



การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเพื่อผลิตชาเล็บรอก

บุษราคัม สิงห์ชัย

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชในพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพพระรัตนราชสุดา
มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

2558

บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

ปัจจุบันประชาชนทั่วไปหันมาดูแลสุขภาพกันมากขึ้น โดยเลือกรับประทานอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น รับประทานอาหารให้ครบห้าหมู่ โดยเน้นรับประทานผักผลไม้มากขึ้นเพื่อควบคุมน้ำหนักและดูแลสุขภาพให้แข็งแรง และเน้นการดื่มเครื่องดื่มที่ดีต่อสุขภาพเช่นเครื่องดื่มที่ผลิตจากสมุนไพร ทั้งนี้สมุนไพรไทยหลายชนิดยังเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถหาซื้อหรือรับประทานได้ง่าย เครื่องดื่มประเภทชาเป็นเครื่องดื่มที่ดีต่อสุขภาพที่คนส่วนใหญ่ก็หันมาดื่มกันมากขึ้น โดยชาในปัจจุบันมีมากมายหลากหลายให้เลือกดื่มตามความชอบของแต่ละบุคคล ในอดีตชาเป็นผลผลิตทางเกษตรกรรมจากใบ ยอดอ่อน และก้านจากชา (*Camellia sinensis*) เท่านั้น โดยนำมาผ่านกรรมวิธีแปรรูปที่หลากหลาย ปัจจุบันคำว่า "ชา" ยังหมายรวมถึงเครื่องดื่มกลิ่นหอม ที่ทำจากพืชตากแห้งชนิดต่างๆ เช่นผักหรือผลไม้ต่างๆ ที่นำมาชงหรือต้มกับน้ำร้อน ซึ่งนิยมมากในรูปชาดอกไม้มที่สามารถหาซื้อได้ง่ายตามร้านค้าทั่วไปเช่นชาดอกคำฝอย ชาดอกกุหลาบมอญ (*Rosa damascene* Mill.) ชาดอกเก๊กฮวย (*Crysanthemum indicum* L.) (ธิดารัตน์, 2557) เป็นต้น ทั้งแบบชาเดี่ยวและชาผสม ทำให้นักวิทยาศาสตร์พยายามศึกษาสมุนไพรเพื่อประยุกต์ใช้ในรูปแบบชาเพื่อวัตถุประสงค์หลักคือสะดวกและยังคงคุณค่าทางเภสัชวิทยาไว้เช่นการศึกษาชาดอกขี้เหล็กผสมดอกเก๊กฮวยในการต้านออกซิเดชัน (วชิระและคณะ, 2011) เช่นเล็บรอก เป็นผักพื้นบ้านของจังหวัดชุมพรที่คนส่วนใหญ่นิยมนำมารับประทานในรูปของผักสด เพื่อช่วยลดไขมันในเส้นเลือด เพราะมีรสชาติที่เผ็ดร้อน และจากงานวิจัยปัจจุบันเล็บรอกแสดงฤทธิ์ต้านเบาหวานฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Madhavan *et al.*, 2010; Raj *et al.*, 2012) และฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือด (Irudayaraj *et al.*, 2012) เนื่องจากเล็บรอกมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดีกว่าวิตามินซี โดยมีค่า IC_{50} 37 $\mu g/ml$ ส่วนวิตามินซีมีค่า IC_{50} 93 $\mu g/ml$ โดยทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี Nitric oxide assay (Madhavan *et al.*, 2010) เป็นการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระกลุ่ม Nitric oxide assay ซึ่งมักพบในคัวนบูหรี่ (ไมตรี, 2555) และจากการใช้ทางภูมิปัญญาชาวบ้าน โดยนำกิ่งเล็บรอกต้มดื่มเพื่อลดความอ้วนของตนในท้องถิ่นจังหวัดชุมพร (กนกวรรณ, 2556) และปัจจุบันยังไม่มีผลิตภัณฑ์ชาชงสมุนไพรจากเล็บรอก ดังนั้นผู้วิจัยจึงเห็นว่าชาชงเป็นรูปแบบหนึ่งในการรับประทานสมุนไพรที่ได้ประโยชน์และคุณค่าจากสมุนไพรซึ่งสะดวกในการรับประทานและสามารถเก็บไว้ได้ทุกฤดูกาล ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะนำเล็บรอกมาศึกษาเป็นผลิตภัณฑ์ชาเล็บรอกต้านออกซิเดชัน

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเล็บรอก
2. เพื่อศึกษาพิษเคมีเบื้องต้นของเล็บรอก
3. เพื่อศึกษาการผลิตชาเล็บรอก
4. เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของชาเล็บรอก

ขอบเขตของการวิจัย

1. เก็บส่วนต่างๆของเล็บรอกได้แก่ ใบ กิ่ง และราก ในจังหวัดชุมพร
2. สกัดสารจากส่วนต่างๆด้วยตัวทำละลาย เอทานอล
3. ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเบื้องต้นด้วยวิธีDPPH และไนตริกออกไซด์ ของส่วนต่างๆของเล็บรอก โดยมีวิตามินซีเป็นสารมาตรฐาน
4. ศึกษาพิษเคมีเบื้องต้นในส่วนที่ดีที่สุดในการต้านออกซิเดชัน
5. ศึกษาผลิตภัณฑ์ชาเล็บรอก ณ อุณหภูมิ ต่างๆ ระหว่าง 60-100 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 1-10 นาที
6. ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเบื้องต้นด้วยวิธี DPPHและไนตริกออกไซด์ ของชา โดยมีวิตามินซีเป็นสารมาตรฐาน
7. ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดก่อนผลิตชาและชาเล็บรอก

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพิ่มมูลค่าและคุณค่าแก่สมุนไพร
2. สามารถนำไปประยุกต์ในเชิงพาณิชย์ได้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ชาสมุนไพร

การแปรรูปผลิตภัณฑ์สมุนไพร คือ การเปลี่ยนแปลงสถานะของสมุนไพรให้แตกต่างไปจากเดิม เพื่อประโยชน์ในการใช้งานที่หลากหลายมากขึ้น โดยคุณภาพหรือสรรพคุณทางยาของสมุนไพรให้คงเดิม ปัจจัยที่สำคัญในการแปรรูปเช่นชนิดสมุนไพร กลิ่น รสของสมุนไพร ส่งผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์สมุนไพร รวมถึงการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ วัตถุประสงค์หลักของการแปรรูปสมุนไพรเช่นเพื่อรักษาคุณภาพและประโยชน์ของสมุนไพร โดยปกติแล้วคุณภาพของผลิตภัณฑ์ เนื่องจากสมุนไพรไม่สามารถเก็บรักษาได้ตลอดทุกฤดูกาล การแปรรูปจึงเป็นการเก็บรักษาสมุนไพรเพื่อรอกการนำไปใช้ประโยชน์ เพื่อเปลี่ยนลักษณะของผลิตภัณฑ์ให้เหมาะสมในเชิงการค้า หรือการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ เช่น ฟัาหลายใจเป็นสมุนไพรที่มากคุณประโยชน์แต่รสชาติเป็นอุปสรรคต่อการรับประทาน จึงมีการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์แคปซูลเพื่อประโยชน์ต่อการนำไปบริโภค เพื่อเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์ให้สูงขึ้น เช่น การนำดอกไม้ที่มีกลิ่นหอมมาสกัดเป็นน้ำหอม น้ำผึ้งนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง โดยผสมน้ำผึ้งร่วมกับน้ำสมุนไพร และยา

ชาสมุนไพรเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรชนิดหนึ่งที่สามารถเก็บคุณภาพสมุนไพรไว้ได้นานและคงคุณภาพตามความต้องการของผู้ใช้ได้ และที่สำคัญเครื่องดื่มชาสมุนไพรเป็นเครื่องดื่มชนิดหนึ่งที่ประชาชนทั่วไปนิยมรับประทานกันอย่างแพร่หลายเช่นน้ำชา (*Camellia sinensis*) กาแฟ (*Coffea arabica*) โกโก้ (*Theobroma cacao*) รวมถึงชาสมุนไพรต่างๆ ประโยชน์ที่ได้รับจากการดื่มชา คือ ทำให้การหมุนเวียนโลหิตในร่างกายดีขึ้น ทำให้สมองปลอดโปร่ง ขจัดแอลกอฮอล์ในร่างกายได้เร็วขึ้น สร้างภูมิต้านทานในร่างกาย ป้องกันฟันผุ มีสารต้านอนุมูลอิสระป้องกันการแก่ก่อนวัย ขับปัสสาวะ บำรุงสายตา ช่วยระบบการย่อยอาหาร ช่วยบรรเทาการปวดเมื่อยตามกล้ามเนื้อ แก้กษะหายน้ำได้ อดี สร้างความสดชื่นให้กับร่างกาย ป้องกันการเกิดมะเร็งและบำรุงหัวใจ (Gadow, Joubert and Hansmann, 1997) ทั้งนี้ฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆล้วนขึ้นอยู่กับชนิดของสมุนไพรที่นำมาแปรรูปเป็นชา สมุนไพรที่นิยมนำมาผลิตชาเช่นดอกไม้ชนิดต่างๆ (ธิดารัตน์, 2557) เช่นชาดอกคำฝอย (*Carthamus tinctorius* L.) ชาดอกมะลิ (*Jasminum sambac* (L.) Ait.) ชากุหลาบมอญหรือยี่สุ่น (*Rosa damascene* Mill.) และชาเกสรบัวหลวง (*Nelumbo nucifera* Gaertn) ชาดอกเก๊กฮวย (*Chrysanthemum molifollum* Ramat) เนื่องจากในสมุนไพรมักพบสารกลุ่มเมตาโบไลต์ทุติยภูมิกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenol) ซึ่งเป็นสารสำคัญในการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่เกิดขึ้นในร่างกายมนุษย์ได้ (Pinitsoontorn, Suwantrai and Boonsiri, 2012) สมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงและนิยมนำมาผลิตเป็นชาสมุนไพรหรือองค์ประกอบในชาสมุนไพรเช่นหญ้าหวาน (*Stevia rebaudiana*) หม่อน (*Morus alba*) ฟัาหลายใจ (*Andrographis paniculata*) ชุมเห็ดเทศ (*Cassia alata*) และรางจืด (*Thunbergia laurifolia*) (ชมรมศาสนาและการกุศล, 22257) การผลิตชาสมุนไพรมักใช้กรรมวิธีเดียวกับการผลิตชาซึ่งมี 3 วิธีดังนี้

1. **ชาจีน** นำใบอ่อนมาคั่วให้แห้งโดยใช้มือเคล้าบนกระทะ หรืออบด้วยเครื่องอบ ชาจีนชั้นดี จะมีสีเหลืองทอง

2. **ชาเขียว** นำใบชามาลวกในน้ำเดือดก่อนแล้ว จึงแช่น้ำเย็นทันทีเพื่อหยุดการทำงานของเซลล์และสี จากนั้นจึงนำไปคั่ว จะได้ชาที่มีสีเขียวสดใส

3. **ชาฝรั่ง** โดยการเก็บใบชาสดมากองสุ่มกัน เพื่อให้เกิดขบวนการหมัก (Ferment) แล้วจึงนำมาชยี้ให้เซลล์แตกก่อนแล้ว จึงคั่วให้แห้ง

สมุนไพรไทยหลายชนิดที่มีประโยชน์และเหมาะที่จะนำมาศึกษาทางวิทยาศาสตร์และสร้างผลิตภัณฑ์ชาเพื่อประโยชน์ทางการดูแลสุขภาพและการเพิ่มมูลค่าแก่สมุนไพรในท้องถิ่น ผักพื้นบ้าน และผลไม้ท้องถิ่นเป็นสมุนไพรที่อาจมีการนำมาใช้ประโยชน์น้อยมากอาจเนื่องจากขาดการนำสืบทอดความรู้อย่างต่อเนื่อง หรืออาจเนื่องจากสมุนไพรไม่สามารถเก็บรักษาไว้ได้นานจึงทำให้ไม่สะดวกต่อการนำมาใช้อย่างต่อเนื่อง

เล็บรอก

เล็บรอกมีชื่ออื่น : เล็กรอกเครื่องเห่าผักแปมป่า (เหนือ) ชื่อสามัญ : Wild Orange-Tree, Lopea Tree, Forest-Pepper ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Toddalia asiatica* (Linn.) Lamk., *T. asuleata* Pers. อยู่ในวงศ์ : RUTACEAE



ต้น



ยอด



กิ่ง



ใบ



ราก

ภาพที่ 2.1 เล็บรอก

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

เป็นไม้เถาขนาดใหญ่กิ่งก้านเล็กเรียว เถาแก่มีปุ่มของนมหนามติดอยู่ทั่วไป ผิวสีน้ำตาลมีกระสีขาวเนื้อสีเหลือง เถาอ่อนมีหนามแหลมจุ่ม ใบประกอบแบบนิ้วมือ 3 ใบ ใบย่อยรูปไข่ปลายสอบ มีจุดน้ำมันกระจายทั่วไป ยาว 5-10 ซม. มีกลิ่นคล้ายการบูร และตะไคร้ ดอกสีเหลืองแกมเขียวเป็นช่อที่ปลายกิ่งและง่ามใบ ผลกลมฉ่ำน้ำเมื่อสุกสีส้ม มีกลิ่นคล้ายพริกไทย ใช้แต่งกลิ่นอาหาร เกิดตามป่าในเขตร้อนทั่วไป ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด (ภาพที่ 2.1)

สรรพคุณทางสมุนไพร

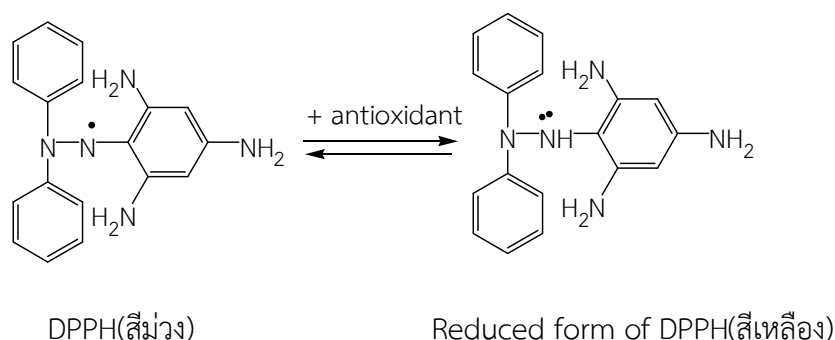
ใบสด รสสุขุมหอม แก้ปวดท้อง ใช้เป็นอาหารยา ตำพอกหรือทาแก้โรคผิวหนัง
เปลือกราก (Lopez Root, Cortex Radicis) รสสุขุมหอม ขับเหงื่อ บำรุงธาตุ แก้ไข้ แก้ท้องเสีย รักษาอาการเรื้อรังชนิดจับวันระยะ
เถา รสสุขุม ต้มดื่ม แก้ปวดเมื่อยเส้นเอ็น ขับปัสสาวะ แก้พิษโลหิต แก้พิษในข้อ ในกระดูก ในเส้นเอ็น แก้ไอ แก้พิษตานซาง ตานขโมย ขับพยาธิไส้เดือน แก้กามโรค แก้ปวดฟกการ
ราก รสสุขุมหอม ชงน้ำดื่มขับลม บำรุงกำลัง แก้เถาตานในท้อง แก้ปวดเสียดแทง แก้ริดสีดวงลำไส้ ตำพอกฝี (เกศริน, 2551:8)

ภูมิปัญญาชาวบ้าน

ในจังหวัดชุมพร ชาวบ้านเชื่อว่าการรับประทานน้ำต้มใบเล็บรอกช่วยเพื่อลดไขมันในเส้นเลือดได้เพราะรสชาติของใบเล็บรอกมีรสเผ็ดร้อน (กนกวรรณ, 2013)

อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ คือ สารที่เกิดจากปฏิกิริยาลูกโซ่ที่เกิดผ่านกลไกในรูปอนุมูลอิสระ อนุมูลอิสระเกิดขึ้นเมื่อมีการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในปฏิกิริยาที่มีสารเปอร์ออกไซด์หรือมีการใช้แสงกระตุ้นปฏิกิริยา ในร่างกายมนุษย์สารอนุมูลอิสระเกิดมาจากหลายช่องทางเช่นการรับอนุมูลจากทางหายใจ การเกิดอนุมูลอิสระเมื่อมีการเมตาโบไลต์ของยาบางชนิด หรือกลไกปฏิกิริยาของร่างกายถ่ายเทอนุมูลอิสระเอง (ไมตรี สุทธิจิตต์, 2555) อนุมูลอิสระ DPPH (DPPH radical, DPPH[•]) มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระชนิด Organic nitrogen radical ที่มีความคงตัวและสามารถดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วง UV-VIS ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เมื่อ DPPH[•] เกิดปฏิกิริยารีดักชันหรือได้รับอิเล็กตรอนจะมีการเปลี่ยนสีคือสีม่วงเข้มของ DPPH[•] จะจางลงเป็นสีเหลือง ซึ่งการเปลี่ยนสีที่เกิดขึ้นนี้สามารถติดตามวัดได้ด้วยเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ Spectrophotometer (ไมตรี, 2555:182)



ภาพที่ 2.2 สมการการเกิดออกซิเดชันของ DPPH

สารต้านออกซิเดชัน (antioxidants)

สารต้านออกซิเดชัน คือ สารต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน สามารถป้องกันหรือยืดระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาให้เกิดปฏิกิริยาได้ช้าลง ซึ่งในการแบ่งกลุ่มของสารต้านออกซิเดชันสามารถแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ (โชติรส, 2549:9)

1. แบ่งตามกระบวนการสร้างของร่างกาย

เมื่อแบ่งสารต้านออกซิเดชันตามกระบวนการสร้างของร่างกายสามารถแบ่งได้ 2 ชนิด คือ สารต้านออกซิเดชันที่ร่างกายสามารถสร้างขึ้นเองได้ กับที่ไม่สามารถขึ้นเองได้ต้องได้รับจากอาหารเท่านั้น

1.1 สารต้านออกซิเดชันที่ร่างกายสร้างขึ้นเอง ได้แก่ เอนไซม์ต่าง ๆ และสารเคมีที่ร่างกายสร้างขึ้นได้เอง เพื่อทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ ซึ่งเอนไซม์จะมีความจำเพาะเจาะจงกับซับสเตรท (substrate) และปริมาณของเอนไซม์ที่ร่างกายผลิตขึ้นมาอาจไม่เพียงพอต่ออนุมูลอิสระ นอกจากนี้อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากปัจจัยภายนอก ร่างกายเอนไซม์ และสารเคมีที่ร่างกายสร้างขึ้นนั้นไม่สามารถต่อต้านหรือเข้าไปทำปฏิกิริยาเพื่อกำจัดอนุมูลอิสระเหล่านั้นได้ จึงจำเป็นต้องรับประทานอาหารที่มีสารต้านออกซิเดชันด้วย

1.2 สารต้านออกซิเดชันที่ได้รับจากอาหาร ได้แก่ วิตามิน แร่ธาตุ และสารอาหารในพืช ซึ่งสารต้านออกซิเดชันเหล่านี้เป็นสารที่ได้จากการรับประทานอาหารเข้าไปเท่านั้นร่างกายไม่สามารถสร้างขึ้นมาเองได้ สารต้านออกซิเดชันเหล่านี้ส่วนใหญ่แล้วจะพบมากในผักผลไม้ที่สีสดใสใส เช่น สีเหลือง สีแดง สีส้ม สีเขียว สีม่วง เป็นต้น สารต้านออกซิเดชันเหล่านี้สามารถทำปฏิกิริยาได้ทั้งอนุมูลอิสระที่เกิดจากปัจจัยภายนอกในร่างกาย แต่สารต้านออกซิเดชันในปริมาณที่เพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย จึงจำเป็นต้องบริโภคผักผลไม้ที่แตกต่างกันไปอีกด้วย

2. แบ่งตามธรรมชาติ สามารถแบ่งสารต้านออกซิเดชันที่พบในธรรมชาติได้ 4 ประเภท ดังนี้

2.1 สารต้านออกซิเดชันที่ร่างกายสร้างขึ้นเอง เช่น เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) เอนไซม์คะตะเลส (catalase) เป็นต้น

2.2 วิตามิน เช่น วิตามินอี , วิตามินซี เป็นต้น

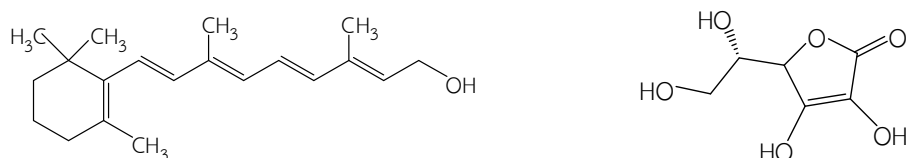
2.3 แร่ธาตุ เช่น เซลีเนียม , สังกะสี เป็นต้น

2.4 สารในพืชและสัตว์บางชนิด เช่น เบตาแคโรทีนฟลาโวนอยด์ เป็นต้น

ในบางครั้งอาจจัดกลุ่มหรือแบ่งประเภทของสารต้านออกซิเดชันออกเป็นประเภทต่าง ๆ นิยมจัดตามคุณสมบัติการเป็นสารต้านออกซิเดชัน และสารเหล่านี้โดยส่วนใหญ่จะได้รับจากการบริโภคอาหาร ในปริมาณที่แตกต่างกันจึงแบ่งออกเป็น 4 ประเภทดังนี้

1. สารต้านออกซิเดชันที่ร่างกายสร้างขึ้นเอง แบ่งออกเป็น 2 ประเภท ด้วยกัน คือ เป็นเอนไซม์กับไม่เป็นเอนไซม์เช่น Superoxide dismutase (SOD) Catalase (CAT) Glutathione peroxidase (GPX) Glutathione reductase (GR)

2. วิตามิน วิตามินที่มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชันนั้นเช่นวิตามินเอ และวิตามินซี



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างวิตามินเอ (ซ้าย) และ วิตามินซี (ขวา)

3. แร่ธาตุ ธาตุบางชนิดมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชันเช่นแมกนีเซียม ทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์ที่ทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระทำหน้าที่ได้อย่างสมบูรณ์ เซลีเนียมช่วยปกป้องร่างกายจากโรคเรื้อรัง เช่น มะเร็ง โรคหัวใจ กระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน

4. สารพฤกษเคมีในพืช สารสำคัญในพืชมีอยู่มากมายหลายชนิดที่มีส่วนช่วยในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน ส่วนใหญ่แล้วใหญ่แล้วจะเป็นสารเมตาบอไลต์ชนิดทุติยภูมิ เช่น ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) แทนนิน (tannin) เบตาแคโรทีน (β -carotene) และไลโคพีน (licopen)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ตารางที่ 2.1 งานวิจัยในเลืกรอกจำแนกตามส่วนของพืช

ส่วนของพืช	ผลการวิจัย	เอกสารอ้างอิง
ใบ	สารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตทที่ความเข้มข้น 250 และ 500 mg/kg จากใบเลืกรอกมีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูทดลองเทียบเท่ากับยาแผนปัจจุบันชนิด glibenclamide 0.6 mg/kg และพบว่าที่ทั้ง 2 ความเข้มข้นนี้ไม่มีความเป็นพิษอย่างรุนแรงและพบว่าหนูทุกตัวมีชีวิตรอดตลอดการทดลองโดยมีน้ำหนักและการบริโภคอาหารปกติ	Irudayaraj et al., 2012

ตารางที่ 2.1 งานวิจัยในเล็บบรอกจำแนกตามส่วนของพืช (ต่อ)

ส่วนของพืช	ผลการวิจัย	เอกสารอ้างอิง
	การแยกสารบริสุทธิ์พบสารกลุ่มคูมารินชนิด ulopterol (6-(2,3-dihydroxy-3-methylbutyl)-7-methoxy-2H-chromen-2-one และพบสารสารนี้มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์น่าสนใจ คือ <i>E. coli</i> เทียบเท่ากับยาแผนปัจจุบันชนิด streptomycin ที่ inhibition zone 11 ± 0.71 mm ที่ความเข้มข้น $250 \mu\text{g}/\text{disc}$	Raj et al., 2012
	การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและปริมาณฟีนอลิก รวมเปรียบเทียบกับระหว่างผักแปมและผักแปมป่า พบว่าผักแปมป่าหรือเล็บบรอกมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH ค่า IC_{50} 41.81 ± 1.39 และ $40.52 \pm 1.97 \mu\text{g}/\text{ml}$	Sithisarn and Jarikasem, 2010
เปลือกกราก	การสังเคราะห์สาร toddaquinoline ซึ่งเป็นแอลคาลอยด์ที่แยกได้จากเปลือกกราก	Harrowven et al., 2001
ราก	การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดชั้นเอทานอลและชั้นน้ำในหลอดทดลองพบว่าสารสกัดชั้นแอลกอฮอล์มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีกว่าวิตามินซีประมาณ 3 เท่า ด้วยวิธี nitric oxide assay และการต้านออกซิเดชันในหนูทดลองพบว่าสารสกัดทั้ง 2 ส่วนปริมาณ 200 และ 400 mg/kg มีฤทธิ์เทียบเท่ากับสาร silymarin 100 mg/kg อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ	Madhavan et al., 2010
	การแยกสารบริสุทธิ์ได้สารกลุ่มคูมารินชนิด 5,7-dimethoxy-8-(3'-hydroxy-3'-methyl-1'-butene) coumarin โดยสารนี้มีฤทธิ์ต้านเชื้อ <i>P. falciparum</i> 2 ชนิดคือ K39 และ V1/S ด้วย IC_{50} 16.2 ± 1.4 และ $8.8 \pm 1.6 \mu\text{g}/\text{ml}$ ตามลำดับ	Oketch-Rabah et al., 2000

