



ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดผักกูด  
ที่เตรียมจากวิธีการสกัดแบบลำดับขั้น

ANTIOXIDANT AND TYROSINASE INHIBITORY ACTIVITIES OF  
*Diplazium esculentum* (Retz.) Sw. EXTRACTS OBTAINED  
BY SEQUENTIAL EXTRACTION METHOD

ฐิตาภา เอียงปาน

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

2565

©ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดผักกูด  
ที่เตรียมจากวิธีการสกัดแบบลำดับขั้น

ANTIOXIDANT AND TYROSINASE INHIBITORY ACTIVITIES OF  
*Diplazium esculentum* (Retz.) Sw. EXTRACTS OBTAINED  
BY SEQUENTIAL EXTRACTION METHOD

ฐิตาภา เอี้ยงปาน

การค้นคว้าอิสระนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา  
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง  
มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง  
2565

©ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดผักกูด  
ที่เตรียมจากวิธีการสกัดแบบลำดับขั้น

ANTIOXIDANT AND TYROSINASE INHIBITORY ACTIVITIES OF  
*Diplazium esculentum* (Retz.) Sw. EXTRACTS OBTAINED  
BY SEQUENTIAL EXTRACTION METHOD

จิตภา เอียงปาน

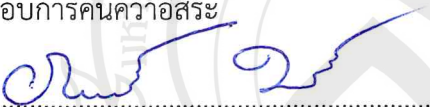
การค้นคว้าอิสระนี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

2565

คณะกรรมการสอบการค้นคว้าอิสระ

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาณุพงษ์ ใจวุฒิ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(ดร.ปัญญาวัฒน์ ปินดาทอง)

.....กรรมการ

(ดร.นัตฐารุติ ฐิติปราโมทย์)

**วรรณิศา ชัยญาณะ**.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.วรรณิศา ชัยญาณะ)

## กิตติกรรมประกาศ

การค้นคว้าอิสระฉบับนี้สำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ได้ด้วยดี ด้วยความเมตตาและกรุณาอย่างยิ่งจากอาจารย์ ดร.ปัญญาวัฒน์ ปินตาทอง ผู้ซึ่งให้คำปรึกษา ความรู้ คำแนะนำ ชี้แนะแนวทางต่าง ๆ ตลอดจนตรวจทานแก้ไขจนการค้นคว้าอิสระฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณอาจารย์เป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาณุพงษ์ ใจจุฑา, ดร.ณัฐราวุฒิ ฐิติปราโมทย์ และรองศาสตราจารย์ ดร.วรรณธิดา ชัยญาณะ ที่สละเวลาเป็นประธานและกรรมการในการสอบครั้งนี้ ตลอดจนให้คำปรึกษา คอยแนะนำให้ความรู้ จนการค้นคว้าอิสระฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ประจำสำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวงทุกท่าน ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกเป็นอย่างดีในทุก ๆ ด้าน ตลอดการศึกษาค้นคว้าหลักสูตร

ขอขอบคุณพี่ เพื่อน และน้อง ๆ นักศึกษาปริญญาโท สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ความช่วยเหลือ รวมถึงให้กำลังใจที่ดีตลอดการศึกษา

ขอบคุณครอบครัว ที่เป็นแรงผลักดัน ให้ความเข้าใจ รวมถึงกำลังใจที่ดีเสมอมา และสนับสนุนตลอดระยะเวลาในการศึกษา

สุดท้ายนี้ ผู้เขียนหวังเป็นอย่างยิ่งว่าการค้นคว้าอิสระนี้ จะมีคุณค่าและเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจ หากมีข้อผิดพลาดประการใด ผู้เขียนขออภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ฐิตาภา เอี้ยงปาน

ชื่อเรื่องการค้นคว้าอิสระ	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จากสารสกัดผักกูดที่เตรียมจากวิธีการสกัดแบบลำดับขั้น
ชื่อผู้เขียน	ฐิตาภา เอี้ยงปาน
หลักสูตร	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.ปัญญาวัฒน์ ปินตาทอง

### บทคัดย่อ

ผักกูด (*Diplazium esculentum* (Retz.) Sw.) เป็นพืชที่สามารถรับประทานได้ พบได้ทั่วไปในประเทศไทย นิยมนำส่วนใบอ่อนและยอดอ่อนมาปรุงรับประทานเป็นอาหาร โดยผักกูดมีสารสำคัญที่น่าสนใจคือ สารประกอบฟีนอลิกและพอลิแซ็กคาไรด์ ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในทางเครื่องสำอางได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อเตรียมสารสกัดหยาบฟีนอลิกและสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากผักกูดด้วยวิธีการสกัดแบบลำดับขั้น โดยใช้ตัวทำละลาย 5 ชนิด ได้แก่ อะซิโตน, เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95, น้ำ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส, กรด (ไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล) หรือต่าง (โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาประเมินปริมาณฟีนอลิกและพอลิแซ็กคาไรด์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จากการสกัดแบบลำดับขั้นจะได้สารสกัดฟีนอลิกและพอลิแซ็กคาไรด์ ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดฟีนอลิกมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงกว่าสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยสารสกัดฟีนอลิกที่สกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตนและเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงสุด มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $0.14 \pm 0.02$  และ  $0.14 \pm 0.01$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ส่วนสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่าสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดด้วยกรด (ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส) มีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมสูงสุด เท่ากับ  $230.68 \pm 1.26$  มิลลิกรัมสมมูลของกลูโคสต่อกรัมสารสกัด ปริมาณซัลเฟตสูงสุดในสารสกัด

ที่สกัดด้วยน้ำ (ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส) เท่ากับ  $14.03 \pm 0.42$  มิลลิกรัมสมมูลของซัลเฟตต่อกรัมสารสกัด และจากผลการวิเคราะห์ FT-IR พบหมู่ซัลเฟตในสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำ ขณะที่สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดด้วยต่าง (ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส) มีปริมาณพินอลิกรวมสูงสุด เท่ากับ  $83.53 \pm 1.71$  มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด นอกจากนี้สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดด้วยต่าง (ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส) ยังแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดด้วยเช่นกัน ด้วยวิธี ABTS เท่ากับ  $409.94 \pm 5.71$  มิลลิกรัมสมมูลของโทรลอคซ์ต่อกรัมสารสกัด ดังนั้นสารสกัดผักกูดจึงน่าสนใจมากที่จะนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารออกฤทธิ์ในทางเครื่องสำอางต่อไป

**คำสำคัญ:** ผักกูด, การสกัดแบบลำดับขั้น, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส



**Independent Study Title** Antioxidant and Tyrosinase Inhibitory Activities of *Diplazium esculentum* (Retz.) Sw. Extracts Obtained by Sequential Extraction Method

**Author** Thitapha Oiangpan

**Degree** Master of Science (Cosmetic Science)

**Advisor** Punyawatt Pintathong, Ph. D.

## ABSTRACT

Paco fern (*Diplazium esculentum* (Retz.) Sw.) is an edible fern found throughout Thailand. The edible parts are young fronds and leaves, which are generally used as food. Paco fern contains phenolic compounds and polysaccharides that could be interesting in cosmetics. The objective of this research was to prepare phenolic and polysaccharide crude extracts of *Diplazium esculentum* using a sequential extraction method with different solvents, including acetone, ethanol, water at 55°C and 80°C, acid (0.1 N HCl) or alkaline (0.1 N NaOH) at 55°C and 80°C. All extracted were evaluated for total phenolic content, total polysaccharide content as well as antioxidant and tyrosinase inhibitory activities. Following sequential extraction, phenolic and polysaccharide extracts were obtained. The results indicated that phenolic extract had significantly higher tyrosinase inhibitory activity than polysaccharide extract ( $p < 0.05$ ). The acetone and ethanolic extract exhibited the highest tyrosinase inhibitory activity ( $IC_{50}$ ) of  $0.14 \pm 0.02$  and  $0.14 \pm 0.01$  mg/ml, respectively. For polysaccharide extracts, acid extract (at 80°C) had the highest total polysaccharide ( $230.68 \pm 1.26$  mg GE/g crude extract). The highest sulfate content was result obtained by water extraction at 80°C ( $14.03 \pm 0.42$  mg sulfate/g crude

extract) and the result base on spectral data of FT-IR revealed the presence of sulfate group in water extract, while the highest total phenolic content ( $83.53 \pm 1.71$  mg GAE/g crude extract) was present in alkaline extract (at  $55^{\circ}\text{C}$ ). Furthermore, alkaline extract (at  $55^{\circ}\text{C}$ ) exhibited the highest antioxidant activity when assayed by ABTS method ( $409.94 \pm 5.71$  mg TEAC/g crude extract). Therefore, Paco fern extract could be more interesting for further use as an active ingredient in cosmetic products.

**Keywords:** *Diplazium esculentum*, Sequential Extraction, Antioxidant Activity, Tyrosinase Inhibitory Activity



## สารบัญ

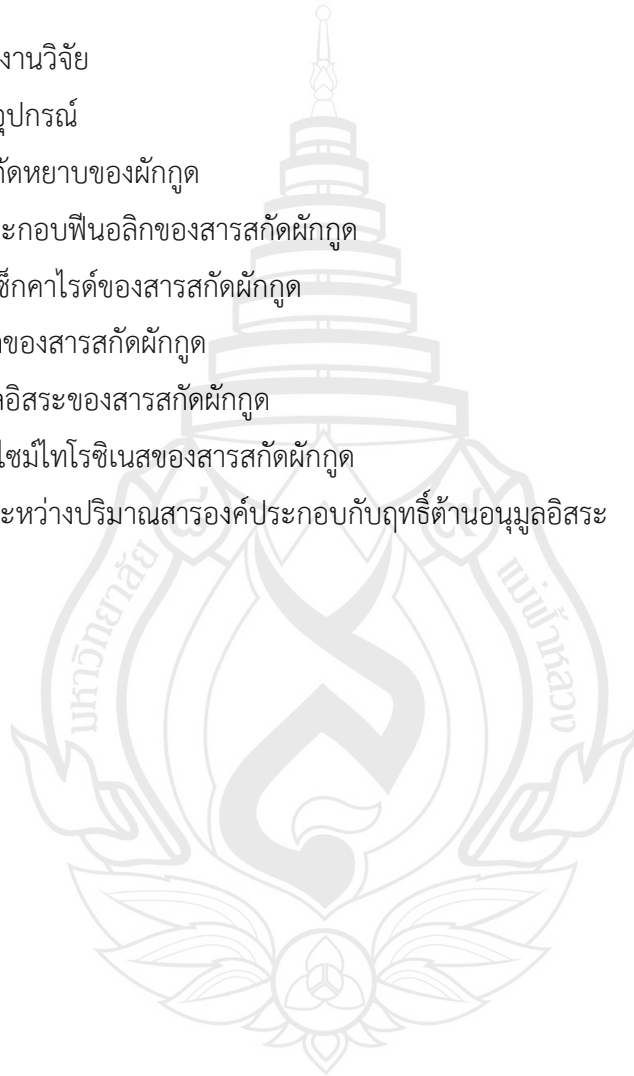
	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	(3)
บทคัดย่อภาษาไทย	(4)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(6)
สารบัญตาราง	(10)
สารบัญภาพ	(11)
<b>บทที่</b>	
<b>1 บทนำ</b>	<b>1</b>
1.1 ที่มาของปัญหาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการศึกษา	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
<b>2 ทบทวนวรรณกรรม</b>	<b>4</b>
2.1 ผักกูด	4
2.2 การสกัดสารสำคัญจากพืช	8
2.3 สารประกอบฟีนอลิก	13
2.4 พอลิแซ็กคาไรด์	17
2.5 อนุมูลอิสระ และสารต้านอนุมูลอิสระ	19
2.6 เอนไซม์ไทโรซิเนส และการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส	23

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
<b>บทที่</b>	
<b>3 วิธีดำเนินงานวิจัย</b>	<b>25</b>
3.1 วัตถุประสงค์ และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	25
3.2 เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	26
3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย	27
<b>4 ผลการทดลอง และอภิปรายผลการทดลอง</b>	<b>35</b>
4.1 การเตรียมสารสกัดจากผักกูด	35
4.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากผักกูด	38
4.3 การวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ของสารสกัดจากผักกูด	40
4.4 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	44
4.5 การวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส	46
4.6 การวิเคราะห์สหสัมพันธ์	48
<b>5 สรุปผลการศึกษาวิจัย และข้อเสนอแนะ</b>	<b>50</b>
5.1 สรุปผลการศึกษาวิจัย	50
5.2 ข้อเสนอแนะ	51
<b>รายการอ้างอิง</b>	<b>52</b>
<b>ภาคผนวก</b>	<b>63</b>

## สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
3.1 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	25
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์	26
4.1 ลักษณะสารสกัดหยาบของผักกูด	36
4.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดผักกูด	39
4.3 ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ของสารสกัดผักกูด	41
4.4 ปริมาณซัลเฟตของสารสกัดผักกูด	42
4.5 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผักกูด	45
4.6 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดผักกูด	47
4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารองค์ประกอบกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	49



## สารบัญญภาพ

ภาพ	หน้า
2.1 ลักษณะทางกายภาพของใบและยอดผักกูด	4
2.2 สารสำคัญที่พบในผักกูด	6
2.3 กลไกการสกัดด้วยคลื่นอัลตราโซนิค	11
2.4 เครื่องมือสำหรับการสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟ	12
2.5 การจำแนกประเภทของสารประกอบฟีนอลิก	14
2.6 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟีนอลิกกลุ่มกรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์	15
2.7 สารประกอบฟีนอลิกในเซลล์พืช	16
2.8 การเชื่อมต่อระหว่างกรดฟีนอลิกกับส่วนประกอบโครงสร้างผนังเซลล์	16
2.9 ประเภทและการจัดเรียงตัวของพอลิแซ็กคาไรด์	17
2.10 โครงสร้าง fucoidans ในสาหร่ายสีน้ำตาล	18
2.11 ซิวโมเลกุลเป้าหมายและกลไกการทำลายของอนุมูลอิสระ	20
2.12 การเกิดอนุมูลไฮดรอกซิล	20
2.13 การจำแนกประเภทสารต้านอนุมูลอิสระ	22
2.14 กระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน	23
3.1 ลักษณะทางกายภาพของผักกูด	27
3.2 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดผักกูดด้วยวิธีการสกัดแบบลำดับขั้น	28
4.1 ร้อยละผลผลิตของสารสกัดผักกูดที่เตรียมโดยวิธีการสกัดแบบลำดับขั้น	38
4.2 FT-IR spectrum ของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์	44

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ที่มาของปัญหาและความสำคัญ

ปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อม ทั้งภาวะโลกร้อน มลพิษ ฝุ่นควัน การรั่วไหลของสารเคมีอันตราย ภัยทางธรรมชาติต่าง ๆ ส่งผลให้การดำรงชีวิตของมนุษย์ยากขึ้น จึงเกิดเป็นกระแสรักโลก อนุรักษ์ธรรมชาติขึ้นมา ซึ่งทั่วโลกให้ความสำคัญกับการดูแลสิ่งแวดล้อมและสุขภาพควบคู่กัน จึงหันมาเลือกใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ลดการใช้สารเคมีสังเคราะห์ลง และในทางเครื่องสำอางมีการนำวัตถุดิบจากธรรมชาติเข้ามาใช้เป็นส่วนผสมมากขึ้น เพื่อลดหรือทดแทนการใช้ส่วนผสมที่ได้จากการสังเคราะห์ โดยวัตถุดิบจากธรรมชาติที่นำมาใช้ในเครื่องสำอางนั้น ต้องปลอดภัย เนื่องจากผู้บริโภคมีความตระหนักถึงความปลอดภัยและใส่ใจในสุขภาพ

ประเทศไทยมีความอุดมสมบูรณ์ของทรัพยากรธรรมชาติ มีพืชผักและสมุนไพรหลากหลายชนิดพันธุ์ ด้วยลักษณะภูมิประเทศและอากาศที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโตของพืชนานาชนิด ทำให้สามารถปลูกพืชผักและสมุนไพรเพื่อการดำรงชีวิต การรักษาโรค ความงาม รวมถึงการส่งออกเพื่อสร้างรายได้ จากความหลากหลายของฐานทรัพยากร ถือว่าเป็นต้นทุนทางธรรมชาติที่ทำให้ประเทศไทยสามารถค้นพบส่วนผสมทางธรรมชาติได้มากมาย ทรัพยากรในชุมชนท้องถิ่นได้ถูกนำมาปรับใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดอย่างยั่งยืน ซึ่งสารสกัดหรือส่วนผสมที่ได้มีฤทธิ์ทางชีวภาพ อาทิเช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้านแบคทีเรีย ด้านการอักเสบ ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจิเนสและไทโรซิเนส เป็นต้น (สินีนานู ภูระยั๊บ และคณะ, 2564; Cheng et al., 2005; Choi et al., 2016) ซึ่งเป็นการพัฒนาผลิตภัณฑ์ให้ก้าวหน้าและในขณะเดียวกันก็เป็นการสร้างรายได้ให้แก่ชุมชน

ผักกูด มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Diplazium esculentum* (Retz.) Sw. เป็นพืชในตระกูลเฟิน จัดอยู่ในวงศ์ Athyriaceae พบได้ทั่วไปแทบทุกภูมิภาคในประเทศไทย ผักกูดเป็นพืชที่เจริญเติบโตได้ดีในบริเวณที่ชื้นและสามารถเก็บผลผลิตได้ตลอดทั้งปี โดยนิยมนำส่วนของยอดอ่อนและใบอ่อนของผักกูดมาปรุงรับประทานเป็นอาหาร นอกจากนี้การแพทย์พื้นบ้านนำมาใช้รักษาโรคต่าง ๆ ทั้งโรคเบาหวาน หอบหืด ท้องร่วง โรคไขข้ออักเสบ โรคบิด แก้ไข้ ปวดหัว บาดแผล เป็นต้น

(Semwal et al., 2021) จากการศึกษาสารพิษเคมีพบสารสำคัญในกลุ่มพอลิแซ็กคาไรด์ ฟลาโวนอยด์ เทอร์พีนอยด์ สารประกอบฟีนอลิก สเตียรอยด์ ซาโปนิน ไกลโคไซด์ แทนนิน แอลคาลอยด์ ลิวโคแอนโทไซยานิน ไฟโตสเตอรอล แอนทราควิโนน เบต้าแคโรทีน (ธเนศ ว่องอาทรกุล, 2557; Akter et al., 2014; Das et al., 2013; Tongco et al., 2014) โดยเฉพาะ สารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Akter et al., 2014) ที่เกี่ยวข้อง ในทางเครื่องสำอาง แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการใช้ประโยชน์ผักกูดในทางเครื่องสำอาง

ปัจจุบันมีการพัฒนาขั้นตอนวิธีการสกัดให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น เพื่อให้ได้สารสกัดที่มีคุณภาพ ซึ่งขั้นตอนวิธีการสกัดมีผลต่อโครงสร้างและหน้าที่ของสารสกัดที่ได้ รวมถึงฤทธิ์ทางชีวภาพ ด้วยเช่นกัน วิธีการสกัดที่ใช้มีหลากหลายวิธี หนึ่งในนั้นคือการสกัดแบบลำดับชั้น ซึ่งการสกัดแบบลำดับชั้น ทำให้สารสกัดที่ได้มีความหลากหลายและมีความบริสุทธิ์มากขึ้น จากการศึกษาของ Peasura (2015) ได้ทำการสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบลำดับชั้นในสาหร่ายไส้ไก่ (*Ulva intestinalis*) พบว่าการสกัดแบบลำดับชั้นทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้น ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะเตรียมสารสกัด ผักกูดด้วยวิธีการสกัดแบบลำดับชั้น ซึ่งยังไม่มีรายงานการศึกษาการสกัดแบบลำดับชั้นในผักกูด มาก่อน โดยผักกูดมีสารสำคัญที่น่าสนใจคือ สารประกอบฟีนอลิก และพอลิแซ็กคาไรด์ ผู้วิจัยจึงสนใจ ศึกษา โดยเตรียมสารสกัดผักกูดด้วยวิธีการสกัดแบบลำดับชั้น เพื่อประเมินปริมาณฟีนอลิก และ พอลิแซ็กคาไรด์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ยังไม่มีรายงานการศึกษา มาก่อน เพื่อนำข้อมูลจากการศึกษาไปประยุกต์ใช้ในทางเครื่องสำอางต่อไป

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1 เพื่อเตรียมสารสกัดหยาบฟีนอลิก และสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากผักกูด ด้วยวิธีการสกัดแบบลำดับชั้น
- 1.2.2 เพื่อประเมินปริมาณฟีนอลิก และพอลิแซ็กคาไรด์ของสารสกัดที่เตรียมได้จากผักกูด
- 1.2.3 เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ได้จากสารสกัด จากผักกูด

### 1.3 ขอบเขตของการศึกษา

1.3.1 นำตัวอย่างผักกูดจากอำเภอน้ำหนาว จังหวัดชลบุรี โดยเลือกส่วนก้านอ่อนและใบอ่อน (บริเวณที่มีสารเมือก) หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร จากนั้นอบให้แห้ง แล้วบดให้เป็นผงละเอียด

1.3.2 ทำการสกัดสารประกอบฟีนอลิกและพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธีการสกัดแบบลำดับขั้น โดยใช้ตัวทำละลาย 5 ชนิด คือ อะซิโตน, เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95, น้ำ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส, กรด (0.1 N HCl) หรือ ด่าง (0.1 N NaOH) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส

1.3.3 วิเคราะห์หาสารองค์ประกอบของสารสกัด

1.3.4 ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้สารสกัดหยาบฟีนอลิก และสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากผักกูด ที่เตรียมจากการสกัดแบบลำดับขั้น

1.4.2 ได้สารสกัดหยาบฟีนอลิก และสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในทางเครื่องสำอาง

## บทที่ 2

### ทบทวนวรรณกรรม

#### 2.1 ผักกูด

##### 2.1.1 ข้อมูลทั่วไป

ผักกูด มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Diplazium esculentum* (Retz.) Sw. เป็นพืชตระกูลเฟิน จัดอยู่ในวงศ์ Athyriaceae กระจายพันธุ์ในเขตร้อนชื้นและพบได้ทั่วไปใน อินเดีย จีน กัมพูชา ลาว เวียดนาม มาเลเซีย และไทย ผักกูดจะขึ้นอย่างหนาแน่นบริเวณที่ลุ่มชุ่มน้ำ หนองบึง ริมห้วย ชายลำคลอง และเจริญเติบโตได้ดีบริเวณที่มีความชุ่มชื้นสูง มีแสงแดดส่องถึง นิยมนำมาปรุงรับประทานเป็นอาหาร โดยนำส่วนใบอ่อนและยอดอ่อน ดังภาพที่ 2.1 ที่ปลายใบมีลักษณะม้วนงอ (ลักษณะเด่นของพืชตระกูลเฟิน) ซึ่งส่วนนี้จะพัฒนาไปเป็นใบอ่อนและใบแก่



(ก) ใบผักกูด

(ข) ยอดผักกูด

ที่มา Roy and Chaudhuri (2020)

