



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากฟองน้ำกระชาย
Biological activities of the extracts from the sponge
Coelocarteria singaporensis

โดย

นศก. นนวัฒน์ ดีตทอง	62210067
นศก. นราธิป บรรจง	62210069
นศก. ศุภการต์ จิตรกรมาลี	62210156

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2566

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากฟองน้ำกระชาย
Biological activities of the extracts from the sponge
Coelocarteria singaporensis

โดย

นศภ. นนวัฒน์ ดีตทอง	62210067
นศภ. นราธิป บรรจง	62210069
นศภ. ศุภการต์ จิตรกรมาลี	62210156

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2566

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

รายงานการศึกษาวิจัย “การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากฟองน้ำกระชาย” ฉบับนี้เป็นรายงานฉบับสมบูรณ์ มีวัตถุประสงค์ เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของฟองน้ำที่ได้จากเกาะไผ่ อำเภอบางละมุง จังหวัดชลบุรี ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นจากฟองน้ำกระชายโดยใช้ตัวทำละลายในการสกัดที่ต่างกัน และเพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง และฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ของสารสกัดจากฟองน้ำกระชายโดยใช้ตัวทำละลายที่ต่างกัน โดยคณะผู้วิจัยได้เรียบเรียงวิธีขั้นตอนการดำเนินวิจัยไว้โดยละเอียดทุกขั้นตอน เพื่อให้ผู้ที่สนใจสามารถศึกษาเข้าใจและเพื่อเป็นการแลกเปลี่ยนความรู้สำหรับผู้สนใจในการดำเนินงานวิจัยนี้

คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานการศึกษาวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้สนใจที่จะศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากฟองน้ำกระชาย และสามารถนำผลการวิจัยมาพัฒนาและปรับปรุงให้เกิดประโยชน์ในภาคหน้า หากมีข้อผิดพลาดประการใดต้องขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

คณะผู้วิจัย

นสภ.นนทวัฒน์	ดีดทอง	62210067
นสภ.นราธิป	บรรจง	62210069
นสภ.ศุภกานต์	จิตรกรมาลี	62210156

18 มีนาคม 2567

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ ปีการศึกษา 2566

เรื่อง การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากฟองน้ำกระชาย

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. นสภ.นนทวัฒน์ ดีดทอง รหัส 62210067
2. นสภ.นราธิป บรรจง รหัส 62210069
3. นสภ.ศุภกานต์ จิตรกรมาลี รหัส 62210156

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. ผศ.ดร.ญ. สมาวดี เปลี่ยนวงษ์
2. ผศ.ดร.ญ. นภัสสร ฉันทธารังศิริ

บทคัดย่อ

ฟองน้ำทะเลหลายชนิดมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพ สามารถนำไปพัฒนาต่อเป็นยารักษาโรคได้ โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากฟองน้ำกระชาย โดยใช้ตัวทำละลายที่ต่างกัน 3 ชนิด คือ เมทานอล ไอโซโพรพานอล และน้ำ รวมถึงพิสูจน์เอกลักษณ์และศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นจากฟองน้ำกระชาย

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าตัวอย่างฟองน้ำที่ใช้ในการศึกษามี 2 ชนิด คือ ฟองน้ำกระชาย (*Coelocarteria singaporensis*) และฟองน้ำท่อพุ่มสีแดง (*Oceanapia sagittaria*) จากการศึกษาจำนวนองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง พบว่าฟองน้ำทั้งสองชนิดมีจำนวนองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นใกล้เคียงกัน โดยพบองค์ประกอบทางเคมีจำนวนมากในชั้นสารที่สกัดด้วย ไอโซโพรพานอล และไอโซโพรพานอลผสมน้ำ จากการศึกษาทดสอบสารทางเคมีเบื้องต้น พบว่าฟองน้ำกระชายมีสารกลุ่ม แอลคาลอยด์ สเตียรอยด์ คอนเดนส์แทนนิน และซาโปนิน ฟองน้ำท่อพุ่มสีแดงมีสารกลุ่ม แอลคาลอยด์ สเตียรอยด์ และซาโปนิน จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดีพีพีเอช พบว่าฟองน้ำกระชายที่สกัดด้วยเมทานอล ไอโซโพรพานอล ไอโซโพรพานอลผสมน้ำ และน้ำ มีความเข้มข้นที่ต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 อยู่ที่ 420.18 ± 3.12 , 1091.79 ± 10.12 , 419.37 ± 3.36 และ 467.73 ± 3.77 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ฟองน้ำท่อพุ่มสีแดงที่สกัดด้วยเมทานอลและน้ำ มีความเข้มข้นที่ต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 อยู่ที่ 942.42 ± 3.00 และ 1145.79 ± 30.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดีพีพีเอช พบว่าฟองน้ำกระชายที่สกัดด้วยเมทานอลและน้ำ

มีค่าความเข้มข้นที่ด้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 อยู่ที่ 400.52 ± 10.44 และ 617.07 ± 12.44 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนฟองน้ำที่พุ่มสีแดงให้ผลการทดสอบด้วยวิธีดีพีพีเอชต่ำ จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอักเสบโดยการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ พบว่าฟองน้ำกระชายและฟองน้ำพุ่มสีแดงที่สกัดด้วยไอโซโพรพานอล มีความเข้มข้นที่ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้ร้อยละ 50 อยู่ที่ 71.80 ± 17.42 และ 109.44 ± 11.74 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ว่าฟองน้ำทั้ง 2 ชนิดไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส จากการศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมด้วยวิธีเอ็มทีที ฟองน้ำทั้ง 2 ชนิดที่สกัดด้วย ไอโซโพรพานอล และไอโซโพรพานอลผสมน้ำ ให้ผลการทดสอบที่ดี โดยในฟองน้ำกระชายมีค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์มะเร็งตายได้ร้อยละ 50 อยู่ที่ 741.14 ± 32.41 และ 675.31 ± 6.86 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และฟองน้ำพุ่มสีแดงมีค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์มะเร็งตายได้ร้อยละ 50 อยู่ที่ 875.31 ± 39.18 และ 758.01 ± 38.93 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผศ.ดร.ญ. สมาวดี เปลี่ยนวงษ์

Senior Project Academic Year 2023

: Biological activities of the extracts from the sponge *Coelocarteria singaporensis*

By

- | | | |
|-----------------|------------------|-------------|
| 1. Mr. Nontawat | Deetthong | ID 62210067 |
| 2. Mr. Narathip | Banjong | ID 62210055 |
| 3. Mr. Supakarn | Chittrakornmalee | ID 62210156 |

Advisor :

1. Asst. Prof. Dr. samarwadee Plianwong
2. Asst. Prof. Dr. Naphatson Chanthathamrongsiri

.....

Abstract

Marine sponges have potent bioactive properties that can be developed for pharmaceuticals products. This research aimed to study the bioactivities of extracts from the *Coelocarteria singaporensis* by using three different solvents, namely methanol, isopropanol and water. This study also aimed to identify the sponge and its chemical composition. From microscopic identification, there are two sponge species in our samples, *Coelocarteria singaporensis* and *Oceanapia sagittaria*. Thin-layer chromatography analysis showed that both sponges had a similar number of chemical elements, with the highest number of chemical elements found in the fractions extracted with isopropanol and isopropanol/water. Phytochemical analysis showed that *Coelocarteria singaporensis* contained alkaloids, steroids, condensed tannins, and saponins while *Oceanapia sagittaria* contained alkaloids, steroids, and saponins. From the result, the *Coelocarteria-singaporensis* extracts exhibited higher antioxidant activity than the *Oceanapia sagittaria* extracts detected by DPPH assay. *Coelocarteria-singaporensis* sponge extracts obtained with methanol, isopropanol, isopropanol/water and water had IC_{50} 420.18±3.12, 1091.79±10.12, 419.37±3.36, and 467.73±3.77 µg/ml for DPPH assay, respectively. *Oceanapia sagittaria* extracts obtained with methanol and water had IC_{50} 942.42±3.00 and

1145.79±30.25 µg/ml, respectively. So, the DPPH assay showed lower activity for *Oceanapia sagittaria* extracts. Both sponge extracts obtained with isopropanol exhibited anti-inflammatory activity by inhibiting nitric oxide production. The IC₅₀ were 71.80±17.42 and 109.44±11.74 µg/ml, for *Coelocarteria singaporensis* and *Oceanapia sagittaria* respectively. Neither of the sponge extracts showed any inhibitory activity against the alpha-glucosidase enzyme. Anti-breast cancer activity determined by MTT assay showed that both sponge extracts obtained with isopropanol and isopropanol/water had good cytotoxicity. The IC₅₀ values of *Coelocarteria singaporensis* extracts were 741.14±32.41 and 675.31±6.86 µg/ml, respectively. The IC₅₀ values of *Oceanapia sagittaria* extracts were 875.31±39.18 and 758.01±38.93 µg/ml, respectively.

Major advisor Asst. Prof. Dr. samarwadee Plianwong

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจาก ญ.ผศ.ดร.สมาวดี เปลี่ยนวงษ์ และ ญ.ผศ.ดร.นภัสสร ฉันทธำรงศิริ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยที่กรุณาให้คำปรึกษา ช่วยแนะนำแนวทาง ให้ความรู้ คอยดูแลในการทำโครงการวิจัยตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความเอาใจใส่ ทำให้โครงการวิจัยสำเร็จตามความคาดหวัง ผู้วิจัยได้ตระหนักถึงความตั้งใจและความทุ่มเทของอาจารย์และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณผู้ทรงคุณวุฒิผู้เชี่ยวชาญที่ให้คำแนะนำ และกรุณาเป็นคณะกรรมการสอบโครงการวิจัย ขอขอบพระคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ผู้ให้ทุนสนับสนุนโครงการวิจัย ผู้ให้ความช่วยเหลือด้านสถานที่ และอุปกรณ์ ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ญ.ธัญชนก ศิริรักษ์และนักวิทยาศาสตร์ที่ให้ความช่วยเหลือในการใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีต่าง ๆ

สุดท้ายขอขอบพระคุณบิดามารดาที่คอยให้กำลังใจ เจ้าหน้าที่คณะเภสัชศาสตร์และเพื่อน ๆ รวมถึงผู้ที่เกี่ยวข้องทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้กำลังใจในการทำโครงการวิจัยนี้ตลอดมาจนทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้ด้วย

คณะผู้วิจัย

นสภ.นนทวัฒน์	ดีดทอง	62210067
นสภ.นราธิป	บรรจง	62210069
นสภ.ศุภกานต์	จิตรกรมาลี	62210156

18 มีนาคม 2567

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
คำนำ	๗
บทคัดย่อ	๘
Abstract.....	๙
กิตติกรรมประกาศ	๙
สารบัญ	๙
สารบัญตาราง	๑๐
สารบัญรูปภาพ.....	๑๑
บทที่ 1 บทนำ	1
2. วัตถุประสงค์.....	2
3. สมมติฐาน.....	2
4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
5. กรอบแนวคิด	3
6. นิยามศัพท์	3
บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	4
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	9
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	22
1. ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ตัวอย่าง	22
2. ผลการตรวจสอบกลุ่มสารของตัวอย่างด้วยน้ำยาทดสอบชนิดต่างๆ	24
3. การตรวจสอบจำนวนองค์ประกอบของสารสกัด	26
4. ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ	34
5. ผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ โดยทดสอบการยับยั้งการหลั่ง Nitric oxide	52

6. ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase	60
7. ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมโดย MTT assay.....	63
บทที่ 5 วิเคราะห์ผลการวิจัย	74
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง	79
เอกสารอ้างอิง	81
ภาคผนวก.....	85
ภาคผนวก (1) ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ตัวอย่าง	86
ภาคผนวก (2) ผลการทดสอบกลุ่มสารของตัวอย่าง 1.1-2.4.....	88
ภาคผนวก (3) แบบฟอร์มรายงานการเงิน.....	96
ภาคผนวก (4) แบบฟอร์มอนุญาตให้เผยแพร่โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์.....	97

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 1 รหัสของตัวอย่างทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษา.....	14
ตารางที่ 2 ผลการทดสอบกลุ่มสารของตัวอย่างสารสกัด 1.1-2.4 ด้วยน้ำยาทดสอบชนิดต่างๆ.....	24
ตารางที่ 3 ผลองค์ประกอบของตัวอย่าง ด้วยเทคนิค Thin-Layer Chromatography โดยใช้ระบบ hexane : ethanol อัตราส่วน 3:2	26
ตารางที่ 4 ผลองค์ประกอบของตัวอย่าง ด้วยเทคนิค Thin-Layer Chromatography โดยใช้ระบบ Dichloromethane : methanol อัตราส่วน 9:1	30
ตารางที่ 5ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน vitamin C โดยใช้ DPPH assay	35
ตารางที่ 6 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน trolox โดยใช้ DPPH assay	36
ตารางที่ 7 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างพองน้ำ 1.1-2.4 โดยใช้ DPPH assay	37
ตารางที่ 8 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างพองน้ำ 1.1 โดยใช้ DPPH assay	38
ตารางที่ 9 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างพองน้ำ 1.4 โดยใช้ DPPH assay	39
ตารางที่ 10 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน vitamin C โดยใช้ ABTS assay	42
ตารางที่ 11 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน trolox โดยใช้ ABTS assay	43
ตารางที่ 12 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างพองน้ำ 1.1-2.4 โดยใช้ ABTS assay	44
ตารางที่ 13 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างพองน้ำ 1.1 โดยใช้ ABTS assay	45
ตารางที่ 14 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างพองน้ำ 1.2 โดยใช้ ABTS assay	46
ตารางที่ 15 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างพองน้ำ 1.3 โดยใช้ ABTS assay	47
ตารางที่ 16 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างพองน้ำ 1.4 โดยใช้ ABTS assay	48
ตารางที่ 17 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างพองน้ำ 2.1 โดยใช้ ABTS assay	49
ตารางที่ 18 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างพองน้ำ 2.4 โดยใช้ ABTS assay	50
ตารางที่ 19 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของตัวอย่าง 1.1 โดยทดสอบการยับยั้งการหลั่ง Nitric oxide	53
ตารางที่ 20 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของตัวอย่าง 1.2 โดยทดสอบการยับยั้งการหลั่ง Nitric oxide	53
ตารางที่ 21 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของตัวอย่าง 1.3 โดยทดสอบการยับยั้งการหลั่ง Nitric oxide	54
ตารางที่ 22 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของตัวอย่าง 1.4 โดยทดสอบการยับยั้งการหลั่ง Nitric oxide	55

ตารางที่ 23 การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของตัวอย่าง 2.1 โดยทดสอบการยับยั้งการหลั่ง Nitric oxide.....	55
ตารางที่ 24 การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของตัวอย่าง 2.2 โดยทดสอบการยับยั้งการหลั่ง Nitric oxide.....	56
ตารางที่ 25 การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของตัวอย่าง 2.3 โดยทดสอบการยับยั้งการหลั่ง Nitric oxide.....	57
ตารางที่ 26 การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ ของตัวอย่าง 2.4 โดยทดสอบการยับยั้งการหลั่ง Nitric oxide.....	57
ตารางที่ 27 สรุปฤทธิ์ด้านการอักเสบของตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 250 µg/mL โดยวิธี Nitric oxide assay.....	58
ตารางที่ 28 สรุป IC ₅₀ ของตัวอย่าง โดยวิธี Nitric oxide assay.....	59
ตารางที่ 29 ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ของสารมาตรฐาน acarbose	61
ตารางที่ 30 ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ของสารตัวอย่าง 1.1-2.4.....	62
ตารางที่ 31 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของตัวอย่าง 1.1 โดยใช้ MTT assay (% Variable).....	63
ตารางที่ 32 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของตัวอย่าง 1.1 โดยใช้ MTT assay (% Cell death)	64
ตารางที่ 33 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของตัวอย่าง 1.2 โดยใช้ MTT assay (% Variable)	64
ตารางที่ 34 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของตัวอย่าง 1.2 โดยใช้ MTT assay (% Cell death).....	65
ตารางที่ 35 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของตัวอย่าง 1.3 โดยใช้ MTT assay (% Variable)	66
ตารางที่ 36 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของตัวอย่าง 1.3 โดยใช้ MTT assay (% Cell death).....	66
ตารางที่ 37 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของตัวอย่าง 1.4 โดยใช้ MTT assay (% Variable)	67
ตารางที่ 38 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของตัวอย่าง 1.4 โดยใช้ MTT assay (% Cell death).....	68
ตารางที่ 39 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของตัวอย่าง 2.1 โดยใช้ MTT assay (% Variable).....	68
ตารางที่ 40 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของตัวอย่าง 2.1 โดยใช้ MTT assay (% Cell death).....	69
ตารางที่ 41 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของตัวอย่าง 2.2 โดยใช้ MTT assay (% Variable).....	69
ตารางที่ 42 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของตัวอย่าง 2.2 โดยใช้ MTT assay (% Cell death)	70
ตารางที่ 43 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของตัวอย่าง 2.3 โดยใช้ MTT assay (% Variable).....	71
ตารางที่ 44 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของตัวอย่าง 2.3 โดยใช้ MTT assay (% Cell death)	71
ตารางที่ 45 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของตัวอย่าง 2.1 โดยใช้ MTT assay (% Variable).....	72
ตารางที่ 46 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของตัวอย่าง 2.1 โดยใช้ MTT assay (% Cell death).....	73

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
รูปที่ 1 ลักษณะโครงสร้างผิวนอกของฟองน้ำกระชาย	22
รูปที่ 2 ลักษณะโครงสร้างเนื้อของฟองน้ำกระชาย	22
รูปที่ 3 ลักษณะ spicule ของฟองน้ำกระชาย	23
รูปที่ 4 ลักษณะโครงสร้างของฟองน้ำท่อพุ่มแดง 1) ผิวบริเวณตัว 2) เนื้อบริเวณตัว 3) ผิวบริเวณท่อ	23
รูปที่ 5 ผลองค์ประกอบของตัวอย่าง ด้วยเทคนิค Thin-Layer Chromatography โดยใช้ระบบ Hexane: Ethanol อัตราส่วน 3:2 ดังนี้ 1) ตาเปล่า 2) UV254 3) UV365 4) anisaldehyde-H ₂ SO ₄	26
รูปที่ 6 ผลองค์ประกอบของตัวอย่าง ด้วยเทคนิค Thin-Layer Chromatography โดยใช้ระบบ Dichloromethane : methanol อัตราส่วน 9:1 ดังนี้ 1) ตาเปล่า 2) UV254 3) UV365 4) anisaldehyde-H ₂ SO ₄	30
รูปที่ 7 กราฟสารมาตรฐาน vitamin c โดยวิธี DPPH assay	35
รูปที่ 8 กราฟสารมาตรฐาน Trolox โดยวิธี DPPH assay	36
รูปที่ 9 กราฟตัวอย่างสารสกัดฟองน้ำ 1.1 โดยวิธี DPPH assay	38
รูปที่ 10 กราฟตัวอย่างสารสกัดฟองน้ำ 1.4 โดยวิธี DPPH assay	39
รูปที่ 11 กราฟสารมาตรฐาน vitamin c โดยวิธี ABTS assay	42
รูปที่ 12 กราฟสารมาตรฐาน trolox โดยวิธี ABTS assay	43
รูปที่ 13 กราฟตัวอย่างสารสกัดฟองน้ำ 1.1 โดยวิธี ABTS assay	45
รูปที่ 14 กราฟตัวอย่างสารสกัดฟองน้ำ 1.2 โดยวิธี ABTS assay	46
รูปที่ 15 กราฟตัวอย่างสารสกัดฟองน้ำ 1.3 โดยวิธี ABTS assay	47
รูปที่ 16 กราฟตัวอย่างสารสกัดฟองน้ำ 1.4 โดยวิธี ABTS assay	48
รูปที่ 17 กราฟตัวอย่างสารสกัดฟองน้ำ 2.1 โดยวิธี ABTS assay	49
รูปที่ 18 กราฟตัวอย่างสารสกัดฟองน้ำ 2.4 โดยวิธี ABTS assay	50
รูปที่ 19 การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของตัวอย่าง 1.2	54
รูปที่ 20 การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของตัวอย่าง 2.2	56
รูปที่ 21 สรุปรูปที่ด้านการอักเสบของตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 250 µg/mL โดยวิธี Nitric oxide assay	58

รูปที่ 22 กราฟฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ของสารมาตรฐาน acarbose	61
รูปที่ 23 กราฟความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของตัวอย่าง 1.2 โดยวิธี MTT assay	65
รูปที่ 24 กราฟความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของตัวอย่าง 1.3 โดยวิธี MTT assay	67
รูปที่ 25 กราฟความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของตัวอย่าง 2.2 โดยวิธี MTT assay	70
รูปที่ 26 กราฟความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของตัวอย่าง 2.3 โดยวิธี MTT assay	72
รูปที่ 27 ลักษณะโครงสร้างผิวนอกของฟองน้ำกระชาย	86
รูปที่ 28 ลักษณะโครงสร้างเนื้อของฟองน้ำกระชาย	86
รูปที่ 29 ลักษณะ spicule ของฟองน้ำกระชาย	87
รูปที่ 30 ลักษณะโครงสร้างของฟองน้ำที่พุ่มแดง 1) ผิวบริเวณตัว 2) เนื้อบริเวณตัว 3) ผิวบริเวณท่อ	87
รูปที่ 31 ผลการทดสอบกลุ่มสาร Flavonoid ของตัวอย่าง 1.1-1.4	88
รูปที่ 32 ผลการทดสอบกลุ่มสาร Flavonoid ของตัวอย่าง 2.1-2.4	88
รูปที่ 33 ผลการทดสอบกลุ่มสาร Phenolic ของตัวอย่าง 2.1-2.4	88
รูปที่ 34 ผลการทดสอบกลุ่มสาร Phenolic ของตัวอย่าง 1.1-1.4	88
รูปที่ 35 ผลการทดสอบกลุ่มสาร alkaloids ของตัวอย่าง 1.1	88
รูปที่ 36 ผลการทดสอบกลุ่มสาร alkaloids ของตัวอย่าง 1.2	89
รูปที่ 37 ผลการทดสอบกลุ่มสาร alkaloids ของตัวอย่าง 1.3	89
รูปที่ 38 ผลการทดสอบกลุ่มสาร alkaloids ของตัวอย่าง 2.1	90
รูปที่ 39 ผลการทดสอบกลุ่มสาร alkaloids ของตัวอย่าง 1.4	90
รูปที่ 40 ผลการทดสอบกลุ่มสาร alkaloids ของตัวอย่าง 2.2	91
รูปที่ 41 ผลการทดสอบกลุ่มสาร alkaloids ของตัวอย่าง 2.3	91
รูปที่ 42 ผลการทดสอบกลุ่มสาร alkaloids ของตัวอย่าง 2.4	92
รูปที่ 43 ผลการทดสอบกลุ่มสาร triterpene และ steroid ของตัวอย่าง 1.1-1.4	92
รูปที่ 44 ผลการทดสอบกลุ่มสาร triterpene และ steroid ของตัวอย่าง 2.1-2.4	92
รูปที่ 45 ผลการทดสอบกลุ่มสาร tannin ของตัวอย่าง 1.1	93
รูปที่ 46 ผลการทดสอบกลุ่มสาร tannin ของตัวอย่าง 1.2	93
รูปที่ 47 ผลการทดสอบกลุ่มสาร tannin ของตัวอย่าง 1.3	93
รูปที่ 48 ผลการทดสอบกลุ่มสาร tannin ของตัวอย่าง 1.4	93

รูปที่ 49 ผลการทดสอบกลุ่มสาร tannin ของตัวอย่าง 2.1.....	94
รูปที่ 50 ผลการทดสอบกลุ่มสาร tannin ของตัวอย่าง 2.2.....	94
รูปที่ 51 ผลการทดสอบกลุ่มสาร tannin ของตัวอย่าง 2.3.....	94
รูปที่ 52 ผลการทดสอบกลุ่มสาร tannin ของตัวอย่าง 2.4.....	94
รูปที่ 53 ผลการทดสอบกลุ่มสาร saponin ของตัวอย่าง 1.1-1.4.....	95
รูปที่ 54 ผลการทดสอบกลุ่มสาร saponin ของตัวอย่าง 2.1-2.4.....	95

บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปัจจุบันฟองน้ำทะเลนั้นถือว่าเป็นแหล่งของ secondary metabolites ที่ได้รับความสนใจและมีการศึกษามาเป็นเวลามากกว่า 50 ปี มีการรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพของ metabolite มากกว่า 100 งานวิจัย ซึ่งทำให้เห็นว่าสารสำคัญจากฟองน้ำทะเลนั้นมีประสิทธิภาพในการใช้เป็นยาในการรักษาโรคต่างๆได้ในอนาคต เช่น ยารักษามะเร็ง ยาต้านไวรัส และยาแก้ชัก เป็นต้น (1)

แต่งานวิจัยการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของฟองน้ำในไทยนั้นยังมีค่อนข้างน้อย และยังไม่ครอบคลุมฟองน้ำที่พบในประเทศไทยทั้งหมด (2) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง จังหวัดชลบุรี ซึ่งเป็นจังหวัดที่มีชายฝั่งติดกับทะเล มีความยาวของชายฝั่งทะเลถึง 160 กิโลเมตร และมีเกาะอยู่ไม่น้อยกว่า 46 เกาะ เช่น เกาะสีชัง เกาะคางคาว เกาะล้าน เกาะไผ่ เป็นต้น (2) ทำให้มีการศึกษาเกี่ยวกับฟองน้ำทะเลอยู่บ้าง ทั้งการศึกษาความหลากหลายของฟองน้ำ ที่พบว่าฟองน้ำทะเลบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของไทย ในบริเวณของเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี รวมถึง เกาะมัน และเกาะสะเก็ด จังหวัดระยอง พบว่ามีความหลากหลายทางชีวภาพของฟองน้ำทะเลทั้งสิ้น 54 ชนิด จาก 41 สกุล 31 วงศ์ 10 อันดับ รวมถึงมีการศึกษาการใช้ฟองน้ำเป็นดัชนีในการวัดคุณภาพและตรวจติดตามมลพิษจากโลหะหนัก (3) แต่งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของฟองน้ำทะเลที่พบได้ในจังหวัดชลบุรีหรือบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของไทยยังมีค่อนข้างน้อย

ซึ่งทางคณะผู้ทำวิจัยได้รู้จักฟองน้ำกระชาย (*Coelocarteria singaporensis*) โดยการศึกษาฟองน้ำกระชายนั้นยังไม่ได้มีการศึกษาอย่างละเอียดเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพรวมถึงความหลากหลายขององค์ประกอบทางเคมี เนื่องจากมีงานวิจัยเพียงไม่กี่ฉบับเท่านั้นที่ได้รายงานฤทธิ์ทางชีวภาพของฟองน้ำกระชาย ได้แก่ ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ MKN-45 (humgastric adenocarcinoma) จากสาร coeloc acid ซึ่งเป็นสารสกัดจากตัวอย่างฟองน้ำกระชายจากประเทศอินโดนีเซีย แต่ยังไม่ทราบกลไกในการออกฤทธิ์ (4) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดฟองน้ำกระชายจากประเทศไทย(4) แต่ให้ผลฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดจากตัวอย่างฟองน้ำกระชายที่ต่ำ

ทางกลุ่มผู้วิจัยจึงเห็นถึงความสำคัญในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพจากฟองน้ำกระชาย ซึ่งมีความสนใจในการศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ในการยับยั้ง α -glucosidase และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดจากฟองน้ำกระชาย

2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของฟองน้ำที่ได้จากเกาะไผ่ อ.บางละมุง จ.ชลบุรี
2. เพื่อศึกษาจำนวนองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นจากฟองน้ำกระชายโดยใช้ตัวทำละลายในการสกัดที่ต่างกัน
3. เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง และฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ของสารสกัดจากฟองน้ำกระชายโดยใช้ตัวทำละลายที่ต่างกัน

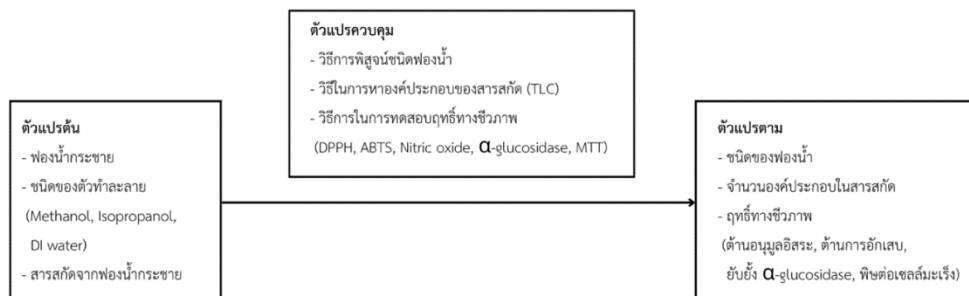
3. สมมติฐาน

1. ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของฟองน้ำที่ได้จากเกาะไผ่ อ.บางละมุง จ.ชลบุรี
2. สารสกัดจากฟองน้ำกระชายมีองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นที่ต่างกัน เมื่อใช้ตัวทำละลายที่ต่างกัน
3. สารสกัดจากฟองน้ำกระชายมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต่างกัน เมื่อใช้ตัวทำละลายที่ต่างกัน

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้เรียนรู้วิธีการพิสูจน์เอกลักษณ์ฟองน้ำเบื้องต้น
2. ทราบถึงจำนวนองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นจากฟองน้ำกระชายโดยใช้ตัวทำละลายในการสกัดที่ต่างกัน
3. ทราบถึงฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง และฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ของสารสกัดจากฟองน้ำกระชายที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน

5. กรอบแนวคิด



6. นิยามศัพท์

1. ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ หมายถึง ความสามารถในการป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยา oxidation เพื่อกำจัดและลดความรุนแรงของ reactive oxygen species (5)
2. ฤทธิ์การต้านการอักเสบ หมายถึง ความสามารถในการลดการผลิตหรือการทำงานของไซโตไคน์ที่ทำให้เกิดการอักเสบ และขัดขวางการเข้าไปในเนื้อเยื่อของ immune cell (5)
3. ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง หมายถึง การออกฤทธิ์ทางเคมีที่เปลี่ยนแปลงการทำงานของเซลล์มะเร็งและทำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตาย (6)
4. ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase หมายถึง ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -glucosidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ในการย่อยแป้งและคาร์โบไฮเดรตให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ในผู้ป่วยเบาหวาน การยับยั้งเอนไซม์นี้สามารถช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดลงได้ (7)
5. องค์ประกอบทางเคมี หมายถึง การรวมกันของสารประกอบที่แตกต่างกันในอัตราส่วนที่ต่างกันของสิ่งมีชีวิตหรือไม่มีชีวิต ซึ่งสารประกอบคือ สารที่เกิดจากธาตุตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไปมารวมตัวโดยปฏิกิริยาเคมี ในอัตราส่วนคงที่เสมอ (8) ตัวอย่างสารประกอบ เช่น ฟลาโวนอยด์ ซึ่งเป็นสารประกอบ ฟีนอล เป็นต้น และการทดสอบองค์ประกอบทางเคมีนั้น มีหลายวิธี เช่น thinlayer chromatography (TLC) ซึ่งเป็นหนึ่งใน chromatographic methods ที่เป็นการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ ในการวิเคราะห์เพื่อให้ทราบถึงองค์ประกอบของสารหรือสารผสม (9)

บทที่ 2

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

1. ข้อมูลทั่วไปฟองน้ำกระชาย

ชื่อ : กระชาย (10)

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Coelocarteria singaporensis* (10)

Classification: Biota > Animalia (Kingdom) > Porifera (Phylum) > Demospongiae (Class) > Heteroscleromorpha (Subclass) > Poecilosclerida (Order) > Coelocarteriidae (Family) > Coelocarteria (Genus) > singaporensis (Species) (11)

ข้อมูลทั่วไป

ฟองน้ำกระชาย มีรูปทรงการเจริญที่เรียกว่า "Fistule" ซึ่งฟองน้ำจะสร้างท่อยืดยาวขึ้นจากลำตัว ฟองน้ำและมักพบฝังตัวในบริเวณพื้นท้องทะเลที่อ่อนนุ่มจากการตกตะกอนซึ่งถ้าเราพบฟองน้ำเหล่านี้ สร้างท่อขึ้นไปสูงมากขึ้นเท่าใดอาจจะสามารถคาดคะเนได้ว่าบริเวณนั้นอาจจะมีการตกตะกอนสูงมาก (3) ฟองน้ำกระชายเป็นฟองน้ำขนาดใหญ่ที่มีลักษณะแข็งแต่เปราะ ครึ่งซีมีลักษณะกลม บางส่วนมักถูกฝังอยู่ในดินหรือตะกอน มีท่อน้ำเข้า (ostia) ที่สั้นและแตกออกเป็นกิ่งก้าน ส่วนท่อน้ำออก (oscula) สำหรับใช้หายใจออกมีเพียงช่องเดียวเป็นรูขนาดใหญ่ โดยทั่วไปฟองน้ำถูกปกคลุมด้วย numerous epibionts เช่น สาหร่าย เปรียง เป็นต้น และจะมองเห็นได้เพียงรูสำหรับหายใจเท่านั้น สารที่แยกได้จากฟองน้ำชนิดนี้เป็นสารใหม่ในกลุ่ม ent-isocopalane diterpenes 2 ชนิด ชื่อว่า coelodiol และ coeloic acid ซึ่งมีการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ (4) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาฟองน้ำ *Coelocarteria agglomerans* ซึ่งเป็นสกุลเดียวกันกับฟองน้ำกระชาย โดยฟองน้ำดังกล่าวถูกนำมาทดสอบด้วยวิธี cholinesterase inhibitory assay และ 5 α -reductase assay พบว่า มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ 5 α -reductase ที่ร้อยละ 52.23 ± 8.81 ส่วนฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase นั้นให้ผลไม่ค่อยดีนัก (13) แต่ทั้งการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ cholinesterase และ ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ 5 α -reductase ยังไม่ใช้การศึกษาที่กลุ่มผู้วิจัยสนใจ จึงไม่ได้มีการนำมาศึกษาในครั้งนี้

2. ข้อมูลยาที่พัฒนาจากฟองน้ำทะเล

ยาจากสารสกัดจากฟองน้ำนั้นได้มีการให้ความสนใจมาตั้งแต่ปี 1950 นั่นคือสาร nucleosides spongothymidine และ nucleosides spongouridine จากฟองน้ำทะเล *Cryptotethia crypta* ซึ่งโครงสร้างของสารทั้ง 2 รายการนี้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ ara-A (Vidarabine) ที่ใช้เป็นยาต้านไวรัส (1) และ ara-C (cytarabine, cytosin arabinoside) ที่ใช้เป็นยาระงับ (1, 12) และได้มีการใช้ ara-C เป็นยาระงับเม็ดเลือดขาวระยะเฉียบพลันชนิดมัยอีลอยด์มากกว่า 40 ปี (12) โดยในปัจจุบัน contemporary approach to acute myeloid leukemia therapy in 2022 แนะนำให้มีการใช้ ara-C เป็นหนึ่งในทางเลือกในการรักษาผู้ป่วยใหม่ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวระยะเฉียบพลันชนิดมัยอีลอยด์ร่วมกับยา venetoclax (VEN) หรือใช้ร่วมกับยาอื่นในการรักษาโรคมะเร็งดังกล่าว (13) นอกจากนี้ ara-C ยังมีการใช้แบบนอกข้อบ่งใช้ ในมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันชนิดลิมโฟยด์ อีกด้วย (14) ส่วน ara-A หรือ vidarabine นั้นเคยมีการรับรองให้ใช้เป็นยาต้านไวรัส herpes viruses และ pox viruses เป็นต้น อย่างไรก็ตาม สารชนิดนี้มีความเป็นพิษสูง และสารทุติยภูมิมีความเสถียรที่ต่ำเมื่อเทียบกับยาต้านไวรัสอื่นๆ เช่น acyclovir หรือ ganciclovir นอกจากนี้ยา vidarabin ในรูปแบบยาฉีดนั้นได้มีการถอนทะเบียนในอเมริกาไปแล้ว เนื่องจากมีช่วงในการรักษาสำหรับต้านไวรัสที่แคบ แต่ยังมีการใช้ในรูปแบบยาตาใน European union (EU) (15) Eribulin Mesylate (EM) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ (synthetic macrocyclic ketone analogue) จากสาร halichondrin B ซึ่งเป็นสารที่สกัดมาจากฟองน้ำทะเล *Halichondria okadai* ซึ่งสาร eribulin mesylate มีการรายงานว่ามีประสิทธิภาพในมะเร็งเต้านมระยะลุกลาม (16, 17) โดยได้รับการรับรองจาก U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (FDA) และ The European Medicines Agency (EMA) สำหรับใช้เป็นยาระงับเต้านม (locally advanced breast cancer or metastatic breast cancer) ในผู้ป่วยที่มีการกำเริบของมะเร็งหลังจากที่ได้รับยาเคมีบำบัดมาแล้วอย่างน้อย 2 แนวทางการรักษา ซึ่งจะต้องรวมถึงได้รับ anthracycline และ taxane มาแล้วหรือไม่เหมาะสมกับยาข้างต้น นอกจากนี้ elibulin mesylate ยังมีการรับรองใน european union ไทย ชองกง เกาหลีใต้ อินเดีย และฟิลิปปินส์ ในการรักษามะเร็งเต้านมในผู้ป่วยที่กำเริบของมะเร็งจากการหลังใช้ยาเคมีบำบัดมาแล้วอย่างน้อย 1 แนวทางการรักษา (18) นอกจากนี้ยาที่ถูกกล่าวไปข้างต้นยังมีสารจากฟองน้ำทะเลที่เคยมีการศึกษาใน clinical trial phases 1 หรือ 2 แต่ในปัจจุบันไม่ได้มีการศึกษาต่อเช่น สาร hemiasterlin จากฟองน้ำ *Hemiasrella minor* สาร discodermolide จากฟองน้ำ *Discodermia dissoluta* และ KRN-7000 จากฟองน้ำ *Agelas mauritianus* ที่เคยศึกษาเป็นยารักษามะเร็ง หรือ สารสกัดจากฟองน้ำ *Petrosia contignata* ที่เคยศึกษาเป็นยาสำหรับโรคหอบหืด (15)

3. ข้อมูลฟองน้ำและสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

จากการทบทวนวรรณกรรมพบการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากฟองน้ำทะเลในประเทศไทยเพียงงานวิจัยเดียวที่คณะผู้วิจัยพบ โดยเป็นงานวิจัยที่ทำการศึกษาคัดฟองน้ำ 20 ชนิด โดยมีฟองน้ำกระชายเป็นหนึ่งในตัวอย่างที่ทำการศึกษาคัดด้วย ตัวอย่างจะถูกนำมาสกัดด้วยเมทานอล แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 3 วิธีคือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging assay (DPPH assay), 2,2'-Azinobis- (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid assay (ABTS assay) และ ความสามารถในการรวมตัวกับเหล็ก (ferrous chelating ability) ซึ่งจากการทดสอบ พบว่าที่ความเข้มข้น 1 mg/mL ฟองน้ำกระชายนั้นยังมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ไม่ถึงร้อยละ 90 โดยให้ผลการทดสอบ DPPH และ ABTS assay เท่ากับ 27.03 ± 1.51 และ 30.86 ± 3.25 ตามลำดับ ทำให้ไม่ได้มีการนำไปศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ตัวทำละลายที่ต่างกัน แต่จากการศึกษาพบว่าในการใช้ตัวทำละลายที่ต่างกันทำให้ได้ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ต่างกัน (4) นอกจากนี้จากการทบทวนวรรณกรรมยังไม่พบการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของฟองน้ำกระชายในต่างประเทศ รวมถึงไม่พบการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของฟองน้ำใน Coelocarteriidae family และเมื่อทำการทบทวนวรรณกรรมการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในฟองน้ำที่พบในไทย และต่างประเทศ พบการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ พบการศึกษาในฟองน้ำชนิดอื่นๆ เช่น

Xestospongia testudinaria จากการศึกษาในต่างประเทศพบว่าที่ความเข้มข้น 7.2 $\mu\text{g/mL}$ เมื่อทดสอบโดยใช้ DPPH assay ได้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ 59.59% และ ABTS assay ได้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ 62.79% (19) แต่การศึกษาในไทยพบว่า สารสกัดเมทานอลมีค่า inhibitory-concentration ที่ 50% (IC_{50}) เท่ากับ 474.6 $\mu\text{g/mL}$ (4)

Neopetrosia exigua จากการศึกษาตัวอย่างจาก Amber island ที่อยู่ทางตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศมอริเชียสในทวีปแอฟริกาตะวันออก โดยมีการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่า สารสกัดฟองน้ำโดยใช้ Hexane, Ethyl acetate และน้ำ และนำมาทำการทดสอบด้วย 5 วิธี คือ DPPH assay, superoxide radical scavenging, nitric oxide radical scavenging, iron chelating และ inhibition of deoxyribose degradation พบว่าชั้นที่ให้ผลที่ดีที่สุดของทั้ง 5 การทดสอบคือ สารสกัดจากชั้น ethyl acetate (20) ส่วนการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของฟองน้ำชนิดนี้ในไทยนั้น

พบว่าเมื่อเทียบตัวทำละลายในการสกัดที่แตกต่างกัน 3 ชนิด คือ methanol, acetone และ dichloromethane ด้วยการทดสอบ 2 วิธี คือ DPPH assay และ ABTS assay พบว่าสารสกัดจาก methanol ให้ผลการทดสอบดีที่สุดโดยได้ค่า IC_{50} เท่ากับ 608.5 $\mu\text{g/mL}$ และ 208.3 $\mu\text{g/mL}$ จากการทดสอบด้วย DPPH และ ABTS assay ตามลำดับ (4)

4. ข้อมูลฟองน้ำและสารสำคัญที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ

จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าฟองน้ำในคลาส demospongiae หลายชนิดมีฤทธิ์ด้านการอักเสบ เช่น กับฟองน้ำทะเล *Neopetrosia compacta* ซึ่งทำการทดลองโดยสกัดสารจากฟองน้ำในตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกัน 3 ชนิด คือ n-hexane, dichloromethane: methanol (4:1) และ methanol พบว่ามีสาร xestoquinone, adociaquinone B, adociaquinone A, 14-hydroxymethylxestoquinone, 15-hydroxymethylxestoquinone และส่วนผสมของ 14 กับ 15-methoxyquinone ในอัตราส่วน 2:1 เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบด้วยวิธีทดสอบการยับยั้ง nitric-oxide ในเซลล์ RAW264.7 (เซลล์ macrophages ที่ได้จากหนู) ที่กระตุ้นการอักเสบด้วย LPS (lipopolysaccharides) พบว่าสารประกอบเหล่านี้สามารถยับยั้งการผลิต nitric oxide ได้ตามความเข้มข้นที่สูงขึ้น โดยมีค่า IC_{50} ที่ $1.2 \pm 0.10 \mu\text{M}$, $1.92 \pm 0.72 \mu\text{M}$, $2.1 \pm 0.17 \mu\text{M}$, $2.5 \pm 0.39 \mu\text{M}$, 4.0 ± 2.4 และ $1.4 \pm 0.56 \mu\text{M}$ ตามลำดับ ซึ่งสารประกอบ 14-hydroxymethylxestoquinone, 15-hydroxymethylxestoquinone และส่วนผสม 14-methoxyxestoquinone กับ 15-methoxyxestoquinone มีค่า IC_{50} ต่ำ รวมถึงมีค่า selectivity index อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ (23) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการสกัดสารจากฟองน้ำ *Luffariella variabilis* เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง NMR พบว่ามีสาร manoalide (24) โดยในภายหลังมีการศึกษาที่ทำการศึกษาศักยภาพด้านการอักเสบของสาร manoalide ซึ่งพบว่า manoalide เป็นตัวยับยั้งที่แรงของ phospholipase A_2 โดยมีค่า IC_{50} ที่ $1.7 \mu\text{M}$ (25) รวมไปถึงการศึกษาศักยภาพการทดลองสกัดสารจากฟองน้ำ *Xestospongia bergquistia* ในตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกัน 2 ชนิด คือ toluene และ methanol พบว่ามีสารสเตียรอยด์ xestobergsterol A และ xestobergsterol ซึ่งสารทั้งสองชนิดนี้เป็นตัวยับยั้งการปลดปล่อย histamine จาก mast cell ในหนูทดลองโดย xestobergsterol A และ xestobergsterol B มีค่า IC_{50} ที่ $0.05 \mu\text{M}$ และ $0.10 \mu\text{M}$ ตามลำดับ

5. ข้อมูลฟองน้ำและสารสำคัญที่มีฤทธิ์ α -glucosidase inhibitor

สาร 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase สามารถสกัดได้จากฟองน้ำชนิด *Haliclona* sp. และ *Raispalia* sp. พบได้ที่ฝั่งตะวันตกของออสเตรเลีย โดยตรวจสอบจากวิธี liquid chromatography-mass spectrometer (LC-MS) พบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของ α -glycosidase ได้ (21) และมีรายงานที่กล่าวถึงการทดลองสกัดสารจากฟองน้ำ 47 สายพันธุ์ที่เก็บในน่านน้ำ Mauritius พบว่าในจำนวน 141 สารที่สกัดได้ มีเพียง 10 สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่มากกว่าร้อยละ 85 นอกจากนี้ 8 สารมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ร้อยละ 70 – 84 และมี 18 สารมีฤทธิ์ยับยั้งที่อยู่ในช่วงร้อยละ 50 – 69 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดที่ได้วิเคราะห์โดยวิธี LC-MS และเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์จาก IC_{50} เปรียบเทียบกับ acarbose ซึ่งใช้เป็น positive control โดยสารสกัดในชั้นเมทานอลที่ได้จากฟองน้ำชนิด *Echinodictyum pykei* (EPM) และ *Acanthostylotella* sp. (ASSM) พบว่าการทำงานของเอนไซม์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเหลือเพียงร้อยละ 21.8 (ยับยั้งร้อยละ 78.2) และ 37.1 (ยับยั้งร้อยละ 62.9) (22)

6. ข้อมูลฟองน้ำและสารสำคัญที่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม

จากการทบทวนวรรณกรรมนั้นยังไม่มีการศึกษา cytotoxic activity ต่อเซลล์มะเร็งเต้านมในฟองน้ำกระชายทั้งในไทยและต่างประเทศ แต่การศึกษาในฟองน้ำชนิดอื่นที่พบในไทยนั้นยังพอมียูบ่าง เช่น สาร kuanoniamines A และ C ที่ได้จากการสกัดจากฟองน้ำ *Oceanapia sagittaria* จากเกาะเสม็ด โดยนำตัวอย่างมาสกัดด้วย ethyl acetate จากนั้นนำมาทดสอบกับ human tumour cell lines คือ MCF-7 (breast carcinoma, estrogen-dependent ER+), MDA-MB-231 (breast carcinoma, estrogen-independent ER-), SF-268 (glioma), NCI-H460 (non small cell lung cancer), UACC-62 (melanoma), and a non-tumors human cell line MRC-5 (diploid embryonic lung fibroblast) พบว่าทั้งสาร Kuanoniamines A และ C มีศักยภาพในการยับยั้ง MCF-7 cells เป็นอย่างมาก (23)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในต่างประเทศ เช่น สารสกัดจาก *Hyrtios erectus* จากทะเลอันดามัน ประเทศอินเดีย โดยใช้ตัว n-hexane ในการสกัดแล้วจึงนำมาทดสอบกับ MCF-7 cells พบว่า มีศักยภาพในการยับยั้ง MCF-7 cells โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 50 และ 25.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ (24) หรือสารสกัดจาก *Xestospongia testudinaria* โดยใช้ methanol และ n-hexane พบว่ามีฤทธิ์ anticancer ต่อ Human cervical cancer (HeLa) และสารสกัดจาก methanol ยังพบฤทธิ์ anticancer ต่อ human cervical cancer (HeLa) และ MCF-7 cells (19, 25)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. ตัวอย่างฟองน้ำที่ใช้ในการศึกษา

ฟองน้ำกระชาย (*Coelocarteria singaporensis*) ซึ่งเป็นฟองน้ำทะเลที่เก็บได้จากเกาะไผ่ อ. บางละมุง จังหวัดชลบุรี โดยวิธีการดำน้ำลึก (scuba diving) ในระหว่างที่อยู่บนเรือจะเก็บตัวอย่างไว้ในถุงซิปล็อคและแช่ในกระติกน้ำแข็งทันทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงขนส่งมายัง คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

2. สารเคมี อุปกรณ์ และเครื่องมือ

2.1. สารเคมี

- 2.1.1. ABTS (2,2'-azino-bis)
- 2.1.2. Anisaldehyde- H_2SO_4
- 2.1.3. Antibiotic-antimycotic solution
- 2.1.4. Ascorbic acid
- 2.1.5. DI water
- 2.1.6. Dichloromethane
- 2.1.7. DMEM (Dulbecco's modified eagle medium)
- 2.1.8. DMSO (Dimethyl sulfoxide)
- 2.1.9. Ethyl acetate
- 2.1.10. FBS (Fetal bovine serum)
- 2.1.11. Griess reagent
- 2.1.12. Hexane
- 2.1.13. Ibuprofen

- 2.1.14. Isopropanol
- 2.1.15. LPS (Lipopolysaccharides)
- 2.1.16. Methanol
- 2.1.17. P-nitrophenyl-D-glucopyranoside (PNPG)
- 2.1.18. Potassium persulfate
- 2.1.19. Silica gel
- 2.1.20. α -glucosidase

2.2. อุปกรณ์ และเครื่องมือ

- 2.2.1. 96-well plate
- 2.2.2. Beakers
- 2.2.3. Capillary tube
- 2.2.4. Centrifuge machine
- 2.2.5. Cutting boards
- 2.2.6. Cylinders
- 2.2.7. Dropper tubes
- 2.2.8. Eppendorf tubes
- 2.2.9. Freeze dryer
- 2.2.10. Incubator
- 2.2.11. Knives
- 2.2.12. MCF-7 cell line
- 2.2.13. Micropipettes
- 2.2.14. Microplate reader
- 2.2.15. Pipette tips
- 2.2.16. Plastic bags
- 2.2.17. RAW264.7
- 2.2.18. Rotary evaporator

2.2.19. Sonicator

2.2.20. Stirring rods

2.2.21. UV-VIS Spectrophotometer

2.2.22. Volumetric flask

2.2.23. Weighing Scale

3. วิธีวิจัย

3.1. การเตรียมตัวอย่าง

ชั่งน้ำหนักเปียก (wet weight) ตัวอย่างฟองน้ำทะเล และแช่แข็งไว้ที่ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป

3.2. การพิสูจน์เอกลักษณ์ตัวอย่าง

ตัวอย่างฟองน้ำที่เก็บได้จะนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานเบื้องต้น เพื่อแยกชนิดของฟองน้ำโดยการศึกษาลักษณะของเนื้อเยื่อ (spongin fiber) บริเวณตัวกับท่อนของฟองน้ำ และศึกษาลักษณะหนามฟองน้ำ (spicule) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การพิสูจน์เอกลักษณ์ของฟองน้ำโดยละเอียดจะดำเนินการโดยการส่งตัวอย่างไปสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา เพื่อทำการพิสูจน์เอกลักษณ์โดย ดร.สุเมตต์ ปุจฉาการ ซึ่งตัวอย่างที่นำมาศึกษามีทั้งหมด 2 ตัวอย่าง ซึ่งลักษณะภายนอกมีความแตกต่างกัน

3.3. การทำแห้งตัวอย่าง

ทำแห้งตัวอย่างฟองน้ำด้วยวิธีการแช่เยือกแข็ง (freeze dry) โดยจะหั่นฟองน้ำเป็นชิ้นเล็ก ๆ จากนั้นแยกสิ่งแปลกปลอมออกจากเนื้อเยื่อฟองน้ำ แล้วนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง freeze dry จนตัวอย่างแห้ง และบันทึกน้ำหนักตัวอย่างแห้ง

3.4. การตรวจสอบกลุ่มสาร

นำผงแห้งตัวอย่างสารสกัด 2.5 mg ละลายด้วย 95% EtOH 1 mL แล้วนำไปทดสอบด้วยน้ำยาทดสอบ

3.4.1. การทดสอบสารกลุ่ม flavonoids

ทดสอบด้วย Cyanidin test โดยนำตัวอย่างสารสกัด 50 μ L ใส่ Mg ribbon 1 ชิ้น แล้วเติมกรด HCl เข้มข้น 20 μ L ผล positive ให้สีชมพู ส้ม แดง

3.4.2. การทดสอบสารกลุ่ม phenolic compounds

ทดสอบด้วย Felic chloride test โดยนำตัวอย่างสารสกัด 50 μ L เติม FeCl_3 10% 20 μ L ผล positive ให้ตะกอนสีน้ำเงินดำหรือเขียวน้ำตาล

3.4.3. การทดสอบสารกลุ่ม alkaloids

เตรียมกลุ่ม control แบ่งกระจกสไลด์ออกเป็นสองส่วน ส่วนแรก นำตัวอย่างสารมา 10 μ L เติม ethanol 10 μ L และส่วนที่สอง นำตัวอย่างสารมา 10 μ L เติม ethanol 10 μ L จากนั้นเติม 5% HCl 20 μ L จากนั้นนำมาทดสอบด้วย reagent ต่างๆ โดยนำตัวอย่างมา 10 μ L หยดลงบนกระจกสไลด์ เติม 5% HCl 20 μ L จากนั้นทดสอบด้วยการเติม reagent ต่างๆ ปริมาณ 10 μ L ได้แก่ Dragendorff's reagent ผล positive จะเกิดตะกอนสีแดงส้ม Mayer's reagent ผล positive จะเกิดตะกอนสีขาวครีม Wagner's reagent ผล positive จะเกิดตะกอนสีแดงน้ำตาล และ Hager's reagent ผล positive จะเกิดตะกอนผลึกสีเหลือง

3.4.4. การทดสอบสารกลุ่ม triterpenes และ steroids

ทดสอบด้วย Liebermann-Burchard test โดยใส่ตัวอย่างสารสกัดปริมาณ 50 μ L ลงในถ้วยกระเบื้องและนำไประเหยแห้ง จากนั้นเติม acetic anhydride 20 μ L และ sulfuric acid เข้มข้นปริมาณ 20 μ L ตามลำดับ สังเกตสีทันที หากมี triterpenes จะเกิดสีน้ำตาลอมแดง ส่วน steroids จะเกิดสีเขียวอมม่วง

3.4.5. การทดสอบสารกลุ่ม tannins

เจือจางสารสกัด 95% EtOH ด้วย DI water ให้เป็น 30% EtOH และนำไปทดสอบด้วย
น้ำยาทดสอบต่าง ๆ

- 3.4.5.1. วิธี gelatin solution test โดยนำตัวอย่างสารสกัด 500 μ L เติม gelatin solution 500 μ L
ผล positive เกิดตะกอนสีขาวคั่งตัว
- 3.4.5.2. วิธี ferric chloride test โดยนำตัวอย่างสารสกัด 500 μ L เติม FeCl_3 1%
500 μ L ผล positive เกิดตะกอนสีน้ำเงินดำ หรือสีเขียวน้ำตาล
- 3.4.5.3. วิธี lime water test โดยนำตัวอย่างสารสกัด 500 μ L เติม lime water 500
 μ L ผล positive เกิดตะกอนขาวเหลืองเหลืองเงินเทา
- 3.4.5.4. วิธี vanillin reagent test โดยนำตัวอย่างสารสกัด 500 μ L ใส่ลงถ้วยตะไล
แล้วนำไป ระเหยแห้ง จากนั้นเติม vanillin T.S. 500 μ L ผล positive ให้สีแดง

3.4.6. การทดสอบสารกลุ่ม saponinทดสอบโดย foam test

นำผงแห้งสารสกัดตัวอย่าง 1 mg ละลาย DI water 2 mL แบ่งใส่หลอดทดลอง 2 หลอด
หลอดละ 1 mL หลอดแรกเติม 5% HCl 500 μ L หลอดที่สองเติม DI water 500 μ L จากนั้น
เขย่าหลอดแรง ๆ 1 นาที และสังเกตฟองหลังจากเขย่า 30 นาที ผล positive ความคงตัวของ
ฟอง 30 นาที

3.5. การสกัดตัวอย่างด้วยตัวทำละลาย

นำตัวอย่างแห้ง 016 และ 017 มาลดขนาดให้เล็กลงแล้วแบ่งออกเป็น 2 ส่วนเท่า ๆ กัน

- 3.5.1. ส่วนที่ 1 นำมาสกัดด้วย methanol (AR grade) โดยใช้อัตราส่วนระหว่างตัวอย่างฟองน้ำแห้งต่อ
methanol เท่ากับ 1 g : 10 mL นำตัวอย่างไป sonicate นาน 5 นาที แล้ว centrifuge
(5 นาที, 15000 rpm) เก็บสารสกัด จากนั้นสกัดกากตัวอย่างฟองน้ำซ้ำด้วย methanol
จนสารสกัดที่ได้สีซีดจางลงจนคงที่ แล้วเก็บสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วย methanol
ในแต่ละครั้งมารวมกัน ก่อนนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator
และบันทึกน้ำหนักสารสกัด methanol ที่ทำการสกัดได้

3.5.2. ส่วนที่ 2 นำมาสกัดด้วยน้ำ (DI water) โดยใช้อัตราส่วนระหว่างฟองน้ำแห้งต่อน้ำเท่ากับ 1 g : 10 mL จากนั้นนำไป sonicate นาน 5 นาที แล้ว centrifuge (5 นาที, 15000 rpm) เก็บสารสกัด จากนั้นสกัดกากตัวอย่างฟองน้ำซ้ำด้วยน้ำจนกว่าจะได้สารสกัดที่มีสีซีดจางลงที่ แล้วเก็บสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำมารวมกันก่อนนำไปทำแห้งด้วยวิธี freeze dry และบันทึกน้ำหนักสารสกัดน้ำที่ได้ จากนั้นนำกากที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำมาสกัดต่อด้วย isopropanol โดยใช้อัตราส่วนระหว่างตัวอย่างฟองน้ำแห้งต่อ isopropanol เท่ากับ 1 g : 10 mL นำตัวอย่างไป sonicate นาน 5 นาที แล้ว centrifuge (5 นาที, 15000 rpm) เก็บสารสกัดในครั้งแรก ไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator และบันทึกน้ำหนักสารสกัด isopropanol ผสมน้ำ จากนั้นสกัดกากตัวอย่างฟองน้ำด้วย isopropanol จนได้สารสกัดที่มีสีซีดจางลงจนคงที่ เก็บสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วย isopropanol แต่ ละครั้งมารวมกัน ก่อนระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator บันทึกน้ำหนัก สารสกัด isopropanol ที่สกัดได้ และจะมีการแบ่งรหัสของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้ตาม ตารางที่ 1

ตารางที่ 1 รหัสของตัวอย่างทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่าง	ตัวทำละลาย	รหัส
016	Methanol	C1.1
016	Isopropanol	C1.2
016	Isopropanol + น้ำ	C1.3
016	น้ำ	C1.4
017	Methanol	C2.1
017	Isopropanol	C2.2
017	Isopropanol + น้ำ	C2.3
017	น้ำ	C2.4

