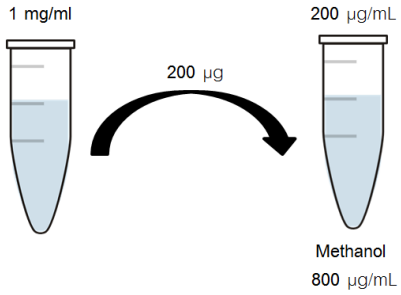
4.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ (antioxidant) ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay เปรียบเทียบระหว่างชั้นสารสกัดที่ผ่านการ partition ของใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล

4.4.1 การเตรียมสารสกัดและ blank

1) ชั่งสารสกัดหยาบ (crude extract) ของใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล แต่ละชั้นของวิธีการ partition ได้แก่

- ชั้น hexane ที่ได้จากการ partition ของใบผักบุ้งทะเล
- ชั้น dichloromethane ที่ได้จากการ partition ของใบผักบุ้งทะเล
- ชั้น ethyl acetate ที่ได้จากการ partition ของใบผักบุ้งทะเล
- ชั้นน้ำ ที่ได้จากการ partition ของใบผักบุ้งทะเล
- ชั้น hexane ที่ได้จากการ partition ของใบถั่วทะเล
- ชั้น dichloromethane ที่ได้จากการ partition ของใบถั่วทะเล
- ชั้น ethyl acetate ที่ได้จากการ partition ของใบถั่วทะเล
- ชั้นน้ำ ที่ได้จากการ partition ของใบถั่วทะเล

นำแต่ละชั้นมาชั่งให้ได้ปริมาณ 1 mg ละลายสารสกัดด้วย methanol 1 mL จะมีความเข้มข้นเป็น 1 mg/mL และทำการเจือจางต่อด้วย methanol ให้มีความเข้มข้นเป็น 200 µg/mL (ภาพที่ 3-7)



ภาพที่ 3-7 การเจือจางความเข้มข้นของสารสกัดที่ผ่านการ partition ของใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล แต่ละชั้นของวิธีการ partition จาก 1 mg/mL เป็น 200 µg/mL

2) เตรียมสารสกัดที่ผ่านการ partition ของใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเลทั้งสี่ชั้น ที่นำมาตรวจสอบ จะใช้ความเข้มข้น 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78 และ 0.39 µg/mL เตรียมโดยนำสารที่มีความเข้มข้น 200 µg/mL มาเจือจางด้วย methanol ให้มีความเข้มข้นเป็น 100 µg/mL และทำการเจือจางความเข้มข้น (serial dilution) 8 ระดับความเข้มข้นด้วย methanol จาก 50 µg/mL ถึง 0.39 µg/mL

3) ชั่งสารมาตรฐาน ascorbic acid 1 mg ละลายด้วย methanol 1 mL จะมีความเข้มข้นเป็น 1 mg/mL และทำการเจือจางต่อด้วย methanol ให้มีความเข้มข้น 50 µg/mL

4) เตรียมสารมาตรฐาน ascorbic acid ที่นำมาตรวจสอบจะใช้ความเข้มข้น 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39 และ 0.20 µg/mL เตรียมโดยนำสารที่มีความเข้มข้น 50 µg/mL มาเจือจางด้วย methanol ให้มีความเข้มข้นเป็น 25 µg/mL และทำการเจือจางความเข้มข้น (serial dilution) 8 ระดับความเข้มข้น ด้วย methanol จาก 25 µg/mL ถึง 0.20 µg/mL

4.4.2 การตรวจสอบหาฤทธ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ

1) เตรียมสารละลาย DPPH ใน methanol ให้มีความเข้มข้น 60 µg/mL (กำหนดให้ การทดสอบค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH อยู่ในช่วงระหว่าง 0.2-0.8) ปริมาตร 50 mL

2) เตรียมสารสกัดพืชที่ความเข้มข้นต่างๆ นำไมโครปิเปต ปิเปตสารสกัดปริมาตร 100 µL และสารละลาย DPPH ปริมาตร 100 µL

3) เตรียม blank โดยนำไมโครปิเปต ปิเปตสารสกัดจากพืชที่มีความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 100 µL และ methanol 100 µL แทนการเติมสารละลาย DPPH ปริมาตร 100 µL

4) เตรียม positive control ของ ascorbic acid โดยนำไมโครปิเปต ปิเปต ascorbic acid 100 µL และสารละลาย DPPH ปริมาตร 100 µL

5) ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง เปรียบเทียบกับการทดลองชุด positive control ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำสารไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer นำค่าที่วัดมาคำนวนหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ (% inhibition) จากสมการ

$$\% \text{ inhibition} = [((Abs_{blank} - Abs_{sample})/ Abs_{blank})] \times 100$$

เมื่อ Abs_{blank} = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น

Abs_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงหลังการเติมสารตัวอย่าง

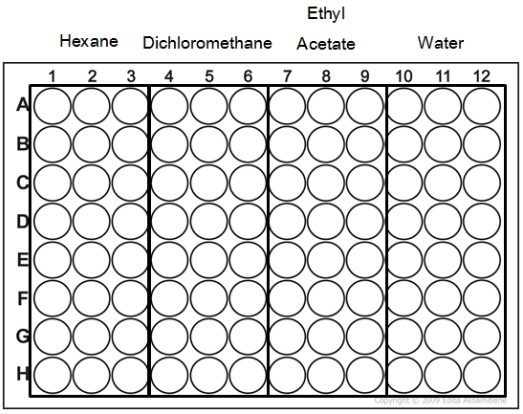
6) คำนวณ IC_{50}±SD (ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ที่ 50% เปอร์เซ็นต์) จากกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่าง ความเข้มข้นของสารกับค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ (% inhibition)

หมายเหตุ เนื่องจากสารสกัดพืชมีสีเหลืองหรือสีน้ำตาลเข้ม ทำให้รบกวนการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ดังนั้นในการทดลอง จึงต้องทำการลบค่าการดูดกลืนแสงของ blank เพื่อกำจัดค่าการดูดกลืนแสงที่เกิดจากสีของสารสกัดพืชตัวอย่าง ดังสมการ

$$A_{sample} = A_{blank} - A_{sample}$$

เมื่อ A_{blank} = ค่าการดูดกลืนแสงทั้งหมดของชุด blank

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงทั้งหมดของสารตัวอย่าง



ภาพที่ 3-8 การเตรียมแผ่น 96-well microplate ของการเปรียบเทียบการสกัดสารที่ผ่านการ partition ของใบผักบุ้งทะเลและใบผักบุ้งทะเล

4.5 การเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีระหว่างชั้นสารสกัดที่ผ่านการ partition ของใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (GC-MS)

4.5.1 กำหนด สภาวะ column ของเครื่อง GC-MS ดังต่อไปนี้

วัฏภาคนิ่ง	5%phenyl&95%dimethylpolysiloxane (BP5)
ความยาว	30 เมตร
ความหนาของวัฏภาคนิ่ง	0.25 ไมโครเมตร
เส้นผ่าศูนย์กลาง	0.25 มิลลิเมตร
วัฏภาคเคลื่อนที่	ก๊าซฮีเลี่ยม
อัตราการไหลของวัฏภาคนิ่ง	1.0 มิลลิลิตร/นาที
อุณหภูมิเริ่มต้น	40.0 °C โดยคงอุณหภูมิไว้ 1 นาที
อัตราการเพิ่มของอุณหภูมิช่วงที่ 1	5.0 °C/นาที จนอุณหภูมิ 120 °C
อัตราการเพิ่มของอุณหภูมิช่วงที่ 2	10.0 °C/นาที จนอุณหภูมิ 250 °C
อัตราการเพิ่มของอุณหภูมิช่วงที่ 3	15.0 °C/นาที จนอุณหภูมิ 310 °C

4.5.2 สภาวะ Injection

อุณหภูมิที่เข็มฉีดตัวอย่าง	220.0 °C
การฉีดตัวอย่าง	Splitless
ปริมาณตัวอย่างที่ฉีดต่อครั้ง	1 ไมโครลิตร
เวลาในการวิเคราะห์	44 นาที

4.5.3 การเตรียมตัวอย่างและการแปลผล

1) ชั่งตัวอย่างสารสกัด 1 mg ละลายด้วย methanol 1 mL ใส่ใน vial for GC สีชาขนาด 1 mL แล้วปิดฝาให้แน่นสนิท

2) นำตัวอย่างไปวิเคราะห์เชิงเปรียบเทียบเพื่อหาสารออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ด้วยเครื่อง GC-MS โดยส่งวิเคราะห์ที่คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์

3) เปรียบเทียบแฟรกชัน (fractions) ที่เวลาต่างๆ (retention time) ซึ่งแยกได้จากเครื่อง GC-MS เพื่อหา mass ratio (m/z) เทียบกับสารอ้างอิงที่มีอยู่ใน library เครื่อง จากนั้นนำพื้นที่ใต้พีค (% peak area) ของสารออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระที่พบในตัวอย่างมาคำนวณ โดยเลือกวิเคราะห์ที่ค่า peak area มากกว่า 1%

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลในหัวข้อการตรวจสอบหาฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 21.0 for Windows โดยการศึกษาจะทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย บวกลบค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน สถิติที่ใช้สำหรับการทดสอบ คือ One way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$ โดยเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน

บทที่ 4
ผลการวิจัย

1. ผลการเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพระหว่างส่วนเหนือดินของถั่วทะเลและผักบุ้งทะเล

ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ (identification) และการเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพระหว่างส่วนเหนือดินของถั่วทะเลและผักบุ้งทะเล สามารถทำได้โดยลงสำรวจหาพื้นที่ที่พบถั่วทะเลและผักบุ้งทะเล สังเกตบันทึกลักษณะทางกายภาพส่วนเหนือดิน ได้แก่ ส่วน ลำต้น ใบ ดอก ผล และเมล็ด เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยการเปรียบเทียบลักษณะที่บันทึกกับตำรายาหรือตำราพืชสมุนไพร [4), (8)] และเปรียบเทียบลักษณะระหว่างถั่วทะเลและผักบุ้งทะเล ดังแสดงในตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 การเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพระหว่างส่วนเหนือดินของถั่วทะเลและผักบุ้งทะเล

ส่วนของพืช	ถั่วทะเล	ผักบุ้งทะเล
ส่วนลำต้น	ลำต้นทอดเลื้อยตามผืนดิน สีเขียวอมน้ำตาล มียางสีใส	ลำต้นทอดเลื้อยตามผืนดิน สีเขียวปนแดง ตามข้อมีรากฝอย มียางสีขาวขุ่น
ส่วนใบ	ใบสีเขียว เป็นใบประกอบ แบบ trifoliate compound leaf มี 3 ใบย่อย มีหนึ่งใบที่ก้านใบย่อย 1 ก้านมีความยาวกว่าใบย่อยอื่น	ใบสีเขียว เป็นใบเดี่ยว (simple leaf) ลักษณะอวบน้ำ รูปใบปลายมนโค้งฐานใบเว้าคล้ายรูปเกือกม้า ผิวใบเป็นมัน ก้านใบยาว ใบเรียงแบบสลับ
ส่วนดอก	ดอกมีลักษณะแบบดอกถั่ว (papilionaceous from) กลีบดอกแยกกัน มีสีม่วงอมชมพู กลีบดอกและกลีบเลี้ยงมีอย่างละ 5 กลีบ	ดอกมีลักษณะเป็นรูปกรวย กลีบดอกเชื่อมติดกันเป็นรูปร่ม ปลายกลีบดอกบานเป็นรูปปากแตร (sympetalae) กลีบดอกเป็นสีชมพูอมม่วง ด้านในมีสีเข้มกว่าด้านนอก

ส่วนผล	ผลเดี่ยว แบบฝักถั่ว (legume) ฝักอ่อนมีสีเขียวแบนเป็นรูปสี่เหลี่ยม ฝักแก่จะแห้งและแตกออกตามรอยตะเข็บ	ผลเดี่ยว รูปมนรี ลักษณะแบบแคปซูล เมื่อแก่แห้งจะแตกออก ผิวผลเรียบ มีขนสีน้ำตาลปกคลุม
ส่วนเมล็ด	รูปร่างแบนรี มีสีเขียวเมื่ออ่อนและมีสีน้ำตาลเมื่อแก่ มีเยื่อสีขาวบางหุ้มเมล็ด แต่ละฝักมีเมล็ด 5-10 เมล็ด	เมล็ดมีสีเหลือง รูปร่างกลม มีสีเขียวเมื่ออ่อนและมีสีน้ำตาลเมื่อแก่ มีขนอ่อนหุ้ม

ในการเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพระหว่างส่วนเหนือดินของถั่วทะเลและผักบุ้งทะเลจากที่สังเกตได้กับตำรายาสมุนไพร เพื่อยืนยันว่าพืชทั้งสองชนิดที่ใช้ในการศึกษาเป็นถั่วทะเลและผักบุ้งทะเล จากผลการศึกษาพบว่าพืชทั้งสองชนิดที่ใช้ในการศึกษาเป็นถั่วทะเลและผักบุ้งทะเล และจากการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพของส่วนเหนือดินของพืชทั้งสองชนิด จากผลการศึกษาพบว่าพืชทั้งสองชนิดมีลักษณะคล้ายกันมาก ทั้งลักษณะลำต้นที่มีสีเขียว และทอดยาวบนพื้นดิน สีของดอกมีสีคล้ายกัน และขึ้นอยู่ในบริเวณใกล้เคียงหรือที่เดียวกัน ซึ่งจะนำไปสู่การใช้ผิดต้นได้ หากขาดความรู้ทางด้านพฤกษศาสตร์

2. ผลการทดลองการเปรียบเทียบวิธีสกัดสารเบื้องต้นจากใบผักบุ้งทะเล (preliminary study of extraction)

ในการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดเบื้องต้นในขั้นตอนนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อเลือกวิธีการสกัดที่เหมาะสมที่จะใช้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและองค์ประกอบทางเคมีระหว่างถั่วทะเลและผักบุ้งทะเล โดยดำเนินการศึกษาการสกัดจำนวน 3 วิธี ได้แก่ วิธี maceration, sonication และ reflux extractionโดยพิจารณาวิธีการสกัดจากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ได้ ปริมาณสารสกัด และองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัด

2.1 การเปรียบเทียบน้ำหนักสารสกัดหยาบจากการเตรียมสารสกัดใบผักบุ้งทะเลด้วยวิธี maceration, sonication และ reflux extraction

ในการหาวิธีการสกัดที่ดีที่สุด สามารถทำได้โดยการเปรียบเทียบปริมาณสารที่ได้หลังจากการสกัดสารจากแต่ละวิธีการสกัด ได้แก่ วิธี marceration, sonication และ reflux extraction โดยเปรียบเทียบน้ำหนักของสารสกัดที่สกัดได้จากวิธีการต่างๆ ในรูปของ %yield ซึ่งได้จากการคำนวนดังนี้

%yield = [(น้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้ (g))/(น้ำหนักพืชที่ใช้ในการสกัด (g))]x100

ตารางที่ 4-2 ปริมาณสารสกัดและ % yield ของใบผักปุ้งทะเล จากวิธีการสกัดที่ต่างกัน

วิธีการสกัด	น้ำหนักพืช (g)	น้ำหนักสารสกัด (g)	%yield
Maceration	20.03	3.39	16.90
Sonication	20.02	1.54	7.72
Reflux extraction	20.01	2.75	13.74

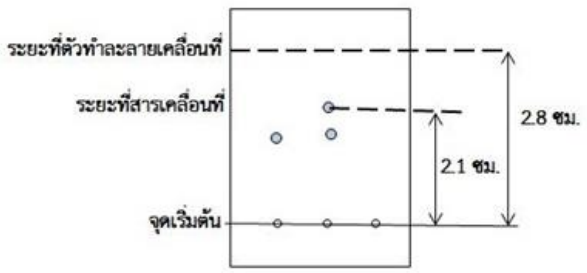
หมายเหตุ สกัดพืชด้วยปริมาณตัวทำละลาย methanol เท่ากับ 200 mL

โดยจากผลการทดลอง (ตารางที่ 4-2) การสกัดใบผักปุ้งทะเลด้วยวิธี maceration ได้ปริมาณสารสกัดมากที่สุด รองลงมา คือ reflux extraction และ sonication ตามลำดับ

2.2 การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบใบผักปุ้งทะเล ด้วยวิธีธินแลเยอร์โครมาโทกราฟี (thin layer chromatography; TLC)

จากการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบใบผักปุ้งทะเล ที่ได้มาจากการสกัดแต่ละวิธี ได้แก่ marceration, sonication และ reflux extraction ด้วยวิธีธินแลเยอร์โครมาโทกราฟี เพื่อเปรียบเทียบจำนวนองค์ประกอบทางเคมีโดยการเปรียบเทียบจำนวนของจุดบน TLC chromatogram (ภาพที่ 4-1) เมื่อสังเกตผลด้วยการมองด้วยตาเปล่า สังเกตผลภายใต้แสง UV 254 และ 366 nm และการใช้น้ำยาทดสอบ anisaldehyde-sulfuric acid (ตารางที่ 4-3) โดยรายงานตำแหน่งของสารแต่ละชนิดบน TLC chromatogram ด้วยค่า R_f ซึ่งสามารถคำนวณได้ดังนี้

R_f = ระยะทางที่สารเคลื่อนที่/ระยะทางที่ mobile phase เคลื่อนที่



$$Rf = \frac{2.1\ cm.}{2.8\ cm.} = 0.75$$

ภาพที่ 4-1 การคำนวณค่า R_f ที่ได้จากวิธีธินแลเยอร์โครมาโทกราฟี

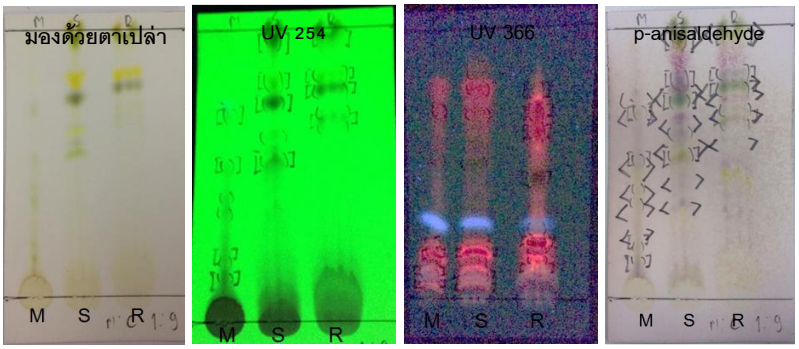
ตารางที่ 4-3 การตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบของสารพฤกษเคมีของใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล

น้ำยาทดสอบ	สารเคมี	การทดสอบ	ผลการทดลองด้วย TLC
Anisaldehyde-sulfuric acid	p-anisaldehyde ใน glacial acetic acid และ 97% sulfuric acid	ฟีนอลิก เทอร์พีน สเตอรอยด์ และน้ำตาล	(+) ม่วง น้ำเงิน แดง เทา และเขียว

หมายเหตุ (+) หมายถึง เกิดปฏิกิริยา

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น ของสารสกัดหยาบจากใบผักบุ้งทะเล โดยวิธี TLC โดยใช้ตัวทำละลาย (mobile phase) ให้สารเคลื่อนที่บนแผ่น TLC (stationary phase; SiO_2) โดยผลการทดลองจะรายงานผลของระบบ Methanol : Dichloromethane ในอัตราส่วน 1:9 (ภาพที่ 4-2 และตารางที่ 4-4) สำหรับตัวอย่างระบบอื่นๆ ดำเนินการลักษณะเช่นเดียวกัน รายละเอียดแสดงในภาคผนวก

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น ของสารสกัดหยาบจากใบผักบุ้งทะเล โดยวิธี TLC โดยใช้ stationary phase เป็น silica gel และ mobile phase เป็น methanol : dichloromethane ในอัตราส่วน 1:9 สามารถรายงานองค์ประกอบทางเคมีของสารที่พบได้ดังภาพที่ 4-2 และตารางที่ 4-4



ภาพที่ 4-2 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของใบผักบุ้งทะเลด้วยวิธีธินแลเยอร์โครมาโทกราฟี ในระบบ methanol : dichloromethane ในอัตราส่วน 1:9 โดย M คือ สารสกัดด้วยวิธี maceration, S = สารสกัดด้วยวิธี sonication, R = สารสกัดด้วยวิธี reflux extraction เมื่อสังเกตผลด้วยตาเปล่า, UV 254 และ 366 nm, และการใช้ anisaldehyde-sulfuric acid ตามลำดับ