ภาพที่ 2.1 ลักษณะทางกายภาพของใบและยอดผักกูด

### 2.1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ สรรพคุณและการนำไปใช้ประโยชน์

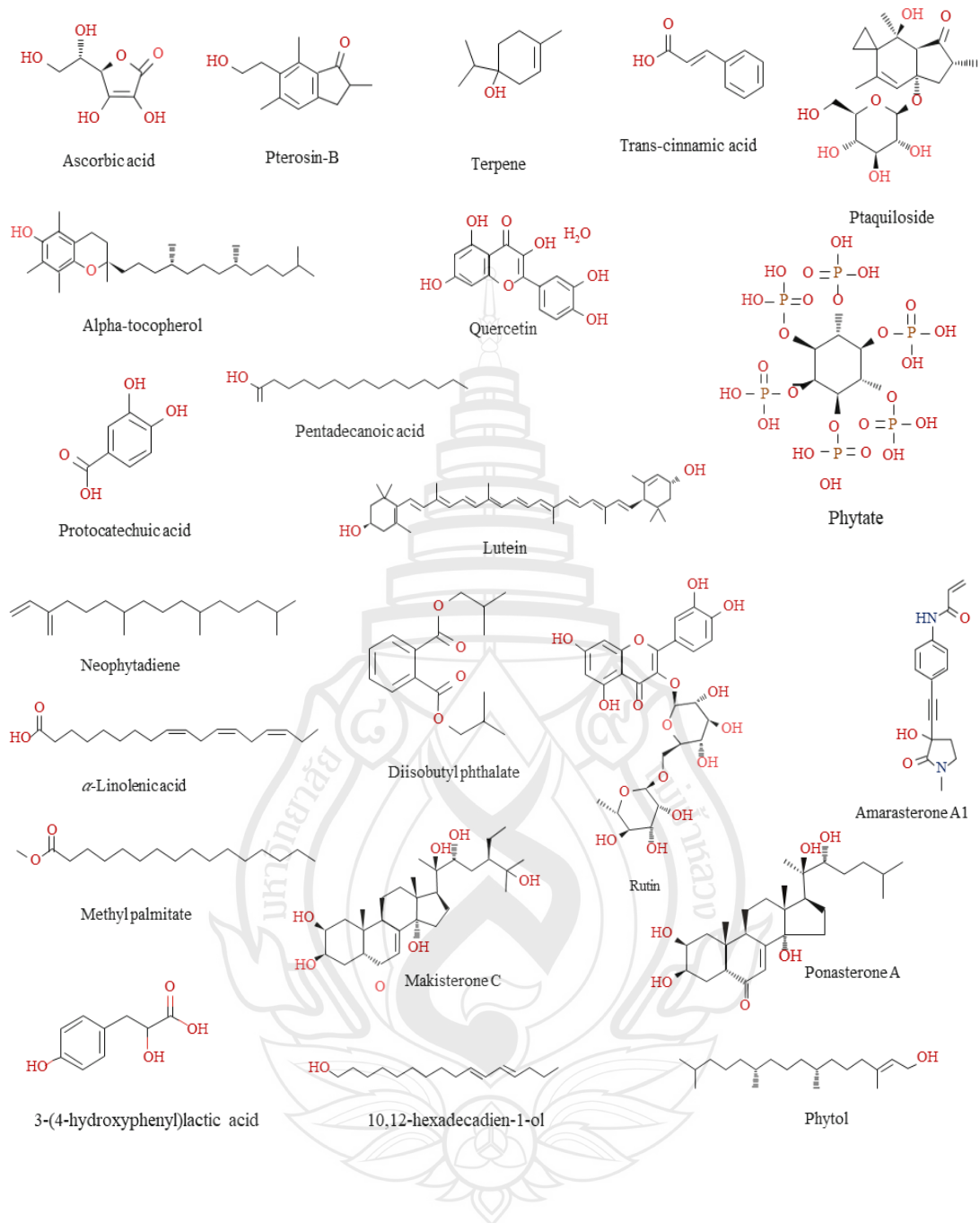
ผักกูดเป็นพืชที่มีเหง้าตั้งตรง (erect rhizome) เป็นลำต้นมีการเจริญเติบโตในแนวตั้ง มีรากและใบเจริญรอบ ๆ โดยแผ่เป็นรัศมี ซึ่งเหง้าปกคลุมไปด้วยเกล็ด (scale) เกล็ดมีลักษณะเป็นแผ่นยาวประมาณ 1 เซนติเมตร สีน้ำตาลเข้ม ขอบเกล็ดหยักซี่ฟัน ก้านใบตรงโคนมีสีดำและมีเกล็ดปกคลุมส่วนปลายสีอ่อน ใบประกอบแบบขนนกสองชั้น ใบมีสีเขียวอ่อนเมื่อแก่จะมีสีเขียวเข้ม ใบย่อยคู่ล่างจะเล็กกว่าใบย่อยที่อยู่ช่วงกลาง เนื้อใบคล้ายกระดาษ (papyraceous) กลุ่มอับสปอร์เรียงตามเส้นใบขยายพันธุ์ด้วยเหง้าและสปอร์ การเรียงตัวของใบอ่อนก่อนคลี่ จะม้วนหดจากปลายใบเข้าหาโคนใบ มีลักษณะคล้ายกันหอย และเจริญเติบโตได้ดีในช่วงฤดูฝน

ผักกูดมีรสจืดอมหวานและกรอบ นิยมนำมาปรุงเป็นอาหารได้หลากหลาย เช่น ยำผักกูด ผักกูดผัดน้ำมันหอย ต้มจืดผักกูดหมูสับ เป็นต้น นอกจากนี้ยังนำมาลวกแล้วราดด้วยน้ำกะทิรับประทานร่วมกับน้ำพริก แต่ไม่นิยมนำมารับประทานแบบดิบ เนื่องจากมีสารเมือกอยู่ที่ก้านอ่อนและยอดอ่อนของผักกูด

สรรพคุณของผักกูด ทางการแพทย์พื้นบ้าน (ethnomedicine) นำมาใช้รักษาโรคต่าง ๆ ทั้งโรคเบาหวาน หอบหืด ท้องร่วง โรคไขข้ออักเสบ โรคบิด แก้ไข้ ปวดหัว ความดันโลหิตสูง บาดแผล เป็นต้น (Semwal et al., 2021) นอกจากนี้ยังใช้เป็นสารไล่แมลงและศัตรูพืช ทดแทนการใช้สารเคมี (Zihad et al., 2019) ผักกูดมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านเชื้อแบคทีเรีย สารต้านการอักเสบ (Amit et al., 2011; Choudhury et al., 2017; Semwal et al., 2021)

### 2.1.3 สารองค์ประกอบสำคัญในผักกูด

จากการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของผักกูด (100 กรัม) ประกอบด้วย ความชื้น ไขมัน ไฟเบอร์ เถ้า โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และวิตามินซี (สุวรรณ บัญดา และคณะ, 2563) นอกจากนี้ยังพบแร่ธาตุต่าง ๆ ได้แก่ แคลเซียม ทองแดง เหล็ก ไอโอดีน แมกนีเซียม แมงกานีส โมลิบดีนัม โซเดียม สังกะสี (Chettri et al., 2018) การศึกษาสารพฤกษเคมี (phytochemical) ของผักกูดพบสารสำคัญในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน แทนนิน เทอร์พีนอยด์ แอลคาลอยด์ ไกลโคไซด์ สเตียรอยด์ ลิวโคแอนโทไซยานิน ไฟโตสเตอรอล แอนทราควิโนน (Akter et al., 2014; Das et al., 2013; Tongco et al., 2014) และยังพบเบต้าแคโรทีน ซึ่งเป็นสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ (ธเนศวร อารทกุล, 2557) มีรายงานในส่วนของก้านอ่อนและยอดอ่อนพบสารสำคัญเพิ่มเติมในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ (2R)-3-(4'-hydroxyphenyl) lactic acid, trans-cinnamic acid, protocatechuic acid, rutin และสารกลุ่ม ecdysteroids คือ amarasterone A1, makisterone C, ponasterone A (Watanabe et al., 2021) ดังภาพที่ 2.2



ที่มา Semwal et al. (2021)

ภาพที่ 2.2 สารสำคัญที่พบในผักกูด

Kunkeaw et al. (2021) และ Sirichai et al. (2022) ได้ศึกษาผักกูดโดยทดสอบ phenolic profile พบว่าผักกูดมีสารสำคัญในกลุ่มโพลีฟีนอล ได้แก่ quercetin, kaempferol, luteolin, rutin, และ rosmarinic acid นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดที่ได้มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับโรคอ้วน (ไลเปส), โดยเฉพาะอย่างยิ่งการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับโรคเบาหวาน (แอลฟา-กลูโคซิเดส และแอลฟา-อะไมเลส) ที่มีค่าการยับยั้งในปริมาณที่สูง

ในผักกูดยังพบสารเมือก ซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์จากเมือกพืชที่สามารถสกัดได้จากบริเวณก้านอ่อนและใบอ่อนของผักกูด จากการศึกษาของ Hayati et al. (2019) ที่ทำการสกัดสารเมือกจากผักกูดโดยใช้น้ำ ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส, กรด (1 M citric acid) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และด่าง (1 M NaOH) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส แล้วทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากการทดสอบด้วยวิธี DPPH พบว่าสารเมือกที่สกัดด้วยน้ำแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด นอกจากนี้สารเมือกที่สกัดด้วยน้ำยังแสดงคุณสมบัติในการละลายที่ดี (เมื่อเทียบกับ gum arabic) เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ซึ่งความสามารถในการละลายของพอลิแซ็กคาไรด์เกิดจากการสลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างสายพอลิแซ็กคาไรด์ นอกจากนี้ยังแสดงคุณสมบัติ thixotropic รวมถึงความสามารถในการเป็นสารให้ความคงตัว ที่ช่วยรักษาความคงตัวของระบบอิมัลชัน โดยพบว่า *D. esculentum* ให้ความคงตัวของอิมัลชันสูงสุด (68%) ที่ความเข้มข้นสูงสุด 0.5% ซึ่งไม่มีชั้นน้ำมันปรากฏในอิมัลชันที่ความเข้มข้นดังกล่าว

นอกจากนี้พอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดจาก *Athyrium multidentatum* (Doll.) Ching. ซึ่งเป็นพืชในตระกูลเดียวกัน และวงศ์เดียวกันกับผักกูด คือ Athyriaceae พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. multidentatum* มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และชะลอการชราของเซลล์ โดยพอลิแซ็กคาไรด์ของ *A. multidentatum* ส่วนใหญ่ประกอบด้วย น้ำตาลแมนโนส (mannose) น้ำตาลแรมโนส (rhamnose) น้ำตาลกลูโคส (glucose) น้ำตาลกรดกลูคูโรนิก (glucuronic acid) น้ำตาลอะราบินโนส (arabinose) น้ำตาลฟิวโคส (fucose) และน้ำตาลกาแล็กโทส (galactose) และมีน้ำหนักโมเลกุล (Mw) เท่ากับ 33,203 ดัลตัน จากการศึกษาพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ของ *A. multidentatum* สามารถลด oxidative stress ที่เกิดจากดี-กาแลคโทส เป็นที่ทราบโดยทั่วไปว่า ดี-กาแลคโทส ที่มากเกินไปอาจก่อให้เกิดการก่อตัวของอนุมูลอิสระ หรือ ROS ที่นำไปสู่กระบวนการชราของเซลล์ (Jing et al., 2019)

### 2.1.4 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

รักษาโรคเบาหวาน ซึ่งโรคเบาหวานคือ กลุ่มโรคทางการเผาผลาญพลังงานซึ่งเป็นผลมาจากความผิดปกติของตับอ่อนในการหลั่งอินซูลิน หรือออกฤทธิ์ของอินซูลิน หรือทั้งสองอย่าง ทำให้การเผาผลาญคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีนผิดปกติ ส่งผลให้ระดับน้ำตาลในเลือดสูงขึ้น (hyperglycemia) การยับยั้งเอนไซม์ แอลฟา-กลูโคซิเดส และแอลฟา-อะไมเลส ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยคาร์โบไฮเดรต สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญ จึงเป็นกลยุทธ์ที่สำคัญในการจัดการระดับน้ำตาลในเลือดในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 โดยเบาหวานชนิดที่ 2 เกิดจากการรับประทานอาหารที่มีแป้งและน้ำตาลมากเกินไปและขาดการออกกำลังกาย ซึ่งในคนอ้วนจะมีเซลล์ไขมันจำนวนมาก เซลล์ไขมันจะปล่อยสารต่าง ๆ เช่น กรดไขมันออกมาทำให้ร่างกายดื้อต่ออินซูลิน ทำให้อินซูลินไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ ซึ่งฤทธิ์ยับยั้งแอลฟา-กลูโคซิเดส และแอลฟา-อะไมเลสของ *D. esculentum* จากการศึกษาของ Tabiano and Deliman (2014) พบว่าสารสกัด *D. esculentum* มีฤทธิ์ยับยั้ง แอลฟา-อะไมเลส สูงสุด (92.09%) และแอลฟา-กลูโคซิเดส (70.01%) นอกจากนี้การศึกษาของปนัดดา ทินบุตร (2554) ได้ศึกษาการสกัดและฤทธิ์ยับยั้งแอลฟา-กลูโคซิเดสในพืชตระกูลเฟินคือ กระแตไต่ไม้ ผักกูด และผักแว่น ซึ่งสารยับยั้งแอลฟา-กลูโคซิเดส สามารถนำไปรักษาโรคเบาหวานชนิดไม่พึ่งพาอินซูลิน จากการทดสอบพบว่าเฟินทั้ง 3 ชนิด มีความสามารถยับยั้งแอลฟา-กลูโคซิเดสได้ดี

## 2.2 การสกัดสารสำคัญจากพืช

การเตรียมสารสกัดส่วนใหญ่ประกอบด้วย การสกัด การทำให้บริสุทธิ์ และการดึงน้ำออกจากสารสกัด ซึ่งวิธีการหรือสภาวะที่ใช้ในสามขั้นตอนนี้มีผลต่อโครงสร้างและหน้าที่ของสารสกัดที่ได้ อย่างมีนัยสำคัญ (Yi et al., 2020) การเตรียมสารสกัดส่วนใหญ่เน้นที่ขั้นตอนการสกัด ซึ่งมีการพัฒนาเป็น สิ่งแรกและสำคัญที่สุดสำหรับประสิทธิภาพของสารสกัด ซึ่งผลจากการสกัดด้วยวิธีต่าง ๆ จะมีผลต่อโครงสร้างและหน้าที่ของสารสกัดที่ได้ การสกัดโดยใช้ตัวทำละลายมีหลักการคือ ตัวทำละลายสัมผัสกับเนื้อเยื่อพืช เกิดการแทรกซึมของตัวทำละลาย แล้วเกิดการละลายของสาร แพร่ไปสู่ตัวทำละลาย ซึ่งตัวทำละลายที่ใช้จะต้องมีคุณสมบัติในการละลายสารที่สนใจ โดยมีขั้วคล้ายคลึงกัน และละลายสารที่ต้องการออกมามากที่สุด ซึ่งการสกัดสารสำคัญจากพืชที่ใช้นี้มีหลากหลายวิธี

### 2.2.1 การสกัดแบบแช่หมัก (Maceration)

การสกัดสารจากพืชนิยมใช้การสกัดแบบแช่หมักมากที่สุด เนื่องจากเครื่องมือที่ใช้และขั้นตอนในการสกัดไม่ซับซ้อน โดยเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมกับสารสำคัญที่สนใจ ตัวทำละลายที่นิยมใช้ในการสกัด คือ เฮกเซน (hexane) เอทิลอะซิเตท (ethylacetate) อะซิโตน (acetone) เมทานอล (methanol) และเอทานอล (ethanol) เป็นต้น โดยหมักพืชกับตัวทำละลายในภาชนะปิด สารสำคัญที่สนใจถูกสกัดและละลายออกมาในตัวทำละลาย ความเข้มข้นของสารสกัดมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด การสกัดจะใช้เวลาแตกต่างกันไป อาจใช้เวลาในการสกัดประมาณ 3-7 วัน วิธีการสกัดแบบแช่หมักจะสกัดที่อุณหภูมิห้อง ใช้อัตราส่วนของพืชตัวอย่างกับตัวทำละลาย (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน ตั้งแต่ 1 : 4 ไปจนถึง 1 : 20

### 2.2.2 การสกัดด้วยการย่อย (Hydrolysis)

เนื่องจากองค์ประกอบในโครงสร้างของผนังเซลล์พืช (cell wall component) มีสารองค์ประกอบหลายชนิด เช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน เพกทิน โปรตีน สารประกอบฟีนอลิก และแร่ธาตุต่าง ๆ เป็นต้น ซึ่งอยู่ในรูปไม่ละลาย ดังนั้นเมื่อทำการย่อยสารองค์ประกอบเหล่านี้ จะเกิดการย่อยคือ การย่อยเซลลูโลสจะได้น้ำตาลกลูโคสออกมา การย่อยเฮมิเซลลูโลสซึ่งมีทั้งน้ำตาลเฮกโซส และเพนโทส จะได้น้ำตาลไซโลส อะราบิโนส แมนโนส กาแล็กโทส กลูโคส และกรดกลูโคโรนิก ขึ้นกับชนิดของพืช การย่อยจะทำให้มีสายสั้นลงหรือกลายเป็นน้ำตาล เกิดการละลายของสารองค์ประกอบออกมา โดยทั่วไปการย่อยมี 2 วิธี คือ การย่อยด้วยกรด-ด่าง และการย่อยด้วยเอนไซม์

#### 2.2.2.1 การย่อยด้วยกรด-ด่าง (acid-alkaline hydrolysis)

การย่อยด้วยกรด ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งในการย่อยเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส ซึ่งเซลลูโลสเป็นเส้นใยชนิดไม่ละลายน้ำ ไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่น ไม่ละลายในด่าง และตัวทำละลายส่วนใหญ่ เซลลูโลสไม่ละลายน้ำ แต่สามารถดูดซับน้ำไว้ที่บริเวณผิวจึงเกิดการพองตัว ซึ่งความสามารถในการพองตัวทั้งในน้ำและสารละลายแตกต่างกัน โดยเรียงลำดับจากความสามารถในการพองตัวของเซลลูโลสในสารละลายจากน้อยไปมาก คือ ตัวทำละลายอินทรีย์ < น้ำ < เกลือ < กรด < ด่าง สามารถย่อยสลายเซลลูโลสโดยกรดและเอนไซม์ โดยกรดจะย่อยสลายหรือทำลายพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่อยู่ผนังเซลล์ ทำให้ตัดสายพอลิแซ็กคาไรด์ให้สั้นลงหรือเป็นน้ำตาลละลายออกจากผนังเซลล์ แต่ในขณะเดียวกันในสภาวะ pH ที่ต่ำ สารประกอบฟีนอลิกไม่เสถียร จึงสามารถถูกทำลายและย่อยสลาย (hydrolyze) ได้ในระหว่างกระบวนการสกัด (Shahidi & Yeo, 2016) ส่งผลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกลดลง

การย่อยด้วยต่าง เหมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบในโครงสร้างของผนังเซลล์พืช โดยรวมตัวอยู่กับลิกนินและเซลลูโลส มีสมบัติไม่ละลายน้ำ สามารถย่อยสลายเหมิเซลลูโลสได้โดยใช้กรด ต่างและเอนไซม์ โดยการย่อยด้วยต่างจะเกิดการบวมของเซลลูโลส ซึ่งทำลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างเหมิเซลลูโลสและเซลลูโลสในผนังเซลล์ เป็นผลให้เกิดการละลายของเหมิเซลลูโลสออกมาได้อย่างมีประสิทธิภาพ และการใช้สารละลายต่าง สามารถตัดพันธะไฮโดรเจน พันธะเอไมด์และพันธะไดซัลไฟด์ในโปรตีนได้ ทำให้โปรตีนละลายออกมา รวมถึงโพลิฟีนอลที่เชื่อมต่อกับพอลิแซ็กคาไรด์ก็สามารถสกัดร่วมกับพอลิแซ็กคาไรด์ได้ง่ายขึ้น

#### 2.2.2.2 การย่อยด้วยเอนไซม์ (enzymatic hydrolysis)

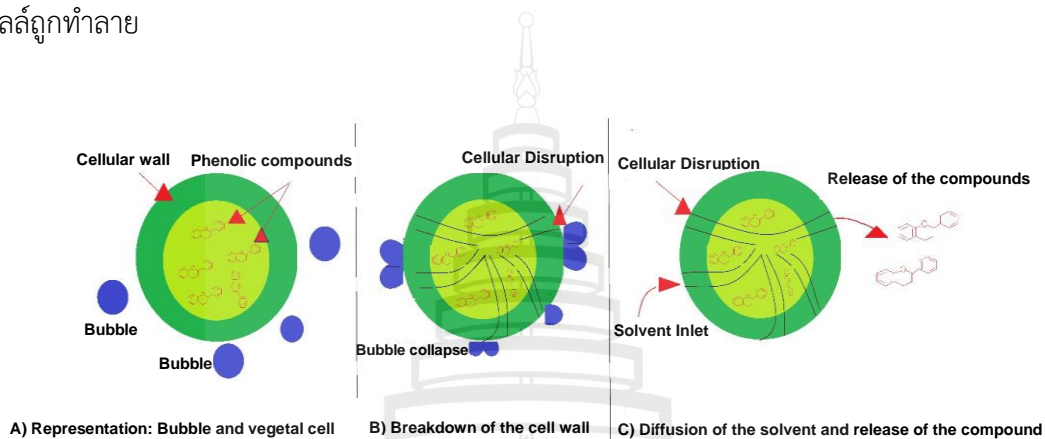
การย่อยด้วยเอนไซม์ เป็นวิธีที่มีความเฉพาะเจาะจง โดยเอนไซม์ที่ใช้จะมีคุณสมบัติในการย่อยองค์ประกอบในโครงสร้างของผนังเซลล์พืช โดยเอนไซม์ที่นิยมใช้ได้แก่ เซลลูเลส (cellulase) เหมิเซลลูเลส (hemicellulase) และเพกทิเนส (pectinase) มีผลทำให้สารสำคัญที่อยู่ในพืชถูกสกัดออกมาได้มากขึ้น โดยปัจจัยที่ส่งผลถึงประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ ได้แก่ ส่วนของพืชที่นำมาสกัด ชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ สภาพที่เหมาะสมในการสกัดและการทำงานของเอนไซม์

โดยการเลือกเอนไซม์ควรเลือกให้เหมาะสมกับส่วนของพืชที่นำมาสกัด เช่น องค์ประกอบหลักที่พบได้ในใบและเหง้า คือ เซลลูโลส จึงเลือกใช้เอนไซม์เซลลูเลส เพราะเซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการตัดพันธะ เบต้า-1-4-ดี-ไกลโคซิดิก ที่พบในเซลลูโลส จึงนิยมนำมาช่วยในการสกัดสารที่ได้จากใบและเหง้าของพืช และองค์ประกอบหลักที่พบได้ในผล คือ เพกทิน จึงเลือกใช้เอนไซม์เพกทิเนส เพราะเพกทิเนสเป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการตัดพันธะ แอลฟา-1-4-ดี-กาแล็กโทโรนิกแอซิด ที่พบอยู่ในเพกทิน จึงนิยมนำมาช่วยในการสกัดสารที่ได้จากผล เป็นต้น นอกจากนี้ความเข้มข้นของเอนไซม์ ค่าความเป็นกรดต่าง เวลา และอุณหภูมิ ก็ล้วนส่งผลต่อประสิทธิภาพการสกัดและการทำงานของเอนไซม์ด้วยเช่นกัน

#### 2.2.3 การสกัดด้วยคลื่นอัลตราโซนิค (Ultrasound-assisted Extraction)

เป็นวิธีการสกัดที่ใช้คลื่นเสียงความถี่สูงหรืออัลตราโซนิคร่วมกับตัวทำละลาย (ตัวทำละลายอินทรีย์หรือน้ำ) ในการสกัดสาร โดยเครื่องจะปล่อยคลื่นเสียงความถี่สูงออกมาในตัวพา ซึ่งในที่นี้คือตัวทำละลาย กระบวนการดังกล่าวทำให้เกิดฟองก๊าซในของเหลว (cavitation) แล้วฟองค่อย ๆ ขยายตัวและแตกออกใกล้กับพืชและก่อให้เกิดแรงของของเหลวแทรกซึมเข้าไปในพื้นผิวของพืช ทำให้เกิดการสกัดและการอิมตัวของของเหลวในของแข็ง เนื่องจากเนื้อเยื่อของพืชประกอบเป็นเซลล์ที่มีส่วนผนังเซลล์อยู่ชั้นนอกสุด ซึ่งจะเป็นตัวต้านทานการสกัด การสกัดจะประกอบด้วยสองขั้นตอนคือ กระบวนการแพร่ผ่านผนังเซลล์ของตัวทำละลายและการชะสารสำคัญออกจากเซลล์เมื่อผนังเซลล์ถูกทำลายลง ดังภาพที่ 2.3 ซึ่งการเกิดฟองในของเหลว คลื่นจะประกอบด้วยช่วงอัดและช่วงขยาย

ในช่วงขยายเมื่อคลื่นเคลื่อนที่ผ่านตัวทำละลายจะเกิดฟองของตัวทำละลายขนาดเล็กจำนวนมากและเมื่อรับแรงจากคลื่นในช่วงอัดจะทำให้ฟองแตกออกและเกิดพลังงาน จนสามารถทำลายผนังเซลล์ของพืชได้ เมื่อผนังเซลล์ของพืชแตกจะทำให้เพิ่มอัตราการถ่ายเทมวลได้ดียิ่งขึ้น จะพบว่าเกิดการกระจายตัวของตัวทำละลายในพืช ซึ่งสามารถไหลผ่านเนื้อเยื่อของผนังเซลล์ ผลคือสามารถช่วยการสกัดโดยจะทำให้ลดเวลาการสกัดให้สั้นลง แรงกระบวนกรสกัดของสารที่มีโมเลกุลต่ำเนื่องมาจากการที่ผนังเซลล์ถูกทำลาย