เล็บบรอกเป็นพืชที่น่าสนใจเนื่องจากการใช้ใบในทางภูมิปัญญาท้องถิ่นในการลดระดับไขมันในร่างกาย (กนกวรรณ, 2013) และจากรายงานการวิจัยต่างๆพบว่ารากเล็บบรอกมีสรรพคุณที่ดีในการต้านออกซิเดชันที่ดีกว่าวิตามินซีประมาณ 3 เท่าในสัตว์ทดลอง (Madhavan et al., 2010) ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาหาเล็บบรอกต้านออกซิเดชันจากส่วนที่แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดีที่สุดด้วยวิธี DPPH รวมถึงศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากชาที่ผลิตขึ้น

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. สารเคมี เกรดหรือความบริสุทธิ์และบริษัทผู้ผลิต ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สารเคมี เกรดหรือความบริสุทธิ์และบริษัทผู้ผลิต

สารเคมี	เกรดหรือความบริสุทธิ์	บริษัทผู้ผลิต
Bismuth nitrate	Analytical	Ajax Finechem
Hydrochloric acid	Analytical	MERCK
Nitric acid	Analytical	MERCK
Potassium Iodide	Analytical	MERCK
Mercury(II) chloride	Analytical	MERCK
Sulfuric acid	Analytical	MERCK
Sodium sulphate anhydrous	Analytical	MERCK
Iron(III) chloride	Analytical	CARLO ERBA
lead acetate	Analytical	MERCK
Dichloromethane	Analytical	MERCK
sodium hydroxide	Analytical	MERCK
3,5 – dinitrobenzoic acid	Analytical	Fluka
Absolute Methanol	Analytical	MERCK
1,2,3 indanetrione monohydrate	Analytical	MERCK
Copper (II) sulfate pentahydrate	Analytical	Ajax Finechem
Sodium citrate	Analytical	Ajax Finechem
anhydrous sodium carbonate	Analytical	Ajax Finechem
Ethanol	Analytical	MERCK
DPPH	Analytical	Sigma - ALDRICH
Ascorbic acid	Analytical	APS

2. เครื่องมือ อุปกรณ์และบริษัทผู้ผลิต ดังในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 เครื่องมือ อุปกรณ์และบริษัทผู้ผลิต

เครื่องมือและอุปกรณ์	บริษัท
เครื่อง UV-Light รุ่น Desagasarstedt-gruppeMin UV	Desaga, Germany
เครื่อง Vacuum Rotary Evaporator	-
เครื่อง Hotplate	Becthai Bangkok Equipment & Chemical
Heating and Shaker water bath	Becthai Bangkok Equipment & Chemical
Petri dish	
กระดาษกรอง	Whatman
เครื่องแก้ว	-
ปิเปตต์	-
ผ้าขาวบาง	-
มิดลัสและเขียง	-

3. ตัวอย่างพืชสมุนไพร

เก็บตัวอย่างพืชสมุนไพร กิ่งและรากเล็บรอกที่ ตำบลท่าชะ อำเภอนาทม จังหวัดอุดรธานี เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2557 ถึง มีนาคม พ.ศ. 2558 และพิสูจน์เอกลักษณ์โดยนักพฤกษศาสตร์ อ.ดร.บุญสนอง ช่วยแก้ว อาจารย์สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

วิธีวิจัย

ในการวิจัยนี้แบ่งเป็นการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดและหาได้แก่ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและความเป็นพิษต่อเซลล์และการหาสารสำคัญเบื้องต้นของสารสกัดมี 4 ตอนดังนี้

ตอนที่ 1 การเก็บตัวอย่างพืชสมุนไพรและการพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืช

1.1 เล็บรอกที่นำมาศึกษา ครั้งนี้เก็บที่ ตำบลท่าชะ อำเภอนาทม จังหวัดอุดรธานี เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2557 ถึง มีนาคม พ.ศ. 2558

1.2 นำส่วนของเล็บรอกที่แห้งจัดเป็นตัวอย่างพืชวางลงในกระดาษแข็งสีขาวขนาด 25x42 เซนติเมตร เย็บด้วยด้ายสีขาว ป้องกันการหลุดร่วงออกนอกกระดาษ

1.3 จัดทำป้ายชื่อในกระดาษขาวขนาด 11x15 เซนติเมตร พร้อมกับเขียนรายละเอียดของพืชแต่ละชนิด ติดกระดาษขาวนี้ลงในกระดาษแข็งตำแหน่งมุมซ้ายด้านล่าง

1.4 นำไปศึกษาเปรียบเทียบกับข้อมูลในสารานุกรม ณ อาคารวิทยบริการ ชั้น 4 มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

ตอนที่ 2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของสารสกัด

2.1 การเตรียมสารสกัดจากพืช

นำส่วนของพืชที่แห้งแล้วทั้ง 3 ส่วนได้แก่ ใบ กิ่งและรากซึ่งน้ำหนักแล้วสกัดด้วยเอทานอลนำพืชแห้งน้ำหนักตั้งแต่ 17.71-38.14 กรัมมาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เอทานอลนำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศออกจนได้สารสกัดพืชออกมา

2.2 การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเบื้องต้นของสารสกัดด้วย DPPH (Gaikwad *et al.*, 2011)

2.2.1 การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเบื้องต้นของสารสกัดโดยการทดสอบด้วยสารละลาย 1, 1-diphenyl -2-picryl hydrazine (DPPH) มีขั้นตอนดังนี้ นำสารละลาย 0.02 mM DPPH 0.2 มิลลิลิตร และเมทานอล 3.7 มิลลิลิตร แล้วเติมสารสกัดตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 125 12.5 1.25 0.125 และ 0.01 $\mu\text{g/ml}$ (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) แล้วนำไปบ่มในที่มืด 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV) ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร (วิตามินซีเป็นสารมาตรฐาน)

2.2.2 การคำนวณค่าร้อยละการต้านออกซิเดชัน

โดยใช้สูตร DPPH scavenging (%) = $((A_0 - A_1) / A_0) \times 100$

เมื่อ A_0 = ค่าการดูดกลืนของสารควบคุม

A_1 = ค่าการดูดกลืนของสารตัวอย่าง

นำสารสกัดที่มีค่าร้อยละการยับยั้งสูงที่สุดไปศึกษาค่าการต้านออกซิเดชัน 50% (IC_{50}) จากคำนวณจากการเทียบค่าในกราฟ ระหว่างความเข้มข้นและค่าร้อยละการยับยั้ง การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistic analysis) ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารต้านออกซิเดชันในธรรมชาติรวมทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง ($n=3$) และนำมาผลที่ได้มาวิเคราะห์ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\pm S.D.$) สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ความแตกต่าง t-test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05

2.3 การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเบื้องต้นของสารสกัดโดยการทดสอบด้วยไนตริกออกไซด์ (nitric oxide assay) มีขั้นตอนดังนี้ (Banerjee *et al.*, 2011) เตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5000 $\mu\text{g/ml}$ ในเอทานอล เติมสารละลาย sodium nitroprusside (5mM) ในฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ที่ pH 7.4 ในหลอดทดลองที่มีสารสกัด 1.0 cm^3 บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 30 นาที เติม Griess reagent 1.5 cm^3 (1% sulphanilamide และ 0.1% naphthylethylenediamine dichloride ใน 3% กรดฟอสฟอริก ผสมในอัตราส่วน 1:1) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV) ที่ความยาวคลื่น 546 นาโนเมตร (วิตามินซีเป็นสารมาตรฐาน) คำนวณค่าร้อยละการต้านออกซิเดชัน โดยใช้สูตรเดียวกับวิธี DPPH

2.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไคลิง (Cytotoxicity against primate cell line (Vero)) [Hunt *et al.*, 1999] การความเป็นพิษต่อเซลล์นี้เป็นวิธีที่ติดฉลากโปรตีนเรืองแสงสี

เชื้อยวชนิด pEGFP-N1 (Clonotech) โดยมีวิธีการสรุปดังนี้ นำสารสกัด ที่เตรียมที่ความเข้มข้น เริ่มต้น 500 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 5 cm^3 ลงในถาดหลุมชนิด 384 หลุม เติมน้ำละลายที่มีเซลล์ Vero จำนวน 3.3×10^4 cells/ml ปริมาตร 45 μl บ่มเป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิ 37 °C ที่สภาวะ 5% CO_2 วัดการเรืองแสงที่สภาวะกระตุ้นและการปล่อยพลังงานที่ความยาวคลื่น 485 และ 535 nm ตามลำดับ ด้วยเครื่อง SpectraMax M5 microplate reader (Molecular Devices, USA) โดยสารอีลิปติซิน (Ellipticine) เป็นสารมาตรฐาน และ 5% DMSO เป็นสารละลายควบคุม คำนวณหาค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยสูตร

$$\% \text{ Cytotoxicity} = [1 - (\text{FU}_T / \text{FU}_C)] \times 100$$

เมื่อ FU_T = การเรืองแสงของเซลล์ที่มีสารสกัดหรือสารมาตรฐาน

FU_C = การเรืองแสงของเซลล์ที่ไม่มีสารสกัดหรือสารมาตรฐาน

ตอนที่ 3 การทดสอบหาสารสำคัญเบื้องต้นในส่วนของพืชที่น่าสนใจ

ในการศึกษาตอนนี้จะเน้นการศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดเพียง 8 กลุ่มดังนี้