ตารางที่ 4-4 ผลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดใบผักบุ้งทะเล ด้วยวิธี maceration, sonication และ reflux extraction

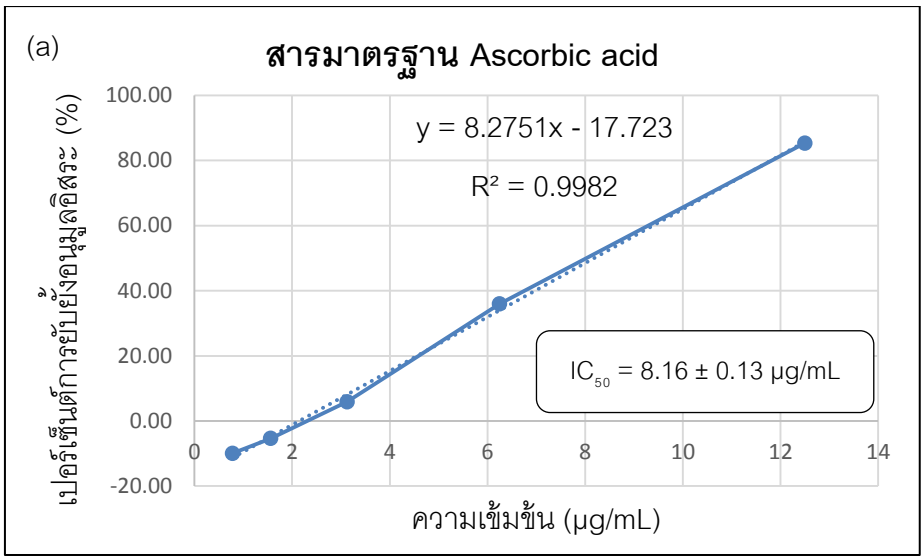
R_f	มองด้วยตาเปล่า	UV 254 nm	UV 366 nm	anisaldehyde-sulfuric acid
M (วิธี maceration)				
1. 0.140	-	✓	-	เหลือง
2. 0.211	-	✓	-	-
3. 0.316	-	-	แดง	-
4. 0.342	เขียว	-	-	เหลือง
5. 0.386	-	-	แดง	-
6. 0.397	เหลือง	-	-	เหลือง
7. 0.474	-	-	แดง	เหลือง
8. 0.518	เขียว	✓	-	-
9. 0.667	-	-	แดง	-
10. 0.684	เขียว	✓	-	เทา
11. 0.728	-	-	น้ำเงิน	-
จำนวน spot	6 spots	4 spots	6 spots	6 spots
S (วิธี sonication)				
1. 0.32	-	-	-	เหลือง
2. 0.35	-	-	แดง	-
3. 0.33	-	-	-	ม่วง
4. 0.42	-	-	แดง	-
5. 0.53	เขียว	✓	-	เหลือง
6. 0.55	เหลือง	-	แดง	เทา
7. 0.56	-	-	-	ม่วงอ่อน
8. 0.65	-	-	แดง	-
9. 0.71	เขียวเข้ม	✓	-	น้ำเงิน
10. 0.76	-	-	ทึบดำแถบแดง	-
11. 0.82	เหลือง	✓	-	ม่วงเข้ม

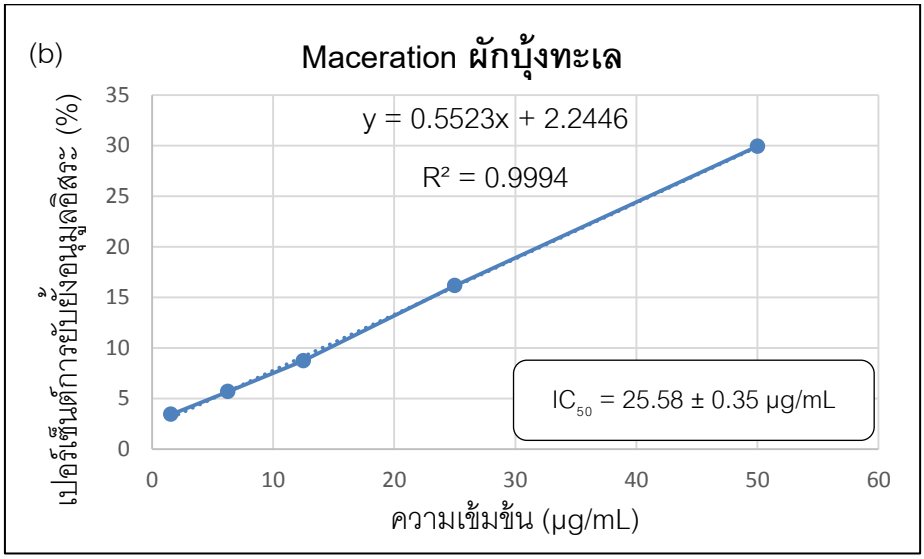
12. 0.90	-	-	-	ม่วงอ่อน
13. 0.97	เขียวเข้ม	✓	ทึบดำแถบแดง	เขียว
จำนวน spot	5 spots	4 spots	6 spots	9 spots
R (วิธี reflux)				
1. 0.46	-	-	-	เหลือง
2. 0.49	-	-	-	ม่วง
3. 0.56	-	-	แดง	-
4. 0.64	เหลือง	-	-	-
5. 0.68	-	✓	แดง	เหลือง
6. 0.71	เหลือง	-	-	เทา
7. 0.74	-	-	น้ำเงิน	ม่วง
8. 0.78	เขียวเข้ม	✓	แดง	น้ำเงิน
9. 0.83	เหลือง	✓	-	ม่วงเข้ม
10. 0.90	-	-	-	ม่วง
11. 0.98	เขียว	✓	แดง	เขียว
จำนวน spot	5 spots	4 spots	5 spots	9 spots

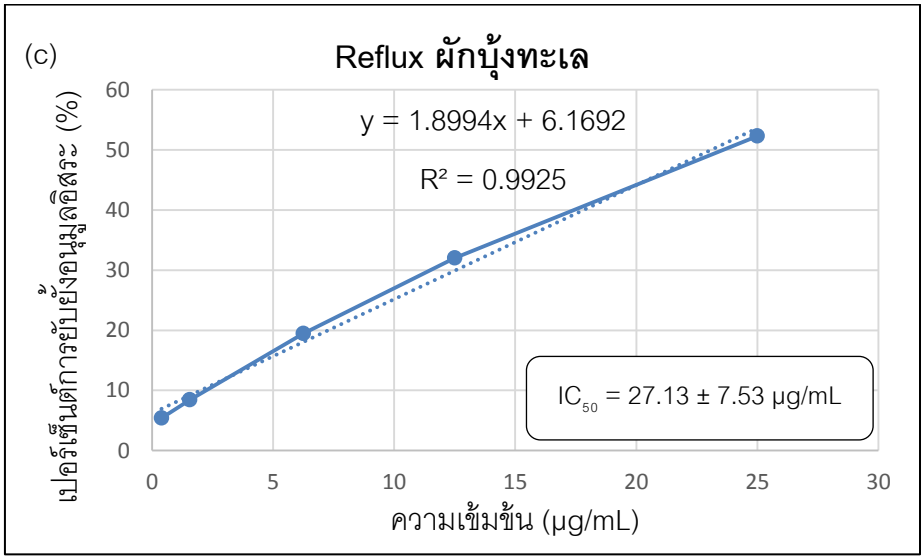
โดยจากผลการทดลอง (ภาพที่ 4-2 และตารางที่ 4-4) วิธีการสกัดใบผักบุ้งทะเลที่ให้จำนวนขององค์ประกอบทางเคมีมากที่สุด คือ วิธี sonication (13 spots) ส่วนการสกัดด้วยวิธี reflux extraction และ maceration พบองค์ประกอบทางเคมีจำนวน 11 spots

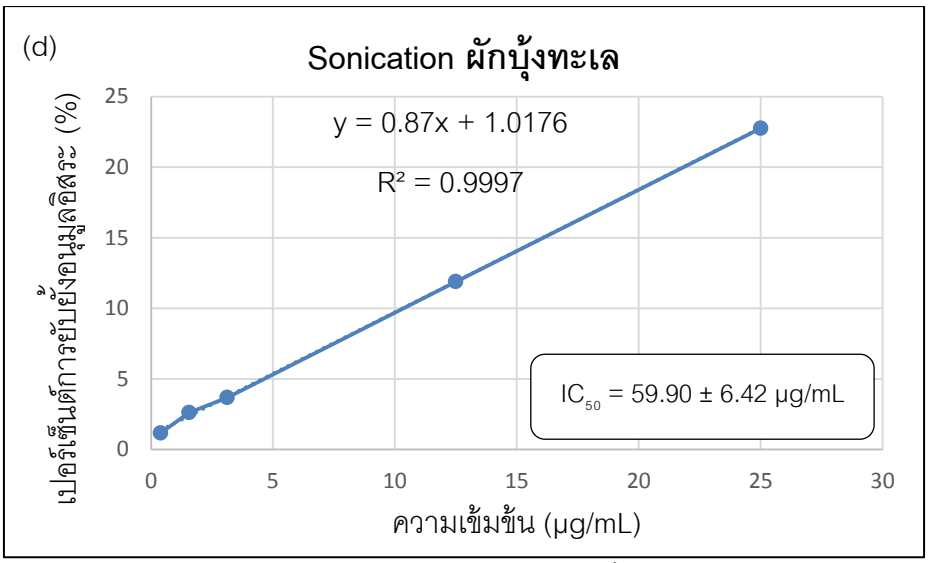
2.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ (antioxidant) ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay ของสารสกัดหยาบใบผักบุ้งทะเล

การตรวจสอบหาฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบผักบุ้งทะเลที่ความเข้มข้น 0.39, 0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.50, 25, 50 µg/ml โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 0.20, 0.39, 0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.50, 25 µg/ml ซึ่งทำการทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระและค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบจากใบผักบุ้งทะเล โดยใช้ ascorbic acid เป็นสารมาตรฐาน (ภาพที่ 4-3)


(a)
สารมาตรฐาน Ascorbic acid
y = 8.2751x - 17.723
R² = 0.9982
IC50 = 8.16 ± 0.13 µg/mL
ความเข้มข้น (µg/mL)


(b)
Maceration ผักบุ้งทะเล
y = 0.5523x + 2.2446
R² = 0.9994
IC50 = 25.58 ± 0.35 µg/mL
ความเข้มข้น (µg/mL)


(c)
Reflux ผักบุ้งทะเล
y = 1.8994x + 6.1692
R² = 0.9925
IC50 = 27.13 ± 7.53 µg/mL
ความเข้มข้น (µg/mL)



ภาพที่ 4-3 แสดงกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระกับความเข้มข้นของ (a) สารมาตรฐาน ascorbic acid (b) สารสกัดหยาบจากใบผักบุ้งทะเลด้วยวิธี maceration (c) สารสกัดหยาบจากใบผักบุ้งทะเลด้วยวิธี reflux extraction (d) สารสกัดหยาบจากใบผักบุ้งทะเลด้วยวิธี sonication

หมายเหตุ ในขั้นตอนนี้สารมาตรฐาน ascorbic acid ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย

จากผลการทดลอง ค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบผักบุ้งทะเลที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50% (IC_{50}) พบว่าสารสกัดหยาบจากใบผักบุ้งทะเลของวิธีการสกัด maceration มีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 25.58 ± 0.35 µg/mL ซึ่งมากกว่าสารสกัดหยาบจากวิธี reflux extraction และ sonication โดยมีค่าเท่ากับ 27.13 ± 7.53 µg/mL และ 59.90 ± 6.42 µg/mL ตามลำดับ และเมื่อนำผลการทดลองของสารสกัดหยาบใบผักบุ้งทะเลมาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.16 ± 0.13 µg/mL พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 4-5)

ตารางที่ 4-5 ค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบผักบุ้งทะเลที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50% (IC_{50})

สารตัวอย่าง	IC_{50} (µg/ml) ± SD
Ascorbic acid	8.16 ± 0.13
สารสกัดหยาบจากใบผักบุ้งทะเล ของวิธีการสกัด maceration	25.58 ± 0.35 [a]
สารสกัดหยาบจากใบผักบุ้งทะเล ของวิธีการสกัด reflux extraction	27.13 ± 7.53 [a]
สารสกัดหยาบจากใบผักบุ้งทะเล ของวิธีการสกัด sonication	59.90 ± 6.42 [a]

[a] สารสกัดหยาบจากพืชกับสารมาตรฐาน ascorbic acid มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า p-value < 0.05

โดยจากผลการเปรียบเทียบทั้งสามปัจจัย ได้แก่ ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay น้ำหนักของสารสกัด และจำนวนองค์ประกอบทางเคมีที่พบในสารสกัดหยาบ ในการพิจารณาเลือกวิธีการสกัดที่เหมาะสม พบว่าวิธี maceration เป็นวิธีที่ให้ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระที่ดีสุด และให้น้ำหนักสารสกัดรวมถึงพบองค์ประกอบทางเคมีมากที่สุด ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปในการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระระหว่างถั่วทะเลและผักบุ้งทะเล จึงเลือกใช้วิธี maceration ในการสกัดสารสกัดหยาบของใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล

3. ผลการทดลองการเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ระหว่างสารสกัดจากใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล

3.1 การเปรียบเทียบน้ำหนักของสารสกัดหยาบของใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล

โดยศึกษาเปรียบเทียบผลจากน้ำหนักพืชเริ่มต้น ปริมาณสารสกัดที่สกัดได้จากวิธี maceration และน้ำหนักสุดท้ายของสารหลังการระเหย โดยเทียบเป็น %yield ดังแสดงในตารางที่ 4-6

ตารางที่ 4-6 ปริมาณสารสกัดและ % yield ของตัวอย่างพืช จากวิธีการสกัด maceration

ตัวอย่างพืช	**น้ำหนักพืช** (g)	**น้ำหนักสารสกัด** (g)	%yield
ใบผักบุ้งทะเล	50.01	6.61	13.22
ใบถั่วทะเล	50.01	5.65	11.29

หมายเหตุ สกัดพืชด้วยปริมาณตัวทำละลาย methanol เท่ากับ 500 mL

โดยจากผลการทดลอง (ตารางที่ 4-6) พบว่าปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้จากใบถั่วทะเลและผักบุ้งทะเลมีความต่างกัน โดยสารสกัดหยาบจากใบผักบุ้งทะเลมีปริมาณมากกว่าสารสกัดหยาบใบถั่วทะเล โดยมีค่า %yield เท่ากับ 13.22 และ 11.29 ตามลำดับ

3.2 การสกัดสารสกัดหยาบถั่วทะเลและผักบุ้งทะเลโดยวิธีแยกชั้น (partition extraction)

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของถั่วทะเลและผักบุ้งทะเล โดยการ partition ด้วย hexane, dichloromethane, ethyl acetate เพื่อลดความซับซ้อนของสารสกัดหยาบ (crude extract) และเป็นการแยกองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดหยาบตามสภาพความมีขั้วของสาร โดยสารมีที่มีขั้วน้อยจะถูกสกัดออกมาด้วยตัวทำละลาย hexane สารที่มีขั้วปานกลาง จะถูกสกัดออกมาด้วยตัวทำละลาย dichloromethane และสารที่มีขั้วมาก จะถูกสกัดออกมาด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate และน้ำ ตามลำดับ

การ partition ชั้นสารสกัดหยาบ ของใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเลโดยใช้กรวยแยก สามารถรายงานผล โดยเปรียบเทียบผลจากน้ำหนักของถั่วทะเลและผักบุ้งทะเลเริ่มต้น ปริมาณ hexane, dichloromethane, ethyl acetate ทั้งหมดที่ใช้ในการสกัด จำนวนครั้งที่ใส่ตัวทำละลาย น้ำหนักสุดท้ายของสารหลังการ freeze dry โดยเทียบเป็น %yield

ตารางที่ 4-7 ปริมาณสารสกัดและ % yield ของใบผักบุ้งทะเล จากการแยกสารวิธี partition

ชั้นของตัวทำละลาย	**ปริมาณตัวทำละลาย** (mL)	**จำนวนครั้งที่ใส่ตัวทำละลาย**	**น้ำหนักสารสกัด** (g)	%yield
Hexane	295	9	0.25	13.81
Dichloromethane	180	6	0.31	17.39
Ethyl acetate	195	5	0.18	10.36
น้ำ	-	-	0.70	39.62

หมายเหตุ น้ำหนักเริ่มต้นของใบผักบุ้งทะเลก่อนการนำมา partition เท่ากับ 1.77 g

โดยจากผลการทดลอง (ตารางที่ 4-7) ตัวอย่างชั้นของสารสกัดใบผักบุ้งทะเล ที่มีน้ำหนักสารสกัดและ %yield มากสุดไปน้อยที่สุด จากวิธีการ partition คือ ชั้นน้ำ ชั้น dichloromethane ชั้น hexane และชั้น ethyl acetate ตามลำดับ

ตารางที่ 4-8 ปริมาณสารสกัดและ % yield ของใบถั่วทะเล จากการแยกสารวิธี partition

ชั้นของตัวทำละลาย	ปริมาณตัวทำละลาย (mL)	จำนวนครั้งที่ใส่ตัวทำละลาย	น้ำหนักสารสกัด (g)	%yield
Hexane	260	10	0.32	18.00
Dichloromethane	230	10	0.27	15.01
Ethyl acetate	195	6	0.04	2.22
น้ำ	-	-	1.00	53.55

หมายเหตุ น้ำหนักเริ่มต้นของใบถั่วทะเลก่อนการนำมา partition เท่ากับ 1.86 g

โดยจากผลการทดลอง (ตารางที่ 4-8) ตัวอย่างชั้นของสารสกัดใบถั่วบุ้งทะเล ที่มีน้ำหนักสารสกัดและ %yield มากสุดไปน้อยที่สุด จากวิธีการ partition คือ ชั้นน้ำ ชั้น dichloromethane ชั้น hexane และชั้น ethyl acetate ตามลำดับ

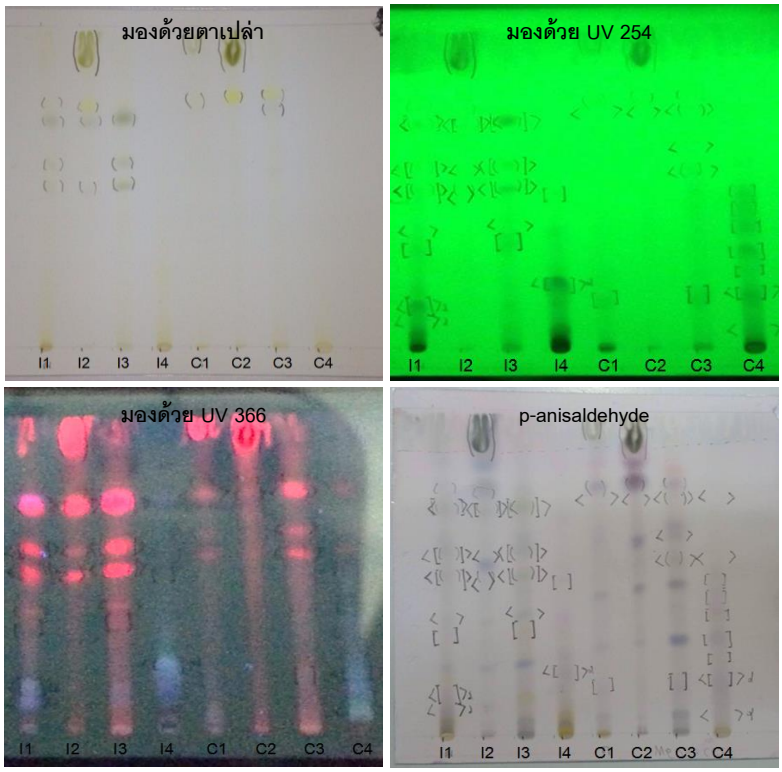
ตารางที่ 4-9 ปริมาณ %yield ของใบถั่วทะเลเปรียบเทียบกับ %yield ของใบผักบุ้งทะเล จากการแยกสารวิธี partition

ชั้นสารสกัด	ผักบุ้งทะเล	ถั่วทะเล
Hexane	13.81	18.00
Dichloromethane	17.39	15.01
Ethyl acetate	10.36	2.22
น้ำ	39.62	53.55