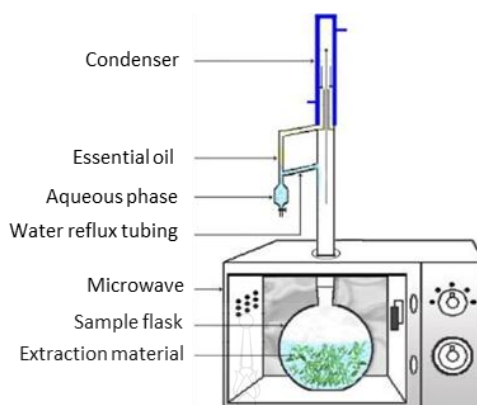


ที่มา Medina-Torres et al. (2017)

### ภาพที่ 2.3 กลไกการสกัดด้วยคลื่นอัลตราโซนิก

#### 2.2.4 การสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟ (Microwave-assisted Extraction)

หลักการของวิธีนี้ คือ การใช้คลื่นไมโครเวฟซึ่งเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์ ในการสกัดสารสำคัญ เมื่อวัตถุดิบวางตัวอยู่ในสนามแม่เหล็กไฟฟ้า ด้วยคุณสมบัติความเป็นขั้วของโมเลกุลภายในวัตถุดิบทำให้เกิดความร้อนขึ้น ความร้อนที่เกิดขึ้นส่งผลต่อเนื้อเยื่อของวัตถุ และมีผลต่อการละลายของสารสำคัญ กระบวนการนี้จะเป็นวิธีเพิ่มปริมาณสารที่สกัดได้ (yield) และลดเวลาในการสกัดเมื่อเปรียบเทียบการสกัดในแบบอื่น ในการสกัดสารนั้นสารละลายที่ใช้ในการสกัดจะมีผลต่อประสิทธิภาพของการสกัดโดยใช้คลื่นไมโครเวฟ ด้วยความสามารถในการละลายของสารประกอบที่ถูกสกัดในสารละลายจะเกิดการถ่ายเทมวลด้วยพลังงานจลน์และเกิดอันตรกิริยา (interaction) ในสารละลาย เครื่องมือสำหรับการสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟ ดังแสดงดังภาพที่ 2.4



ที่มา Gomez et al. (2020)

ภาพที่ 2.4 เครื่องมือสำหรับการสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟ

### 2.2.5 การสกัดแบบลำดับขั้น (Sequential Extraction)

การสกัดแบบลำดับขั้นคือ การนำตัวอย่างพืชมาสกัดแบบลำดับ ตามคุณสมบัติของกลุ่มสารที่สนใจ การสกัดด้วยวิธีแบบลำดับขั้นจะทำให้ได้สารสกัดที่หลากหลาย โดยใช้ตัวอย่างแค่ตัวอย่างเดียว ซึ่งอาศัยหลักการคือ

#### 2.2.5.1 การสกัดสารตามกลุ่มประเภท

สารแต่ละกลุ่ม แต่ละประเภท จะมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน ทำให้มีวิธีการสกัดที่ต่างกันไปตามคุณสมบัติของสารกลุ่มนั้น ๆ เช่น สารในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก กลุ่มพอลิแซ็กคาไรด์ จะมีขั้นตอนและวิธีการสกัดที่ต่างกันไป

#### 2.2.5.2 การสกัดโดยการเพิ่มความเข้มข้นของตัวทำละลาย

สารสำคัญในพืชมีหลากหลายชนิด การใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วใกล้เคียงกัน จะสามารถสกัดสารที่มีความเข้มข้นใกล้เคียงกันออกมาได้ ดังนั้นการเลือกตัวทำละลายโดยเริ่มจากตัวทำละลายที่ค่าความขั้วต่ำไปถึงขั้วสูง ทำให้ได้สารสกัดที่มีความหลากหลายและมีความเฉพาะเจาะจงมากขึ้น

#### 2.2.5.3 การสกัดโดยอาศัยคุณสมบัติการย่อยของตัวทำละลาย

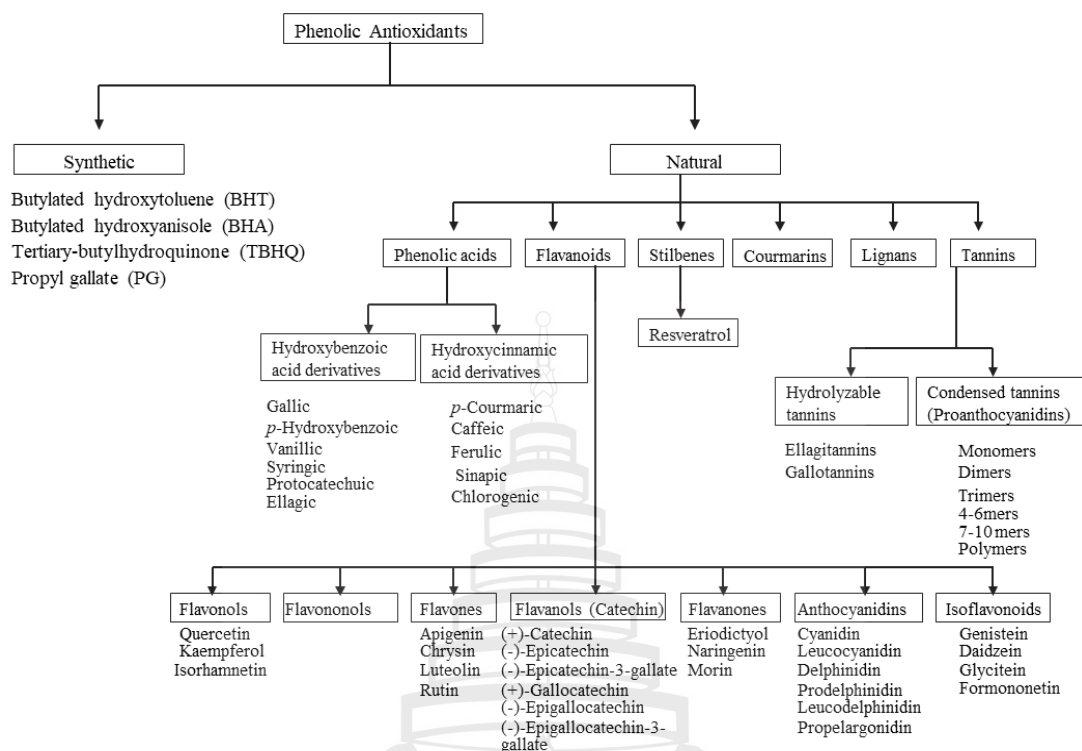
เป็นเทคนิคการย่อย (hydrolysis) โดยใช้ตัวทำละลายกรดหรือด่าง เนื่องจากองค์ประกอบในโครงสร้างของผนังเซลล์พืช มีสารองค์ประกอบหลายชนิด เช่น เซลลูโลส เพกทิน เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน โปรตีน สารประกอบฟีนอลิก แร่ธาตุต่าง ๆ เป็นต้น ซึ่งอยู่ในรูปไม่ละลาย การย่อยจะทำให้มีสายสั้นลงหรือกลายเป็นน้ำตาล เกิดการละลายออกมา สารสกัดที่ได้จะมีโครงสร้างที่ต่างกันไปและฤทธิ์ทางชีวภาพก็แตกต่างกัน

## 2.3 สารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่พบได้ในพืช ผัก และผลไม้ทั่วไป มีสูตรโครงสร้างทางเคมีประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติกจับกับหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อยหนึ่งหมู่หรือมากกว่านั้น สารประกอบฟีนอลิกเหล่านี้เป็นสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่พืชผลิตขึ้น (วรรณิตา ชัยญาณะ, 2561) เนื่องจากโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกมีหมู่ไฮดรอกซิลจึงทำให้สามารถละลายน้ำได้ โดยจะรวมอยู่ในโมเลกุลของน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ สารประกอบฟีนอลิกที่พบในธรรมชาติมีหลากหลายชนิด มีโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน ซึ่งกลุ่มใหญ่ที่สุดที่พบคือ กลุ่มฟลาโวนอยด์ นอกจากนี้ยังมีสารประกอบต่าง ๆ เช่น simple monocyclic phenol, phenyl propanoid, phenolic quinine และ polyphenolic ได้แก่ พวงกลินิน แทนนิน เป็นต้น รวมทั้งยังพบว่ามีการประกอบที่มีกลุ่มฟีนอล (phenolic unit) รวมอยู่ในโมเลกุลของโปรตีน อัลคาลอยด์ และเทอร์ปีนอยด์ เป็นต้น

สารประกอบฟีนอลิกสามารถแบ่งเป็นสารที่ได้จากสังเคราะห์และสารจากธรรมชาติ โดยสารประกอบฟีนอลิกจากการสังเคราะห์ ได้แก่ butylated hydroxyanisole (BHA), tertiary-butylhydroquinone (TBHQ), propyl gallate และ butylated hydroxytoluene (BHT) นอกจากนี้ octyl gallate (OG) และ dodecyl gallate (DG) ก็ยังเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยเช่นกัน (Makahleh et al., 2015)

สารประกอบฟีนอลิกจากธรรมชาติ ปัจจุบันได้มีการศึกษาค้นคว้ากันอย่างกว้างขวางเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพในสารกลุ่มนี้ โดยสารประกอบฟีนอลิกในพืชพบได้ทุกส่วน ได้แก่ ผล เมล็ด ใบ ราก เปลือก เป็นต้น สารประกอบฟีนอลิกสามารถจำแนกออกเป็นหลายกลุ่ม เช่น กรดฟีนอลิก สติลบิน ฟลาโวนอยด์ คูมาริน ลิกแนน และแทนนิน ดังภาพที่ 2.5 สารประกอบฟีนอลิกทำหน้าที่เป็นตัวจับไล่อนุมูลอิสระที่สำคัญคือ อนุมูล peroxy โดยมีกลไก 2 แบบ คือเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นต่ำเมื่อเทียบกับสารออกซิไดซ์ สารประกอบฟีนอลิกจะป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน นอกจากนี้อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาจะถูกทำให้เป็นสารที่มีความเสถียร ดังนั้นจึงสามารถป้องกันการเกิดขึ้นตอนพลอพาเกินได้ นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิกบางชนิดยังทำหน้าที่เป็นสารคีเลต ดักจับไอออนของโลหะเข้าไว้ในโมเลกุล เช่น เคอร์ซีทิน สารประกอบฟีนอลิกยังทำหน้าที่ทั้งเป็นสารให้อิเล็กตรอน หรือเป็นตัวให้อิโตรเจน และกำจัดออกซิเจนที่อยู่ในรูปแอกทีฟ ด้วยหน้าที่ต่าง ๆ ดังกล่าวจึงทำให้สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารต้านออกซิเดชันที่สำคัญชนิดหนึ่งในพืชทั่วไป โดยสารประกอบฟีนอลิกหลายชนิดมีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน เช่น ฟลาโวนอยด์ และกรดฟีนอลิก เป็นต้น



ที่มา Shahidi and Ambigaipalan (2015)

ภาพที่ 2.5 การจำแนกประเภทของสารประกอบฟีนอลิก

### 2.3.1 กรดฟีนอลิก (Phenolic Acid)

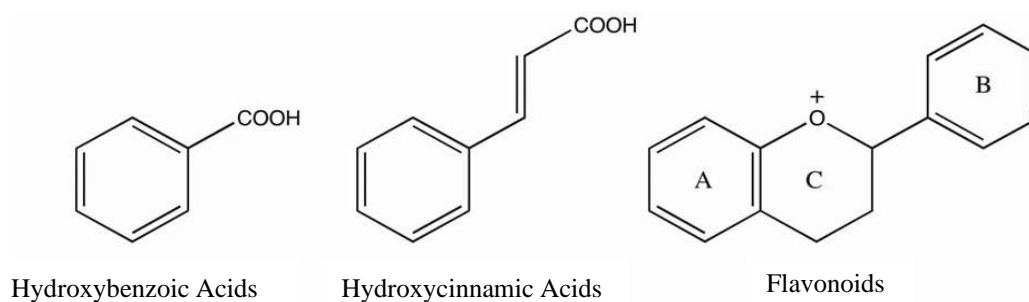
เป็นกลุ่มหนึ่งที่ถูกสร้างโดยพืช ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

#### 2.3.1.1 กรดไฮดรอกซีซินนามิก (hydroxycinnamic acids)

มีโครงสร้างโดยทั่วไป  $C_6-C_3$  ดังภาพที่ 2.6 เป็น phenolic acid กลุ่มใหญ่ที่สุดที่พบทั่วไปในพืช ได้แก่ *p*-coumaric, ferulic, sinapic, caffeic และ chlorogenic acid

#### 2.3.1.2 กรดไฮดรอกซีเบนโซอิก (hydroxybenzoic acids)

มีโครงสร้างโดยทั่วไป  $C_6-C_1$  ดังภาพที่ 2.6 ได้แก่ gallic, *p*-hydroxybenzoic, vanillic, syringic, protocatechuic และ ellagic acid



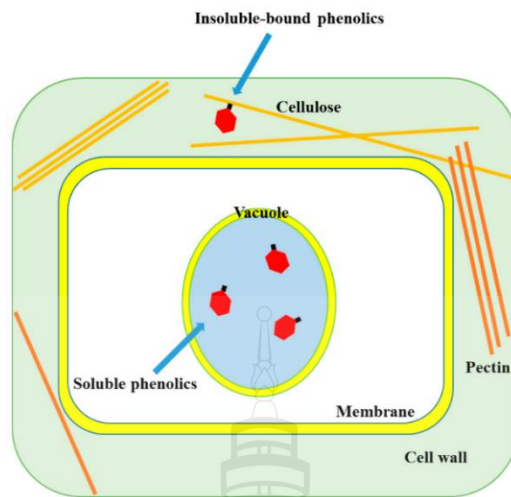
ที่มา Khoddami et al. (2013)

ภาพที่ 2.6 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟีนอลิกกลุ่มกรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์

### 2.3.2 ฟลาโวนอยด์ (Flavonoid)

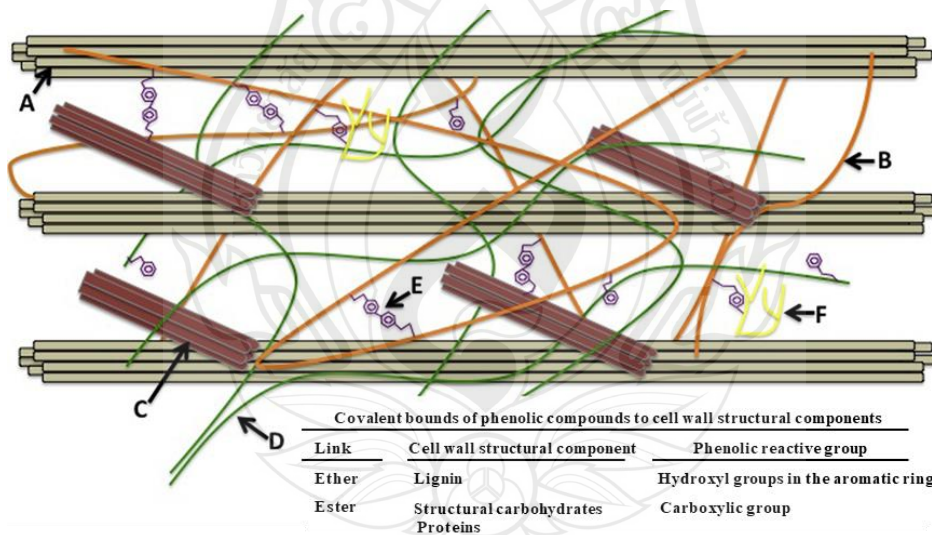
ฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบฟีนอลิกที่พบมากที่สุด พบได้ในผัก ผลไม้ ธัญพืช เปลือก ราก ลำต้น ดอก ชา และไวน์ (Abotaleb et al., 2018; Panche et al., 2016) โดยในธรรมชาติจะพบฟลาโวนอยด์มากกว่า 4,000 ชนิด จัดเรียงตัวเป็นวงแหวน 3 วง (A, B และ C) ดังภาพที่ 2.6 โครงสร้าง  $C_6-C_3-C_6$  โดยวงแหวน A และ B คือ phenyl ring ส่วน วงแหวน C คือไพแรน หรือไพโรน C การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่วงแหวน C ทำให้มีการแยกฟลาโวนอยด์ออกเป็นกลุ่ม ๆ และการเกิดปฏิกิริยา hydroxylation ที่วงแหวน A และ B ทำให้เกิดอนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์ชนิดนั้น ๆ ส่วนใหญ่อยู่ในรูปไกลโคไซด์ ซึ่งหมู่ไฮดรอกซิลหนึ่งหมู่หรือมากกว่าในโมเลกุลจับอยู่กับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส แรมโนส อะราบิโนส และไซโลส (ลือชัย บุตุคุป, 2554) สามารถแยกฟลาโวนอยด์ออกเป็น 7 กลุ่ม คือ ฟลาโวนอล ฟลาโวน ฟลาวาโนน ฟลาวานอล ฟลาวาโนนอล ไอโซฟลาโวน และแอนโธไซยานิดิน

สารประกอบฟีนอลิกมี 2 รูปแบบ คือ ฟีนอลิกอิสระ (free phenolic) และฟีนอลิกยึดเหนี่ยว (bound phenolic) ซึ่งเป็นฟีนอลิกที่เชื่อมต่อกับองค์ประกอบของผนังเซลล์ เช่น เซลลูโลส เพกทิน เฮมิเซลลูโลส (เช่น อะราบิโนไซแลน) โปรตีน เป็นต้น ดังภาพที่ 2.7 โดยเชื่อมต่อด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent bounds) (Acosta-Estrada et al., 2014) ดังภาพที่ 2.8 ฟีนอลิกที่ผนังเซลล์ 2 กลุ่มหลักคือ ลิกนิน และกรดไฮดรอกซีซินนามิก สารประกอบเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในผนังเซลล์ในการเจริญเติบโตของพืช ช่วยป้องกันการติดเชื้อ บาดแผล และรังสียูวี และพบว่าฟีนอลิกยึดเหนี่ยวมีปริมาณค่อนข้างมาก (20-60% ในผัก ผลไม้ เมล็ดธัญพืช) เมื่อเทียบกับฟีนอลิกอิสระ



ที่มา Shahidi and Yeo (2016)

ภาพที่ 2.7 สารประกอบฟีนอลิกในเซลล์พืช



(A) Cellulose. (B) Hemicellulose. (C) Structural proteins. (D) Pectin. (E) Phenolic acids. (F) Lignin.

ที่มา Acosta-Estrada et al. (2014)

ภาพที่ 2.8 การเชื่อมต่อระหว่างกรดฟีนอลิกกับส่วนประกอบโครงสร้างผนังเซลล์

## 2.4 พอลิแซ็กคาไรด์

พอลิแซ็กคาไรด์ในธรรมชาติมีหลายชนิดและมีโครงสร้างที่แตกต่างกัน พอลิแซ็กคาไรด์ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) เป็นหน่วยย่อยเชื่อมต่อกันตั้งแต่ 10 โมเลกุลขึ้นไปด้วยพันธะไกลโคซิดิก จนเป็นโครงสร้างที่มีโมเลกุลใหญ่ขึ้นและกลายเป็นพอลิแซ็กคาไรด์หรือเรียกอีกชื่อว่า ไกลแคน (glycan) ซึ่งมีความซับซ้อนและหลากหลาย เพราะพอลิแซ็กคาไรด์บางชนิดอาจมีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเป็นหน่วยย่อยหลายชนิด และบางชนิดก็จะมีอนุพันธ์ของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide derivatives) เป็นหน่วยย่อย ลำดับการเรียงตัวที่ต่างกัน รวมทั้งการเกิดพันธะไกลโคซิดิกได้หลายรูปแบบและหลายโครงแบบ (configuration) ของพันธะ ส่งผลต่อโครงสร้าง (structure) และโครงรูป (conformation) ที่แตกต่างกันของพอลิแซ็กคาไรด์ ทำให้คุณสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์มีความแตกต่างกัน

### 2.4.1 ประเภทของพอลิแซ็กคาไรด์

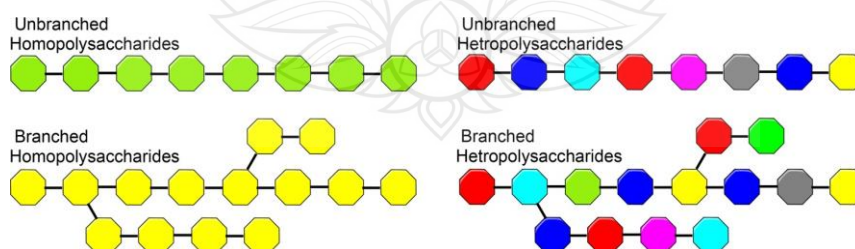
เมื่อพิจารณาชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหน่วยย่อยที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์สามารถแบ่งพอลิแซ็กคาไรด์ได้เป็น 2 กลุ่ม ดังภาพที่ 2.9

#### 2.4.1.1 โฮโมพอลิแซ็กคาไรด์ (Homopolysaccharide)

เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพียงชนิดเดียวเชื่อมต่อกันเป็นสายตรงหรือกิ่งก้าน เช่น แป้ง และเซลลูโลส

#### 2.4.1.2 เฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (Heteropolysaccharide)

เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวตั้งแต่ 2 หรือมากกว่า 2 ชนิดขึ้นไปมาเชื่อมต่อกันเป็นสายตรงหรือกิ่งก้าน เช่น เพกทิน และเฮมิเซลลูโลส



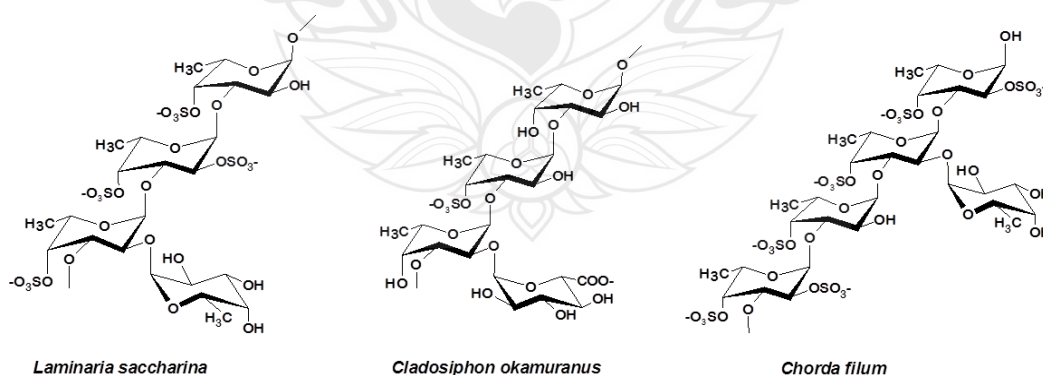
ที่มา Mohammed et al. (2021)

ภาพที่ 2.9 ประเภทและการจัดเรียงตัวของพอลิแซ็กคาไรด์

## 2.4.2 ซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์

ซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีอะตอมซัลเฟตอยู่ในโครงสร้างของน้ำตาล เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้รับความสนใจและมีความสำคัญอีกกลุ่มหนึ่ง เนื่องจากคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความหลากหลาย เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านการอักเสบ สารชะลอการแข็งตัวของเลือด เป็นต้น (Olasehinde et al., 2019) ซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ในสัตว์ จุลินทรีย์ และพืช โดยในพืชส่วนใหญ่มักพบในสาหร่ายทะเล สาหร่ายทะเลแบ่งเป็น 3 ชนิด คือ สาหร่ายสีเขียว (chlorophyta) สาหร่ายสีน้ำตาล (phaeophyta) และสาหร่ายสีแดง (rhodophyta) เช่น fucans, fucoindans (ดังภาพที่ 2.10) และ carrageenans เป็นต้น โครงสร้างของซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ส่วนใหญ่ ประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิลและหมู่ซัลเฟต ซึ่งถือเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อกระบวนการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งในปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้ซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ในด้านการแพทย์อย่างกว้างขวาง (สุวรรณี ทองมาลี, 2557)

คุณสมบัติในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์สัมพันธ์กับโครงสร้างโมเลกุล เช่น หมู่และตำแหน่งแทนที่ ชนิดของน้ำตาล น้ำหนักโมเลกุล เป็นต้น ซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายสีแดงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง แสดงให้เห็นถึงหน้าที่ต่าง ๆ เช่น การดักจับอนุมูลอิสระ และลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันให้ช้าลงหรือป้องกันการถูกทำลายของเซลล์จากอนุมูลอิสระ โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ขึ้นอยู่กับปริมาณซัลเฟต การกระจายตัวของหมู่ซัลเฟตในโครงสร้าง องค์ประกอบน้ำตาล สเตอริโอเคมี และสารประกอบฟีนอลิก ที่พบในพอลิแซ็กคาไรด์ (Devi et al., 2008) องค์ประกอบทางเคมีของซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์เหล่านี้จะแตกต่างกันไป ตามปัจจัยต่าง ๆ รวมถึงพันธุ์พืช แหล่งพืช และวิธีสกัดที่ใช้