3.1 การทดสอบแอลคาลอยด์

3.1.1 การทดสอบแอลคาลอยด์เบื้องต้น (preliminary alkaloid tests) นำ สารสกัด มา 2 cm^3 ใส่ในขามกระเบื้องและระเหยบน water bath จนขึ้นเหนียวเติม 2 M HCl 15 cm^3 ต้มและกวน 10 นาที กรองรินสารละลายลงในหลอดทดลอง 5 หลอด ๆ หลอดละ 1 cm^3 สารละลายที่เหลืออีก 10 cm^3 เก็บไว้ทดสอบกับรีเอเจนต์ต่อไปนี้ คือ Mayer's ,Wagner's และ Dragendorff's สังเกตการเปลี่ยนแปลง

3.1.2 การทดสอบแอลคาลอยด์เพื่อความหนาแน่น (Confirmed alkaloid test) นำสารละลายที่เหลือจากขั้นที่ 1 มาทำให้ต่างด้วย 28 % NH_4OH รินสารละลายทั้งหมดลงในกรวยแยก สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน 2 ครั้ง ๆ ละ 10 cm^3 นำชั้นไดคลอโรมีเทนทั้ง 2 ครั้ง มารวมกันแล้วระเหยให้แห้งบน water bath (ชั้นน้ำเก็บไว้ทดสอบขั้นที่ 3) เติมน้ำ 2 M HCl ประมาณ 5 cm^3 ต้มและกวน 5 นาที กรองแบ่งสารละลายเป็น 3 หลอด เพื่อทดสอบกับรีเอเจนต์ 3 ชนิด เช่นเดียวกับขั้นที่ 1

3.1.3 ทดสอบ Quarternary และ/หรือ Amine Oxide Base นำสารละลายที่เป็นชั้นน้ำจากขั้นที่ 1 มาทำให้เป็นกรดด้วย 2 M HCl กรอง แบ่งสารละลายเป็น 3 หลอด เพื่อทดสอบกับรีเอเจนต์ 3 ชนิด เช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 1 และขั้นตอนที่ 2

รีเอเจนต์สำหรับทดสอบแอลคาลอยด์

1) Dragendorff's reagent ละลาย $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ หนัก 8.0 กรัม HNO_3 12.0 cm^3 (30% w/v) แล้วผสมกับสารละลาย KI 27.2 กรัมในน้ำ 50 cm^3 เติมน้ำจนมีปริมาตร 100 cm^3

2) Mayer's reagent ละลาย HgCl₂หนัก 1.36 กรัมในน้ำ 60 cm³ แล้วผสมกับสารละลายที่มี KI หนัก 5 กรัมในน้ำ 10 cm³ แล้วเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 cm³

3) Wagner's reagent ละลาย KI หนัก 2 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วเติม I₂ ปริมาณ 1.27 กรัมลงไปจนละลายหมด แล้วเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 cm³

3.2 การทดสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์

นำสารสกัดมา 5 cm³ เติม 10 % lead acetate 40 cm³ ต้มให้เดือดเบา ๆ 15 นาที ทำให้เย็น แล้วกรองสกัดสารละลายที่กรองได้ด้วยไดคลอโรมีเทน 3 ครั้งๆ ละ 10 cm³ รวมขึ้นไดคลอโรมีเทนทั้ง 3 ครั้งเข้าด้วยกัน เขย่ากับ anhyd. Na₂SO₄ กรอง นำไประเหยจนปริมาตรเหลือประมาณ 1/10 ของปริมาตรเดิม ทำให้เย็น แบ่งใส่หลอดทดลอง 3 หลอด เพื่อนำไปทดสอบหาองค์ประกอบของคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ดังนี้

3.2.1 ทดสอบส่วนที่เป็น steroid (Liebermann-Burchard reaction) นำสารละลายไดคลอโรมีเทนในหลอดที่ 1 มาระเหยจนเกือบแห้ง ทำให้เย็น หยด conc. acetic acid ลงไป 3 หยด เขย่าแล้วค่อยๆ หยด conc. H₂SO₄ ลงไปตามข้าง ๆ หลอด 1 หยด สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น

3.2.2 ทดสอบส่วนที่เป็น lactone, butenolide (Kedde's reaction) ระเหยสารละลายไดคลอโรมีเทนในหลอดที่ 2 จนเกือบแห้ง หยด Kedde's reagent ลงไป 1 cm³ และสารละลาย 1 M NaOH 2 หยด สังเกตการเปลี่ยนแปลง

3.2.3 ทดสอบส่วนที่เป็น deoxy sugar (Keller-Kiliani) เติม FeCl₃ reagent 3 cm³ ลงในสารละลายไดคลอโรมีเทนในหลอดที่ 3 เขย่าให้เข้ากัน เอียงหลอดทดลองแล้วค่อยๆ ริน conc. H₂SO₄ ประมาณ 1-2 cm³ สังเกตการเปลี่ยนแปลง

รีเอเจนต์สำหรับทดสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์

1) Kedde's reagent คือสารละลายของ 3,5-dinitrobenzoic acid 1 กรัม ในเมทานอล 100 cm³

2) Ferric chloride reagent คือสารละลายที่ได้จาก 10 % FeCl₃ จำนวน 0.3 cm³ ใน glacial acetic acid 50 cm³

3.3 การทดสอบฟลาโวนอยด์

นำสารสกัด มา 3 cm³ มาระเหยบน water bath สกัดไขมันออกด้วยเฮกเซน จนเฮกเซน ไม่มีสี แล้วจึงนำของแข็งที่ปราศจากไขมันนั้นมาละลายใน 80% เอทานอล 10 cm³ แบ่งใส่หลอดทดลอง 3 หลอด ให้หลอดที่ 1 เป็น blank control

3.3.1. Cyanidin test นำหลอดที่ 2 มาเติม conc. HCl 0.5 cm³ แล้วเติมแมกนีเซียม 1-2 แผ่น สังเกตการเปลี่ยนแปลง เติมน้ำ 2 cm³ และ octyl alcohol 1 cm³ เขย่าแรง ๆ สังเกตสีขึ้นน้ำ

3.3.2 Leucoanthocyanin test นำหลอดที่ 3 มาเติม conc. HCl 0.5 cm³ อุ้มนบน water bath 5 นาที สังเกตสี

3.4 การทดสอบซาโปนิน

ทดสอบฟอง ชั่งพืชแห้งที่บดละเอียด 100 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลองเติมน้ำกลั่น 5 cm³ แล้วต้มบน water bath 5 นาที กรองขณะร้อนปล่อยให้เย็น เขย่าสารละลายที่ใสอย่างแรง 1 นาที สังเกตผลนาน 30 นาที เติม dil.H₂SO₄ 1 cm³ ลงในสารละลาย ต้มนาน 5 นาที ปล่อยให้เย็น เขย่าแรง ๆ 1 นาที สังเกตผล

3.5 การทดสอบแอนทราควิโนนไกลโคไซด์

นำพืชแห้งที่บดละเอียด 1 ช้อนเล็ก ใส่ในหลอดทดลอง เติม 10 % HCl 5 cm³ แล้วต้มบน water bath 5 นาที กรองขณะร้อน ปล่อยให้เย็น นำสารละลายที่ได้ใส่กรวยแยก สกัดด้วย ไดคลอโรมีเทนนำขึ้นน้ำมาเติม 10 % NH₃ สังเกตการเปลี่ยนแปลง

3.6 การทดสอบแทนนิน

พืชแห้งบดละเอียด 1 ช้อนเล็ก ใส่ในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 5 cm³ แล้วต้มบน water bath 5 นาที กรองขณะร้อน นำสารละลายที่กรองได้ทำให้เจือจางโดยเติมน้ำกลั่นแล้วหยด FeCl₃ 3-4 หยด สังเกตการเปลี่ยนแปลง

3.7 การทดสอบคูมาริน

สารสกัดเอทานอลมาหยดสารละลายลงบนกระดาษกรองที่ขึ้นด้วย 1 M NaOH นำไปตั้งบนแผ่นความร้อนให้กระดาษแห้ง ระวังอย่าให้กระดาษกรองไหม้ นำกระดาษกรองไปวางใต้แสงอุตราไวโอเลต และสังเกตการณ์เรืองแสงที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร

3.8 ทดสอบ steroid nucleus (Liebermann-Burchard test)