จากผลการทดลองในตารางที่ 4-9 พบว่าปริมาณสารสกัดด้วยตัวทำละลาย hexane และน้ำของถั่วทะเลมีมากกว่าผักบุ้งทะเล แต่สารสกัดด้วยตัวทำละลาย dichloromethane และ ethyl acetate ของผักบุ้งทะเลมีมากกว่าถั่วทะเล

3.3 การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นระหว่างสารสกัดด้วยตัวทำละลาย hexane, dichloromethane และ ethyl acetate เปรียบเทียบระหว่างสารสกัดใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล ด้วยวิธีธินแลเยอร์โครมาโทกราฟฟี (thin layer chromatography; TLC)

การเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล เพื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นระหว่างสารสกัดจากใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล ที่ทำการ partition ด้วยตัวทำละลาย hexane dichloromethane และ ethyl acetate โดยใช้วิธี TLC โดยมี stationary phase เป็น silica gel และ mobile phase เป็น methanol : dichloromethane ในอัตราส่วน 1:9 โดยจำนวนองค์ประกอบทางเคมีจะแสดงด้วยจำนวนสาร บน TLC chromatogram ที่ได้จากการตรวจสอบด้วยวิธีการต่างๆ ได้แก่ การสังเกตด้วยตาเปล่า การตรวจหา ภายใต้แสง UV 254 และ 366 nm และการตรวจวิเคราะห์ด้วย anisaldehyde-sulfuric acid ตามลำดับ จากนั้นรายงานค่า R_f ของแต่ละสารและบันทึกผลการทดลอง (ภาพที่ 4-4 และตารางที่ 4-10)



ภาพที่ 4-4 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของใบผักบุ้งทะเล และใบถั่วทะเลในระบบ methanol : dichloromethane ในอัตราส่วน 1:9 โดย I1 = สารสกัดหยาบใบผักบุ้งทะเล, I2 = สารสกัดชั้น hexane ใบผักบุ้งทะเล, I3 = สารสกัดชั้น dichloromethane ใบผักบุ้งทะเล, I4 = สาร

สกัดชั้น ethyl acetate ใบผักบุ้งทะเล, C1 = สารสกัดหยาบใบถั่วทะเล, C2 = สารสกัดชั้น hexane ใบใบถั่วทะเล, C3 = สารสกัดชั้น dichloromethane ใบถั่วทะเล, C4 = สารสกัดชั้น ethyl acetate ใบถั่วทะเล โดยสังเกตผลด้วยตาเปล่า, ภายใต้แสง UV 254 และ 366 nm, และ anisaldehyde-sulfuric acid ตามลำดับ

ตารางที่ 4-10 การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารพฤกษเคมีของใบถั่วทะเลและผักบุ้งทะเล เปรียบเทียบระหว่างชั้นสารสกัด partition ด้วยวิธีธินเลเยอร์โครมาโทรกราฟี ระบบ methanol : dichloromethane ในอัตราส่วน 1:9

R_f	มองด้วยตาเปล่า	UV 254 nm	UV 366 nm	anisaldehyde-sulfuric acid
I1 (สารสกัดหยาบใบผักบุ้งทะเล)				
1. 0.08	-	-	น้ำเงิน	เทา
2. 0.13	-	✓	น้ำเงิน	เทา
3. 0.21	-	-	-	ม่วง
4. 0.31	-	✓	-	ชมพูอ่อน
5. 0.36	-	-	แดงจาง	เทา
6. 0.49	เหลือง	✓	แดง	เทา
7. 0.56	เหลือง	✓	แดง	เทา
8. 0.69	เทา	✓	แดง	เหลืองอ่อน
9. 0.76	เหลือง	-	-	-
10. 0.83	-	-	-	เทา
11. 0.91	-	-	แดง	-
จำนวน spot	4 spots	5 spots	7 spots	9 spots
I2 (สารสกัดชั้น hexane ใบผักบุ้งทะเล)				
1. 0.20	-	-	-	ม่วง
2. 0.47	-	-	แดง	-
3. 0.49	เหลือง	-	-	-
4. 0.52	-	-	-	-
5. 0.55	-	-	แดงจาง	ม่วง

6. 0.69	เหลือง	✓	แดง	เหลืองอ่อน
7. 0.74	เหลือง	-	-	-
8. 0.76	-	-	-	เทา
9. 0.83	-	-	-	น้ำเงิน
10. 0.91	เขียว	✓	แดง	เทาเข้ม
จำนวน spot	4 spots	2 spots	4 spots	6 spots
I3 (สารสกัดชั้น dichloromethane ใบผักบุ้งทะเล)				
1. 0.03	-	-	-	เทา
2. 0.13	-	-	-	เหลือง
3. 0.22	-	-	-	ม่วง
4. 0.33	-	✓	-	-
5. 0.38	-	-	แดง	เทา
6. 0.49	เขียว	✓	แดง	เทา
7. 0.56	เหลือง	✓	แดง	-
8. 0.58	-	-	-	เทา
9. 0.69	เขียว	-	แดง	เหลือง
จำนวน spot	3 spots	3 spots	4 spots	7 spots
I4 (สารสกัดชั้น ethyl acetate ใบผักบุ้งทะเล)				
1. 0.19	-	✓	น้ำเงิน	เทา
2. 0.48	-	✓	-	-
3. 0.63	-	-	-	ชมพู
จำนวน spot	0 spot	2 spots	1 spots	2 spots
C1 (สารสกัดหยาบใบถั่วทะเล)				
1. 0.15	-	✓	-	-
2. 0.26	-	-	-	เทา
3. 0.43	-	-	-	เทา
4. 0.54	-	-	แดง	-
5. 0.60	-	-	แดง	-
6. 0.70	เขียว	-	-	-

7. 0.73	-	-	แดง	-
8. 0.76	-	-	-	ม่วง
9. 0.94	เหลือง	-	แดง	เทา
จำนวน spot	2 spots	1 spot	4 spots	4 spots
C2 (สารสกัดชั้น hexane ใบถั่วทะเล)				
1. 0.27	-	-	-	เทา
2. 0.44	-	-	-	เทา
3. 0.60	-	-	-	เทา
4. 0.73	-	-	แดง	-
5. 0.77	เขียว	-	-	ม่วง
6. 0.83	-	-	-	ม่วง
7. 0.93	เหลือง	✓	แดง	เทา
จำนวน spot	2 spots	1 spot	2 spots	6 spots
C3 (สารสกัดชั้น dichloromethane ใบถั่วทะเล)				
1. 0.06	-	-	-	เทา
2. 0.16	-	✓	-	-
3. 0.30	-	-	-	ม่วง
4. 0.47	-	-	-	เทา
5. 0.54	-	-	แดง	-
6. 0.61	-	-	แดง	เทา
7. 0.74	เหลือง	-	แดง	-
8. 0.78	เหลือง	-	-	ม่วง
9. 0.82	-	-	-	ชมพู
จำนวน spot	2 spots	1 spot	3 spots	6 spots
C4 (สารสกัดชั้น ethyl acetate ใบถั่วทะเล)				
1. 0.11	-	-	น้ำเงิน	-
2. 0.17	-	✓	น้ำเงิน	-
3. 0.23	-	✓	-	-
4. 0.30	-	✓	-	ม่วง

5. 0.34	-	-	-	ชมพู
6. 0.37	-	✓	-	-
7. 0.43	-	✓	-	-
8. 0.47	-	✓	-	-
9. 0.55	-	-	แดง	-
10. 0.74	-	-	แดง	-
จำนวน spot	0 spot	6 spots	4 spots	2 spots

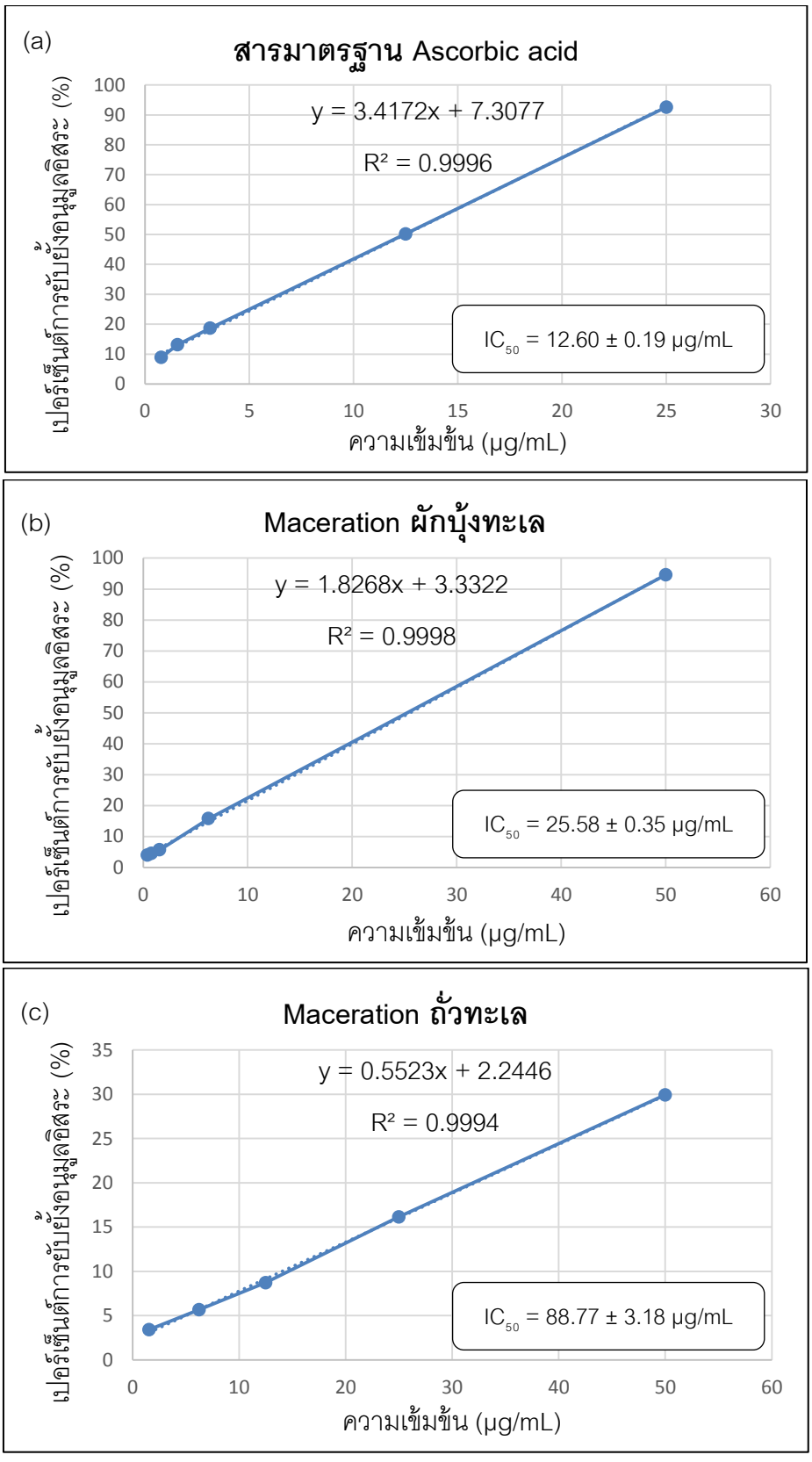
โดยจากผลการทดลอง (ภาพที่ 4-4 และตารางที่ 4-10) สารสกัดหยาบใบผักบุ้งทะเลจะแสดงองค์ประกอบทางเคมีมากกว่าสารสกัดหยาบใบถั่วทะเล โดยพบองค์ประกอบทางเคมีอย่างน้อย 11 และ 9 spots ในสารสกัดผักบุ้งทะเลและถั่วทะเลตามลำดับ

ในการ partition สารสกัดใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเลเป็นการแยกองค์ประกอบทางเคมีตามความมีขั้วของสาร จากผลการทำ TLC พบว่าสารที่มีขั้วน้อยจะพบได้ในสารสกัด hexane ส่วนสารสกัด dichloromethane และ ethyl acetate จะพบสารที่มีขั้วสูงขึ้นมาตามลำดับ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า สารที่มีขั้วสูงในชั้น ethyl acetate ของผักบุ้งทะเลมีจำนวนน้อยกว่าถั่วทะเล แต่สารที่มีขั้วน้อยในชั้น hexane และ dichloromethane พบว่ามีสารไม่ต่างกันทั้งในถั่วทะเลและผักบุ้งทะเล เมื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีที่พบได้บน TLC chromatogram

3.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay เปรียบเทียบระหว่างชั้นสารสกัดที่ผ่านการ partition ของใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล

3.4.1 การหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50% (IC_{50}) ของชั้นสารสกัดหยาบใบผักบุ้งทะเลเปรียบเทียบกับชั้นสารสกัดหยาบใบถั่วทะเล

การตรวจสอบหาฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเลที่ความเข้มข้น 0.39, 0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.50, 25, 50 µg/ml โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 0.20, 0.39, 0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.50, 25 µg/ml ซึ่งทำการทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay เพื่อทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระและค่า IC_{50} ของสารสกัดจากใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเลจากวิธีการสกัด maceration และสารมาตรฐาน ascorbic acid (ภาพที่ 4-5)



ภาพที่ 4-5 แสดงกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระกับความเข้มข้นของ

(a) สารมาตรฐาน ascorbic acid (b) สารสกัดหยาบจากใบผักบุ้งทะเลด้วยวิธีการสกัด maceration (c) สารสกัดหยาบจากใบถั่วทะเลด้วยวิธีการสกัด maceration

หมายเหตุ เพื่อทำการปัจจัยกวน ที่อาจเกิดขึ้นได้จากการใช้สารละลายที่ต่างกัน ในขั้นตอนนี้สารมาตรฐาน ascorbic acid จึงใช้ methanol เป็นตัวทำละลายเช่นเดียวกับชั้นทดสอบอื่นๆ และทดสอบวันเดียวกับขั้นตอนการหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50% (IC_{50}) ของใบผักบุ้งทะเลและใบถั่วทะเลแต่ละชั้นที่ผ่านการ partition

จากค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากวิธีการสกัด maceration ที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50% (IC_{50}) พบว่าสารสกัดหยาบจากใบผักบุ้งทะเลมีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระมากกว่าใบถั่วทะเล ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 25.58 ± 0.35 µg/mL และ 88.77 ± 3.18 µg/mL ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 12.60 ± 0.19 µg/mL พบว่าค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบจากใบผักบุ้งทะเลและถั่วทะเล แตกต่างจากค่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน ascorbic acid อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 4-11)

ตารางที่ 4-11 ค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบผักบุ้งทะเลและใบถั่วทะเลที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50% (IC_{50})

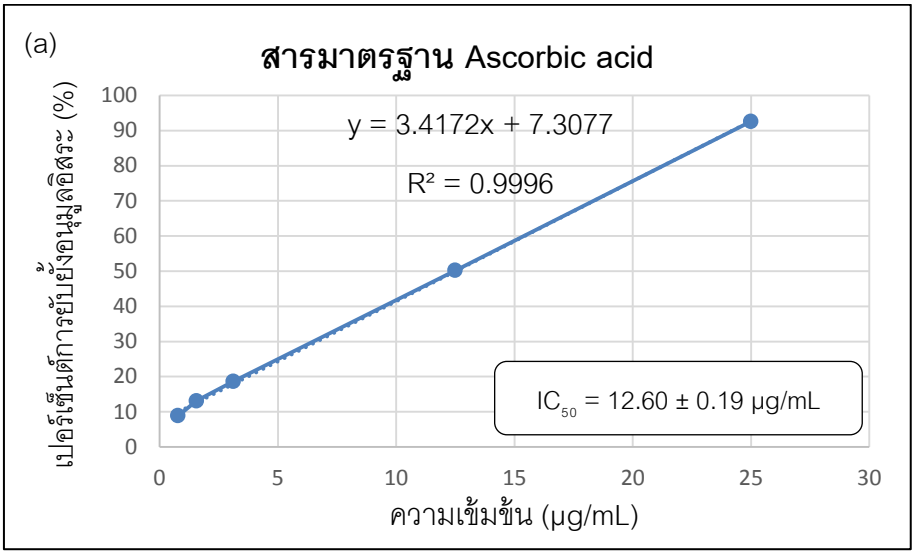
สารตัวอย่าง	IC_{50} (µg/ml) ± SD
Ascorbic acid	12.60 ± 0.19
สารสกัดหยาบจากใบผักบุ้งทะเลของวิธีการสกัด maceration	25.58 ± 0.35 [a]
สารสกัดหยาบจากใบถั่วทะเลของวิธีการสกัด maceration	88.77 ± 3.18 [a]

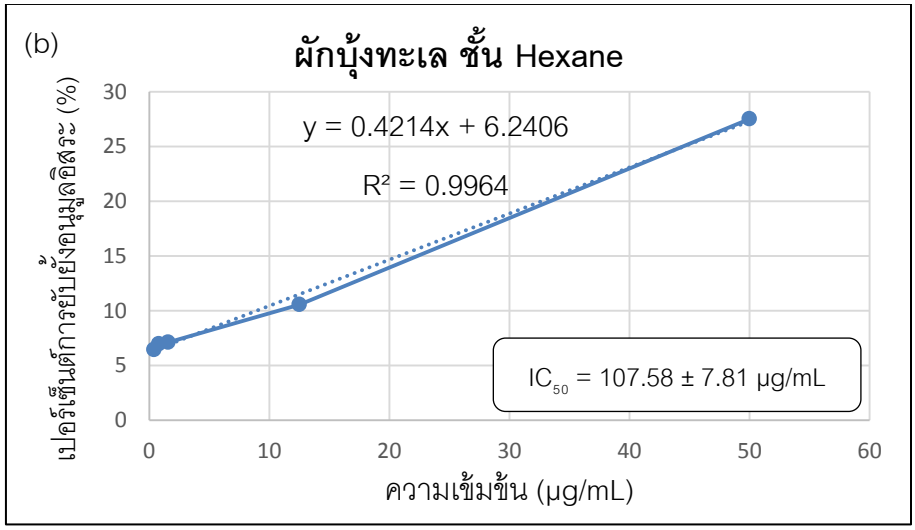
[a] สารสกัดหยาบจากพืชกับสารมาตรฐาน ascorbic acid มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า p-value < 0.05

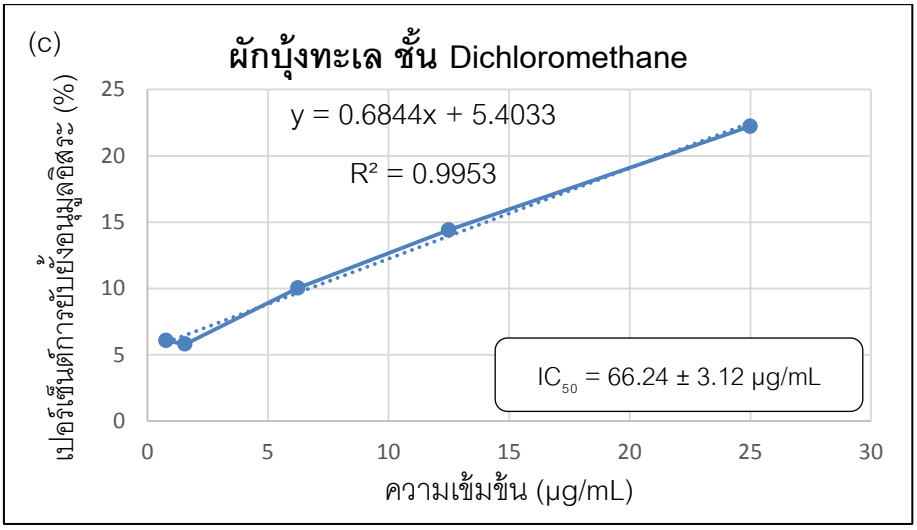
3.4.2 การหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50% (IC_{50}) ของใบผักบุ้งทะเลแต่ละชั้นที่ผ่านการ partition