ที่มา Ale et al. (2011)

ภาพที่ 2.10 โครงสร้าง fucoidans ในสาหร่ายสีน้ำตาล

## 2.5 อนุมูลอิสระ และสารต้านอนุมูลอิสระ

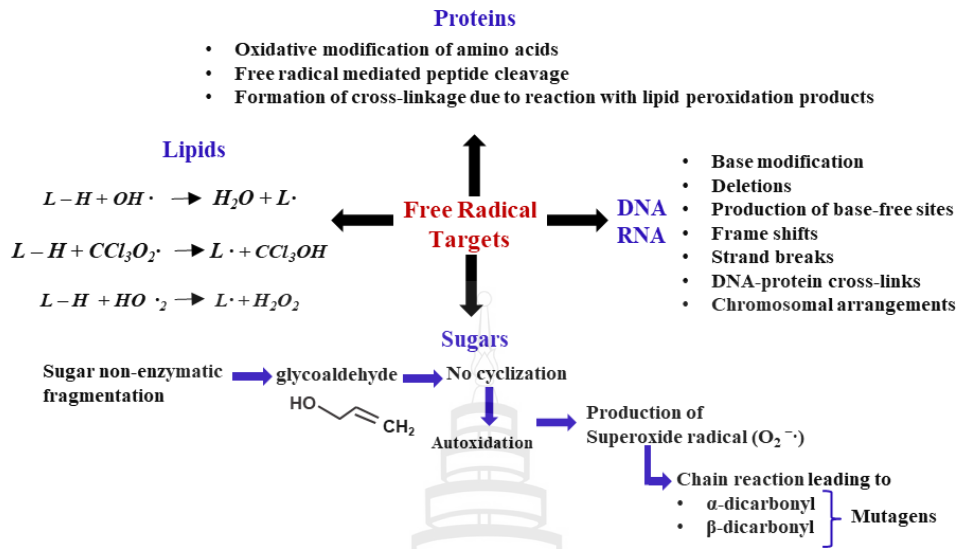
### 2.5.1 อนุมูลอิสระ

ปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) เป็นปฏิกิริยาที่โมเลกุลหรืออะตอมมีการสูญเสียอิเล็กตรอนให้กับโมเลกุลที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน โดยปฏิกิริยาออกซิเดชันนี้จะทำให้เกิดอนุมูลอิสระ (free radicals) ซึ่งมีอิเล็กตรอนอยู่เพียง 1 ตัวในวงโคจรรอบนอกสุด ทำให้โมเลกุลไม่เสถียร สามารถเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่น ๆ ได้ง่ายทันที และจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารอื่นต่อไปเรื่อย ๆ ในลักษณะของปฏิกิริยาลูกโซ่ (วรริชิตา ชัยญานะ, 2561) ซึ่งปฏิกิริยาออกซิเดชันสามารถเกิดจากภายในร่างกาย หรือถูกกระตุ้นจากสิ่งแวดล้อมภายนอก

ปฏิกิริยาออกซิเดชันจากภายในร่างกาย ออกซิเจนมีความจำเป็นต่อสิ่งมีชีวิต โดยสิ่งมีชีวิตหายใจเอาออกซิเจนจากอากาศเข้าสู่ร่างกายแล้วถ่ายเทสู่กระแสเลือดเพื่อใช้ในการเผาผลาญสารอาหาร (เช่น ไขมัน โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต เป็นต้น) เพื่อผลิตพลังงานต่าง ๆ ให้กับเซลล์ ซึ่งในระหว่างนั้นก็เกิดการปลดปล่อยอนุมูลอิสระ หรือ ROS (reactive oxygen species) ออกมา ซึ่งปกติร่างกายจะมีกระบวนการกำจัดอยู่แล้ว แต่อนุมูลอิสระที่มากเกินไปจะไปทำลายชีวโมเลกุลซึ่งเป็นองค์ประกอบของเซลล์ เช่น ไขมัน โปรตีน อาร์เอ็นเอ ดีเอ็นเอ และน้ำตาล (Carocho & Ferreira, 2013) ดังภาพที่ 2.11 ทำให้เกิดภาวะความเครียดภายในเซลล์ ที่เรียกว่า oxidative stress นำไปสู่โรคในหลายระบบ เช่น มะเร็ง โรคเรื้อรังต่าง ๆ และนำไปสู่ความเสื่อมของอวัยวะต่าง ๆ ได้

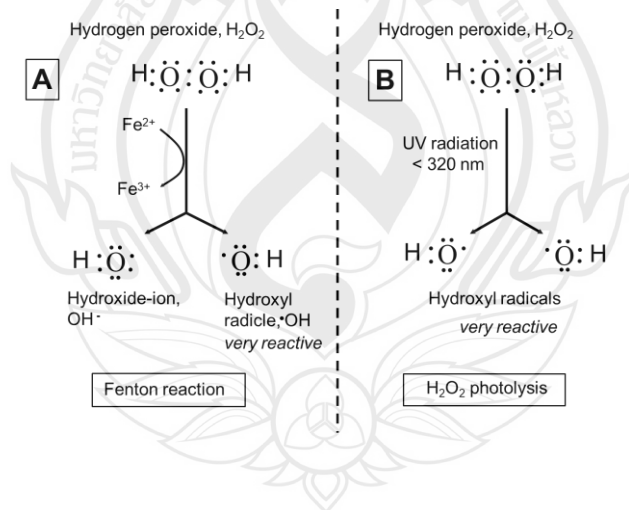
ปฏิกิริยาออกซิเดชันจากการถูกกระตุ้นจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ซึ่งปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมนั้นมีส่วนมากในการกระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระ การสัมผัสกับแสงแดด อากาศ มลภาวะ ฝุ่นควัน สารเคมี รวมทั้งความเครียด การนอนติดต่อกันเป็นเวลานาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งรังสียูวีจากแสงแดด ซึ่งรังสียูวีจะไปกระตุ้นให้เกิดอนุมูลไฮดรอกซิล และนอกจากนี้ยังมีโลหะหนักที่ก่อให้เกิดปฏิกิริยา Fenton reaction เกิดอนุมูลไฮดรอกซิลขึ้น ดังภาพที่ 2.12 ซึ่งอนุมูลไฮดรอกซิลจัดเป็นสารออกซิไดส์แรงสูงที่มีความไว สามารถทำปฏิกิริยากับสารรอบข้างได้ทันที ดังนั้นอนุมูลชนิดนี้จึงอันตรายต่อสารชีวโมเลกุลในสิ่งมีชีวิตมากกว่าอนุมูลชนิดอื่น

อนุมูลอิสระของออกซิเจน (reactive oxygen species; ROS) เป็นอนุมูลอิสระสำคัญเกิดขึ้นภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่ใช้ออกซิเจน ได้แก่ อนุมูลเปอร์ออกซิล (peroxyl radical) อนุมูลไฮโดรเจนเปอร์ออกซิล (hydroperoxyl radical) อนุมูลไฮดรอกซิล (hydroxyl radical) เป็นต้น หากอนุมูลไปจับกับสารตัวใด อาจเรียกชื่อสารนั้นด้วย เช่น จับกับไนโตรเจนเรียก reactive nitrogen species (RNS) เช่น อนุมูลไนตริกออกไซด์ (nitric oxide radical) เป็นต้น



ที่มา Carocho and Ferreira (2013)

ภาพที่ 2.11 ชีวโมเลกุลเป้าหมายและกลไกการทำลายของอนุมูลอิสระ



ที่มา Kammeyer and Luiten (2015)

ภาพที่ 2.12 การเกิดอนุมูลไฮดรอกซิล

### 2.5.2 สารต้านอนุมูลอิสระ

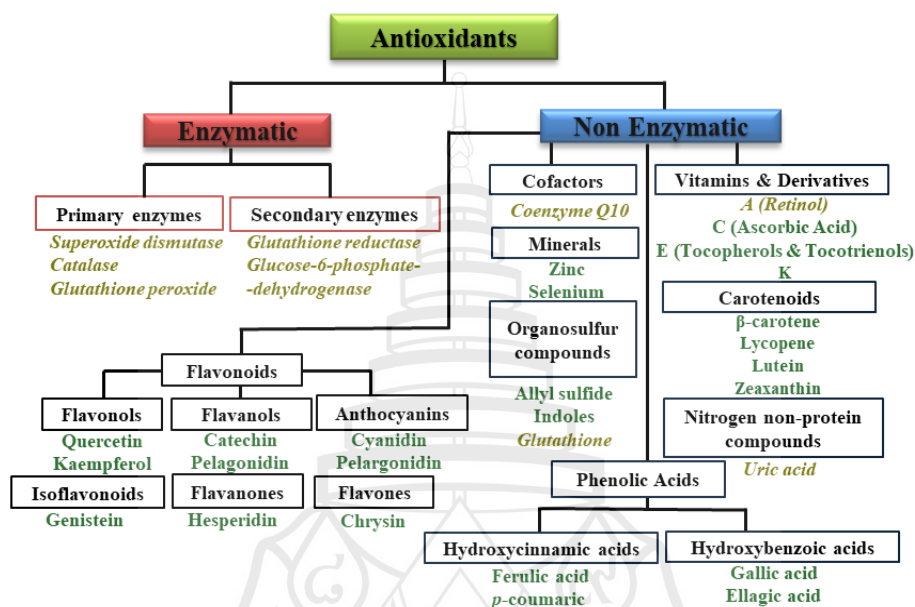
สารต้านอนุมูลอิสระ เป็นสารที่ทำหน้าที่สามารถชะลอ ยับยั้ง หรือต่อต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นในกระบวนการต่าง ๆ ของการดำรงชีวิต ซึ่งโดยปกติร่างกายจะมีการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระเพียงพอต่ออนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกาย แต่หากมีการสร้างอนุมูลอิสระที่ผิดปกติหรือมากเกินไป เช่น การนอนดึก การสัมผัสกับแสงแดด การเจ็บป่วยด้วยโรคต่าง ๆ จนทำให้สมดุลระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระกับอนุมูลอิสระเสียสมดุล ทำให้เกิด oxidative stress จึงเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่าง ๆ ดังนั้นสารต้านอนุมูลอิสระจึงมีความสำคัญ ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติสามารถจำแนกเป็น 2 แบบ คือ สารต้านอนุมูลอิสระแบบเอนไซม์และไม่เอนไซม์ ดังภาพที่ 2.13

สารต้านอนุมูลอิสระแบบเอนไซม์ สามารถป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ได้แก่ เอนไซม์กลูตาไธโอนเพอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase; GPx) ที่สามารถกำจัด singlet oxygen, hydrogen peroxide และ organic peroxidases (Tyrrell & Pidoux, 1986) เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase; SOD) ที่กำจัด superoxide radicals และเอนไซม์คะตาเลส (catalase) ที่กำจัด hydrogen peroxide เป็นต้น

สารต้านอนุมูลอิสระแบบไม่เอนไซม์ เป็นสารในกลุ่มวิตามิน เช่น วิตามินเอ วิตามินซี และวิตามินอี เป็นต้น โคเอนไซม์คิวเท็น แร่ธาตุ สารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ สารกลุ่ม flavonoids ซึ่งมีรายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจำนวนมาก โดยเฉพาะการเป็น free radical scavenger นอกจากนี้ยังสามารถจับกับโลหะหนักโดยเฉพาะ Fe และ Cu ซึ่งช่วยป้องกันการเกิด Fenton reaction ที่ก่อให้เกิดอนุมูลไฮดรอกซิล และสารกลุ่ม phenolic acid การใช้สารในกลุ่ม carotenoids ได้แก่ เบต้าแคโรทีน ไลโคปีน ลูทีน ซีแซนทีน เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้สามารถจับอนุมูลอิสระประเภท peroxy radical ได้ดีกว่า ROS กลุ่มอื่น เพราะละลายได้ดีในน้ำมัน ซึ่งส่วนใหญ่พบในพืช ผัก ผลไม้ และเมล็ดธัญพืช

นอกจากนี้กลไกของร่างกายเองก็ผลิตเม็ดสีเมลานิน (melanin) ขึ้นมา โดยเฉพาะยูเมลานิน (eumelanin) นอกจากความสามารถในการดูดซับรังสียูวีโดยตรงแล้ว ยังสามารถกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดจากรังสียูวีได้อีกเช่นกัน (Pavel, 1993) ซึ่งจะตรงข้ามกับฟีโอมเมลานิน (pheomelanin) ที่ผลิต ROS เมื่อสัมผัสกับรังสียูวี (Pavel, 1993) การป้องกันผิวหนังจากสิ่งเร้าภายนอกโดยใช้ผลิตภัณฑ์กันแดดหรือใช้เครื่องสำอางที่มีคุณสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Poljšak & Dahmane, 2012) รวมถึงการหลีกเลี่ยงพฤติกรรมที่ก่อให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระต่าง ๆ เช่น การสูบบุหรี่ การนอนดึก การสัมผัสแสงแดดเป็นเวลานาน เป็นต้น

สารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากการสังเคราะห์ เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ บิเอชเอ (butylated hydroxyanisole; BHA) บิเอชที (butylated hydroxytoluene; BHT) ทีบิเอชควิ (tertiary-butylhydroquinone; TBHQ) เป็นต้น



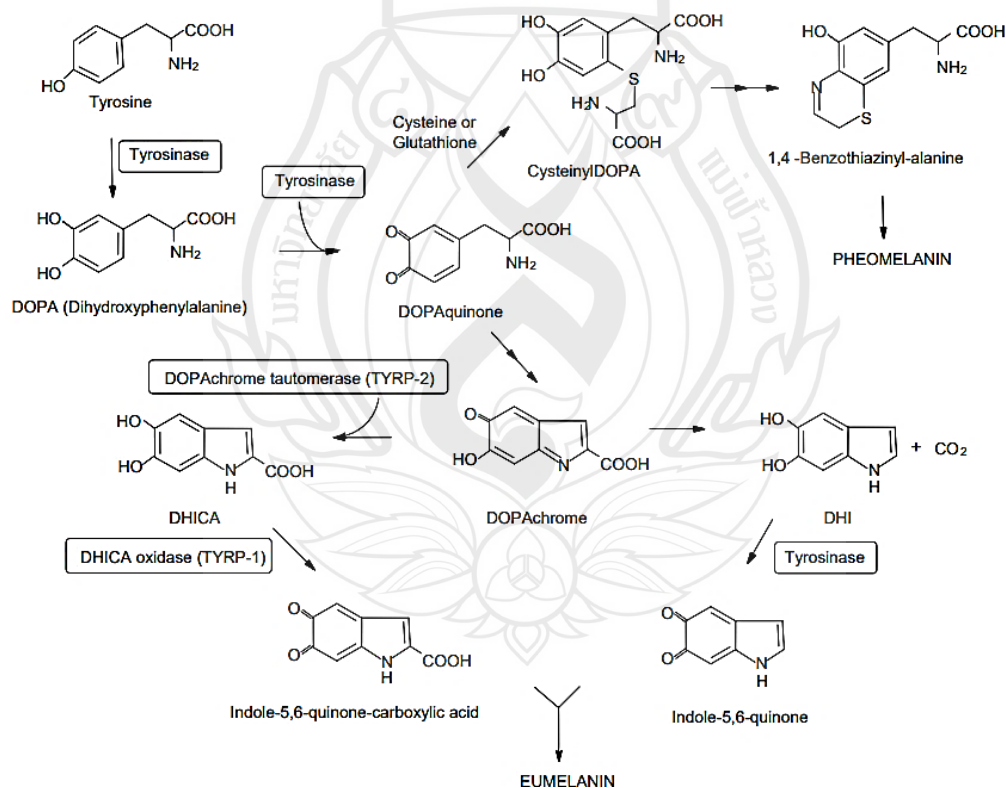
ที่มา Caroch and Ferreira (2013)

ภาพที่ 2.13 การจำแนกประเภทสารต้านอนุมูลอิสระ

กลไกการต้านอนุมูลอิสระมี 4 วิธีคือ (1) การดักจับอนุมูลอิสระ (free radical scavenging) โดยการให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ สารที่มีกลไกการออกฤทธิ์แบบนี้คือ BHA วิตามินอี เป็นต้น (2) ยับยั้งการทำงานของ single oxygen สารที่มีกลไกการออกฤทธิ์แบบนี้คือ แคโรทีนอยด์ (3) ดักจับกับโลหะหนัก (metal chelating) โดยการดักจับกับโลหะหนัก  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  และ  $Cu^{2+}$  ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน สารที่มีกลไกการออกฤทธิ์แบบนี้ คือ สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ กรดซิตริก กรดฟอสฟอริก และวิตามินซี เป็นต้น ซึ่งการดักจับนี้ถือเป็นการป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ (4) การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ โดยการยับยั้งการทำงานของ lipoxygenase สารที่มีกลไกการออกฤทธิ์แบบนี้คือ สารประกอบฟีนอลิก บางชนิด ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ และโพลีฟีนอลอื่น ๆ

## 2.6 เอนไซม์ไทโรซิเนส และการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

เอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์เมลานิน ซึ่งกระบวนการสังเคราะห์เมลานินเกิดโดย tyrosinase จะไปเร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันเปลี่ยนสารตั้งต้นกรดอะมิโนชนิด tyrosine เป็น DOPA จากนั้น DOPA ถูกออกซิไดซ์เป็น DOPA quinone แล้วเข้าสู่ขั้นตอนการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินซึ่งมีด้วยกัน 2 ชนิด คือ ฟีโอเมลานิน และ ยูเมลานิน ซึ่งมีวิธีการสังเคราะห์ที่ต่างกัน โดยฟีโอเมลานินจะอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตาไรโอนหรือซิสเตอีน กับ DOPA quinone เกิดเป็นฟีโอเมลานิน แต่ในสภาวะที่ขาดซิสเตอีน DOPA quinone จะเปลี่ยนไปเป็น DOPA chrome จะอาศัยเอนไซม์สองตัว คือ TYRP-2 และ TYRP-1 เกิดเป็นยูเมลานิน แต่หากไม่มี TYRP-2 กรดคาร์บอกซิลิกของ DOPA chrome จะหายไป และกลายเป็น 5,6-dihydroxyindole (DHI) เกิดเป็นยูเมลานิน ดังภาพที่ 2.14 (Ebanks et al., 2009)



ที่มา Ebanks et al. (2009)

ภาพที่ 2.14 กระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน

กลไกการยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินมีได้หลายหลายกลไก ได้แก่ การยับยั้งการสังเคราะห์ เอนไซม์ไทโรซิเนส สารออกฤทธิ์ เช่น resveratrol, retinol, tretinoin, retinaldehyde เป็นต้น การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส สารออกฤทธิ์ เช่น hydroquinone, azelaic acid, kojic acid, arbutin, vitamin C เป็นต้น การเร่งการผลิตเซลล์ผิว สารออกฤทธิ์ เช่น thiocctic acid, lactic acid, salicylic acid, retinoids เป็นต้น การยับยั้งการขนส่งเมลานิน สารออกฤทธิ์ เช่น niacinamide, linoleic acid, N-nicotinoyl dopamine เป็นต้น การยับยั้งกระบวนการอักเสบ สารออกฤทธิ์ เช่น niacinamide และ soy milk เป็นต้น การดักจับอนุมูลอิสระ เช่น vitamin E, vitamin C, tropical steroids เป็นต้น (ประไพพิศ อีเสน, 2561)

จะเห็นว่าเอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ตัวแรกที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันและออกซิเดชันของสารตั้งต้นที่เป็น tyrosine และ DOPA ถูกเปลี่ยนเป็นสารตัวกลาง แล้วจะถูกเปลี่ยนเป็นเมลานินในขั้นตอนสุดท้าย และหากเอนไซม์ทำงานผิดปกติก็จะส่งผลให้ผิวหนังมีความผิดปกติ เช่น เกิดฝ้ากระ จุดด่างดำ รวมถึงมะเร็งผิวหนัง ดังนั้นการศึกษาหาสารสำคัญที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจึงเป็นที่น่าสนใจ เพราะสารออกฤทธิ์ดังกล่าวสามารถนำไปใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง เพื่อให้ผิวขาวกระจ่างใส ลดฝ้ากระ จุดด่างดำ หรือความหมองคล้ำของสีผิว ซึ่งเอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ที่มี Cu เป็นองค์ประกอบในโครงสร้าง โดยจะมีตำแหน่งว่างหนึ่งตำแหน่งที่สามารถจับกับ L-DOPA ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่บริเวณเร่ง (active site) จึงเกิดการสร้างเมลานินขึ้น ดังนั้นหากมีสารที่สามารถแย่งจับกับโลหะ Cu ได้ดีกว่า L-Dopa ก็จะทำให้ Cu ของเอนไซม์ไม่สามารถไปจับกับสารตั้งต้นอย่าง L-Dopa ได้ จึงทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงาน จึงเกิดการสร้างเมลานินน้อยลง โดยสารออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสต้องมีหมู่ฟังก์ชันที่สามารถจับ Cu ได้ดี อาจเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ โพลีฟีนอล ซึ่งพบว่าสารกลุ่มฟลาโวนอยด์มีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระได้ดีและยังสามารถจับ Cu บริเวณเร่ง เนื่องจากโครงสร้างของฟลาโวนอยด์มีหมู่แอลฟาคีโต หรือ 3-ไฮดรอกซี ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับหมู่ไฮดรอกซีฟีนิลของ DOPA จึงทำให้จับกับ Cu ได้ สารกลุ่มสติลปีน คูมาริน กรดคาร์บอกซิลิก กรดไขมัน ไอโซคูมาริน โกลโคไซด์ ไบโอฟิโอริน รวมถึงสารต้านอนุมูลอิสระที่อยู่ในรูปวิตามินซีและวิตามินอี โดยวิตามินซีนอกจากจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแล้ว วิตามินซียังสามารถจับกับ Cu ของไทโรซิเนสเพื่อป้องกันการเกิดโพสิเมอร์ไลเซชันของเมลานิน โดยสารเหล่านี้ มีกลไกการยับยั้งที่อาจเป็นไปได้ทั้งตัวยับยั้งเอนไซม์แบบผันกลับได้ ชนิดแข่งขัน และชนิดแบบไม่แข่งขัน ขึ้นอยู่กับลักษณะโครงสร้างของสารยับยั้งชนิดนั้น และอาจยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสทั้งชนิด monophenolase และ diphenolase

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 วัสดุดิบ และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

##### 3.1.1 วัสดุดิบ

จัดหาผักกูดจากอำเภอพนัสนิคม จังหวัดชลบุรี ซึ่งเก็บตัวอย่างในช่วงเดือน มีนาคม ถึง เมษายน ปี พ.ศ. 2564 โดยเลือกส่วนของก้านอ่อนและใบอ่อน (บริเวณที่มีสารเมือก)

##### 3.1.2 สารเคมี

#### ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมี	บริษัท	ประเทศ
Acetone	CARLO ERBA	France
95% Ethanol	J.T. Baker	USA
Hydrochloric acid	CARLO ERBA	France
Sodium hydroxide	CARLO ERBA	France
Gallic acid	Merck	Germany
Folin-Ciocalteu's reagent	Merck	Germany
Sodium carbonate	Merck	Germany
Dimethylsulfoxide	CARLO ERBA	France
D-glucose	Ajax Finechem	Australia
Sulfuric acid	CARLO ERBA	France
Trichloroacetic acid	DAEJUNG	Korea
Barium chloride dihydrate	LOBA CHEMIE	India
Gelatin powder	KEMAUS	Australia

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

สารเคมี	บริษัท	ประเทศ
Potassium sulfate	QRëC	New Zealand
Potassium persulfate	Sigma-Aldrich	USA
Mushroom tyrosinase	Sigma-Aldrich	USA
Kojic acid	ACROS	USA
L-dopa	Sigma-Aldrich	USA
Potassium dihydrogen phosphate	Merck	Germany
Dipotassium hydrogen phosphate	Merck	Germany
Trolox	Sigma-Aldrich	USA
ABTS	Sigma-Aldrich	USA
Phenol detached crystals	Thermo Fisher Scientific	USA

### 3.2 เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

ตารางที่ 3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือและอุปกรณ์	รุ่น	บริษัท
เครื่องบดสมุนไพร	DMF-16A	DAMING
ตู้อบลมร้อน	30-1060	Memmert
เครื่องระเหยแบบสูญญากาศ	N-1000V-WD	EYELA
เครื่องผสมสารละลาย	VXMNAL	OHAUS
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง	B200	QIS
อ่างควบคุมอุณหภูมิ	WB 29	Memmert
เครื่องปั่นเหวี่ยง	Z 206	HERMLE
เครื่องเขย่าแบบสั่นความถี่สูง	690 DAE	CREST
เครื่องเขย่าสาร	Orbit 1000	Labnet

### ตารางที่ 3.2 (ต่อ)

เครื่องมือและอุปกรณ์	รุ่น	บริษัท
เครื่องเขย่าสารแบบควบคุมอุณหภูมิ	SW22	Julaba
เครื่องสเปกโตรสโกปี	Spectrum GX	PerkinElmer
เครื่องวัดการดูดกลืนแสง	Genesys 10 UV	Thermo Fisher Scientific
เครื่องวัดการดูดกลืนแสง	FLUOstar OMEGA	BMGlabtech
เครื่องชั่งสาร 2 ตำแหน่ง	XT 220A	Precisa
เครื่องชั่งสาร 4 ตำแหน่ง	ML 104T/00	METTLER TOLEDO

### 3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.3.1 การเตรียมตัวอย่างผักกูด

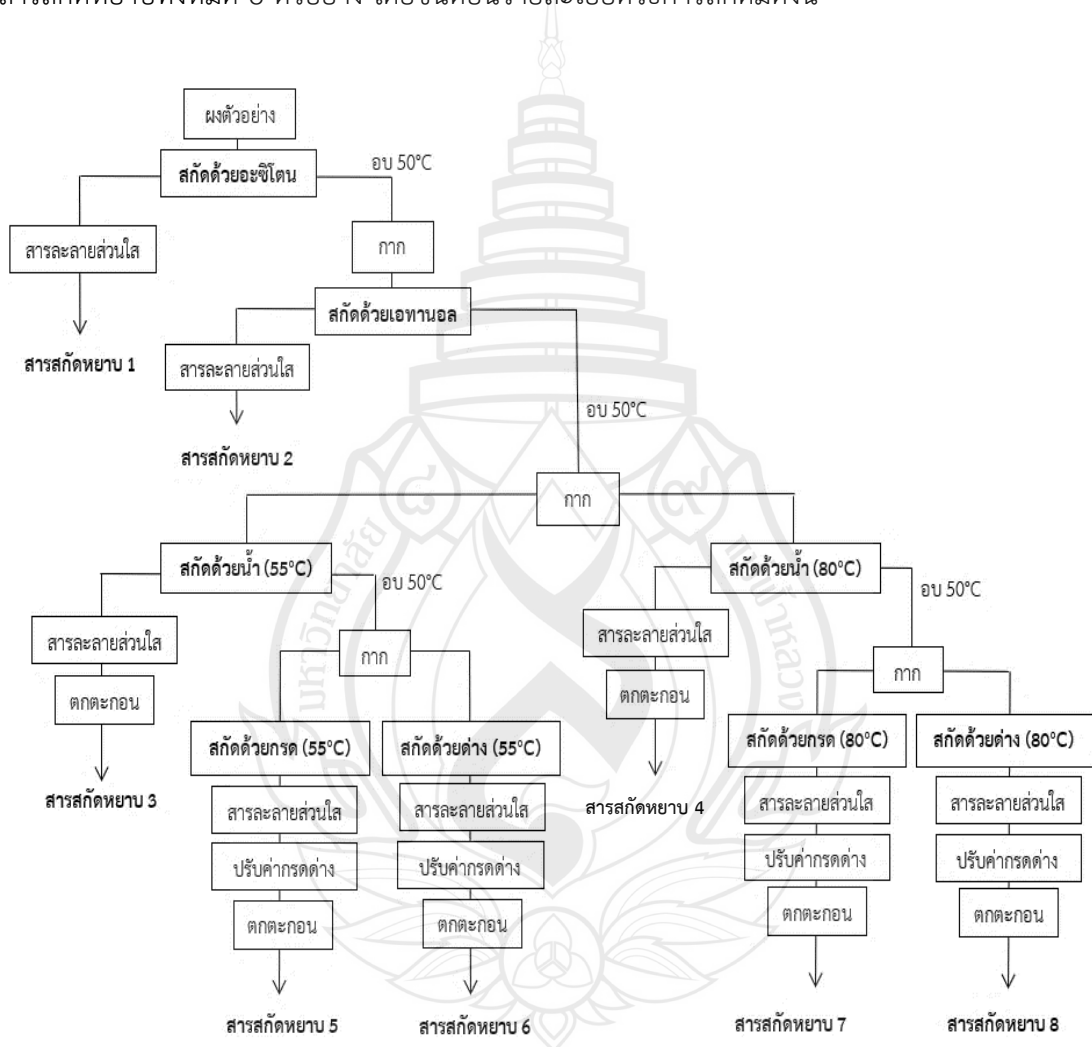
นำผักกูดมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำเปล่า ชั้บให้แห้ง จากนั้นหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร แล้วนำไปอบให้แห้งในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จนน้ำหนักคงที่ ปริมาณร้อยละของผลผลิตที่ได้เท่ากับ  $7.47 \pm 0.41$  จากนั้นนำตัวอย่างมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดสมุนไพร แล้วร่อนตัวอย่างผ่านตะแกรงขนาด 60 mesh ดังภาพที่ 3.1 นำผงตัวอย่างแห้งบดละเอียดเก็บไว้ในซิปล็อค แล้วเก็บไว้ในที่มีอุณหภูมิห้อง



ภาพที่ 3.1 ลักษณะทางกายภาพของผักกูด

### 3.3.2 การเตรียมสารสกัดผักกูด

เตรียมสารสกัดผักกูดด้วยวิธีการสกัดแบบลำดับขั้น โดยตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด ได้แก่ อะซิโตน, เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95, น้ำ, กรด (0.1 N HCl), และด่าง (0.1 N NaOH) แสดงขั้นตอนการเตรียมดังภาพที่ 3.2 ซึ่งขั้นแรกจะทำการสกัดสารฟีนอลิกออกมาเป็นลำดับแรก จากนั้นทำการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ในลำดับต่อไป จากการสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบลำดับขั้นจะได้สารสกัดหยาบทั้งหมด 8 ตัวอย่าง โดยขั้นตอนรายละเอียดวิธีการสกัดมีดังนี้



ภาพที่ 3.2 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดผักกูดด้วยวิธีการสกัดแบบลำดับขั้น

### 3.3.2.1 การสกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตน

นำผงแห้งบดละเอียดของผักกูดที่ร่อนผ่านตะแกรงแล้ว มาสกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตน อัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลาย 1 : 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) สกัดด้วยวิธีการเขย่า (shaking) โดยนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร (shaker) ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที (revolutions per minute; rpm) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นแยกสารสกัดออกจากกากโดยกรองผ่านกระดาษ Whatman No.1 นำสารละลายส่วนใสที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดหยาบฟีนอลิกที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตน (สารสกัดหยาบ 1) จากนั้นชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหาปริมาณร้อยละของผลผลิต (จากสมการที่ 1) แล้วเก็บสารสกัดหยาบไว้ในขวดทึบแสง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป และส่วนกากนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วร่อนตัวอย่างผ่านตะแกรงขนาด 60 mesh นำไปใช้ในการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ในลำดับต่อไป

$$\text{ร้อยละผลผลิต} = \frac{\text{น้ำหนักของสารสกัดที่ได้}}{\text{น้ำหนัก (ก้านและใบ) แห้งของผักกูดที่ใช้}} \times 100 \text{ (สมการที่ 1)}$$

### 3.3.2.2 การสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95

นำกากอบแห้งบดละเอียดของผักกูดที่ผ่านการสกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตน มาสกัดต่อด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ในอัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลาย 1 : 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นกรองผ่านกระดาษ Whatman No.1 แล้วนำสารละลายส่วนใสที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดหยาบฟีนอลิกที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 (สารสกัดหยาบ 2) จากนั้นชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหาปริมาณร้อยละของผลผลิต (จากสมการที่ 1) แล้วเก็บสารสกัดหยาบไว้ในขวดทึบแสง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป และส่วนกากนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วร่อนตัวอย่างผ่านตะแกรงขนาด 60 mesh นำไปใช้ในการสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำในลำดับต่อไป

### 3.3.2.3 การสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ

นำกากอบแห้งบดละเอียดของผักกูดที่ผ่านการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 มาสกัดต่อด้วยตัวทำละลายน้ำ ในอัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลาย 1 : 40 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ด้วยเครื่องเขย่าสารแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath shaker) ที่อุณหภูมิ

55 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นกรองผ่าน nylon cloth เพื่อแยกสารสกัดออกจากกาก นำสารสกัดไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เพื่อแยกกากที่อยู่ในสารสกัดอีกครั้ง จากนั้นนำสารสกัดมาวัดค่าความเป็นกรดต่าง แล้วนำสารละลายส่วนใสที่ได้มาตกตะกอนด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ที่เย็น ในอัตราส่วนตัวอย่างต่อตัวทำละลาย 1 : 5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน (อย่างน้อย 12 ชั่วโมง) จากนั้นรินเอทานอลออก แล้วนำตะกอนที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนตัวอย่างมีน้ำหนักคงที่ จะได้สารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส (สารสกัดหยาบ 3 และสารสกัดหยาบ 4) จากนั้นชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหาปริมาณร้อยละของผลผลิต (จากสมการที่ 1) แล้วเก็บสารสกัดหยาบไว้ในขวดแก้ว ในโถดูดความชื้นที่อุณหภูมิห้อง เพื่อนำไปใช้ในวิเคราะห์ต่อไป และส่วนกากนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บดให้ละเอียดและร่อนตัวอย่างผ่านตะแกรงขนาด 60 mesh นำไปใช้ในการสกัดด้วยตัวทำละลายกรดหรือต่าง ในลำดับต่อไป

#### 3.3.2.4 การสกัดด้วยตัวทำละลายกรดหรือต่าง

นำกากอบแห้งบดละเอียดของผักกูดที่ผ่านการสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ มาสกัดต่อด้วยตัวทำละลาย 0.1 N HCl หรือ 0.1 N NaOH ในอัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลาย 1 : 40 (น้ำหนักต่อปริมาตร) สกัดด้วยเครื่องเขย่าสารแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นกรองผ่าน nylon cloth เพื่อแยกสารสกัดออกจากกาก แล้วนำสารสกัดใส่ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายส่วนใสมาวัดค่าความเป็นกรดต่าง แล้วปรับค่าความเป็นกรดต่าง (neutralize) ด้วย 1 N HCl หรือ 6 N NaOH ให้ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับสารละลายส่วนใสที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ แล้วนำสารละลายส่วนใสที่ได้มาตกตะกอนด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ที่เย็น ในอัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลาย 1 : 5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) นำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน (อย่างน้อย 12 ชั่วโมง) จากนั้นรินเอทานอลออก แล้วนำตะกอนที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนตัวอย่างมีน้ำหนักคงที่ จะได้สารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายกรด และสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (สารสกัดหยาบ 5 และสารสกัดหยาบ 6) และ 80 องศาเซลเซียส (สารสกัดหยาบ 7 และสารสกัดหยาบ 8) จากนั้นชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหาปริมาณร้อยละของผลผลิต (จากสมการที่ 1) แล้วเก็บสารสกัดหยาบไว้ในขวดแก้ว ในโถดูดความชื้นที่อุณหภูมิห้อง เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

### 3.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากผักกูด

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจากสารสกัดหยาบฟีนอลิก และสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ของผักกูด ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric (ดัดแปลงวิธีจาก Singleton et al., 1999) โดยใช้สารละลายมาตรฐานคือ กรดแกลลิก (gallic acid) เจือจางในตัวทำละลายน้ำ จนได้ความเข้มข้น 0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเจือจางตัวอย่างสารสกัดหยาบผักกูดในตัวทำละลายที่เหมาะสม ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการปิเปตสารละลายมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่างลงในหลอดทดลอง เจือจางและปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 1.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex) แล้วเติม Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร และ sodium carbonate (7.5% w/v) ปริมาตร 1.50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ (triplicate) คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารตัวอย่าง โดยนำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก แสดงผลเป็นปริมาณมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด (mg GAE/g crude extract)

### 3.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ของสารสกัดจากผักกูด

#### 3.3.4.1 การวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวม

การหาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมจากสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ของผักกูดทั้ง 6 ตัวอย่าง ได้แก่ สารสกัดหยาบที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ กรด และด่าง (ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส) โดยวิเคราะห์ด้วยวิธี phenol-sulfuric acid (ดัดแปลงวิธีจาก DuBois et al., 1956) ซึ่งใช้สารละลายมาตรฐานคือ กลูโคส (glucose) เจือจางในตัวทำละลายน้ำ จนได้ความเข้มข้น 0.30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเจือจางตัวอย่างสารสกัดผักกูดในตัวทำละลายที่เหมาะสม ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการปิเปตสารละลายมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่างลงในหลอดทดลอง (ที่มีฝาปิด) เจือจางและปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 0.50 มิลลิลิตร แล้วเติม phenol (5% w/v) ปริมาตร 0.50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้น ปิเปต sulfuric acid ปริมาตร 2.50 มิลลิลิตร โดยใช้ปิเปตแก้วลงในหลอดทดลอง นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำให้เย็นลงเพื่อหยุดปฏิกิริยา โดยนำสารละลายไปแช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ คำนวณหาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมของสารตัวอย่าง โดยนำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

ของกลูโคส แสดงผลเป็นปริมาณมิลลิกรัมสมมูลของกลูโคสต่อกรัมสารสกัด (mg GE/g crude extract)

#### 3.3.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณซัลเฟต

การหาปริมาณซัลเฟตจากสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ของผักกูดทั้ง 6 ตัวอย่าง โดยวิเคราะห์ด้วยวิธี turbidimetric (ดัดแปลงวิธีจาก Peasura et al., 2015) ซึ่งเตรียมตัวอย่างสารสกัดผักกูดโดยนำตัวอย่างทดสอบ 2-4 มิลลิกรัมมาด้วย 1 N HCl ปริมาตร 0.20 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม trichloroacetic acid (3% w/v) ปริมาตร 3.80 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม barium chloride-gelatin reagent ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ คำนวณหาปริมาณซัลเฟตของสารตัวอย่าง โดยนำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโพแทสเซียมซัลเฟต ความเข้มข้นของซัลเฟต 0.60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงผลเป็นปริมาณมิลลิกรัมสมมูลของซัลเฟตต่อกรัมสารสกัด (mg sulfate/g crude extract)

#### 3.3.4.3 การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยเครื่อง fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)

การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชัน (function group) ของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ของผักกูดทั้ง 6 ตัวอย่าง ด้วยวิธี KBr disc technique โดยบดสารตัวอย่างเข้ากับ potassium bromide (KBr) โดยใช้ตัวอย่าง 2% ของ KBr จากนั้นอัดเป็นแผ่นกลม นำแผ่น KBr disc ใส่ลงในช่องใส่ตัวอย่าง ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงอินฟราเรด ที่ความยาวคลื่น 400-4000  $\text{cm}^{-1}$  (Tiensri, 2019)

#### 3.3.5 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดผักกูด ด้วยวิธี ABTS radical cation scavenging activity (ดัดแปลงวิธีจาก Re et al., 1999) ซึ่งใช้สารละลายมาตรฐานคือ โทรลอกซ์ (trolox) เจือจางในตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 จนได้ความเข้มข้น 0.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเจือจางตัวอย่างสารสกัดผักกูดในตัวทำละลายที่เหมาะสม ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการปิเปตสารละลายมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่างลงในหลอดทดลอง เจือจางและปรับปริมาตรด้วย 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) จนครบ 1.00 มิลลิลิตร แล้วเติม ABTS<sup>+</sup> reagent ปริมาตร 2.00 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (free radical inhibition) จากอนุมูลอิสระที่เหลืออยู่

จากสมการที่ 2 แล้วนำค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระมาคำนวณหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่าง โดยนำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของโทรลอกซ์ แสดงผลเป็นปริมาณมิลลิกรัมสมมูลของโทรลอกซ์ต่อกรัมสารสกัด (mg TEAC/g crude extract)

$$\text{ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ} = (A_C - A_S) / A_C \times 100 \quad (\text{สมการที่ 2})$$

เมื่อกำหนดให้

$A_C$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ control

$A_S$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ sample

### 3.3.6 การวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

การวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดผักกูด ด้วยวิธี dopachrome โดยใช้ substrate คือ L-dopa และสารละลายมาตรฐานคือ กรดโคจิก (kojic acid) เจือจางในตัวทำละลาย 50 mM Potassium phosphate buffer (pH 6.8) จนได้ความเข้มข้น 0.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเจือจางตัวอย่างสารสกัดผักกูดในตัวทำละลายที่เหมาะสม โดยทำการปิเปตสารละลายมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่างลงใน 96 well plate เจือจางและปรับปริมาตรด้วย 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.8) จนครบ 0.12 มิลลิลิตร แล้วเติม mushroom tyrosinase (1,000 units/ml) ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที จากนั้นเติม 15 mM L-dopa solution ปริมาตร 0.06 มิลลิลิตร แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase inhibition) จากสมการที่ 3 แล้วนำค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส มาคำนวณหาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารตัวอย่าง โดยนำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดโคจิก แสดงผลเป็นปริมาณมิลลิกรัมสมมูลของกรดโคจิกต่อกรัมสารสกัด (mg KAE/g crude extract)

$$\text{ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส} = [A_C - (A_S - A_B)] / A_C \times 100 \quad (\text{สมการที่ 3})$$

เมื่อกำหนดให้

$A_C$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ control

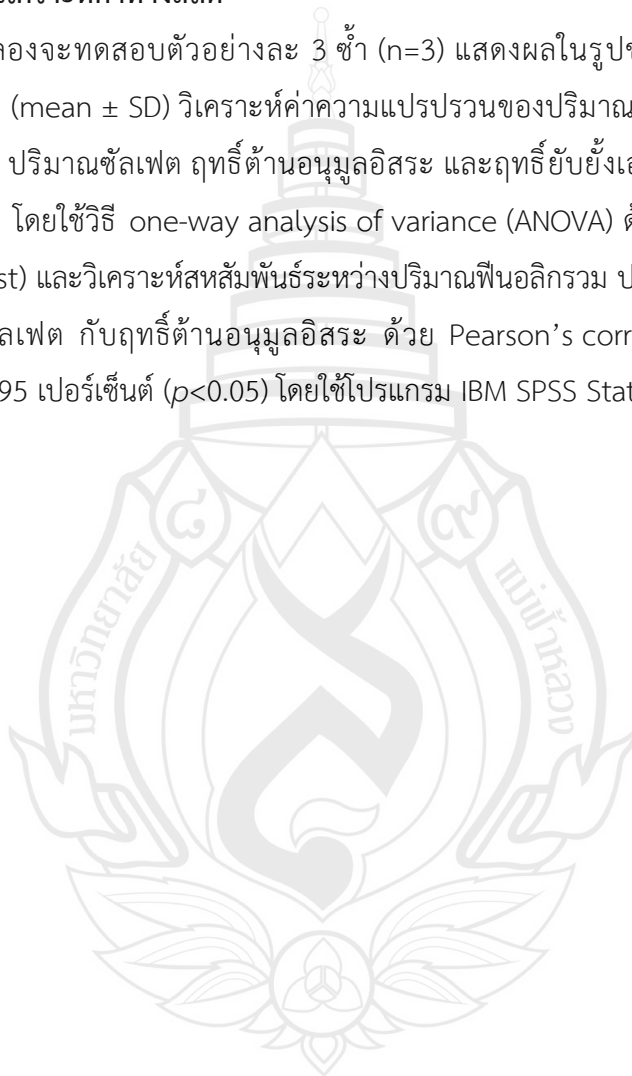
$A_S$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ sample (เติมเอนไซม์ไทโรซิเนส)

$A_b$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ sample (ไม่เติมเอนไซม์ไทโรซิเนส)

นำสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีค่าสูง มาหา  $IC_{50}$  หรือความเข้มข้นที่ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ 50 เปอร์เซ็นต์ จากการสร้างกราฟระหว่างร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสกับความเข้มข้นของตัวอย่าง

### 3.3.7 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ทุกการทดลองจะทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ( $n=3$ ) แสดงผลในรูปของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ( $mean \pm SD$ ) วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวม ปริมาณซัลเฟต ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบผักกูด โดยใช้วิธี one-way analysis of variance (ANOVA) ด้วยวิธี Tukey's test, independent (t-test) และวิเคราะห์สหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวม และปริมาณซัลเฟต กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วย Pearson's correlation coefficients ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $p<0.05$ ) โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistic version 21



## บทที่ 4









### ผลการทดลอง และอภิปรายผลการทดลอง

#### 4.1 การเตรียมสารสกัดจากผักกูด

จากการเตรียมสารสกัดจากผักกูดด้วยวิธีการสกัดแบบลำดับขั้น โดยใช้ตัวทำละลาย ได้แก่ อะซิโตน, เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95, น้ำ, กรด หรือ ต่าง ทำให้ได้สารสกัดหยาบ 2 ชนิด คือ สารสกัดหยาบฟีนอลิก และสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ กล่าวคือ ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบฟีนอลิกที่สกัดด้วยอะซิโตนมีสีเขียวเข้ม ชั้นหนืด ในขณะที่สารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 มีสีเขียวที่จางลง และมีลักษณะเป็นก้อนแข็ง ส่วนลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้เป็นผงสีน้ำตาล โดยสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยต่างมีสีเข้มสุดคือ สีน้ำตาลอมดำ รองลงมาคือสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยกรด และสีน้ำตาลอ่อนสุดในสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยน้ำ ดังตารางที่ 4.1

ขั้นตอนการสกัดด้วยอะซิโตนและเอทานอล เป็นขั้นตอนของการสกัดสารในกลุ่มโพลีฟีนอล ฟลาโวนอยด์ ออกจากตัวอย่าง ก่อนที่จะนำไปสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ (Liu et al., 2009; Zhou et al., 2020) ทำให้สารสกัดที่ได้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น โดยเอทานอลเป็นตัวทำละลายที่ดีในการสกัดสารกลุ่มโพลีฟีนอลและมีความปลอดภัย ในขณะที่อะซิโตนมีประสิทธิภาพในการสกัดสารโพลีฟีนอลที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า (Dai & Mumper, 2010) และการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์โดยการใช้ น้ำ ซึ่งน้ำจะสกัดสารกลุ่มที่มีขั้วสูง เช่น โกลโคไซด์ น้ำตาล (Wanyo et al., 2016) ส่วนการย่อยโดยกรดหรือต่าง ทำให้ได้สารสำคัญที่ฝังแน่นอยู่ที่ผนังเซลล์หลุดออกมา ซึ่งสารองค์ประกอบในโครงสร้างของผนังเซลล์ที่มีหลากหลายชนิด เช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน เพกทิน โปรตีน สารประกอบฟีนอลิก และแร่ธาตุต่าง ๆ เป็นต้น ดังนั้นเมื่อสกัดด้วยกรดหรือต่าง สารใดก็ตามที่อยู่ผนังเซลล์ เมื่อสกัดด้วยกรดหรือต่าง แล้วไปทำลายพันธะที่เชื่อมออกจากผนังเซลล์ แล้วเกิดการละลายออกมา

ตารางที่ 4.1 ลักษณะสารสกัดหยาบของผักกูด

ลักษณะทางกายภาพ	ตัวทำละลาย							
	อะซิโตน	เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95	น้ำ (55°C)	น้ำ (80°C)	0.1 นอร์มัล NaOH (55°C)	0.1 นอร์มัล NaOH (80°C)	0.1 นอร์มัล HCl (55°C)	0.1 นอร์มัล HCl (80°C)
ลักษณะ	ชั้นหนืด	เป็นก้อน	ผง	ผง	ผง	ผง	ผง	ผง
สี	สีเขียวเข้ม	สีเขียวเข้ม	สีน้ำตาล	สีน้ำตาลอ่อน	สีน้ำตาลอมดำ	สีน้ำตาลอมดำ	สีน้ำตาลเข้ม	สีน้ำตาลเข้ม
กลิ่น	กลิ่นเขียวของพืช	กลิ่นเขียวของพืช	กลิ่นเฉพาะตัว	กลิ่นเฉพาะตัว	กลิ่นเฉพาะตัว	กลิ่นเฉพาะตัว	กลิ่นเฉพาะตัว	กลิ่นเฉพาะตัว
ลักษณะปรากฏ								