3.6. การตรวจสอบจำนวนองค์ประกอบของสารสกัด

สารสกัดฟองน้ำที่สกัดได้จากตัวทำละลาย methanol น้ำ และ isopropanol จะถูกนำมาทดสอบด้วยวิธี TLC เพื่อศึกษาจำนวนชนิดขององค์ประกอบทางเคมี จากจำนวน spot ของสารที่พบบน TLC chromatogram การทดสอบเริ่มจากการเตรียมสารสกัดให้เป็นสารละลาย ความเข้มข้น 2 mg/mL โดยละลายตัวอย่างใน methanol (AR grade) จากนั้นนำมาทดสอบ TLC โดย spot ตัวอย่าง 5 μ L ลงบนแผ่น TLC ที่มี stationary phase เป็น silica gel และใช้ mobile phase 2 ระบบ ได้แก่ hexane : ethyl acetate (3:2) และ dichloromethane : methanol (9:1) การศึกษา spot ที่เกิดขึ้นใช้ UV 254 nm UV 365 nm และ anisaldehyde-H₂SO₄ เป็น spraying reagent

3.7. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.7.1. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging assay (DPPH assay)

การวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay โดยใช้ L-ascorbic acid และ Trolox ที่ความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625 และ 0.7812 μ g/mL เป็นสารมาตรฐานจากนั้นเลือกช่วงมาสร้างกราฟมาตรฐาน ในการคัดเลือกตัวอย่างเพื่อหาค่า IC₅₀ จะมีการเตรียมสารละลายตัวอย่างฟองน้ำโดยจะนำสารตัวอย่างแห้ง 5 mg มาละลายด้วย methanol 1 mL (stock solution 5000 μ g/mL) จากนั้นใส่สารตัวอย่างลงใน 96-well plate ปริมาตร 20 μ L และเติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 mM ปริมาตร 80 μ L ลงในหลุมในแต่ละหลุม จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของตัวอย่าง 1000 μ g/mL ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาทีในที่มืด สำหรับ blank คือ สารตัวอย่าง 20 μ L ผสมกับ methanol 80 μ L ส่วน control คือ methanol 20 μ L ผสมกับสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 mM ปริมาตร 80 μ L จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader แล้วนำข้อมูลที่ได้นำไปคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ (% radical scavenging) ได้จากสมการ

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

เมื่อ

A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm ของสาร control

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm ของสารตัวอย่าง

A_{blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm ของ blank

จากนั้นจะคัดเลือกตัวอย่างที่ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ มากกว่าร้อยละ 80 มาทดสอบใช้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ต่างกัน 5 ความเข้มข้น คือ 1000 500 250 125 และ 625 $\mu\text{g/mL}$ ส่วนตัวอย่างที่ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระไม่ถึงร้อยละ 80 แต่มากกว่าร้อยละ 60 จะทดสอบโดยใช้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ต่างกัน 5 ความเข้มข้น คือ 2000, 1000, 500, 250 และ 125 $\mu\text{g/mL}$

และเมื่อคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ (% radical scavenging) ของแต่ละความเข้มข้นแล้วจึงนำไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ (% radical scavenging) ในแนวแกนตั้ง (y) กับความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ระดับต่าง ๆ ในแนวแกนนอน (x) เพื่อคำนวณหาค่า inhibitory concentration ที่ร้อยละ 50 (IC_{50})

3.7.2. การวิเคราะห์โดย 2,2'-Azinobis- (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid assay) (ABTS assay)

การวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay โดยใช้ L-ascorbic acid และ Trolox ที่ความเข้มข้น 100 50 25 12.5 6.25 3.125 1.5625 และ 0.7812 $\mu\text{g/mL}$ เป็นสารมาตรฐานจากนั้นเลือกช่วงมาสร้างกราฟมาตรฐาน โดยก่อนการทดสอบจะมีการเตรียมสารละลาย ABTS stock solution โดยการละลาย ABTS ด้วย methanol ให้ได้ความเข้มข้น 7 mM จากนั้นผสมกับ potassium persulfate ความเข้มข้น 2.45 mM ในอัตราส่วน 1:1 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 12-16 ชั่วโมงในที่มืด จากนั้นเตรียม ABTS working solution เพื่อใช้ในการทดสอบ โดยผสม stock solution 1 mL กับ methanol 40 mL โดยก่อนการทดสอบฤทธิ์ radical scavenging ของสารสกัด จะควบคุมค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ของสารละลาย ABTS working solution ให้อยู่ในช่วง 0.700 ± 0.02

โดยการเจือจางด้วย methanol หากค่าการดูดกลืนแสงมีค่าเกินกว่าช่วงที่กำหนด ในการคัดเลือกตัวอย่างเพื่อหาค่า IC_{50} จะมีการเตรียมสารละลายของสารสกัดพองน้ำ โดยละลายสารตัวอย่างแห้ง 5 mg ใน methanol 1 mL (stock solution 5000 $\mu\text{g/mL}$) ใส่ลงใน 96-well plate ปริมาตร 20 μL จากนั้นเติมสารละลาย ABTS working solution ปริมาตร 80 μL ลงในหลุมแต่ละหลุม จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของตัวอย่าง 1000 $\mu\text{g/mL}$ ตั้งทิ้งไว้ในที่มีอุณหภูมิห้อง นาน 6 นาที สำหรับ blank คือ สารตัวอย่าง 20 μL ผสมกับ methanol 80 μL ส่วน control คือ methanol 20 μL ผสมกับสารละลาย ABTS working solution 80 μL นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ด้วยเครื่อง microplate reader จากนั้น คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ (% radical scavenging) ได้จากสมการ

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

เมื่อ

A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ของ control

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ของสารละลายตัวอย่าง

A_{blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ของ blank

จากนั้นจะคัดเลือกตัวอย่างที่ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ มากกว่าร้อยละ 80 มาทดสอบใช้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ต่างกัน 5 ความเข้มข้น คือ 1000 500 250 125 และ 62.5 $\mu\text{g/mL}$ ส่วนตัวอย่างที่ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระไม่ถึงร้อยละ 80 แต่มากกว่าร้อยละ 60 จะทดสอบโดยใช้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ต่างกัน 5 ความเข้มข้น คือ 2000 1000 500 250 และ 125 $\mu\text{g/mL}$

และเมื่อคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ (% radical scavenging) ของแต่ละความเข้มข้นแล้วจึงนำไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ (% radical scavenging) ในแนวแกนตั้ง (y) กับความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ระดับต่าง ๆ ในแนวแกนนอน (x) เพื่อคำนวณหาค่า inhibitory concentration ที่ร้อยละ 50 (IC_{50})

3.7.3. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยการทดสอบการยับยั้งการหลั่ง Nitric oxide

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยการทดสอบการยับยั้งการหลั่ง Nitric oxide โดยเลี้ยงเซลล์ RAW264.7 (เซลล์ macrophages ที่ได้จากหนู) ในอาหาร DMEM ที่ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum (FBS), 1% antibiotic-antimycotic solution ใน 24 well plate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของ CO₂ 5% ก่อนทำการทดลอง จากนั้นเตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้น 250 125 61.5 31.25 และ 15.625 µg/mL ใช้ Ibuprofen เป็น positive controls และเซลล์ที่ไม่ได้ใส่ Ibuprofen เป็น negative control ทั้งไว้เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นเติม lipopolysaccharide (LPS) 1 µg/mL เป็นตัวกระตุ้นการอักเสบ แล้วเลี้ยงเซลล์ต่อที่สภาวะปกติเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา ดูด supernatant จาก cell culture plate ปริมาตร 50 µL ลงใน 96 well plate และเติม Griess reagent หลุมละ 50 µL แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm คำนวณหา % inhibition ได้จากสมการ

$$\% \text{ inhibition of NO production} = [(OD_{\text{control}} - OD_{\text{sample}})/OD_{\text{control}}] \times 100$$

เมื่อ

OD_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ไม่ได้เติม Ibuprofen - ค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเซลล์

OD_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่เติมสารสกัดตัวอย่าง - ค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเซลล์

จากนั้นสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดและความสามารถในการยับยั้ง nitric oxide ในการคำนวณหา IC₅₀

3.7.4. การวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase

การวิเคราะห์ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ใช้ acarbose ที่ความเข้มข้น 12500, 6250, 3125, 1562.5, 781.25, 390.625, 195.3125 และ 97.65625 µg/mL เป็นสารมาตรฐานในการทดสอบ ขั้นตอนแรกเตรียมสารละลายตัวอย่างที่จะ

ใช้ทดสอบโดยละลายสารสกัดปริมาณ 5 mg ใน 50% Dimethyl sulfoxide (DMSO) 5 mL (stock solution 1 mg/mL) จากนั้นเตรียมสารละลายเอนไซม์ α -glucosidase ความเข้มข้น 1 unit/mL และ p-nitrophenyl-D-glucopyranoside (PNPG) ความเข้มข้น 20 mM โดยใช้ 0.1M phosphate buffer pH 7.0 เป็นตัวทำละลาย ในขั้นตอนการทดสอบเติมสารละลายตัวอย่าง 50 μ L ลงใน 96-well plate จากนั้นเติม phosphate buffer 50 μ L และสารละลายเอนไซม์ 50 μ L ตามลำดับ ทิ้งไว้ใน incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เมื่อครบเวลาให้เติมสารละลาย PNPG 50 μ L ทิ้งไว้ใน incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารตัวอย่างที่ 250 μ g/mL ใช้ blank คือ สารตัวอย่าง 50 μ L ผสมกับ phosphate buffer 150 μ L และ control คือ 50% DMSO 50 μ L ผสมกับ phosphate buffer 50 μ L สารละลายเอนไซม์ 50 μ L และสารละลาย PNPG 50 μ L นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 405 nm แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหา %inhibition ของเอนไซม์ α -glucosidase ได้จากสมการ

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

เมื่อ

A_C = Absorbance ของ control

A_1 = Absorbance ของตัวอย่าง

A_0 = Absorbance ของ blank

จากนั้น สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารตัวอย่าง (แกน x) และ % inhibition (แกน y) เพื่อสร้างสมการในการคำนวณหา IC_{50}

3.7.5. การวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม โดยวิธี MTT assay

การวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม โดยวิธี MTT assay โดยเป็นเซลล์ MCF-7 Cell line (Human breast carcinoma) ในอาหาร DMEM ที่ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum (FBS), 1% antibiotic-antimycotic solution ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของ CO_2 5% โดยนำเซลล์มาเพาะเลี้ยงใน 96-well plate ที่

ความหนาแน่น 8,000 เซลล์ ต่อหลุม และบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารสกัดตัวอย่างแต่ละชั้นที่ได้จากแต่ละวิธีที่ความเข้มข้น 1000, 500, 250, 125, และ 62.5 μL ใส่ลงใน 96-well plate แล้วทำการบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ 24 ชั่วโมง จากนั้น เติม MTT (ละลายใน PBS ที่ความเข้มข้น 5 mg/ml) 25 μL ลงในแต่ละหลุม แล้วทำการบ่มต่อในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ 2 ชั่วโมง นำอาหารเดิมออก จากนั้นเติม DMSO 100 μL เพื่อละลายผลึกฟอร์มาซาน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate reader จากนั้นคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ได้จากสมการ

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

เมื่อ

A_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ไม่ได้เติมตัวอย่าง - ค่าการดูดกลืนแสงของ DMSO

A_1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ถูกเติมตัวอย่าง - ค่าการดูดกลืนแสงของ DMSO

จากนั้นสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ในแนวแกนตั้งกับความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ระดับต่างๆ ในแนวแกนนอน และคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ฆ่าเซลล์ตายได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน

และคำนวณปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตจากการเติมสารสกัด ได้จากสมการ

$$\% \text{ Viability} = (A_1/A_0) \times 100$$

เมื่อ

A_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ไม่ได้เติมสารสกัด - ค่าการดูดกลืนแสง DMSO

A_1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ถูกเติมด้วยสารสกัด - ค่าการดูดกลืนแสงของ DMSO

3.7.6. การวิเคราะห์ทางสถิติ

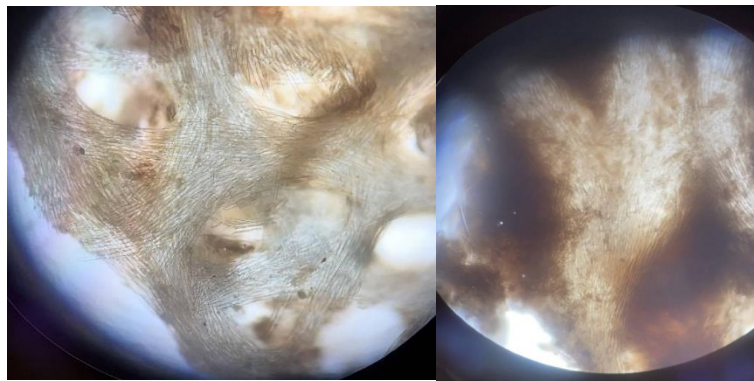
การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ จะมีทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และรายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SD. ความแตกต่างทางสถิติทดสอบโดย student t-test และ one way ANOVA โดยมีค่าความเชื่อมั่นที่ 95% confidence interval

บทที่ 4

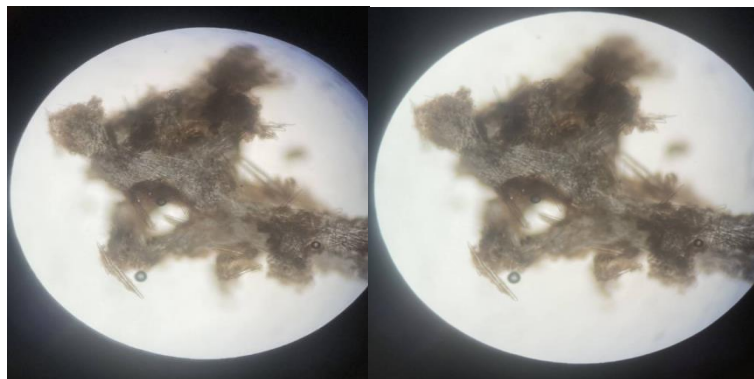
ผลการทดลอง

1. ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ตัวอย่าง

การศึกษาลักษณะของเนื้อเยื่อ (spongin fiber) บริเวณตัวกับท่อนของฟองน้ำ และลักษณะหนามฟองน้ำ (spicule) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในตัวอย่างฟองน้ำรหัส 016 และฟองน้ำรหัส 017 ให้ผลดังรูปภาพที่ 1-4



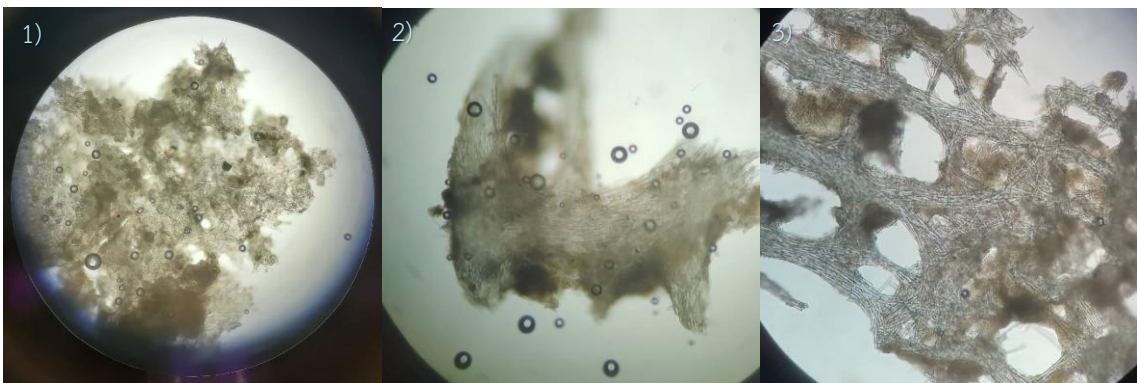
รูปที่ 1 ลักษณะโครงสร้างผิวนอกของฟองน้ำกระชาย



รูปที่ 2 ลักษณะโครงสร้างเนื้อของฟองน้ำกระชาย



รูปที่ 3 ลักษณะ spicule ของฟองน้ำกระชาย



รูปที่ 4 ลักษณะโครงสร้างของฟองน้ำท่อพุ่มแดง 1) ผิวบริเวณตัว 2) เนื้อบริเวณตัว 3) ผิวบริเวณท่อ

จากผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ตัวอย่างฟองน้ำรหัส 016 ด้วยคู่มือจำแนกอันดับฟองน้ำทะเลในประเทศไทย โดย ดร.สุเมตต์ ปุจฉาการ จากกองวิจัยสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา พบว่าฟองน้ำรหัส 016 เป็นฟองน้ำที่มีโครงสร้างร่างกายประกอบด้วยหนามฟองน้ำ และเส้นใยฟองน้ำ แสดงให้เห็นว่าฟองน้ำรหัส 016 เป็นฟองน้ำใน class Demospongiae นอกจากนี้ยังพบว่าฟองน้ำรหัส 016 เป็นฟองน้ำที่ไม่มีหนามฟองน้ำเป็นแท่งสี่แฉก ไม่มีหนามฟองน้ำรูปเข็มหมุด ไม่มีหินปูนเป็นองค์ประกอบในส่วนหนาม แต่มีซิลิกาเป็นองค์ประกอบในส่วนหนาม ซึ่งโครงสร้างร่างกายฟองน้ำที่พบมีหนามฟองน้ำแบบ Echinatin Oxea และ Palmate chelae แสดงให้เห็นว่าฟองน้ำรหัส 016 เป็นฟองน้ำใน Order Poecilosclerida โดยในภายหลัง ได้มีการยืนยันการพิสูจน์เอกลักษณ์โดย ดร.สุเมตต์ ปุจฉาการ ทำให้ทราบว่าฟองน้ำรหัส 016 คือ ฟองน้ำกระชาย (*Coelocarteria singaporensis*) และจากข้อมูลการศึกษาฟองน้ำกระชายในต่างประเทศ พบว่าฟองน้ำกระชายจะมีการจัดเรียงโครงสร้างสานกันเป็นตา

ข่ายหลายชั้น(26, 27) และหนามของฟองน้ำมีลักษณะแบบ oxea strongyle toxa และ palmate chaelae(26-31) ซึ่งพบได้ในผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของฟองน้ำรหัส 016 จึงเป็นข้อมูลสนับสนุนได้ว่า ฟองน้ำรหัส 016 คือ ฟองน้ำกระชาย

จากผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ตัวอย่างฟองน้ำรหัส 017 ด้วยคู่มือจำแนกอันดับฟองน้ำทะเลในประเทศไทย โดย ดร.สุเมตต์ ปุจฉาการ จากกองวิจัยสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา พบว่าฟองน้ำรหัส 017 เป็นฟองน้ำที่มีโครงสร้างร่างกายประกอบด้วยหนามฟองน้ำ และเส้นใยฟองน้ำ แสดงให้เห็นว่าฟองน้ำรหัส 017 เป็นฟองน้ำใน class Demospongiae นอกจากนี้ยังพบว่าฟองน้ำรหัส 017 เป็นฟองน้ำที่ไม่มีหนามฟองน้ำแท่งสี่แฉก ไม่มีหนามฟองน้ำรูปเข็มหมุด (verticillate style) โครงสร้างฟองน้ำไม่มี chinating spicules และ chelae รวมถึงไม่มี calcarous spicules แต่จะมี megasclere ซึ่งเป็นหนามแท่งเดี่ยว โดยฟองน้ำชนิดนี้มี megasclere แบบ oxea ในโครงสร้างที่สานกันเป็นตาข่าย แสดงให้เห็นว่าฟองน้ำรหัส 017 เป็นฟองน้ำใน Order Haplosclerida นอกจากนี้ฟองน้ำรหัส 017 เป็นฟองน้ำทะเลที่ไม่มีการสร้าง gemmules มี choanosomal skeleton เป็นแบบ iso-tropic reticulation หรือ subiso-tropic reticulation ทำให้ฟองน้ำรหัส 017 จัดอยู่ใน suborder Petrosina และฟองน้ำชนิดนี้มีท่อน้ำยกตัวเป็นท่อน้ำสูง (Fistule) จึงจัดอยู่ใน family Phloeodictyidae โดยในภายหลัง ได้มีการยืนยันการพิสูจน์เอกลักษณ์โดย ดร.สุเมตต์ ปุจฉาการ ทำให้ทราบว่าฟองน้ำรหัส 017 คือ ฟองน้ำท่อน้ำสีแดง (*Oceanapia sagittaria*) ซึ่งผู้วิจัยยังพบ microsclere เป็นรูปตัว C และไม่พบหนามฟองน้ำรูปดาว โดยเป็นไปตามลักษณะที่ฟองน้ำท่อน้ำสีแดงควรมี แต่ยังไม่พบเซลล์สืบพันธุ์เป็นดอกพุ่มทรงกลมที่เป็นลักษณะเด่นอีกอย่างหนึ่งของฟองน้ำชนิดนี้

2. ผลการตรวจสอบกลุ่มสารของตัวอย่างด้วยน้ำยาทดสอบชนิดต่างๆ

การทดสอบกลุ่มสารทางเคมีเบื้องต้นในฟองน้ำกระชายและฟองน้ำท่อพุ่มสีแดง ประกอบด้วย การทดสอบสารกลุ่ม flavonoids โดยใช้ cyanidin test การทดสอบสารกลุ่ม phenolics โดยใช้ 10% ferric chloride การทดสอบสารกลุ่ม alkaloids โดยใช้ Dragendorff's reagent, Mayer's reagent, Wagner's reagent และ Hager's reagent การทดสอบสารกลุ่ม triterpenes/steroids โดยใช้ conc. sulfuric acid และ acetic acid การทดสอบสารกลุ่ม tannins โดยใช้ gelatin solution, 1% ferric chloride, lime water และ vanillin T.S. และการทดสอบสารกลุ่ม saponins โดยใช้ DI water และ HCl ซึ่งให้ผลการทดสอบดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบกลุ่มสารของตัวอย่างสารสกัด 1.1-2.4 ด้วยน้ำยาทดสอบชนิดต่างๆ

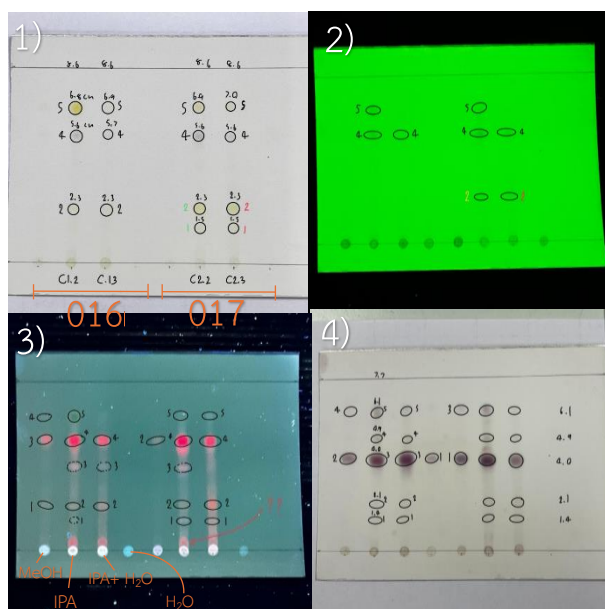
กลุ่มสาร	น้ำยาทดสอบ	ตัวอย่าง							
		C1.1	C1.2	C1.3	C1.4	C2.1	C2.2	C2.3	C2.4
Flavonoids	Cyanidin test	-	-	-	-	-	-	-	-
Phenolic compounds	Ferric chloride	-	-	-	-	-	-	-	-
Alkaloid	Dragendorff's reagent	-	-	+	-	-	+	+	-
	Mayer's reagent	-	+	+	-	-	+	+	-
	Wagner's reagent	-	+	+	-	-	+	+	-
	Hager's reagent	-	+	+	-	-	-	+	-
Triterpene/Steroid	Conc. sulfuric acid/ acetic acid	-	+	+	-	-	+	+	-
Tannins	Gelatin solution test	-	-	-	-	-	-	-	-
	ferric chloride test	-	-	-	-	-	-	-	-
	lime water test	-	-	-	-	-	-	-	-
	vanillin reagent test	+	-	-	-	-	-	-	-
Saponin	foam test	+	-	-	+	-	-	-	+

จากการทดลองการตรวจสอบกลุ่มสารของตัวอย่างด้วยน้ำยาทดสอบ พบว่า สารสกัดจากพองน้ำกระชายที่สกัดด้วย methanol (C1.1) พบสารกลุ่ม condensed tannin จากการทดสอบด้วย vanillin T.S. และพบสารกลุ่ม saponins จากการทดสอบด้วยน้ำ โดยยังมีฟองอากาศหลังตั้งทิ้งไว้ 30 นาที สารสกัดด้วย isopropanol (C1.2) พบสารกลุ่ม alkaloids จากการทดสอบเกิดตะกอนสีขาวครีมใน Mayer's reagent เกิดตะกอนผลึกสีเหลืองใน Hager's reagent และเกิดตะกอนสีน้ำตาลใน Wagner's reagent และพบสารกลุ่ม steroids จากการทดสอบเกิดสีเขียวอมม่วงเมื่อทดสอบด้วย conc. sulfuric acid และ acetic acid สารสกัดด้วย isopropanol ผสมน้ำ (C1.3) พบสารกลุ่ม alkaloids จากการทดสอบเกิดตะกอนแดงส้มใน Dragendorff's reagent เกิดตะกอนสีขาวครีมใน Mayer's reagent เกิดตะกอนผลึกสีเหลืองใน Hager's reagent และเกิดตะกอนสีน้ำตาลใน Wagner's reagent และพบสารกลุ่ม triterpenes จากการทดสอบเกิดสีน้ำตาลอมแดงเมื่อทดสอบด้วย conc. sulfuric acid และ acetic acid สารสกัดด้วยน้ำ (C1.4) พบสารกลุ่ม saponin จากการทดสอบด้วย HCl โดยยังมีฟองอากาศหลังตั้งทิ้งไว้ 30 นาที

สารสกัดจากพองน้ำทอพุ่มสีแดงที่สกัดด้วย methanol (C2.1) ไม่พบสารกลุ่มใดจากการทดสอบ สารสกัดด้วย isopropanol (C2.2) พบสารกลุ่ม alkaloids จากการทดสอบเกิดตะกอนแดงส้มใน Dragendorff's reagent เกิดตะกอนสีขาวครีมใน Mayer's reagent และเกิดตะกอนสีน้ำตาลใน Wagner's reagent พบ triterpenes และ steroids จากการทดสอบเกิดสีน้ำตาลอมแดง และเกิดสีเขียวอมม่วงเมื่อทดสอบด้วย conc. sulfuric acid และ acetic acid สารสกัดด้วย isopropanol ผสมน้ำ (C2.3) พบสารกลุ่ม alkaloids จากการทดสอบเกิดตะกอนแดงส้มใน Dragendorff's reagent เกิดตะกอนสีขาวครีมใน Mayer's reagent เกิดตะกอนผลึกสีเหลืองใน Hager's reagent และเกิดตะกอนสีน้ำตาลใน Wagner's reagent และพบ triterpenes จากการเกิดสีน้ำตาลอมแดง และ steroids จากการเกิดสีเขียวอมม่วงเมื่อทดสอบด้วย conc. sulfuric acid และ acetic acid สารสกัดด้วยน้ำ (C2.4) พบสารกลุ่ม saponins จากการทดสอบด้วย HCl โดยยังมีฟองอากาศหลังตั้งทิ้งไว้ 30 นาที

3. การตรวจสอบจำนวนองค์ประกอบของสารสกัด

การศึกษาจำนวนองค์ประกอบของสารสกัด ด้วยเทคนิค Thin-Layer Chromatography (TLC) โดยใช้ระบบ hexane : ethanol อัตราส่วน 3:2 ให้ผลดัง รูปที่ 5 และ ตารางที่ 3



รูปที่ 5 ผลองค์ประกอบของตัวอย่าง ด้วยเทคนิค Thin-Layer Chromatography โดยใช้ระบบ hexane: ethanol อัตราส่วน 3:2 ดังนี้ 1) ตาเปล่า 2) UV254 3) UV365 4) anisaldehyde-H₂SO₄

ตารางที่ 3 ผลองค์ประกอบของตัวอย่าง ด้วยเทคนิค Thin-Layer Chromatography โดยใช้ระบบ hexane : ethanol อัตราส่วน 3:2

	spot	R _f	ตาเปล่า	UV254	UV365	anisaldehyde-H ₂ SO ₄
C1.1	1	0.27	-	-	ชมพู	-
	2	0.52	-	-	-	ม่วง
	3	0.65	-	-	ชมพู	-
	4	0.79	-	-	ดำ	ม่วง
C1.2	1	0.18	-	-	ส้ม	ดำ
	2	0.27	เหลือง	-	ส้ม	ดำ
	3	0.52	-	-	ชมพู	ม่วง

	4	0.64	ดำ	ดำ	ชมพู	ดำ
	5	0.79	เหลือง	ดำ	ดำ	ม่วง
C1.3	1	0.18	-	-	-	ดำ
	2	0.27	เหลือง	-	ส้ม	ดำ
	3	0.52	-	-	ชมพู	ม่วง
	4	0.66	ดำ	ดำ	ชมพู	ดำ
	5	0.80	เหลือง	-	-	ม่วง
C1.4	1	0.52	-	-	-	ม่วง
C2.1	1	0.52	-	-		ม่วง
	2	0.66	-	-	ชมพู	-
	3	0.80	-	-	-	ม่วง
C2.2	1	0.18	เหลือง	-	ขาว	ดำ
	2	0.27	เหลือง	ดำ	ส้ม	ดำ
	3	0.52	-	-	ชมพู	ม่วง
	4	0.64	ดำ	ดำ	ชมพู	ดำ
	5	0.80	เหลือง	ดำ	ดำ	ม่วง
C2.3	1	0.18	เหลือง	-	ส้ม	ดำ
	2	0.27	เหลือง	ดำ	ส้ม	ดำ
	3	0.52	-	-	-	ม่วง
	4	0.64	ดำ	ดำ	ชมพู	ดำ
	5	0.81	เหลือง	-	ดำ	ม่วง
C2.4	No spot	-	-	-	-	-