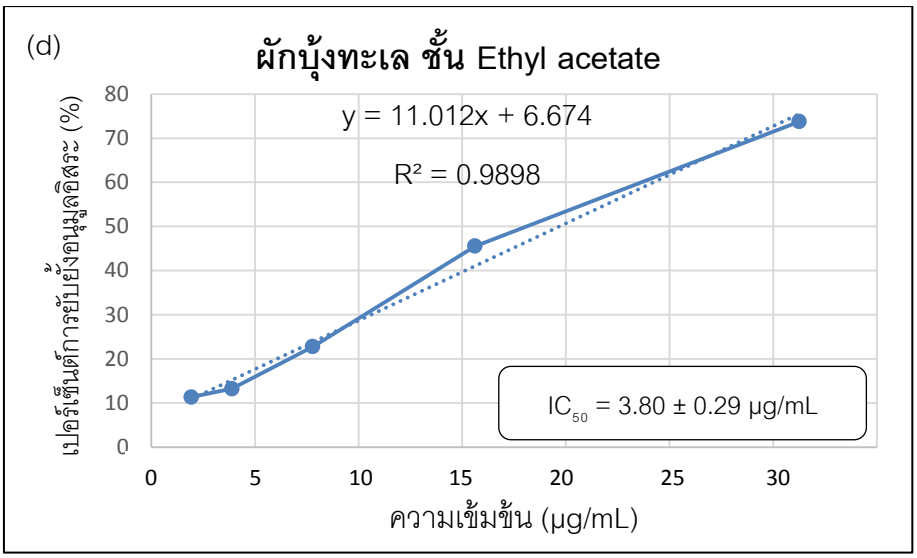
การตรวจสอบหาฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบผักบุ้งทะเลที่ผ่านการ partition ที่ความเข้มข้น 0.39, 0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.50, 25, 50 µg/ml โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 0.20, 0.39, 0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.50, 25 µg/ml ซึ่งทำการทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay เพื่อทำการคำนวนเปอร์เซ็นต์

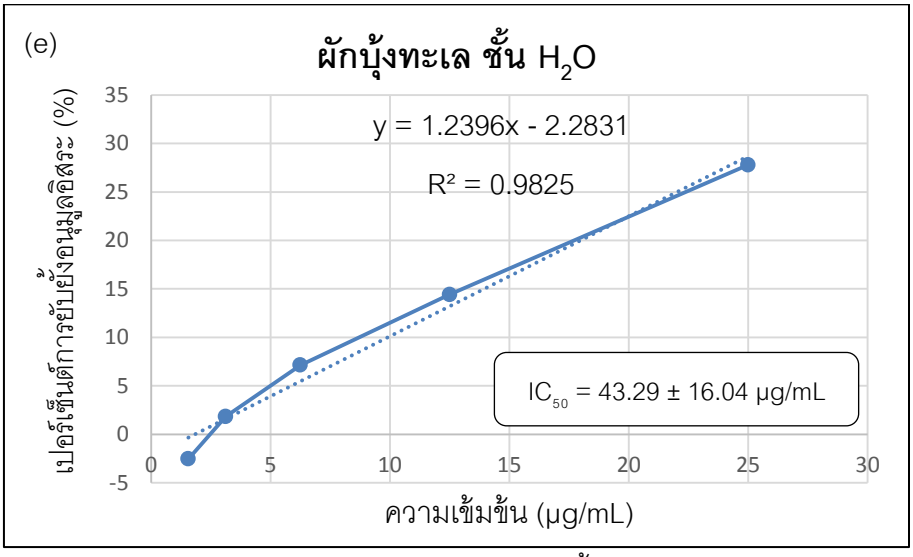
การยับยั้งอนุมูลอิสระและค่า IC_{50} ของสารสกัดจากใบผักบุ้งทะเลที่ผ่านการ partition ชั้น hexane, dichloromethane, ethyl acetate, น้ำ และสารมาตรฐาน ascorbic acid (ภาพที่ 4-6)











ภาพที่ 4-6 แสดงกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระกับความเข้มข้นของ (a) สารมาตรฐาน ascorbic acid (b) สารสกัดจากใบผักบุ้งทะเลชั้น hexane (c) สารสกัดจากใบผักบุ้งทะเลชั้น dichloromethane (d) สารสกัดจากใบผักบุ้งทะเลชั้น ethyl acetate (e) สารสกัดจากใบผักบุ้งทะเลชั้นน้ำ

หมายเหตุ เพื่อทำการปัจจัยกวน ที่อาจเกิดขึ้นได้จากการใช้สารละลายที่ต่างกัน ในขั้นตอนนี้สารมาตรฐาน ascorbic acid จึงใช้ methanol เป็นตัวทำละลายเช่นเดียวกับชั้นทดสอบอื่นๆ และทดสอบวันเดียวกับขั้นตอนการหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50% (IC_{50}) ของใบผักบุ้งทะเลและใบถั่วทะเลแต่ละชั้นที่ผ่านการ partition

ค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากใบผักบุ้งทะเลที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50% (IC_{50}) พบว่าสารสกัดจากใบผักบุ้งทะเลชั้น ethyl acetate มีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงที่สุด ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.80 ± 0.29 µg/mL รองลงมาคือสารสกัดจากใบผักบุ้งทะเลชั้นน้ำ, dichloromethane และ hexane ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 43.29 ± 16.04 µg/mL, 66.24 ± 3.12 µg/mL และ 107.58 ± 7.81 µg/mL ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 12.60 ± 0.19 µg/mL พบว่าสารสกัดชั้น ethyl acetate ของผักบุ้งทะเลแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในระดับดีกว่าสารมาตรฐาน ascorbic acid อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 4-12)

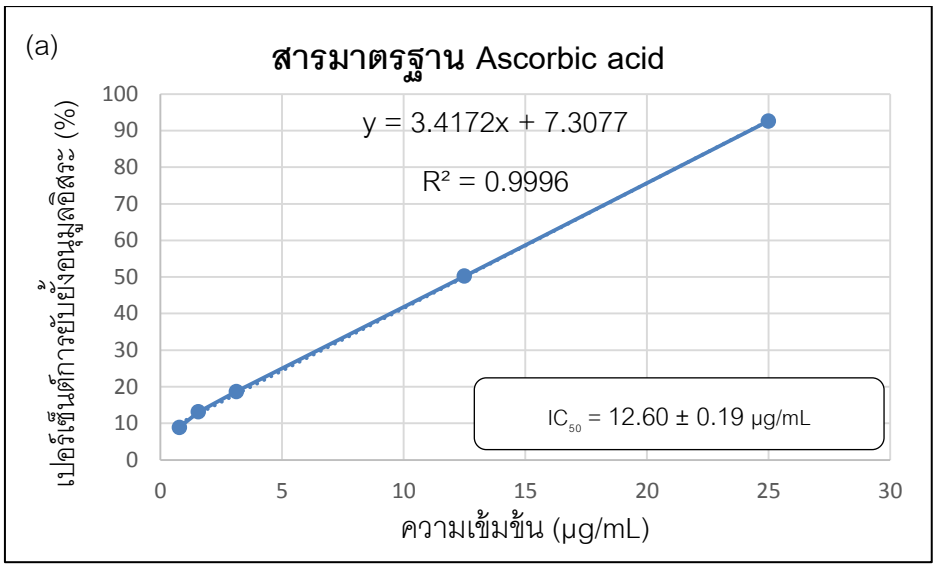
ตารางที่ 4-12 ค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากใบผักบุ้งทะเลที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50% (IC_{50})

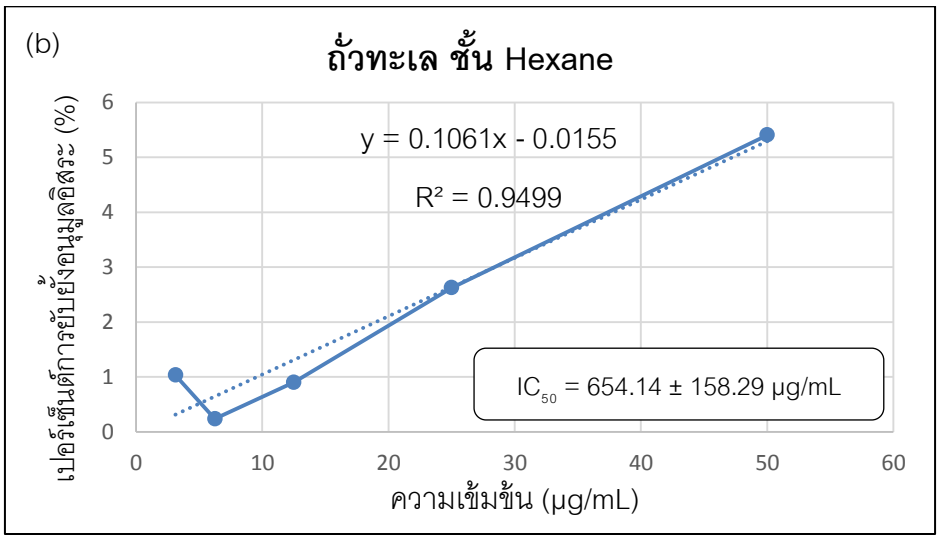
สารตัวอย่าง	IC_{50} (µg/ml) ± SD
Ascorbic acid	12.60 ± 0.19
สารสกัดจากใบผักบุ้งทะเลชั้น hexane	107.58 ± 7.81 [a]
สารสกัดจากใบผักบุ้งทะเลชั้น dichloromethane	66.24 ± 3.12 [a]
สารสกัดจากใบผักบุ้งทะเลชั้น ethyl acetate	3.80 ± 0.29 [a]
สารสกัดจากใบผักบุ้งทะเลชั้นน้ำ	43.29 ± 16.04 [a]

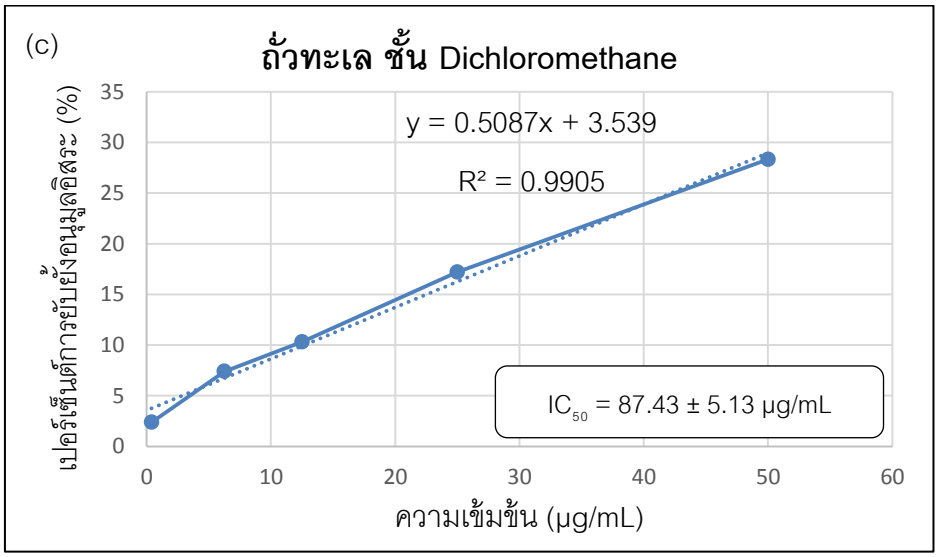
[a] สารสกัดจากพืชกับสารมาตรฐาน ascorbic acid มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า p-value < 0.05

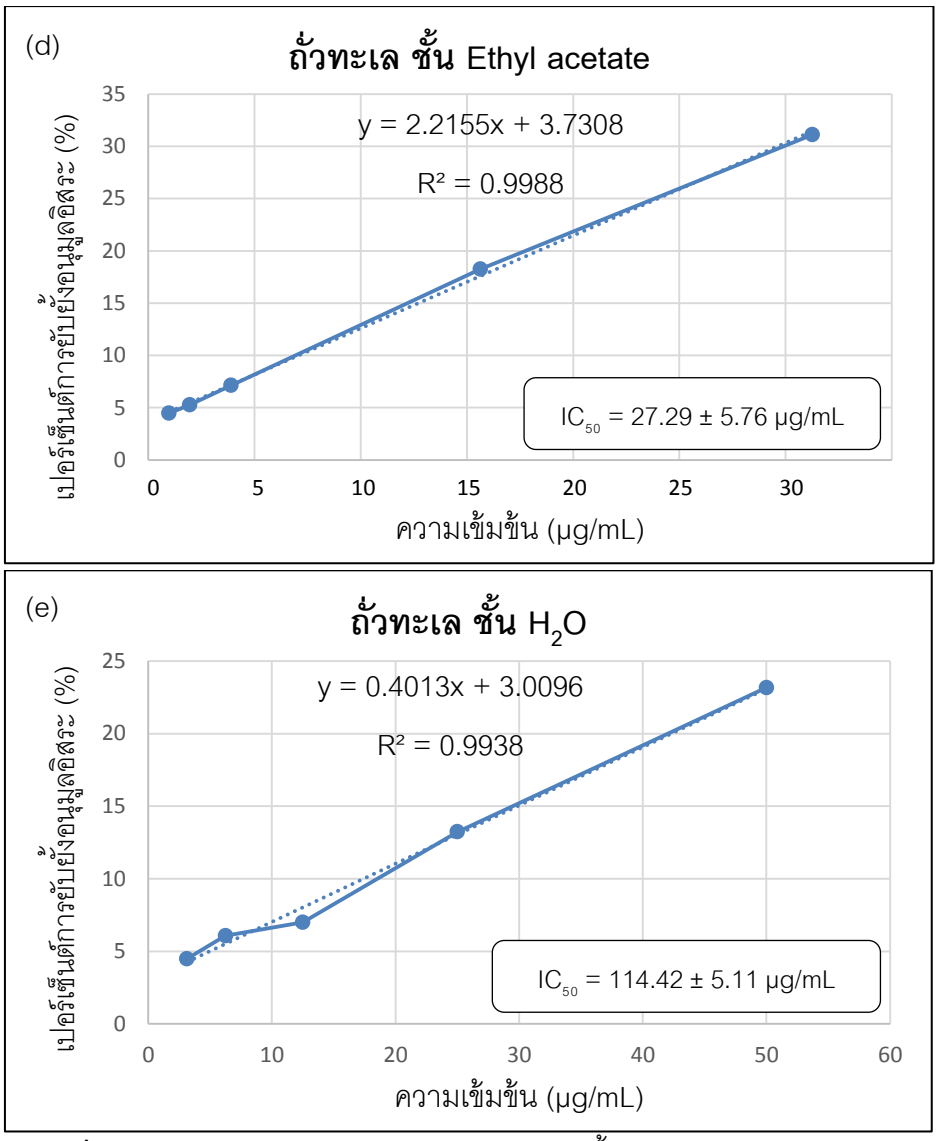
3.4.3 การหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50% (IC_{50}) ของใบถั่วทะเลแต่ละชั้นที่ผ่านการ partition

จากการตรวจสอบหาฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบผักบุ้งทะเลที่ผ่านการ partition ที่ความเข้มข้น 0.39, 0.78, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 µg/ml โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 0.195, 0.39, 0.78, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25 µg/ml ซึ่งทำการทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay พบว่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระและค่า IC_{50} ของสารสกัดจากใบถั่วทะเลที่ผ่านการ partition ชั้น hexane, dichloromethane, ethyl acetate, น้ำ และสารมาตรฐาน ascorbic acid (ภาพที่ 4-7)


(a)
สารมาตรฐาน Ascorbic acid
y = 3.4172x + 7.3077
R² = 0.9996
IC50 = 12.60 ± 0.19 µg/mL
เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ (%)
ความเข้มข้น (µg/mL)


(b)
ถั่วทะเล ชั้น Hexane
y = 0.1061x - 0.0155
R² = 0.9499
IC50 = 654.14 ± 158.29 µg/mL
เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ (%)
ความเข้มข้น (µg/mL)


(c)
ถั่วทะเล ชั้น Dichloromethane
y = 0.5087x + 3.539
R² = 0.9905
IC50 = 87.43 ± 5.13 µg/mL
เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ (%)
ความเข้มข้น (µg/mL)



ภาพที่ 4-7 แสดงกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระกับความเข้มข้นของ (a) สารมาตรฐาน ascorbic acid (b) สารสกัดจากใบถั่วทะเลชั้น hexane (c) สารสกัดจากใบถั่วทะเลชั้น dichloromethane (d) สารสกัดจากใบถั่วทะเลชั้น ethyl acetate (e) สารสกัดจากใบถั่วทะเลชั้นน้ำ

หมายเหตุ เพื่อทำการปัจจัยกวน ที่อาจเกิดขึ้นได้จากการใช้สารละลายที่ต่างกัน ในขั้นตอนนี้สารมาตรฐาน ascorbic acid จึงใช้ methanol เป็นตัวทำละลายเช่นเดียวกับชั้นทดสอบอื่นๆ และทดสอบวันเดียวกับขั้นตอนการหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50% (IC_{50}) ของใบผักบุ้งทะเลและใบถั่วทะเลแต่ละชั้นที่ผ่านการ partition

ค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากใบถั่วทะเลที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50% (IC_{50}) พบว่าสารสกัดจากใบถั่วทะเลชั้น ethyl acetate มีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงที่สุด ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 27.29 ± 5.76 µg/mL รองลงมาคือสารสกัดจากใบถั่วทะเลชั้น dichloromethane, น้ำ และ hexane ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 87.43 ± 5.13 µg/mL, 114.42 ± 5.11 µg/mL และ 654.14 ± 158.29 µg/mL ตามลำดับ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 12.60 ± 0.19 µg/mL ดังนั้นสารมาตรฐาน ascorbic acid มีค่า IC_{50} ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับสารสกัดจากใบถั่วทะเลชั้น hexane, dichloromethane, ethyl acetate และน้ำ (ตารางที่ 4-13)

ตารางที่ 4-13 ค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากใบถั่วทะเลที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50% (IC_{50})

สารตัวอย่าง	IC_{50} (µg/ml) ± SD
Ascorbic acid	12.60 ± 0.19
สารสกัดจากใบถั่วทะเลชั้น hexane	654.14 ± 158.29 [a]
สารสกัดจากใบถั่วทะเลชั้น dichloromethane	87.43 ± 5.13 [a]
สารสกัดจากใบถั่วทะเลชั้น ethyl acetate	27.29 ± 5.76 [a]
สารสกัดจากใบถั่วทะเลชั้นน้ำ	114.42 ± 5.11 [a]

[a] สารสกัดจากพืชกับสารมาตรฐาน ascorbic acid มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า p-value < 0.05

โดยจากผลการหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งได้ 50% (IC_{50}) พบว่า สารสกัดหยาบจากวิธีการสกัด maceration ของใบผักบุ้งทะเลมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระที่ดีกว่าใบถั่วทะเล โดยแสดงค่า IC_{50} เท่ากับ 25.58 ± 0.35 µg/mL และ 88.77 ± 3.18 µg/mL และในการเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดชั้น ethyl acetate ของใบผักบุ้งทะเลและใบถั่วทะเล พบว่าสารสกัดชั้น ethyl acetate ของใบผักบุ้งทะเล มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระที่ดีกว่าใบถั่วทะเล โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.80 ± 0.29 µg/mL และ 27.29 ± 5.76 µg/mL ตามลำดับ

3.5 การเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีระหว่างชั้นสารสกัดที่ผ่านการ partition ของใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (GC-MS)

แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี ใช้เทคนิคในการวิเคราะห์สารระเหยได้ขั้นสูงที่สามารถใช้ในการทำนายชนิดขององค์ประกอบที่มีอยู่ในสารโดยอาศัยการเปรียบเทียบ fingerprint ของเลขมวลของสารตัวอย่างนั้นๆ กับข้อมูลของสารที่มีอยู่ในฐานข้อมูล

จากการทดลองการฉีดสารละลายของสารสกัดที่ผ่านการ partition ของใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล ผลการทดลองที่ได้แสดงด้วยไอออนโครมาโตแกรม (ion chromatogram) โดยแกนนอนแสดงลำดับเวลาและแกนตั้งแสดงเปอร์เซ็นต์ abundance ขององค์ประกอบในสารละลาย โดยแต่ละองค์ประกอบในสารละลายจะมีตำแหน่งพีค (peak) ที่แตกต่างกัน และพื้นที่ใต้กราฟของพีคจะแสดงถึงปริมาณขององค์ประกอบนั้น

3.5.1 ผลการทดลองและการวิเคราะห์ GC-MS ในชั้นสารสกัดใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเลที่ผ่านการ partition ชั้น hexane

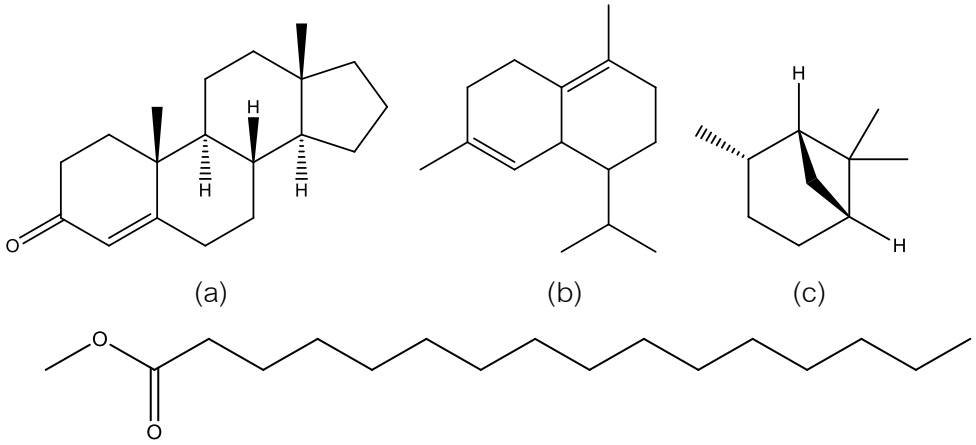
จาก GC chromatogram และมวลต่อประจุ (m/z) ที่ได้จากการวิเคราะห์ GC-MS สามารถระบุชนิดของสารที่เป็นองค์ประกอบในชั้น hexane ได้ โดยกำหนดให้ดำเนินการวิเคราะห์ peak ใน GC chromatogram ที่มี peak area มากกว่า 1% ในตารางที่ 4-14 ตารางที่ 4-15 และภาพที่ 4-10

ตารางที่ 4-14 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในชั้น hexane ที่ได้จากการ partition ของใบผักบุ้งทะเล โดยเรียงค่า peak area จากปริมาณมากไปน้อย

เลขที่	**Retention time (นาที)**	**ชื่อสาร**	**Peak area %**
1	1.19	*O*-Methylhydroxylamine	23.63
2	19.83	*E*-Phytol	20.99
3	1.36	2-Propanol	11.50
4	1.29	Androst-4-en-3-one,17-(acetyloxy)-19-methoxy-,(17. β.)-	7.89
5	19.53	Methyl linolenate	7.70
6	16.19	Methyl palmitate	4.29
7	19.36	Methyl linoleate	1.97

8	15.06	2,6,6-Trimethyl-, [1R(1.***α***.,2.***β***.,5.***α***.)]-bicyclo[3.1.1]heptane	1.89
9	6.75	***δ***-Cadinene	1.26
10	25.33	2-Xylene-D10	1.25
11	11.15	Hexasiloxane, 1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11-dodecamethyl-	1.13
12	20.15	Octadecanoic acid, methyl ester	1.10

องค์ประกอบทางเคมีที่พบในชั้น hexane ของใบผักบุ้งทะเล (ตารางที่ 4-14) ซึ่งผ่านการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS ที่ peak area มากกว่า 1% มี 12 ชนิด โดยสารที่เป็นองค์ประกอบหลักของชั้น ที่พบมากที่สุด 5 อันดับแรก ในชั้น hexane ของใบผักบุ้งทะเล ได้แก่ *O*-methylhydroxylamine, *E*-phytol, 2-propanol, androst-4-en-3-one,17-(acetyloxy)-19-methoxy-,(17.***β***.)- และ methyl linolenate ตามลำดับ



(a) (b) (c)

(e)

ภาพที่ 4-8 โครงสร้างของสารสำคัญในชั้น hexane ที่ได้จากการ partition ของใบผักบุ้งทะเลที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ

(a) Androst-4-en-3-one,17-(acetyloxy)-19-methoxy-, (17. ***β***.)-

(b) ***δ***-Cadinene

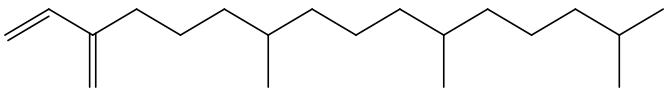
(c) 2,6,6-Trimethyl-, [1R(1.***α***.,2.***β***.,5.***α***.)]-bicyclo[3.1.1]heptane

(d) Methyl palmitate

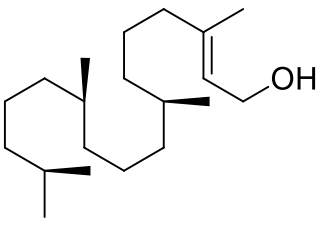
ตารางที่ 4-15 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในชั้น hexane ที่ได้จากการ partition ของใบถั่วทะเล โดยเรียงค่า peak area จากปริมาณมากไปน้อย

เลขที่	Retention time (นาที)	ชื่อสาร	Peak area %
1	1.20	*O*-Methylhydroxylamine	30.96
2	19.83	*E*-Phytol	24.06
3	1.29	Methyl-2-octylcyclopropene-1-heptanoate	7.96
4	1.36	Isopropyl alcohol	6.56
5	19.52	9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester	5.51
6	15.06	Neophytadiene	3.44
7	16.18	Methyl palmitate	3.34
8	2.07	*N,N*-dimethylthioformamide	2.22
9	24.54	Tributyl acetylcitrate	2.07
10	19.36	9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester	1.57
11	15.59	2-Octyne	1.13
12	15.14	Benzyl methyl ether	1.10

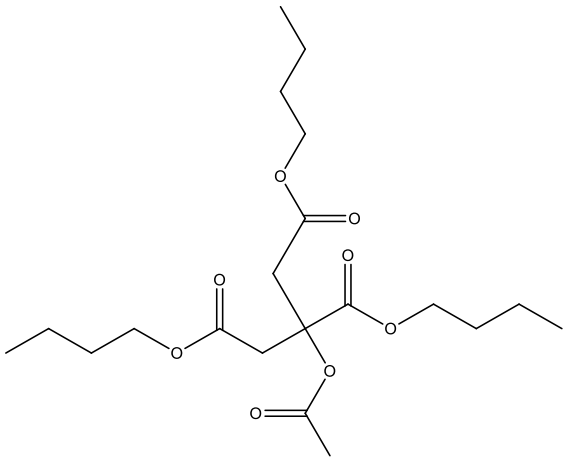
องค์ประกอบทางเคมีที่พบในชั้น hexane ของใบถั่วทะเล (ตารางที่ 4-15) ซึ่งผ่านการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS ที่ peak area มากกว่า 1% มี 12 ชนิด โดยสารที่เป็นองค์ประกอบหลักของชั้น ที่พบมากที่สุด 5 อันดับแรก ในชั้น hexane ของใบถั่วทะเล ได้แก่ *O*-methylhydroxylamine, *E*-phytol, methyl-2-octylcyclopropene-1-heptanoate, isopropyl alcohol และ 9,12,15-octadecatrienoic acid, methyl ester ตามลำดับ



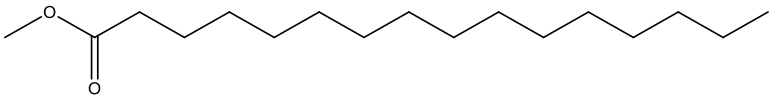
(a)



(b)



(c)



(d)

ภาพที่ 4-9 โครงสร้างของสารสำคัญในชั้น hexane ที่ได้จากการ partition ของใบถั่วทะเลที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ

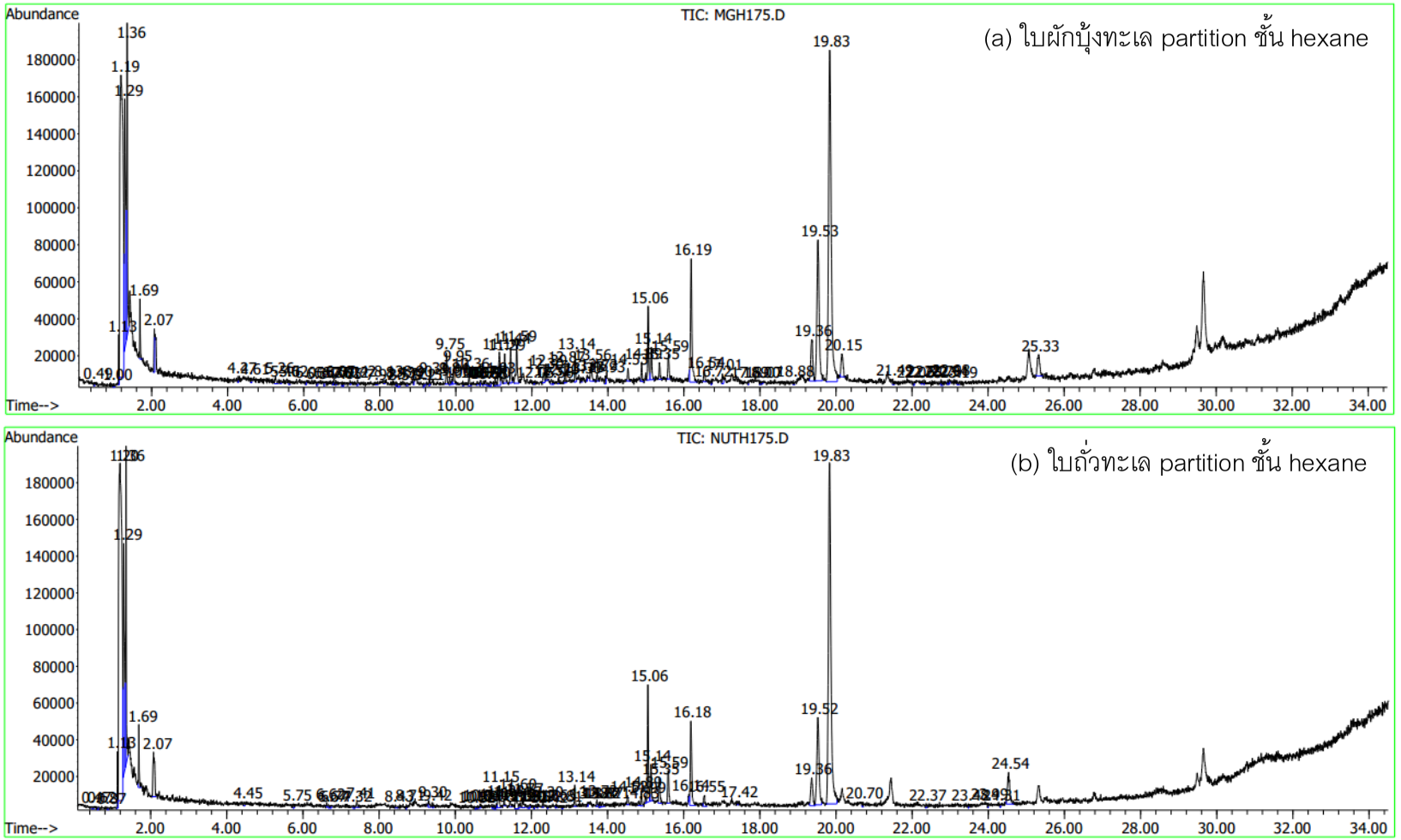
(a) Neophytadiene

(b) *E*-phytol

(c) Tributyl acetylcitrate

(d) Methyl palmitate

จากการเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีที่พบในชั้น hexane ที่ได้จากการ partition ของใบผักบุ้งทะเลและใบถั่วทะเลซึ่งผ่านการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS โดยเลือกวิเคราะห์ที่ค่า peak area มากกว่า 1% สามารถสรุปผลได้ว่า พบจำนวนของสารเท่ากัน คือ 12 ชนิด มีสารที่เป็นองค์ประกอบหลักของชั้นเหมือนกัน 2 ชนิด คือ *O*-methylhydroxylamine และ *E*-phytol ซึ่งสามารถพบได้ในสารสกัด hexane จากพืชทั้งสองชนิด แต่มีปริมาณของสารไม่เท่ากัน โดยสามารถพบ *O*-methylhydroxylamine และ *E*-phytol ได้มากกว่าในชั้น hexane ของใบถั่วทะเล นอกจากนี้ องค์ประกอบทางเคมีอื่นๆ ที่พบในสารสกัดทั้งสองชนิดนั้นมีความแตกต่างกัน



ภาพที่ 4-10 ไอออนโครมาโตแกรมของตัวอย่างชั้นสารสกัดใบผักบุ้งทะเลและใบถั่วทะเล ที่ผ่านการ partition ชั้น hexane

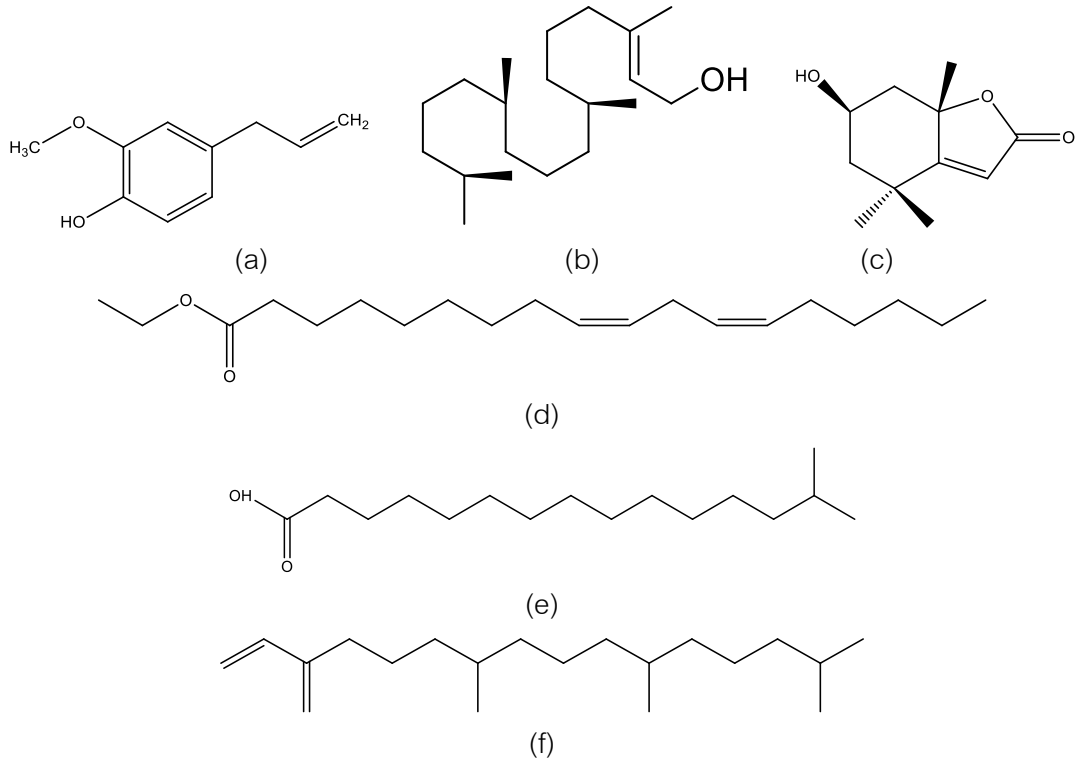
3.5.2 ผลการทดลองและการวิเคราะห์ GC-MS ในชั้นสารสกัดใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเลที่ผ่านการ partition ชั้น dichloromethane

จาก GC chromatogram และ มวลต่อประจุ (m/z) ที่วิเคราะห์ได้จาก GC-MS สามารถระบุองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดใบผักบุ้งทะเลและถั่วทะเล ชั้น dichloromethane โดยกำหนดให้ดำเนินการวิเคราะห์ peak ใน GC chromatogram ที่มี peak area มากกว่า 1% ได้ดังตารางที่ 4-16 และ 4-17 และภาพที่ 4-13

ตารางที่ 4-16 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในชั้น dichloromethane ที่ได้จากการ partition ของใบผักบุ้งทะเล โดยเรียงค่า peak area จากปริมาณมากไปน้อย

เลขที่	**Retention time (นาที)**	**ชื่อสาร**	**Peak area %**
1	1.20	*O*-Methylhydroxylamine	50.79
2	1.29	2,2'-Bis[3-cyano-4-(4-methylphenyl)60phenylpyridyl] disulphide	16.35
3	19.84	*E*-Phytol	5.11
4	2.06	2,2-Dimethoxybuthane	4.70
5	14.52	Loliolide	3.83
6	19.52	Ethyl linoleolate	3.70
7	16.19	14-Methyl-pentadecanoic acid, methyl ester	3.18
8	9.52	Eugenol	2.80
9	1.69	Dimethoxymethyl-silane	1.79
10	15.05	Neophytadiene	1.17
11	1.13	Itaconamide	1.15

องค์ประกอบทางเคมีที่พบในชั้น dichloromethane ของใบผักบุ้งทะเล (ตารางที่ 4-16) ซึ่งผ่านการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS ที่ peak area มากกว่า 1% มี 11 ชนิด โดยสารที่เป็นองค์ประกอบหลักของชั้น ที่พบมากที่สุด 5 อันดับแรก ในชั้น dichloromethane ของใบผักบุ้งทะเล ได้ แก่ *O*-methylhydroxylamine, 2,2'-Bis[3-cyano-4-(4-methylphenyl)60phenylpyridyl]disulphide , *E*-phytol, 2,2-dimethoxybuthane และ loliolide ตามลำดับ



ภาพที่ 4-11 โครงสร้างของสารสำคัญในชั้น dichloromethane ที่ได้จากการ partition ของใบผักบุ้งทะเลที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ

(a) Eugenol

(b) *E*-phytol

(c) Loliolide

(d) Ethyl linoleolate

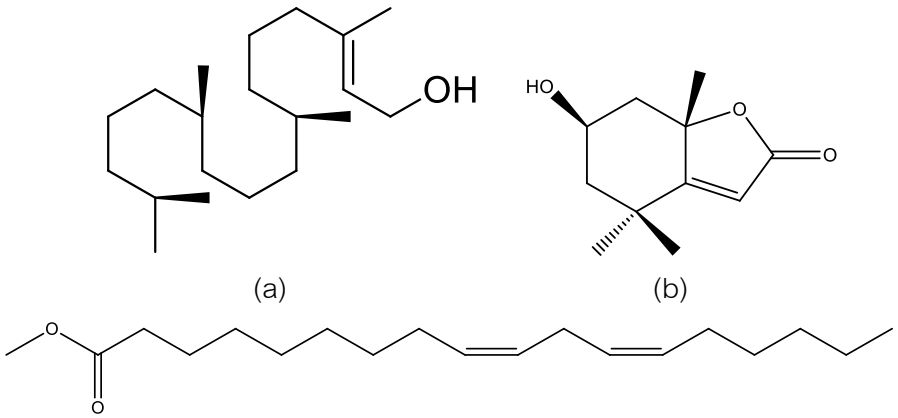
(e) 14-Methyl-pentadecanoic acid

(f) Neophytadiene

ตารางที่ 4-17 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในชั้น dichloromethane ที่ได้จากการ partition ของใบถั่วทะเล โดยเรียงค่า peak area จากปริมาณมากไปน้อย

เลขที่	Retention time (นาที)	ชื่อสาร	Peak area %
1	1.19	*O*-Methylhydroxylamine	51.83
2	1.29	Methyl linoleate	15.04
3	19.81	*E*-Phytol	12.05
4	2.07	2,2-Dimethoxybutane	3.99
5	14.51	Loliolide	3.80
6	15.06	Bergamotane	1.82
7	8.96	2-Methoxy-5-vinylphenol	1.52
8	14.72	1-Methyl-3-[(1-methylpropyl)thio]- benzene	1.49
9	1.13	Ethylene oxide	1.13
10	14.16	Carbofuran-3-hydroxy-7-phenol	1.10
11	1.69	1-(Benzylthio)-2-(2-chloroethylthio)- ethane	1.07

องค์ประกอบทางเคมีที่พบในชั้น dichloromethane ของใบถั่วทะเล (ตารางที่ 4-17) ซึ่งผ่านการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS ที่ peak area มากกว่า 1% มี 11 ชนิด โดยสารที่เป็นองค์ประกอบหลักของชั้น ที่พบมากที่สุด 5 อันดับแรก ในชั้น dichloromethane ของใบถั่วทะเล ได้แก่ *O*-methylhydroxylamine, methyl linoleate, *E*-phytol, 2,2-dimethoxybutane และ loliolide ตามลำดับ



(a) (b)

(c)

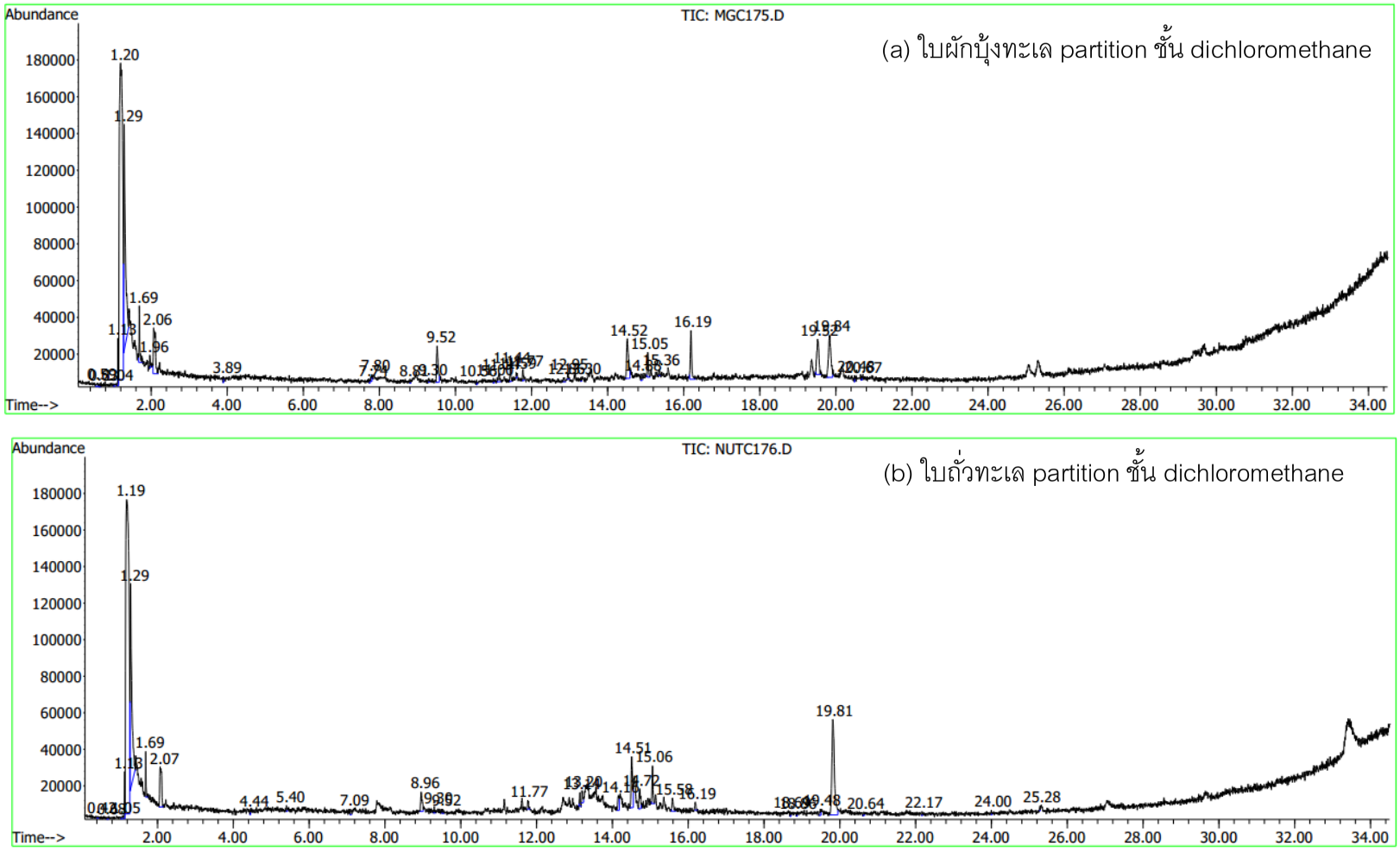
ภาพที่ 4-12 โครงสร้างของสารสำคัญในชั้น dichloromethane ที่ได้จากการ partition ของใบถั่วทะเลที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ

(a) *E*-Phytol

(b) Loliolide

(c) Methyl linoleolate

จากการเปรียบเทียบ องค์ประกอบทางเคมีที่พบในชั้น dichloromethane ที่ได้จากการ partition ของใบผักบุ้งทะเลและใบถั่วทะเล ซึ่งผ่านการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS สามารถสรุปผลได้ว่า มีสารที่เป็นองค์ประกอบหลักของชั้นเหมือนกัน 3 ชนิด คือ *O*-methylhydroxylamine, *E*-phytol และ loliolide ซึ่งสามารถพบได้ในชั้น dichloromethane ของพืชทั้งสองชนิด แต่มีปริมาณของสารต่างกัน โดยสามารถพบ *O*-methylhydroxylamine และ *E*-phytol ได้มากกว่าในชั้น dichloromethane ของใบถั่วทะเล และสามารถพบ loliolide ได้มากกว่าในชั้น dichloromethane ของใบผักบุ้งทะเล



ภาพที่ 4-13 ไอออนโครมาโตแกรมของตัวอย่างชั้นสารสกัดใบผักปู่งทะเลและใบถั่วทะเล ที่ผ่านการ partition ชั้น dichloromethane

3.5.3 ผลการทดลองและการวิเคราะห์ GC-MS ในชั้นสารสกัดใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเลที่ผ่านการ partition ชั้น ethyl acetate

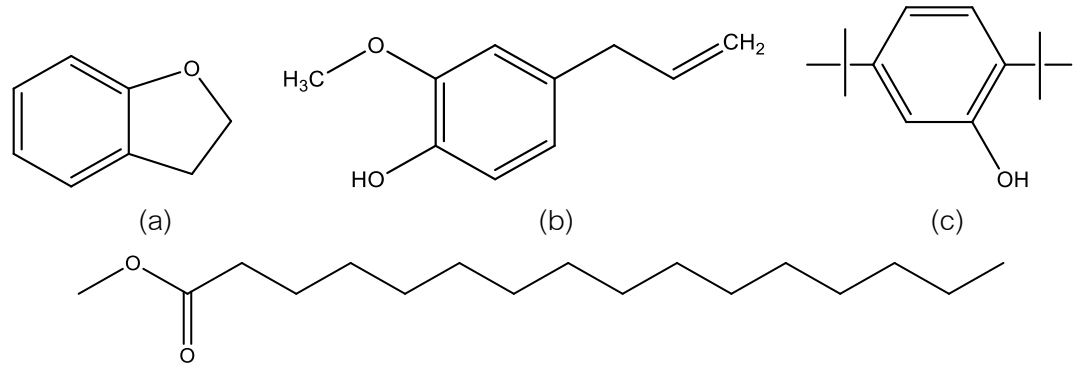
จาก GC chromatogram และ มวลต่อประจุ (m/z) ที่วิเคราะห์ได้จาก GC-MS สามารถระบุองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดใบผักบุ้งทะเลและถั่วทะเล ชั้น ethyl acetate โดยกำหนดให้ดำเนินการวิเคราะห์ peak ใน GC chromatogram ที่มี peak area มากกว่า 1% ได้ดังตารางที่ 4-18 ตารางที่ 4-19 และภาพที่ 4-16

ตารางที่ 4-18 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในชั้น ethyl acetate ที่ได้จากการ partition ของใบผักบุ้งทะเล โดยเรียงค่า peak area จากปริมาณมากไปน้อย

เลขที่	**Retention time (นาที)**	**ชื่อสาร**	**Peak area %**
1	1.20	*O*-Methylhydroxylamine	58.19
2	1.29	3-Ethylidenecholestane	16.40
3	2.08	2,2-Dimethoxybutane	2.75
4	11.55	6-Methyl benzobicyclo[2.2.1] heptenone-5	2.67
5	7.79	Coumaran	2.06
6	19.52	2,3-Epoxy-5,8-hetadecadien-1-ol	2.01
7	16.19	Methyl palmitate	1.95
8	1.69	2-(Methylthio)-ethanamine	1.63
9	8.46	2-Hydroxy-megastigma-6(*E*),8(*E*)-diene	1.56
10	1.13	Carbon dioxide	1.49
11	11.45	2,4-Di-tert-butylphenol	1.33
12	8.95	2-Methyl-2-hydroxy-decalin-4a-carboxyic acid 2,4***α***-ester	1.18
13	9.52	Eugenol	1.11

องค์ประกอบทางเคมีที่พบในชั้น ethyl acetate ของใบผักบุ้งทะเล (ตารางที่ 4-19) ซึ่งผ่านการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS ที่ peak area มากกว่า 1% มี 13 ชนิด โดยสารที่เป็นองค์ประกอบหลักของชั้น ที่พบมากที่สุด 5 อันดับแรก ในชั้น ethyl acetate ของใบผักบุ้งทะเล

ได้แก่ *O*-methylhydroxylamine, 3-ethylidenecholestane, 2,2-dimethoxybutane, 6-methyl benzobicyclo[2.2.1] heptenone-5 และ coumaran ตามลำดับ



(a) (b) (c)

(d)

ภาพที่ 4-14 โครงสร้างของสารสำคัญในชั้น ethyl acetate ที่ได้จากการ partition ของใบผักบุ้งทะเลที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ

(a) Coumaran

(b) Eugenol

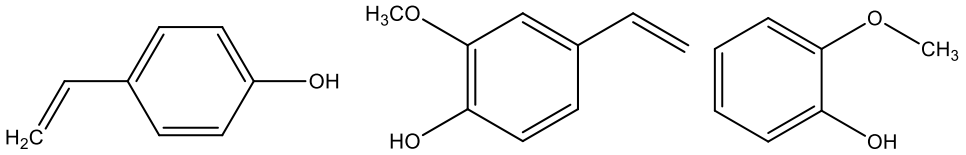
(c) 2,4-Di-tert-butylphenol

(d) Methyl palmitate

ตารางที่ 4-19 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในชั้น ethyl acetate ที่ได้จากการ partition ของใบถั่วทะเล โดยเรียงค่า peak area จากปริมาณมากไปน้อย

เลขที่	**Retention time (นาที)**	**ชื่อสาร**	**Peak area %**
1	1.19	*O*-Methylhydroxylamine	38.96
2	7.74	*p*-Vinylphenol	25.78
3	1.48	Acetic acid	9.30
4	1.29	[2,5-Dioxo-1-(m-tolyl)-3-pyrrolidinylthio]acetic acid	7.91
5	8.95	*p*-Vinylguaiacol	5.80
6	14.58	*O*-Methoxyphenol	4.70
7	2.06	2,2-dimethoxybutane	1.31
8	10.61	Phenylethanediol	1.00

องค์ประกอบทางเคมีที่พบในชั้น ethyl acetate ของใบถั่วทะเล (ตารางที่ 4-20) ซึ่งผ่านการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS ที่ peak area มากกว่า 1% มี 8 ชนิด โดยสารที่เป็นองค์ประกอบหลักของชั้น ที่พบมากที่สุด 5 อันดับแรก ในชั้น ethyl acetate ของใบถั่วทะเล ได้แก่ *O*-methylhydroxylamine, *p*-vinylphenol, acetic acid, [2,5-Dioxo-1-(m-tolyl)-3-*p*yrrolidinylthio] acetic acid และ p-vinylguaiacol ตามลำดับ



(a) (b) (c)

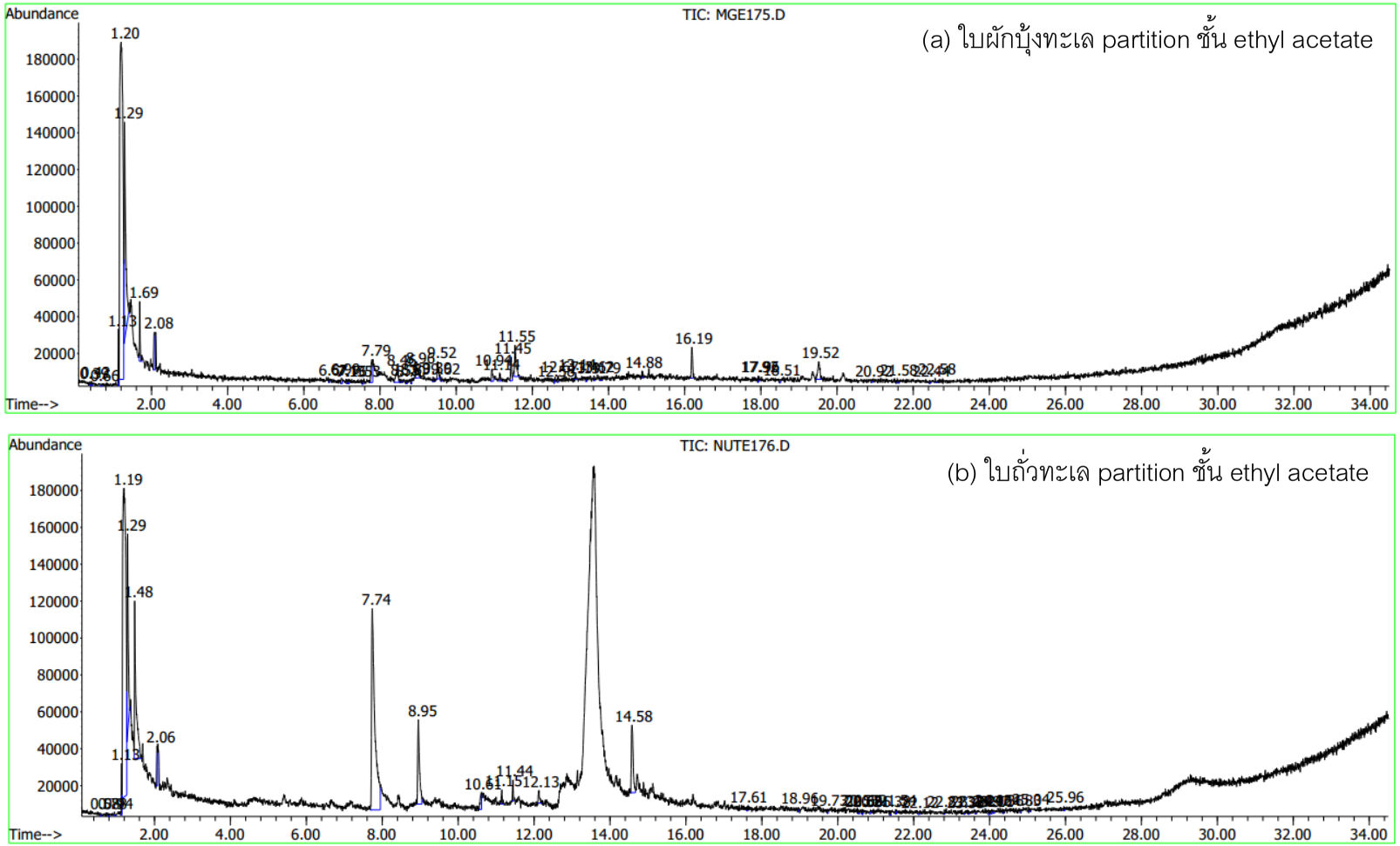
ภาพที่ 4-15 โครงสร้างของสารสำคัญในชั้น ethyl acetate ที่ได้จากการ partition ของใบถั่วทะเลที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ

(a) *p*-Vinylphenol

(b) *p*-Vinylguaiacol

(c) *O*-Methoxyphenol

จากการเปรียบเทียบ องค์ประกอบทางเคมีที่พบในชั้น ethyl acetate ที่ได้จากการ partition ของผักบุ้งทะเลและใบถั่วทะเล ซึ่งผ่านการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS สามารถสรุปผลได้ว่า พบความแตกต่างทั้งในจำนวนของสารและปริมาณ โดยองค์ประกอบทางเคมีที่เหมือนกันมีเพียงชนิดเดียว คือ *O*-methylhydroxylamine



ภาพที่ 4-16 ไอออนโครมาโตแกรมของตัวอย่างชั้นสารสกัดใบผักบุ้งทะเลและใบถั่วทะเล ที่ผ่านการ partition ชั้น ethyl acetate

3.5.4 ผลการทดลองและการวิเคราะห์ GC-MS ในชั้นสารสกัดใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเลที่ผ่านการ partition ชั้นน้ำ

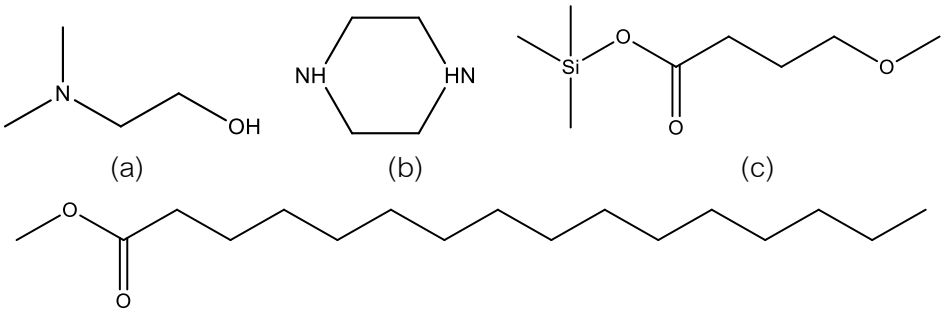
จาก GC chromatogram และ มวลต่อประจุ (m/z) ที่วิเคราะห์ได้จาก GC-MS สามารถระบุองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดใบผักบุ้งทะเลและถั่วทะเลชั้นน้ำ โดยกำหนดให้ดำเนินการวิเคราะห์ peak ใน GC chromatogram ที่มี peak area มากกว่า 1% ได้ดังตารางที่ 4-20 ตารางที่ 4-21และภาพที่ 4-19

ตารางที่ 4-20 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในชั้นน้ำ ที่ได้จากการ partition ของใบผักบุ้งทะเล โดยเรียงค่า peak area จากปริมาณมากไปน้อย

เลขที่	**Retention time (นาที)**	**ชื่อสาร**	**Peak area %**
1	1.19	*O*-Methylhydroxylamine	36.17
2	1.95	*N,N*-Dimethylaminoethanol	17.82
3	1.29	1-Methyl-4-(1,5,9-trimethyl-1,5,9-decatrienyl)-cyclohexene	15.62
4	11.55	4-Cyclopropylmethylbenzonitrile	11.87
5	2.07	Trimethylsilyl 4-methoxybutanoate	3.65
6	1.13	Carbon dioxide	2.66
7	1.69	3-Ethoxy-1,2-propanediol	2.16
8	16.20	Methyl palmitate	1.82
9	6.99	Quinoline, 4-methyl-, 1-oxide	1.66
10	10.68	Piperazine	1.55
11	4.10	Tetracarbonyl(1,1',3,3'-tetramethyl-2,2'-bi-1,3,2-diazaphospholidine-P2)-iron	1.01

องค์ประกอบทางเคมีที่พบในชั้นน้ำ ของใบผักบุ้งทะเล (ตารางที่ 4-20) ซึ่งผ่านการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS ที่ peak area มากกว่า1% มี 11 ชนิด โดยสารที่เป็นองค์ประกอบหลักของชั้น ที่พบมากที่สุด 5 อันดับแรก ในชั้นน้ำ ของใบผักบุ้งทะเล ได้แก่ *O*-methylhydroxylamine, *N,N*-dimethylaminoethanol, 1-methyl-4-(1,5,9-trimethyl-1,5,9-deca trienyl)-cyclohexene, 4-cyclopropylmethylbenzonitrile และ trimethylsilyl

4-methoxybutanoate ตามลำดับ



(a) (b) (c)

(d)

ภาพที่ 4-17 โครงสร้างของสารสำคัญในชั้นน้ำ ที่ได้จากการ partition ของใบผักบุ้งทะเล ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ

(a) *N,N*-Dimethylaminoethanol

(b) Piperazine

(c) Trimethylsilyl 4-methoxybutanoate

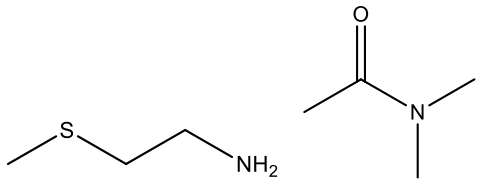
(d) Methyl palmitate

ตารางที่ 4-21 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในชั้นน้ำ ที่ได้จากการ partition ของใบถั่วทะเล โดยเรียงค่า peak area จากปริมาณมากไปน้อย

เลขที่	**Retention time (นาที)**	**ชื่อสาร**	**Peak area %**
1	1.20	*O*-Methylhydroxylamine	60.75
2	1.29	(*E*)-9-octadecenoic acid	21.28
3	12.70	Methyl-N-methyl-N-acetyl-3,4,6-tri-0-methyl-2-amino-2-desoxy-. ***β***.-D-glucoside	4.35
4	2.06	Dimethyl(methylthio)acetamide	2.28
5	1.69	*N,N*-(Methylthio)-ethanamine	1.77

องค์ประกอบทางเคมีที่พบในชั้นน้ำ ของใบถั่วทะเล (ตารางที่ 4-21) ซึ่งผ่านการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS ที่ peak area มากกว่า 1% มี 5 ชนิด โดยสารที่เป็นองค์ประกอบหลักของชั้นที่พบมากที่สุด 5 อันดับแรก ในชั้นน้ำ ของใบผักบุ้งทะเล ได้แก่ คือ *O*-methylhydroxylamine, (*E*)-

9-octadecenoic acid, Dethyl-N-methyl-N-acetyl-3,4,6-tri-0-methyl-2-amino-2-desoxy-.***β***.-D-glucoside, Dimethyl(methylthio)acetamide และ 2-(methylthio)-ethanamine ตามลำดับ



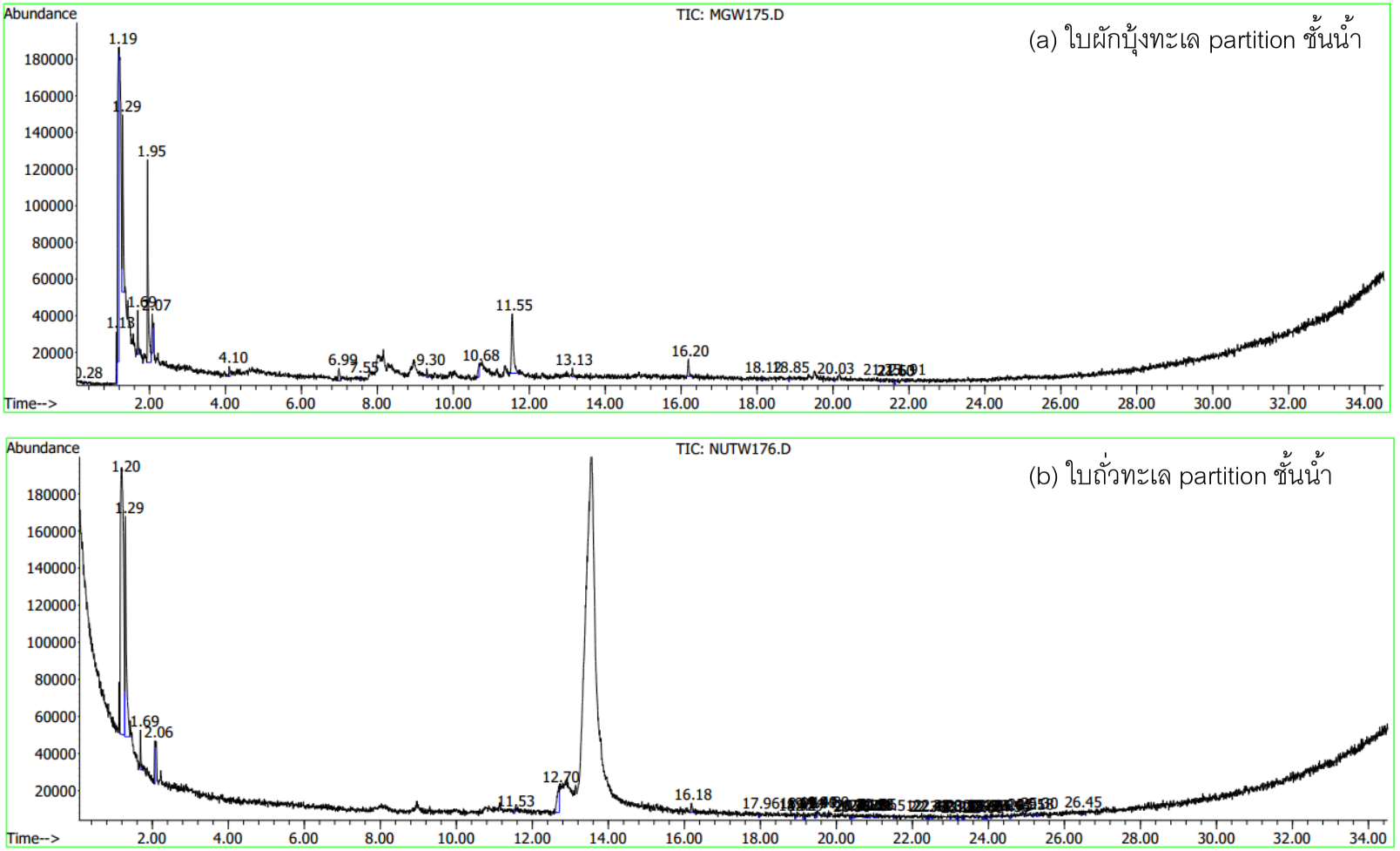
(a) (b)

ภาพที่ 4-18 โครงสร้างของสารสำคัญในชั้นน้ำ ที่ได้จากการ partition ของใบถั่วทะเลที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ

(a) *N,N*-(methylthio)-ethanamine

(b) Dimethyl(methylthio)acetamide

จากการเปรียบเทียบ องค์ประกอบทางเคมีที่พบในชั้นน้ำ ที่ได้จากการ partition ของใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล ซึ่งผ่านการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS สามารถสรุปผลได้ว่า พบความแตกต่างทั้งในทั้งจำนวนสารสำคัญและปริมาณสาร มีสารที่เป็นองค์ประกอบหลักของชั้นเหมือนกัน 1 ชนิด คือ *O*-methylhydroxylamine



ภาพที่ 4-19 ไอออนโครมาโตแกรมของตัวอย่างชั้นสารสกัดใบผักบุ้งทะเลและใบถั่วทะเล ที่ผ่านการ partition ชั้นน้ำ

3.6 การเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ ของสารสกัดที่ผ่านการ partition ของใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล ด้วยวิธี DPPH radical scavenging

นอกจากการเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมี ที่มีอยู่ในพืชทั้งสองชนิดแล้ว ในการวิจัยนี้ยังได้ทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ได้จากถั่วทะเลและผักบุ้งทะเล ด้วยวิธี DPPH radical scavenging เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งในการลดการเกิดการอักเสบได้

ตารางที่ 4-22 ผลการทดลองฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ ของสารสกัดที่ผ่านการ partition ของใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล

ตัวทำละลาย	**ชนิดของพืช**	IC_{50} (μg/mL)
ชั้น Hexane	ถั่วทะเล	654.14 ± 158.29
	ผักบุ้งทะเล	107.58 ± 7.81
ชั้น Dichloromethane	ถั่วทะเล	87.43 ± 5.13
	ผักบุ้งทะเล	66.24 ± 3.12
ชั้น Ethyl acetate	ถั่วทะเล	27.29 ± 5.76
	ผักบุ้งทะเล	3.80 ± 0.29
ชั้นน้ำ	ถั่วทะเล	114.42 ± 5.11
	ผักบุ้งทะเล	43.29 ± 16.04
	ascorbic acid (สารมาตรฐาน)	12.60 ± 0.19

จากผลการทดสอบที่แสดงในตารางที่ 4-22 สามารถสรุปได้ว่าสารสกัดชั้น ethyl acetate จากพืชทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระได้ดีกว่า สารสกัดชั้น hexane, dichloromethane และน้ำ และเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระของพืชทั้งสองชนิด พบว่าสารสกัดชั้น hexane, dichloromethane, ethyl acetate และน้ำ จากผักบุ้งทะเลแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระสูงกว่าใบถั่วทะเล แต่ชั้น ethyl acetate แสดงฤทธิ์ได้ดีที่สุด ในระดับเดียวกันกับ ascorbic acid ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบ

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

1. สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัยการเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพระหว่างส่วนเหนือดินของถั่วทะเลและผักบุ้งทะเล

ผลการศึกษา การพิสูจน์เอกลักษณ์ (identification) และการเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพของพืช 2 ชนิด ที่พบบริเวณชายหาดบางแสนและชายหาดนวล จังหวัดชลบุรี ได้แก่ ใบผักบุ้งทะเล และใบถั่วทะเล ซึ่งเจริญเติบโตในบริเวณใกล้เคียงกันและมีลักษณะทางพฤกษศาสตร์คล้ายคลึงกัน โดยการสังเกตเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพส่วนเหนือดิน เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยการเปรียบเทียบลักษณะที่บันทึกกับตำรายาหรือตำราพืชสมุนไพร [4), (8)] สรุปได้ว่าพืชทั้งสองมีความคล้ายคลึงทางพฤกษศาสตร์คล้ายกันมาก ในส่วนของ ลำต้นที่มีลักษณะ มีสีเขียว ทอดยาวบนพื้นดินเหมือนกัน มียางเหมือนกัน สีของดอกที่เป็นสีชมพูอมม่วงคล้ายกัน และลักษณะรูปร่างใบที่คล้ายคลึงกัน และขึ้นอยู่ในบริเวณใกล้เคียงหรือที่เดียวกัน จึงอาจทำให้เกิดความสับสน และจะนำไปสู่การใช้ผิดต้นได้ หากขาดความรู้ทางด้านพฤกษศาสตร์

สำหรับ ความแตกต่างทางพฤกษศาสตร์ จากที่สังเกตโดยละเอียด พบว่าทางกายภาพระหว่างส่วนเหนือดิน (aerial part) ของถั่วทะเลและผักบุ้งทะเล มีลักษณะทางกายภาพที่แตกต่างกัน โดยที่ส่วนของใบ ใบถั่วทะเลเป็นใบประกอบ แต่ใบผักบุ้งทะเลเป็นใบเดี่ยว ส่วนของดอก ดอกถั่วทะเลเป็นดอกช่อแบบดอกถั่ว (papilionaceous form) แต่ดอกผักบุ้งทะเลใบประกอบเป็นดอกรูปปากแตร (sympetalae) ส่วนของผล ผลถั่วทะเลเป็นผลฝักถั่ว แต่ผลผักบุ้งทะเลเป็นผลแบบแคปซูล ส่วนของเมล็ด เมล็ดถั่วทะเลอยู่ในฝักผลรูปร่างแบนรี แต่เมล็ดผักบุ้งทะเลมีรูปร่างกลม

2. สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัยการเปรียบเทียบวิธีสกัดสารเบื้องต้นจากใบผักบุ้งทะเล (preliminary study of extraction)

ในการศึกษาเปรียบเทียบวิธีสกัด maceration, sonication และ reflux extraction จากใบผักบุ้งทะเล โดยนำใบผักบุ้งทะเลสกัดด้วย methanol แล้วนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบสารทางพฤกษเคมีเบื้องต้นโดยวิธีธินแลเยอร์โครมาโทกราฟี และศึกษาฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ

ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay แล้วจึงพิจารณาวิธีการสกัดที่ดีที่สุดจากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ได้ ปริมาณสารสกัด และองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัด ผลการศึกษา การหาปริมาณสารสกัด พบว่าปริมาณของสารสกัดจากใบผักบุ้งทะเล เมื่อเตรียมด้วยวิธีการ maceration, sonication และ reflux extraction คิดเป็นร้อยละ เท่ากับ 16.90, 7.72 และ 13.74 ตามลำดับ ความสามารถในการสกัดของ methanol อธิบายได้ด้วยหลักการ like-dissolve-like สารที่มีขั้วมากจะละลายในตัวทำละลายที่มีขั้วมาก สารที่มีขั้วน้อยจะละลายในตัวทำละลายที่มีขั้วน้อย และตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลางจะสามารถละลายได้ทั้งสารที่มีขั้วมากและขั้วน้อย ดังนั้น ตัวทำละลาย methanol จึงสามารถสกัดสารที่มีขั้วออกมาได้ สำหรับสาเหตุที่วิธีการ maceration สามารถสกัดสารได้ปริมาณมากกว่าการสกัดวิธีอื่น เนื่องจาก การหมักแช่สาร เป็นวิธีการที่ใช้เวลานานและไม่อาศัยความร้อน ทำให้เกิดการสลายตัวของสารต่ำ

ผลการทดสอบ การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น ของสารสกัดหยาบใบผักบุ้งทะเล ในการวิจัยเลือกใช้วิธีธินแลเยอร์โครมาโทกราฟีโดยการเปรียบเทียบจำนวน spots ของสาร เนื่องจาก เป็นวิธีที่สามารถวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบโดยใช้สารตัวอย่างในปริมาณน้อย สามารถวิเคราะห์สารหลายชนิดได้พร้อมกัน ใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น ขั้นตอนไม่ยุ่งยากซับซ้อน ใช้ต้นทุนต่ำในการวิเคราะห์ตัวอย่าง สามารถแยกองค์ประกอบต่างๆ ในสารตัวอย่างได้ทั้งที่มีสีและไม่มีสี

ผลการศึกษา ด้วยวิธีธินแลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น methanol : dichloromethane ในอัตราส่วน 1:9 โดยทำการคำนวณระยะทางเคลื่อนที่สัมผัส (R_f) เปรียบเทียบจำนวน spots จากสังเกตผลด้วยจำนวนของสีของสารที่ได้หลังจากการสกัด สังเกตด้วยแสง UV 254 และ 366 nm และฉีดพ่นด้วยสารละลายด้วย anisaldehyde-sulfuric acid จากผลการทดลอง พบว่าการสกัดด้วยวิธีการ sonication (13 spots), maceration (11 spots) และ reflux extraction (11 spots) พบจำนวนขององค์ประกอบทางเคมี (spots) ของสารจากการสังเกตมากที่สุดไปน้อยที่สุดตามลำดับ ซึ่งจำนวนของ spots ที่พบแตกต่างกันในแต่ละวิธีการสกัด อาจเกิดจาก ระบบเฟสเคลื่อนที่ไม่เหมาะสม ทำให้การแยกสารแยกออกจากกันไม่สมบูรณ์ ส่งผลให้ ผู้วิจัยสังเกตจำนวน spots ผิดพลาดได้ นอกจากนี้ อาจเกิดจาก วิธีการสกัดไม่เหมาะสม จึงอาจทำให้สารสำคัญบางตัวสลายไป จึงไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธีธินแลเยอร์โครมาโทกราฟี

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ในการวิจัยนี้เลือกใช้วิธี DPPH radical scavenging assay เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย ไม่ซับซ้อน ใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์สั้น โดยหลักการ คือ สารเคมีชนิดนี้เป็นอนุมูลอิสระ ที่สามารถดูดกลืนแสงได้ และสามารถมองเห็นเป็นสี

ม่วง เมื่ออนุมูลอิสระ DPPH ถูกรีดิวซ์โดยโปรตอนก็จะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ส่งผลให้การดูดกลืนแสงลดลง การลดลงของอนุมูลอิสระจึงเป็นตัวชี้วัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบผักบุ้งทะเลได้

โดยสารสกัดใบผักบุ้งทะเลที่สกัดด้วยตัวทำละลาย methanol จากวิธีสกัด maceration, sonication, reflux extraction และสารมาตรฐาน ascorbic acid มีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.16 ± 0.13, 25.58 ± 0.35, 27.13 ± 7.53 และ 59.90 ± 6.42 µg/mL โดยได้ค่า IC_{50} ของ control สูงกว่า และค่า IC_{50} ของ ascorbic acid มากกว่า IC_{50} สารสกัดที่ได้จากวิธีสกัด maceration, sonication และ reflux extraction เป็น 3.14, 3.33 และ 7.34 เท่า ตามลำดับ

โดยสรุป จากผลการเปรียบเทียบทั้งสามปัจจัย ได้แก่ ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay น้ำหนักของสารสกัด และจำนวนองค์ประกอบทางเคมีที่พบในสารสกัดหยาบ ในการพิจารณาเลือกวิธีการสกัดที่เหมาะสม พบว่าวิธี maceration เป็นวิธีที่ให้ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ที่ดีสุด และให้น้ำหนักสารสกัดรวมมากที่สุด ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปในการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระระหว่างถั่วทะเลและผักบุ้งทะเล จึงเลือกใช้วิธี maceration ในการสกัดสารสกัดหยาบของใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล

3. สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัยการเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ระหว่างสารสกัดจากใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล

ในการศึกษาเปรียบเทียบชั้นสารสกัดใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล ได้เลือกวิธีสกัดด้วยวิธีการ maceration และทำการแยกชั้น (partition extraction) ด้วย hexane, dichloromethane และ ethyl acetate เพื่อลดความซับซ้อนของสารสกัดหยาบ (crude extract) และเป็นการแยกองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดหยาบตามสภาพความมีขั้วของสาร โดยสารมีที่มีขั้วน้อยจะถูกสกัดออกมาด้วยตัวทำละลาย hexane สารที่มีขั้วปานกลาง จะถูกสกัดออกมาด้วยตัวทำละลาย dichloromethane และสารที่มีขั้วมาก จะถูกสกัดออกมาด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate และน้ำ ตามลำดับ

จากนั้นนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบสารทางพฤกษเคมีเบื้องต้นโดยวิธีธินแลเยอร์โครมาโทกราฟีโดยการเปรียบเทียบจำนวนจุด ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging assay และการเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (GC-MS)

สำหรับข้อจำกัดของการ partition ด้วย hexane, dichloromethane และ ethyl acetate ที่อาจส่งผลต่อการแยกชั้นสารของงานวิจัยนี้ เกิดจากการใช้สัดส่วนของความมีขั้วที่ไม่เหมาะสม

ผลการศึกษา การตรวจสอบสารสกัดของชั้นสารสกัดที่ผ่านการ partition ชั้น hexane, dichloromethane และ ethyl acetate ของใบผักบุ้งทะเล ด้วยวิธีธินแลเยอร์โครมาโทกราฟฟี โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น methanol : dichloromethane ในอัตราส่วน 1:9 โดยทำการคำนวณระยะทางเคลื่อนที่สัมผัส (R_f) จากจำนวนของสีของสารที่ได้หลังจากการสกัด สังเกตด้วยแสง UV 254 และ 366 nm และฉีดพ่นด้วยสารละลายด้วย anisaldehyde-sulfuric acid จากผลการทดลอง พบว่า จากผลการทดลอง พบจำนวนขององค์ประกอบทางเคมี (spots) จากผลการศึกษาพบว่าสารที่มีขั้วน้อยจะพบได้ในสารสกัด hexane ส่วนสารสกัด dichloromethane และ ethyl acetate จะพบสารที่มีขั้วสูงขึ้นมาตามลำดับ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า สารที่มีขั้วสูงในชั้น ethyl acetate ของผักบุ้งทะเล มีจำนวนน้อยกว่าถั่วทะเล แต่สารที่มีขั้วน้อยในชั้น hexane และชั้น dichloromethane พบว่ามีสารไม่ต่างกันทั้งในถั่วทะเลและผักบุ้งทะเล เมื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีที่พบได้บน TLC chromatogram

ผลการทดสอบฤทธิ์อนุมูลอิสระ ของชั้นสารสกัดหยาบ ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย methanol จากวิธีสกัด maceration เปรียบเทียบระหว่าง ใบถั่วทะเล, ใบผักบุ้งทะเล และสารมาตรฐาน ascorbic acid มีค่า IC_{50} เท่ากับ 88.77 ± 3.18, 25.58 ± 0.35 และ 12.60 ± 0.19 µg/mL โดยได้ค่า IC_{50} ของ control สูงกว่า และค่า IC_{50} ของ ascorbic acid มากกว่าสารสกัดใบถั่วทะเล และใบผักบุ้งทะเล 7.05 และ 2.03 เท่า ตามลำดับ

ผลการทดสอบฤทธิ์อนุมูลอิสระ ของชั้นสารสกัดที่ผ่านการ partition ชั้น hexane, dichloromethane, ethyl acetate, ชั้นน้ำ ของใบถั่วทะเล และสารมาตรฐาน ascorbic acid มีค่า IC_{50} เท่ากับ 654.14 ± 158.29, 87.43 ± 5.13, 27.29 ± 5.76, 114.42 ± 5.11 และ 12.60 ± 0.19 µg/mL โดยได้ค่า IC_{50} ของ control สูงกว่า และค่า IC_{50} ของ ascorbic acid มากกว่าสารสกัดที่ผ่านการ partition ชั้น hexane, dichloromethane, ethyl acetate และชั้นน้ำของใบถั่วทะเล 51.92, 6.94, 2.17 และ 9.08 เท่า ตามลำดับ

ผลการทดสอบฤทธิ์อนุมูลอิสระ ของชั้นสารสกัดที่ผ่านการ partition ชั้น hexane, dichloromethane, ethyl acetate, ชั้นน้ำ ของใบผักบุ้งทะเล และสารมาตรฐาน ascorbic acid มีค่า IC_{50} เท่ากับ 107.58 ± 7.81, 66.24 ± 3.12, 3.80 ± 0.29, 43.29 ± 16.04 และ 12.60 ± 0.19 µg/mL โดยได้ค่า IC_{50} ของ control สูงกว่า และพบว่า ค่า IC_{50} ของ ascorbic acid น้อยกว่าสารสกัดที่ผ่านการ partition ชั้น ethyl acetate 3.32 เท่า และค่า IC_{50} ของ ascorbic acid มากกว่า

สารสกัดที่ผ่านการ partition ชั้น hexane, dichloromethane และชั้นน้ำของใบผักบุ้งทะเล 8.54, 5.26 และ 3.44 เท่า ตามลำดับ

โดยสรุป การหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งได้ 50% (IC_{50}) พบว่า สารสกัดหยาบจากวิธีการสกัด maceration ของใบผักบุ้งทะเลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าใบถั่วทะเล โดยแสดงค่า IC_{50} เท่ากับ 25.58 ± 0.35 µg/mL และ 88.77 ± 3.18 µg/mL ตามลำดับ และในการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของชั้น ethyl acetate ซึ่งเป็นชั้นที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด ของสารสกัดจากใบผักบุ้งและใบถั่วทะเล พบว่าสารสกัดผักบุ้งทะเลชั้น ethyl acetate มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าถั่วทะเล โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.80 ± 0.29 µg/mL และ 27.29 ± 5.76 µg/mL ตามลำดับ และสังเกตได้ว่า DPPH เปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลือง จากการถูกรีดิวซ์โดยโปรตอน ส่งผลให้การดูดกลืนแสงลดลง นอกจากนี้ กราฟระหว่างเปอร์เซนต์การยับยั้งระหว่างอนุมูลอิสระ DPPH กับ ความเข้มข้นของการสกัด เป็นสิ่งที่ช่วยยืนยันว่าสารสกัดที่ผ่านการ partition ชั้น ethyl acetate ของพืชทั้งสอง มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระดีที่สุด เมื่อเทียบกับชั้นอื่น

ในการเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีระหว่างชั้นสารสกัดที่ผ่านการ partition ของใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล ในการวิจัยนี้เลือกใช้วิธีวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (GC-MS) เนื่องจาก เป็นวิธีที่มีความถูกต้อง ความแม่นยำในการวิเคราะห์สูง และจากการทบทวนวรรณกรรม [4] สารที่คาดว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระของใบผักบุ้งทะเลสามารถระเหยได้

สำหรับสภาวะของ เครื่อง GC-MS นั้น ผู้วิจัยได้กำหนดสภาวะเครื่อง โดยใช้วิธีการฉีดแบบ splitless, วัฏภาคนิ่ง คือ 5% phenyl & 95% dimethylpolysiloxane (BP5), วัฏภาคเคลื่อนที่ คือ ก๊าซ helium โดยกำหนดอุณหภูมิเริ่มต้นที่ 40 องศา จนสิ้นสุดที่ 310 องศาเซลเซียส และใช้เวลาวิเคราะห์รวมทั้งสิ้น 44 นาที โดยจาก GC chromatogram และมวลต่อประจุ (m/z) ที่ได้จากการวิเคราะห์ GC-MS จะแปลผล peak โดยเทียบกับ library และดำเนินการวิเคราะห์ peak ใน GC chromatogram ที่มี peak area มากกว่า 1%

ผลการเปรียบเทียบ องค์ประกอบทางเคมีที่พบในชั้น hexane ที่ได้จากการ partition ของใบผักบุ้งทะเลและใบถั่วทะเล พบจำนวนของสารเท่ากัน คือ 12 ชนิด มีสารที่เป็นองค์ประกอบหลักของชั้นเหมือนกัน 2 ชนิด คือ *O*-methylhydroxylamine และ *E*-phytol ซึ่งสามารถพบได้ในชั้น hexane ของพืชทั้งสองชนิด แต่มีปริมาณของสารไม่เท่ากัน นอกจากนี้ องค์ประกอบทางเคมีอื่นๆ ที่พบในสารสกัดทั้งสองชนิดนั้นมีความแตกต่างกัน จึงสามารถอธิบายได้ถึงคุณสมบัติทางฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันระหว่างพืชทั้งสองชนิดในชั้น hexane

ผลการเปรียบเทียบ องค์ประกอบทางเคมีที่พบในชั้น dichloromethane ที่ได้จากการ partition ของใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล พบจำนวนของสารเท่ากัน คือ 11 ชนิด มีสารที่เป็นองค์ประกอบหลักของชั้นเหมือนกัน 3 ชนิด คือ *O*-methylhydroxylamine, *E*-phytol และ loliolide ซึ่งสามารถพบได้ในชั้น dichloromethane ของพืชทั้งสองชนิด แต่มีปริมาณของสารไม่เท่ากัน นอกจากนี้ องค์ประกอบทางเคมีอื่นๆ ที่พบในสารสกัดทั้งสองชนิดนั้นมีความแตกต่างกัน จึงสามารถอธิบายได้ถึงคุณสมบัติทางฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันระหว่างพืชทั้งสองชนิดในชั้น dichloromethane

ผลจากการเปรียบเทียบ องค์ประกอบทางเคมีที่พบในชั้น ethyl acetate ที่ได้จากการ partition ของใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล พบความแตกต่างทั้งในจำนวนของสารและปริมาณ มีสารที่เป็นองค์ประกอบหลักของชั้นเหมือนกัน 1 ชนิด คือ *O*-methylhydroxylamine ซึ่งจากองค์ประกอบทางเคมีที่พบในทั้งสองชั้น สามารถอธิบายได้ถึงคุณสมบัติทางฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันระหว่างพืชทั้งสองชนิด ในชั้น ethyl acetate

ผลการเปรียบเทียบ องค์ประกอบทางเคมีที่พบในชั้นน้ำ ที่ได้จากการ partition ของใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเล พบความแตกต่างทั้งในจำนวนของสารและปริมาณ มีสารที่เป็นองค์ประกอบหลักของชั้นเหมือนกัน 1 ชนิด คือ *O*-methylhydroxylamine ซึ่งจากองค์ประกอบทางเคมีที่พบในทั้งสองชั้น สามารถอธิบายได้ถึงคุณสมบัติทางฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันระหว่างพืชทั้งสองชนิด ในชั้นน้ำ

จากผลการตรวจสอบเบื้องต้นด้วยการสกัดแบบ maceration การเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ระหว่างสารสกัดจากใบถั่วทะเลและใบผักบุ้งทะเลทั้งหมด ของผู้วิจัย พบว่า ใบถั่วทะเลนั้น มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ เช่นเดียวกับใบผักบุ้งทะเล แต่สามารถให้ฤทธิ์ที่ต่ำกว่า เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay แต่เนื่องด้วยการศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีที่ทำให้ออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยการใช้เครื่อง GC-MS พบว่ามีความแตกต่างกันของโครงสร้างสารระหว่างใบถั่วทะเลกับใบผักบุ้งทะเล ยกเว้น *O*-methylhydroxylamine เป็นสารประกอบหลักที่สามารถพบได้มากที่สุดในทุกชั้น ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ของสารละลาย methanol ที่ใช้ในการละลายสารสกัด จึงสามารถพบได้ในทุกชั้นสารสกัด

สำหรับ สารสำคัญจากการทบทวนวรรณกรรม ที่ทำหน้าที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ ต้านพิษแมงกะพรุน คือ eugenol พบว่าเป็นส่วนประกอบในชั้นดังกล่าว และพบในสารสกัดชั้น

dichloromethane ของใบผักบุ้งทะเลได้เช่นกัน โดยพบ %peak area ซึ่งแสดงถึงปริมาณสารที่เป็นองค์ประกอบสูงกว่า

สารสำคัญอีกชนิด จากการทบทวนวรรณกรรม ที่ทำหน้าที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ ต้านพิษแมงกะพรุนอีกชนิด คือ *E*-phytol จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS พบในสารสกัดชั้น dichloromethane ของทั้งใบผักบุ้งทะเลและใบถั่วทะเล โดยพบ %peak area เป็นสัดส่วนที่เป็นหนึ่งในองค์ประกอบหลักของชั้น dichloromethane

จากผลของการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ด้วยเครื่อง GC-MS ร่วมกับการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ พบว่า ชั้น ethyl acetate มีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงกว่าสารที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายอื่น แต่โครงสร้างของสารสำคัญ ทำหน้าที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ ต้านพิษแมงกะพรุน ส่วนมาก จะพบอยู่ในชั้น dichloromethane ซึ่งแสดงฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบต่ำกว่า จึงสรุปได้ว่า นอกจากจากสำคัญที่ออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ นอกจากสารสำคัญจากการทบทวนวรรณกรรมที่พบ 2 ชนิดแล้ว อาจจะเกิดได้จากการออกฤทธิ์ร่วมกันของสารในชั้น ethyl acetate ตัวอื่นๆ เช่น phenolic compounds เป็นต้น สำหรับ โครงสร้างกลุ่มสารที่แตกต่างกันที่มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ จะแสดงกลไกการทำงานของการยับยั้งอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน และจาก TLC chromatogram พบว่ายังมีสารจำนวนหลายชนิดที่อาจจะศึกษาด้วยวิธีแก๊สโครมาโตรกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (GC-MS) ไม่ได้ ดังนั้น อาจจะต้องใช้วิธีอื่นในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบถั่วทะเลและผักบุ้งทะเล เช่น HPLC ซึ่งเป็นเครื่องมือที่สามารถวิเคราะห์กลุ่มของสารประกอบอินทรีย์ที่ไม่ระเหย หรือ สารประกอบอินทรีย์ที่สามารถระเหยได้ปานกลางได้ เป็นต้น และกลไกการเกิดการอักเสบ จากการได้รับพิษแมงกะพรุน อาจไม่ได้เกิดจากกลไกการดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging) เพียงอย่างเดียว จากผลการวิจัยทั้งหมด จึงสามารถสรุปเบื้องต้นได้ว่า พืชทั้งสองชนิด ไม่สามารถนำมาใช้แทนกันได้ ในการรักษาพิษแมงกะพรุน

ปัจจุบัน การศึกษาส่วนใหญ่ของถั่วทะเล เป็นการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดจากเมล็ดถั่วทะเล แต่การศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารสกัดจากใบถั่วทะเลยังมีไม่มากนัก เมื่อเปรียบเทียบกับใบผักบุ้งทะเลที่เจริญเติบโตในบริเวณใกล้เคียงกันและมีลักษณะทางพฤกษศาสตร์คล้ายคลึงกัน กลับมีการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมาย โดยเฉพาะฤทธิ์ในการรักษาพิษแมงกะพรุน ดังนั้น จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต ทั้งสารสำคัญในใบถั่วทะเล และใบผักบุ้งทะเล รวมถึงควรมีการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่นเพิ่มเติม ต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. ราชกิจจานุเบกษา. แผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 11 (2555-2559) [Online].2012 [cited 2017 Feb 1]; Available from: URL: www.ratchakitcha.soc.go.th/DATA/PDF/2554/E/152/1.PDF.
2. กองแผนงานมหาวิทยาลัยบูรพา. กลยุทธ์และตัวชี้วัดตามแผนยุทธศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา (ฉบับปรับปรุง พ.ศ. 2556) [Online].2013 [cited 2017 Feb 1]; Available from: URL: https://planning.buu.ac.th/content/plan/strategie/kpi2556.pdf.
3. สำนักหอสมุดกลาง มหาวิทยาลัยรามคำแหง. แมงกะพรุน (Jellyfish) [Online]. 2017. [cited 2017 Feb 1]; Available from: URL: http://www.lib.ru.ac.th/journal/jellyfish.html.
4. Medicine PMHPA. Bagasua, *Ipomoea pes-caprae*, beach morning glory [Online]. 2017. [cited 2017 Feb 1]; Available from: URL: http://www.stuartxchange.org/Bagasua.html.
5. Rogers KL GI, Griffiths LR. Inhibition of platelet aggregation and 5-HT release by extracts of Australian plants used traditionally as headache treatments. Eur J Pharm Biopharm. 2000;9(4):355–63.
6. S. Bragadeeswaran, K. Prabhu, S. Sophia Rani, S. Priyadharsini and N. Vembu. Biomedical Application of Beach Morning Glory *Ipomoea pes-caprae*. J Trop Med. 2010;5(4):81-5.
7. Reddy ARK, Grace JR. In vitro evaluation of antioxidant activity of methanolic extracts of selected mangrove plants. Med Aromat Plants. 2016;5(3).
8. Medicine PMHPA. Pataning Dagat, *Canavalia rosea*, bay bean [Online]. 2016. [cited 2017 Feb 1]; Available from: URL: http://www.stuartxchange.org/PataningDagat.html.
9. มัณฑนา นวลเจริญ. พรรณไม้ป่าชายหาด. ปทุมธานี : สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ; 2009.

10. S. Prabhu LJMR, S. John Britto, S.R. Senthilkumar. Antibacterial activity and Preliminary phytochemical analysis of leaf extract of *Canavalia rosea* (Sw.) DC. (Beach Bean). J Pharm Sci. 2010;1(4):428-34.

11. Mendoza-González G. MM, Lithgow D. Biological Flora of Coastal Dunes and Wetlands: *Canavalia rosea* (Sw.) DC. J Coast Res. 2014:697-713.

12. V. R. Niveditha DKV, K. R. Sridhar. Cytotoxic effects of methanol extract of raw, cooked and fermented split beans of canavalia on cancer cell lines MCF-7 and HT-29. IIOABJ. 2013;4(4):20-3.

13. Pattamadilok D, Pengsuparp T, Phummiratch D, Ongpipattanakul B, Meksuriyen D, Kawanishi K, Kaneda N, Suttisri R. Canarosine: A new guanidine alkaloid from *Canavalia rosea* with inhibitory activity on dopamine D1 receptors. J Asian Nat Prod Res. 2008;10(10):915-18.

14. Pattamadilok D. Phytochemical study of *Canavalia Rosea* and *Elateriospermum Tapos* [PhD thesis]. CUIE; 2012.

15. ระบบฐานข้อมูลทรัพยากรชีวภาพและภูมิปัญญาท้องถิ่นของชุมชน. ผักบุ้งทะเล [Online]. 2012. [cited 2017 Feb 1]; Available from: URL: http://www.bedo.or.th/lcdb/biodiversity/view.aspx?id=8941

16. de Souza MM, Madeira A, Berti C, Krogh R, Yunes RA, Cechinel-Filho V. Antinociceptive properties of the methanolic extract obtained from *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. J Ethnopharmacol. 2000;69(1):85–90.

17. ศศิธร วสุวัต, พัชรี สุนทรพะลิน. การใช้ครีมผักบุ้งทะเลรักษาผิวหนังอักเสบที่เกิดจากแมงกะพรุน. สารศิริราช. 1985;37(5):325-38.

18. Pongprayoon U. BL, Soonthornsaratune P, Wasuwat S. Anti-inflammatory activity of *Ipomoea pes-caprae* (L.) R.Br. Phytother Res. 1991;5(2).

19. Pongprayoon U BP, Jacobsson U, Lindstrom M, Boahlin L. Compounds inhibiting prostaglandin synthesis isolated from *Ipomoea pes-caprae*. Planta Medica. 1991;57:515-57.

20. N. Deepak Venkataraman WCA, T. Purushoth Prabhu, R.Kannan. Anti-Inflammatory potential of ethanolic extracts from aerial partsof *Ipomoea pes-caprae* (L.) R.Br using cotton pellet induced granuloma model. J Appl Pharm Sci. 2013;61:61-3

21.เกสรี กลิ่นสุคนธ์ อส, ประภัสสร รักถาวร. การประเมินคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและต้านเชื้อแบคทีเรียของพืชสมุนไพรไทยบางชนิด. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. 2014;1:1412.

22. Umamaheshwari G. TR, R. Shanmugapriya. Antioxidant and radical scavenging effect of *Ipomoea pes-caprae* Linn. R.Br. IJPRIF. 2012;4:848-51.

23. Minakshi Ganjir DRB, Sunita Bhatnagar. Phytochemical analysis, cytotoxic and antioxidant potential of *Ipomoea pes-caprae* (L) R.Br and *Merremia umbellata* (L.) H. Hallier. IJSTR. 2013;2(5)217-25.

24. Wasuwat S. Extract of *Ipomoea pes-caprae* (Convolvulaceae) antagonistic to histamine and jellyfish poison. Nature (London). 1970(225):758.

25. Wasuwat S SP. Investigation of pharmacologically active principles of *Ipomoea pes-caprae* (Linn.) Roth. (Phakbungtha-le). Conference of science and technology Thailand; Chiangmai univ, Chiangmai, Thailand 1984. p. 222-3.

26. Manigauha A KM, Ganesh N. In vivo antitumor potential of *Ipomoea pes-caprae* on melanoma cancer. Phcog Mag. 2015:426.

27. Bang-Wei Yu J-GL, Jun-Song Wang, Dong-Ming Zhang, Shi-Shan Yu, and Ling-Yi Kong. Pentasaccharide Resin Glycosides from *Ipomoea pes-caprae*. J Nat Prod. 2011:620-28.

28. Gurudeeban S, Satyavani K, Ramanathan T. Alpha glucosidase inhibitory effect and enzyme kinetics of coastal medicinal plants. Bangladesh J Pharmacol. 2012:186-91.

29.Marina Elisa Philippi BMD, Carolina Vieira Da Silva, Michel Thomaz De Souza, Rivaldo Niero, Valdir Cechinel Filho and Edneia Casagranda Bueno. Immunostimulatory acivity of *Calophyllum brasiliense*, *Ipomoea pes-caprae* and *Matayba elaeagnoides* demonstrated by human peripheral blood mononuclear

cells prolipheration. Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research. 2010;67(1):69-73.

30. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ข้อควรพิจารณาในการเตรียมสารสกัดจากพืช [Online]. 2010. [cited 2017 Feb 7]; Available from: URL: http://cyberlab.lh1.ku.ac.th/elearn/faculty/agriculture/agri02/lesson5/lesson5-9.htm.
31. ดวงกมล เรือนงาม. การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ (Extraction of Antioxidant) [Online]. 2015. [cited 2017 Feb 7]; Available from: URL: http://www.thaiscience.info/journals/Article/JOSL/10970881.pdf.
32. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร. การเตรียมสารสกัดจากสมุนไพร [Online]. 2015. [cited 2017 Feb 7]. Available from: URL: http://www.slideshare.net/NarongchaiPongpan/plant-extraction-4-04-2015.
33. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. Thin-layer chromatography [Online]. 2016. [cited 2017 Feb 7]; Available from: URL: https://sites.google.com/site/khormathokrafi/
34. คณะกรรมการจัดการความรู้ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 (KM) นครสวรรค์. คู่คิดพิชิต GC-MS [Online]. 2011. [cited 2017 Feb 7]; Available from: URL: http://rmscns.dmsc.moph.go.th/2011/file/คู่คิดพิชิต%20G1.pdf.
35. วันทนา อยู่สุข. สัตว์มีพิษในทะเลไทย: แมงกะพรุน [Online]. 2016. [cited 2017 Feb 7]; Available from: URL: http://www.healthcarethai.com/พิษแมงกะพรุน.
36. มหาวิทยาลัยมหิดล ภค. พิษแมงกะพรุน (Jellyfish strings) [Online]. 2015. [cited 2017 Feb 7]; Available from: URL: http://www.errama.com/system/spaw2/uploads/files/jellyfish.pdf.
37. Sarinya Kumpunya SP. Antioxidant activities of *Vernonia Cinerea* L. extract in endotoxin and cytokine stimulated macrophages. Thai J Pharmacol. 2014;36(2):29-43.
38. บุหรัน พันธุ์สวรรค์. อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 2013;21(3)275-86.

39. กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง. โครงการผักบุ้งทะเล [Online]. 2015. [cited 2017 Feb 7]; Available from: URL: http://www.science.navy.mi.th/webproject/pdf/Ipomoea%20pes-aprae.pdf.

40. เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม. อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ: แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา, ว.วิชาการ มหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ 2011;1(1): 59-70.

41. Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). Free radical research. 1999 Jan 1;31(4):261-72.

42. Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon MH, editors. Antioxidants in food: practical applications. CRC press; 2001 Apr 12.