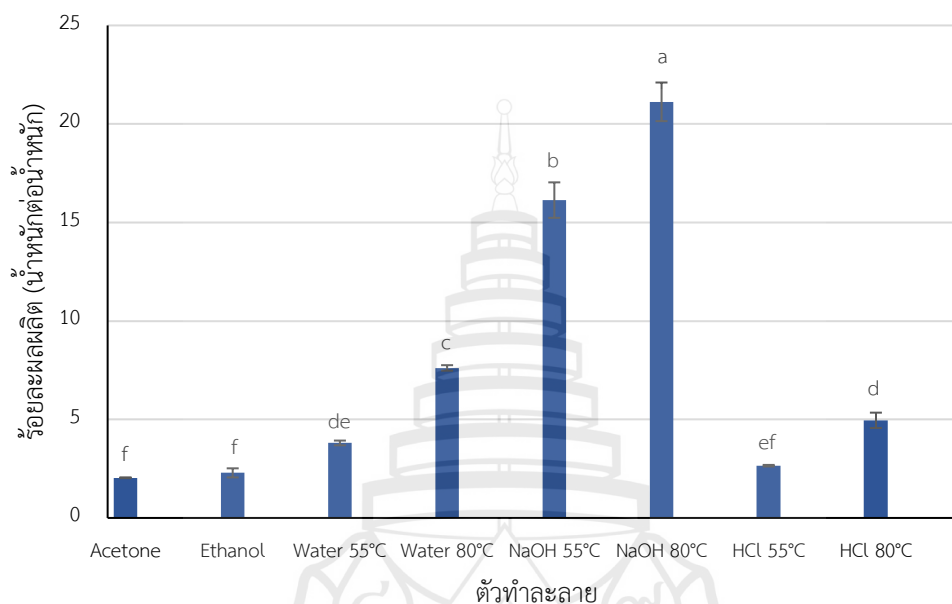
ปริมาณร้อยละผลผลิตของสารสกัดผักกูดอยู่ในช่วง  $2.04 \pm 0.02$  ถึง  $21.12 \pm 0.98$  ดังภาพที่ 4.1 โดยสารสกัดฟีนอลิกที่สกัดด้วยอะซิโตน ซึ่งมีค่าความมีขั้ว (polarity index; PI) เท่ากับ 5.1 มีปริมาณร้อยละผลผลิตต่ำสุด ( $2.04 \pm 0.02$ ) และสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 (PI = 5.2) มีปริมาณร้อยละผลผลิตของสารสกัดเท่ากับ  $2.29 \pm 0.23$  ซึ่งจากการเพิ่มขึ้นของค่าความมีขั้วของตัวทำละลายทำให้ปริมาณร้อยละผลผลิตของสารสกัดมีปริมาณสูงขึ้น แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดฟีนอลิกที่ได้มีปริมาณร้อยละผลผลิตต่ำกว่าสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์

การสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยน้ำ กรด และด่าง ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส ซึ่งพอลิแซ็กคาไรด์เป็นโมเลกุลที่มีขั้ว มักจะละลายได้ในน้ำ (PI = 9.0) การสกัดด้วยน้ำทำให้ได้ water-soluble polysaccharide ละลายออกมา แล้วนำมากมาสกัดต่อด้วยกรดหรือด่าง ซึ่งเป็นวิธีการสกัดด้วยการย่อยด้วยกรด-ด่าง ทำให้ได้ bound polysaccharide ละลายออกมา จากการศึกษาพบว่าสารสกัดที่มีปริมาณร้อยละของผลผลิตสูงสุด คือสารสกัดที่สกัดด้วยด่างที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เท่ากับ  $21.12 \pm 0.98$  (น้ำหนักต่อน้ำหนัก; w/w) รองลงมาคือสารสกัดที่สกัดด้วยด่างที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เท่ากับ  $16.13 \pm 0.90$  ส่วนสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำและกรด ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส มีปริมาณร้อยละผลผลิตเท่ากับ  $3.81 \pm 0.12$ ,  $7.62 \pm 0.14$ ,  $2.65 \pm 0.04$  และ  $4.96 \pm 0.39$  (w/w) ตามลำดับ

สอดคล้องกับการศึกษาของ Peasura et al. (2015) ที่ทำการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายไส้ไก่ (*Ulva intestinalis*) ด้วยน้ำ กรด (0.1 N HCl) และด่าง (0.1 N NaOH) ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าการสกัดด้วยด่างมีปริมาณร้อยละผลผลิตสูงสุด กล่าวคือในสภาวะต่างจะเกิดการสกัดร่วม (co-extracted) โดยการสกัดด้วยด่าง จะทำให้เฮลลูโลสในผนังเซลล์บวม ซึ่งทำลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสในผนังเซลล์ เป็นผลให้เกิดการละลายของเฮมิเซลลูโลส ดังนั้นการสกัดด้วยด่างทำให้ปลดปล่อย bound polysaccharide ที่ฝังแน่นอยู่ที่ผนังเซลล์หลุดออกมา นอกจากนี้ในสภาวะต่าง อาจจะไปย่อยพันธะที่เชื่อมกับโปรตีน ทำให้โปรตีนหลุดออกมา รวมถึงโพลีฟีนอลก็ถูกสกัดร่วมออกมาด้วยเช่นกัน ดังนั้นร้อยละผลผลิตที่สกัดด้วยด่างที่มีค่าสูง อาจมีเฮมิเซลลูโลส โปรตีน โพลีฟีนอล หรือสารใดก็ตามที่อยู่ผนังเซลล์เมื่อสกัดด้วยด่างแล้วไปทำลายพันธะที่เชื่อมออกจากผนังเซลล์ แล้วเกิดการละลายออกมา

ในขณะที่การสกัดด้วยกรด มีปริมาณร้อยละผลผลิตต่ำกว่าการสกัดด้วยด่าง อาจเนื่องจากการสกัดด้วยกรดไปย่อยพอลิแซ็กคาไรด์บางส่วน โดยการทำลายพันธะไกลโคซิดิกของพอลิแซ็กคาไรด์ แต่ไม่ได้ไปตัดโปรตีน ขณะเดียวกันพอลิแซ็กคาไรด์บางชนิดที่มีหมู่กรด ละลายได้ยากภายใต้สภาวะพีเอชต่ำ จึงส่งผลให้ปริมาณร้อยละผลผลิตต่ำกว่าการสกัดด้วยด่าง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Hayati et al. (2019) ที่ทำการสกัดผักกูดโดยใช้น้ำ ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส,

กรด (1 M citric acid) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และต่าง (1 M NaOH) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณร้อยละผลผลิตที่สกัดด้วยกรดต่ำกว่าการสกัดด้วยต่าง



**หมายเหตุ** ตัวอักษรยกภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ ( $p < 0.05$ ) ตาม Tukey's test

**ภาพที่ 4.1** ร้อยละผลผลิตของสารสกัดผักกูดที่เตรียมโดยวิธีการสกัดแบบลำดับขั้น

#### 4.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากผักกูด

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจากสารสกัดผักกูด ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric แล้วนำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก แสดงผลดังตารางที่ 4.2 จากการสกัดด้วยอะซิโตนและเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ทำให้ได้ free phenolic compound ละลายออกมา ซึ่งมีปริมาณฟีนอลิกเท่ากับ  $24.98 \pm 1.11$  และ  $25.21 \pm 0.31$  ตามลำดับ ส่วนการสกัดด้วยน้ำ มีปริมาณฟีนอลิกเท่ากับ  $42.74 \pm 1.81$  และ  $51.70 \pm 0.19$  ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งการสกัดด้วยน้ำทำให้ได้ water-soluble phenolic ละลายออกมา ได้แก่ กรดฟีนอลิก หรือได้สารประกอบฟีนอลิกกลุ่มที่มีขั้วค่อนข้างสูง เช่น ไกลโคไซด์ ซึ่งเป็นฟีนอลิกที่รวมอยู่ในโมเลกุลของน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ (glycosides) และเมื่อน้ำตาลอยู่โครงสร้างจึงมีขั้วค่อนข้างสูง ดังนั้นจึงละลายได้ดีในน้ำ

สำหรับการสกัดด้วยต่างและกรด ทำให้ bound phenolic ละลายออกมา จากการวิเคราะห์พบว่า การสกัดด้วยต่าง มีปริมาณฟีนอลิกสูงสุด เท่ากับ  $83.53 \pm 1.71$  และ  $74.85 \pm 1.06$  ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส ตามลำดับ สอดคล้องกับการศึกษาของ Zhou et al. (2020) ที่ทำการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากใบของ *Apocynum venetum* ด้วยน้ำ กรด และต่าง พบว่าปริมาณฟีนอลิกจากการสกัดด้วยต่างสูงสุด กล่าวคือ การสกัดด้วยต่างทำให้เกิดการสกัดร่วมของพอลิแซ็กคาไรด์และโปรตีน รวมถึงโพลีฟีนอล โดยฟีนอลิกยึดเหนี่ยว (bound phenolic) ที่เกาะแน่นกับพอลิแซ็กคาไรด์ และเกาะแน่นกับโปรตีน ในสภาวะที่เป็นต่าง จึงถูกสกัดร่วมออกมา ส่งผลให้ปริมาณฟีนอลิกที่สกัดด้วยต่างมีปริมาณฟีนอลิกสูงสุด

**ตารางที่ 4.2** ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดผักกูด

ตัวทำละลาย	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (mg GAE/g Crude Extract)
อะซิโตน	$24.98 \pm 1.11^e$
เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95	$25.21 \pm 0.31^e$
น้ำ (ที่อุณหภูมิ 55°C)	$42.74 \pm 1.81^d$
น้ำ (ที่อุณหภูมิ 80°C)	$51.70 \pm 0.19^c$
0.1 นอร์มัล NaOH (ที่อุณหภูมิ 55°C)	$83.53 \pm 1.71^a$
0.1 นอร์มัล NaOH (ที่อุณหภูมิ 80°C)	$74.85 \pm 1.06^b$
0.1 นอร์มัล HCl (ที่อุณหภูมิ 55°C)	$8.01 \pm 0.05^f$
0.1 นอร์มัล HCl (ที่อุณหภูมิ 80°C)	$10.01 \pm 0.37^f$

**หมายเหตุ** ตัวอักษรยกภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ ( $p < 0.05$ ) ตาม Tukey's test

### 4.3 การวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ของสารสกัดจากผักกูด

ทั้งนี้ไม่พบพอลิแซ็กคาไรด์ในสารสกัดอะซิโตนและเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 เนื่องจากพอลิแซ็กคาไรด์เป็นโมเลกุลที่มีขั้วสูง โดยในโมเลกุลจะมีหมู่ไฮดรอกซิลจำนวนมากในโครงสร้าง จึงละลายได้ดีในน้ำ รวมถึงการสกัดด้วยตัวทำละลายกรดและด่าง แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ (Gong et al., 2020; Zhang et al., 2018) ดังนั้นจึงพบพอลิแซ็กคาไรด์เฉพาะสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำ กรด และด่าง

#### 4.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมจากสารสกัดผักกูด

จากการวิเคราะห์หาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมจากสารสกัดผักกูด โดยวิเคราะห์ด้วยวิธี phenol-sulfuric acid ซึ่งปริมาณนี้รวมถึงมอโนแซ็กคาไรด์ ไดแซ็กคาไรด์ โอลิโกแซ็กคาไรด์ และพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่าปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์อยู่ในช่วง  $150.82 \pm 5.28$  ถึง  $230.68 \pm 1.26$  โดยการสกัดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ด้วยน้ำ ด่าง และกรด มีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ  $169.66 \pm 16.48$ ,  $160.73 \pm 5.08$  และ  $197.42 \pm 6.29$  มิลลิกรัมสมมูลของกลูโคสต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ ส่วนการสกัดที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ด้วยตัวทำละลายน้ำ ด่าง และกรด มีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ  $150.82 \pm 5.28$ ,  $151.64 \pm 4.43$  และ  $230.68 \pm 1.26$  มิลลิกรัมสมมูลของกลูโคสต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.3 จากข้อมูลแสดงให้เห็นว่า การสกัดด้วยกรด มีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุด

การสกัดด้วยกรดมีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมสูงสุด สอดคล้องกับการศึกษาของ Peasura et al. (2015) พบว่าการสกัดด้วยกรด มีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงกว่าน้ำและด่าง เนื่องจากการสกัดด้วยกรดจะไปทำลายพันธะไกลโคซิดิกของพอลิแซ็กคาไรด์ที่อยู่ที่ผนังเซลล์ ทำให้พอลิแซ็กคาไรด์หลุดออกจากผนังเซลล์ ทำให้วัดปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงกว่าตัวทำละลายน้ำและด่าง ซึ่งปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้มีค่าสูงสุด แปรผกผันกับร้อยละผลผลิตที่มีปริมาณต่ำสุด ซึ่งให้เห็นว่าร้อยละผลผลิตที่สูงจากการสกัดด้วยด่างมีสารอื่นผสมอยู่ เช่น โปรตีน หรือสารอื่นที่ละลายได้ดีในสภาวะต่าง จึงทำให้มีร้อยละผลผลิตสูงกว่าการสกัดด้วยกรด

ตารางที่ 4.3 ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ของสารสกัดผักกูด

ตัวทำละลาย	ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ (mg GE/g Crude Extract)	
	อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส	อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส
น้ำ	169.66 ± 16.48 <sup>b</sup>	150.82 ± 5.28 <sup>b</sup>
0.1 นอร์มัล NaOH	160.73 ± 5.08 <sup>b</sup>	151.64 ± 4.43 <sup>b</sup>
0.1 นอร์มัล HCl	197.42 ± 6.29 <sup>a</sup>	230.68 ± 1.26 <sup>a*</sup>

หมายเหตุ ตัวอักษรยกภาษาอังกฤษ แสดงถึงความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญที่ ( $p < 0.05$ ) โดยตัวอักษรยกภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก แสดงถึงความแตกต่างในคอลัมน์ และเครื่องหมายดอกจัน (\*) แสดงถึงความแตกต่างระหว่างแถว

#### 4.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณซัลเฟต

จากการวิเคราะห์หาปริมาณซัลเฟตจากสารสกัดผักกูด โดยวิเคราะห์ด้วยวิธี turbidimetric พบว่าการสกัดมีปริมาณซัลเฟตอยู่ในช่วง  $6.96 \pm 0.30$  ถึง  $14.03 \pm 0.42$  โดยการสกัดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ด้วยน้ำ ต่าง และกรด มีปริมาณซัลเฟตเท่ากับ  $8.10 \pm 0.23$ ,  $10.06 \pm 0.12$  และ  $6.96 \pm 0.30$  ตามลำดับ และการสกัดที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ด้วยน้ำ ต่าง และกรด มีปริมาณซัลเฟตเท่ากับ  $14.03 \pm 0.42$ ,  $10.28 \pm 0.06$  และ  $7.37 \pm 0.14$  ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.4 จากข้อมูลแสดงให้เห็นว่า การสกัดด้วยตัวทำละลายกรด มีปริมาณซัลเฟตต่ำสุด นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณซัลเฟตสูงขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิ

จากผลการศึกษาพบว่า การสกัดด้วยกรดมีปริมาณร้อยละซัลเฟตต่ำที่สุด (ทั้ง 2 อุณหภูมิ คือ 55 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส) สอดคล้องกับการศึกษาของ Peasura et al. (2015) พบว่าการสกัดด้วยกรดมีปริมาณซัลเฟตต่ำกว่าน้ำและต่าง และยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Fang et al. (2020) พบว่าการสกัดด้วยกรด (citric acid) มีปริมาณซัลเฟตต่ำกว่าตัวทำละลายน้ำต่าง (5% NaOH/0.05% NaBH<sub>4</sub>) และน้ำเกลือ (0.9% NaCl solution) เนื่องจากกรดไปกำจัดหมู่ซัลเฟต (sulfate group) ที่อยู่ในพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งเกิดการสลายหมู่ซัลเฟตแทนที่ในสายพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีหมู่ซัลเฟต ทำให้ปริมาณซัลเฟตต่ำกว่าตัวทำละลายน้ำและต่าง

จากปริมาณซัลเฟตที่ได้เมื่อเทียบกับปริมาณซัลเฟตที่พบในสาหร่ายไส้ไก่ ที่สกัดด้วยน้ำ กรด และต่าง ซึ่งมีค่าเท่ากับ  $40.85 \pm 0.38$ ,  $38.35 \pm 0.60$  และ  $40.84 \pm 0.92$  (g/100 g dried weight of sample) ตามลำดับ (Peasura et al., 2015) ถือว่ามีปริมาณซัลเฟตน้อยมาก ซึ่งผักกูดอาจไม่ใช่

แหล่งที่มีซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ที่สูง ดังนั้นการสกัดด้วยน้ำ กรด และด่าง อาจไม่ได้ช่วยเรื่องการสกัดมากนัก อาจเป็นไปได้ว่าผักกูดอาจจะไม่ใช่แหล่งซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์

แต่อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ปริมาณซัลเฟต หากตัวอย่างมีปริมาณซัลเฟตต่ำกว่า 5% ควรเลือกใช้การวัดด้วยวิธีอื่น เช่น วิธีการวัดค่าการนำไฟฟ้าแบบอัตโนเมตริก (conductometric method) เนื่องจากการวัดด้วยวิธีวัดความขุ่น (turbidimetric) อาจไม่แม่นยำเท่าวิธีการวัดค่าการนำไฟฟ้าแบบอัตโนเมตริก เนื่องจากตัวอย่างอาจเกิดปฏิกิริยาไม่พอ หรืออาจมีองค์ประกอบของโปรตีนเข้ามารบกวนการตรวจวัด (Arata et al., 2015)

ตารางที่ 4.4 ปริมาณซัลเฟตของสารสกัดผักกูด

ตัวทำละลาย	ปริมาณซัลเฟต (mg Sulfate/g Crude Extract)	
	อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส	อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส
น้ำ	8.10 ± 0.23 <sup>b</sup>	14.03 ± 0.42 <sup>a*</sup>
0.1 นอร์มัล NaOH	10.06 ± 0.12 <sup>a</sup>	10.28 ± 0.06 <sup>b*</sup>
0.1 นอร์มัล HCl	6.96 ± 0.30 <sup>c</sup>	7.37 ± 0.14 <sup>c</sup>

หมายเหตุ ตัวอักษรยกภาษาอังกฤษ แสดงถึงความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญที่ ( $p < 0.05$ ) โดยตัวอักษรยกภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก แสดงถึงความแตกต่างในคอลัมน์ และเครื่องหมายดอกจัน (\*) แสดงถึงความแตกต่างระหว่างแถว

#### 4.3.3 การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยเครื่อง fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)

การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากผักกูดด้วยเครื่อง FT-IR ที่ความยาวคลื่น 400-4,000  $\text{cm}^{-1}$  โดยการวิเคราะห์แบ่งเป็น 2 บริเวณ คือ บริเวณฟังก์ชัน (functional group region) เป็นบริเวณที่มีช่วงเลขคลื่นตั้งแต่ 4,000-1,500  $\text{cm}^{-1}$  ซึ่งเป็นช่วงที่พบการดูดกลืนของหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญ และบริเวณลักษณะเฉพาะของสาร (fingerprint region) เป็นบริเวณที่มีช่วงเลขคลื่นตั้งแต่ 1,500-600  $\text{cm}^{-1}$  โดยบริเวณฟังก์ชันแบ่งเป็น บริเวณการดูดกลืนของหมู่ฟังก์ชันพันธะเดี่ยว (4,000-2,500  $\text{cm}^{-1}$ ) หมู่ฟังก์ชันพันธะสาม (2,500-2,000  $\text{cm}^{-1}$ ) และหมู่ฟังก์ชันพันธะสอง (2,000-1,500  $\text{cm}^{-1}$ ) (Nandiyanto et al., 2019)

การวิเคราะห์พบเลขคลื่นในช่วง 3,500-3,200 (O-H stretching), 3,000-2,800 (C-H stretching), 1,640-1651 (aromatic C=C), 1,270-1,200 (S=O stretching), และ 880-800 (C-O-S stretching) (Droussi et al., 2009; Korva et al., 2016; Türker-Kaya & Huck, 2017; Udchumpisai & Bangyeekhun, 2020) แสดงดังภาพที่ 4.2 ซึ่งการวิเคราะห์ FT-IR เพื่อยืนยันซัลเฟตที่อยู่ในโครงสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ โดยพิจารณา 2 ช่วงคลื่น คือ S=O stretching และ C-O-S stretching

ในช่วง  $3,423\text{ cm}^{-1}$  ของตัวอย่าง ปรากฏพีคที่มีลักษณะกว้าง แสดงถึง O-H stretching ของหมู่แอลกอฮอล์ ซึ่งในโมเลกุลจะมีหมู่ไฮดรอกซิลจำนวนมากในโครงสร้าง ทำให้สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับน้ำได้ดี จึงทำให้พอลิแซ็กคาไรด์สามารถดูดความชื้นได้ดี

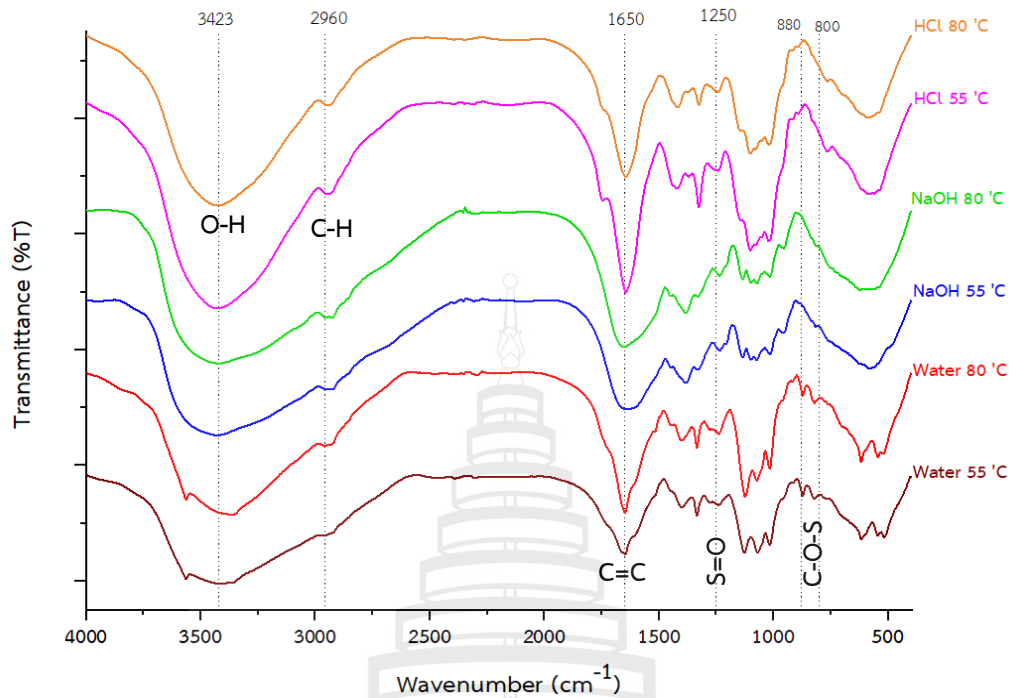
ในช่วง  $2,960\text{ cm}^{-1}$  แสดงถึง C-H stretching (aliphatic) ของหมู่เมทิล

ในช่วง  $1,650\text{ cm}^{-1}$  แสดงถึง aromatic C=C ของสารประกอบฟีนอลิก นอกจากนี้ยังรวมถึงช่วง amide I ซึ่งสารสกัดอาจประกอบด้วยโปรตีนอยู่ในโครงสร้าง

ในช่วง  $1,250\text{ cm}^{-1}$  แสดงถึง S=O stretching ของหมู่ซัลเฟต

ในช่วง  $820\text{ cm}^{-1}$  แสดงถึง C-O-S stretching หมู่ซัลเฟตแทนที่ในโครงสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ จากการพิจารณา 2 ช่วงคลื่น คือ S=O stretching และ C-O-S stretching (หรือ C-O-SO<sub>3</sub>) ที่บริเวณลักษณะเฉพาะของสาร (fingerprint region) พบ S=O stretching ในโครงสร้างของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดด้วยน้ำ กรด และด่าง แต่ช่วง C-O-S stretching พบเฉพาะในสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำ ที่เลขคลื่น  $820\text{ cm}^{-1}$  และไม่พบในสารสกัดฝักกูดที่สกัดด้วยตัวทำละลายกรดและด่าง ทั้งนี้ อาจเนื่องจากการวิเคราะห์ปริมาณซัลเฟตก่อนหน้านี้ อาจมีการรบกวนการตรวจวัดของสารอื่น เช่น โปรตีน หรืออาจจะมีซัลเฟตน้อยมาก ๆ จนไม่สามารถตรวจวัดได้ ทำให้ตรวจวัดไม่พบ C-O-S stretching ในสารสกัดที่สกัดด้วยกรดและด่าง

ดังนั้นจากข้อมูลข้างต้นสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดมาได้ อาจไม่ใช่พอลิแซ็กคาไรด์เพียงชนิดเดียว พอลิแซ็กคาไรด์อาจมีได้หลากหลายชนิด และซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์อาจเป็นส่วนหนึ่งหรือประเภทหนึ่งของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัด



ภาพที่ 4.2 FT-IR spectrum ของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์

#### 4.4 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดผักกูด ด้วยวิธี ABTS radical cation scavenging activity แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโทรลอกซ์ แสดงผลเป็นปริมาณมิลลิกรัมสมมูลของโทรลอกซ์ต่อกรัมสารสกัด พบว่าสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำสุดคือ สารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายกรด มีค่าเท่ากับ  $30.15 \pm 0.71$  และ  $35.94 \pm 0.83$  ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดต่างมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด มีค่าเท่ากับ  $409.94 \pm 5.71$  และ  $397.53 \pm 3.89$  ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และสารสกัดน้ำ เท่ากับ  $187.24 \pm 1.25$  และ  $213.13 \pm 2.60$  ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ส่วนสารสกัดเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 และอะซิโตนมีค่าเท่ากับ  $165.72 \pm 0.60$  และ  $81.50 \pm 0.50$  ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.5

สอดคล้องกับการศึกษาของ Zhou et al. (2020) ที่ทำการสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์จากใบ *Apocynum venetum* ด้วยตัวทำละลายน้ำ กรด และด่าง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และ 90 องศาเซลเซียส เมื่อวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, ABTS และ reducing power พบว่าทั้ง 3 วิธีให้ผลเหมือนกันคือ ตัวทำละลายต่างแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด ซึ่งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีความสอดคล้องกับปริมาณฟีนอลิกที่สูงขึ้น แต่ผลการศึกษาที่ได้ไม่สอดคล้องกับการศึกษาของ Hayati et al. (2019) ที่ทำการสกัดผักกูดโดยใช้ตัวทำละลายน้ำที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส, กรด (1 M citric acid) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และด่าง (1 M NaOH) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส แล้วทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด อาจเนื่องจากวิธีการสกัด เวลา สภาวะ รวมถึงแหล่งของตัวอย่างที่ต่างกัน จึงทำให้ผลของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ได้ไม่สอดคล้องกัน

#### ตารางที่ 4.5 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผักกูด

ตัวทำละลาย	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (mg TEAC/g Crude Extract)
อะซิโตน	81.50 ± 0.50 <sup>f</sup>
เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95	165.72 ± 0.60 <sup>e</sup>
น้ำ (ที่อุณหภูมิ 55°C)	187.24 ± 1.25 <sup>d</sup>
น้ำ (ที่อุณหภูมิ 80°C)	213.13 ± 2.60 <sup>c</sup>
0.1 นอร์มัล NaOH (ที่อุณหภูมิ 55°C)	409.94 ± 5.71 <sup>a</sup>
0.1 นอร์มัล NaOH (ที่อุณหภูมิ 80°C)	397.53 ± 3.89 <sup>b</sup>
0.1 นอร์มัล HCl (ที่อุณหภูมิ 55°C)	30.15 ± 0.71 <sup>s</sup>
0.1 นอร์มัล HCl (ที่อุณหภูมิ 80°C)	35.94 ± 0.83 <sup>s</sup>

หมายเหตุ ตัวอักษรยกภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ ( $p < 0.05$ )

ตาม Tukey's test

#### 4.5 การวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

การวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดผักกูด ด้วยวิธี dopachrome โดยใช้ substrate คือ L-dopa แล้วนำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดโคจิก แสดงผลเป็น ปริมาณมิลลิกรัมสมมูลของกรดโคจิกต่อกรัมสารสกัด จากการศึกษาพบว่าสารสกัดจากผักกูดมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสอยู่ในช่วง  $3.22 \pm 0.78$  ถึง  $382.11 \pm 9.67$  ดังตารางที่ 4.6 โดยสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากที่สุดคือ สารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตน มีค่าเท่ากับ  $382.11 \pm 9.67$  รองลงมาคือตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 เท่ากับ  $337.28 \pm 5.29$  ส่วนสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสอยู่ระดับกลางคือ สารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและต่าง ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส เท่ากับ  $26.74 \pm 0.90$ ,  $22.70 \pm 1.66$ ,  $21.92 \pm 1.94$  และ  $28.87 \pm 3.00$  ตามลำดับ และสารสกัดที่สกัดจากตัวทำละลายกรด มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสต่ำสุด เท่ากับ  $3.22 \pm 0.78$  และ  $4.45 \pm 3.00$  อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

เมื่อวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นค่า  $IC_{50}$  พบว่าสารสกัดฟีนอลิกที่สกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตนและเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 มีค่าเท่ากัน เท่ากับ  $0.14 \pm 0.02$  และ  $0.14 \pm 0.01$  ตามลำดับ จากข้อมูลจะเห็นว่าสารสกัดที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่สูงคือ สารสกัดฟีนอลิก ส่วนสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ต่ำกว่า อาจเป็นไปได้ว่าเป็นสารประกอบฟีนอลิกคนละกลุ่มกัน ซึ่งจากการศึกษาของ Kunkeaw et al. (2021) ได้ทำการสกัดสารจากผักกูดด้วยตัวทำละลายเอทานอลพบสารประกอบฟีนอลิกในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ rutin และ quercetin สำหรับสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดด้วยน้ำ กรด และต่าง ทำให้ได้สารประกอบฟีนอลิกกลุ่มที่สามารถละลายน้ำ หรือที่ฝังแน่นอยู่ที่ผนังเซลล์หลุดออกมา ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่รวมอยู่กับพอลิแซ็กคาไรด์หรือน้ำตาลในรูปไกลโคไซด์ การมีน้ำตาลรวมอยู่ในโมเลกุลทำให้โครงสร้างหรือขนาดโมเลกุลใหญ่ขึ้น จำนวนน้ำตาลที่มากขึ้นยิ่งทำให้ขนาดโมเลกุลใหญ่ขึ้น และขนาดโมเลกุลที่ใหญ่ขึ้นนั้นจะไปขัดขวางการเข้าถึงบริเวณเร่งของเอนไซม์ ทำให้ความสามารถในการจับกับคอปเปอร์บริเวณเร่งน้อยลง ส่งผลให้ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ต่ำกว่าสารสกัดฟีนอลิก (Fu et al., 2005; Karioti et al., 2007; Yang et al., 2012)

นอกจากนี้การศึกษาของ Fitriani (2021) การประยุกต์ใช้ครีมสารสกัดผักกูด 25% ป้องกันการเพิ่มขึ้นของปริมาณเมลานินและการลดลงของปริมาณคอลลาเจนในผิวหนังของหนู ที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสียูวีบี ผลการศึกษาพบว่าสามารถป้องกันการเพิ่มขึ้นของเมลานินและการลดลงของคอลลาเจน

ซึ่งสารสกัดผักกูดมีสารออกฤทธิ์คือ ฟลาโวนอยด์ ซึ่งฟลาโวนอยด์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ที่สามารถป้องกันการเกิดจุดดำผ่านการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส นอกจากฟลาโวนอยด์แล้ว สารสกัดผักกูดยังประกอบด้วยวิตามินซี ซึ่งนอกจากจะเป็นสารต้านอนุมูลอิสระแล้ว วิตามินซียังเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยการจับกับโลหะคอปเปอร์ของไทโรซิเนสที่บริเวณเร่ง (active site)

จากฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดพีนอลิกที่สกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตนและเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ที่มีประสิทธิภาพดี จึงน่าสนใจมากที่จะนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งเมลานินในทางเครื่องสำอาง

#### ตารางที่ 4.6 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดผักกูด

ตัวทำละลาย	ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (mg KAE/g Crude Extract)	ร้อยละการยับยั้ง IC <sub>50</sub> (mg/ml)
อะซิโตน	382.11 ± 9.67 <sup>a</sup>	0.14 ± 0.02 <sup>a</sup>
เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95	337.28 ± 5.29 <sup>b</sup>	0.14 ± 0.01 <sup>a</sup>
น้ำ (ที่อุณหภูมิ 55°C)	26.74 ± 0.90 <sup>c</sup>	-
น้ำ (ที่อุณหภูมิ 80°C)	22.70 ± 1.66 <sup>c</sup>	-
0.1 นอร์มัล NaOH (ที่อุณหภูมิ 55°C)	21.92 ± 1.94 <sup>c</sup>	-
0.1 นอร์มัล NaOH (ที่อุณหภูมิ 80°C)	28.87 ± 3.00 <sup>c</sup>	-
0.1 นอร์มัล HCl (ที่อุณหภูมิ 55°C)	3.22 ± 0.78 <sup>d</sup>	-
0.1 นอร์มัล HCl (ที่อุณหภูมิ 80°C)	4.45 ± 3.00 <sup>d</sup>	-
<b>สารมาตรฐานกรดโคจิก</b>		<b>0.0467 ± 0.006</b>

หมายเหตุ ตัวอักษรยกภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ ( $p < 0.05$ ) ตาม Tukey's test

#### 4.6 การวิเคราะห์สหสัมพันธ์

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพอลิแซ็กคาไรด์ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางโครงสร้างที่หลากหลาย เช่น องค์ประกอบทางเคมี, องค์ประกอบโมโนแซ็กคาไรด์, มวลโมเลกุล, กลุ่มฟังก์ชัน และประเภทของการเชื่อมไกลโคซิดิก เป็นต้น (He et al, 2020; Lin et al, 2019) จากการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ด้วย Pearson's correlation coefficient ระหว่างปริมาณฟีนอลิก ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ ปริมาณซัลเฟต กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แสดงค่าเป็นค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient;  $r$ ) พบว่าปริมาณฟีนอลิกกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.979 ซึ่งมีความสัมพันธ์ในระดับสูงมาก ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ในสารสกัดมีความสัมพันธ์ในเชิงลบกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ อยู่ในระดับสูง ( $r = -0.781$ ) หมายความว่าหากมีพอลิแซ็กคาไรด์ในสารสกัดมากขึ้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะน้อยลง และความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณซัลเฟตกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ( $r = 0.519$ ) อยู่ในระดับปานกลาง ดังตารางที่ 4.7

ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลิกกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ( $r = 0.979$ ) ซึ่งมีความสัมพันธ์ในระดับสูงมาก สอดคล้องกับการศึกษาของ Zhou et al. (2020) ที่พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีความสอดคล้องกับปริมาณฟีนอลิกที่สูงขึ้น จึงทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง

ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ในสารสกัดมีความสัมพันธ์ในเชิงลบกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ( $r = -0.781$ ) สอดคล้องกับการศึกษาของ Imjongjairak et al. (2016) ที่สกัดสาหร่ายผสมนาง (*Gracilaria fisheri*) พบว่าความสัมพันธ์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ในสารสกัดมีความสัมพันธ์ในเชิงลบกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ( $r = -0.995$ ) ซึ่งให้เห็นว่าชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharides) มีผลต่อประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ มีรายงานว่าองค์ประกอบของน้ำตาลหรือชนิดของน้ำตาลเป็นตัวแปรสำคัญที่มีอิทธิพลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดย Siriamornpun et al. (2021) ได้ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบโมโนแซ็กคาไรด์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าแมนโนสมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH, ABTS, OH scavenging และ FRAP) เท่ากับ 0.971, 0.918, 0.907 และ 0.985 ตามลำดับ และกาแลคโทสมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH, ABTS, OH scavenging และ FRAP) เท่ากับ 0.861, 0.970, 0.933 และ 0.926 ตามลำดับ ดังนั้นหากสารสกัดมีปริมาณแมนโนสและกาแลคโทสที่สูงก็จะมีประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น ซึ่งจากผลการวิเคราะห์  $r = -0.781$  อาจเป็นไปได้ว่าสารสกัดมีปริมาณแมนโนสและกาแลคโทสอยู่ในสารสกัดน้อย จึงทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำ

ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณซัลเฟตกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอยู่ในระดับปานกลาง ซึ่งฤทธิ์ทางชีวภาพขึ้นอยู่กับการกระจายตัวของหมู่ซัลเฟตในโมเลกุลซ้ำ ๆ กัน แต่อาจเนื่องจากปริมาณหมู่ซัลเฟตในตัวอย่างมีปริมาณน้อย จึงทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอยู่ในระดับปานกลาง ซึ่งการมีหมู่ซัลเฟตอยู่ในพอลิแซ็กคาไรด์มีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Wang et al., 2009)

จากการศึกษาสรุปได้ว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ซึ่งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูงเนื่องมาจากปริมาณฟีนอลิกที่สูงขึ้นในสารสกัด

#### ตารางที่ 4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารองค์ประกอบกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ปริมาณสารองค์ประกอบ	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก	0.979 **
ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์	- 0.781 **
ปริมาณซัลเฟต	0.518 *

หมายเหตุ เครื่องหมายดอกจัน (\*\*) แสดงถึงความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญที่ ( $p < 0.01$ )

เครื่องหมายดอกจัน (\*) แสดงถึงความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญที่ ( $p < 0.05$ )

## บทที่ 5

### สรุปผลการศึกษาวิจัย และข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการศึกษาวิจัย

การสกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตนและเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 สารสกัดที่ได้มีสีเขียวเข้ม ปริมาณร้อยละผลผลิตของสารสกัดพินอลิกต่ำกว่าพอลิแซ็กคาไรด์ โดยปริมาณสารประกอบพินอลิกรวมไม่แตกต่างกันระหว่างสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตนและเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 เมื่อวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS พบว่าสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 สูงกว่าการสกัดด้วยอะซิโตนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าสารสกัดพินอลิกแสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงกว่าสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ โดยสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตนและเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $0.14 \pm 0.02$  และ  $0.14 \pm 0.01$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (โดยค่า  $IC_{50}$  ของสารมาตรฐานกรดโคจิก เท่ากับ  $0.0467 \pm 0.006$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

การสกัดด้วยตัวทำละลาย น้ำ กรด และด่าง (ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส) จะได้สารสกัดสีน้ำตาล โดยปริมาณร้อยละผลผลิตสูงสุดเมื่อสกัดด้วยด่าง นอกจากนี้การสกัดด้วยด่าง (ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส) พบว่ามีปริมาณสารประกอบพินอลิกรวมสูงสุด เท่ากับ  $83.53 \pm 1.71$  มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด ส่วนปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมสูงในสารสกัดที่สกัดด้วยกรด (ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส) เท่ากับ  $230.68 \pm 1.26$  มิลลิกรัมสมมูลของกลูโคสต่อกรัมสารสกัด และมีปริมาณซัลเฟตสูงในสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำ (ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส) เท่ากับ  $14.03 \pm 0.42$  มิลลิกรัมสมมูลของซัลเฟตต่อกรัมสารสกัด เมื่อทดสอบวิเคราะห์ FT-IR สเปกตรัมพบหมู่ซัลเฟตในสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำ (ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส)

สารสกัดผักกูดที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง (ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส) แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด เท่ากับ  $409.94 \pm 5.71$  มิลลิกรัมสมมูลของโทรลอคซ์ต่อกรัมสารสกัด เมื่อวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำและต่าง แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในระดับกลาง และต่ำสุดในสารสกัดที่สกัดด้วยกรด จากการวิเคราะห์สหสัมพันธ์พบว่าปริมาณฟีนอลิกกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์ในระดับสูงมาก ดังนั้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูงเนื่องมาจากปริมาณฟีนอลิกที่สูงขึ้นในสารสกัด

จากผลการศึกษาการเตรียมสารสกัดจากผักกูดด้วยวิธีการสกัดแบบลำดับขั้น ทำให้ได้สารสกัดที่มีความหลากหลายและมีความเฉพาะเจาะจงมากขึ้น นอกจากนี้ยังทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงขึ้น รวมถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มสูงขึ้นด้วยเช่นกัน โดยเฉพาะสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดในขณะที่สารสกัดฟีนอลิกที่สกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตนและเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่สูงด้วย ดังนั้นสารสกัดฟีนอลิกและพอลิแซ็กคาไรด์ สามารถใช้เป็นสารออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งเมลานินในทางเครื่องสำอางได้

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรนำสารสกัดผักกูดไปวิเคราะห์สารประกอบในสารสกัดด้วยวิธี HPLC เพื่อหาสารประกอบสำคัญที่มีผลต่อฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส รวมถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้สารมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบควรมากพอที่จะอธิบายผลที่ได้จากการศึกษา

5.2.2 ควรศึกษาการหาปริมาณซัลเฟตในสารสกัดด้วยวิธีอื่นเพิ่มเติม เช่น วิธีการวัดค่าการนำไฟฟ้าแบบอัตโนมัติ (conductometric method) ในกรณีที่ในสารสกัดมีปริมาณซัลเฟตต่ำกว่า 5% ซึ่งการทดสอบโดยวัดความขุ่นอาจเกิดปฏิกิริยาไม่พอ หรืออาจมีองค์ประกอบของโปรตีนเข้ามารบกวนการตรวจวัด



รายการอ้างอิง

## รายการอ้างอิง

- ธนศ ว่องอาทรกุล. (2557). *การสกัดสารเบต้าแคโรทีนจากกระแตไต่ไม้ ผักกูด และผักแว่น* (วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต). มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- ปนัดดา ทินบุตร. (2554). *การศึกษาสารสกัดจากพืชตระกูลเฟินที่มีฤทธิ์ยับยั้งแอลฟา-กลูโคซิเดส* (วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต). มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- ประไพพิศ อินเสน. (2561). การยับยั้งกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินจากพืชกลุ่มเบอร์รี่ไทย. *วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเซีย*, 12(2), 69-81.
- ลือชัย บุตคุป. (2554). สารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ทางชีวภาพ. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม*, 31(4), 443-455.
- วรรธิตา ชัยญาณะ. (2561). *เส้นทางสู่ผลิตภัณฑ์ลดเลือนริ้วรอยแห่งวัย* (พิมพ์ครั้งที่ 2). โอ เอส พรีนติ้ง เฮ้าส์.
- สินีนานู ภูระยับ, ลภัสสรดา มุ่งหมาย, เกียรติศักดิ์ เม่งอำพัน, ณัฐวุฒิ หวังสมนึก และดวงพร อมรเลิศพิศาล. (2564). ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากดอกเก๊กฮวยอินทรีย์เพื่อใช้ในเครื่องสำอาง. *วารสารวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร*, 38(2), 46-56.
- สุวรรณา บุญตา, กัญฐิกา จิวพงษ์, สุรางค์รัตน์ พันแสง และพวงผกา แก้วกรม. (2563). คุณค่าทางโภชนาการของผักพื้นบ้าน 5 ชนิด จากอำเภอหล่มเก่า จังหวัดเพชรบูรณ์. *แก่นเกษตร*, 48(1), 31-36.
- สุวรรณี ทองมาลี. (2557). *การใช้วิธีทางเคมีในการลดขนาดและเติมหมู่ซัลเฟตในอัลจินตพอลิเมอร์เพื่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ* (วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต). มหาวิทยาลัยศิลปากร.

- Abotaleb, M., Samuel, S. M., Varghese, E., Varghese, S., Kubatka, P., Liskova, A., . . . Büsselberg, D. (2018). Flavonoids in cancer and apoptosis. *Cancers*, *11*(1), Article 28. <https://doi.org/10.3390/cancers11010028>
- Acosta-Estrada, B. A., Gutiérrez-Urbe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2014). Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, *152*, 46-55.
- Akter, S., Hossain, M. M., Ara, I., & Akhtar, P. (2014). Investigation of in vitro antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activity of *Diplazium esculentum* (Retz.) Sw. *International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry*, *3*(3), 723-733.
- Ale, M. T., Mikkelsen, J. D., & Meyer, A. S. (2011). Important determinants for fucoidan bioactivity: A critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds. *Marine Drugs*, *9*(10), 2106-2130.
- Amit, S., Sunil, K., Bhatt, S. P., & Arvind, N. (2011). Antibacterial activity of *Diplazium esculentum* (Retz.) Sw. *Pharmacognosy Journal*, *3*(21), 77-79.
- Arata, P. X., Fernández, P. V., & Ciancia, M. (2015). Determination of substitution patterns of galactans from green seaweeds of the bryopsidales. In *Natural Products From Marine Algae* (pp. 313-323). Humana Press.
- Carocho, M., & Ferreira, I. C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, *51*, 15-25.
- Cheng, W., Li, J., You, T., & Hu, C. (2005). Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of the extracts from the inflorescence of *Chrysanthemum indicum* Linne. *Journal of Ethnopharmacology*, *101*(1-3), 334-337.

- Chettri, S., Manivannan, S., & Muddarsu, V. R. (2018). Nutrient and elemental composition of wild edible ferns of the himalaya. *American Fern Journal*, 108(3), 95-106.
- Choi, K. T., Kim, J. H., Cho, H. T., Lim, S. S., Kwak, S. S., & Kim, Y. J. (2016). Dermatologic evaluation of cosmetic formulations containing *Chrysanthemum indicum* extract. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 15(2), 162-168.
- Choudhury, J., Majumdar, S., Roy, S., & Chakraborty, U. (2017). Antioxidant activity and phytochemical screening of two edible wetland pteridophytes *Diplazium esculentum* (Retz) Sw. and *Marsilea minuta* L.–a comparative study. *World Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, 3(9), 195-203.
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352.
- Das, B., Paul, T., Apte, K. G., Chauhan, R., & Saxena, R. C. (2013). Evaluation of antioxidant potential & quantification of polyphenols of *Diplazium esculentum* Retz. with emphasis on its HPTLC chromatography. *Journal of Pharmacy Research*, 6(1), 93-100.
- Devi, K. P., Suganthy, N., Kesika, P., & Pandian, S. K. (2008). Bioprotective properties of seaweeds: In vitro evaluation of antioxidant activity and antimicrobial activity against food borne bacteria in relation to polyphenolic content. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 8(1), 1-11.
- Droussi, Z., D'orazio, V., Provenzano, M. R., Hafidi, M., & Ouattmane, A. (2009). Study of the biodegradation and transformation of olive-mill residues during composting using FTIR spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Journal of Hazardous Materials*, 164(2-3), 1281-1285.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356.

- Ebanks, J. P., Wickett, R. R., & Boissy, R. E. (2009). Mechanisms regulating skin pigmentation: The rise and fall of complexion coloration. *International Journal of Molecular Sciences*, *10*(9), 4066-4087.
- Fang, C., Chen, G., & Kan, J. (2020). Comparison on characterization and biological activities of *Mentha haplocalyx* polysaccharides at different solvent extractions. *International Journal of Biological Macromolecules*, *154*, 916-928.
- Fitriani, E. (2021). *The application of topical leaves vegetable fern (Diplazium esculentum) extract cream 25% prevented amount of melanin increase and amount of collagen decrease in in ultraviolet B-induced guinea pigs (Cavia porcelus) skin* (Master's Thesis). Udayana University.
- Fu, B., Li, H., Wang, X., Lee, F. S., & Cui, S. (2005). Isolation and identification of flavonoids in licorice and a study of their inhibitory effects on tyrosinase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(19), 7408-7414.
- Gomez, L., Tiwari, B., & Garcia-Vaquero, M. (2020). Emerging extraction techniques: Microwave-assisted extraction. In *Sustainable Seaweed Technologies* (pp. 207-224). Elsevier.
- Gong, P., Wang, S., Liu, M., Chen, F., Yang, W., Chang, X., . . . Chen, X. (2020). Extraction methods, chemical characterizations and biological activities of mushroom polysaccharides: A mini-review. *Carbohydrate Research*, *494*, Article 108037. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.108037>
- Hayati, I. N., Suhaimi, A., & Bakar, N. F. (2019). Antioxidant activities and functional properties of complex polysaccharide (mucilage) in vegetable fern (*Diplazium esculentum*). *Asian Food Science Journal*, *6*(2), 1-8.

- He, J. L., Guo, H., Wei, S. Y., Zhou, J., Xiang, P. Y., Liu, L., . . . Wu, D. T. (2020). Effects of different extraction methods on the structural properties and bioactivities of polysaccharides extracted from Qingke (Tibetan hulless barley). *Journal of Cereal Science*, *92*, Article 102906. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2020.102906>
- Imjongjairak, S., Ratanakhanokchai, K., Laohakunjit, N., Tachaapaikoon, C., Pason, P., & Waeonukul, R. (2016). Biochemical characteristics and antioxidant activity of crude and purified sulfated polysaccharides from *Gracilaria fisheri*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *80*(3), 524-532.
- Jing, L., Jiang, J. R., Liu, D. M., Sheng, J. W., Zhang, W. F., Li, Z. J., . . . Wei, L. Y. (2019). Structural characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Athyrium multidentatum* (Doll.) Ching in d-galactose-induced aging mice via PI3K/AKT pathway. *Molecules*, *24*(18), 3364.
- Kammeyer, A., & Luiten, R. M. (2015). Oxidation events and skin aging. *Ageing Research Reviews*, *21*, 16-29.
- Karioti, A., Protopappa, A., Megoulas, N., & Skaltsa, H. (2007). Identification of tyrosinase inhibitors from *Marrubium velutinum* and *Marrubium cylleneum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *15*(7), 2708-2714.
- Khoddami, A., Wilkes, M. A., & Roberts, T. H. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, *18*(2), 2328-2375.
- Korva, H., Kärkkäinen, J., Lappalainen, K., & Lajunen, M. (2016). Spectroscopic study of natural and synthetic polysaccharide sulfate structures. *Starch-Stärke*, *68*(9-10), 854-863.
- Kunkeaw, T., Suttisansanee, U., Trachootham, D., Karinchai, J., Chantong, B., Potikanond, S., . . . Temviriyankul, P. (2021). *Diplazium esculentum* (Retz.) Sw. reduces BACE-1 activities and amyloid peptides accumulation in *Drosophila* models of Alzheimer's disease. *Scientific reports*, *11*(1), 1-11.