นำสารสกัดเอทานอล มา 2.5 cm³ เติม dil.H₂SO₄ 10 cm³ เขย่าให้เข้ากัน ต้มบน water bath 15 นาที ปล่อยให้ของผสมเย็นลง แล้วสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน 15 cm³ นำชั้นไดคลอโรมีเทนมาเติม anh.Na₂SO₄ จำนวนเล็กน้อย กรอง ให้สารละลายไดคลอโรมีเทนลงในขามกระบือ ระบายให้วบบนอ่างน้ำร้อน ปล่อยให้เย็นเติม conc. acetic acid 3 หยด เขย่าให้เข้ากันดี แล้วค่อยๆหยด conc.H₂SO₄ 1-2 หยด ให้ไหลไปตามผนังขามกระบือ เพื่อให้สารละลายทั้ง 2 ผสมกันช้าๆ สังเกตสีที่เปลี่ยนทันทีและสังเกตต่อไปเรื่อย ๆ จนครบ 1 ชั่วโมง ถ้ามี steroid จะให้สีน้ำเงินหรือสีเขียวแกมน้ำเงิน

ตอนที่ 4 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของชาเล็บรอก

4.1 การทดสอบการต้านออกซิเดชันเบื้องต้น ในการเตรียมชาเล็บรอกนำผงกิ่งเล็บรอกที่แห้งแล้ว ปริมาณ 2.00 กรัม บรรจุในถุงชา นำชามาชงในน้ำร้อน ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน ดังนี้ 60 70 80 90 และ 100 องศาเซลเซียส และระยะเวลาการแช่ถุงชาในน้ำร้อนแตกต่างกันดังนี้ 1 2 3 4 5 10 นาที รอให้น้ำชาเย็นแล้วนำไปทดสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH เหมือนตอนที่ 1. ข้อ 2 โดยเปลี่ยนจากสารสกัดจากพืชเป็นน้ำชา ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรแทน และนำค่าที่ได้มาคำนวณค่าร้อยละการต้านออกซิเดชัน

4.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไตลิง (Cytotoxicity against primate cell line (Vero)) [Hunt *et al.*, 1999] ในการศึกษาใช้วิธีเดียวกับตอนที่ 2. หัวข้อ 2.4 โดยเปลี่ยนจากสารสกัดเป็นน้ำชา

สถิติที่ใช้ในการวิจัย

ค่าเฉลี่ย (Mean)

$$\bar{x} = \frac{\sum xi}{n}$$

เมื่อ	$\bar{x}$	แทน	ค่าเฉลี่ย
	$\sum x$	แทน	ผลรวมของคะแนนทั้งหมดของกลุ่ม
	n	แทน	จำนวนของคะแนนในกลุ่ม

ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation)

$$SD = \frac{\sqrt{\sum (xi - \bar{x})^2}}{n}$$

เมื่อ	$S.D$	แทน	ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	Xi	แทน	ค่าคะแนน
	n	แทน	จำนวนคะแนนในแต่ละกลุ่ม
	X	แทน	ผลรวม
	$\bar{x}$	แทน	ค่าเฉลี่ย

สถิติที่ใช้ในการทดสอบสมมุติฐานความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่าง

กรณีกลุ่มตัวอย่าง 1 กลุ่ม หรือข้อมูล 2 ชุด

$$t = \frac{\sum D}{\sqrt{\frac{n \sum D^2 - (\sum D)^2}{(n - 1)}}}$$

$$df = n - 1$$

เมื่อ	t	แทน	ค่าสถิติที่ใช้ในการเปรียบเทียบกับค่าวิกฤติ เพื่อทราบความมีนัยสำคัญ
	D	แทน	ค่าผลต่างระหว่างคู่คะแนน
	$\sum D$	แทน	ผลรวมค่าผลต่างระหว่างคู่คะแนน
	n	แทน	จำนวนกลุ่มตัวอย่างหรือจำนวนคู่คะแนน

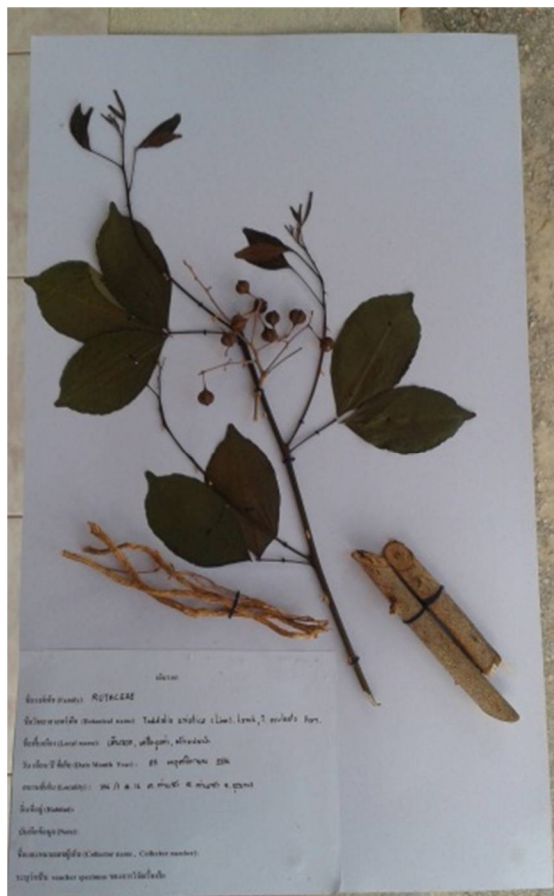
บทที่ 4

ผลการทดลอง

ตอนที่ 1 ตัวอย่างพืชสมุนไพรและสารสกัด

1.1 ตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างพืชส่วนใบ กิ่งและรากเล็บรอกที่ ตำบลท่าชะ อำเภอนาทม จังหวัด
ชมพร เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2557 ถึง มีนาคม พ.ศ. 2558 ดังภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 ตัวอย่างเล็บรอก

1.2 สารสกัด

นำส่วนของพืชที่แห้งแล้วทั้ง 3 ส่วนได้แก่ ใบ กิ่งและราก นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เอทานอล นำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศออกจนได้สารสกัดพืชดังรายละเอียดในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 สารสกัดของทุกส่วนของเล็บบรอก

ส่วนของพืช	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ร้อยละโดยน้ำหนัก ของสารสกัดต่อ น้ำหนักพืชแห้ง	ลักษณะสารสกัด
ใบ	0.9042	5.10	ของเหลวสีเขียว
กิ่ง	0.1974	0.52	ของเหลวสีเหลือง
ราก	0.6248	3.32	ของเหลวสีเหลือง มีน้ำมันสีน้ำตาลอ่อนเจือปน

จากการสกัดพืชแห้งส่วนใบ กิ่งและรากด้วยตัวทำละลายเอทานอล พืชทั้ง 3 ส่วน มีร้อยละโดยน้ำหนักของสารสกัดต่อน้ำหนักพืชแห้ง เท่ากับ 5.10 0.52 และ 3.32 ตามลำดับ ทุกส่วนให้สารสกัดเป็นของเหลว

ตอนที่ 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของสารสกัด

ในการวิจัยนี้ได้ศึกษาการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นมี 2 ประเภทได้แก่

2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันแบ่งออกเป็น 2 วิธีดังนี้

2.1.1 การทดสอบด้วยวิธี DPPH โดยมีวิตามินซีเป็นสารมาตรฐาน ดังผลการทดลองในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ผลการต้านออกซิเดชันเบื้องต้นของสารสกัด

ส่วนของพืช	ร้อยละการยับยั้ง*	(IC ₅₀ ±SD; µg/ml)	
		วิธีDPPH	วิธีNitric oxide
ใบ	29.72	-	-
กิ่ง	64.86	89.65±1.00	-
ราก	41.21	-	-
วิตามินซี		59.38±0.00	

หมายเหตุ * หมายถึงที่ความเข้มข้นสุดท้ายสูงสุด 125 µg/ml

จากตารางที่ 4.2 พบว่าสารสกัดจากกิ่งแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงที่สุดที่ความเข้มข้นสุดท้าย 125 µg/ml รองลงมาเป็นรากและใบตามลำดับ และนำสารสกัดกิ่งมาหาค่าการยับยั้งร้อยละ 50 ได้เท่ากับ 89.65±1.00 µg/ml

2.1.2 การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเบื้องต้นของสารสกัดโดยการทดสอบด้วยไนตริกออกไซด์โดยมีวิตามินซีเป็นสารมาตรฐาน

จากการวิจัยครั้งนี้พบว่าสารสกัดทั้งสามส่วนของเล็บรอกไม่แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ความเข้มข้นสุดท้าย 125 $\mu\text{g/ml}$ โดยวิตามินซีแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ $142.85 \pm 8.02 \mu\text{g/ml}$

2.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไคลิง

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเบื้องต้นพบว่าสารสกัดกึ่งเล็บรอกมีค่าสูงสุด จึงนำสารสกัดส่วนนี้ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไคลิงก่อนนำไปผลิตเป็นชาเล็บรอก พบว่าสารสกัดนี้ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไคลิงที่ความเข้มข้นสุดท้าย 50 $\mu\text{g/ml}$ ดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไคลิงของสารสกัดกึ่งเล็บรอก