จากการตรวจสอบจำนวนองค์ประกอบของสารสกัดจากฟองน้ำทั้งสองชนิดด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) โดยใช้ระบบ hexane : ethanol ในอัตราส่วน 3:2 พบว่า

สารสกัดจากฟองน้ำกระชายที่สกัดด้วย methanol (C1.1) พบองค์ประกอบทั้งหมด 4 จุด โดยจุดที่ 1 มีค่า R_f เท่ากับ 0.27 เกิดสีชมพูภายใต้แสง UV 365 nm จุดที่ 2 มีค่า R_f เท่ากับ 0.52

เกิดสีม่วงเมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent จุดที่ 3 มีค่า R_f เท่ากับ 0.65 เกิดสีชมพูภายใต้แสง UV 365 nm และจุดที่ 4 มีค่า R_f เท่ากับ 0.79 เกิดสีดำภายใต้แสง UV ที่ 365 nm

สารสกัดจากฟองน้ำกระชายที่สกัดด้วย isopropanol (C1.2) พบองค์ประกอบทั้งหมด 5 จุด โดยจุดที่ 1 มีค่า R_f เท่ากับ 0.18 เกิดสีส้มภายใต้แสง UV 365 nm และเกิดสีดำเมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent จุดที่ 2 มีค่า R_f เท่ากับ 0.27 มีสีเหลืองเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า เกิดสีส้มภายใต้แสง UV 365 nm และเกิดสีดำเมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent จุดที่ 3 มีค่า R_f เท่ากับ 0.52 เกิดสีชมพูภายใต้แสง UV 365 nm และเกิดสีม่วงเมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent จุดที่ 4 มีค่า R_f เท่ากับ 0.64 มีสีดำเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า เกิดสีดำและสีชมพูภายใต้แสง UV 254 และ 365 nm ตามลำดับ และเกิดสีดำเมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent และจุดที่ 5 มีค่า R_f เท่ากับ 0.79 มีสีเหลืองเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า เกิดสีดำภายใต้แสง UV 254/365 nm และเกิดสีม่วงเมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent

สารสกัดจากฟองน้ำกระชายที่สกัดด้วย isopropanol ผสมน้ำ (C1.3) พบองค์ประกอบ 5 จุด โดยจุดที่ 1 มีค่า R_f เท่ากับ 0.18 เกิดสีดำเมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent จุดที่ 2 มีค่า R_f เท่ากับ 0.27 มีสีเหลืองเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า เกิดสีส้มภายใต้แสง UV 365 nm และเกิดสีดำเมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent จุดที่ 3 มีค่า R_f เท่ากับ 0.52 เกิดสีชมพูภายใต้แสง UV 365 nm และเกิดสีม่วงเมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent จุดที่ 4 มีค่า R_f เท่ากับ 0.66 มีสีดำเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า เกิดสีดำและสีชมพูภายใต้แสง UV 254 และ 365 nm ตามลำดับ และเกิดสีดำเมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent และจุดที่ 5 ค่า R_f เท่ากับ 0.80 มีสีเหลืองเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า และเกิดสีม่วงเมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent

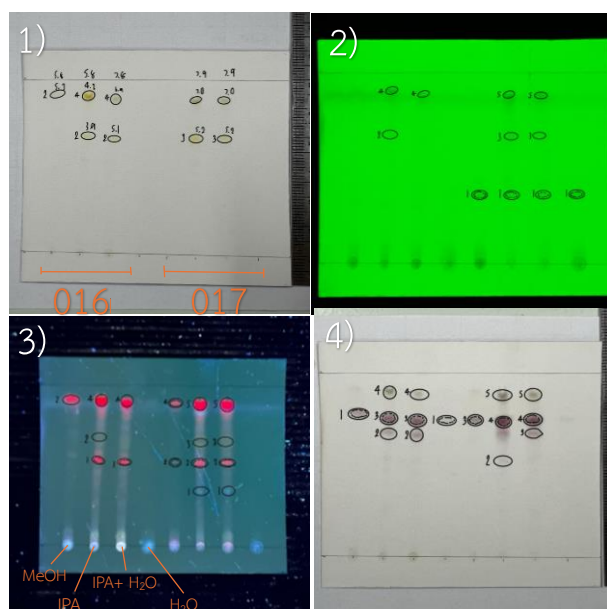
สารสกัดจากฟองน้ำกระชายที่สกัดด้วยน้ำ (C1.4) พบองค์ประกอบ 1 จุด มีค่า R_f เท่ากับ 0.52 และเกิดสีม่วงเมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent

สารสกัดจากฟองน้ำห่อพุ่มสีแดงที่สกัดด้วย methanol (C2.1) พบองค์ประกอบ 3 จุด โดยจุดที่ 1 มีค่า R_f เท่ากับ 0.52 เกิดสีม่วงเมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent จุดที่ 2 มีค่า R_f เท่ากับ 0.66 เกิดสีชมพูภายใต้แสง UV 365 nm และจุดที่ 3 มีค่า R_f เท่ากับ 0.80 เกิดสีม่วงเมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent

สารสกัดจากฟองน้ำท่อพุ่มสีแดงที่สกัดด้วย isopropanol (C2.2) พบองค์ประกอบ 5 จุด โดยจุดที่ 1 มีค่า R_f เท่ากับ 0.18 มีสีเหลืองเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า เกิดสีขาวภายใต้แสง UV 365 nm และเกิดสีดำเมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent จุดที่ 2 มีค่า R_f เท่ากับ 0.27 มีสีเหลืองเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า เกิดสีดำและสีส้มภายใต้แสง UV 254 และ 365 nm ตามลำดับ และเกิดสีดำเมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent จุดที่ 3 ค่า R_f เท่ากับ 0.52 เกิดสีชมพูภายใต้แสง UV ที่ 365 nm เกิดสีม่วงเมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent จุดที่ 4 มีค่า R_f เท่ากับ 0.64 มีสีดำเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า เกิดสีดำและสีชมพูภายใต้แสง UV ที่ 254 และ 365 nm ตามลำดับ และเกิดสีดำเมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent และจุดที่ 5 มีค่า R_f เท่ากับ 0.80 มีสีเหลืองเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า เกิดสีดำภายใต้แสง UV ที่ 254 และ 365 nm และเกิดสีม่วงเมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent

สารสกัดจากฟองน้ำท่อพุ่มสีแดงที่สกัดด้วย isopropanol ผสมกับน้ำ (C2.3) พบองค์ประกอบ 5 จุด โดยจุดที่ 1 มีค่า R_f เท่ากับ 0.18 มีสีเหลืองเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า เกิดสีส้มภายใต้แสง UV ที่ 365 nm และเกิดสีดำเมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent จุดที่ 2 มีค่า R_f เท่ากับ 0.27 มีสีเหลืองเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า เกิดสีดำและสีส้มภายใต้แสง UV ที่ 254 และ 365 nm ตามลำดับ และเกิดสีดำเมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent จุดที่ 3 มีค่า R_f เท่ากับ 0.52 เกิดสีม่วงเมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent จุดที่ 4 มีค่า R_f เท่ากับ 0.64 มีสีดำเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า เกิดสีดำและสีชมพูภายใต้แสง UV ที่ 254 และ 365 nm ตามลำดับ ตามลำดับ และเกิดสีดำเมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent และจุดที่ 5 มีค่า R_f เท่ากับ 0.81 มีสีเหลืองเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า เกิดสีดำภายใต้แสง UV ที่ 365 nm และเกิดสีม่วงเมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent ส่วนสารสกัดจากฟองน้ำท่อพุ่มสีแดงที่สกัดด้วยน้ำ (C2.4) ไม่พบองค์ประกอบใดในการทดสอบ

การศึกษาจำนวนองค์ประกอบของสารสกัด ด้วยเทคนิค Thin-Layer Chromatography (TLC)
โดยใช้ระบบ dichloromethane : methanol อัตราส่วน 9:1 ให้ผลดัง รูปที่ 6 และ ตารางที่ 4



รูปที่ 6 ผลองค์ประกอบของตัวอย่าง ด้วยเทคนิค Thin-Layer Chromatography โดยใช้ระบบ
Dichloromethane : methanol อัตราส่วน 9:1 ดังนี้ 1) ตาเปล่า 2) UV254 3) UV365 4) anisaldehyde-H₂SO₄

ตารางที่ 4 ผลองค์ประกอบของตัวอย่าง ด้วยเทคนิค Thin-Layer Chromatography โดยใช้ระบบ
Dichloromethane : methanol อัตราส่วน 9:1

	spot	R _f	ตาเปล่า	UV254	UV365	anisaldehyde-H ₂ SO ₄
C1.1	1	0.78	-	-	-	ม่วง
	2	0.91	เขียว	-	ชมพู	-
C1.2	1	0.52	-	-	ชมพู	-
	2	0.67	เหลือง	ดำ	ดำ	ม่วง
	3	0.75	-	-	-	ม่วง
	4	0.90	เหลือง	ดำ	ชมพู	ดำ
C1.3	1	0.51	-	-	ชมพู	-
	2	0.65	เหลือง	-	-	ม่วง

	3	0.75	-	-	-	ม่วง
	4	0.88	เขียว	ดำ	ชมพู	ดำ
C1.4	1	0.75	-	-	-	ดำ
C2.1	1	0.34	-	ดำ	ดำ	-
	2	0.52	-	ดำ	-	-
	3	0.75	-	-	-	ม่วง
	4	0.90	-	-	ชมพู	-
C2.2	1	0.34	-	ดำ	ฟ้า	-
	2	0.52	-	-	ชมพู	ดำ
	3	0.66	เหลือง	ดำ	ดำ	-
	4	0.74	-	-	-	ม่วง
	5	0.89	เขียว	ดำ	ชมพู	ดำ
C2.3	1	0.34	-	ดำ	ฟ้า	-
	2	0.52	-	-	ชมพู	-
	3	0.66	เหลือง	ดำ	ดำ	ม่วง
	4	0.75	-	-	-	ม่วง
	5	0.89	เขียว	ดำ	ชมพู	ดำ
C2.4	1	0.34	-	ดำ	-	-

จากการตรวจสอบจำนวนองค์ประกอบของสารสกัดจากฟองน้ำทั้งสองชนิดด้วยเทคนิค Thin-Layer Chromatography โดยใช้ระบบ Dichloromethane : Methanol ในอัตราส่วน 9:1 พบว่า

สารสกัดจากฟองน้ำกระชายที่สกัดด้วย methanol (C1.1) พบองค์ประกอบทั้งหมด 2 จุด โดยจุดที่ 1 มีค่า R_f เท่ากับ 0.78 เกิดสีม่วงเมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent และจุดที่ 2 มีค่า R_f เท่ากับ 0.91 มีสีเขียวเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า เกิดสีชมพูภายใต้แสง UV ที่ 365 nm

สารสกัดจากฟองน้ำกระชายที่สกัดด้วย isopropanol (C1.2) พบองค์ประกอบ 4 จุด โดยจุดที่ 1 มีค่า R_f เท่ากับ 0.52 เกิดสีชมพูภายใต้แสง UV ที่ 365 nm จุดที่ 2 มีค่า R_f เท่ากับ 0.67 มีสีเหลืองเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า เกิดสีดำภายใต้แสง UV ที่ 254 และ 365 nm และเกิดสีม่วงเมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent จุดที่ 3 มีค่า R_f เท่ากับ 0.75 เกิดสีม่วงเมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent และจุดที่ 4 มีค่า R_f เท่ากับ 0.90 สีเหลืองเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า เกิดสีดำและสีชมพูภายใต้แสง UV ที่ 254 และ 365 nm ตามลำดับ และเกิดสีดำเมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent

สารสกัดจากฟองน้ำกระชายที่สกัดด้วย isopropanol ผสมกับน้ำ (C1.3) พบองค์ประกอบ 4 จุด โดยจุดที่ 1 มีค่า R_f เท่ากับ 0.51 เกิดสีชมพูภายใต้แสง UV ที่ 365 nm จุดที่ 2 มีค่า R_f เท่ากับ 0.65 มีสีเหลืองเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าและเกิดสีม่วงเมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent จุดที่ 3 มีค่า R_f เท่ากับ 0.75 เกิดสีม่วงเมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent และจุดที่ 4 มีค่า R_f เท่ากับ 0.88 มีสีเขียวเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า เกิดสีดำและสีชมพูภายใต้แสง UV ที่ 254 และ 365 nm ตามลำดับ และเกิดสีดำเมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent

สารสกัดจากฟองน้ำกระชายที่สกัดด้วยน้ำ (C1.4) พบองค์ประกอบ 1 จุด มีค่า R_f เท่ากับ 0.75 และเกิดสีดำเมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent

สารสกัดจากฟองน้ำท่อพุ่มสีแดงที่สกัดด้วย methanol (C2.1) พบองค์ประกอบ 4 จุด โดยจุดที่ 1 มีค่า R_f เท่ากับ 0.34 เกิดสีดำภายใต้แสง UV ที่ 254 และ 365 nm จุดที่ 2 มีค่า R_f เท่ากับ 0.52 เกิดสีดำภายใต้แสง UV ที่ 254 nm จุดที่ 3 มีค่า R_f เท่ากับ 0.75 เกิดสีม่วงเมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent และจุดที่ 4 มีค่า R_f เท่ากับ 0.90 เกิดสีชมพูภายใต้แสง UV ที่ 365 nm

สารสกัดจากฟองน้ำท่อพุ่มสีแดงที่สกัดด้วย isopropanol (C2.2) พบองค์ประกอบ 5 จุด โดยจุดที่ 1 มีค่า R_f เท่ากับ 0.34 เกิดสีดำและสีฟ้าภายใต้แสง UV ที่ 254 และ 365 nm ตามลำดับ จุดที่ 2 มีค่า R_f เท่ากับ 0.52 เกิดสีชมพูภายใต้แสง UV ที่ 365 nm และเกิดสีดำเมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent จุดที่ 3 มีค่า R_f เท่ากับ 0.66 มีสีเหลืองเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า เกิดสีดำภายใต้แสง UV ที่ 254 และ 365 nm จุดที่ 4 มีค่า R_f เท่ากับ 0.74 เกิดสีม่วงเมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent และจุดที่ 5 มีค่า R_f เท่ากับ 0.89 มีสีเขียวเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า

เกิดสีดำและสีชมพูภายใต้แสง UV ที่ 254 และ 365 nm ตามลำดับ และเกิดสีดำเมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent

สารสกัดจากฟองน้ำท่อพุ่มสีแดงที่สกัดด้วย isopropanol ผสมน้ำ (C2.3) พบองค์ประกอบ 5 จุด โดยจุดที่ 1 มีค่า R_f เท่ากับ 0.34 เกิดสีดำและสีฟ้าภายใต้แสง UV ที่ 254 และ 365 nm ตามลำดับ จุดที่ 2 มีค่า R_f เท่ากับ 0.52 เกิดสีชมพูภายใต้แสง UV ที่ 365 nm จุดที่ 3 มีค่า R_f เท่ากับ 0.66 มีสีเหลืองเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า เกิดสีดำภายใต้แสง UV ที่ 254 และ 365 nm และเกิดสีม่วงเมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent จุดที่ 4 มีค่า R_f เท่ากับ 0.75 เกิดสีม่วงเมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent และจุดที่ 5 มีค่า R_f เท่ากับ 0.89 มีสีเขียวเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า เกิดสีดำและสีชมพูภายใต้แสง UV ที่ 254 และ 365 nm ตามลำดับ และเกิดสีดำเมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent

สารสกัดจากฟองน้ำท่อพุ่มสีแดงที่สกัดด้วยน้ำ (C2.4) พบองค์ประกอบ 1 จุด มีค่า R_f เท่ากับ 0.34 เกิดสีดำภายใต้แสง UV ที่ 254 nm

จากผลการทดลอง พบว่าสารที่มีองค์ประกอบมากที่สุด ได้แก่ สารสกัดจากฟองน้ำกระชาย ที่สกัดด้วย isopropanol (C1.2) และสารที่สกัดด้วย isopropanol ผสมน้ำ (C1.3) โดยพบ 5 องค์ประกอบในระบบ Hexane: Ethanol 3:2 พบ 4 องค์ประกอบในระบบ Dichloromethane: Methanol 9:1 ส่วนสารสกัดจากฟองน้ำท่อพุ่มสีแดงที่สกัดด้วย isopropanol (C2.2) และสารที่สกัดด้วย isopropanol ผสมน้ำ (C2.3) พบ 5 องค์ประกอบทั้งในระบบ Hexane: Ethanol 3:2 และระบบ Dichloromethane: Methanol 9:1

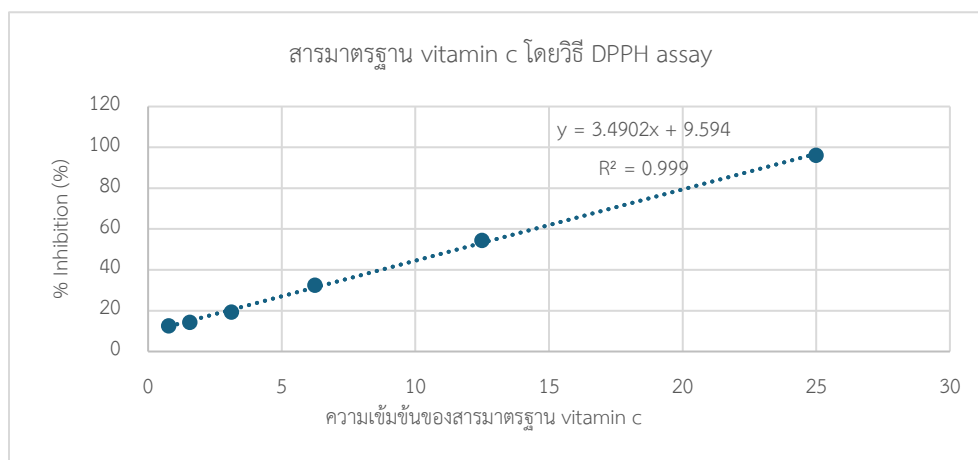
4. ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

4.1. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพองน้ำกระชายและพองน้ำทอพู่มแดงที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน 4 ชนิด แล้วนำไปทดสอบด้วยวิธี DPPH assay โดยมีสารมาตรฐาน คือ vitamin c และ trolox พบว่าสารสกัดตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1000 $\mu\text{g/mL}$ ที่สกัดด้วย methanol (C1.1) ต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 93.76 ± 0.00 สารสกัดด้วย isopropanol (C1.2) ต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 44.02 ± 0.63 สารสกัดด้วย isopropanol ผสมน้ำ (C1.3) ต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 58.79 ± 0.47 และสารสกัดด้วยน้ำ (C1.4) ต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 85.15 ± 0.47 ส่วนสารสกัดจากพองน้ำทอพู่มสีแดงที่สกัดด้วย methanol (C2.1) ต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 34.15 ± 0.27 สารสกัดด้วย isopropanol (C2.2) ต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 27.77 ± 0.61 สารสกัดด้วย isopropanol ผสมน้ำ (C2.3) ต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 28.50 ± 0.90 และสารสกัดด้วยน้ำ (C2.4) ต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 39.34 ± 0.44 ดังตารางที่ 11 และเมื่อนำตัวอย่างสารสกัดที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้มากกว่าร้อยละ 50 ขึ้นไป มาทำการทดสอบโดยใช้ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เพื่อคำนวณหา IC_{50} พบว่าสารสกัดจากพองน้ำกระชายที่สกัดด้วย methanol (C1.1) มีค่า IC_{50} $400.52 \pm 10.44 \mu\text{g/mL}$ และสารสกัดด้วยน้ำ (C1.4) มีค่า IC_{50} $617.07 \pm 12.44 \mu\text{g/mL}$ ดังตารางที่ 12-13 รวมถึงสารมาตรฐาน vitamin c มีค่า IC_{50} $11.57 \pm 0.27 \mu\text{g/mL}$ และ trolox มีค่า IC_{50} $19.41 \pm 0.18 \mu\text{g/mL}$ ดังตารางที่ 5-6

ตารางที่ 5ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน vitamin C โดยใช้ DPPH assay

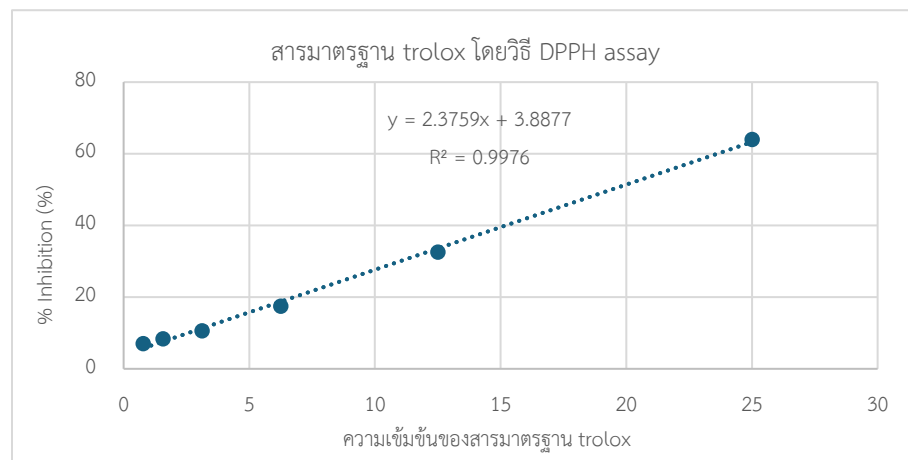
ความเข้มข้นของสาร มาตรฐาน vitamin c ($\mu\text{g/mL}$)	% Inhibition (%)			IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)			ค่าเฉลี่ย ของ IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	SD
	1	2	3	1	2	3		
25	96.39	96.25	95.82	11.27	11.76	11.70	11.57	0.2677
12.5	56.33	53.93	53.08					
6.25	33.26	31.14	32.98					
3.125	18.75	19.46	19.75					
1.5625	16.56	13.45	13.02					
0.7812	15.50	9.98	12.39					



รูปที่ 7 กราฟสารมาตรฐาน vitamin c โดยวิธี DPPH assay

ตารางที่ 6ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน trolox โดยใช้ DPPH assay

ความเข้มข้นของสาร มาตรฐาน Trolox ($\mu\text{g/mL}$)	% Inhibition (%)			IC ₅₀			ค่าเฉลี่ยของ IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	SD
	1	2	3	1	2	3		
25	63.34	64.51	64.36	19.58	19.22	19.42	19.41	0.1784
12.5	32.96	33.11	31.79					
6.25	16.97	18.57	16.97					
3.125	11.56	10.25	10.10					
1.5625	9.66	9.66	5.87					
0.7812	7.47	9.81	3.82					



รูปที่ 8 กราฟสารมาตรฐาน Trolox โดยวิธี DPPH assay

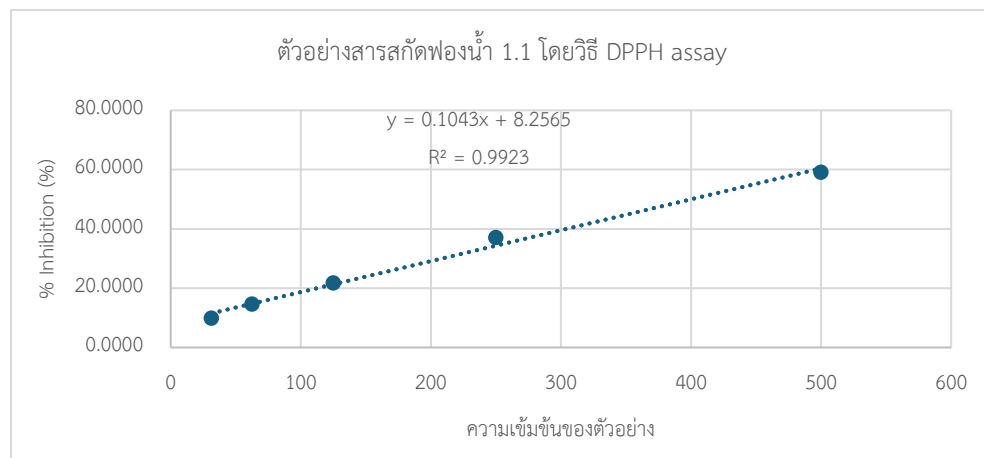
ตารางที่ 7 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างพองน้ำ C1.1-C2.4 โดยใช้ DPPH assay

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของสารสกัดตัวอย่าง (µg/mL)	% Inhibition (%)			ค่าเฉลี่ยของ % Inhibition (%)	SD	%RSD
		1	2	3			
C1.1	1000	93.76	93.76	93.76	93.76	0.0000	0.0000
C1.2	1000	44.55	44.20	43.32	44.02	0.6337	1.4393
C1.3	1000	58.96	58.26	59.13	58.78	0.4650	0.7910
C1.4	1000	85.32	85.50	84.62	85.14	0.4650	0.5461
C2.1	1000	33.91	34.44	34.09	34.15	0.2685	0.7860
C2.2	1000	27.06	28.11	28.11	27.76	0.6088	2.1925
C2.3	1000	29.26	28.73	27.50	28.50	0.9019	3.1644
C2.4	1000	38.92	39.27	39.80	39.33	0.4423	1.1243

จากตารางที่ 7 จึงเลือกตัวอย่าง C1.1 C1.4 มาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกันเพื่อหา IC_{50}

ตารางที่ 8ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างพองน้ำ C1.1 โดยใช้ DPPH assay

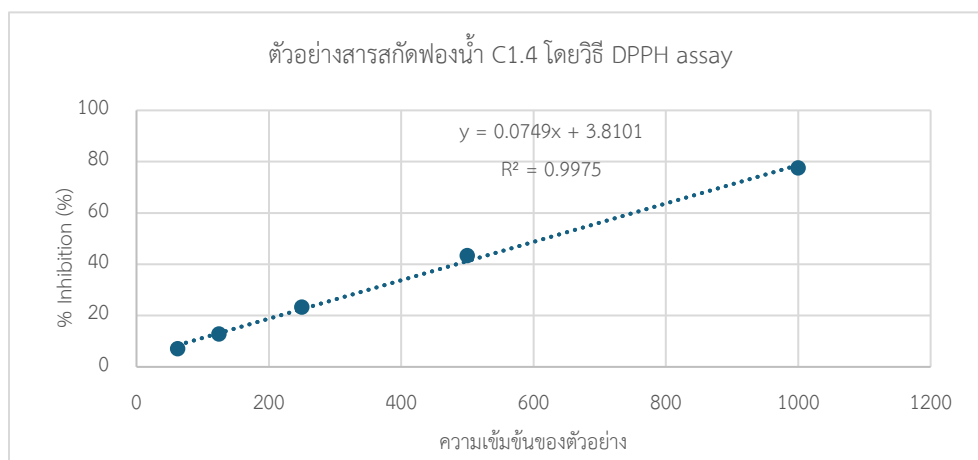
ความเข้มข้นของสารสกัด ตัวอย่าง (µg/mL)	% Inhibition (%)			IC ₅₀			ค่าเฉลี่ยของ IC ₅₀ (µg/mL)	SD
	1	2	3	1	2	3		
500	56.24	61.34	59.64	408.71	388.76	404.08	400.52	10.4394
250	39.64	36.66	34.96					
125	25.31	20.78	18.93					
62.5	17.51	13.40	12.97					
31.25	13.47	8.93	7.23					



รูปที่ 9 กราฟตัวอย่างสารสกัดพองน้ำ C1.1 โดยวิธีการ DPPH assay

ตารางที่ 9ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างพองน้ำ C1.4 โดยใช้ DPPH assay

ความเข้มข้นของสารสกัด ตัวอย่าง (µg/mL)	% Inhibition (%)			IC ₅₀			ค่าเฉลี่ยของ IC ₅₀ (µg/mL)	SD
	1	2	3	1	2	3		
1000	79.25	75.50	78.00	605.76	630.40	615.03	617.07	12.4401
500	42.90	43.45	43.59					
250	23.12	23.54	23.26					
125	13.55	12.58	12.44					
62.5	9.04	5.71	6.40					



รูปที่ 10 กราฟตัวอย่างสารสกัดพองน้ำ C1.4 โดยวิธี DPPH assay

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากฟองน้ำกระชาย ด้วยวิธี DPPH assay พบว่าสารสกัดจากฟองน้ำกระชายที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด คือ สารที่สกัดด้วย methanol (C1.1) ตามด้วยสารที่สกัดด้วยน้ำ (1.4) โดยมีค่า IC_{50} ที่ 400.52 ± 10.44 และ 617.07 ± 12.44 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ซึ่งสารที่สกัดด้วย methanol (C1.1) มีค่า IC_{50} ต่ำกว่าสารที่สกัดด้วยน้ำ (1.4) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนสารสกัดจากฟองน้ำท่อพุ่มสีแดงเมื่อทดสอบด้วยความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 1000 $\mu\text{g/mL}$ พบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าร้อยละ 50 หมายความว่าฟองน้ำท่อพุ่มสีแดงมีแนวโน้มที่จะไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

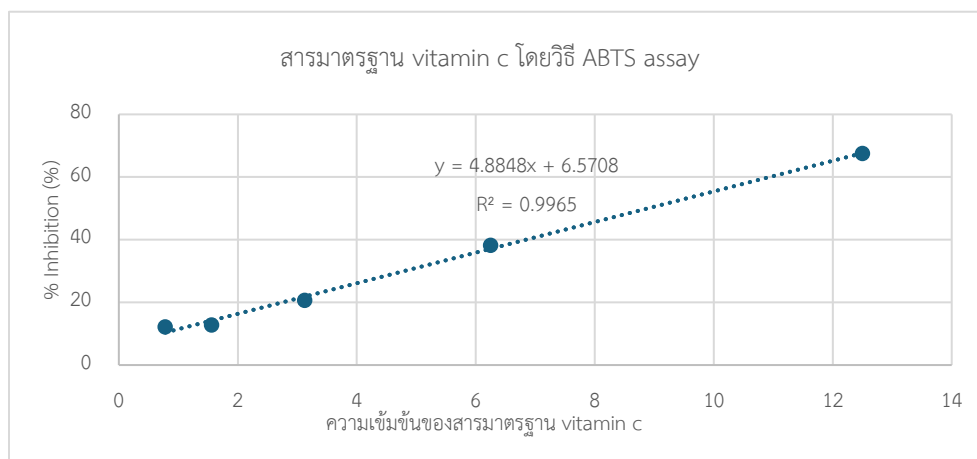
เมื่อพิจารณาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระระหว่างสารสกัดจากฟองน้ำกระชายและสารสกัดจากฟองน้ำท่อพุ่มสีแดง พบว่าสารสกัดจากฟองน้ำกระชายมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต่างจากฟองน้ำท่อพุ่มสีแดงที่ไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แสดงให้เห็นว่าฟองน้ำกระชายมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าฟองน้ำท่อพุ่มสีแดง ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากฟองน้ำกระชาย ด้วยวิธี DPPH assay

4.2. ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี ABTS assay

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากฟองน้ำกระชายและฟองน้ำท่อพุ่มสีแดง ที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน 4 ชนิด แล้วนำไปทดสอบด้วยวิธี ABTS assay โดยมีสารมาตรฐาน คือ vitamin c และ trolox พบว่าตัวอย่างสารสกัดจากฟองน้ำกระชายที่ความเข้มข้น 1000 $\mu\text{g/mL}$ ที่สกัดด้วย methanol (C1.1) ต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 99.65 ± 0.27 สารสกัดด้วย isopropanol (C1.2) ต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 45.29 ± 0.23 สารสกัดด้วย isopropanol ผสมน้ำ (C1.3) ต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 88.10 ± 1.70 และสารสกัดด้วยน้ำ (C1.4) ต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 97.64 ± 0.75 ส่วนสารสกัดจากฟองน้ำท่อพุ่มสีแดงที่สกัดด้วย methanol (C2.1) ต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 69.73 ± 0.40 สารสกัดด้วย isopropanol (C2.2) ต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 34.82 ± 0.68 สารสกัดด้วย isopropanol ผสมน้ำ (C2.3) ต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 24.94 ± 0.23 และสารสกัดด้วยน้ำ (C2.4) ต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 41.28 ± 0.91 ดังตารางที่ 16 และเมื่อนำตัวอย่างสารสกัดที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้มากกว่า ร้อยละ 50 ขึ้นไป มาทำการทดสอบด้วยความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เพื่อคำนวณหา IC_{50} พบว่า สารสกัดจากฟองน้ำกระชายที่สกัดด้วย methanol (C1.1) มีค่า IC_{50} $420.18 \pm 3.11 \mu\text{g/mL}$ สารสกัดด้วย isopropanol (C1.2) มีค่า IC_{50} $1091.79 \pm 10.12 \mu\text{g/mL}$ สารสกัดด้วย isopropanol ผสมน้ำ (C1.3) มีค่า IC_{50} $419.37 \pm 3.36 \mu\text{g/mL}$ และสารสกัดด้วยน้ำ (C1.4) มีค่า IC_{50} $467.73 \pm 3.77 \mu\text{g/mL}$ ส่วนสารสกัดจากฟองน้ำท่อพุ่มสีแดงที่สกัดด้วย methanol (C2.1) มีค่า IC_{50} 942.42 ± 3.00 และสารสกัดด้วยน้ำ (C2.4) มีค่า IC_{50} 1145.79 ± 30.25 ดังตารางที่ 17-22 รวมถึงสารมาตรฐาน vitamin c มีค่า IC_{50} $8.89 \pm 0.41 \mu\text{g/mL}$ และ trolox มีค่า IC_{50} $6.81 \pm 0.06 \mu\text{g/mL}$ ดังตารางที่ 10-11

ตารางที่ 10ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน vitamin C โดยใช้ ABTS assay

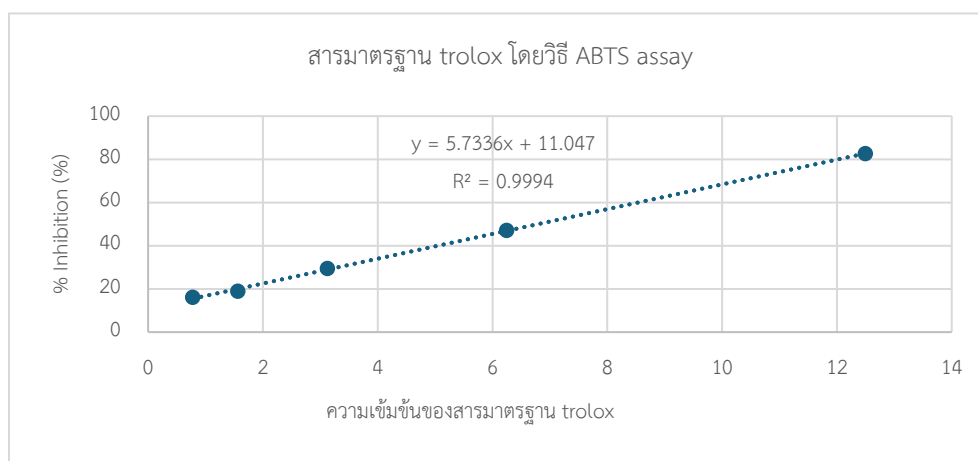
ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน vitamin c (µg/mL)	% Inhibition (%)			IC ₅₀			ค่าเฉลี่ยของ IC ₅₀ (µg/mL)	SD
	1	2	3	1	2	3		
12.5	68.35	68.89	65.15	8.66	8.64	9.36	8.89	0.4116
6.25	39.71	38.65	36.11					
3.125	21.89	22.29	17.75					
1.5625	14.28	14.41	9.61					
0.7812	11.88	12.28	12.14					



รูปที่ 11 กราฟสารมาตรฐาน vitamin c โดยวิธี ABTS assay

ตารางที่ 11ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน trolox โดยใช้ ABTS assay

ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Trolox ($\mu\text{g/mL}$)	% Inhibition (%)			IC_{50}			ค่าเฉลี่ยของ IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	SD
	1	2	3	1	2	3		
12.5	82.68	82.02	83.21	6.78	6.78	6.86	6.81	0.0557
6.25	46.93	47.20	46.93					
3.125	31.00	29.16	27.97					
1.5625	18.03	21.46	17.11					
0.7812	17.44	16.52	14.54					



รูปที่ 12 กราฟสารมาตรฐาน trolox โดยวิธี ABTS assay

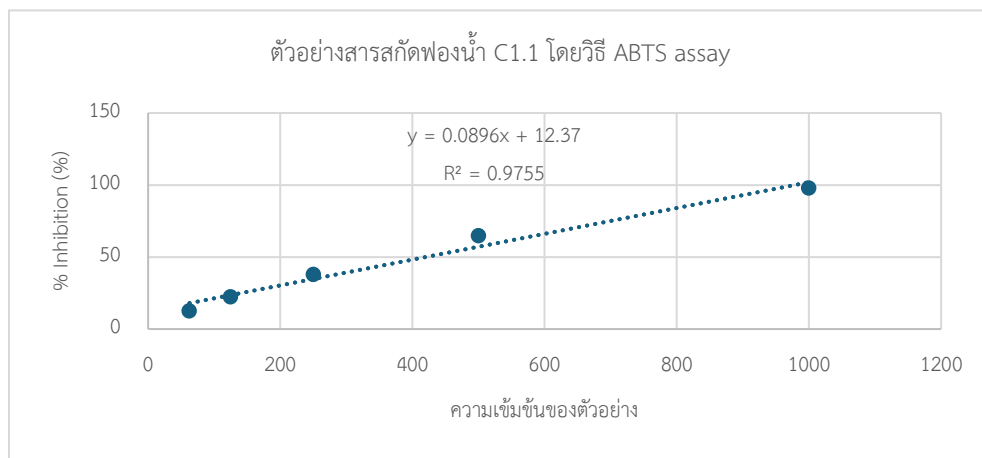
ตารางที่ 12ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างพองน้ำ C1.1-C2.4 โดยใช้ ABTS assay

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของสารสกัดตัวอย่าง (µg/mL)	% Inhibition (%)			ค่าเฉลี่ยของ % Inhibition (%)	SD	%RSD
		1	2	3			
C1.1	1000	99.73	99.86	99.34	99.65	0.2708	0.2718
C1.2	1000	45.16	45.55	45.16	45.29	0.2253	0.4975
C1.3	1000	90.04	86.92	87.31	88.10	1.7012	1.9311
C1.4	1000	98.50	97.20	97.20	97.64	0.7511	0.7693
C2.1	1000	70.07	69.81	69.29	69.73	0.3974	0.5700
C2.2	1000	34.04	35.21	35.21	34.82	0.6760	1.9413
C2.3	1000	24.80	24.80	25.19	24.94	0.2253	0.9037
C2.4	1000	41.19	40.41	42.23	41.28	0.9138	2.2134

จากตารางที่ 12 จึงเลือกตัวอย่าง C1.1 C1.2 C1.3 C1.4 C2.1 C2.4 มาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกันเพื่อหา IC_{50}

ตารางที่ 13ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างพองน้ำ C1.1 โดยใช้ ABTS assay

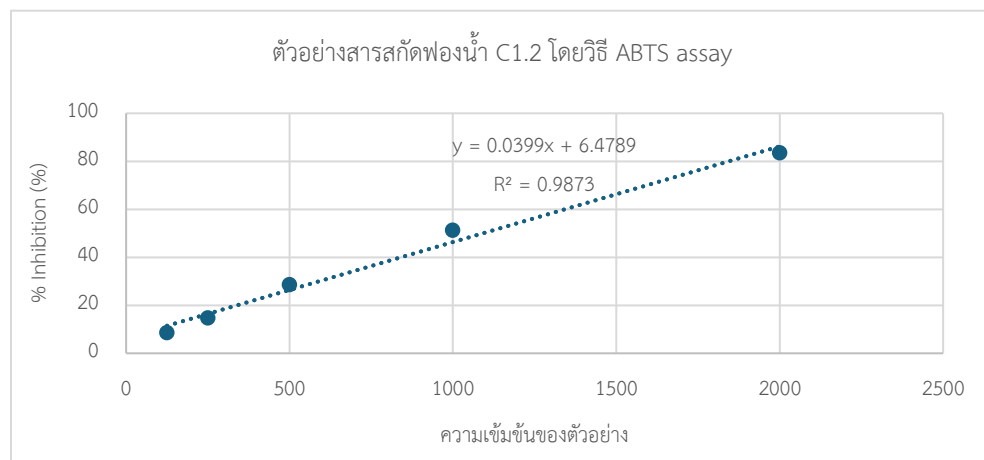
ความเข้มข้นของสารสกัด ตัวอย่าง (μg/mL)	% Inhibition (%)			IC ₅₀			ค่าเฉลี่ยของ IC ₅₀ (μg/mL)	SD
	1	2	3	1	2	3		
1000	99.18	98.00	96.23	418.77	418.01	423.74	420.18	3.1129
500	65.91	64.43	64.14					
250	37.50	38.39	37.80					
125	22.30	21.27	23.48					
62.5	10.72	14.26	12.49					



รูปที่ 13 กราฟตัวอย่างสารสกัดพองน้ำ C1.1 โดยวิธี ABTS assay

ตารางที่ 14ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างพองน้ำ C1.2 โดยใช้ ABTS assay

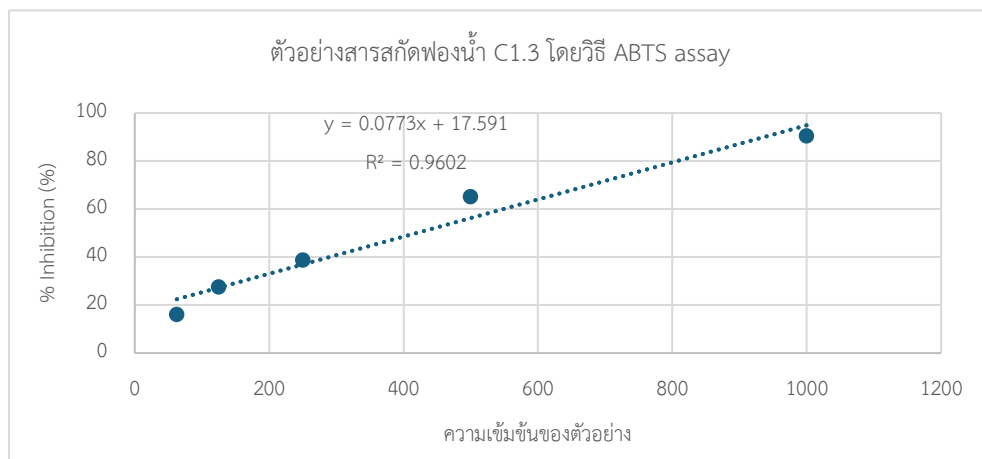
ความเข้มข้นของสารสกัดตัวอย่าง (µg/mL)	% Inhibition (%)			IC ₅₀			ค่าเฉลี่ยของ IC ₅₀ (µg/mL)	SD
	1	2	3	1	2	3		
2000	84.70	82.67	83.35	1080.55	1094.65	1100.17	1091.79	10.1166
1000	52.16	50.81	50.98					
500	28.50	29.01	28.33					
250	14.39	15.40	14.39					
125	7.46	10.50	7.97					



รูปที่ 14 กราฟตัวอย่างสารสกัดพองน้ำ C1.2 โดยวิธี ABTS assay

ตารางที่ 15ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างพองน้ำ C1.3 โดยใช้ ABTS assay

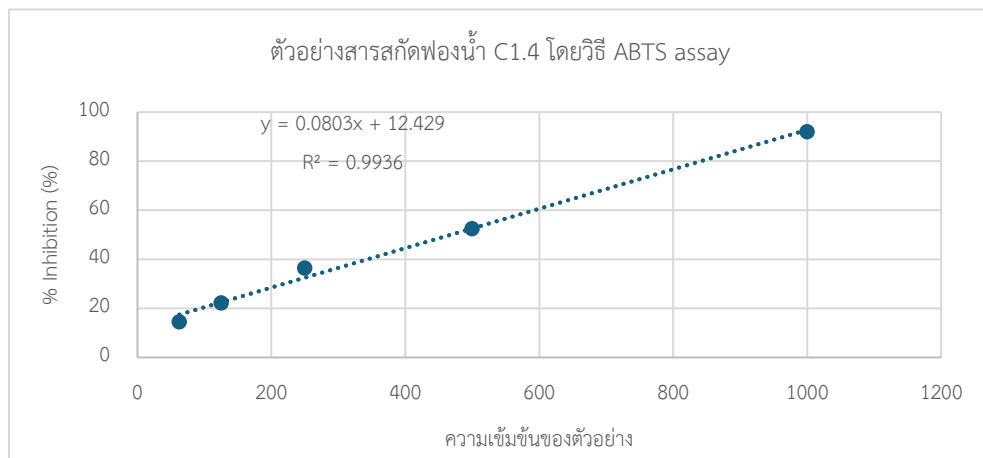
ความเข้มข้นของสารสกัด ตัวอย่าง (µg/mL)	% Inhibition (%)			IC ₅₀			ค่าเฉลี่ยของ IC ₅₀ (µg/mL)	SD
	1	2	3	1	2	3		
1000	85.61	92.10	93.51	422.92	416.25	418.92	419.37	3.3556
500	67.20	63.54	64.66					
250	40.12	38.15	37.87					
125	27.50	29.33	25.81					
62.5	16.92	15.65	15.37					



รูปที่ 15 กราฟตัวอย่างสารสกัดพองน้ำ C1.3 โดยวิธี ABTS assay

ตารางที่ 16ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างพองน้ำ C1.4 โดยใช้ ABTS assay

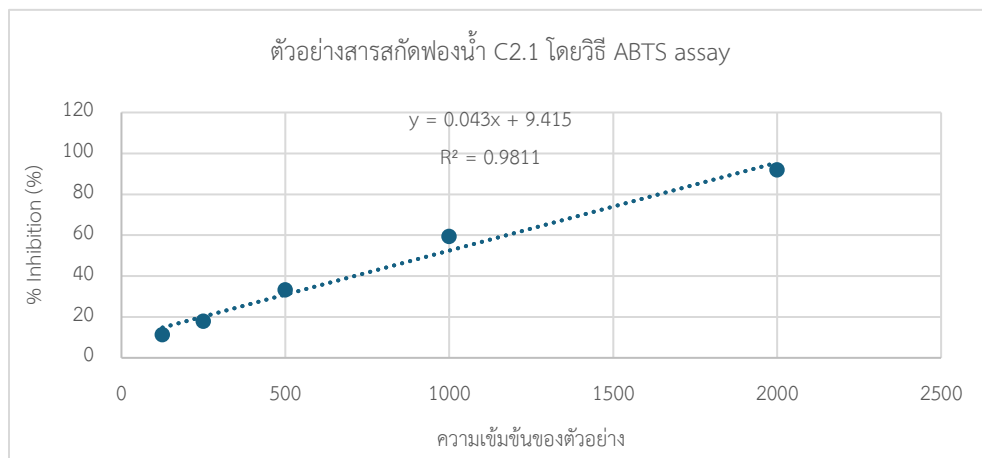
ความเข้มข้นของสารสกัด ตัวอย่าง (µg/mL)	% Inhibition (%)			IC ₅₀			ค่าเฉลี่ยของ IC ₅₀ (µg/mL)	SD
	1	2	3	1	2	3		
1000	90.26	93.24	92.61	468.50	463.63	471.05	467.73	3.7675
500	47.69	55.54	54.29					
250	41.64	34.58	33.01					
125	25.07	21.15	20.52					
62.5	15.10	13.69	14.94					



รูปที่ 16 กราฟตัวอย่างสารสกัดพองน้ำ C1.4 โดยวิธี ABTS assay

ตารางที่ 17ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างพองน้ำ C2.1 โดยใช้ ABTS assay

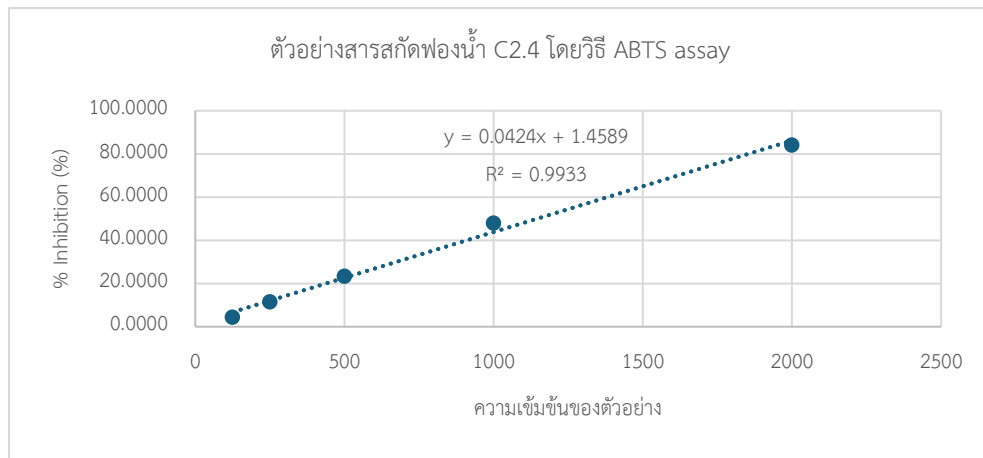
ความเข้มข้นของสารสกัด ตัวอย่าง (μg/mL)	% Inhibition (%)			IC ₅₀			ค่าเฉลี่ยของ IC ₅₀ (μg/mL)	SD
	1	2	3	1	2	3		
2000	92.97	91.45	91.45	938.95	944.19	944.09	942.42	2.9982
1000	59.87	59.02	59.36					
500	33.04	34.39	32.19					
250	18.05	17.72	17.88					
125	9.76	11.45	12.97					



รูปที่ 17 กราฟตัวอย่างสารสกัดพองน้ำ C2.1 โดยวิธี ABTS assay

ตารางที่ 18ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างพองน้ำ C2.4 โดยใช้ ABTS assay

ความเข้มข้น ของสารสกัด ตัวอย่าง ($\mu\text{g/mL}$)	% Inhibition (%)			IC_{50}			ค่าเฉลี่ย ของ IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	SD
	1	2	3	1	2	3		
2000	83.76	85.36	83.28	1151.69	1113.01	1172.65	1145.79	30.2534
1000	47.52	50.40	46.08					
500	24.32	23.52	22.24					
250	11.20	13.92	9.60					
125	3.60	5.04	4.56					



รูปที่ 18 กราฟตัวอย่างสารสกัดพองน้ำ C2.4 โดยวิธี ABTS assay

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากฟองน้ำกระชาย ด้วยวิธี ABTS assay พบว่าสารสกัดจากฟองน้ำกระชายที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด คือ สารที่สกัดด้วย isopropanol ผสมน้ำ (C1.3) ตามด้วยสารสกัดด้วย methanol (C1.1) สารสกัดด้วยน้ำ (C1.4) และสารสกัดด้วย isopropanol (1.2) โดยมีค่า IC_{50} ที่ 419.37 ± 3.36 , 420.18 ± 3.11 , 467.73 ± 3.77 และ 1091.79 ± 10.11 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ซึ่งสารที่สกัดด้วย isopropanol ผสมน้ำ (C1.3) และสารที่สกัดด้วย methanol (C1.1) มีค่า IC_{50} ต่ำกว่าสารที่สกัดด้วยน้ำ (C1.4) และสารที่สกัดด้วย isopropanol (C1.2) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนสารสกัดจากฟองน้ำท่อพุ่มสีแดงที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด คือ สารสกัดด้วย methanol (C2.1) ตามด้วยสารสกัดด้วยน้ำ (C2.4) โดยมีค่า IC_{50} ที่ 942.42 ± 3.00 และ 1145.79 ± 30.25 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระระหว่างสารสกัดจากฟองน้ำกระชายและสารสกัดจากฟองน้ำท่อพุ่มสีแดง โดยการเปรียบเทียบจากสารสกัดชั้นที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด พบว่าสารสกัดจากฟองน้ำกระชายที่สกัดด้วย isopropanol ผสมกับน้ำ (C1.3) ซึ่งมีค่า IC_{50} ที่ 419.37 ± 3.36 $\mu\text{g/mL}$ นั้นมีค่าต่ำกว่าสารสกัดจากฟองน้ำท่อพุ่มสีแดงที่สกัดด้วย methanol (C2.1) ซึ่งมีค่า IC_{50} ที่ 942.42 ± 3.00 $\mu\text{g/mL}$ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากฟองน้ำกระชายมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าสารสกัดจากฟองน้ำท่อพุ่มสีแดง เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay

5. ผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ โดยทดสอบการยับยั้งการสร้าง Nitric oxide

การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ ของสารสกัดจากพองน้ำกระชายและพองน้ำทอพูมสีแดง ที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน 4 ชนิด แล้วนำไปทดสอบด้วยวิธียับยั้งการสร้าง nitric oxide พบว่า ตัวอย่างสารสกัดจากพองน้ำกระชายที่ความเข้มข้น 250 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งสกัดด้วย methanol (C1.1) ยับยั้งการสร้าง nitric oxide ได้ร้อยละ 42.16 ± 16.67 สารสกัดด้วย isopropanol (C1.2) ยับยั้งการสร้าง nitric oxide ได้ร้อยละ 71.85 ± 6.84 สารสกัดด้วย isopropanol ผสมน้ำ (C1.3) ยับยั้งการสร้าง nitric oxide ได้ร้อยละ 68.80 ± 12.93 และสารสกัดด้วยน้ำ (C1.4) ยับยั้งการสร้าง nitric oxide ได้ร้อยละ 0.00 ± 15.34 ส่วนสารสกัดจากพองน้ำทอพูมสีแดงที่สกัดด้วย methanol (C2.1) ยับยั้งการสร้าง nitric oxide ได้ร้อยละ 49.57 ± 1.57 สารสกัดด้วย isopropanol (C2.2) ยับยั้งการสร้าง nitric oxide ได้ร้อยละ 86.69 ± 7.20 สารสกัดด้วย isopropanol ผสมน้ำ (C2.3) ยับยั้งการสร้าง nitric oxide ได้ร้อยละ 62.61 ± 11.87 และสารสกัดด้วยน้ำ (C2.4) ยับยั้งการสร้าง nitric oxide ได้ร้อยละ 30.47 ± 26.91 เมื่อนำตัวอย่างสารสกัดที่สามมรณยับยั้งการสร้าง nitric oxide ได้มากกว่าร้อยละ 50 ขึ้นไป มาทำการทดสอบด้วยความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เพื่อคำนวณหา IC_{50} พบว่าสารสกัดจากพองน้ำกระชายที่สกัดด้วย isopropanol (C1.2) มีค่า IC_{50} $71.80 \pm 17.42 \mu\text{g/mL}$ ส่วนสารสกัดจากพองน้ำทอพูมสีแดงที่สกัดด้วย isopropanol (C1.2) มีค่า IC_{50} 109.44 ± 11.74 ดังตารางที่ 19-26

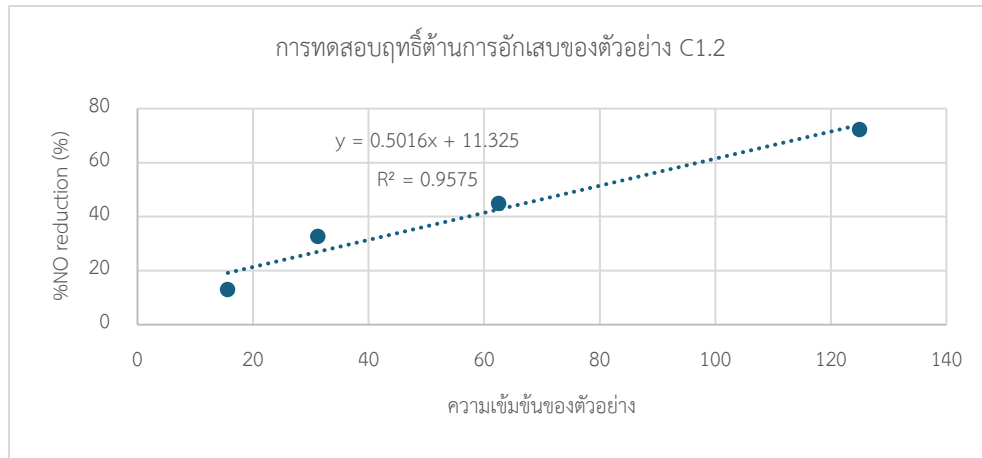
ตารางที่ 19 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของตัวอย่าง C1.1 โดยทดสอบการยับยั้งการหลั่ง Nitric oxide

ความเข้มข้นของตัวอย่าง ($\mu\text{g/mL}$)	%NO reduction (%)			ค่าเฉลี่ยของ %NO reduction (%)	SD
	1	2	3		
250	25.00	58.33	43.13	42.16	16.6883
125	-72.50	40.00	-19.60	-17.37	56.2834
62.5	-10.00	31.66	17.64	13.10	21.2015
31.25	-2.50	25.00	-17.64	1.62	21.6196
15.625	-30.00	26.66	17.64	4.77	30.4486

ตารางที่ 20 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของตัวอย่าง C1.2 โดยทดสอบการยับยั้งการหลั่ง Nitric oxide

ความเข้มข้นของ ตัวอย่าง ($\mu\text{g/mL}$)	%NO reduction (%)			IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)			ค่าเฉลี่ย ของ IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	SD
	1	2	3					
250	72.50*	78.33*	64.70*	86.34	52.50	76.56	71.81	17.4180
125	67.50	76.66	72.54					
62.5	37.50	48.33	49.01					
31.25	27.50	45.00	25.49					
15.625	-15.00*	38.33	15.68					

*ไม่ได้นำค่ามาใช้ในการคำนวณ IC₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)



รูปที่ 19 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของตัวอย่าง C1.2

ตารางที่ 21 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของตัวอย่าง C1.3 โดยทดสอบการยับยั้งการหลั่ง Nitric oxide

ความเข้มข้นของตัวอย่าง (μg/mL)	%NO reduction (%)			ค่าเฉลี่ยของ %NO reduction (%)	SD
	1	2	3		
250	82.35	67.44	56.60	68.80	12.9282
125	79.41	48.83	73.58	67.28	16.2337
62.5	32.35	55.8	56.60	48.26	13.7789
31.25	61.76	44.186	39.62	48.52	11.6912
15.625	14.70	9.30	16.98	13.66	3.9442

ตารางที่ 22 การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของตัวอย่าง C1.4 โดยทดสอบการยับยั้งการหลั่ง Nitric oxide

ความเข้มข้นของตัวอย่าง (µg/mL)	%NO reduction (%)			ค่าเฉลี่ยของ %NO reduction (%)	SD
	1	2	3		
250	5.88	-23.25	-16.98	-11.45	15.3359
125	-23.52	-23.25	-7.54	-18.11	9.1494
62.5	-35.29	-76.74	3.77	-36.09	40.2648
31.25	14.70	13.95	13.20	13.96	0.7492
15.625	-23.52	2.32	22.64	0.48	23.1408

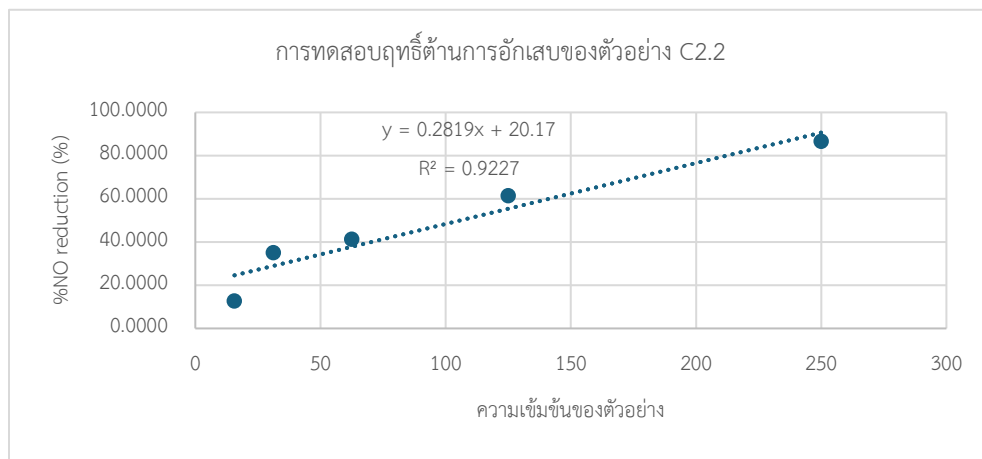
ตารางที่ 23 การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของตัวอย่าง C2.1 โดยทดสอบการยับยั้งการหลั่ง Nitric oxide

ความเข้มข้นของตัวอย่าง (µg/mL)	%NO reduction (%)			ค่าเฉลี่ยของ %NO reduction (%)	SD
	1	2	3		
250	50.00	47.83	50.87	49.57	1.5708
125	35.00	47.83	45.61	42.81	6.8564
62.5	32.50	36.96	50.87	40.11	9.5862
31.25	17.50	13.04	28.07	19.54	7.7178
15.625	10.00	2.17	33.33	15.17	16.2101

ตารางที่ 24 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของตัวอย่าง C2.2 โดยทดสอบการยับยั้งการหลั่ง Nitric oxide

ความเข้มข้นของตัวอย่าง (µg/mL)	%NO reduction (%)			IC ₅₀ (µg/mL)			ค่าเฉลี่ยของ IC ₅₀ (µg/mL)	SD
	1	2	3					
250	95.00	82.60	82.45	109.60	121.08	97.611	109.44	11.73907
125	60.00	63.04	61.40					
62.5	37.50	39.13	47.36					
31.25	45.00*	21.73	38.59					
15.625	12.50	6.52	19.29					

*ไม่ได้นำค่ามาใช้ในการคำนวณ IC₅₀ (µg/mL)



รูปที่ 20 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของตัวอย่าง C2.2

ตารางที่ 25 การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของตัวอย่าง C2.3 โดยทดสอบการยับยั้งการหลั่ง Nitric oxide

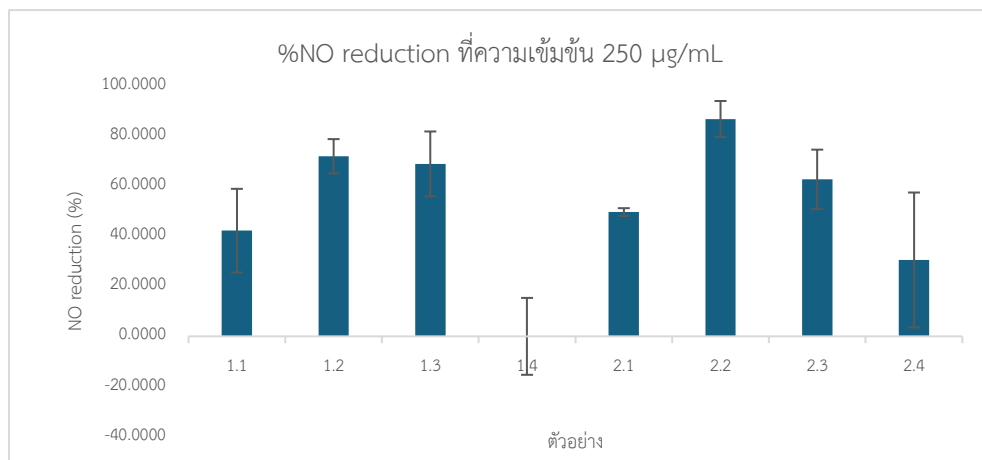
ความเข้มข้นของตัวอย่าง (µg/mL)	%NO reduction (%)			ค่าเฉลี่ยของ %NO reduction (%)	SD
	1	2	3		
250	70.27	68.62	48.93	62.61	11.8715
125	54.05	56.8	44.68	51.87	6.3789
62.5	51.35	19.60	31.91	34.29	16.0046
31.25	32.43	17.64	14.89	21.66	9.4322
15.625	-21.62	-3.92	17.02	-2.84	19.3441

ตารางที่ 26 การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ ของตัวอย่าง C2.4 โดยทดสอบการยับยั้งการหลั่ง Nitric oxide

ความเข้มข้นของตัวอย่าง (µg/mL)	%NO reduction (%)			ค่าเฉลี่ยของ %NO reduction (%)	SD
	1	2	3		
250	0.00	50.98	40.42	30.47	26.9092
125	-37.83	45.09	17.02	8.09	42.1825
62.5	-18.91	58.82	34.04	24.65	39.7134
31.25	-105.40	52.94	53.19	0.24	91.4938
15.625	-27.02	50.98	53.19	25.72	45.6893

ตารางที่ 27 สรุปฤทธิ์ด้านการอักเสบของตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 250 $\mu\text{g/mL}$ โดยวิธี Nitric oxide assay

ตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ยของ %NO reduction $\pm$ SD โดย Nitric oxide assay
C1.1	42.16 $\pm$ 16.69
C1.2	71.85 $\pm$ 6.84
C1.3	68.80 $\pm$ 12.93
C1.4	0.00 $\pm$ 15.34
C2.1	49.57 $\pm$ 1.57
C2.2	86.69 $\pm$ 7.20
C2.3	62.61 $\pm$ 11.87
C2.4	30.47 $\pm$ 26.91



รูปที่ 21 สรุปฤทธิ์ด้านการอักเสบของตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 250 $\mu\text{g/mL}$ โดยวิธี Nitric oxide assay

ตารางที่ 28 สรุป IC₅₀ ของตัวอย่าง โดยวิธี Nitric oxide assay

ตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ยของ IC ₅₀ ± SD โดย Nitric oxide assay
C1.2	71.80 ± 17.42
C2.2	109.44 ± 11.74

จากผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ โดยการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการหลั่ง nitric oxide พบว่าสารสกัดจากพองน้ำกระชายที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบสูงที่สุด คือ สารสกัดด้วย isopropanol (C1.2) โดยมีค่า IC₅₀ 71.80 ± 17.42 µg/mL ส่วนสารสกัดจากพองน้ำทอพูมสีแดงที่มีฤทธิ์ฤทธิ์การยับยั้งการหลั่ง nitric oxide สูงที่สุด คือ สารสกัดด้วยน้ำ (C2.4) โดยมีค่า IC₅₀ 109.44 ± 11.74 µg/mL

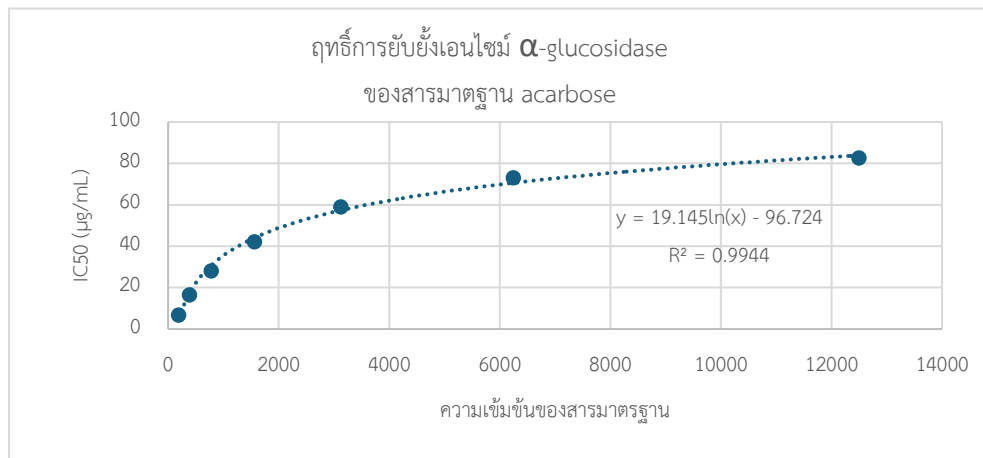
เมื่อพิจารณาฤทธิ์ด้านการอักเสบระหว่างสารสกัดจากพองน้ำกระชายและสารสกัดจากพองน้ำทอพูมสีแดง โดยการเปรียบเทียบจากสารสกัดชั้นที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบสูงที่สุด พบว่าสารสกัดจากพองน้ำกระชายสกัดด้วย isopropanol (C1.2) ซึ่งมีค่า IC₅₀ 71.80 ± 17.42 µg/mL ซึ่งต่ำกว่าสารสกัดจากพองน้ำทอพูมสีแดงที่สกัดด้วยน้ำ (C2.4) ซึ่งมีค่า IC₅₀ 109.44 ± 11.74 µg/mL อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) แสดงให้เห็นว่าพองน้ำกระชายมีฤทธิ์ด้านการอักเสบที่สูงกว่าพองน้ำทอพูมสีแดง

6. ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ของสารสกัดจากฟองน้ำกระชายและฟองน้ำท่อพุ่มสีแดงที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน 4 ชนิด แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase โดยมี acarbose เป็นสารมาตรฐาน พบว่า สารสกัดที่ความเข้มข้น 250 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งสกัดด้วย methanol (C1.1) ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ได้ร้อยละ -246.37 ± 178.37 สารสกัดด้วย isopropanol (C1.2) ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ได้ร้อยละ -246.37 ± 55.63 สารสกัดด้วย isopropanol ผสมน้ำ (C1.3) ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ได้ร้อยละ -379.24 ± 105.67 และสารสกัดด้วยน้ำ (C1.4) ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ได้ร้อยละ -223.53 ± 94.99 ส่วนสารสกัดจากฟองน้ำท่อพุ่มสีแดงที่สกัดด้วย methanol (C2.1) ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ได้ร้อยละ -69.38 ± 78.26 สารสกัดด้วย isopropanol (C2.2) ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ได้ร้อยละ 15.92 ± 51.15 สารสกัดด้วย isopropanol ผสมกับน้ำ (C2.3) ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ได้ร้อยละ 13.67 ± 19.49 และสารสกัดด้วยน้ำ (C2.4) ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ได้ร้อยละ 5.36 ± 23.82 ดังตารางที่ 30 ซึ่งไม่พบค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ที่มากกว่า 50 ในตัวอย่างฟองน้ำทั้งสองชนิด จึงไม่สามารถคำนวณหาค่า IC_{50} ได้ โดยสารมาตรฐาน acarbose มีค่า IC_{50} $2.09 \pm 0.27 \mu\text{g/mL}$ ดังตารางที่ 29

ตารางที่ 29ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ของสารมาตรฐาน acarbose

ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน vitamin c ($\mu\text{g/mL}$)	% Inhibition (%)			IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)			ค่าเฉลี่ยของ IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	SD
	1	2	3	1	2	3		
12500	82.13	82.84	83.19	2.40	1.90	1.96	2.09	0.2718
6250	71.78	74.32	72.96					
3125	55.71	61.73	59.61					
1562.50	38.64	44.72	43.13					
781.25	27.06	28.714	28.71					
390.62	14.41	18.1	17.12					
195.31	-0.88	9.66	11.61					
97.66	-6.75	2.21	4.74					



รูปที่ 22 กราฟฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ของสารมาตรฐาน acarbose

ตารางที่ 30 ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ของสารตัวอย่าง C1.1-C2.4

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของสารสกัด ตัวอย่าง ($\mu\text{g/mL}$)	% Inhibition (%)			ค่าเฉลี่ยของ % Inhibition (%)	SD	%RSD
		1	2	3			
C1.1	250	-43.25	- 377.50	- 318.33	-246.36	178.3726	-72.40
C1.2	250	- 303.80	- 192.73	- 242.56	-246.36	55.6341	-22.58
C1.3	250	- 491.69	- 364.01	- 282.00	-379.23	105.6701	-27.86
C1.4	250	- 278.89	- 113.84	- 277.85	-223.52	94.9945	-42.49
C2.1	250	-1.21	- 154.84	-52.07	-69.37	78.2642	- 112.80
C2.2	250	22.14	-38.06	63.66	15.91	51.1502	321.35
C2.3	250	36.15	1.90	2.94	13.66	19.4850	142.56
C2.4	250	21.62	-21.97	16.43	5.36	23.8152	444.03

จากผลการทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ของสารสกัดจากฟองน้ำกระชาย พบว่าไม่มีสารสกัดใดที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ได้มากกว่าร้อยละ 50 รวมถึงสารสกัดจาก ฟองน้ำท่อพุ่มสีแดงก็พบว่าไม่มีสารสกัดใดที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ได้มากกว่าร้อยละ 50 เช่นกัน แสดงว่าทั้งฟองน้ำกระชายและฟองน้ำท่อพุ่มสีแดงไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase

7. ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมโดย MTT assay

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ของสารสกัดจากพองน้ำกระชายและพองน้ำทอพูมสีแดงที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน 4 ชนิด แล้วนำไปทดสอบด้วยวิธี MTT assay พบว่าที่ความเข้มข้น 1000 $\mu\text{g/mL}$ สารสกัดจากพองน้ำกระชายด้วย methanol (C1.1) มีค่าร้อยละการตายของเซลล์มะเร็ง 37.49 ± 4.68 สารสกัดด้วย isopropanol (C1.2) มีค่าร้อยละการตายของเซลล์มะเร็ง 58.42 ± 3.65 สารสกัดด้วย isopropanol ผสมน้ำ (C1.3) มีค่าร้อยละการตายของเซลล์มะเร็ง 76.37 ± 5.97 สารสกัดด้วยน้ำ (C1.4) มีค่าร้อยละการตายของเซลล์มะเร็ง -0.30 ± 11.57 ส่วนสารสกัดจากพองน้ำทอพูมสีแดงที่สกัดด้วย methanol (C2.1) มีค่าร้อยละการตายของเซลล์ 43.23 ± 0.61 สารสกัดด้วย isopropanol (C2.2) มีค่าร้อยละการตายของเซลล์มะเร็ง 52.18 ± 3.11 สารสกัดด้วย isopropanol ผสมน้ำ (C2.3) มีค่าร้อยละการตายของเซลล์มะเร็ง 67.74 ± 1.36 สารที่สกัดด้วยน้ำ (C2.4) มีค่าร้อยละการตายของเซลล์ที่ 21.1225 ± 8.2771 จากนั้นคำนวณหา IC_{50} แต่สารสกัดจากพองน้ำทั้งสองชนิดที่สกัดด้วย methanol และสกัดด้วยน้ำ มีค่าร้อยละการตายของเซลล์น้อยกว่า 50 จึงไม่สามารถคำนวณค่า IC_{50} ได้ ดังตารางที่ 31-46

ตารางที่ 31 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของตัวอย่าง C1.1 โดยใช้ MTT assay (% Variable)

ความเข้มข้นของตัวอย่าง ($\mu\text{g/mL}$)	% Variable (%)			ค่าเฉลี่ยของ % Variable (%)	SD
	1	2	3		
1000	60.12	59.49	67.8	62.50	4.6783
500	70.09	76.84	81.004	75.98	5.5063
250	71.35	94.97	95.83	87.38	13.8966
125	77.94	92.70	98.11	89.58	10.4405
62.5	94.74	93.40	96.62	94.92	1.6169

ตารางที่ 32 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของตัวอย่าง C1.1 โดยใช้ MTT assay (% Cell death)

ความเข้มข้นของตัวอย่าง ($\mu\text{g/mL}$)	% Cell death (%)			ค่าเฉลี่ยของ % Cell death (%)	SD
	1	2	3		
1000	39.87	40.50	32.10	37.49	4.6783
500	29.90	23.15	18.99	24.01	5.5063
250	28.64	5.02	4.16	12.61	13.8966
125	22.05	7.29	1.88	10.41	10.4405
62.5	5.25	6.59	3.37	5.07	1.6169

ผลการทดสอบ MTT assay ของตัวอย่าง C1.1 ที่ความเข้มข้น 1000 $\mu\text{g/mL}$ มีค่า % Cell death ที่ต่ำกว่า 50% จึงไม่นำมาคำนวณหาค่า IC_{50}

ตารางที่ 33 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของตัวอย่าง C1.2 โดยใช้ MTT assay (% Variable)

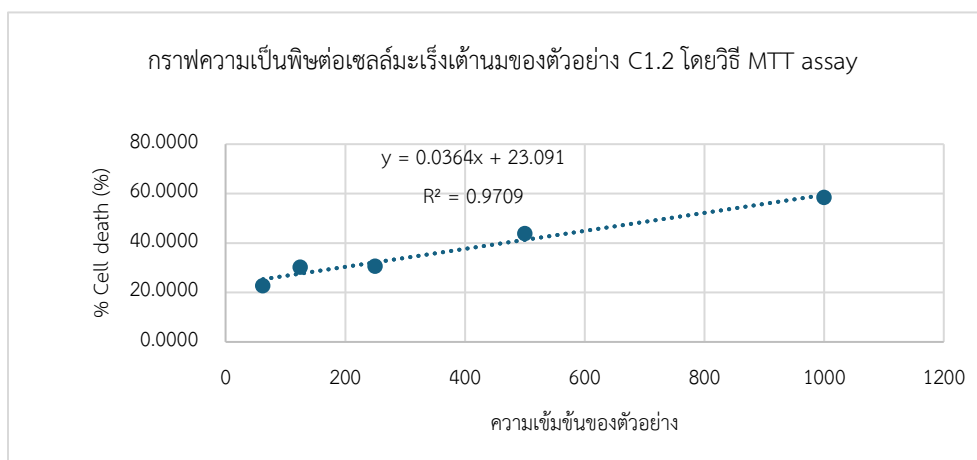
ความเข้มข้นของตัวอย่าง ($\mu\text{g/mL}$)	% Variable (%)			ค่าเฉลี่ยของ % Variable (%)	SD
	1	2	3		
1000	39.08	39.87	45.76	41.58	3.6466
500	56.82	59.18	52.51	56.17	3.3837
250	89.24	59.34	59.34	69.30	17.2661
125	57.37*	71.42	68.13	65.64	7.3475
62.5	38.69*	81.16	73.23	64.36	22.5791

*ไม่นำค่ามาใช้ในการคำนวณ % Variable (%)

ตารางที่ 34 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของตัวอย่าง C1.2 โดยใช้ MTT assay (% Cell death)

ความเข้มข้นของตัวอย่าง ($\mu\text{g/mL}$)	% Cell death (%)			IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)			ค่าเฉลี่ย ของ IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	SD
	1	2	3					
1000	60.91	60.12	54.23	771.20	706.80	745.41	741.14	32.4126
500	43.17	40.81	47.48					
250	10.75	40.65	40.65					
125	42.62*	28.57	31.86					
62.5	61.30*	18.83	26.76					

*ไม่ได้นำค่ามาใช้ในการคำนวณ IC₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)



รูปที่ 23 กราฟความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของตัวอย่าง C1.2 โดยวิธี MTT assay

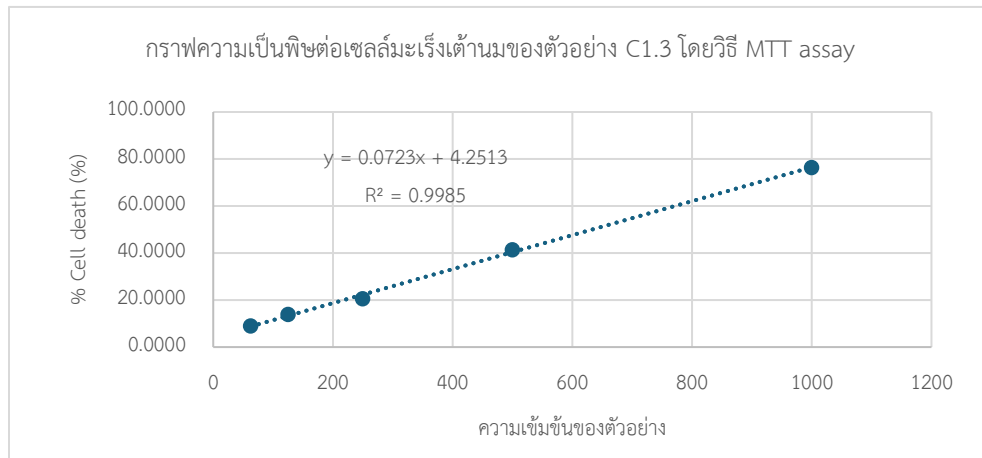
ตารางที่ 35 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของตัวอย่าง C1.3 โดยใช้ MTT assay (% Variable)

ความเข้มข้นของตัวอย่าง ($\mu\text{g/mL}$)	% Variable (%)			ค่าเฉลี่ยของ % Variable (%)	SD
	1	2	3		
1000	16.79	26.26	27.83	23.63	5.9708
500	57.89	58.71	59.20	58.60	0.6656
250	61.84	92.06	84.32	79.41	15.6989
125	81.93	92.47	83.83	86.08	5.6193
62.5	92.80	89.76	90.33	90.96	1.6186

ตารางที่ 36 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของตัวอย่าง C1.3 โดยใช้ MTT assay (% Cell death)

ความเข้มข้นของ ตัวอย่าง ($\mu\text{g/mL}$)	% Cell death (%)			IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)			ค่าเฉลี่ย ของ IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	SD
	1	2	3					
1000	83.20	73.73	72.16	551.75*	680.16	670.45	675.31	6.8657
500	42.10	41.28	40.79					
250	38.15	7.93	15.67					
125	18.06	7.52	16.16					
62.5	7.19	10.23	9.66					

*ไม่ได้นำค่ามาใช้ในการคำนวณ ค่าเฉลี่ยของ IC₅₀ และ SD



รูปที่ 24 กราฟความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของตัวอย่าง C1.3 โดยวิธี MTT assay

ตารางที่ 37 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของตัวอย่าง C1.4 โดยใช้ MTT assay (% Variable)

ความเข้มข้นของตัวอย่าง ($\mu\text{g/mL}$)	% Variable (%)			ค่าเฉลี่ยของ % Variable (%)	SD
	1	2	3		
1000	98.32	112.73	89.84	100.30	11.5739
500	104.83	105.98	104.41	105.07	0.8111
250	97.58	96.76	99.97	98.10	1.6681
125	103.43	96.34	92.72	97.50	5.4451
62.5	97.83	95.03	94.12	95.66	1.9319

ตารางที่ 38 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของตัวอย่าง C1.4 โดยใช้ MTT assay (% Cell death)

ความเข้มข้นของตัวอย่าง ($\mu\text{g/mL}$)	% Cell death (%)			ค่าเฉลี่ยของ % Cell death (%)	SD
	1	2	3		
1000	1.67	-12.73	10.15	-0.30	11.5739
500	-4.83	-5.98	-4.41	-5.07	0.8111
250	2.41	3.23	0.02	1.89	1.6681
125	-3.43	3.65	7.27	2.49	5.4451
62.5	2.16	4.96	5.87	4.33	1.9319

ผลการทดสอบ MTT assay ของตัวอย่าง C1.4 ที่ความเข้มข้น 1000 $\mu\text{g/mL}$ มีค่า % Cell death ที่ต่ำกว่า 50% จึงไม่นำมาคำนวณหาค่า IC_{50}

ตารางที่ 39 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของตัวอย่าง C2.1 โดยใช้ MTT assay (% Variable)

ความเข้มข้นของตัวอย่าง ($\mu\text{g/mL}$)	% Variable (%)			ค่าเฉลี่ยของ % Variable (%)	SD
	1	2	3		
1000	57.24	56.97	56.08	56.77	0.6051
500	60.71	62.48	65.51	62.90	2.4267
250	75.55	71.55	82.84	76.65	5.7237
125	82.31	91.28	87.37	86.99	4.5013
62.5	90.84	95.20	99.73	95.25	4.4447

ตารางที่ 40 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของตัวอย่าง C2.1 โดยใช้ MTT assay (% Cell death)

ความเข้มข้นของตัวอย่าง ($\mu\text{g/mL}$)	% Cell death (%)			ค่าเฉลี่ยของ % Cell death (%)	SD
	1	2	3		
1000	42.75	43.02	43.91	43.23	0.6051
500	39.28	37.51	34.48	37.09	2.4267
250	24.44	28.44	17.15	23.34	5.7237
125	17.68	8.71	12.62	13.00	4.5013
62.5	9.15	4.80	0.26	4.74	4.4447

ผลการทดสอบ MTT assay ของตัวอย่าง C2.1 ที่ความเข้มข้น 1000 $\mu\text{g/mL}$ มีค่า % Cell death ที่ต่ำกว่า 50% จึงไม่ได้นำมาคำนวณหาค่า IC_{50}

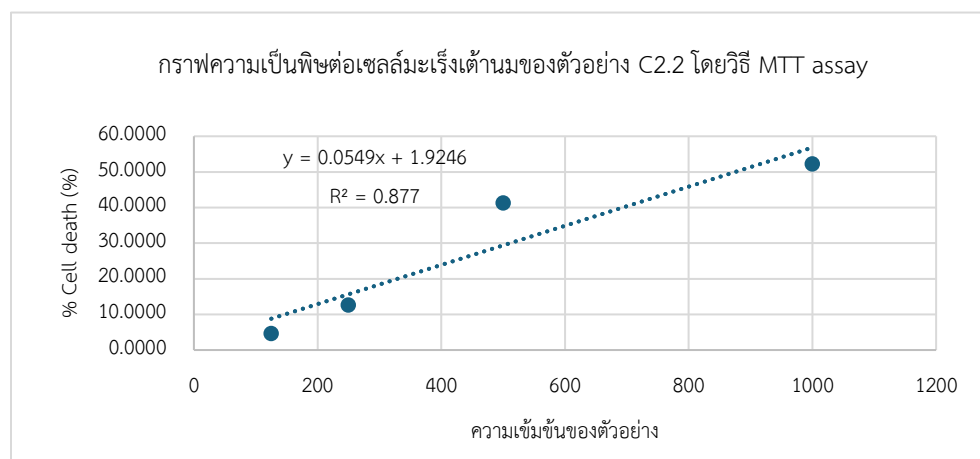
ตารางที่ 41 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของตัวอย่าง C2.2 โดยใช้ MTT assay (% Variable)

ความเข้มข้นของตัวอย่าง ($\mu\text{g/mL}$)	% Variable (%)			ค่าเฉลี่ยของ % Variable (%)	SD
	1	2	3		
1000	46.48	51.37	45.60	47.82	46.4889
500	62.40	56.17	57.60	58.72	62.4000
250	98.84	82.93	80.35	87.37	98.8444
125	97.68	95.02	93.51	95.40	97.6889
62.5	110.93	106.66	101.06	106.22	110.9333

ตารางที่ 42 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของตัวอย่าง C2.2 โดยใช้ MTT assay (% Cell death)

ความเข้มข้น ของ ตัวอย่าง ($\mu\text{g/mL}$)	% Cell death (%)			IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)			ค่าเฉลี่ย ของ IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	SD
	1	2	3					
1000	53.51	48.62	54.40	881.98	910.72	833.22	875.31	39.1807
500	37.60	43.82	42.40					
250	1.15	17.06	19.64					
125	2.31	4.97	6.48					
62.5	-10.93*	-6.66*	-1.06*					

*ไม่ได้นำค่ามาใช้ในการคำนวณ ค่าเฉลี่ยของ IC_{50} และ SD



รูปที่ 25 กราฟความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของตัวอย่าง C2.2 โดยวิธี MTT assay

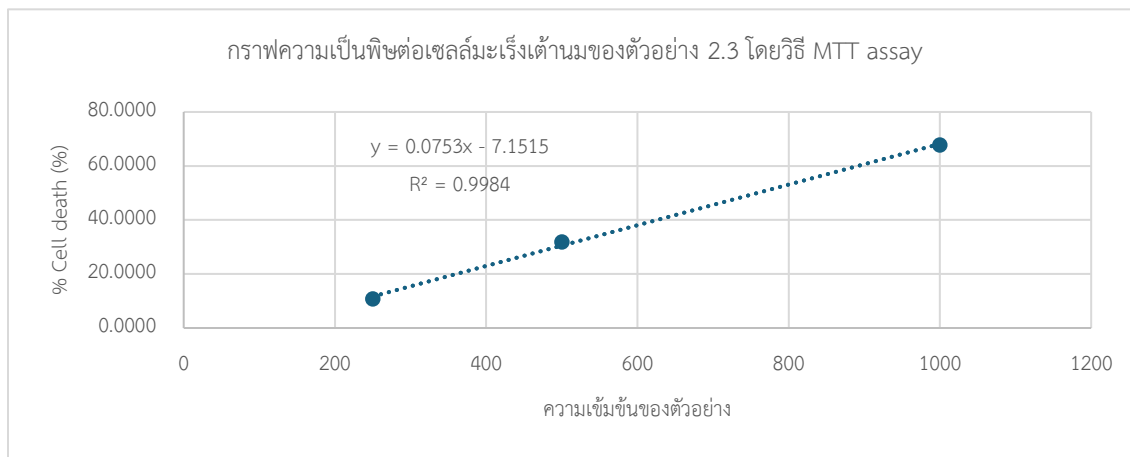
ตารางที่ 43 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของตัวอย่าง C2.3 โดยใช้ MTT assay (% Variable)

ความเข้มข้นของตัวอย่าง ($\mu\text{g/mL}$)	% Variable (%)			ค่าเฉลี่ยของ % Variable (%)	SD
	1	2	3		
1000	32.95	30.68	33.13	32.25	1.3619
500	77.30	62.64	64.54	68.16	7.9749
250	88.53	86.17	92.87	89.19	3.3984
125	83.73	73.77	67.89	75.13	8.0078
62.5	72.96	70.97	73.86	72.60	1.4820

ตารางที่ 44 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของตัวอย่าง C2.3 โดยใช้ MTT assay (% Cell death)

ความเข้มข้น ของ ตัวอย่าง ($\mu\text{g/mL}$)	% Cell death (%)			IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)			ค่าเฉลี่ย ของ IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	SD
	1	2	3					
1000	67.04	69.31	66.86	796.78	718.92	758.31	758.01	38.9305
500	22.69	37.35	35.45					
250	11.46	13.82	7.12					
125	16.26*	26.22*	32.10*					
62.5	27.03*	29.02*	26.13*					

*ไม่ได้นำค่ามาใช้ในการคำนวณ ค่าเฉลี่ยของ IC_{50} และ SD



รูปที่ 26 กราฟความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของตัวอย่าง C2.3 โดยวิธี MTT assay

ตารางที่ 45 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของตัวอย่าง C2.1 โดยใช้ MTT assay (% Variable)

ความเข้มข้นของตัวอย่าง ($\mu\text{g/mL}$)	% Variable (%)			ค่าเฉลี่ยของ % Variable (%)	SD
	1	2	3		
1000	81.47	85.54	69.61	78.87	8.2771
500	86.54	86.63	86.90	86.69	0.1884
250	91.97	94.32	96.4	94.26	2.2637
125	110.25	113.97	100.48	108.23	6.9677
62.5	116.14	126.73	98.762	113.88	14.1228

ตารางที่ 46 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของตัวอย่าง C2.1 โดยใช้ MTT assay (% Cell death)

ความเข้มข้นของตัวอย่าง ($\mu\text{g/mL}$)	% Cell death (%)			ค่าเฉลี่ยของ % Cell death (%)	SD
	1	2	3		
1000	18.52	14.45	30.38	21.12	8.2771
500	13.4	13.36	13.09	13.31	0.1884
250	8.026	5.67	3.50	5.73	2.2637
125	-10.25	-13.97	-0.48	-8.24	6.9677
62.5	-16.14	-26.73	1.23	-13.88	14.1228

ผลการทดสอบ MTT assay ของตัวอย่าง C2.4 ที่ความเข้มข้น 1000 $\mu\text{g/mL}$ มีค่า % Cell death ที่ต่ำกว่า 50% จึงไม่ได้นำมาคำนวณหาค่า IC_{50}

จากผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดจากฟองน้ำกระชาย ด้วยวิธี MTT assay พบว่าสารสกัดจากฟองน้ำกระชายที่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูงที่สุด คือ สารสกัดด้วย isopropanol ผสมน้ำ (C1.3) ตามด้วยสารสกัดด้วย isopropanol (C1.2) โดยมีค่า IC_{50} $675.31 \pm 6.87 \mu\text{g/mL}$ และ $741.14 \pm 32.41 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกัน ส่วนสารสกัดจากฟองน้ำท่อพุ่มสีแดงที่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูงที่สุด คือ สารสกัดด้วย isopropanol ผสมน้ำ (C2.3) ตามด้วยสารสกัดด้วย isopropanol (C2.2) โดยมีค่า IC_{50} $758.01 \pm 38.93 \mu\text{g/mL}$ และ $875.31 \pm 39.18 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งระหว่างสารสกัดจากฟองน้ำกระชายและสารสกัดจากฟองน้ำท่อพุ่มสีแดง โดยการเปรียบเทียบจากสารสกัดชั้นที่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูงที่สุด พบว่าสารสกัดจากฟองน้ำกระชายที่สกัดด้วย isopropanol ผสมน้ำ (C1.3) ซึ่งมีค่า IC_{50} $675.31 \pm 6.87 \mu\text{g/mL}$ โดยมีค่าใกล้เคียงกับสารสกัดจากฟองน้ำท่อพุ่มสีแดงที่สกัดด้วย isopropanol ผสมกับน้ำ (C2.3) ซึ่งมีค่า IC_{50} $758.01 \pm 38.93 \mu\text{g/mL}$ และไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แสดงให้เห็นว่าฟองน้ำกระชายมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเทียบเท่ากับฟองน้ำท่อพุ่มสีแดง

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการวิจัย

การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานเบื้องต้นของตัวอย่างฟองน้ำรหัส 016 และ 017 ด้วยคู่มือจำแนกอันดับฟองน้ำทะเล พบว่าตัวอย่างฟองน้ำทั้งสองรหัสอยู่ใน Class Demospongiae แต่มีลักษณะโครงสร้างฟองน้ำที่ต่างกัน โดยตัวอย่างฟองน้ำที่มีรหัส 016 พบโครงสร้างฟองน้ำที่ประกอบด้วย Echinating spicules และมีหนามลักษณะ Palmate chelae ส่วนในตัวอย่างฟองน้ำรหัส 017 ไม่พบโครงสร้างฟองน้ำที่ประกอบด้วย Echinating spicules และ chelae ทำให้ตัวอย่างฟองน้ำทั้งสองรหัสต่างกันในระดับลำดับ (Order) โดยฟองน้ำรหัส 016 คือ ฟองน้ำ Order Poecilosclerida ส่วนฟองน้ำรหัส 017 คือ ฟองน้ำ Order Haplosclerida จึงสันนิษฐานได้ว่าตัวอย่างฟองน้ำทั้งสองรหัสเป็นฟองน้ำต่างชนิดกัน ซึ่งในคู่มือจำแนกอันดับฟองน้ำทะเลมีรายละเอียดของฟองน้ำรหัส 016 ถึงเพียงแค่ชั้น Order เท่านั้น ทำให้คณะผู้วิจัยไม่สามารถจำแนกฟองน้ำรหัส 016 ต่อไปได้ถึงชั้น Species แต่ในภายหลังได้มีการยืนยันการพิสูจน์เอกลักษณ์โดย ดร.สุเมตต์ ปุจฉาการ และมีข้อมูลการศึกษาฟองน้ำกระชายในต่างประเทศที่สนับสนุนได้ว่าฟองน้ำรหัส 016 คือ ฟองน้ำกระชาย (*Coelocarteria singaporensis*) ส่วนฟองน้ำรหัส 017 สามารถใช้คู่มือจำแนกอันดับฟองน้ำทะเลได้ถึงชั้น Species ซึ่งพบลักษณะที่สำคัญของฟองน้ำชนิดนี้คือ Microsclere เป็นรูปตัว C และไม่มีหนามฟองน้ำรูปดาว แต่ยังไม่พบเซลล์สืบพันธุ์เป็นดอกพุ่มทรงกลมที่เป็นลักษณะเด่นอีกอย่างของฟองน้ำชนิดนี้ ซึ่งอาจเกิดจากการใช้ส่วนของฟองน้ำที่ใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ไม่ถูกส่วนหรืออาจเกิดจากความสามารถในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของคณะผู้ทำวิจัย แต่ลักษณะเด่นที่พบส่วนใหญ่ยังสามารถจำแนกได้ว่าฟองน้ำรหัส 017 คือ ฟองน้ำท่อพุ่มสีแดง (*Oceanapia sagittaria*) โดยในภายหลังได้มีการยืนยันการพิสูจน์เอกลักษณ์โดย ดร.สุเมตต์ ปุจฉาการ จึงเป็นข้อมูลสนับสนุนว่าฟองน้ำรหัส 017 คือ ฟองน้ำท่อพุ่มสีแดง

การตรวจสอบกลุ่มสารด้วยน้ำยาทดสอบชนิดต่างๆ พบว่าสารสกัดจากฟองน้ำกระชายด้วย methanol (C1.1) พบสารกลุ่ม tannins saponins และ alkaloids สารสกัดด้วยน้ำ (C1.4) พบสารกลุ่ม alkaloids สารสกัดด้วย isopropanol (C1.2) พบสารกลุ่ม steroids และ triterpenes สารสกัดด้วย

isopropanol ผสมน้ำ (C1.3) พบ steroids ส่วนสกัดจากฟองน้ำท่อพุ่มสีแดง พบสารกลุ่ม saponin ในสารสกัดด้วยน้ำ (C2.4) พบสารกลุ่ม alkaloids, steroids และ triterpenes ในสารสกัดด้วย isopropanol (C2.2) และ isopropanol ผสมน้ำ (C2.3) โดยเมื่อเปรียบเทียบฟองน้ำทั้งสองชนิด พบว่า ฟองน้ำทั้งสองชนิดมีสารประกอบทุติยภูมิใกล้เคียงกันโดยมีสารประกอบหลักเป็นสารกลุ่ม alkaloids, steroids และ triterpene

การตรวจสอบจำนวนองค์ประกอบของสารสกัดด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบผิวนาง พบว่าสารสกัดจากฟองน้ำกระชาย เมื่อนำมาแยกองค์ประกอบด้วยการใช้ mobile phase ระบบ hexane: ethyl acetate (2:3) สารที่สกัดด้วย methanol (C1.1) พบองค์ประกอบ 4 จุด สารสกัดด้วย isopropanol (C1.2) พบ 5 จุด สารสกัดด้วย isopropanol (C1.3) ผสมน้ำ พบ 5 จุด และสารสกัดด้วยน้ำ (C1.4) พบ 1 จุด ในขณะที่สารสกัดจากฟองน้ำท่อพุ่มสีแดงที่สกัดด้วย methanol (C2.1) พบองค์ประกอบ 3 จุด สารสกัดด้วย isopropanol (C2.2) พบ 5 จุด สารสกัดด้วย isopropanol (C2.3) ผสมน้ำ พบ 5 จุด และสารที่สกัดด้วยน้ำ (C1.4) ไม่พบองค์ประกอบใด ส่วนการใช้ mobile phase ระบบ dichloromethane: methanol (9:1) สารสกัดจากฟองน้ำกระชายที่สกัดด้วย methanol (C1.1) พบองค์ประกอบ 2 จุด สารสกัดด้วย isopropanol (C1.2) พบ 4 จุด สารสกัดด้วย isopropanol (C1.3) ผสมน้ำ พบ 4 จุด และสารที่สกัดด้วยน้ำ (C1.4) พบ 1 จุด ในขณะที่สารสกัดจากฟองน้ำท่อพุ่มสีแดงที่สกัดด้วย methanol (C2.1) พบองค์ประกอบ 4 จุด สารสกัดด้วย isopropanol (C2.2) พบ 5 จุด สารสกัดด้วย isopropanol (C2.3) ผสมน้ำ พบ 5 จุด และสารที่สกัดด้วยน้ำ (C1.4) พบ 1 จุด เมื่อเปรียบเทียบฟองน้ำทั้งสองชนิด พบว่า ค่า R_f ของสารที่ถูกสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดเดียวกันมีค่าใกล้เคียงกัน สีของจุดเมื่อส่องด้วย UV ที่ 254 และ 365 nm รวมถึงเมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent ของฟองน้ำทั้งสองชนิดให้สีใกล้เคียงกัน จึงสันนิษฐานได้ว่าตัวอย่างฟองน้ำทั้งสองชนิดมีองค์ประกอบใกล้เคียงกัน ซึ่งการปรากฏจุดสีเมื่อส่องด้วย UV ที่ 254 และ 365 nm อาจจะบ่งชี้ถึงโครงสร้าง aromatic อาจเป็นสารในกลุ่ม alkaloids, triterpenes หรือ steroids ได้ ส่วนการสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent แสดงให้เห็นว่าสารประกอบจากฟองน้ำทั้งสองมีโครงสร้างที่เป็น aldehyde, ketone หรือ alcohol ซึ่งอาจเป็นโครงสร้างของสารในกลุ่ม tannins, saponins หรือ triterpenes ได้ นอกจากนี้ anisaldehyde reagent ยังสามารถใช้ตรวจสอบสารในกลุ่ม alkaloids จากโครงสร้างของ phenol และตรวจสอบสารในกลุ่ม steroids จากโครงสร้าง

hydroxyl group ได้ เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับ การตรวจสอบกลุ่มสารพบว่ากลุ่มสารที่ปรากฏจากการตรวจสอบทั้งสองวิธีมีความสอดคล้องกัน

แต่ในการตรวจสอบกลุ่มสารด้วยน้ำยาทดสอบชนิดต่าง ๆ และการตรวจสอบจำนวนองค์ประกอบของสารสกัดด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบผิวนาง เป็นเพียงการทดสอบกลุ่มสารและจำนวนองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นเท่านั้น คณะผู้วิจัยจึงเสนอแนะให้มีศึกษาถึงชนิดของสารด้วยวิธีที่จำเพาะ เช่น high performance liquid chromatography (HPLC) ในการศึกษาต่อไปในอนาคต

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay พบว่าสารสกัดจากพองน้ำกระชายที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด คือ สารสกัดด้วย methanol (C1.1) โดยมีค่า IC_{50} ที่ $400.52 \pm 10.44 \mu\text{g/mL}$ ส่วนสารสกัดจากพองน้ำทอพูมสีแดง ไม่มีสารใดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเนื่องจากฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าร้อยละ 50 ซึ่งคณะผู้วิจัยสันนิษฐานว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่พบจากพองน้ำกระชายอาจเกิดจากสารกลุ่ม triterpenes condensed tannins saponins และ alkaloid ที่พบจากผลการตรวจสอบกลุ่มสารในการทดลองก่อนหน้า แม้ว่าผลการทดสอบส่วนใหญ่ทั้ง 2 ตัวอย่างมีกลุ่มสารที่คล้ายๆกันในตัวทำละลายที่เหมือนกันแต่กลุ่มสารเหล่านี้อาจมีโครงสร้างในและฤทธิ์ที่ต่างกัน นอกจากนี้ในการศึกษา ยังพบว่าสารสกัดจากพองน้ำกระชายซึ่งสกัดด้วย methanol (C1.1) ที่ความเข้มข้นสุดท้าย $125 \mu\text{g/mL}$ ต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 21.67 ± 3.28 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพองน้ำทะเลไทย(4) ที่ทำก่อนหน้า ด้วยวิธี DPPH assay โดยพบว่าสารสกัด methanol จากพองน้ำกระชายที่ความเข้มข้นสุดท้าย $100 \mu\text{g/mL}$ มีค่าการต้านอนุมูลอิสระร้อยละ 27.03 ± 1.51

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay พบว่าสารสกัดจากพองน้ำกระชายที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด คือ สารที่สกัดด้วย isopropanol ผสมน้ำ (C1.3) ส่วนสารสกัดจากพองน้ำทอพูมสีแดงที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด คือ สารที่สกัดด้วย methanol (C2.1) และเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระระหว่างสารสกัดจากพองน้ำกระชายและสารสกัดจากพองน้ำทอพูมสีแดง ในสารที่สกัดด้วย isopropanol ผสมน้ำ (C1.3) โดยมีค่า IC_{50} ที่ $419.37 \pm 3.36 \mu\text{g/mL}$ ซึ่งมีค่าต่ำกว่าสารที่สกัดด้วย methanol (C2.1) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงสรุปได้ว่าสารสกัดจากพองน้ำกระชายมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าสารสกัดจากพองน้ำทอพูมสีแดง นอกจากนี้ในการศึกษา ยังพบว่าสารสกัดจาก

ฟองน้ำกระชายซึ่งสกัดด้วย methanol (C1.1) ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 125 $\mu\text{g/ml}$ มีค่าการต้านอนุมูลอิสระร้อยละ 22.35 ± 0.90 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากฟองน้ำทะเลไทย(4) ที่ทำก่อนหน้า ด้วยวิธี ABTS assay โดยพบว่าสารสกัด methanol จากฟองน้ำกระชายที่ความเข้มข้นสุดท้าย 100 $\mu\text{g/ml}$ มีค่าการต้านอนุมูลอิสระร้อยละ 30.86 ± 3.25

การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ โดยการทดสอบการยับยั้งการหลั่ง nitric oxide พบว่าสารสกัดจากฟองน้ำกระชายที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบสูงที่สุด คือ สารที่สกัดด้วย isopropanol (C1.2) ส่วนสารสกัดจากฟองน้ำท่อพุ่มสีแดงที่มีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง nitric oxide มากที่สุด คือสารที่สกัดด้วยน้ำ (C2.4) และเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ด้านการอักเสบระหว่างสารสกัดจากฟองน้ำกระชายและสารสกัดจากฟองน้ำท่อพุ่มสีแดง ในสารที่สกัดด้วย isopropanol (C1.2) โดยมีค่า IC_{50} ที่ $71.80 \pm 17.42 \mu\text{g/mL}$ ซึ่งมีค่าต่ำกว่าสารที่สกัดด้วยน้ำ (C2.4) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงสรุปได้ว่าสารสกัดจากฟองน้ำกระชายมีฤทธิ์ด้านการอักเสบที่สูงกว่าสารสกัดจากฟองน้ำท่อพุ่มสีแดง

การทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase พบว่าทั้งฟองน้ำกระชายและฟองน้ำท่อพุ่มสีแดงไม่มีสารสกัดใดที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ได้มากกว่าร้อยละ 50 โดยในระหว่างการศึกษา คณะผู้วิจัยพบปัญหาที่เกิดขึ้น คือ DMSO ที่ใช้ในการละลายสารสกัดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ทำให้เกิดผล false positive คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาใหม่อีกครั้ง และพบว่าสารสกัดจากฟองน้ำทั้งสองชนิด มีค่าการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ตีกลับ ซึ่งอาจสันนิษฐานได้ว่าฟองน้ำทั้งสองชนิดไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase อีกทั้งยังเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ α -glucosidase หรืออาจคาดการณ์ได้อีกอย่างหนึ่งว่าสารสกัดจากฟองน้ำทั้งสองชนิดสามารถทำปฏิกิริยากับ PNPG ที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ จึงทำให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ตีกลับ

การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบว่าสารสกัดจากฟองน้ำกระชายที่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูงที่สุด คือ สารที่สกัดด้วย isopropanol ผสมกับน้ำ (C1.3) ส่วนสารสกัดจากฟองน้ำท่อพุ่มสีแดงที่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูงที่สุด คือ สารที่สกัดด้วย isopropanol ผสมกับน้ำ (C2.3) ซึ่งคณะผู้วิจัยสันนิษฐานว่าฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่พบจากฟองน้ำทั้งสองชนิดอาจเกิดจากสารกลุ่ม triterpenes และ saponins ที่พบจากผลการตรวจสอบกลุ่มสารในการทดลองก่อนหน้า เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งระหว่างสารสกัดจากฟองน้ำกระชายและสารสกัดจาก

ฟองน้ำท่อพุ่มสีแดง ในสารที่สกัดด้วย isopropanol ผสมกับน้ำ (C1.3) โดยมีค่า IC_{50} ที่ 675.31 ± 6.87 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับสารที่สกัดด้วย isopropanol ผสมกับน้ำ (C2.3) โดยมีค่า IC_{50} ที่ 758.01 ± 38.93 $\mu\text{g/mL}$ และไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงสรุปได้ว่าสารสกัดจากฟองน้ำกระชายมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเทียบเท่ากับสารสกัดจากฟองน้ำท่อพุ่มสี

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานเบื้องต้นของตัวอย่างฟองน้ำรหัส 016 และฟองน้ำรหัส 017 พบว่าฟองน้ำรหัส 016 คือ ฟองน้ำกระชาย (*Coelocarteria singaporensis*) ส่วนฟองน้ำรหัส 017 คือ ฟองน้ำท่อพุ่มสีแดง (*Oceanapia sagittaria*) โดยฟองน้ำทั้งสองชนิดมีลักษณะเด่นของโครงร่างฟองน้ำและหนามฟองน้ำที่แตกต่างกัน

การตรวจสอบกลุ่มด้วยน้ำยาทดสอบชนิดต่างๆ พบว่าสารสกัดที่พบกลุ่มสารเหมือนกันในฟองน้ำทั้ง 2 ชนิด คือ สารสกัดด้วย isopropanol (C1.2, C2.2) และสกัดด้วย isopropanol ผสมน้ำ (C1.3, C2.3) พบสารกลุ่ม alkaloids steroids และ triterpenes และสารสกัดด้วยน้ำ (C1.4, C2.4) พบกลุ่มสาร saponins เหมือนกัน และกลุ่มสารที่พบต่างกันคือ สารสกัดฟองน้ำกระชายที่สกัดด้วย methanol (C1.1) พบ saponins และ tannins ซึ่งไม่พบในสารสกัดฟองน้ำท่อพุ่มสีแดงที่สกัดด้วย methanol

การตรวจสอบจำนวนองค์ประกอบของสารสกัดด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง พบว่าตัวอย่างฟองน้ำทั้งสองชนิดมีจำนวนองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นใกล้เคียงกัน โดยสารสกัดที่มีจำนวนองค์ประกอบมากที่สุดในฟองน้ำกระชายและฟองน้ำท่อพุ่มสีแดง คือ สารสกัดด้วย isopropanol (C1.2, C2.2) และสารที่สกัดด้วย isopropanol ผสมน้ำ (C1.3, C2.3)

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay พบว่าสารสกัดจากฟองน้ำกระชายมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ซึ่งเป็นสารที่สกัดด้วย methanol (C1.1) โดยมีค่า $IC_{50} 400.52 \pm 10.44 \mu\text{g/mL}$ ส่วนการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay พบว่าสารสกัดจากฟองน้ำกระชายมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ซึ่งเป็นสารที่สกัดด้วย isopropanol ผสมน้ำ (C1.3) โดยมีค่า $IC_{50} 419.37 \pm 3.36 \mu\text{g/mL}$

การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ โดยการทดสอบการยับยั้งการหลั่ง nitric oxide พบว่าสารสกัดจากฟองน้ำกระชายมีฤทธิ์ด้านการอักเสบสูงที่สุด ซึ่งเป็นสารที่สกัดด้วย isopropanol (C1.2) โดยมีค่า $IC_{50} 71.80 \pm 17.42 \mu\text{g/mL}$

การทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase พบว่าทั้งฟองน้ำกระชายและฟองน้ำท่อพุ่มสีแดง ไม่มีสารสกัดใดที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ได้มากกว่าร้อยละ 50 แสดงให้เห็นว่าฟองน้ำทั้งสองชนิด ไม่มีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase

การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบว่าสารสกัดจากฟองน้ำกระชายที่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูงที่สุด คือ สารที่สกัดด้วย isopropanol ผสมกับน้ำ (C1.3) โดยมีค่า IC_{50} $675.31 \pm 6.87 \mu\text{g/mL}$ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับสารสกัดจากฟองน้ำท่อพุ่มสีแดงที่สกัดด้วย isopropanol ผสมกับน้ำ (C2.3) โดยมีค่า IC_{50} $758.01 \pm 38.93 \mu\text{g/mL}$

จากผลการศึกษาในโครงการวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่า ฤทธิ์ทางชีวภาพของฟองน้ำกระชาย ไม่ว่าจะเป็นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ด้านการอักเสบ และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ให้ผลการทดสอบที่ต่ำ แต่เนื่องจากการศึกษานี้เป็นการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพบางฤทธิ์ด้วยวิธีเบื้องต้นเท่านั้น ซึ่งการศึกษาฟองน้ำชนิดนี้ยังมีน้อย คณะผู้วิจัยจึงเสนอแนะให้ใช้ข้อมูลในโครงการวิจัยนี้เป็นแนวทางในการศึกษาที่หลากหลายเพิ่มเติมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Sipkema D, Franssen MC, Osinga R, Tramper J, Wijffels RH. Marine sponges as pharmacy. *Mar Biotechnol* (NY). 2005;7(3):142-62.
2. Climate of Chonburi Province Climate Center Meteorological Development Division: climate center; 2023 [cited 2023 10 october]. Available from: <http://climate.tmd.go.th/>.
3. มุสิกะ ณ, วงสุตาวรรณ ว, หมั่นหาผล อ, ทองระอา แ. ฟองน้ำทะเล: ดัชนีชี้วัดทางชีวภาพที่เป็นทางเลือกใหม่ในการใช้ตรวจติดตามมลพิษจากโลหะหนักบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของไทย. *มหาวิทยาลัยบูรพา:ชลบุรี*. 2557.
4. วิเศษพงษ์พันธุ์ พ, หงษ์ทศศิริ ค, กันทะวงศ์ อ. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 54: สาขาพืช, สาขาสัตว์, สาขาสัตวแพทยศาสตร์, สาขาประมง, สาขาส่งเสริมการเกษตรและคหกรรมศาสตร์. *มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์* 2559. 912-21 p.
5. Hoseini MHM, Sadeghi S, Azizi M, Pouriran R. Chapter 19 - Immunomodulatory activities of chitin and chitosan microparticles. In: Gopi S, Thomas S, Pius A, editors. *Handbook of Chitin and Chitosan*: Elsevier; 2020. p. 609-39.
6. Gupta R, Polaka S, Rajpoot K, Tekade M, Sharma MC, Tekade RK. Chapter 6 - Importance of toxicity testing in drug discovery and research. In: Tekade RK, editor. *Pharmacokinetics and Toxicokinetic Considerations*. 2: Academic Press; 2022. p. 117-44.
7. พวงซ่อ ภ, นวลแก้ว น.ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของสารสกัดผักพื้นบ้าน(α -Glucosidase Inhibition of Thai Local Vegetable Extracts). *วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน*. 2013;9(1):218.
8. สำนักงานราชบัณฑิตยสภา. สารประกอบ [Internet] 2554 [cited 2566 20 ตุลาคม]. Available from: <https://dictionary.orst.go.th/>.

9. Pedersen-Bjergaard S, Gammelgaard B, Halvorsen TG. Introduction to Pharmaceutical Analytical Chemistry. First ed. Wiley; 2012.
10. DoMaC. สัตว์พื้นทะเล internet2558 [cited 2566 10 ตุลาคม]. Available from: <https://projects.dmcr.go.th/miniprojects/169/news/247/detail/48879>.
11. (WoRMS) WroMS. *Coelocarteria singaporensis* (Carter, 1883) internet2007 [updated 2007-06-30. Available from: <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=168440#images>.
12. Momparler RL. Optimization of cytarabine (ARA-C) therapy for acute myeloid leukemia. Exp Hematol Oncol. 2013;2:20.
13. Roloff GW, Odenike O, Bajel A, Wei AH, Foley N, Uy GL. Contemporary Approach to Acute Myeloid Leukemia Therapy in 2022. American Society of Clinical Oncology Educational Book. 2022(42):568-83.
14. Faruqi A, Tadi P. Cytarabine StatPearls [Internet]2023 [cited 2023 15 october]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557680/>.
15. Martins A, Vieira H, Gaspar H, Santos S. Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: tips for success. Mar Drugs. 2014;12(2):1066-101.
16. Valerio MR, Arrivas Bajardi E, Arcara CC, Borsellino N, Lo Mauro M, Cipolla C, et al. Eribulin Mesylate for the Treatment of Metastatic Hormone-refractory and Triple-negative Breast Cancer: A Multi-institutional Real-world Report on Efficacy and Safety. Am J Clin Oncol. 2021;44(3):105-8.
17. Nakao Y, Fusetani N. 2.10 - Marine Invertebrates: Sponges. In: Liu H-W, Mander L, editors. Comprehensive Natural Products II. Oxford: Elsevier; 2010. p. 327-62.

18. Ro J, Cheng FT, Sriuranpong V, Villalon A, Smruti BK, Tsang J, et al. Patient Management with Eribulin in Metastatic Breast Cancer: A Clinical Practice Guide. *J Breast Cancer*. 2016;19(1):8-17.
19. Khodzori FA, Mazlan NB, Chong WS, Ong KH, Palaniveloo K, Shah MD. Metabolites and Bioactivity of the Marine *Xestospongia Sponges* (Porifera, Demospongiae, Haplosclerida) of Southeast Asian Waters. *Biomolecules*. 2023;13(3).
20. Beesoo R, Neergheen VS, Bhagooli R, Reid A-M, Lambrechts IA, Gibango L, et al. In vitro antioxidant, antibacterial, cytotoxic, and epigenetic screening of crude extract and fractions of the marine sponge *Neopetrosia exigua* from Mauritius waters. *Scientific African*. 2023;21:e01867.
21. Saludes JP, Lievens SC, Molinski TF. Occurrence of the alpha-glucosidase inhibitor 1,4-Dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol and related iminopentitols in marine sponges. *J Nat Prod*. 2007;70(3):436-8.
22. Ramanjooloo A, Cresteil T, Lebrasse C, Beedessee G, Oogarah P, van Soest RW, et al. α -Glucosidase inhibitory activity of marine sponges collected in Mauritius waters. *Nat Prod Res*. 2015;29(4):383-7.
23. Kijjoa A, Wattanadilok R, Campos N, Nascimento MS, Pinto M, Herz W. Anticancer activity evaluation of kuanoniamines A and C isolated from the marine sponge *Oceanapia sagittaria*, collected from the Gulf of Thailand. *Mar Drugs*. 2007;5(2):6-22.
24. Muthiyan R, Nambikkairaj B, Mahanta N, Immanuel T, Mandal RS, Kumaran K, et al. Antiproliferative and Proapoptotic Activities of Marine Sponge *Hyrtios erectus* Extract on Breast Carcinoma Cell Line (MCF-7). *Pharmacogn Mag*. 2017;13(Suppl 1):S41-s7.
25. Swantara MD, Rita WS, Suartha N, Agustina KK. Anticancer activities of toxic isolate of *Xestospongia testudinaria* sponge. *Vet World*. 2019;12(9):1434-40.

26. Hajdu, E.; Lôbo-Hajdu, G. (2002 [2004]). Family Isodictyidae Dendy, 1924. pp. 703-706. *In*: Hooper, J.N.A. & Van Soest, R.W.M. (eds) (2002 [2004]). *Systema Porifera. A guide to the classification of sponges (2 Volumes)*. Kluwer Academic/Plenum, NY, 1708 + xlviii. ISBN 978-1-4615-0747-5 (eBook electronic version)
27. Dendy, A. (1905). Report on the sponges collected by Professor Herdman, at Ceylon, in 1902. *In*: Herdman, W.A. (Ed.), *Report to the Government of Ceylon on the Pearl Oyster Fisheries of the Gulf of Manaar. 3 (Supplement 18)*. (Royal Society: London). Pp. 57-246, pls I-XVI. page(s): 166-168
28. Laubenfels, M.W. de. (1954). The Sponges of the West-Central Pacific. *Oregon State Monographs. Studies in Zoology. 7*: i-x, 1-306, pls I-XII. page(s): 112-113
29. Laubenfels, M.W. de. (1954). The Sponges of the West-Central Pacific. *Oregon State Monographs. Studies in Zoology. 7*: i-x, 1-306, pls I-XII. page(s): 75
30. Carter, H.J. (1883). Contributions to our Knowledge of the Spongida. *Annals and Magazine of Natural History. (5) 12 (71)*: 308-329, pls XI-XIV. page(s): 326-327
31. Lévi, C. (1961). Spongiaires des Iles Philippines, principalement récoltées au voisinage de Zamboanga. *Philippine Journal of Science. 88 (4)*: 509-533. page(s): 518-520

ภาคผนวก

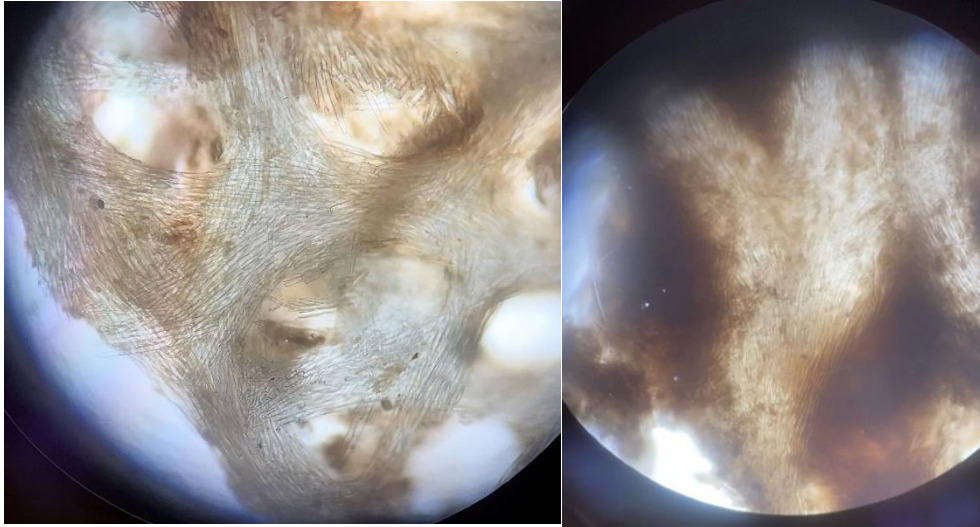
ภาคผนวก (1) ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ตัวอย่าง

ภาคผนวก (2) ผลการทดสอบกลุ่มสารของตัวอย่าง 1.1-2.4

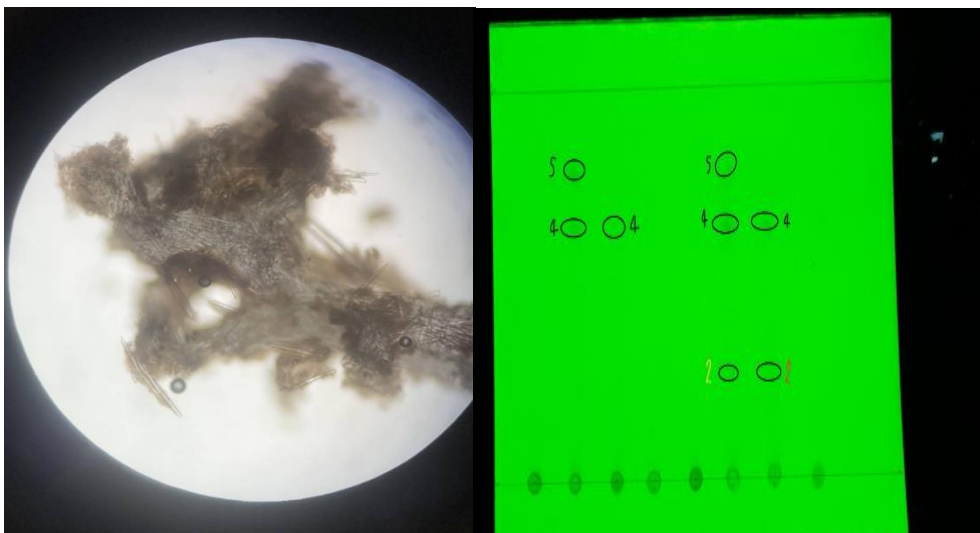
ภาคผนวก (3) แบบฟอร์มรายงานการเงิน

ภาคผนวก (4) แบบฟอร์มอนุญาตให้เผยแพร่โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์

ภาคผนวก (1)
ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ตัวอย่าง



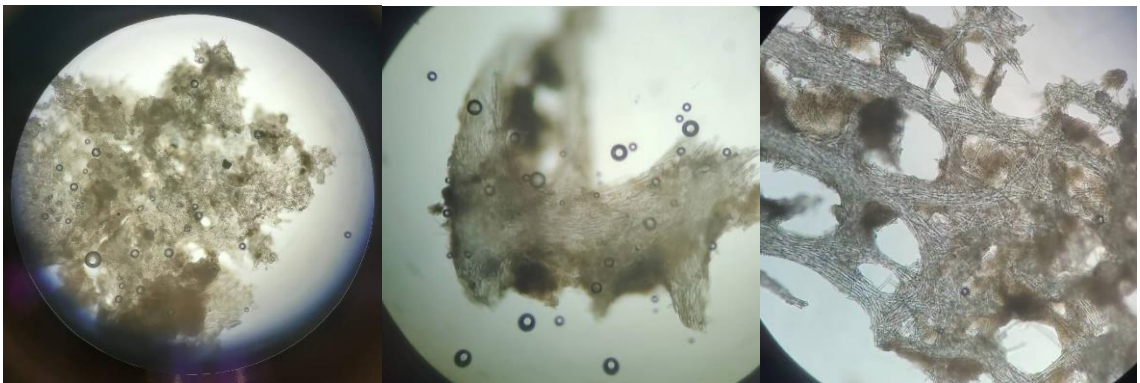
รูปที่ 27 ลักษณะโครงสร้างผิวนอกของฟองน้ำกระชาย



รูปที่ 28 ลักษณะโครงสร้างเนื้อของฟองน้ำกระชาย



รูปที่ 29 ลักษณะ spicule ของฟองน้ำกระชาย



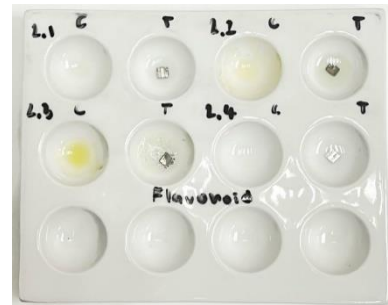
รูปที่ 30 ลักษณะโครงสร้างของฟองน้ำท่อพุ่มแดง 1) ผิวบริเวณตัว 2) เนื้อบริเวณตัว 3) ผิวบริเวณท่อ

ภาคผนวก (2)

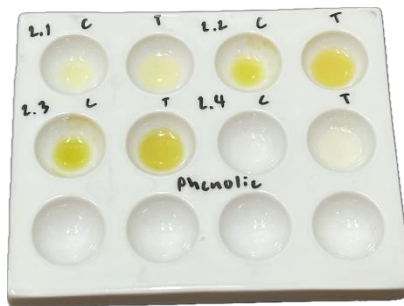
ผลการทดสอบกลุ่มสารของตัวอย่าง 1.1-2.4



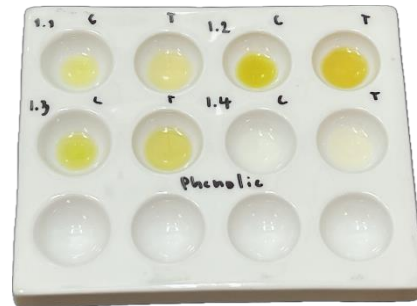
รูปที่ 31 ผลการทดสอบกลุ่มสาร
Flavonoid ของตัวอย่าง 1.1-1.4



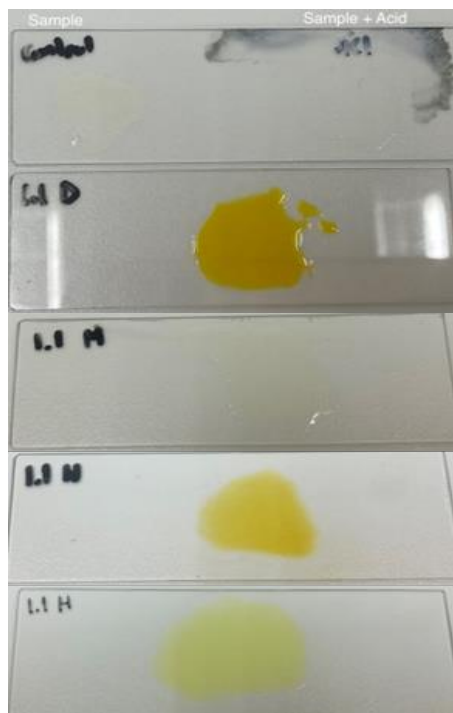
รูปที่ 32 ผลการทดสอบกลุ่มสาร
Flavonoid ของตัวอย่าง 2.1-2.4



รูปที่ 33 ผลการทดสอบกลุ่มสาร
Phenolic ของตัวอย่าง 2.1-2.4

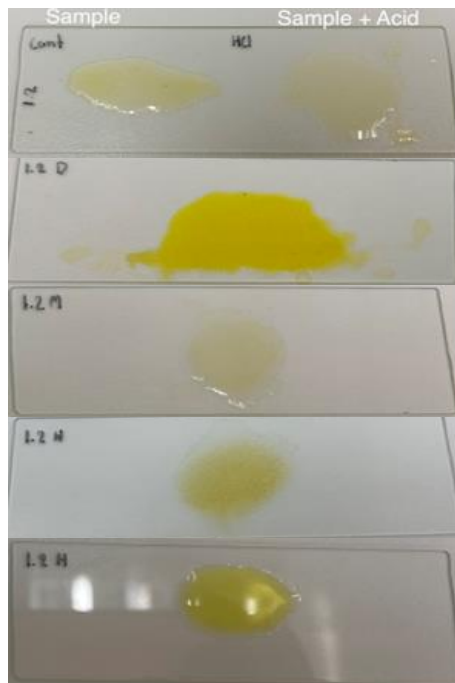


รูปที่ 34 ผลการทดสอบกลุ่มสาร
Phenolic ของตัวอย่าง 1.1-1.4



รูปที่ 35 ผลการทดสอบกลุ่มสาร
alkaloids ของตัวอย่าง 1.1
โดยใช้น้ำยาทดสอบต่างๆ

1. Control
2. HCL
3. Dragendorff's reagent
4. Mayer's reagent
5. Wagner's reagent
6. Hager's reagent

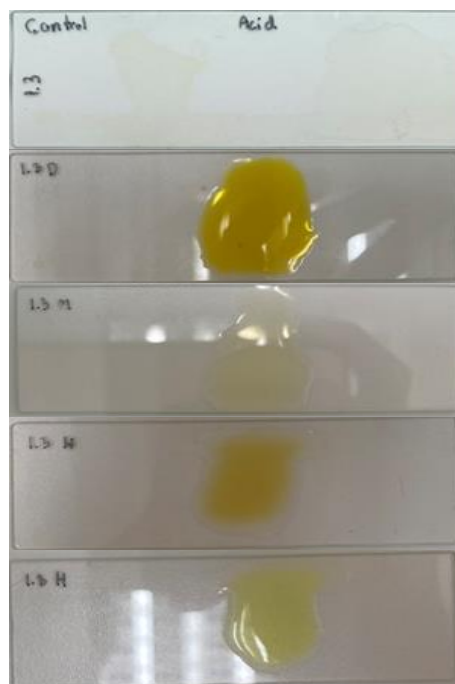


รูปที่ 36 ผลการทดสอบกลุ่มสาร

alkaloids ของตัวอย่าง 1.2

โดยใช้น้ำยาทดสอบต่างๆ

1. Control
2. HCL
3. Dragendorff's reagent
4. Mayer's reagent
5. Wagner's reagent
6. Hager's reagent

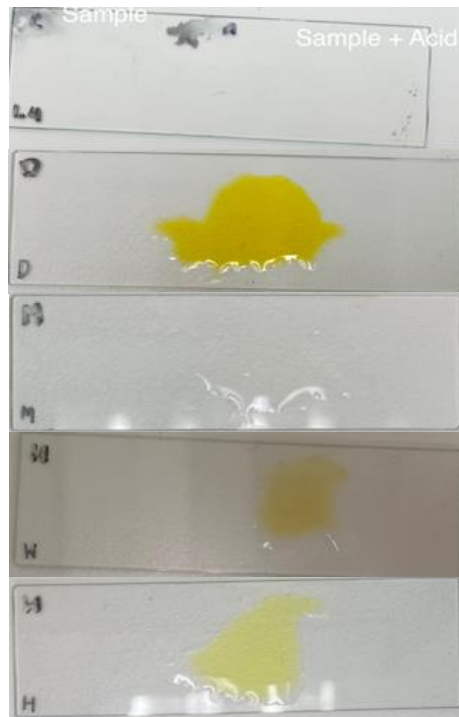


รูปที่ 37 ผลการทดสอบกลุ่มสาร

alkaloids ของตัวอย่าง 1.3

โดยใช้น้ำยาทดสอบต่างๆ

1. Control
2. HCL
3. Dragendorff's reagent
4. Mayer's reagent
5. Wagner's reagent
6. Hager's reagent

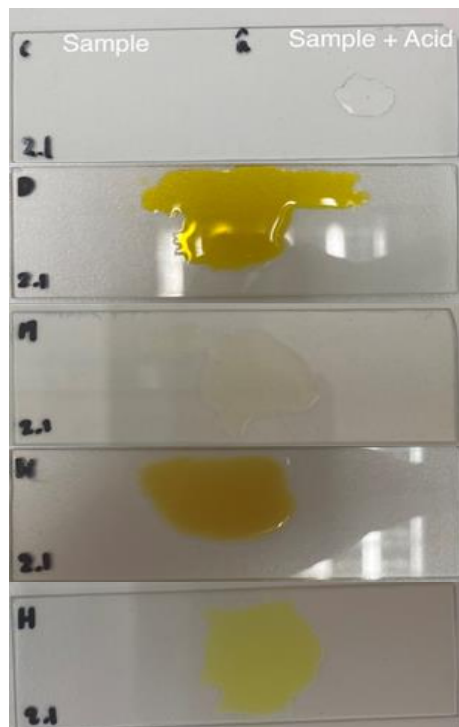


รูปที่ 39 ผลการทดสอบกลุ่มสาร

alkaloids ของตัวอย่าง 1.4

โดยใช้น้ำยาทดสอบต่างๆ

1. Control
2. HCL
3. Dragendorff's reagent
4. Mayer's reagent
5. Wagner's reagent
6. Hager's reagent

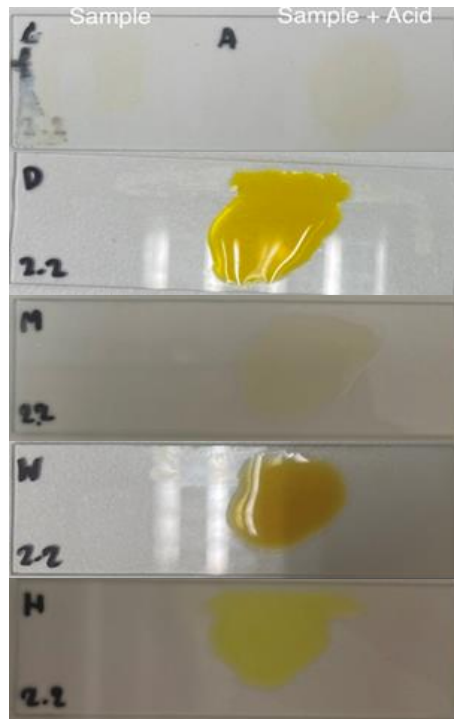


รูปที่ 38 ผลการทดสอบกลุ่มสาร

alkaloids ของตัวอย่าง 2.1

โดยใช้น้ำยาทดสอบต่างๆ

1. Control
2. HCL
3. Dragendorff's reagent
4. Mayer's reagent
5. Wagner's reagent
6. Hager's reagent

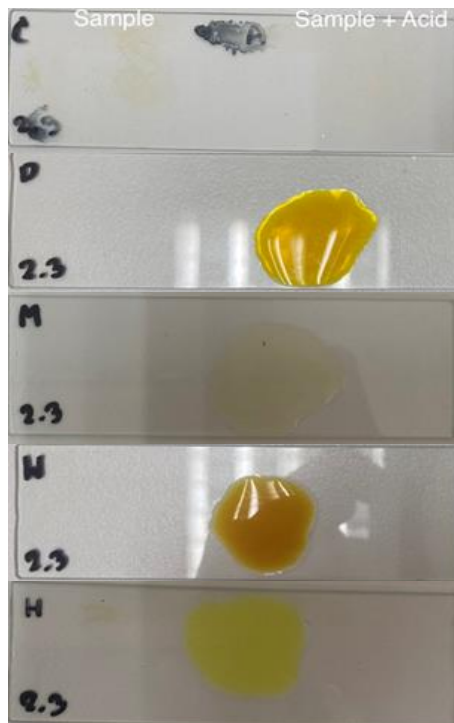


รูปที่ 40 ผลการทดสอบกลุ่มสาร

alkaloids ของตัวอย่าง 2.2

โดยใช้น้ำยาทดสอบต่างๆ

1. Control
2. HCL
3. Dragendorff's reagent
4. Mayer's reagent
5. Wagner's reagent
6. Hager's reagent

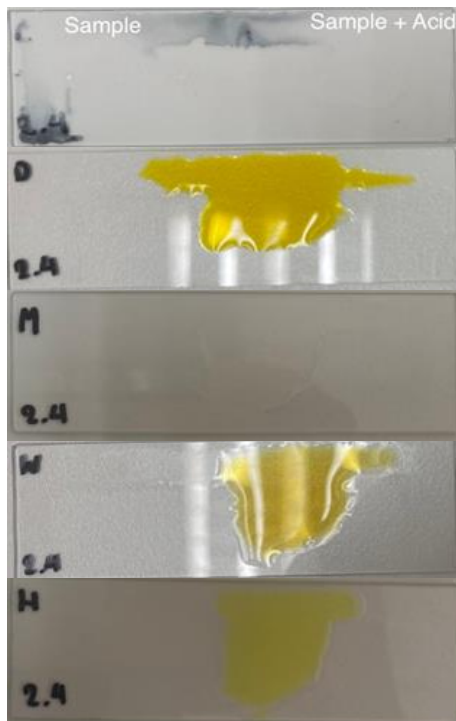


รูปที่ 41 ผลการทดสอบกลุ่มสาร

alkaloids ของตัวอย่าง 2.3

โดยใช้น้ำยาทดสอบต่างๆ

1. Control
2. HCL
3. Dragendorff's reagent
4. Mayer's reagent
5. Wagner's reagent
6. Hager's reagent



รูปที่ 42 ผลการทดสอบกลุ่มสาร

alkaloids ของตัวอย่าง 2.4

โดยใช้น้ำยาทดสอบต่างๆ

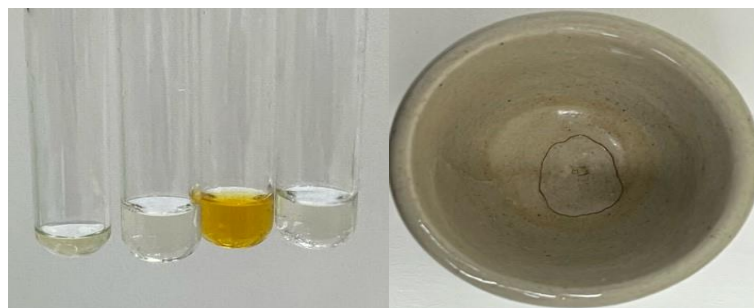
1. Control
2. HCL
3. Dragendorff's reagent
4. Mayer's reagent
5. Wagner's reagent
6. Hager's reagent



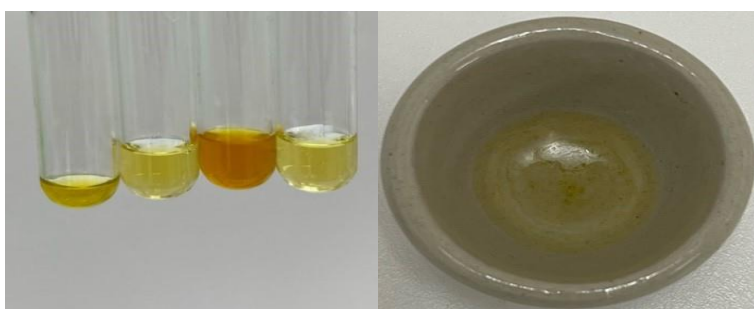
รูปที่ 43 ผลการทดสอบกลุ่มสาร triterpene และ steroid ของตัวอย่าง 1.1-1.4



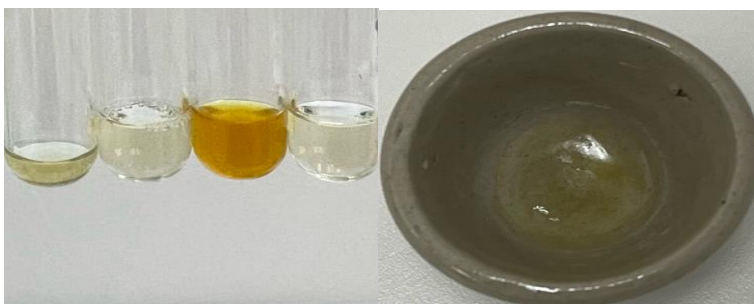
รูปที่ 44 ผลการทดสอบกลุ่มสาร triterpene และ steroid ของตัวอย่าง 2.1-2.4



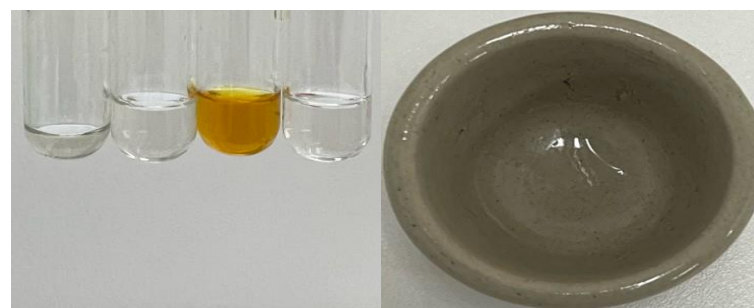
รูปที่ 45 ผลการทดสอบกลุ่มสาร tannin ของตัวอย่าง 1.1



รูปที่ 46 ผลการทดสอบกลุ่มสาร tannin ของตัวอย่าง 1.2



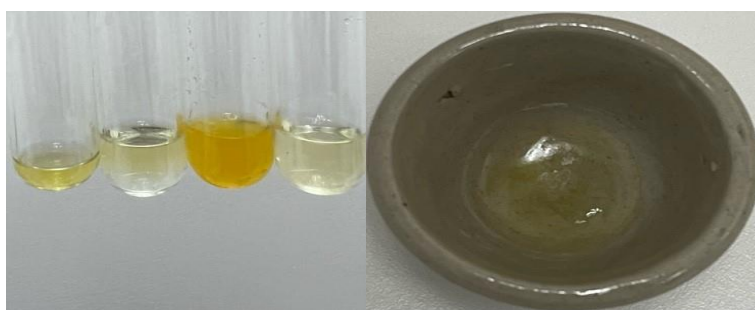
รูปที่ 47 ผลการทดสอบกลุ่มสาร tannin ของตัวอย่าง 1.3



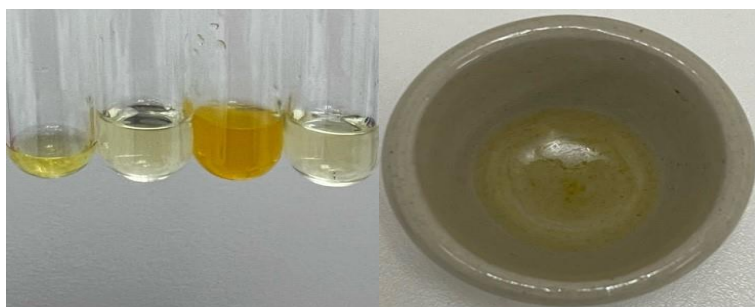
รูปที่ 48 ผลการทดสอบกลุ่มสาร tannin ของตัวอย่าง 1.4



รูปที่ 49 ผลการทดสอบกลุ่มสาร tannin ของตัวอย่าง 2.1



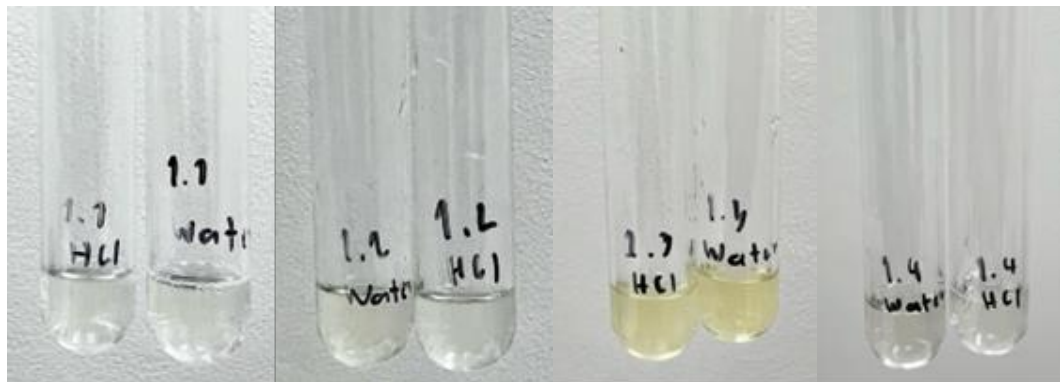
รูปที่ 50 ผลการทดสอบกลุ่มสาร tannin ของตัวอย่าง 2.2



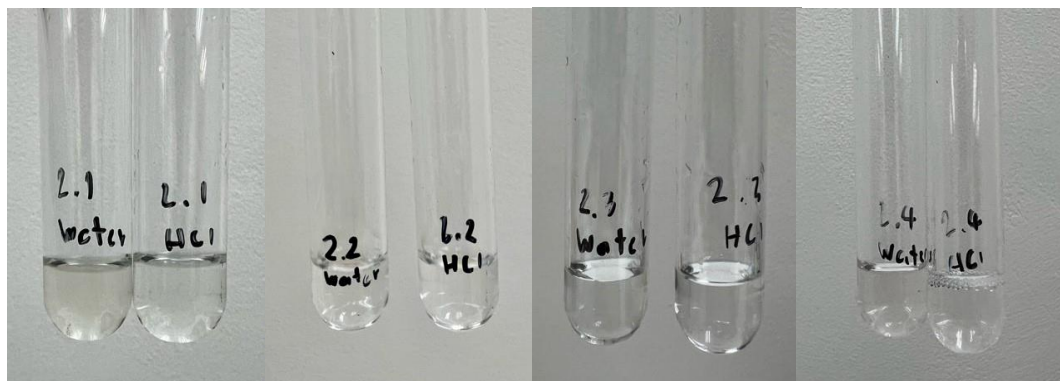
รูปที่ 51 ผลการทดสอบกลุ่มสาร tannin ของตัวอย่าง 2.3



รูปที่ 52 ผลการทดสอบกลุ่มสาร tannin ของตัวอย่าง 2.4



รูปที่ 53 ผลการทดสอบกลุ่มสาร saponin ของตัวอย่าง 1.1-1.4



รูปที่ 54 ผลการทดสอบกลุ่มสาร saponin ของตัวอย่าง 2.1-2.4

ภาคผนวก (3)
แบบฟอร์มรายงานการเงิน

รายงานสรุปการเงิน

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2566 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากฟองน้ำกระชาย

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน (อ./ดร./ผศ./รศ./ศ.).....

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ก.ค. 2566 **ถึงวันที่** 1 เม.ย.2567

ระยะเวลาดำเนินการ 10 เดือน **ตั้งแต่วันที่** 1 ก.ค. 2566

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ (100%) 15,000 บาท เมื่อ 22 มีนาคม 2567

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/ เกิน
1.ค่าวัสดุ	14,000	14,000	0
2.ค่าใช้จ่ายอื่นๆ ค่าทำโปสเตอร์ ค่าทำรูปเล่มรายงาน	1,000	1,000	0
รวม	15,000	15,000	0

ลงชื่อ.....

(.....)

อาจารย์ที่ปรึกษารายวิชาโครงการงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์

ภาคผนวก (4)

แบบฟอร์มอนุญาตให้เผยแพร่โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์



แบบฟอร์มอนุญาตให้เผยแพร่โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์

ในฐานข้อมูลเว็บ OPAC ของมหาวิทยาลัย

ชื่อ-นามสกุล.....

ตำแหน่ง อาจารย์ที่ปรึกษารายวิชาโครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์

โครงงานวิจัยเรื่อง การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากฟองน้ำกระชาย

☐ ๑. อนุญาตให้เผยแพร่โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์☐ ๒. อนุญาตให้เผยแพร่เฉพาะบทคัดย่อ☐ ๓. ไม่อนุญาตให้เผยแพร่ผลงานวิจัย เนื่องจาก

.....

.....

.....

.....

.....

ลงชื่อ.....

(.....)

อาจารย์ที่ปรึกษารายวิชาโครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์

วันที่.....