- Lin, X., Ji, X., Wang, M., Yin, S., & Peng, Q. (2019). An alkali-extracted polysaccharide from *Zizyphus jujuba* cv. Muzao: Structural characterizations and antioxidant activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, *136*, 607-615.
- Liu, S. C., Lin, J. T., Wang, C. K., Chen, H. Y., & Yang, D. J. (2009). Antioxidant properties of various solvent extracts from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) flowers. *Food Chemistry*, *114*(2), 577-581.
- Makahleh, A., Saad, B., & Bari, M. F. (2015). Synthetic phenolics as antioxidants for food preservation. In *Handbook of antioxidants for food preservation* (pp. 51-78). Woodhead Publishing.
- Medina-Torres, N., Ayora-Talavera, T., Espinosa-Andrews, H., Sánchez-Contreras, A., & Pacheco, N. (2017). Ultrasound assisted extraction for the recovery of phenolic compounds from vegetable sources. *Agronomy*, *7*(3), Article 47. <https://doi.org/10.3390/agronomy7030047>
- Mohammed, A. S. A., Naveed, M., & Jost, N. (2021). Polysaccharides; classification, chemical properties, and future perspective applications in fields of pharmacology and biological medicine (a review of current applications and upcoming potentialities). *Journal of Polymers and the Environment*, *29*(8), 2359-2371.
- Nandiyanto, A. B. D., Oktiani, R., & Ragadhita, R. (2019). How to read and interpret FTIR spectroscopy of organic material. *Indonesian Journal of Science and Technology*, *4*(1), 97-118.
- Olasehinde, T. A., Mabinya, L. V., Olaniran, A. O., & Okoh, A. I. (2019). Chemical characterization, antioxidant properties, cholinesterase inhibitory and anti-amyloidogenic activities of sulfated polysaccharides from some seaweeds. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, *18*, Article 100182. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2019.100182>

- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, 1-15.
- Pavel, S. (1993). Dynamics of melanogenesis intermediates. *Journal of Investigative Dermatology*, 100(2), S162-S165.
- Peasura, N. (2015). *Sulfated polysaccharide of Ulva intestinalis and their biological activities* (Doctoral dissertation). King Mongkut's University of Technology Thonburi.
- Peasura, N., Laohakunjit, N., Kerdchoechuen, O., & Wanlapa, S. (2015). Characteristics and antioxidant of *Ulva intestinalis* sulphated polysaccharides extracted with different solvents. *International Journal of Biological Macromolecules*, 81, 912–919.
- Poljšak, B., & Dahmane, R. (2012). Free radicals and extrinsic skin aging. *Dermatology research and practice*, 2012, Article 135206. <https://doi.org/10.1155/2021/135206>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Roy, S., & Chaudhuri, T. K. (2020). A comprehensive review on the pharmacological properties of *Diplazium esculentum*, an edible fern. *Journal of Pharmaceutics and Pharmacology Research*, 3, 1-9.
- Semwal, P., Painuli, S., Painuli, K. M., Antika, G., Tumer, T. B., Thapliyal, A., . . . Cho, W. C. (2021). *Diplazium esculentum* (Retz.) Sw.: Ethnomedicinal, phytochemical, and pharmacological overview of the himalayan ferns. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, Article 1917890. <https://doi.org/10.1155/2021/1917890>

- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects— A review. *Journal of functional foods*, 18, 820-897.
- Shahidi, F., & Yeo, J. (2016). Insoluble-bound phenolics in food. *Molecules*, 21(9), Article 1216. <https://doi.org/10.3390/molecules21091216>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in Enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178). Academic Press.
- Siriamornpun, S., Kaewseejan, N., Chumroenphat, T., & Inchuen, S. (2021). Characterization of polysaccharides from *Gynura procumbens* with relation to their antioxidant and anti-glycation potentials. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 32, Article 101957. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.101957>
- Sirichai, P., Kittibunchakul, S., Thangsiri, S., On-Nom, N., Chupeerach, C., Temviriyankul, P., . . . Suttisansanee, U. (2022). Impact of drying processes on phenolics and in vitro health-related activities of indigenous plants in Thailand. *Plants*, 11(3), 294.
- Tabiano, J., & Deliman, Y. (2014). In vitro inhibitory activity of *Atuna racemosa*, *Euphorbia hirta* and *Diplazium esculentum* juices against  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. In *International Seminar on Science and Technology* (pp.89-93). Jember.
- Tiensri, N. (2019). *Glucose palmitate and glucose palmate synthesis catalyzed by Carica papaya latex lipase* (Master's Thesis). Mae Fah Luang University.
- Tongco, J. V. V., Villaber, R. A. P., Aguda, R. M., & Razal, R. A. (2014). Nutritional and phytochemical screening, and total phenolic and flavonoid content of *Diplazium esculentum* (Retz.) Sw. from Philippines. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(8), 238-242.

- Türker-Kaya, S., & Huck, C. W. (2017). A review of mid-infrared and near-infrared imaging: Principles, concepts and applications in plant tissue analysis. *Molecules*, *22*(1), 168.
- Tyrrell, R. M., & Pidoux, M. (1986). Endogenous glutathione protects human skin fibroblasts against the cytotoxic action of UVB, UVA and near-visible radiations. *Photochemistry and Photobiology*, *44*(5), 561-564.
- Udchumpisai, W., & Bangyeekhun, E. (2020). Purification, structural characterization, and biological activity of polysaccharides from *Lentinus velutinus*. *Mycobiology*, *48*(1), 51-57.
- Wang, J., Zhang, Q., Zhang, Z., Zhang, J., & Li, P. (2009). Synthesized phosphorylated and aminated derivatives of fucoidan and their potential antioxidant activity in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules*, *44*(2), 170-174.
- Wanyo, P., Kaewseejan, N., Meeso, N., & Siriamornpun, S. (2016). Bioactive compounds and antioxidant properties of different solvent extracts derived from Thai rice by-products. *Applied Biological Chemistry*, *59*(3), 373-384.
- Watanabe, M., Miyashita, T., & Devkota, H. P. (2021). Phenolic compounds and ecdysteroids of *Diplazium esculentum* (Retz.) Sw. (Athyriaceae) from Japan and their chemotaxonomic significance. *Biochemical Systematics and Ecology*, *94*, Article 104211. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2020.104211>
- Yang, Z., Zhang, Y., Sun, L., Wang, Y., Gao, X., & Cheng, Y. (2012). An ultrafiltration high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector and mass spectrometry approach for screening and characterising tyrosinase inhibitors from mulberry leaves. *Analytica Chimica Acta*, *719*, 87-95.
- Yi, Y., Xu, W., Wang, H. X., Huang, F., & Wang, L. M. (2020). Natural polysaccharides experience physiochemical and functional changes during preparation: A review. *Carbohydrate Polymers*, *234*, Article 115896. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.115896>

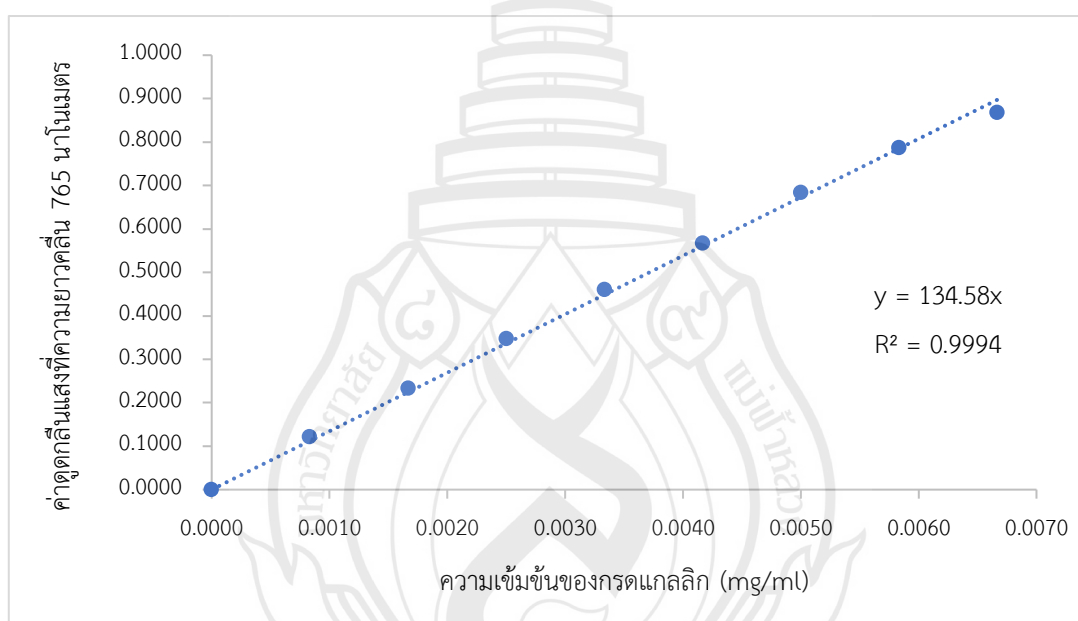
- Zhang, H., Chen, J., Li, J., Yan, L., Li, S., Ye, X., . . . Chen, S. (2018). Extraction and characterization of RG-I enriched pectic polysaccharides from mandarin citrus peel. *Food Hydrocolloids*, 79, 579-586.
- Zhou, J., Zou, P., Jing, C., Xu, Z., Zhou, S., Li, Y., . . . Yuan, Y. (2020). Chemical characterization and bioactivities of polysaccharides from *Apocynum venetum* leaves extracted by different solvents. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(1), 244-253.
- Zihad, S. N. K., Gupt, Y., Uddin, S. J., Islam, M. T., Alam, M. R., Aziz, S., . . . Sarker, S. D. (2019). Nutritional value, micronutrient and antioxidant capacity of some green leafy vegetables commonly used by southern coastal people of Bangladesh. *Heliyon*, 5(11), Article e02768. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02768>



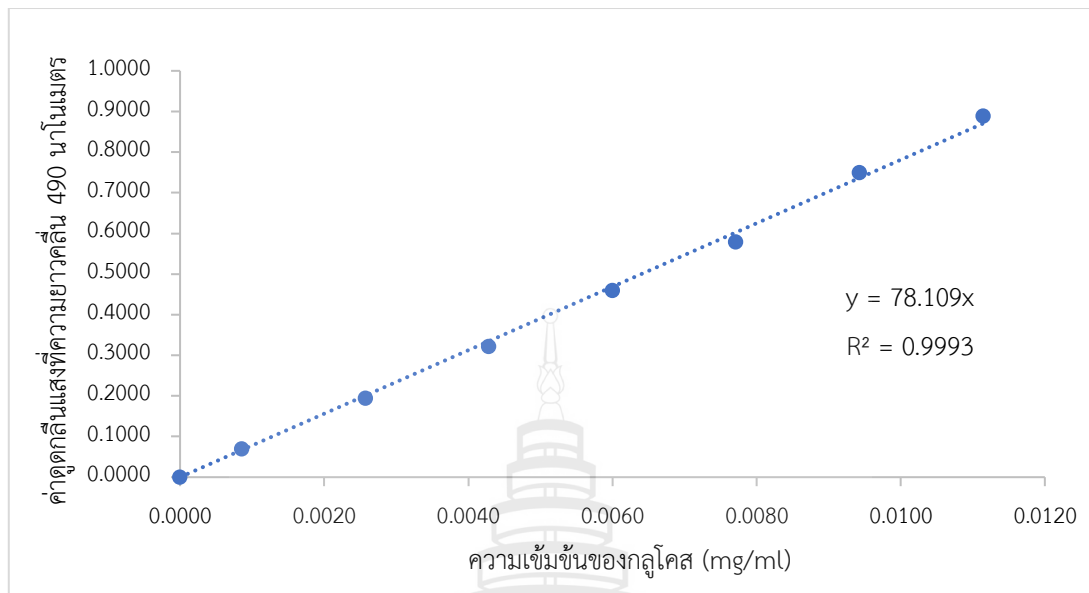


## ภาคผนวก

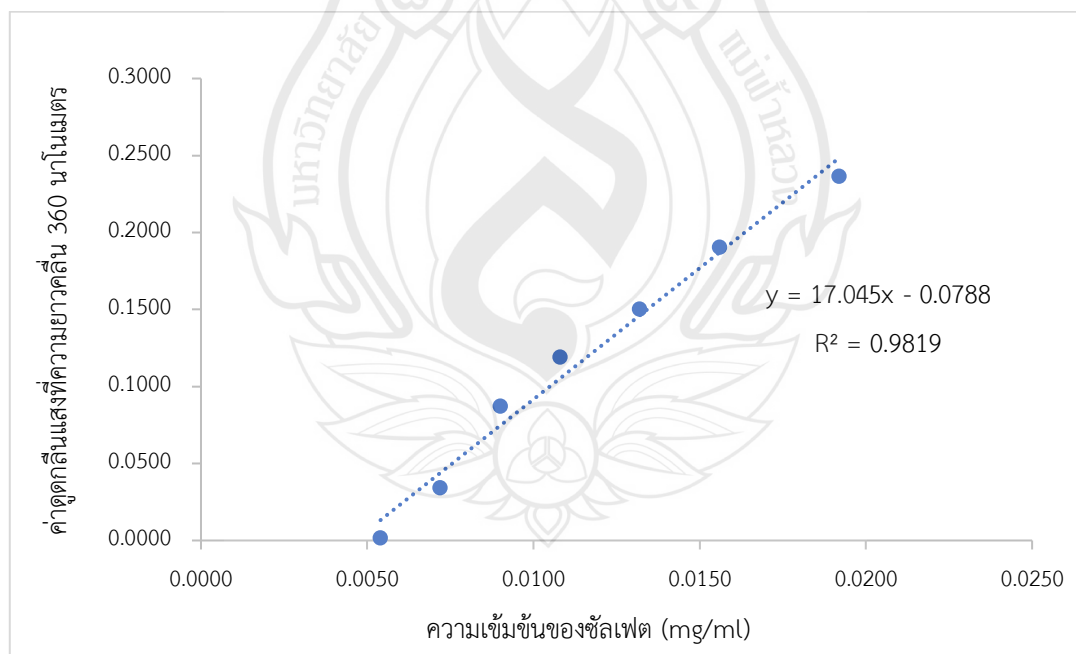
กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ปริมาณสารทางชีวภาพ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดผักกูด ที่เตรียมจากวิธีการสกัดแบบลำดับขั้น



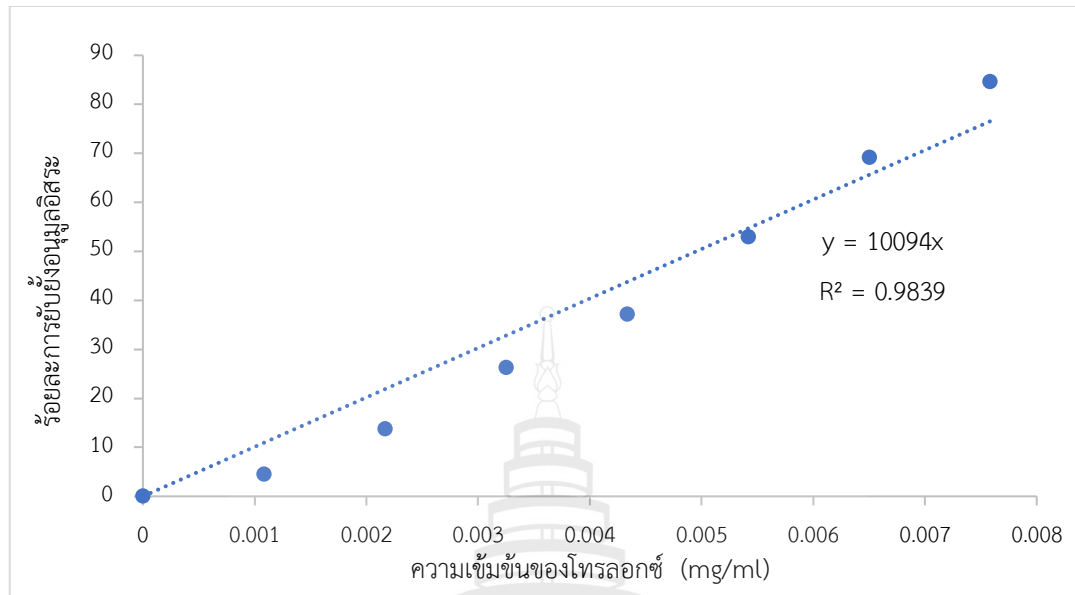
ภาพที่ 1 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ในสารสกัดฟีนอลิกและพอลิแซ็กคาไรด์



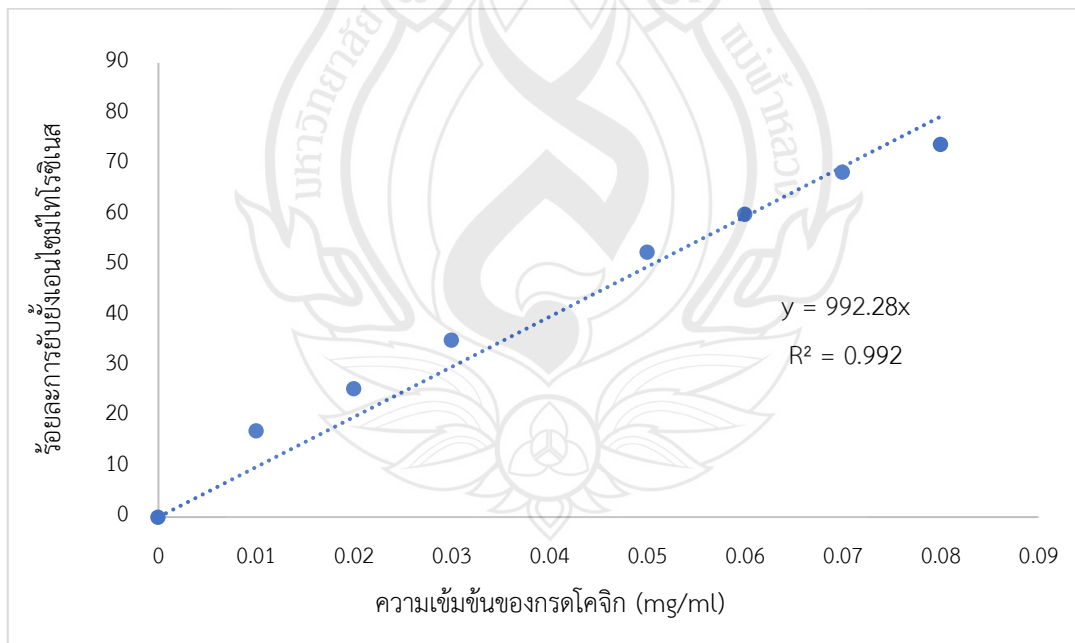
ภาพที่ 2 กราฟมาตรฐานกลูโคส ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวม ในสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์



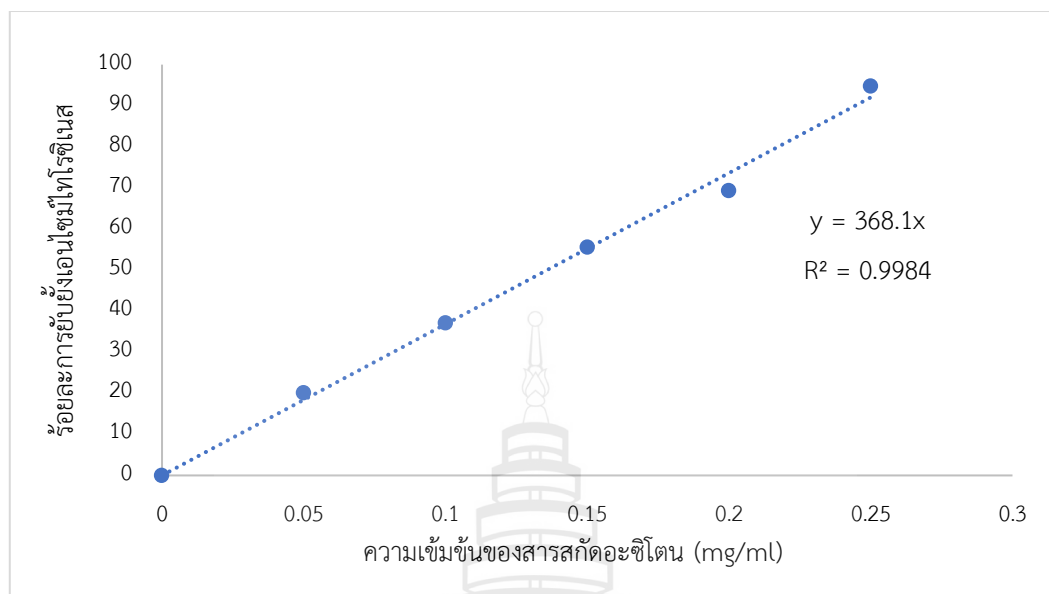
ภาพที่ 3 กราฟมาตรฐานซัลเฟต ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณซัลเฟต ในสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์



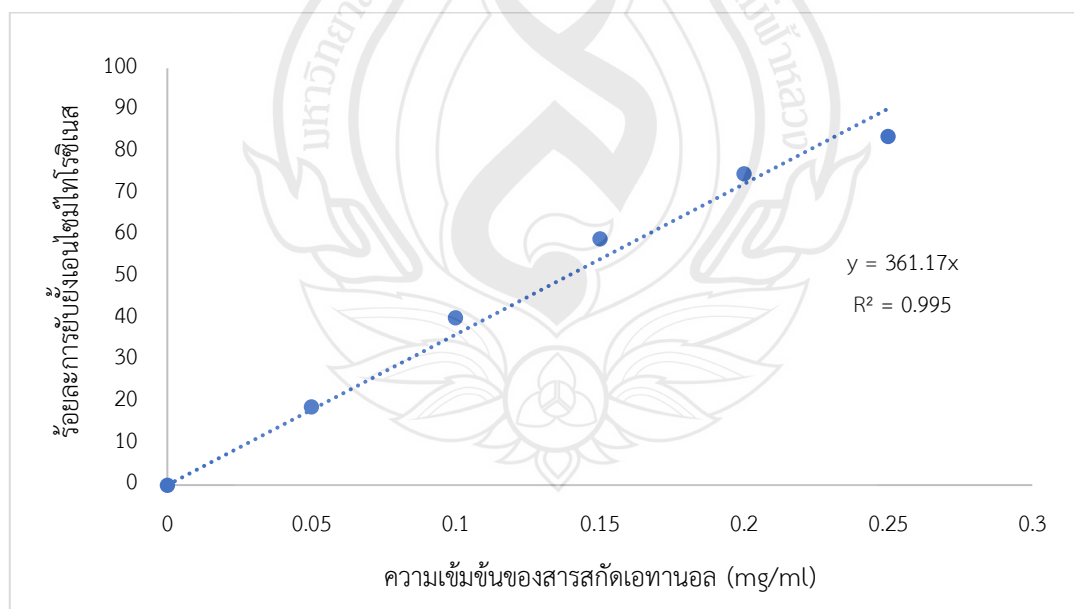
ภาพที่ 4 กราฟมาตรฐานร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระของโทรลอกซ์ ที่ใช้ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ในสารสกัดฟีนอลิกและพอลิแซ็กคาไรด์



ภาพที่ 5 กราฟมาตรฐานร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระของกรดโคจิก ที่ใช้ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ในสารสกัดฟีนอลิกและพอลิแซ็กคาไรด์



**ภาพที่ 6** กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งเอ็นไซม์ไทโรซิเนสกับความเข้มข้นของสารสกัดผักกูดที่สกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตน เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอ็นไซม์ไทโรซิเนส ( $IC_{50}$ )



**ภาพที่ 7** กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งเอ็นไซม์ไทโรซิเนสกับความเข้มข้นของสารสกัดจากผักกูดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอ็นไซม์ไทโรซิเนส ( $IC_{50}$ )