สาร	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	% cytotoxicity	สาร	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	% cytotoxicity
ellipticin	4.00	93.22	สารสกัด	50.00	0.96
	2.00	83.06		16.67	0.12
	1.00	64.48		5.56	0.00
	0.50	30.23		1.85	0.00
	0.25	10.31		0.62	0.00
	0.13	4.07		0.21	0.00
$\text{IC}_{50} = 0.75 \mu\text{g/ml}$					

ตอนที่ 3 การทดสอบหาสารสำคัญเบื้องต้นในกึ่งเล็บรอก

จากตอนที่ 2. สารสกัดกึ่งเล็บรอกแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่น่าสนใจที่สุด จึงนำสารสกัดนี้มาทดสอบหาสารสำคัญ 8 กลุ่ม ได้แก่ ทดสอบแอลคาลอยด์ ทดสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ ทดสอบฟลาโวนอยด์ ทดสอบซาโปนิน ทดสอบแอนทราควิโนนไกลโคไซด์ ทดสอบแทนนิน ทดสอบ คูมาริน และทดสอบสเตอรอยด์ (Liebermann-Burchard test) ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 พฤษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดส่วนกิ่งเล็บบรอก

ประเภทสาร	วิธีการทดสอบ	ผลการทดลอง
alkaloids	Mayer	-
	Wagner	-
	Dragendorff	+
cardiac glycoside	Libermannburchard	+
	Kedde's reagent	-
	Keller-Killani test	-
flavonoids	Cyaniding test	-
	Leucoanthocyanin test	-
saponin	Foam test	-
antraquinoneglycoside	Borntraeger reaction	-
tannins	Ferric chloride test	+
coumarin	Alkaline test	+
steroid	Libermannburchard	+

หมายเหตุ + หมายถึงผลการตรวจสอบเบื้องต้นพบสารกลุ่มดังกล่าว - หมายถึงผลการตรวจสอบเบื้องต้นไม่พบสารกลุ่มดังกล่าว

ในการศึกษาพฤษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดส่วนกิ่งเล็บบรอก พบว่ามีสารกลุ่ม 5 กลุ่ม ได้แก่ alkaloids tannins coumarin และ Steroid/phytosterol

ตอนที่ 4 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของชาเล็บบรอก

4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันเบื้องต้น

จากฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเบื้องต้นของสารสกัดพบว่ากิ่งเล็บบรอกมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีที่สุดด้วยวิธี DPPH จึงพัฒนาเป็นชาเล็บบรอกโดย นำผงกิ่งเล็บบรอกที่แห้งแล้วปริมาณ 2.00 กรัม บรรจุในถุงชา ชงในน้ำร้อน ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิแตกต่างกันดังนี้ 60 70 80 90 และ 100 องศาเซลเซียส และระยะเวลาการแช่ถุงชาในน้ำร้อนแตกต่างกันดังนี้ 1 2 3 4 5 และ 10 นาที รอให้น้ำชาเย็นแล้วนำไปทดสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH ดังแสดงผลในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของชาเล็บรอกตามระยะเวลาการชงและอุณหภูมิแตกต่างกัน

อุณหภูมิ ที่เตรียมชา	ร้อยละการยับยั้ง $\pm$ SD					
	เวลา (นาที่)					
	1 ^a	2 ^a	3	4	5	10
60 °C	0.00 ^a	0.00 ^a	2.52 $\pm$ 0.36 _b	6.60 $\pm$ 0.44 ^{bc}	9.43 $\pm$ 0.96 ^c	18.23 $\pm$ 0.97 ^d
70 °C	0.00 ^a	0.00 ^a	5.66 $\pm$ 1.26 _b	8.18 $\pm$ 1.31 ^{bc}	13.33 $\pm$ 1.28 ^c	27.05 $\pm$ 2.88 ^d
80 °C	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	3.78 $\pm$ 0.88 ^b
90 °C	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	2.83 $\pm$ 0.44 ^b
100 °C	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	10.06 $\pm$ 0.63 ^b

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

ชาที่ชงที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที มีร้อยละการยับยั้งออกซิเดชันดีที่สุด ร้อยละ 27.04 $\pm$ 2.88 โดยรวมชาที่ชงที่ 60-70 องศาเซลเซียส แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีที่สุดทุกช่วงเวลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 รองลงมาคือชาที่ชงที่อุณหภูมิสูง 80-100 องศาเซลเซียส แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดีที่เวลา 10 นาทีเท่านั้น

4.2 ความเป็นพิษต่อเซลล์ไคลิง

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์ชาในตอนที่ 4.1 พบว่าน้ำชาเล็บรอกที่ชงที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 10 นาที แสดงฤทธิ์ที่ดีที่สุดจึงนำน้ำชานี้ทดสอบความเป็นพิษโดยพบว่า ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 10 % (v/v) น้ำชาเล็บรอกไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไคลิงด้วยวิธีที่ติดฉลากโปรตีนเรืองแสงสีเขียวชนิด pEGFP-N1 (Clontech) ดังข้อมูลในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไต้ลิงของน้ำชา

สาร	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	% cytotoxicity	สาร	ความเข้มข้น (%v/v)	% cytotoxicity
ellipticin	4.00	90.32	น้ำชา	10.00	0.00
	2.00	66.63		3.33	0.00
	1.00	38.21		1.11	0.00
	0.50	17.96		0.37	0.00
	0.25	9.51		0.12	0.00
	0.13	1.05		0.04	0.00
IC ₅₀ = 1.34 $\mu\text{g/ml}$					

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผล

สรุปผล

ในการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเบื้องต้นจากส่วนต่างๆของเล็บรอก คือ ใบ กิ่ง และ ราก โดยนำส่วนต่างของเล็บรอก (ใบ กิ่ง ราก) มาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลแล้วนำไปศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยนำสารสกัดส่วนต่างๆทดสอบด้วยวิธี DPPH โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 517 nm พบว่าที่ความเข้มข้นสุดท้าย 125 $\mu\text{g/ml}$ ส่วนกิ่งของเล็บรอกมีร้อยละการยับยั้งดีที่สุด เท่ากับ 64.86 และค่า $\text{IC}_{50} \pm \text{S.D}$ เท่ากับ $89.65 \pm 1.00 \mu\text{g/ml}$ โดยนำไปเปรียบเทียบกับวิตามินซี ค่า $\text{IC}_{50} \pm \text{S.D}$ เท่ากับ $59.38 \pm 0.00 \mu\text{g/ml}$ แต่สารสกัดทุกส่วนไม่แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยไนตริกออกไซด์ที่ความเข้มข้นสูงสุด 125 $\mu\text{g/ml}$

จากการทดสอบหาสารสำคัญเบื้องต้นจากกิ่งเล็บรอก พบว่า ตัวอย่างเล็บรอกที่นำมาทดสอบพบสารกลุ่ม alkaloids tannins coumarin และ Steroid เป็นองค์ประกอบ

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่การต้านออกซิเดชันเบื้องต้นด้วยวิธี DPPH ของน้ำชาเล็บรอก โดยนำกิ่งเล็บรอกมาผลิตเป็นชา วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 215 nm พบว่า ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที ชาเล็บรอกมีร้อยละการยับยั้งดีที่สุด มีค่ากับ 27.04 ± 2.88 แตกต่างจากน้ำชาที่ชง ณ อุณหภูมิแตกต่างกันในช่วง 60-100 องศาเซลเซียส และเวลาที่แตกต่างกันในช่วง 1-10 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 และน้ำชาที่มีร้อยละการยับยั้งดีที่สุด ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไตลิงด้วยวิธีที่ติดฉลากโปรตีนเรืองแสงสีเขียวชนิด pEGFP-N1 (Clonetechn) ที่ความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 10 โดยปริมาตร

อภิปรายผล

จากการทดลองนี้กิ่งเล็บรอกแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงที่สุดแต่ก็พบว่าใบมีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันที่ความเข้มข้น 125 $\mu\text{g/ml}$ ร้อยละ 29.72 ในหลอดทดลอง ขณะที่งานวิจัยของ Irudayaraj *et al.*, 2012 ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันใบเล็บรอกในหนูทดลองพบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทใบเล็บรอกแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ความเข้มข้น 250 และ 500 mg/kg และมีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูทดลองเทียบเท่ากับยาแผนปัจจุบันชนิด glibenclamide 0.6 mg/kg และทั้งสองความเข้มข้นของสารสกัดนี้ไม่มีความเป็นพิษอย่างรุนแรงและพบว่าหนูทุกตัวมีชีวิตรอดตลอดการทดลองโดยมีน้ำหนักและการบริโภคอาหารปกติ

จากการทดลองพบว่ารากไม่แสดงฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี Nitric oxide และ DPPH นั้น กิ่งเล็บรอกแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดีกว่ารากและใบ และนอกจากนี้ยังมีงานวิจัยทำการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเปรียบเทียบกับสารสกัดจากรากและใบเล็บรอก และเพื่อหาฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ เช่นฤทธิ์ต้านเบาหวาน ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี Nitric oxide พบว่า

รากเล็บบรอกมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดีกว่าวิตามินซี โดยเล็บบรอกมีค่า IC_{50} 37 $\mu\text{g/ml}$ ส่วนวิตามินซีมีค่า IC_{50} 93 $\mu\text{g/ml}$ (Madhavan *et al.*, 2010)

ส่วนกิ่งของเล็บบรอกยังไม่มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ผู้วิจัยได้ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันส่วนของกิ่งเล็บบรอกพบว่า มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเท่ากับ 89.65 ± 1.00 $\mu\text{g/ml}$ ที่ความเข้มข้นสุดท้าย สารสกัดที่ความเข้มข้นสุดท้าย 50 $\mu\text{g/ml}$ ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไคลิง และเมื่อนำสารสกัดจากกิ่งและชาจากกิ่งเล็บบรอกในส่วนที่แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงสุด ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที มีร้อยละการยับยั้งออกซิเดชันดีที่สุด 27.04 ± 2.88 และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไคลิงของน้ำชานี้ พบว่าที่ความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 10 โดยปริมาตรของน้ำชา ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไคลิง

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาการผลิตที่มีลักษณะเป็นชาผสมเพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่สูงขึ้น
2. ควรศึกษาเปรียบเทียบระหว่างชาเล็บบรอกกับชาในท้องตลาดที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน
3. ควรศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในด้านอื่นเช่นการลดไขมันในเส้นเลือดหรือฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ตารางข้อมูลผลการวิเคราะห์

ตารางที่ ผ -1 ผลการศึกษาการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของเล็บรอกทุกส่วนโดยวิธี DPPH

ส่วนของ เล็บรอก	ความ เข้มข้น สุดท้าย $\mu\text{g/ml}$	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าเฉลี่ย	ร้อยละการ ยับยั้ง
		1	2	3		
ใบ	0.0001	0.145	0.145	0.144	0.145	2.02
	0.0010	0.144	0.145	0.143	0.144	2.70
	0.0120	0.144	0.142	0.143	0.143	3.37
	0.1250	0.143	0.142	0.142	0.142	4.05
	1.2500	0.138	0.136	0.139	0.138	6.75
	12.5000	0.103	0.103	0.106	0.104	29.72
กิ่ง	0.0001	0.146	0.147	0.143	0.145	2.02
	0.0010	0.146	0.144	0.143	0.144	2.70
	0.0120	0.144	0.143	0.142	0.143	3.37
	0.1250	0.141	0.141	0.139	0.140	5.40
	1.2500	0.122	0.122	0.123	0.122	17.56
	12.5000	0.053	0.052	0.052	0.052	64.86
ราก	0.0001	0.144	0.144	0.143	0.144	2.70
	0.0010	0.144	0.143	0.143	0.143	3.37
	0.0120	0.144	0.141	0.142	0.142	4.05
	0.1250	0.142	0.141	0.139	0.141	4.72
	1.2500	0.134	0.132	0.133	0.133	10.13
	12.5000	0.087	0.085	0.090	0.087	41.21

ตารางที่ ผ -2 ผลการศึกษาการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของวิตามินซีโดยวิธี DPPH

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าเฉลี่ย	ร้อยละ การยับยั้ง
	1	2	3		
0.0001	0.144	0.143	0.144	0.144	2.70
0.0010	0.142	0.142	0.142	0.142	4.05
0.0120	0.142	0.140	0.140	0.141	4.72
0.1250	0.113	0.111	0.111	0.112	24.32
1.2500	0.040	0.040	0.040	0.040	72.97
12.5000	0.040	0.039	0.039	0.039	73.64

ตารางที่ ผ -3 ผลการศึกษาการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของเลืบรอกทุกส่วนโดยวิธีไนตริกออกไซด์

ส่วนของ เลืบรอก	ความ เข้มข้น $\mu\text{g/ml}$	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าเฉลี่ย	ร้อยละการ ยับยั้ง
		1	2	3		
ใบ	3.906	0.999	1.017	1.026	1.014	0.00
	7.812	1.020	0.997	0.974	0.997	0.00
	15.625	1.064	0.991	0.979	1.011	0.00
	31.250	1.049	1.044	0.993	1.029	0.00
	62.500	1.174	1.175	1.200	1.183	0.00
	125.000	1.534	1.463	1.445	1.481	0.00
กิ่ง	3.906	1.021	1.011	0.983	1.005	0.00
	7.812	1.007	1.000	0.998	1.002	0.00
	15.625	0.980	0.958	1.028	0.988	0.00
	31.250	0.968	0.983	1.019	0.990	0.00
	62.500	1.100	1.079	1.030	1.069	0.00
	125.000	1.344	1.346	1.331	1.340	0.00
ราก	3.906	0.994	0.976	0.966	0.977	0.00
	7.812	0.995	0.998	1.005	0.999	0.00
	15.625	1.017	0.991	0.997	1.002	0.00
	31.250	1.047	1.076	1.064	1.062	0.00
	62.500	1.243	1.261	1.258	1.254	0.00
	125.000	1.728	1.719	1.964	1.803	0.00

ตารางที่ ผ -4 ผลการศึกษาการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของวิตามินซีโดยวิธีไนตริกออกไซด์

ความเข้มข้น μg/ml	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าเฉลี่ย	ร้อยละการยับยั้ง
	1	1	2		
3.906	0.694	0.676	0.726	0.699	29.47
7.812	0.604	0.573	0.607	0.595	39.96
15.625	0.409	0.406	0.436	0.417	57.92
31.250	0.186	0.197	0.200	0.194	80.42
62.500	0.074	0.079	0.076	0.076	92.33
125.000	0.063	0.065	0.064	0.063	93.64

ตารางที่ ผ -5 ร้อยละการยับยั้งออกซิเดชันของชาเล็บรอก

อุณหภูมิ	เวลา (นาที)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าเฉลี่ย	ร้อยละการยับยั้ง
		1	2	3		
60	1	0.194	0.175	0.170	0.180	0.00
	2	0.156	0.170	0.167	0.164	0.00
	3	0.152	0.148	0.150	0.150	5.66
	4	0.144	0.145	0.148	0.146	8.17
	5	0.142	0.144	0.145	0.144	9.43
	10	0.128	0.130	0.131	0.130	18.23
70	1	0.164	0.164	0.159	0.162	0.00
	2	0.160	0.164	0.156	0.160	0.00
	3	0.156	0.157	0.152	0.155	2.51
	4	0.148	0.152	0.149	0.150	5.66
	5	0.139	0.136	0.140	0.138	13.20
	10	0.120	0.117	0.111	0.116	27.04
80	1	0.191	0.201	0.196	0.196	0.00
	2	0.178	0.194	0.183	0.185	0.00
	3	0.170	0.168	0.172	0.170	0.00
	4	0.168	0.167	0.168	0.168	0.00
	5	0.162	0.160	0.161	0.161	0.00
	10	0.145	0.152	0.154	0.150	5.66

ตารางที่ ผ-5 (ต่อ)

อุณหภูมิ	เวลา (นาทึ)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าเฉลี่ย	ร้อยละการ ยับยั้ง
		1	2	3		
90	1	0.186	0.182	0.185	0.184	0.00
	2	0.180	0.178	0.178	0.179	0.00
	3	0.173	0.176	0.170	0.173	0.00
	4	0.168	0.173	0.169	0.170	0.00
	5	0.161	0.165	0.165	0.164	0.00
	10	0.154	0.146	0.155	0.152	4.40
100	1	0.195	0.188	0.187	0.190	0.00
	2	0.186	0.177	0.185	0.183	0.00
	3	0.180	0.173	0.168	0.174	0.00
	4	0.171	0.166	0.166	0.168	0.00
	5	0.160	0.163	0.162	0.162	0.00
	10	0.144	0.142	0.143	0.143	10.06

ภาคผนวก ข
ภาพประกอบการวิจัย



ภาพที่ ผ -1 ตัวอย่างเล็บบรอกส่วนใบ กิ่ง และรากที่ตากแห้ง



ภาพที่ ผ -2 สารสกัดจากใบ กิ่ง ราก ของเล็บบรอก



ภาพที่ ผ -3 ผลิตภัณฑ์ถุงชาเส้นบรอกสำเร็จรูป



อุณหภูมิ 70



อุณหภูมิ 100

ภาพที่ ผ -4 น้ำชาเส้นบรอกที่เตรียม ณ อุณหภูมิ 70 และ 100 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที