โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย

(Tyrosinase inhibitor and free radical scavenging activities of marine invertebrate crude extracts from Eastern Gulf of Thailand)

โดย

1.นสภ. กันต์ฤทัย เจริญวรวัฒน์ รหัส 56210002
2.นสภ. ชินภัทร์ วิรัตน์ชยางกูร รหัส 57210023

โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
เภสัชศาสตรบัณฑิต ปีการศึกษา 2561
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย

(Tyrosinase inhibitor and free radical scavenging activities of marine invertebrate crude extracts from Eastern Gulf of Thailand)

โดย

1.นสภ. กันต์ฤทัย เจริญวรวัฒน์ รหัส 56210002
2.นสภ. ชินภัทร์ วิรัตน์ชยางกูร รหัส 57210023

โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
เภสัชศาสตรบัณฑิต ปีการศึกษา 2561
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

โครงงานวิจัยเรื่องฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย จัดทำขึ้นเพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทยจำนวน 15 ตัวอย่างและรวมถึงการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นด้วยวิธี TLC และน้ำยาทดสอบที่มีความจำเพาะกับกลุ่มสาร alkaloid และ phenolic ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและยับยั้งอนุมูลอิสระในอนาคต โดยผลการวิจัยและข้อเสนอแนะที่เกิดขึ้น จะเป็นประโยชน์ต่อผู้เกี่ยวข้องไม่มากก็น้อยในการนำผลการวิจัยไปใช้หรือประยุกต์ใช้เพื่อให้เกิดความเหมาะสม

นสภ.กันต์ฤทัย เจริญวรวัฒน์
นสภ.ชินภัทร์ วิรัตน์ชยางกูร
ผู้จัดทำ

โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2561

เรื่อง ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบ
จากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย

ผู้จัดทำโครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. นสภ. กันต์ฤทัย เจริญวรวัฒน์ รหัส 56210002
2. นสภ. ชินภัทร์ วิรัตน์ชยางกูร รหัส 57210023

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. ภญ.อ.ดร.นภัสสร ฉันทธำรงศิริ
2. ภญ.อ.ดร.เนตรชนก เจียงสืบชาติวีระ

บทคัดย่อ

จากการค้นหาฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ tyrosinase จากสิ่งมีชีวิตไม่มีกระดูกสันในทะเลจำนวน 15 ตัวอย่าง พบว่าสารสกัดหยาบจำนวน 2 ตัวอย่างได้แก่ Nc.16-008-01 และ Nc.16-030-01 มีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ดี โดยมีค่า %inhibition เท่ากับ 84.79% และ 52.10% และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 28.79 μg/mL และ 184.60 μg/mL ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน vitamin c โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 88.31 μg/mL จากการค้นหาฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ tyrosinase ของสารสกัดพบว่า Nc.16-008-01 และ Nc.16-030-01 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ 6.41% และ 12.02% ตามลำดับ คิดเป็น mg/ml สมมูลต่อ kojic acid เท่ากับ 0.11 mg/ml และ 0.02 mg/ml จากการตรวจสอบกลุ่มสารด้วยน้ำยาทดสอบจำเพาะพบว่าสารสกัดดังกล่าวมีสารในกลุ่ม phenolic compound รวมถึงสารในกลุ่ม alkaloid เป็นองค์ประกอบ และจากผล TLC chromatogram (SiO_2, 5% MeOH in CH_2Cl_2) พบองค์ประกอบทางเคมีอย่างน้อย 7 ชนิดเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งมีความสนใจในการนำไปแยกสารบริสุทธิ์ต่อไปได้

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก…………………………………………

Senior Project Academic Year 2018

: Tyrosinase inhibitor and antioxidant of marine invertebrates crude extracts from Eastern Gulf of Thailand

By

1. Miss.Kanruthai Charoenworawat ID 56210002
2. Mr.Chinapat Viratcahyangkul ID 57210023

Advisor:

1. Dr.Naphatson Chanthathamrongsiri
2. Dr.Nadechanok Jiangseubchatveera

ABSTRACT

The result from bioactivity screening of methanol-crude extracts of 15 marine invertebrates from Eastern Gulf of Thailand indicate two crude-extracts, Nc.16-008-01 and Nc.16-030-01 as good DPPH scavenging activity with %inhibition 84.79% and 52.10% and IC_{50} 28.79 μg/mL and 184.60 μg/mL respectively. The result of DPPH scavenging activity of the extracts are compare with vitamin c which show IC_{50} 88.31 μg/mL. Both extract at 250 μg/mL also show %inhibition of tyrosinase inhibitor with 6.41% and 12.02% which equivalent to kojic acid 0.11 mg/ml and 0.02 mg/ml respectively. The result from phytochemical screening of Nc.16-008-01 and Nc.16-030-01 indicate phenolic compound and alkaloid are found in both extracts. From TLC chromatogram show at least 7 major components the potential of Nc.16-008-01 and Nc.16-030-01 for future separation and purification pure compound.

Major Advisor...

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก ภญ.อ.ดร.นภัสสร ฉันทธำรงศิริ และ ภญ.อ.ดร.เนตรชนก เจียงสืบชาติวีระ อาจารย์ที่ปรึกษาที่ช่วยแนะนำแนวทางในการทำการทดลองที่ถูกต้อง ให้คำปรึกษาและช่วยเหลือในทุกปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างการทำการทดลอง ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องที่เกิดขึ้นในการทำโครงงานด้วยความละเอียดถี่ถ้วน และเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมา นอกจากนี้ต้องขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.บุญดิศย์ วงศ์ศักดิ์ ในการให้ความอนุเคราะห์สารเคมีสำหรับทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ และขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ในคณะเภสัชศาสตร์ทุกท่านที่ให้วิชาความรู้แล้วนำมาต่อยอดเกิดโครงงานวิจัยฉบับนี้ อีกทั้งยังคอยยื่นมือช่วยเหลือเมื่อเกิดปัญหาระหว่างการทำการทดลอง ข้าพเจ้ารู้สึกทราบซึ้งเป็นอย่างยิ่งจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

นสภ.กันต์ฤทัย เจริญวรวัฒน์
นสภ.ชินภัทร์ วิรัตน์ชยางกูร
วันที่ 26 พฤศจิกายน พ.ศ.2561

สารบัญ

หน้า

คำนำ .... ค

บทคัดย่อภาษาไทย .... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .... จ

กิตติกรรมประกาศ .... ฉ

สารบัญ .... ช

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา 1

1.2. วัตถุประสงค์ 2

1.3. สมมติฐาน 2

1.4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

1.5. กรอบแนวคิด 3

1.6. นิยามศัพท์ 3

บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรม 5

2.1. ข้อมูลทั่วไปของพืชและสิ่งมีชีวิตในทะเลที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสและฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ 5

2.2. ข้อมูลทั่วไปของเครื่องสำอางที่มีส่วนประกอบของฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสและฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ 5

2.3. สารยับยั้งอนุมูลอิสระ 6

2.4. ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส 6

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

2.5. สารพฤกษเคมีเบื้องต้น.......7

บทที่ 3 วิธีการทดลอง.......11

3.1. เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี.......11

3.2. วิธีดำเนินงานวิจัย.......12

บทที่ 4 ผลการทดลอง.......16

4.1. การสกัดสารจากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง.......16

4.2. การกำจัดเกลือ.......16

4.3. ผลการทดสอบการแยกสารด้วยวิธี TLC.......18

4.4. การทดสอบกลุ่มสารด้วย specific reagent.......22

4.5. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activity evaluation).......23

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.......29

เอกสารอ้างอิง.......27

ภาคผนวก.......34

รายงานการเงิน.......35

บทที่ 1

บทนำ

1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

จากการศึกษา พบว่าปัจจุบัน 15% ของประชากรโลกนิยมมีผิวขาว โดยองค์กร Global Industry Analysts (GIA) ได้คาดการณ์ไว้ว่า ตลาดของผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติทำให้ผิวขาวจะเติบโตได้ถึง 23,000 ล้านดอลล่าร์สหรัฐในปี 2020 และตลาดที่เติบโตมากที่สุดคือ ในทวีปเอเชีย ซึ่งพบว่าในปี 2010 มีการซื้อผลิตภัณฑ์บำรุงผิวและเครื่องสำอางถึง 13,000 ล้านดอลล่าร์สหรัฐ (1) จากการเจริญเติบโตของตลาดการค้าผลิตภัณฑ์สำหรับผิวขาวจึงทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ช่วยให้ผิวขาวกระจ่างใสเป็นที่ต้องการมากในตลาด อีกทั้งคนไทยเริ่มมีแนวโน้มในการใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมจากสารสกัดทางธรรมชาติในการดูแลสุขภาพมากขึ้น ซึ่งในปัจจุบันมีการค้นคว้าพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและยับยั้งอนุมูลอิสระอย่างมากมาย ตัวอย่างเช่น ผลิตภัณฑ์จากมะขามป้อมที่ศึกษาพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยมีค่า IC_{50} อยู่ที่ 0.151±0.002 mg/ml และพบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.07 μg/ml (2), สารสกัดจากเหง้าว่านสาวหลงที่พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 0.24 ถึง 1.89 mg/ml และยังพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระโดยค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 0.47 ถึง 1.33 mg/mL (3), สารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 4 ชนิด คือ สายพันธุ์เอียสกุล (*Dendrobium* spp. 'Sonia-Earsakul'), สายพันธุ์เจสซิก้า (*Dendrobium* spp. 'Jessica'), สายพันธุ์บูรณะเจต (*Dendrobium*-spp. 'Burana Jade') และสายพันธุ์ขาว 5N (*Dendrobium* spp. 'White Fairy') พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ความเข้มข้น 1.00 mg/mL สายพันธุ์ขาว 5N มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุดโดยแสดงค่า %inhibition เท่ากับ (90.99%) อีกทั้งยังพบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระโดยที่ความเข้มข้น 250 μg/mL แสดงค่า %inhibition เท่ากับ 27.28% (4) นอกจากผลิตภัณฑ์จากพืชบนบกแล้วผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเลก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งของแหล่งที่มาของสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจตัวอย่างเช่น ในสาหร่าย *Sargassum polycystum* เป็นสาหร่ายสีน้ำตาลพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ (5), สาหร่าย *Odonthalia corymbifera* พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ (6) อีกทั้งในสาหร่ายสีเขียว *Ulva rigida* หรือสาหร่ายผักกาดทะเลพบว่าในความเข้มข้น 1 μg/ml มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ

เทียบเท่า gallic acid ที่ 18 μg/ml (7) ทำให้ผู้ทำการวิจัยเล็งเห็นถึงศักยภาพของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและยับยั้งอนุมูลอิสระความต้องการของผู้บริโภค จึงทำการศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดทางธรรมชาติจากตัวอย่างสัตว์ทะเลที่ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเลภาคตะวันออกเพื่อหาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ อีกทั้งยังทำการทดสอบกลุ่มสารเคมีเบื้องต้น ได้แก่ สารในกลุ่มฟีนอลิก (phenolic compounds) และแอลคาลอยด์ (alkaloids) เพื่อเป็นประโยชน์ในการศึกษาฤทธิ์และสามารถนำไปต่อยอดพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ส่งเสริมความงามต่อไปในอนาคต

1.2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging assay ของสารสกัดหยาบจากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทยจำนวน 15 ตัวอย่าง
2. เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเลภาคตะวันออกที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและยับยั้งอนุมูลอิสระ

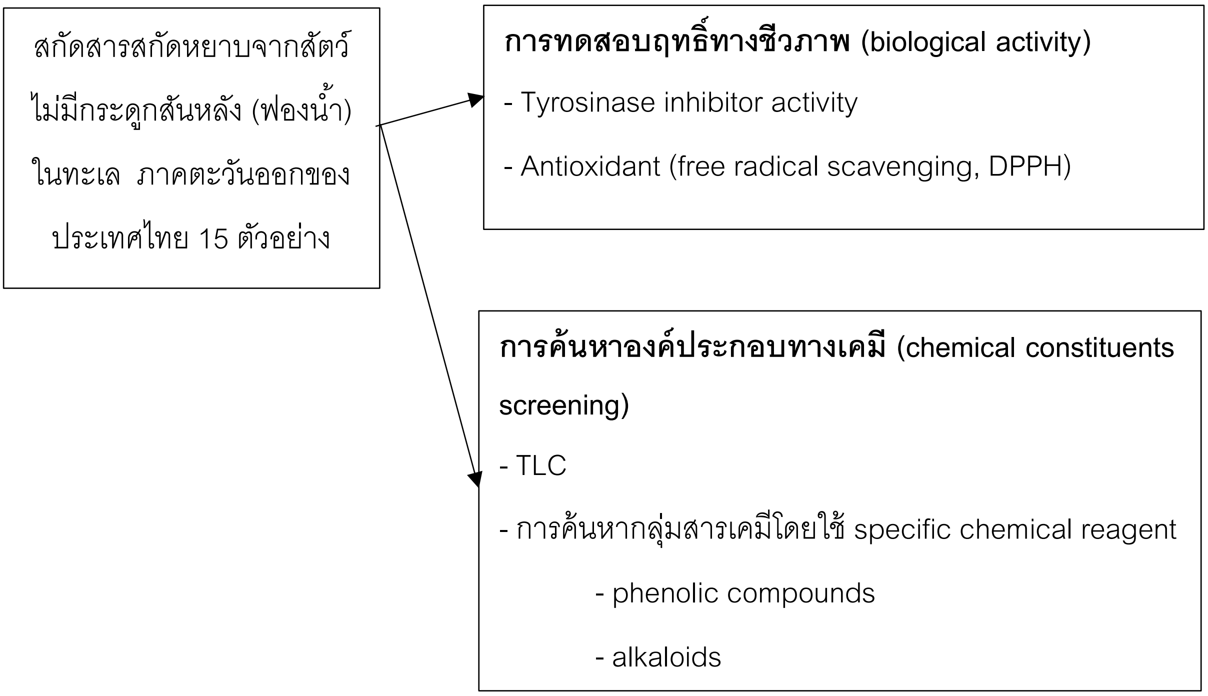
1.3. สมมติฐาน

1. พบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและยับยั้งอนุมูลอิสระหรืออย่างใดอย่างหนึ่งจากสารสกัดหยาบสิ่งมีชีวิตไม่มีกระดูกสันหลังจากทะเลจำนวน 2 ตัวอย่าง
2. พบกลุ่มสารเคมีในกลุ่มฟีนอลิกและแอลคาลอยด์เป็นองค์ประกอบในสารสกัดหยาบ

1.4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อใช้ประโยชน์จากทรัพยากรทางทะเลในภาคตะวันออกไปใช้ในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและยับยั้งอนุมูลอิสระ
2. พบแหล่งวัตถุดิบใหม่ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและยับยั้งอนุมูลอิสระผ่านกลไกการยับยั้งอนุมูลอิสระ (free radical scavenging)

1.5. กรอบแนวคิด



สกัดสารสกัดหยาบจากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (ฟองน้ำ) ในทะเล ภาคตะวันออกของประเทศไทย 15 ตัวอย่าง

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activity)

- Tyrosinase inhibitor activity
- Antioxidant (free radical scavenging, DPPH)

การค้นหาองค์ประกอบทางเคมี (chemical constituents screening)

- TLC
- การค้นหากลุ่มสารเคมีโดยใช้ specific chemical reagent
    - phenolic compounds
    - alkaloids

1.6. นิยามศัพท์

1.6.1. ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ (free radical scavenging)

หมายถึง ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (free radicals) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลต่างๆในร่างกายทำให้เซลล์ในร่างกายเกิดการทำลายและเกิดโรคต่างๆตามมา อนุมูลอิสระสามารถเกิดขึ้นได้เองหรือถูกกระตุ้นให้เกิดโดยปัจจัยภายนอก เช่น ความเครียด อาหารและมลพิษต่างๆ ซึ่งพังระบบ antioxidant ในร่างกายเสียสมดุลจะทำให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพได้ (8)

1.6.2. ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase inhibitor)

หมายถึง ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในการสร้างเม็ดสีเมลานินและทำให้ผิวมีสีเข้มขึ้น tyrosinase เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ ในมนุษย์เอนไซม์นี้จะเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเม็ดสีทั้งสีน้ำตาล, ดำ, เหลือง และขาว ในบริเวณผิวหนังหรือเส้นผม (1)

1.6.3. IC_{50} (half maximum inhibitory concentration)

หมายถึง ความเข้มข้นของสารที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้ 50%

1.6.4. สารกลุ่มฟีนอลิก (phenolic compound)

หมายถึง สารที่มีโครงสร้างทางเคมีที่มีวงอะโรมาติกต่อกับหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) หรือหมู่ phenyl หลายโมเลกุลอยู่ในโครงสร้างทางเคมี มีโครงสร้างที่หลากหลายทั้งเป็นแบบอย่างง่ายเช่น phenol ไปจนถึงโครงสร้างขนาดใหญ่และซับซ้อนเช่น tannin สารในกลุ่มนี้มักมีฤทธิ์ในการเป็นสารยับยั้งอนุมูลอิสระ (antioxidant) โดยมีกลไกเกี่ยวกับการทำลายอนุมูลอิสระ (free radical scavenging) และสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่พบได้ตามธรรมชาติ เช่นใน ผัก ผลไม้ เครื่องเทศ สมุนไพร ถั่วเมล็ดแห้ง เมล็ดธัญพืช เป็นต้น (9)

1.6.5. สารกลุ่มแอลคาลอยด์ (alkaloids)

หมายถึง สารทุติยภูมิที่มี N เป็นองค์ประกอบในโมเลกุล มีฤทธิ์เป็นด่าง มักพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลากหลายเช่น พืช แบคทีเรีย รา และสัตว์ เป็นสารที่ถูกนำมาใช้เป็นยารักษาโรคอย่างกว้างขวาง เช่น ยาระงับปวดในกลุ่ม morphine, ยาลดความดันกลุ่ม reserpine เป็นต้น ซึ่งสารกลุ่มอัลคาลอยด์บางชนิดเช่น พิเพอรีน (piperine) จากพริกไทย จะพบว่ามีฤทธิ์ที่เป็นประโยชน์หลากหลายเช่น ฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ (anti-inflammation), ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง (9, 10)

บทที่ 2

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1. ข้อมูลทั่วไปของพืชและสิ่งมีชีวิตในทะเลที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสและฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสและฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในทะเลพบว่ามีจำนวนหลายชนิดได้แก่ *Sargassum polycystum* เป็นสาหร่ายสีน้ำตาล ซึ่งมีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในตัวทำละลายต่างๆ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Kojic acid แต่พบว่าสารสกัดจาก *S. polycystum* สาหร่ายมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น (5) ในส่วนของฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระมีการศึกษาในสาหร่ายสีเขียว *Ulva rigida* หรือสาหร่ายผักกาดทะเลและในสาหร่ายเซลล์เดียว ได้แก่ *Phaeodactylum tricornutum, Nannochloropsis oculata,* และ *Porphyridium cruentum* พบว่าสารสกัดทุกตัวอย่างมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ (7, 13)

2.2. ข้อมูลทั่วไปของเครื่องสำอางที่มีส่วนประกอบของฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสและฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ

จากการศึกษา พบว่า 15% ของประชากรโลกนิยมมีผิวขาวเพิ่มมากขึ้น โดยองค์กร Global industry analysts (GIA) ได้ทำนายไว้ว่า ตลาดของผลิตภัณฑ์หรือเครื่องสำอางที่มีคุณสมบัติทำให้ผิวขาวจะเติบโตได้ถึง 23,000 ล้านดอลล่าร์สหรัฐในปี 2020 และตลาดที่เติบโตมากที่สุดก็คือเอเชีย พบว่าในปี 2010 มีการซื้อผลิตภัณฑ์บำรุงผิวและเครื่องสำอางถึง 13,000 ล้านดอลล่าร์สหรัฐ ซึ่งในประเทศอินเดียเพียงประเทศเดียวก็มีการซื้อถึง 432 ล้านดอลล่าร์สหรัฐ โดยมีผู้บริโภคผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางเพิ่มขึ้นถึง 18% (14)

2.3. สารยับยั้งอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (free radicals) เป็นโมเลกุลที่ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลต่างๆ ภายในร่างกายซึ่งจะเกิดได้เองภายในร่างกายแต่ปัจจัยภายนอกก็สามารถกระตุ้นให้เกิดอนุมูล-อิสระได้เช่น ความเครียด มลพิษต่างๆ ซึ่งอาจก่อให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพได้เช่น เกิดรอยเหี่ยวย่นบนใบหน้า และผิวพรรณ หรือเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคเรื้อรังต่างๆ เช่น มะเร็ง เป็นต้น อีกทั้งในปัจจุบันผู้คนได้เริ่มความนิยมในการใช้ผลิตภัณฑ์สมุนไพรในการรักษามากขึ้นจึงมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระจากพืชหรือสิ่งมีชีวิตขึ้นมามากมาย ซึ่งการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระในปัจจุบันมีหลากหลายวิธีแต่วิธีที่นิยมที่สุดก็คือ DPPH radical scavenging assay โดย DPPH เป็น free radical สามารถรับอิเล็กตรอนเพื่อเปลี่ยนเป็นโมเลกุลที่เสถียรได้ ในการทดสอบจะผสมกับสารตัวอย่างแล้วทำการตรวจสอบโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ประมาณ 515-517 nm (8)

2.4. ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

เอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ ซึ่งในมนุษย์เอนไซม์นี้จะเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเม็ดสีทั้งสีน้ำตาล, ดำ, เหลือง และขาว ในบริเวณผิวหนังหรือเส้นผม โดยปกติแล้วผิวหนังมนุษย์จะมีกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินเกิดขึ้นที่ชั้นหนังกำพร้า(epidermis) แล้วจะเกิดการสังเคราะห์ในเมลาโนไซต์ที่จะใช้เอนไซม์ไทโรซิเนสเข้ามาทำให้เกิดเมลานิน ซึ่งเมลานินที่ถูกสร้างจะแบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ ยูเมลานิน (Eumelanin) ที่จะให้สีน้ำตาลหรือดำ และฟีโอเมลานิน (Pheomelanin) ทำให้เกิดผิวสีเหลืองหรือขาว โดยเมลานินนี้จะมีหน้าที่ในการป้องกันรังสียูวี ดังนั้นเมื่อมีสีผิวที่เข้มมากก็จะป้องกันรังสีได้มาก แต่ในการศึกษานี้จะต้องการฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสซึ่งทำให้ผิวขาว เมื่อเกิดการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสการดูดซับรังสียูวีก็จะน้อยลงอาจทำให้เกิดโรคผิวหนังต่างๆ เช่น UV injury, กระ (freckles), กระแดด (solar lentigo) และทำให้เกิดมะเร็งผิวหนังขึ้นได้ (14, 15)

2.5. สารพฤกษเคมีเบื้องต้น

สารพฤกษเคมีที่พบในพืชประกอบด้วยสารปฐมภูมิ (primary constituents) ประกอบด้วย แป้ง โปรตีน ไขมัน เป็นต้นและสารทุติยภูมิ (second constituents) เป็นสารที่มีฤทธิ์ทางเคมี ประกอบด้วย ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) แทนนิน (tannin) แอลคาลอยด์ (alkaloid) เทอร์ปีนอยด์ (terpinoid) สเตอรอยด์ (steroid) ไกลโคไซด์ (glycoside) และซาโปนิน (saponin) (16, 17)

2.5.1. แอลคาลอยด์ (alkaloids) เป็นสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิ มีฤทธิ์เป็นด่างเนื่องจากมีส่วนประกอบหลักคือไนโตรเจน มักพบในแบคทีเรีย ราและสัตว์ อัลคาลอยด์มีคุณสมบัติละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์แต่ไม่ละลายในน้ำเป็นสารที่ถูกนำมาใช้ในทางเภสัชวิทยาอย่างกว้างขวางโดยมีการนำมาผลิตเป็นยาหลากหลายชนิด เช่น morphine เป็นยาระงับปวด, quinidine เป็นยารักษาอาการหัวใจเต้นผิดจังหวะ, reserpine เป็นยาลดความดันโลหิต, colchicine เป็นยารักษาโรคเกาต์, quinine เป็นยารักษามาลาเรีย, tubocurarine เป็นยาคลายกล้ามเนื้อ เป็นต้น (18) แอลคาลอยด์สามารถจำแนกได้หลายชนิดแบ่งตามชนิดของสารตั้งต้นในชีวะสังเคราะห์ได้แก่ อัลคาลอยด์แท้จริง (true alkaloids), โพรโทอัลคาลอยด์ (protoalkaloids) และอัลคาลอยด์เทียม (pseudoalkaloids) ซึ่งสารกลุ่มอัลคาลอยด์บางชนิดเช่น พิเพอรีน (piperine) จะพบว่ามีฤทธิ์ที่เป็นประโยชน์หลายชนิดมากเช่น ฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ (anti-inflammation), ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ (antioxidant) และฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง (cytotoxicity)

2.5.2. สารกลุ่มฟีนอลิก (phenolic compound) มีโครงสร้างประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติกที่มีหมู่ hydroxyl อย่างน้อยหนึ่งหมู่ซึ่งอาจจะอยู่ในรูปกลุ่ม free hydroxyl group (–OH) อิสระ หรือจับอยู่กับสารอื่นในรูปของอีเทอร์ หรือไกลโคไซด์ก็ได้ สารประกอบฟีนอลที่พบในธรรมชาติมีมากมายหลายชนิด และมีลักษณะสูตรโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน ตั้งแต่กลุ่มที่มีโครงสร้างอย่างง่าย เช่น กรดฟีนอลิก (phenolic acids) ไปจนถึงกลุ่มที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ เช่น ลิกนิน (lignin) กลุ่มใหญ่ที่สุดที่พบคือ สารประกอบพวกฟลาโวนอยด์ (flavonoid) สารประกอบฟีนอลที่พบในพืชหลายชนิด เช่น ผัก, ผลไม้, เครื่องเทศ, สมุนไพร, ถั่วเมล็ดแห้งและเมล็ดธัญพืช สารประกอบฟีนอลที่พบในพืชมักจะรวมอยู่ในโมเลกุลของน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ น้ำตาลชนิดที่พบมากที่สุดในโมเลกุลของสารประกอบฟีนอล ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส และยังพบว่ามีการรวมตัวกันระหว่างสารประกอบฟีนอลด้วยกันเอง หรือจะเป็น

สารประกอบฟีนอลกับสารสารประกอบอื่นๆ เช่น กรดอินทรีย์ รวมอยู่ในโมเลกุลของโปรตีน แอลคาลอยด์ และเทอร์พีนอยด์ เป็นต้น (19) ซึ่งสารกลุ่มนี้มีการนำมาใช้ประโยชน์มากมาย เนื่องจากมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมายเช่นฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระและฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (20) เป็นต้น

2.5.3 ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เป็นสารประกอบโพลีฟีนอล (polyphenolic compound) ฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างหลักฟลาโวนตรงนิวเคลียส มีสูตรโมเลกุล คือ C_{15} (C_6-C_3-C_6) สารฟลาโวนอยด์ที่พบในธรรมชาติมีมากกว่า 9000 ชนิด พบได้มากในผักและผลไม้ โดยมักพบเป็นเม็ดสี (Pigment) ที่ให้สีสันของดอกไม้ ผลไม้ และใบไม้หลายเฉดสี (21) สามารถแบ่งฟลาโวนอยด์ออกเป็น 5 กลุ่มย่อยตามโครงสร้างโมเลกุลได้แก่ ฟลาโวน (flavones), ฟลาโวนอล (flavonols), ฟลาวาโนน (flavanones), ฟลาวาโนนอล (flavanonols) และไอโซฟลาโวน (isoflavones) ซึ่งแต่ละชนิดก็จะสามารถพบสารประกอบที่แตกต่างกันและในพืชที่ต่างชนิดกัน สารในกลุ่มนี้มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น โรคหัวใจและระบบไหลเวียนโลหิต ป้องกันการเกิดโรคเบาหวาน ยับยั้งเชื้อไวรัสและยับยั้งสารอนุมูลอิสระ (22)

2.5.4 แทนนิน (Tannins) เป็นสารประกอบฟีนอลิกประกอบไปด้วยเอสเทอร์ที่เกิดจากกรดแกลลิก (Gallic acid) หรือสารประกอบพอลิไฮดริก (polyhydric compound) จับกับน้ำตาลกลูโคส หรือเกิดจากสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) จับกับสารคาร์โบไฮเดรตหรือโปรตีน ได้แก่ กรดแทนนิก (tannic acid) และ ฮามาเมลิแทนนิน (hamamelitannin) (21) โดยแทนนินแบ่งเป็น 2 ชนิดใหญ่ๆ ได้แก่ hydrolyzable tannin และ condensed tannins (23) สารในกลุ่มนี้มีรสฝาด มีฤทธิ์เป็นกรดอ่อนและสามารถตกตะกอนโปรตีนทำให้หนังสัตว์ไม่เน่าจึงนิยมนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง อีกทั้งยังมีฤทธิ์ฝาดสมานจึงนำมาใช้เป็นยาแก้ท้องเสียและยังพบว่าแทนนินบางชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเช่น ทีโอแกลลิน (theogallin), กรดแกลลิก (gallic acid) และกรดแอลลาจิก (ellagic acid) เป็นต้น (24)

2.5.5 เทอร์พีน (terpenes) และเทอร์พีนอยด์ (terpenoid) เป็นสารประกอบในกลุ่มลิพิด (lipid) ที่พบมากในน้ำมันหอมระเหย (essential oil) ที่ได้จากพืช ในโครงสร้างจะประกอบไปด้วยหน่วยไอโซพรีน (isoprene units) แต่มีการแบ่งประเภทกันด้วยธาตุที่อยู่ในโครงสร้างโดย terpenes จะประกอบไปด้วยธาตุคาร์บอนและไฮโดรเจน ส่วน terpenoids จะมีธาตุออกซิเจนเป็น

องค์ประกอบอยู่ด้วย (25) สารประกอบประเภทนี้พบกระจายอยู่ทั่วไปในสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะพืชชั้นสูงและยังพบในเชื้อรา แมลง จุลินทรีย์ และสิ่งมีชีวิตในทะเลเช่น sesquiterpenes พบในฮอร์โมนของแมลง, diterpenes พบในสัตว์ทะเลจากพวกฟองน้ำ, triterpenes มักพบในพืชในรูปของ cardiac glycosides, saponin และ phytosterol ตัวอย่างเช่น lupeol และ α-amyrin ซึ่งเป็นสารประกอบประเภท triterpenoids ที่พบในพืชทุกชนิด

2.5.6 สเตียรอยด์ (steroid) เป็นสารที่มีโครงสร้างพื้นฐานเป็น cyclopentano perhydrophenanthrene nucleus เป็นสารที่มีสูตรโครงสร้างเช่นเดียวกับฮอร์โมน และยาต้านการอักเสบ ในธรรมชาติส่วนใหญ่มักพบสเตียรอยด์รูปของไกลโคไซด์จึงมักนำมาใช้ประโยชน์ในการเป็นยายับยั้งการอักเสบ, ยารักษาโรคหัวใจ, เป็นยาลดความดันโลหิต, ยาขับปัสสาวะ, สังเคราะห์เป็นฮอร์โมนเพศ และยาคุมกำเนิดหลายชนิด เช่น hecogenin ที่ได้จาก *Agave sisalana* ใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ corticosteroids และสาร diosgenin ที่ได้จาก *Dioscorea spp*. เป็นสารตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์ยาคุมกำเนิดและฮอร์โมนเพศ เป็นต้น (26)

2.5.7 ไกลโคไซด์ (glycoside) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่สามารถพบได้จากพืชชั้นสูง มีโครงสร้างประกอบไปด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นน้ำตาลเรียกว่า ไกลโคน (glycone) จับกับส่วนที่ไม่ใช่น้ำตาลเรียกว่า อะไกลโคน (aglycone) หรือจีนิน (genin) ไกลโคไซด์ส่วนใหญ่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ สามารถนำมาใช้เป็นยารักษาโรคได้อย่างกว้างขวาง มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี การแบ่งประเภทของไกลโคไซด์จะจำแนกตามโครงสร้างของอะไกลโคนเช่น คาร์ดิแอคไกลโคไซด์ (cardiac glycosides), แอนทราควิโนนไกลโคไซด์ (anthraquinone glycosides), ซาโปนินไกลโคไซด์ (saponin glycosides), ไซยาโนเจนนิติกไกลโคไซด์ (cyanogenatic glycosides), ไอโซไทโอไซยาเนทไกลโคไซด์ (isothiocyanate glycosides), ฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ (favonol glycosides), และแอลกอฮอลิคไกลโคไซด์ (alcoholic glycosides), ฟีนอลิกไกลโคไซด์ (phenolic glycosides) เป็นต้น (17, 27)

2.5.8 ซาโปนิน (saponin) เป็นสารประกอบไกลโคไซด์ (glycoside compound) ที่มีส่วนอะไกลโคนเป็นสารจำพวกสเตอรอยด์หรือไตรเทอร์พีนอยด์ ส่วนนี้จะจับกับน้ำตาลหรืออนุพันธ์ของน้ำตาลที่ตำแหน่ง C_3 ได้เป็น O-glycoside หรือซาโปนินไกลโคไซด์ (21) มีคุณสมบัติคล้ายกับ

สบู่ นำมาใช้ประโยชน์ในการเป็นสารชำระล้างแทนสบู่, สามารถพบได้ในพืชหลายชนิดเช่น มะคำดีควาย หางไหลแดง พืชตระกูลชา เป็นต้น

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1) เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งสุญญากาศ (freeze-dry)
2) เครื่องระเหยแบบลดความดัน (rotary evaporator)
3) เครื่อง micropipette reader
4) UV cabinet พร้อม Lamp 254 nm และ 365 nm
5) เครื่องชั่ง
6) ตู้เย็นอุณหภูมิ -20 ℃
7) กรรไกรตัดตัวอย่าง
8) กระบอกตวง
9) Vial
10) สำลี
11) หลอดหยด และ จุกยาง
12) กรวยแยก
13) 96 well-plate
14) Micropipette และ tip
15) หลอดแคปปิลลารี (capillary tube)
16) TLC plate (SiO_2, GF254)
17) กระดาษกรอง
18) บีกเกอร์
19) กระจกนาฬิกา
20) ขวดแก้วปากกว้างพร้อมฝาปิด
21) Stirring rod

3.1.2 สารเคมี

1) Methanol AR grade และ HPLC grad

2) Ethyl acetate

3) Ascorbic acid

4) Kojic acid

5) DPPH (2,2-diphenyl-l-picrylhydrazyl)

6) Tyrosinase enzyme

7) L-DOPA

8) Phosphate buffer pH 7

9) Dichloromethane

10) Sulfuric acid

11) Glacial acetic acid

12) Potassium iodide

13) Bismuth nitrate

14) *p*-Anisaldehyde

15) น้ำยาทดสอบ Ferric chloride

3.2 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.2.1. เตรียมตัวอย่างของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังจากทะเลภาคตะวันออก 15 ตัวอย่าง

การเตรียมตัวอย่างของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังจากทะเลภาคตะวันออก (ฟองน้ำ) มาลดขนาดและชั่งน้ำหนักที่ได้ แล้วนำไปใส่ตู้เย็น -20 ℃ เพื่อให้ตัวอย่างเป็นน้ำแข็ง จากนั้นนำเข้าเครื่อง freeze-dry เพื่อทำให้แห้งโดยไม่ใช้ความร้อนเมื่อตัวอย่างแห้งนำมาชั่งน้ำหนักตัวอย่างแห้งที่ได้

3.2.2. การสกัดด้วยวิธีการหมัก (maceration)

การทดลองในครั้งนี้ทำการสกัดด้วยวิธีการหมัก (maceration) โดยการนำตัวอย่างแห้งจาก freeze-dry มาเติม methanol 100 mL ทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง แล้วกรองเก็บสารละลายผ่านลำลี ทำการสกัดซ้ำ 5 ครั้ง หรือจนตัวอย่างซีดจางไม่มีสีออกมาในตัวทำละลาย จากนั้นนำสารละลายที่ได้จากการกรองไประเหยตัวทำละลายออกแบบลดความดันด้วยเครื่อง rotary evaporator แล้วชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้และบันทึก

3.2.3. การกำจัดเกลือ

ขั้นตอนการกำจัดเกลือออกจากสารสกัดหยาบ ทำได้โดยการนำสารสกัดหยาบมากระจายตัวในน้ำ 10 mL ใส่ลงในกรวยแยก จากนั้นเติม ethyl acetate แล้วทำการ partition ตั้งทิ้งไว้จนสารละลายแยกชั้นแล้วเก็บสารละลายชั้น ethyl acetate แล้วนำตัวอย่างไปประเหยตัวทำละลายออกด้วยแบบลดความดันด้วยเครื่อง rotary evaporator และบันทึกน้ำหนัก

3.2.4. การทดสอบกลุ่มสารทางเคมีเบื้องต้นด้วยเทคนิค TLC

1) การเตรียมน้ำยา Anisaldehyde (H_2SO_4 spraying reagent)

วิธีเตรียมโดย pipette Anisaldehyde (H_2SO_4 spraying reagent) 0.5 mL เติม glacial acetic acid 5 mL แล้วเติม methanol (AR grade) 43 mL ผสมให้เข้ากันก่อนเติม H_2SO_4 เข้มข้น 2.5 mL ผสมให้เข้ากัน จัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ก่อนนำมาทดสอบ

2) การเตรียม mobile phase

เตรียม mobile phase โดยผสมตัวทำละลายระหว่าง CH_2Cl_2 : MeOH ในอัตราส่วน 9 : 1 แล้วนำมาใส่ใน TLC tank จากนั้นนำแผ่นกระดาษกรองมาวางไว้ด้านข้างในของ tank เพื่อให้ TLC tank อิ่มตัวด้วยไอของ mobile phase

3) วิธีการทดสอบการแยกกลุ่มสารด้วยเทคนิค TLC

นำสารสกัดหยาบละลายใน methanol ความเข้มข้น 1 mg/mL แล้วนำมา Spot ลงบน TLC plate จากนั้นรอจนแห้ง จากนั้นนำแผ่น TLC ที่ผ่านการ spot มาวางลงใน TLC tank ปิดฝา แล้วรอจนกระทั่งสารละลายเคลื่อนที่ถึงระดับด้านบนที่กำหนดไว้ของ TLC plate นำมาพักรอให้แห้ง แล้วนำหาตำแหน่งของสารบน TLC plate ด้วยการสังเกตด้วยตาเปล่า ส่องภายใต้แสง UV ความยาวคลื่น 254 และ 365 nm และทดสอบด้วยน้ำยา *p*-Anisaldehyde แล้วนำไปการคำนวณหาค่า R_f ของ spot ต่างๆ บน chromatogram โดยใช้สมการ

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

3.2.5. การน้ำยาทดสอบจำเพาะ

1) การทดสอบฟีนอลิก (phenolic compound) โดยใช้ ferric chloride test

นำสารสกัดหยาบ 1 mg/mL มาทดสอบด้วย 1% ferric chloride solution 2-3 หยด สังเกตสีที่เปลี่ยนแปลงเทียบกับ control โดยหากเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้มหรือน้ำเงินดำแสดงว่าพบส่วนประกอบของ phenolic compound

2) การทดสอบแอลคาลอยด์ (alkaloids) โดยใช้ Dragendorff's reagent

(1) การเตรียมสารทดสอบ Dragendorff's reagent

ชั่ง bismuth nitrate 0.5 g ใส่บีกเกอร์จากนั้นเติมน้ำกลั่น 10 mL แล้วผสมให้เข้ากัน (สารละลายจะมีลักษณะเป็นสารแขวนตะกอน) เติม concentrated hydrochloric acid 10 mL แล้วชั่ง potassium iodide 4 g ใส่บีกเกอร์อีกอันหนึ่ง จากนั้นเติมน้ำกลั่นเล็กน้อยผสมกันจนเป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน ผสมทั้ง 2 บีกเกอร์เข้าด้วยกัน จะได้สารทดสอบ Dragendorff's reagent ที่มีส้มเข้ม

(2) วิธีทดสอบด้วย Dragendorff's test

เตรียมตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้น 1 mg/mL นำมาทดสอบกับ Dragendorff's reagent ด้วยการหยด 2-3 หยด สังเกตความเปลี่ยนแปลงหากพบตะกอนสีส้มแดงแสดงว่าพบสารกลุ่มแอลคาลอยด์

3.2.6 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activity evaluation)

1) การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดตัวอย่าง

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสทำโดยการเตรียมสารสกัดตัวอย่างความเข้มข้น 1 mg/mL ใน methanol (HPLC grade) นำสารสกัดตัวอย่าง 20 µL ผสมกับ 20mM phosphate buffer pH 6.8 100 µL และ tyrosinase (500 U/mL) 40 µL ใน 96-well plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ℃ นาน 10 นาที แล้วมาเติม substrate 0.85 mM L-DOPA 40 µL แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ℃ นาน 20 นาทีอีกครั้งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 nm เปรียบเทียบกับ Kojic acid เป็นสารมาตรฐาน คำนวณหา %inhibition ดังสมการด้านล่าง จากนั้นนำไปคำนวณหาค่า IC_{50} หากสารตัวอย่างมี %inhibition มากกว่า 50% ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{Inhibition}(\%) = [[A_{control}-(A_{sample} – A_{blank})] / A_{blank}]\text{x}100$$

A_{blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลายเอนไซม์ tyrosinase

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลายตัวอย่าง

$A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของเมทานอล

2) การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดตัวอย่าง

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดตัวอย่างทำโดยการเตียมสารสกัดตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้น 0.1 mM ใน methanol และเตรียม stock solution ให้ได้ความเข้มข้น 1 mg/ml จากนั้นแข่งตัวอย่างมา 100 µL ผสมกับสารทดสอบ DPPH 150 µL ใน 96-well plate แล้วผสมให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm เปรียบเทียบกับ Ascorbic acid เป็นสารมาตรฐาน จากนั้นนำไปคำนวณหาค่า IC_{50} หากสารตัวอย่างมี %Inhibition มากกว่า 50% ดังสมการ

คำนวณหา %inhibition ดังสมการ

Inhibition (%) = [(Ablank – Asample)/ Ablank] x100

Ablank คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลาย DPPH

Asample คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลายตัวอย่าง

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1. การสกัดสารจากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

จากการสกัดสารจากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทยทั้งหมด 15 ตัวอย่าง ด้วยวิธี maceration ด้วยตัวทำละลาย methanol ได้สารสกัดหยาบและ %yield เทียบกับน้ำหนักของตัวอย่างแห้งดังแสดงตารางที่ 1

4.2. การกำจัดเกลือ

ผลการกำจัดเกลือจากสารสกัดหยาบ methanol โดยวิธี partition กับ ethyl acetate ได้น้ำหนักและ %yield ของสารสกัดดังแสดงในตารางที่ 1 โดยจะพบร้อยละผลผลิต (%yield) มากที่สุดคือตัวอย่างที่ 30 รหัส NC. 16-030-01 มีน้ำหนักตัวอย่าง 0.16 กรัมและมี %yield = 11.49 % ส่วนตัวอย่างที่มีร้อยละผลผลิต (%yield) น้อยที่สุดคือตัวอย่างที่ 21 รหัส NC. 16-005-01 ที่มีน้ำหนักตัวอย่าง 0.01 กรัม และมี %yield = 0.11%

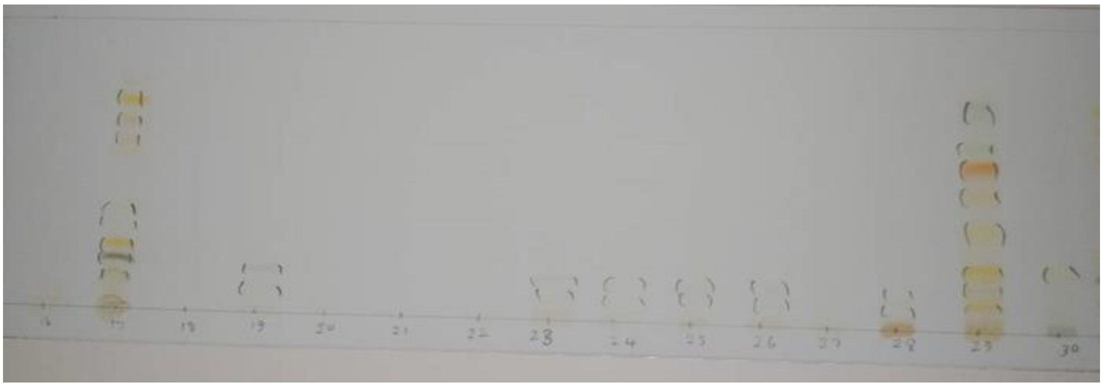
ตารางที่ 1 แสดงน้ำหนักสารสกัดหยาบและ %yield

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง	ขั้นตอนการสกัดสารตัวอย่าง				ขั้นตอนการกำจัดเกลือ	
		น้ำหนักตัวอย่างเปียก(g)	น้ำหนักตัวอย่างแห้ง(g)	น้ำหนักสารสกัด methanol (g)	%yield (เทียบกับตัวอย่างแห้ง)	น้ำหนักสารสกัด ethyl acetate (g)	%yield (เทียบกับสารสกัด methanol)
1	NC.17-011-01	71.93	13.86	1.42	10.30	0.11	0.81
2	NC.17-016-01	46.59	12.23	2.50	20.47	0.23	1.91
3	NC.17-017-01	32.96	31.06	0.97	3.13	0.03	0.12
4	NC. 16-002-01	49.02	12.16	1. 39	11.49	0.14	1.15
5	NC. 16-003-01	30.03	8.16	1.24	15.21	0.07	0.88
6	NC. 16-005-01	49.01	7.90	1.12	14.26	0.01	0.11
7	NC. 16-011-01	31.42	2.60	2.48	95.27	0.02	1.00
8	NC. 16-018-01	31.29	13.71	0.98	7.21	0.12	0.88
9	NC. 16-028-01	50.14	12.18	1.78	14.64	0.06	0.48
10	NC. 16-033-01	48.77	30.38	1.52	5.00	0.13	0.41
11	NC. 16-001-01	49.34	14.99	1.13	7.56	0.11	0.78
12	NC. 16-007-01	50.39	11.28	1.54	13.69	0.08	0.79
13	NC. 16-008-01	48.43	11.09	2.36	21.33	0.10	0.98
14	NC. 16-020-01	49.32	8.28	1.56	18.83	0.15	1.88
15	NC. 16-030-01	50.44	10.96	1.61	14.71	0.16	11.49

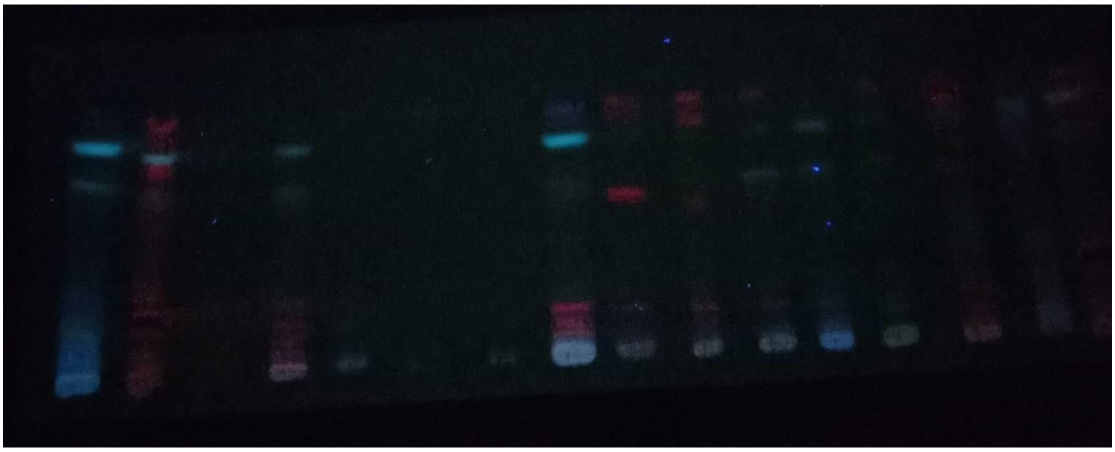
4.3. ผลการทดสอบการแยกสารด้วยวิธี TLC

จากการทดสอบการแยกสารด้วยวิธี TLC โดยใช้ stationary phase เป็น SiO_2 และ mobile phase เป็น CH_2Cl_2:methanol 9:1และตรวจสอบการแยกสารด้วยตาเปล่า แสง UV 254 nm, 365 nm และ anisaldehyde แสดงผลในตารางที่ 2 และภาพที่ 1 จากจำนวน spot ของการแยกสารด้วยวิธี TLC ที่ได้ พบว่า การสกัดแต่ละตัวอย่างมีจำนวนสารที่เป็นองค์ประกอบแตกต่างกันไป โดยมีองค์ประกอบทางเคมีอยู่จำนวนระหว่าง 1-10 องค์ประกอบ

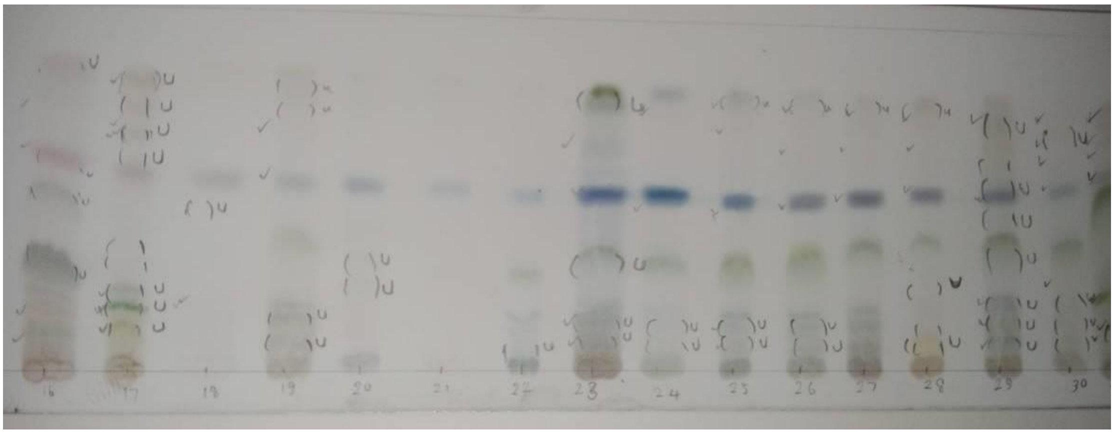
ภาพที่ 1.1 แสดงผลการตรวจสอบการแยกสารด้วยตาเปล่า



ภาพที่ 1.2 แสดงผลการตรวจสอบการแยกสารภายใต้แสง UV 254 nm 365 nm



ภาพที่ 1.3 แสดงผลการตรวจสอบการแยกสารด้วยการพ่น anisaldehyde



ตารางที่ 2 แสดงผลการทดสอบสารด้วยวิธี TLC

ตัวอย่าง	ตำแหน่ง	R_f	ตาเปล่า	UV		Anisaldehyde
				254	365	
NC.17-011-01	0.5	0.085			ฟ้า	เทา
	1	0.169			ฟ้า	
	1.8	0.305	เหลือง	เหลือง		เทา
	2.8	0.475	เหลือง	เหลือง		
	3.3	0.559	เหลือง	เหลือง		น้ำเงิน
	4.2	0.712			ฟ้า	
	4.9	0.831		เหลือง		
NC.17-016-01	0.6	0.102	เหลือง	เหลือง	แดง	เหลือง
	1	0.169	เหลือง	เหลือง	แดง	เขียว
	1.2	0.203	เหลือง	เหลือง	แดง	เทา
	1.7	0.288	เหลือง			เทา
	2	0.339	เหลือง			เทา
	3.4	0.576	เหลือง	เหลือง		ม่วง
	3.7	0.627	เหลือง	เหลือง	แดง	ม่วง
	4.2	0.712	เหลือง	เหลือง		
	4.6	0.780	เหลือง	เหลือง	แดง	ม่วง
NC. 17-017-01	2.6	0.441		ดำ		
	3.1	0.525				เทา
NC. 16-002-01	0.5	0.085			แดง	เทา
	0.8	0.136			แดง	เทา
	2.2	0.373				เทา

ตัวอย่าง	ตำแหน่ง	R_f	ตาเปล่า	UV		Anisaldehyde
				254	366	
NC. 16-002-01	3.1	0.525			น้ำเงิน	ม่วง
	4	0.678			น้ำเงิน	
	4.2	0.712			น้ำเงิน	
	4.6	0.780			น้ำเงิน	
NC. 16-003-01	1.4	0.237			น้ำเงิน	เทา
	1.8	0.305			น้ำเงิน	
	3.1	0.525				เทา
	4.8	0.814				ม่วง
NC. 16-005-01	3.1	0.525				น้ำเงิน
NC. 16-011-01	0.4	0.068			ดำ	เทา
	1.6	0.271				เทา
	3	0.508				น้ำเงิน
NC. 16-018-01	0.5	0.085	เหลือง	เหลือง	ฟ้า	เทา
	0.8	0.136	เหลือง	เหลือง	ฟ้า	เทา
	1.8	0.305		เหลือง	แดง	เทา
	2	0.339		เหลือง		เขียว
	3	0.508			ฟ้า	น้ำเงิน
	3.9	0.661			ม่วง	เทา
	4.5	0.763	เหลือง	เหลือง		เชียว
NC. 16-028-01	0.5	0.085	เหลือง	เหลือง		เทา
	0.8	0.136	เหลือง	เหลือง		
	1.9	0.322				เทา
	3	0.508	เหลือง	เหลือง	แดง	น้ำเงิน
	4.6	0.780			แดง	เทา
NC. 16-033-01	0.5	0.085	เหลือง	เหลือง	แดง	เทา
	0.8	0.136	เหลือง	เหลือง	แดง	เทา
	1.9	0.322				เขียว
	3	0.508			น้ำเงิน	น้ำเงิน
	4.1	0.695			แดง	
	4.6	0.780		เหลือง	แดง	
NC. 16-001-01	0.5	0.085	เหลือง	เหลือง	เทา	เทา
	0.8	0.136	เหลือง	เหลือง		
	2	0.339				เทา
	2.9	0.492			น้ำเงิน	ม่วง
	3.8	0.644			น้ำเงิน	ม่วง
	4.6	0.780	เหลือง	เหลือง	เทา	เทา

ตัวอย่าง	ตำแหน่ง	R_f	ตาเปล่า	UV		Anisaldehyde
				254	366	
NC. 16-007-01	0.5	0.085			น้ำเงิน	เทา
	0.8	0.136			น้ำเงิน	เทา
	2.1	0.356			น้ำเงิน	เทา
	2.9	0.492			แดง	ม่วง
	3.8	0.644			แดง	
	4.5	0.763	เหลือง	เหลือง	แดง	เทา
NC. 16-008-01	0.5	0.085	เหลือง	เหลือง		เทา
	0.8	0.136	เหลือง			เทา
	1.4	0.237	เหลือง			
	2.2	0.373				ม่วง
	3	0.508			ม่วง	ม่วง
	3.8	0.644			แดง	
	4.5	0.763	เหลือง	เหลือง	แดง	
NC. 16-020-01	0.5	0.085	เหลือง	เหลือง	น้ำเงิน	เทา
	0.8	0.136	เหลือง	เหลือง	น้ำเงิน	ม่วง
	1.2	0.203	เหลือง	เหลือง	น้ำเงิน	เขียว
	1.9	0.322	เหลือง	เหลือง		
	2.1	0.356				เทา
	2.6	0.441	เหลือง	เหลือง		
	3	0.508	เหลือง	เหลือง	น้ำเงิน	ม่วง
	3.5	0.593	เหลือง			
	3.9	0.661				ม่วง
	4.2	0.712	เหลือง	เหลือง	เทา	ม่วง
NC. 16-030-01	0.5	0.085	เหลือง	เหลือง	น้ำเงิน	เขียว
	0.8	0.136	เหลือง	เหลือง	น้ำเงิน	เทา
	1.2	0.203	เหลือง	เหลือง	น้ำเงิน	เทา
	2.2	0.373				เทา
	3.2	0.542			น้ำเงิน	น้ำเงิน
	3.7	0.627			น้ำเงิน	
	4.1	0.695	เหลือง	เหลือง	น้ำเงิน	เทา
	4.5	0.763			น้ำเงิน	

4.4. การทดสอบกลุ่มสารด้วย specific reagent

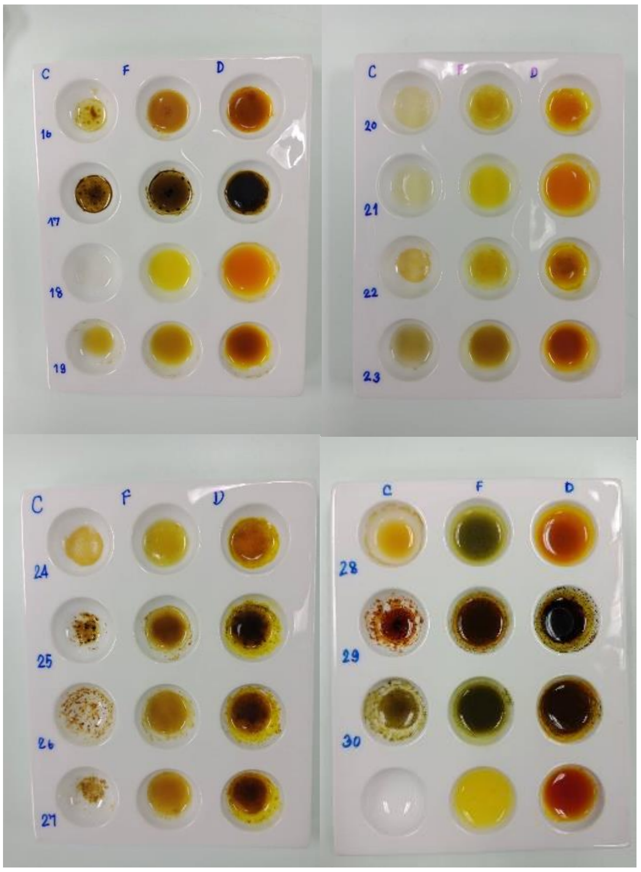
4.1. การทดสอบฟีนอลิก (phenolic compound)

การทดสอบฟีนอลิก (phenolic compound) ในการสกัดโดยใช้ 1% ferric chloride solution โดยผลบวกจะเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้มหรือน้ำเงินดำ แสดงว่ามีสารในกลุ่มฟีนอลิก ผลการทดสอบแสดงได้ในตารางที่ 3 ตัวอย่างที่พบสารฟีนอลิกมีจำนวน 12 ตัวอย่าง และผลชัดที่สุด คือ NC. 16-008-01 และ NC. 16-030-01

4.2. การทดสอบแอลคาลอยด์ (alkaloids)

การทดสอบแอลคาลอยด์ (alkaloids) โดยสารทดสอบกับ Dragendorff's reagent โดยผลบวกจะเกิดปฏิกิริยาเป็นตะกอนสีส้มแดง แสดงว่าสารสกัดมีองค์ประกอบทางเคมีเป็นสารในกลุ่มแอลคาลอยด์ ผลการทดสอบสารในกลุ่มแอลคาลอยด์ด้วย Dragendorff's reagent ดังแสดงในภาพที่ 2 และตารางที่ 3

ภาพที่ 2 แสดงผลการทดสอบด้วย specific reagent



ตารางที่ 3 แสดงผลการทดสอบด้วย specific reagent

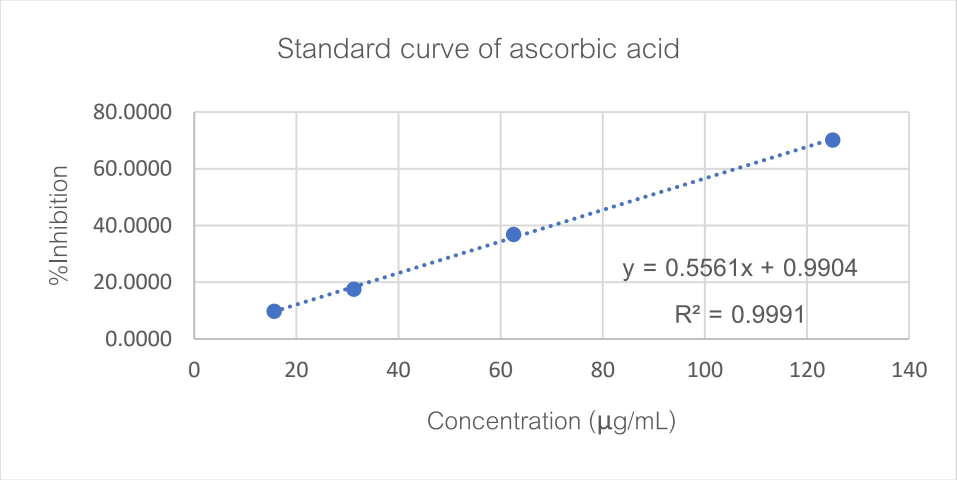
ตัวอย่าง	Blank	ฟีนอลิก (phenolic compound)	แอลคาลอยด์ (alkaloids)
NC. 16-011-01	เหลือง	เขียว	ตะกอนส้มแดง
NC. 16-016-01	เหลือง	น้ำเงินดำ	ตะกอนส้มแดง
NC. 16-017-01	ใส	-	-
NC. 16-002-01	เหลือง	เขียว	ตะกอนส้มแดง
NC. 16-003-01	เหลือง	เขียว	ตะกอนส้ม
NC. 16-005-01	เหลือง	-	-
NC. 16-011-01	เหลืองอมส้ม	เขียว	ตะกอนส้มแดง
NC. 16-018-01	เขียว	เขียว	ตะกอนส้มแดง
NC. 16-028-01	น้ำตาลอ่อน	เขียว	ตะกอนส้ม
NC. 16-033-01	น้ำตาลเข้ม	เขียว	ตะกอนส้มแดง
NC. 16-001-01	น้ำตาลอ่อน	เขียว	ตะกอนส้มแดง
NC. 16-007-01	น้ำตาลแกมเหลือง	เขียว	ตะกอนส้มแดง
NC. 16-008-01	น้ำตาลอ่อน	ตะกอนเขียว	ตะกอนส้มแดง
NC. 16-020-01	น้ำตาลแดง	-	-
NC. 16-030-01	เขียวขี้ม้า	ตะกอนเขียว	ตะกอนส้มแดง

หมายเหตุ: - หมายถึง ตรวจสอบไม่พบ

4.5. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activity evaluation)

5.1. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay ซึ่งใช้วิตามินซี (ascorbic acid) เป็นสารมาตรฐานพบว่าได้กราฟมาตรฐานวิตามินซี ดังภาพที่ 1 ($y = 0.5561x + 0.9904$, $R^2 = 0.9991$) สามารถคำนวณค่า IC_{50} ของ vitamin C ได้เท่ากับ 88.31 μg/mL



ภาพที่ 3 แสดงกราฟมาตรฐานวิตามินซี

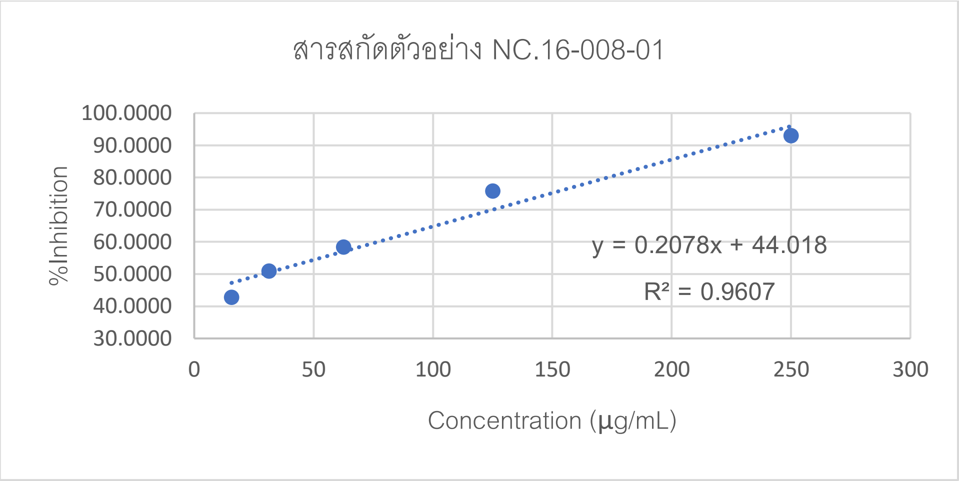
จากนั้นทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของตัวอย่างสารสกัดจากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทยทั้ง 15 ชนิดได้ผลดังตารางที่ 4 และพบว่าตัวอย่างที่มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีโดยมีค่า %inhibition มากกว่า 50% คือ NC. 16-008-01 (84.79%) และ NC. 16-030-01 (52.11%)

ตารางที่ 4 แสดงค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่างในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ

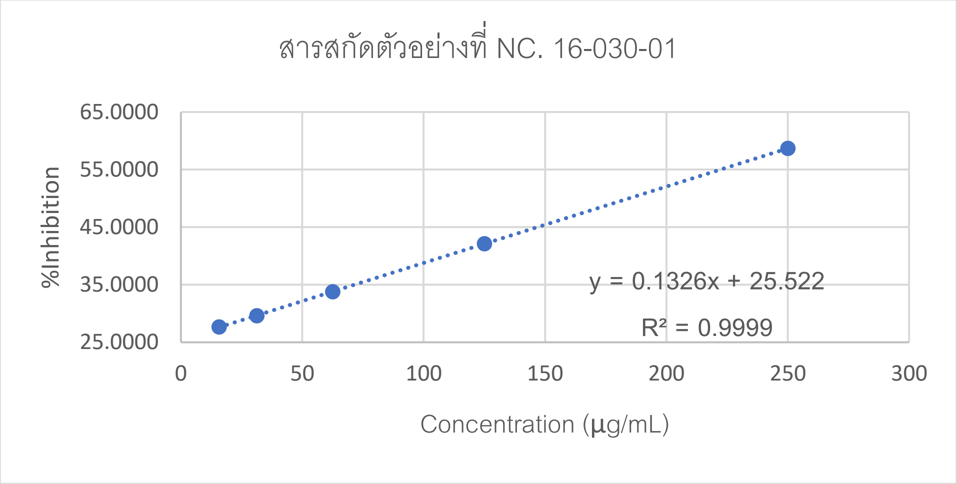
ตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง	%inhibition
NC. 16-011-01	0.54	40.13
NC. 16-016-01	0.79	14.81
NC. 16-017-01	0.76	11.26
NC. 16-002-01	0.75	13.51
NC. 16-003-01	0.72	16.31
NC. 16-005-01	0.72	17.10
NC. 16-011-01	0.69	20.81
NC. 16-018-01	0.71	17.77

ตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง	%inhibition
NC. 16-028-01	0.77	10.68
NC. 16-033-01	0.74	16.47
NC. 16-001-01	0.71	19.27
NC. 16-007-01	0.69	20.48
NC. 16-008-01	0.17	84.79
NC. 16-020-01	0.80	26.36
NC. 16-030-01	0.47	52.11

และจากการหาค่า IC$_{50}$ ของตัวอย่าง NC. 16-008-01 และ NC. 16-030-01 พบว่ามีค่า IC$_{50}$ เท่ากับ 28.79 µg/mL ,184.60 µg/mL ตามลำดับ



ภาพที่ 4 แสดงกราฟของสารสกัดตัวอย่าง NC. 16-008-01



ภาพ 5 แสดงกราฟของสารสกัดตัวอย่าง NC. 16-030-01

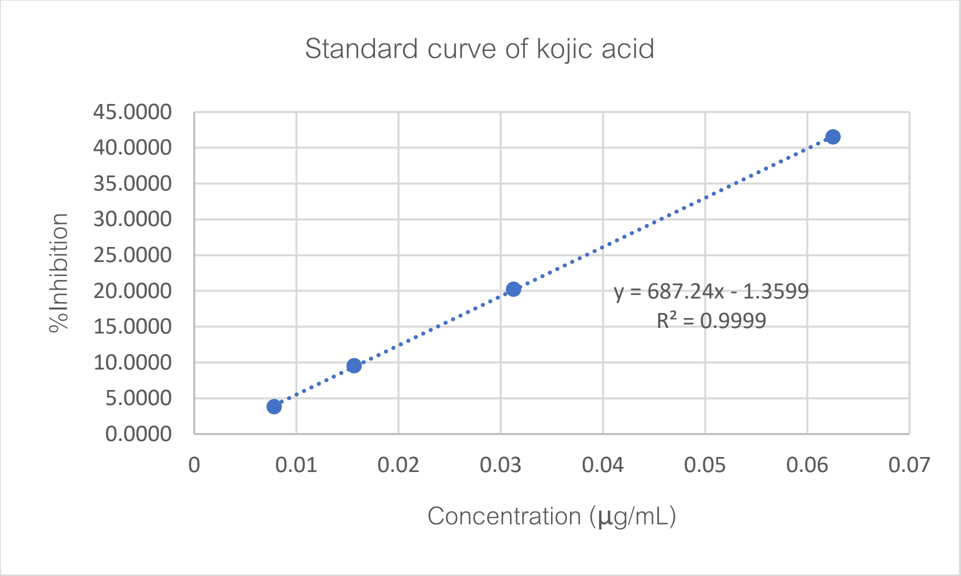
ตารางที่ 5 แสดง %Inhibition และ IC_{50} ของตัวอย่าง NC. 16-008-01 และ NC. 16-030-01

ตัวอย่าง	%inhibition	IC_{50} (µg/mL)
NC. 16-008-01	84.79	28.79
NC. 16-030-01	52.11	184.60

โดยการทดสอบตัวอย่าง NC. 16-008-01 และ NC. 16-030-01 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 28.79 µg/mL และ 184.60 µg/mL ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าสารสกัดตัวอย่างที่ 13 มีค่า IC_{50} ในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารมาตรฐาน vitamin C (IC_{50} = 88.31 µg/mL)

5.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสซึ่งใช้ kojic acid เป็นสารมาตรฐานพบว่า ได้กราฟมาตรฐาน kojic acid ดังภาพที่ 4 (y = 687.24x – 1.3599, R^2 = 0.9999)



ภาพที่ 4 แสดงกราฟมาตรฐาน kojic acid

ผลการทดลองมาตรฐานของ kojic acid ไม่สามารถหาค่า IC_{50} ของ kojic acid ได้ เนื่องจาก %inhibition ในช่วง linear ไม่ถึง 50% จะต้องมีการทดสอบเพื่อยืนยันผลการทดสอบเพิ่มเติม จากนั้นทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของตัวอย่างสารสกัดจากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทยทั้ง 15 ชนิด ได้ผลดังตาราง 6 พบว่าตัวอย่างทั้งหมดมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสต่ำกว่า 50%

ตารางที่ 6 แสดงค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่างในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและ mg/mL kojic acid equivalent to sample 250 µg/mL

ตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง	%inhibition	mg/mL kojic acid equivalent to sample 250 µg/mL
NC. 16-011-01	0.588	18.81	0.029
NC. 16-016-01	0.606	23.45	0.036

ตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง	%inhibition	mg/mL kojic acid equivalent to sample 250 µg/mL
NC. 16-017-01	0.598	11.34	0.018
NC. 16-002-01	0.584	14.91	0.023
NC. 16-003-01	0.582	12.94	0.020
NC. 16-005-01	0.580	9.90	0.016
NC. 16-011-01	0.590	12.08	0.019
NC. 16-018-01	0.589	11.62	0.018
NC. 16-028-01	0.623	9.04	0.015
NC. 16-033-01	0.628	8.21	0.013
NC. 16-001-01	0.638	4.06	0.007
NC. 16-007-01	0.604	9.16	0.015
NC. 16-008-01	0.624	6.41	0.011
NC. 16-020-01	0.719	1.43	0.004
NC. 16-030-01	0.606	12.02	0.019

เนื่องจากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเลทั้ง 15 ตัวอย่างนี้ ไม่มีตัวอย่างใดมีการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสถึง 50% จึงไม่นำมาคำนวณหาความเข้มข้นในการออกฤทธิ์ยับยั้งที่ 50% (inhibition concentration 50%, IC_{50})

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาเพื่อหาทรัพยากรทางทะเลในภาคตะวันออกเพื่อนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและยับยั้งอนุมูลอิสระ ในการทดลองครั้งนี้ได้นำสิ่งมีชีวิตที่ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเลทางภาคตะวันออกของประเทศไทยทั้งหมด 15 ตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างทั้งหมดเป็นตัวอย่างฟองน้ำทะเลซึ่งอยู่ระหว่างการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธาน การทดลองเริ่มโดยการสกัดเอาสารสำคัญจากวิธีการหมัก (maceration) ด้วยเมธานอล (methanol) แล้วนำไปกำจัดเกลือโดยการ partition ด้วยเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) โดยจะพบร้อยละผลผลิต (%yield) มากที่สุดคือตัวอย่าง Nc.16-030-01 มีน้ำหนักตัวอย่าง 0.16 กรัมและมี %yield = 11.49 % ส่วนตัวอย่างที่มีร้อยละผลผลิต (%yield) น้อยที่สุดคือตัวอย่าง Nc.16-005-01 ที่มีน้ำหนักตัวอย่าง 0.01 กรัม และมี %yield = 0.11 % จากนั้นนำไปศึกษากลุ่มสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบเบื้องต้นด้วยเทคนิค TLC พบว่าสารสกัดตัวอย่างมีสารเคมีเป็นองค์ประกอบอยู่ในช่วง 2-10 ตัวอย่าง และเมื่อนำสารสกัดตัวอย่างมาทำการทดสอบด้วยน้ำยาทดสอบจำเพาะ กับสารในกลุ่มสารฟีนอลิก (phenolic compound) และแอลคาลอยด์ (alkaloids) พบว่าตัวอย่าง Nc.16-008-01 และตัวอย่าง Nc.16-030-01 ให้ผลบวกกับน้ำยาทดสอบจำเพาะอย่างชัดเจนกับน้ำยาทดสอบจำเพาะ ในกลุ่มสารฟีนอลิก (phenolic compound) และแอลคาลอยด์ (alkaloids) แต่ในการทดสอบกลุ่มสาร alkaloid อาจเกิด false positive ได้จากการที่สารสกัดมีสารอื่นๆ ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบได้ เช่น สารในกลุ่ม protein และ amino acid ร่วมกับสีของสารสกัดที่มีสีเข้ม และสามารถรบกวนการอ่านผลการทดลอง

จากนั้นนำสารสกัดไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ พบว่ามี 2 ตัวอย่างที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้มากกว่า 50% คือตัวอย่าง Nc.16-008-01 และตัวอย่าง Nc.16-030-01 และคำนวณหาค่า IC_{50} ได้เท่ากับ 28.79 µg/mL และ 184.60 µg/mL ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปตามสมมติฐานที่สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ดี จะเป็นสารในกลุ่ม phenolic compound และอีกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ทำการทดสอบในงานวิจัยนี้ คือ ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งผลการทดลองพบว่าตัวอย่างที่มีการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้มากที่สุดคือตัวอย่าง

NC. 16-016-01 (23.4536%) และไม่มีตัวอย่างใดมีค่าการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้มากกว่า 50%

เอกสารอ้างอิง

1. Pillaiyar, T., Manickam M, Namasivayam V. Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. J Enzyme *Inhib* Med Chem. 2017;32(1):403-425.
2. Homklob, J., Free radical scavenging capacity, tyrosinase inhibition activity and total phenolics content of ethyl acetate extracts from Indian gooseberry (*Phyllanthus emblica* L.) in Thailand. Kasetsart: Kasetsart University; 2010.
3. Klaokwan, S. YC, Ekaruth S. In vitro anti-oxidant and anti-tyrosinase activities of the rhizomal extracts from *Amomum biflorum Jack*. TJB 2. 2012:143-150.
4. Jullapo, N.,Phytochemical screening and biological activities of *Dendrobium* spp. Burapha university. 2016.
5. Chan Y,Y., Kim KH, Cheah SH. Inhibitory effects of *Sargassum polycystum* on tyrosinase activity and melanin formation in B16F10 murine melanoma cells. J Ethnopharmacol. 2011;137(3):1183-1188.
6. Islam MR MD, Kurihara, H.,Tyrosinase Inhibitory and Antioxidant Activity by Bromophenols from the Alga *Odonthalia corymbifera*. Nat Prod Ind J. 2017.
7. Bourguiba, I., Zahlila A, Bouaïcha N, Amri M, Mezghani S. antioxidant effect of the marine green alga *Ulva rigida* ethanolic precipitate in yeast cells and zebrafish embryos. s afr j bot. 2017; 113:253-260.
8. Krishnaiah, D., Sarbatly R, Nithyanandam R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. food bioprod process. 2011;89(3):217-233.
9. Hamuel, JD., Phytochemicals: extraction methods, basic structures and mode of action as potential chemotherapeutic agents. Federal university of technology. 2012.

10. Siribhorn Madla, PD., Potchanapond Graidist, several alkaloids derived from plants and their underlying molecular mechanisms of action in the fight against cancer. Songkla M J. 2017; 35:83-94.
11. Iqbal, E., Salim, KA., Lim, LBL.,Phytochemical screening, total phenolics and antioxidant activities of bark and leaf extracts of Goniothalamus velutinus (Airy Shaw) from Brunei Darussalam. JKSUS. 2015;27(3):224-232.
12. Krishnan, M., S, M¹ D. Evaluation of phytochemical constiuents and antioxidant activity of indian medicinal plant *Hydnocarpus pentandra*. J Pharm Pharm Sci. 2013;5(2):453-458.
13. Feller, R., Matos, ÂP., Mazzutti, S., Moecke, EHS., Tres, MV., Derner, RB., et al. Polyunsaturated ω-3 and ω-6 fatty acids, total carotenoids and antioxidant activity of three marine microalgae extracts obtained by supercritical CO_2 and subcritical n-butane. J. Supercrit. Fluids. 2018;133:437-443.
14. Pillaiyar, T., Manickam, M., Namasivayam, V., Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 2017;32(1):403-425.
15. Karkouch, I., Tabbene, O., Gharbi, D., Ben Mlouka, MA., Elkahoui, S., Rihouey, C., et al. Antioxidant, antityrosinase and antibiofilm activities of synthesized peptides derived from *Vicia faba* protein hydrolysate: a powerful agent in cosmetic application. Ind Crops Prod. 2017;109:310-319.
16. Saha M, Bandyopadhyay PK. Phytochemical screening for identification of bioactive compound and antiprotozoan activity of fresh garlic bulb over trichodinid ciliates affecting ornamental goldfish. Aquac. 2017;473:181-190.
17. Jullapo N. Phytochemical screening and biological activities of *Dendrobium* spp. Burapha university. 2016.
18. Alkaloid [Internet]. britannica.com. [cited 17 March 2018]. Available from: https://www.britannica.com/science/alkaloid.

19. Moeiklang N. Determination of Phenolic Compounds and Antioxidant Potential in Fruit Beverages. KKU Research Journal. 2014.
20. Saenthaweesuk S. Total phenolics content, antioxidant and antimicrobial activities of some herbs. Khon Kaen Agriculture Journal. 2012;40:480.
21. วาทินี เสล่ราษฎร์. การสกัด การตรวจสอบสารพฤกษเคมี ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ และยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของทุเรียนเทศ. มหาวิทยาลัยบูรพา. 2004.
22. Pharmacokinetics of Flavonoids [Internet]. FDA Journal. 2013 [cited 17 march 2018]. Available from: http://kmfda.fda.moph.go.th/Journal/Chapter/1/19_128_A1_2.56.pdf.
23. ณกัญภัทร จินดา.สารสกัดแทนนินจากเปลือกเงาะเพื่อเป็นสีย้อมในพลาสติกชีวภาพ. 2014.
24. ศิริวรรณ แก้วเพ็ชร์และคณะ. การศึกษาสารสกัดจากพืชในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุการเน่าเสียของเนื้อสัตว์. 2010.
25. สารชีวโมเลกุล [Internet]. ku.ac.th. [cited 17 March 2018]. Available from: pirun.ku.ac.th/~fsciwapa/download/problem221/biomolecule1.doc.
26. นงลักษณ์ ห้วยหงษ์ทอง. การทดสอบสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรไทยบางชนิดที่ใช้รักษาโรคเบาหวาน. มหาวิทยาลัยบูรพา. 2016.
27. Glycoside [Internet]. britannica.com. [cited 17 March 2018]. Available from: https://www.britannica.com/science/glycoside.

ภาคผนวก

รายงานสรุปการเงิน
โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2560 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบ
จากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ภญ.อ.ดร.นภัสสร ฉันทธำรงศิริ

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 6/8/2561 **ถึงวันที่** 12/12/2561

ระยะเวลาดำเนินการ 5 **เดือน ตั้งแต่วันที่** 6/8/2561

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ 7000 **บาท เมื่อ** 6/8/2561

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
อุปกรณ์และสารเคมี	5700	5700	0
สื่อโปสเตอร์	300	300	0
ค่าลงทะเบียน นำเสนอสื่อโปสเตอร์	1000	1000	0
รวม	7000	7000	0

…………………………

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานวิจัย