



รายงานการวิจัย

การตรวจคัดกรองทางพฤกษเคมีและการประเมินสารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดใบ
และกิ่งฝาดดอกแดง

Phytochemical Screening and Assessment of In Vitro Antioxidant
Activities from *Lumnitzera littorea* Leaf and Twig Extract

ลักษมี วิทยา

Luksamee Vittaya

จันทรา อู๋ยเอ็ง

Juntra Ui-eng

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

งบประมาณเงินรายได้ ประจำปี พ.ศ. 2562

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ ประจำปี 2562 เป็นรายงานวิจัยประเภทวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช เรื่องตรวจคัดกรองทางพิษเคมีและการประเมินสารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดใบและกิ่งฝาดดอกแดง และเป็นงานวิจัยที่มีจุดประสงค์เพื่อเป็นข้อมูลความรู้พื้นฐานทางเคมี ในการค้นหาสารสำคัญจากพืชและสามารถนำไปใช้เพื่อให้เกิดประโยชน์ต่อไป งานวิจัยนี้สำเร็จตามวัตถุประสงค์และผู้วิจัยหวังอย่างยิ่งว่าผลจากการศึกษาและการวิจัยของงานนี้จะเป็นประโยชน์ต่อวงการศึกษาและอาจนำไปศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องที่เกี่ยวกับอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง สุขภาพสัตว์น้ำ หรืออุตสาหกรรมอาหารต่อไปในอนาคต

ดิฉันในฐานะหัวหน้าโครงการวิจัยขอขอบคุณสำนักงานหอพรรณไม้ (National Park, Wildlife and Plant Conservation Department) โดยเฉพาะคุณเทพลี คະนนานทอง ตำแหน่งผู้ช่วยวิจัย สำหรับคำแนะนำและการสนับสนุนการจัดเตรียมพืชแห้ง เพื่อให้มีความถูกต้อง สามารถจัดเก็บเป็นตัวอย่างอ้างอิง ณ สำนักงานหอพรรณไม้ได้

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง ที่ให้การสนับสนุนสถานที่ในการทำงานอันเกี่ยวกับงานวิจัยนี้ และสนับสนุนอุปกรณ์ สารเคมีบางส่วนจนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ที่วางไว้

ลักษมี วิทยา
จันทร์หา อ้อยแอ้ง
กรกฎาคม 2563

การตรวจคัดกรองทางพิษเคมีและการประเมินสารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดใบ และกิ่งฝาดดอกแดง

ลักษมี วิทยา และ จันทรา อู๋ยเอ็ง

บทคัดย่อ

ฝาดดอกแดง มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Lumnitzera littorea* เป็นพืชป่าชายเลน อยู่ในวงศ์ COMBRETACEAE เก็บใบและกิ่งฝาดดอกแดงจากบริเวณเขตมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง มาสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล นำสารสกัดหยาบตรวจสอบสมบัติทางพิษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่า สารสกัดของกิ่งจากฝาดดอกแดงออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดใบ การตรวจสอบสารพิษเคมีพบสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบหลายชนิด เช่น สารเมทาบอลิท์ปฐมภูมิ คาร์โบไฮเดรต โพรตีน กรดอะมิโน ขณะที่สารเมทาบอลิท์ทุติยภูมิพบแอนทราควิโน แนนิน ฟลาโวนอยด์ เทอร์ปีนอยด์และแอลคาลอยด์ ข้อมูลพื้นฐานข้างต้นสนับสนุนการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดฝาดดอกแดง ผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า สารสกัดจากฝาดดอกแดงมีสารออกฤทธิ์ที่มีประสิทธิภาพ สามารถนำสารสกัดจากใบและกิ่งซึ่งมีสารสำคัญนี้เป็นสารดักจับอนุมูลอิสระจากธรรมชาติทดแทนสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ได้

คำสำคัญ: พิษเคมี อนุมูลอิสระ ฝาดดอกแดง

Phytochemical Screening and Assessment of In Vitro Antioxidant Activities from *Lumnitzera littorea* Leaf and Twig Extract

Luksamee Vittaya and Juntra Ui-eng

Abstract

Fad Dok Dang, namely in scientific name's *Lumnitzera littorea*, is a mangrove plant in COMBRETACEAE family. Leaf and twig were collected from area of Rajamangala University of Technology Srivijaya, Trang campus. The dried samples of leaf and twig of *L. littorea* were macerated in methanol. Crude extract was analyzed for phytochemical properties and antioxidation activity. The result showed that the crude extract of twig exhibited antioxidant activity at higher values than that of leaf. The phytochemical screening revealed that the presence of various chemical constituents including primary metabolite carbohydrate, protein and amino acid. While, secondary metabolite found anthraquinone, tannin, flavonoid, terpenoid and alkaloid. Based on above analyzed data, the extract from *L. littorea* contained effective antioxidation compounds. This experiment suggested that the extract from leaf and twig had important bioactive compounds which may use for natural free radical scavenging agents instead of synthetic one.

Keywords: Phytochemical, Antioxidant, *Lumnitzera littorea*

Faculty of Science and Fisheries Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Sikao, Trang.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย	1
1.2 ทฤษฎี สมมุติฐานและกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย	2
1.3 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
1.4 วัตถุประสงค์	6
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	7
บทที่ 2 วิธีดำเนินงานวิจัย	8
2.1 วัตถุประสงค์ที่ใช้ในงานวิจัย	8
2.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	8
2.3 วัสดุและสารเคมี	8
2.4 เครื่องมือ	9
2.5 วิธีดำเนินการวิจัย	9
2.6 สถานที่ทำการทดลอง/ เก็บข้อมูล	13
บทที่ 3 ผลการทดลองและการอภิปรายผล	14
3.1 การเตรียมพืชตัวอย่างและพืชแห้ง	14
3.2 การศึกษาพฤษเคมีปฐมภูมิและทุติยภูมิของสารสกัดใบและกิ่ง ฝาดดอกแดง	15
3.3 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH และวิธี ABTS	17
บทที่ 4 สรุปผลและข้อเสนอแนะ	20
4.1 สรุปผล	20
4.2 ข้อเสนอแนะ	20

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
เอกสารอ้างอิง	21
ภาคผนวก	26
ภาคผนวก ก	
กราฟการหา IC_{50} ของสารสกัดใบและกิ่งฝาดดอกแดงและสารมาตรฐาน	27
ตารางฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนใบและกิ่งฝาดดอกแดงและ	
สารมาตรฐานโดยวิธี DPPH และ ABTS	
ภาคผนวก ข เอกสารงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่	37



สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	น้ำหนักสารสกัดและเปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ของใบและกิ่งฝาดดอกแดง	15
3.2	องค์ประกอบทางพฤกษเคมีของใบและกิ่งฝาดดอกแดง	16
3.3	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบและกิ่งฝาดดอกแดงโดยวิธี DPPH และ ABTS	18

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวก		หน้า
ก1	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนใบและกิ่งฝาดดอกแดง และสารมาตรฐาน โดยวิธี DPPH	35
ก2	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนใบและกิ่งฝาดดอกแดง และสารมาตรฐาน โดยวิธี ABTS	36

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1.1	ส่วนใบและกิ่งฝาดดอกแดง	3
3.1	ต้น (A) กิ่งและใบ (B) ดอก (C) และผล (D)	14
3.2	ลักษณะพืชแห้งของฝาดดอกแดง	15

ภาคผนวก

ภาพภาคผนวก		หน้า
ก1	กราฟแสดงค่า IC ₅₀ ของสารสกัดใบฝาดดอกแดง จากการทดลอง 3 ครั้ง โดยวิธี DPPH	27
ก2	กราฟแสดงค่า IC ₅₀ ของสารสกัดกิ่งฝาดดอกแดง จากการทดลอง 3 ครั้ง โดยวิธี DPPH	28
ก3	กราฟแสดงค่า IC ₅₀ ของสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ BHT จากการทดลอง 3 ครั้ง โดยวิธี DPPH	29
ก4	กราฟแสดงค่า IC ₅₀ ของสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ Vit. C จากการทดลอง 3 ครั้ง โดยวิธี DPPH	30
ก5	กราฟแสดงค่า IC ₅₀ ของสารสกัดใบฝาดดอกแดง จากการทดลอง 3 ครั้ง โดยวิธี ABTS	31
ก6	กราฟแสดงค่า IC ₅₀ ของสารสกัดกิ่งฝาดดอกแดง จากการทดลอง 3 ครั้ง โดยวิธี ABTS	32
ก7	กราฟแสดงค่า IC ₅₀ ของสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ BHT จากการทดลอง 3 ครั้ง โดยวิธี ABTS	33
ก8	กราฟแสดงค่า IC ₅₀ ของสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ BHT จากการทดลอง 3 ครั้ง โดยวิธี ABTS	34

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

อนุมูลอิสระ (Free radicals) เป็นสารที่ไม่เสถียร จึงมีความว่องไว สามารถเกิดปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุล (biomolecules) ต่าง ๆ เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน กรดไขมัน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของร่างกายได้ ปกติร่างกายจะมีระบบกำจัดอนุมูลอิสระ แต่บางภาวะเช่นร่างกายเจ็บป่วย การได้รับมลภาวะจากภายนอก จะทำให้ร่างกายกำจัดอนุมูลอิสระไม่หมดซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดภาวะ oxidative stress (เป็นภาวะที่ร่างกายมีการใช้ออกซิเจนหรือไนโตรเจนมากกว่าภาวะปกติ) ซึ่งอนุมูลอิสระมี 2 ชนิดคืออนุมูลอิสระของออกซิเจนเรียกว่า oxygen free radicals หรือ reactive oxygen species (ROS) และอนุมูลอิสระที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบเรียกว่า reactive nitrogen species (RNS) หากมีภาวะเช่นนี้ต่อเนื่องนาน ๆ จะทำให้เกิดพยาธิสภาพต่าง ๆ เช่น การเสื่อมสภาพและการแตกสลายของเซลล์ ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็ง โรคหัวใจและหลอดเลือด หรือโรคทางสมองบางชนิด เช่น Alzheimer รวมทั้งทำให้ผิวหนังเกิดการแก่ (skin aging) (Ames et al., 1993) ซึ่งเกิดขึ้นจากการเข้าทำปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระกับไขมันที่ผนังเซลล์หรือกับโปรตีน เอนไซม์ คาร์โบไฮเดรต และดีเอ็นเอ ดังนั้นการใช้สารที่ทำหน้าที่ในการกำจัดอนุมูลอิสระหรือที่เรียกว่าสารแอนติออกซิแดนท์ (Antioxidant) จะช่วยยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระไม่ให้ทำลายองค์ประกอบของเซลล์ สารต้านอนุมูลอิสระมีอยู่จำนวนมากทั้งที่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้นและที่มีอยู่ในธรรมชาติ ช่วยป้องกันและรักษาพยาธิสภาพต่าง ๆ ที่เกิดจากอนุมูลอิสระเช่นการอักเสบ (inflammation) การกดการสร้างระบบภูมิคุ้มกัน (immunosuppression) และอื่น ๆ ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น ในพืช โดยทั่วไปจะพบสารต้านอนุมูลอิสระได้แก่ เอนไซม์คิวเทน โคเอนไซม์ (วัลลภ และคณะ, 2547) นอกจากนี้ พืชที่มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมักจะมีสารประกอบหลัก คือ สารฟีนอลิก ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ แอนโธไซยานินและแทนนิน ซึ่งพบทั่วไปในใบ ลำต้นและเปลือกของพืช

ป่าชายเลนเป็นป่าที่มีความสำคัญทั้งด้านเศรษฐกิจและและนิเวศวิทยา พืชที่มีอยู่ในป่าชายเลนช่วยอนุรักษ์ชายฝั่งไม่ให้เกิดการพังทลาย ทั้งยังเป็นที่อยู่อาศัยของสัตว์ทะเลน้อยใหญ่ พืชบางชนิดใช้เป็นอาหารเช่น ยอดอ่อนของโกงกางใบเล็กใช้รับประทานเป็นผักเคียงหรือจิ้มน้ำพริก (สิทธิโชค, 2552) ผักพังกาหัวสุ่มดอกแดงสามารถนำมาเชื่อมบริโภคได้ บางชนิดใช้เป็นยาแผนโบราณ เช่น เหงือกปลาหมอใช้รักษาโรคผิวหนัง (พัฒน์ สุจางค์, 2522) และเป็นพืชสมุนไพรได้แก่ โปรงแดง มีสรรพคุณเป็นยารักษาโรคเบาหวาน รักษาอาการท้องเสีย ชาวอินเดียใช้เปลือกรักษาภาวะเลือดออก

ในเยื่อและรักษาแผลมะเร็ง (Rastogi et al., 1991) โกงกางใบเล็กใช้เป็นยาฆ่าเชื้อโรคและช่วยรักษาอาการบาดเจ็บและมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย polysaccharide ที่สกัดจากใบของโกงกางใบเล็กอาจมีผลในการต่อต้านเชื้อ HIV (Premanathan et al., 1999) และแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Rahim และคณะ 2008)

ฝาดดอกแดง มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Lumnitzera littorea* อยู่ในวงศ์ COMBRETACEAE พืชชนิดนี้เป็นพืชป่าชายเลนที่ขึ้นอยู่บริเวณริมชายฝั่งทะเล ได้มีการรายงานข้อมูลเบื้องต้นพบว่ สารสกัดเปลือกของฝาดดอกแดงด้วยน้ำมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคแบคทีเรียสเตรปโทค็อกคัส ในขณะที่ใบที่สกัดด้วยน้ำไม่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (ธีรวิทย์, 2552) และสารสกัดใบด้วยเฮกเซนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่เป็นปัญหาต่อสุขภาพโดยเฉพาะเชื้อแกรมบวก (Saad et al., 2011) นอกจากนี้ Keawpiboon et al. (2012) พบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของใบฝาดดอกแดงที่สกัดด้วยเอทานอลกับน้ำ อย่างไรก็ตามการศึกษาผลทางเภสัชวิทยาที่เกี่ยวข้องกับส่วนต่าง ๆ ของฝาดดอกแดงมีไม่มากนัก ในงานวิจัยนี้จึงนำส่วนใบและกิ่งของฝาดดอกแดงมาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ตรวจสอบพฤษเคมีเบื้องต้น และศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดที่เตรียมได้ ผลจากการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพส่วนใบและกิ่งของฝาดดอกแดง อาจนำไปสู่แนวทางการศึกษาทางเภสัชวิทยาจากส่วนพืชที่แสดงฤทธิ์ดีที่สุด เพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ ที่อาจนำไปรักษาโรคได้ในอนาคต

1.2 ทฤษฎี สมมุติฐานและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ฝาดดอกแดง มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Lumnitzera littorea* อยู่ในวงศ์ COMBRETACEAE มีชื่อพื้นเมืองคือ ตำเสาทะเล (พังงา กระบี่ ตรัง) ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของต้นฝาดดอกแดงคือ เป็นไม้ต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ ลำต้นเป็นไม้เนื้อแข็ง สูง 10-15 ม. อาจสูงถึง 30 ม. ลำต้นคดเคี้ยว เปลือกสีน้ำตาลมีรอยแตกเป็นร่องลึก มีรากหายใจรูปคล้ายเข่า มีดอกออกเป็นช่อที่ปลายกิ่ง แต่ละช่อยาว 2-5 เซนติเมตร มี 5-15 ดอก ฐานรองดอกเป็นหลอด กลีบเลี้ยง 5 กลีบ สีเขียว รูปไข่กว้าง กลีบดอก 5 กลีบ สีแดง รูปรี แกมรูปขอบขนาน เกสรเพศผู้ 10 อัน ยาวเป็น 2 เท่าของกลีบดอก มีผล รูปกระสวย ป่องตรงกลาง มีสันตามยาว กว้าง 0.4 เซนติเมตร ยาว 1.3 - 2 เซนติเมตร ผลแก่สีน้ำตาลแดง ออกดอกและผล เดือนพฤศจิกายน-เมษายน และมีใบเดี่ยว เรียงเวียนรอบกิ่ง ออกหนาแน่นที่ปลายกิ่ง แผ่นใบหนา รูปรีแกมรูปไข่กลับ หรือรูปไข่แกมรูปขอบขนาน ปลายใบกลม เว้าตื้นๆ โคนใบรูปปลีมี ขอบใบหยักมน มีต่อมขนาดเล็ก ก้านใบสั้น ฝาดดอกแดง เจริญเติบโตได้ดีในบริเวณด้านในของป่าชายเลน ที่เป็นดินร่วนและมีความเค็มน้อย และมักพบขึ้นเป็นกลุ่มบริเวณปากแม่น้ำ ที่เป็นดินเลนแข็งหรือดินทราย



ภาพที่ 1.1 ส่วนใบและกิ่งฝาดดอกแดง

ฝาดดอกแดงมีประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น เนื้อไม้ ใช้สร้างบ้านเรือน ทำฟืน ทำถ่าน เปลือก นำมาทُبข้บน้ำให้สีฝาด ย้อมผ้า ย้อมจีวรพระสงฆ์ ปลุกเป็นไม้ประดับด้วย (ฝาดดอกแดง : http://tanhakit.blogspot.com/2010/12/blog-post_3764.html (9 กรกฎาคม 63)

จากการค้นคว้าพบว่าพืชที่จัดอยู่ในวงศ์เดียวกับฝาดดอกแดง นำไปใช้ประโยชน์ด้านยา เช่น สมอไทย มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Terminalia chebula* Retz. จัดอยู่ในวงศ์ COMBRETACEAE พืชนี้นำมาใช้เป็นยาสมาน เนื่องจากมีสารพวกแทนนิน (tannin) แก้ลมจุกเสียด ยาเจริญอาหาร ยาบำรุง เป็นยาขมกลั้วคอแก้เจ็บคอ ช้บ่น้ำเหลืองเสีย ใช้ภายนอกบดเป็นผงละเอียดโรยแผลเรื้อรัง ใช้รักษาโรคฟันและเหงือกเป็นแผล เป็นยาระบายอ่อนๆ แก้พิษร้อนภายใน แก้ลมป่วง ระบายลม รู้ถ่าย รู้ปัดเอง คุมธาตุในตัวเสร็จ ถ่ายพิษไข้ สารสกัดจากสมอไทยได้รับการยอมรับว่าเป็นราชาสมุนไพร เนื่องจากฤทธิ์ในการกำจัดสารพิษออกจากร่างกายและบำบัดโรคหลายชนิด ในขณะเดียวกันยังสามารถ บำรุงสุขภาพ และซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอของร่างกาย ในประเทศอินเดีย สารสกัดจากสมอไทยใช้ในการรักษาโรคหลายชนิด เช่น โรกระบบทางเดินอาหาร อากาศอาหารไม่ย่อย โรกระบบทางเดินปัสสาวะ โรคเบาหวาน โรคผิวหนัง โรคพยาธิ โรคหัวใจ อากาศใช้เป็นระยะ อากาศท้องอืด ท้องเฟ้อ ท้องผูก แผลในทางเดินอาหาร อาเจียน อากาศเจ็บปวดในลำไส้ และริดสีดวงทวารหนัก นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อไวรัส รวมทั้งเชื้อ HIV และแบคทีเรียบางชนิด บำรุงหัวใจ ต้านอนุมูลอิสระและชะลอความชรา นอกจากนี้ ยังช่วยควบคุมระดับไขมันในเส้นเลือด และช่วยการทำงานของตับในการกำจัดไขมัน ออกจากร่างกาย รวมทั้งกระตุ้นการเผาผลาญของร่างกายได้อีกด้วย และสมอพิเภก มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Terminalia bellerica* (Gaertn.) Roxb. จัดอยู่ในวงศ์ COMBRETACEAE เป็นไม้ผลัดใบ มีตั้งแต่

ขนาดกลางจนถึงขนาดใหญ่ ผลมีลักษณะเป็นรูปแบบผลมะละกอ ตรงกลางค่อนข้างจะป่อง ส่วนที่นิยมใช้เป็นยาคือผลแก่ มีรสเปรี้ยว ฝาดหวาน เป็นยาระบาย บำรุงธาตุ แก้เสมหะจุกคอก แก้โรคริดสีดวงทวาร (สมอพิเภก <https://medthai.com/%E0%B8%AA%E0%B8%A1%E0%B8%AD%E0%B8%9E%E0%B8%B4%E0%B9%80%E0%B8%A0%E0%B8%81/>) (9 กรกฎาคม 63)

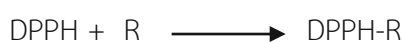
นอกจากนี้ต้นหูกวาง ก็เป็นหนึ่งในวงศ์ COMBRETACEAE มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Terminalia catappa* Linn. เปลือกใช้ทำเป็นยาฝาด แก้ท้องเสีย โรคบิด ใบ และเปลือกรักษาอาการปวดตามข้อ น้ำมันจากเมล็ดใช้ทา นวด ช่วยลดอาการปวด อาการฟกช้ำของกล้ามเนื้อ ในประเทศไต้หวันมีการใช้ใบหูกวางเป็นยาสมุนไพรพื้นบ้านสำหรับรักษาโรคตับ (หูกวาง <https://medthai.com/%E0%B8%AB%E0%B8%B9%E0%B8%81%E0%B8%A7%E0%B8%B2%E0%B8%87/>) (9 กรกฎาคม 63)

สารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารที่สามารถยับยั้ง หรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดอนุมูลอิสระ (free radical) เช่น การเกิดออกซิเดชันของลิพิด (lipid oxidation) สามารถแบ่งตามกลไกการยับยั้งได้เป็น 3 ชนิด คือ

1. Preventive antioxidant ป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ
2. Scavenging antioxidant ทำลายหรือยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น
3. Chain breaking antioxidant ทำให้ลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระสิ้นสุดลง

สามารถทดสอบการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธีการต่าง ๆ เช่น DPPH ABTS หรือ FRAP และในการศึกษานี้ใช้วิธี DPPH assay โดยมีสารมาตรฐานเปรียบเทียบ 2 ชนิดคือ กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) และ Butylated hydroxytoluene (BHT) วิธีการวิเคราะห์นี้จะศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชัน (antioxidant) ซึ่งใช้รีเอเจนต์คือ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ง่ายต่อการวิเคราะห์ ให้ความถูกต้อง และแม่นยำ สูง

DPPH เป็นอนุมูลอิสระที่เสถียร (stable radical) ในตัวทำละลายเมทานอลซึ่งสารละลายนี้มีสีม่วงและดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 515-517 nm โดย DPPH จะเกิดปฏิกิริยากับ antioxidant (AH) หรือกับ radical species (R)



การศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ในสารตัวอย่างนิยมรายงานเป็นค่า 50% Effective concentration (EC₅₀) ซึ่งหมายถึงปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลง 50% จากข้อมูลที่เป็นประโยชน์ข้างต้น ได้เป็นแนวทางในการเลือกพืชป่าชายเลน

โดยนำไปและกิ่งของฝาดดอกแดงมาสกัดด้วยตัวทำละลายที่เลือกและทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งนับเป็นงานที่มีคุณค่าได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ สามารถค้นหาสารออกฤทธิ์จากพืชป่าชายเลนที่มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอีกทางหนึ่ง

1.3 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Rahim และคณะ (2008) รายงานฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากส่วนสกัดหยาบจากเปลือกในตัวทำละลายเอทานอลของโงก่างใบเล็ก โดยวิธี DPPH และ ABTS โดยเทียบกับสารมาตรฐาน butylated hydroxytoluene (BHT) และวิตามินซี ผลที่ได้พบว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสอดคล้องกับปริมาณสารแทนนินที่พบจากเปลือก และผลจากการวิเคราะห์ HPLC ของต้นโงก่างใบเล็กพบว่า Catechin เป็นองค์ประกอบที่พบมากที่สุดของ Flavanoid monomers

ธีรวิมล เลิศสุทธิชวาล และคณะ (2552) ศึกษาการใช้น้ำเป็นตัวสกัดสารสกัดหยาบจากใบ และเปลือกของฝาดดอกแดง (*Lumnitzera littorea*) ที่รวบรวมจากป่าชายเลน ภายในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* sp. ที่แยกได้จากปลากะพงแดงที่มีอาการป่วยพบว่าสารสกัดหยาบจากส่วนของเปลือกสามารถออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีโดยมีค่า MIC เท่ากับ 300 ไมโครลิตรต่อการกระจายของเชื้อแบคทีเรีย 5 มิลลิตร (20.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ขณะที่สารสกัดหยาบจากส่วนของใบไม่มีผลต่อเชื้อแบคทีเรีย และเมื่อนำส่วนใบและเปลือกไปวิเคราะห์ปริมาณแทนนินโดยวิธี Colorimetric Method (AOAC, 1990) โดยกำหนดให้สัดส่วนระหว่างใบ หรือเปลือกต่อน้ำ เป็น 1 : 5 ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการสกัด 1-2 ชั่วโมง พบว่าเปลือกจะมีปริมาณแทนนิน 8.9 ไมโครกรัม/กรัม ขณะที่ส่วนใบมีปริมาณแทนนิน เพียง 1.3 ไมโครกรัม/กรัม เป็นการยืนยันว่าสารสกัดจากเปลือกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสูงกว่า

ลักขมี วิทยา และ ชาคริยา ฉลาด (2558) ศึกษาผลของเปลือกจากโงก่างใบเล็ก (*R.apiculata*) โปรงแดง (*C.tagal*) และถอบแถบ (*D.trifoliata*) ที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ มีผลต่อฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสี่ชนิดคือ *B.cereus* TISTR 687 *S.aureus* TISTR 1466 *Samonella typhimurium* TISTR 292 และ *E.coli* TISTR 780 โดยวิธี disc diffusion ผลที่ได้พบว่าสารสกัดหยาบส่วนเปลือกจากตัวทำละลายเมทานอลของพืชทั้งสามชนิดมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด

Chopade et al. 2008 ได้รายงานการนำส่วนต่าง ๆ ของหมีทะเลไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์หรือทางเภสัชวิทยา เช่นเมล็ดใช้รักษาโรคทางเดินผิวหนัง ใบด้านเชื้อไมโคคอคคัสรักษาอาการไข้หวัด รากใช้ทำความสะอาดฟันและช่องปาก ทั้งยังมีคุณสมบัติด้านการอักเสบ

ด้านเบาหวานและกำจัดอนุมูลอิสระ และน้ำมันที่ได้จากเมล็ดเป็นแหล่งพลังงานทางเลือกที่ปลอดภัยอีกด้วย

Koysomboon et al. (2006) ศึกษาการแยกสารฟลาโวนอยด์จากต้นและรากหทัยทะเล ทั้งหมด 14 ชนิด เป็นชนิดใหม่ 4 ชนิด วิเคราะห์โครงสร้างสารโดยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพและหาความเข้มข้นต่ำสุด พบว่าสารสกัดดังกล่าวออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย แสดงค่า MIC ระหว่าง 6.25-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Khan et al. (2006) ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหทัยทะเล ถอบแถบและหางไหล ซึ่งเป็นพืชในสกุลเดียวกัน โดยการใช้ตัวทำละลาย 5 ชนิดคือ petrol dichloromethane ethyl acetate butanol และ methanol ในการสกัด ผลที่ได้พบว่าสารสกัดแต่ละชนิดออกฤทธิ์ได้แตกต่างกัน เช่น สารสกัดจากเมทานอลจากใบ และรากของหทัยทะเลออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้ดี ขณะที่เปลือก รากของหทัยทะเลที่สกัดด้วย petrol butanol และ methanol ออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้ดีกว่า

Rao et al. (2009) ศึกษาการแยกสารฟลาโวนอยด์ชนิดใหม่จากสารสกัดรากของหทัยทะเล โดยตรวจสอบโครงสร้างด้วยวิธีทางสเปกโทรสโกปี (IR, MS, NMR) ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์กลูโคซิเนสและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสารสกัดที่ออกฤทธิ์ได้ดีคือ Pongamol

Vittaya et al. (2016) ศึกษาพฤษเคมีเบื้องต้น ปริมาณฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดถอบแถบ พบว่าสารสกัดส่วนใบและเปลือกจากเมทานอลยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ดี สอดคล้องกับปริมาณฟีนอลิกในส่วนพืชนั้น ๆ

1.4 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาพฤษเคมีสารเมทาบอลิต์ปฐมภูมิและเมทาบอลิต์ทุติยภูมิเบื้องต้น จากสารสกัดใบและกิ่งฝาดดอกแดง
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดใบและกิ่งฝาดดอกแดง โดยวิธี DPPH กับ ABTS
3. เพื่ออธิบายผลของพฤษเคมีจากสารสกัดใบและกิ่งฝาดดอกแดงต่อการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ทราบองค์ประกอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดใบและกิ่งฝาดดอกแดง
2. ได้ทราบพฤติกรรมการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดใบและกิ่งฝาดดอกแดง
3. ได้เป็นแนวทางในการค้นหาสารใหม่จากพืชธรรมชาติเพื่อประโยชน์ทางด้านเภสัชหรือการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
4. ได้ผลงานวิจัยเพื่อเผยแพร่ในวารสารวิชาการและการประชุมสัมมนาทางวิชาการในสาขาที่เกี่ยวข้อง



บทที่ 2

วิธีดำเนินงานวิจัย

2.1 วัสดุที่ใช้ในงานวิจัย

2.1.1 พืชตัวอย่างฝาดดอกแดง จากพื้นที่ภายในบริเวณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง และส่งตรวจสอบชนิดพันธุ์พืช ณ สำนักงานหอพรรณไม้ (Herbarium of Department of Biologiy, Faculty of Science, Chaing Mai University : CMUB) นำส่วนของพืชที่ต้องการมาล้างทำความสะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปอบที่อุณหภูมิ 45-50 °C จนแห้งเพื่อเตรียมสกัดและวิเคราะห์

2.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

- 2.2.1 กรวยกรอง
- 2.2.2 ขวดก้นกลม (round bottom flask)
- 2.2.3 กระจกนาฬิกา (watch glasses)
- 2.2.4 ขวดแก้วขนาดเล็ก (vial)
- 2.2.5 ขวดรูปชมพู่ (elrenmayer flask)
- 2.2.6 แท่งแก้วคน (stirring rod)
- 2.2.7 ปีกเกอร์ (beaker)
- 2.2.8 หลอดทดลอง (test tube)
- 2.2.9 หลอดหยด (dropper)
- 2.2.10 อุปกรณ์หั่น เช่น มีด กรรไกร
- 2.2.11 เครื่องดูดสารละลายอัตโนมัติ (autopipette)
- 2.2.12 ขวดโหลแก้ว
- 2.2.13 กรวยแก้ว
- 2.2.14 กระดาษออลูมิเนียมฟอยล์
- 2.2.15 กระบอกตวง

2.3 วัสดุและสารเคมี

- 2.3.1 สารเคมี

สารเคมีจาก Merch

- Methanol

สารเคมีจาก Sigma-Aldrich

- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
- 2,2'-Azino-bis- (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid diammonium salt

สารเคมีจาก Fluka

- 2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT)

สารเคมีจาก Lab Scan

- Sodium Chloride
- Hexane
- Ethyl acetate
- Acetone

2.4 เครื่องมือ

2.4.1 เครื่องระเหยตัวทำละลาย (Rotary Evaporator)

2.4.2 ตู้อบชนิดควบคุมอุณหภูมิ

2.4.3 UV-1800 Spectrophotometer

2.4.4 ตู้อบความร้อน (Hot air oven)

2.4.5 เตาให้ความร้อน (Stirrer hot plate)

2.4.6 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

2.4.7 ตู้ดูดความชื้น

2.5 วิธีดำเนินการวิจัย

2.5.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บใบและกิ่งฝาดดอกแดง จากพื้นที่บริเวณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย
วิทยาเขตตรัง

2.5.2 การเตรียมพืชแห้ง

โดยนำส่วนใบและกิ่งฝาดดอกแดง ที่ปราศจากสิ่งเจือปน เช่น ดิน ฝุ่นละอองแห้ง
ให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ จากนั้นนำไปผึ่งลมให้แห้งและชั่งน้ำหนัก

2.5.3 การเตรียมส่วนสกัดหยาบส่วนใบและกิ่งฝาดดอกแดง

นำส่วนใบและกิ่งฝาดดอกแดง ที่ผ่านการทำความสะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ และผึ่งลมจนแห้ง นำมาแช่ด้วยตัวทำละลายเมทานอล กรองและนำไประเหยตัวทำละลายออก เก็บสารสกัดเพื่อการวิเคราะห์สารเมทาบอลไลต์ปฐมภูมิและทุติยภูมิ

2.5.4 ทดสอบสารพิษเคมีเบื้องต้น

การตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้น ของสารสกัดส่วนเมทานอล ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต น้ำตาลรีดิวซิงส์ โปรตีนและกรดอะมิโน เทอร์พีนอยด์ แอนทราควิโนน ซาโปนิน ฟลาโวนอยด์ แทนนิน แอลคาลอยด์ และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ จะใช้ปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอน (Trease and Evans, 2002; Harborne, 1998; ศรีนรัตน์, 2556) ดังนี้

การตรวจสอบคาร์โบไฮเดรต : การทดสอบโมลิส

หยดสารละลายของ α -naphthol ในตัวทำละลายแอลกอฮอล์ 2 หยด และตามด้วยสารสกัด 2-3 มิลลิลิตร เขย่าและเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น จะปรากฏวงแหวนสีน้ำตาล

การตรวจสอบน้ำตาลรีดิวซิงส์ : การทดสอบเฟลิง

ผสมสารละลายเฟลิง A กับสารละลายเฟลิง B อย่างละ 1 มิลลิลิตร ต้มเป็นเวลา 1 นาที เติมสารสกัดลงไป 2 มิลลิลิตร ต้มในอ่างน้ำร้อนเป็นเวลา 5-10 นาที ปรากฏพบตะกอนสีแดงอิฐ

การตรวจสอบโมโนแซกคาไรด์ : การทดสอบบาร์โฟด์

นำสารสกัดมา 2 มิลลิลิตร ผสมกับรีเอเจนต์บาร์โฟด์ 2 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 2 นาที ในอ่างน้ำร้อน ลงในหลอดทดสอบขนาดกลาง เติมน้ำกลั่นลงไป 2 มิลลิลิตร และทำให้เย็น หากปรากฏเป็นสารละลายสีแดง แสดงว่ามีโมโนแซกคาไรด์

ตรวจหาโปรตีนและกรดอะมิโน :

- การทดสอบของ Xanthoproteic

สารสกัด 1 มิลลิลิตร เติมกรดไนตริกเข้มข้น 2 มิลลิลิตร สังเกตสีเหลืองแสดงว่ามีโปรตีน

- การทดสอบของ Ninhydrin

สารสกัด 1 มิลลิลิตร เติม 25% Ninhydrin 2 มิลลิลิตร นำมาต้ม 5 นาที สังเกตสีน้ำเงิน แสดงว่ามีกรดอะมิโน

การตรวจสอบเทอร์ฟีนอยด์ :

ใช้การทดสอบซาลโควสกี (Salkowski test) ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ครั้งละ 3-5 มิลลิลิตร 2-3 ครั้ง เติมคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร เขย่า ค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc.H₂SO₄) หากเกิดสีน้ำตาลแดงระหว่างรอยต่อของสารละลายแสดงว่าพบเทอร์ฟีนอยด์

การตรวจสอบแอนทราควิโนน :

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมสารละลาย 10% H₂SO₄ 10 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ (water bath) 5 นาที กรอง แล้วปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม เติมสารละลายแอมโมเนีย (10% NH₃) 2-3 หยด สังเกตสีชมพูแดงที่เกิดขึ้นแสดงว่าพบแอน-ทราควิโนน

การตรวจสอบซาโปนิน :

ใช้การทดสอบฟอง โดยชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือด กรอง นำของเหลวผลกรอง (filtrate) มาเติมน้ำกลั่น 2-3 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง หากมีฟองเกิดขึ้นแสดงว่าพบซาโปนิน

การตรวจสอบฟลาโวนอยด์ :

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายสารสกัดด้วยสารละลายเอทานอล 50% 3 มิลลิลิตร ใส่หลอดแมกนีเซียมชิ้นเล็ก ๆ ลงไป 2-3 ชิ้น นำไปต้ม และหยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (conc. HCl) ให้สารละลายสีเหลือง ส้ม หรือแดง แสดงว่าพบ ฟลาโวนอยด์

ตรวจสอบแทนนิน :

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ กรอง หยดสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ (FeCl₃) 2-3 หยดลงในของเหลวผลกรอง หากปรากฏสีเขียวดำหรือน้ำเงินดำแสดงว่าพบแทนนิน

การตรวจสอบแอลคาลอยด์ :

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก 15 ml (2% H₂SO₄) นำไปอุ่น 2-3 นาที กรอง นำของเหลวผลกรองไปหยดน้ำยาตราเจนดอร์ฟ (Dragendorff's reagent) ปรากฏตะกอนสีส้มแดงแสดงว่าพบแอลคาลอยด์

การตรวจสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ :

แบ่งการทดสอบออกเป็น 3 ส่วนตามโครงสร้างพื้นฐานของ คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ คือส่วนสเตียรอยด์ ส่วนวงแหวนเล็กโทนไม่อิ่มตัวและส่วนน้ำตาลดีออกซี การทดสอบทำได้ดังนี้ ซึ่งสารสกัด 0.2 กรัม สกัดสีออกด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ 2-3 ครั้ง ละลายสารสกัดด้วยเอทานอล 80% ทดสอบส่วนสเตียรอยด์ ด้วยการทดสอบ ลีเบอร์แมน (Liebermann test) โดยเติมกรด แกลเซียลแอซีติก (glacial acetic acid) 3 หยด และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 3 หยด ถ้าปรากฏสีน้ำเงินหรือ น้ำเงินเขียว แสดงว่าพบสเตียรอยด์ ทดสอบส่วนวงแหวนเล็กโทนไม่อิ่มตัวด้วยน้ำยาเคดเด (Kedde reagent) จะให้สีม่วง และทดสอบ ส่วนน้ำตาลดีออกซีด้วยการทดสอบเคลเลอร์-คิลเลียนี (Keller-Kiliani test) ซึ่งประกอบด้วยกรด แกลเซียลแอซีติก-สารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์-กรดซัลฟิวริกเข้มข้น จะปรากฏวงแหวนสีน้ำตาล ตรงรอยต่อระหว่างสารสกัดกับกรดซัลฟิวริก

2.5.5 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH

การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ด้วยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Seethalaxmi *et al* (2012) โดยใช้ BHT (Butylated hydroxy toluene) และกรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) เป็นสารมาตรฐาน ดังนี้

2.5.5.1 การเตรียมสารเคมี

1) เตรียมสารละลายมาตรฐาน DPPH (มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างเสถียรชนิดหนึ่งเมื่อเตรียมเป็นสารละลายจะมีสีม่วงใช้เป็นรีเอเจนต์ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เพราะเมื่อ DPPH• ทำปฏิกิริยากับสารสกัดจากพืชหรือ BHT ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สีของสารละลายสีม่วงจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง) ความเข้มข้น 6×10^{-5} M. ในเมทานอล

2) เตรียมสารละลายมาตรฐาน BHT (ใช้เป็นสารมาตรฐานที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ) ความเข้มข้น 100, 75, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 และ 1.562 $\mu\text{g/ml}$ ในเมทานอล

3) เตรียมสารละลายตัวอย่างพืชให้ได้ ความเข้มข้นต่างๆ คือ 100, 75, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 และ 1.562 $\mu\text{g/ml}$ ในเมทานอล

4) การตรวจวัดสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในเชิงปริมาณทำได้โดย
- เตรียมสารละลายที่จะวัดค่าการดูดกลืนแสงจากสารละลายที่เตรียมไว้แล้ว ในข้อ 1 ได้แก่ สารละลาย control; สารละลายมาตรฐาน DPPH และ BHT (1:1); สารละลายมาตรฐาน DPPH และสารละลายตัวอย่างพืชที่จะทำการทดสอบแต่ละความเข้มข้น (1:1) เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

- นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นที่เตรียมไว้ในข้อที่ 2.1 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 517 nm ด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer ในแต่ละความเข้มข้นจะ ทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสง

5) การคำนวณความสามารถฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

หาค่า 50% Effective concentration (EC_{50} = ค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์, $\mu\text{g/ml}$)

- สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารตัวอย่างกับค่าการดูดกลืนแสง
- หาค่า EC_{50} จากกราฟในข้อ 3.2 ที่แสดงค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์

- ใช้ค่า EC_{50} ในการเปรียบเทียบความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระระหว่างตัวอย่างพืชที่ทดสอบกับสารมาตรฐาน BHT

- คำนวณ %Radical Scavenging (เปอร์เซ็นต์การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ)

$$\text{สมการ } \% \text{Radical Scavenging} = [(A_B - A_A) / A_B] \times 100$$

เมื่อ A_A = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารตัวอย่างผสมกับ DPPH

A_B = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลาย DPPH

2.5.6 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ABTS

วิธี ABTS free radical – scavenging activity เป็นการทดสอบโดย ABTS (2,2'-Azino – bis – (3 – ethylbenzothiazoline – 6 – sulfonic acid diammonium salt) จะถูกเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระที่มีประจุบวกด้วยการเติมโปแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต เมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นไม่มีสี โดยใช้วิธีทดสอบตามวิธีของ Rahim *et al.* (2008) คือดูดสารสกัดมา 1 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายผสมระหว่าง ABTS 75 mM และโปแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (Potassium persulfate) 1.225 mM ที่ผสมทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วนำมาเจือจาง 10 เท่าด้วยเอทานอล เติมน้ำลงไป 3 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 414 นาโนเมตร โดยมีกรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) เป็น positive control คำนวณค่าตามสูตร

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

(โดยที่ A_{control} และ A_{sample} เท่ากับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS และสารสกัด) จากนั้นนำสารสกัดที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้ดีที่สุด ไปทดสอบหาค่า IC_{50} ที่ความเข้มข้นระหว่าง 3 – 250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.6 สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง 179 หมู่ 3 ตำบลไม้ฝาด อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง 92150

บทที่ 3

ผลการทดลองและการอภิปรายผล

3.1 การเตรียมพืชตัวอย่างและพืชแห้ง

3.1.1 การเตรียมพืชตัวอย่าง

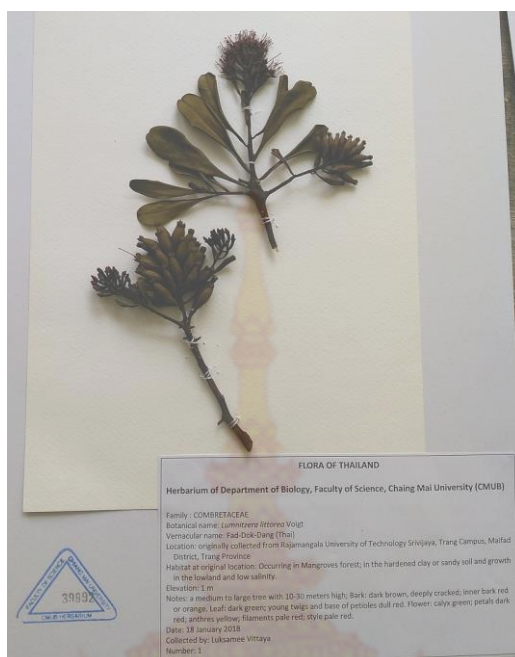
เก็บส่วนใบและกิ่ง ของฝาดดอกแดง (ภาพที่ 3.1) จากพื้นที่ภายในบริเวณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง มาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ตากให้แห้งก่อนนำแต่ละส่วนไปสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล



ภาพที่ 3.1 ต้น (A) กิ่งและใบ (B) ดอก (C) และผล (D)

3.1.2 การเตรียมพืชแห้ง

เก็บตัวอย่างพืชสดของฝาดดอกแดงที่มีองค์ประกอบครบสมบูรณ์ในหนึ่งกิ่ง หนึ่งช่อ หรือ หนึ่งเถา คือ มีใบ ดอก และผล ซึ่งสามารถอนุโลมในกรณีที่มีเฉพาะใบกับดอกหรือใบกับผลเท่านั้น ส่งพิสูจน์เอกลักษณ์ชนิดพันธุ์พืช ณ พิพิธภัณฑ์ (Herbarium of Department of Biological, Faculty of Science, Chiang Mai University : CMUB) พร้อมรหัสจัดเก็บพันธุ์ไม้ แสดงดังภาพที่ 3.2



ภาพที่ 3.2 ลักษณะพืชแห้งของฝาดดอกแดง

นำส่วนใบและกิ่งของฝาดดอกแดงที่ผ่านการบด มาสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล โดยการเติมตัวทำละลายให้ท่วมส่วนพืช แخذตั้งทิ้งไว้เป็นเวลาหนึ่งสัปดาห์ กรองและนำส่วนที่กรองได้ ระเหยแห้งระบบสุญญากาศ จะได้สารสกัดหยาบใบและกิ่งของฝาดดอกแดง แสดงตามตารางที่ 3.1 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

ตารางที่ 3.1 น้ำหนักสารสกัดและเปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ของใบและกิ่งฝาดดอกแดง

พืช	ส่วนพืช	ลักษณะของสารหยาบ	ปริมาณพืชที่ใช้		น้ำหนัก (กรัม :เปอร์เซ็นต์)
			สกัด		
ฝาดดอกแดง	ใบ	ของแข็งสีเขียวเข้ม	500		102 กรัม (20.4%)
	กิ่ง	ของแข็งสีน้ำตาลแดง	5,200		1,094 กรัม (21.03%)

3.2 การศึกษาพฤษเคมีปฐมภูมิและทุติยภูมิของสารสกัดใบและกิ่งฝาดดอกแดง

จากการศึกษาผลทางพฤษเคมีของสารสกัดใบและกิ่งฝาดดอกแดง แสดงดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 องค์ประกอบทางพฤกษเคมีของใบและกิ่งฝาดดอกแดง

ส่วนพืช	พฤกษเคมี	สารสำคัญ	สารสกัดพืชฝาดดอกแดง	
ใบ	ปฐมภูมิ	คาร์โบไฮเดรต	+	
		น้ำตาลรีดิวิซ์	+	
		โมโนแซกคาร์ไลต์	-	
		โปรตีน	+	
		กรดอะมิโน	+	
		เทอร์ปีนอยด์	-	
		ทุติยภูมิ	แอนทราควิโนน	-
	ซาโปนิน	+		
	ฟลาโวนอยด์	+		
	แทนนิน	+		
	แอลคาลอยด์	+		
	คาร์ดิแอกไกลโคไซด์	-		
	กิ่ง	ปฐมภูมิ	คาร์โบไฮเดรต	+
			น้ำตาลรีดิวิซ์	+
โมโนแซกคาร์ไลต์			-	
โปรตีน			+	
กรดอะมิโน			-	
เทอร์ปีนอยด์			+	
ทุติยภูมิ			แอนทราควิโนน	-
ซาโปนิน		+		
ฟลาโวนอยด์		+		
แทนนิน		+		
แอลคาลอยด์		+		
คาร์ดิแอกไกลโคไซด์		-		

หมายเหตุ : “+” พบสารสำคัญ และ “-” ไม่พบสารสำคัญ

จากตารางที่ 3.2 พบพฤกษเคมีปฐมภูมิและทุติยภูมิทั้งในใบและกิ่งของฝาดดอกแดง ดังนี้
 พฤกษเคมีปฐมภูมิของคาร์โบไฮเดรต น้ำตาลรีดิวิซ์ และโปรตีน พบในสารสกัดทั้งส่วนใบและกิ่ง
 ขณะที่กรดอะมิโนพบเฉพาะสารสกัดส่วนใบ และไม่พบโมโนแซกคาร์ไลต์ทั้งในสารสกัดส่วนใบและกิ่ง

เนื่องจากสารเมทาบอลไลต์ปฐมภูมิในพืชพบคล้ายกันเกือบทุกกลุ่มและมีบทบาทการออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้เช่นกัน ดังนั้นการหาสารเหล่านี้เชิงปริมาณอาจเชื่อมโยงไปสู่สารเมทาบอลไลต์ทุติยภูมิ ซึ่งมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ ทั้งนี้สารเมทาบอลไลต์ปฐมภูมิเป็นสารตั้งต้น (precursor) และอาจเป็นโครงสร้างหลักของเมทาบอลไลต์ทุติยภูมิได้

ในกรณีการทดสอบพิษเคมีทุติยภูมิจากสารสกัดพบว่ามิซาโปนิน ฟลาโวนอยด์ แทนนิน แอลคาลอยด์ในสารสกัดส่วนใบและกิ่ง และไม่พบแอนทราควิโนนกับคาร์ดิแอกไกลโคไซด์จากสารสกัดใบและกิ่งฝาดดอกแดง การพบสารพิษเคมีในกลุ่มนี้เช่น ซาโปนิน มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ฟลาโวนอยด์ เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี เนื่องจากมี conjugated double bond และมี OH^- หรือ $-\text{OCH}_3$ เป็นหมู่แทนที่หลายตำแหน่งจึงเกิดปรากฏการณ์เรโซแนนซ์ (resonance) ทำให้เกิดประจุที่จะไปจับกับอนุมูลอิสระได้ สำหรับแทนนินและแอลคาลอยด์ ออกฤทธิ์กว้างมากและหลากหลาย สารเหล่านี้พบได้ในพืชเกือบทุกกลุ่มเช่นกัน ตัวอย่างงานวิจัยของ Vittaya and Chalad (2016) ศึกษาพิษเคมีของสารสกัดจากใบและเปลือกของโง้งกางใบเล็ก พบว่ามีพิษเคมีของฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน แทนนิน เทอร์พีนอยด์และแอนทราควิโนน ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดได้ เช่น *Bacillus cereus* *Staphylococcus aureus* *Escherichia coli* *Samolnella typhi* อีกทั้งสารสกัดใบและเปลือกจากถอบแถบพบว่ามีพิษเคมีของฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน แทนนิน เทอร์พีนอยด์ แอลคาลอยด์ และแอนทราควิโนน ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดเช่นกัน (ลักษณะ และคณะ, 2557) จากนั้นนำสารสกัดใบและกิ่งที่ได้ประเมินสารต้านอนุมูลอิสระต่อไป

3.3 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH และวิธี ABTS

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสมบัติการดักจับอนุมูลอิสระของพืช จะมีข้อมูลช่วยเสริมการนำพืชนั้นไปใช้ประโยชน์และเพิ่มคุณค่าทางการแพทย์ได้ และในงานวิจัยนี้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) และ 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid diammonium salts (ABTS) เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ต้องการ อีกทั้งพฤติกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดพืชมีผลจากหลายปัจจัย ไม่ว่าจะเป็นระบบการทดสอบและองค์ประกอบของสารพิษเคมีในส่วนพืชนั้น ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการเลือกการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าหนึ่งวิธีเพื่อให้ครอบคลุมกลไกต่าง ๆ ของการออกฤทธิ์โดยสารต้านอนุมูลอิสระ (Gan และคณะ, 2010)

DPPH เป็นสารที่อะตอมไนโตรเจนมีอิเล็กตรอนคู่กำกับตรงกลาง ซึ่งให้แถบการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร สีของ DPPH จะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง จาก DPPH เป็น DPPH-H (Cai และคณะ, 2003) ส่วนวิธี ABTS ขึ้นกับความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระใน

การดักจับอนุมูล ABTS โดยเฉพาะอย่างยิ่งวิธีการนี้วัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระได้ทั้งสารประกอบที่มีขั้วและไม่มีขั้วจากสารตัวอย่างในที่นี้คือสารสกัดได้ ซึ่งวิธีการทั้งสองสามารถทำการวิเคราะห์ได้ง่าย ต้นทุนต่ำเหมาะที่จะใช้ตรวจสอบพฤติกรรมความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและให้ผลการทดสอบที่น่าเชื่อถือ ผลการทดลองของสองวิธีกับสารสกัดใบและกิ่ง แสดงได้ดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบและกิ่งฝาดดอกแดงโดยวิธี DPPH และ ABTS

ส่วนพืช	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ IC ₅₀ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	DPPH	ABTS
ใบ	28.17 ± 0.10	16.42 ± 0.10
กิ่ง	7.38 ± 0.04	3.61 ± 0.04
BHT	10.33 ± 0.13	10.73 ± 0.12
Vit. C	1.39 ± 0.02	2.66 ± 0.10

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากข้อมูลการทดลอง 3 ซ้ำ; BHT = Butylated hydroxytoluene; Vit. C = Vitamin C

จากตารางที่ 3.3 พบว่าสารสกัดส่วนใบและกิ่งฝาดดอกแดง ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยแสดงค่า IC₅₀ ในช่วง 7 – 29 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับวิธี DPPH และแสดงค่า IC₅₀ ในช่วง 3 – 16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับวิธี ABTS และสารสกัดจากกิ่ง ซึ่งให้ค่า IC₅₀ 7.38 ± 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (DPPH) และ 3.61 ± 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ABTS) ดักจับอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดจากใบ ซึ่งให้ค่า IC₅₀ 28.17 ± 0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (DPPH) และ 16.42 ± 0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ABTS) ของฝาดดอกแดงตามลำดับ ค่า IC₅₀ ที่ต่ำกว่าหมายความว่ามีความมีประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้สูงกว่า เมื่อเปรียบเทียบผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบและกิ่งฝาดดอกแดง กับสารต้านอนุมูลอิสระทางการค้า Butylated hydroxytoluene (BHT) และวิตามินซี (Vit. C) โดยวิธี DPPH กับ ABTS⁺ พบว่าสารสกัดจากกิ่งให้ค่า IC₅₀ น้อยกว่า BHT แต่มากกว่า Vit. C ในขณะที่สารสกัดจากใบให้ค่า IC₅₀ มากกว่าทั้ง BHT และ Vit.C จึงเป็นไปได้ว่าสารออกฤทธิ์ทางธรรมชาติหรือสารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดกิ่งมีมากกว่าสารสกัดจากใบ ผลจากงานวิจัยนี้คล้ายกับงานวิจัยของ ลักขมี และคณะ (2557) ที่ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดใบและเปลือกของโกนงกางใบเล็ก โปรงแดงและถอบแถบ พบว่าสารสกัดจากเปลือกของสารสกัดทั้งสามชนิดมีสารอนุมูลอิสระจากธรรมชาติออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระได้มากกว่าสารสกัดจากใบ และมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ของ BHT แต่น้อยกว่าวิตามินซี และงานวิจัยของ Vittaya, Khongsai and leesakul (2017)

ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นแหล่งสารอนุมูลอิสระธรรมชาติ พบว่าสารสกัดส่วนเปลือกของพืชป่าชายเลนบางชนิดมีพฤติกรรมการดักจับอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดส่วนใบ ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณสารฟลาโวนอยด์ของพินอลิก ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติดักจับอนุมูลอิสระได้ดี และเพื่อให้ได้ข้อมูลผลการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนใบและกิ่งฝาดดอกแดง จำเป็นอย่างยิ่งต่อการศึกษาการแยกสารสำคัญเช่นสารประกอบพินอลิกให้บริสุทธิ์และศึกษาการออกฤทธิ์ต่อไป

นอกจากนี้ในระหว่างการศึกษาฟลาโวนอยด์และฤทธิ์ทางชีวภาพ มีการนำสารสกัดส่วนกิ่งไปทำการแยกสารให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี พบสารใหม่หนึ่งชนิดคือสารประกอบวงแหวนขนาดใหญ่ของแลกโตน ชื่อ 12-hydroxycorniculatolide A และสารประกอบที่เคยศึกษาการแยกมาแล้วจำนวน 3 ชนิดคือ culatolide A, 12-hydroxy-11-O-methylcorniculatolide A และ 6,7-dimethoxy coumarin สารเหล่านี้จัดเป็นสารประกอบของพินอลิก (Puttandon et al, 2018) มีส่วนช่วยในการดักจับอนุมูลอิสระได้ดี เนื่องจากเป็นสารกลุ่ม macrocyclic lactone และสารกลุ่ม coumarin ที่มี conjugated double bond และมีอะตอมออกซิเจนเป็นหมู่แทนที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการดักจับอนุมูลอิสระสูงมาก ส่งผลให้ค่า IC_{50} ต่ำด้วย



บทที่ 4

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

4.1 สรุปผล

ผลการวิจัยที่ได้จากการศึกษา ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดส่วนใบและกิ่งฝาดดอกแดง มีสารสำคัญของพฤษเคมีที่เป็นเมทาบอลไลต์ปฐมภูมิเช่นคาร์โบไฮเดรต โปรตีน กรดอะมิโน และเมทาบอลไลต์ทุติยภูมิเช่นแอนทราควิโนน ซาโปนิน ฟลาโวนอยด์ แทนนิน และแอลคาลอยด์ เป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้สารสกัดส่วนใบและกิ่งฝาดดอกแดงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะกิ่งฝาดดอกแดงซึ่งมีสารประกอบฟีนอลิก ได้จากการทดลองของ Wongsomboon (2018) สามารถดักจับอนุมูลอิสระด้วยค่า IC_{50} คำน้อย น้อยกว่าสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ BHT ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าสารสกัดใบและกิ่งมีคุณสมบัติใช้ทางยาได้ เนื่องจากการมีสารประกอบฟีนอลิกและสารพฤษเคมีอื่น ๆ เป็นองค์ประกอบสามารถดักจับอนุมูลอิสระได้ และเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี ผลที่ได้จากการศึกษาในงานวิจัยนี้ สามารถนำไปศึกษาต่อยอดงานทางด้านประมง การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสัตว์น้ำ หรือทางเภสัชวิทยาต่อไปในอนาคต

4.2 ข้อเสนอแนะ

4.2.1 ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (Total phenolic content) โดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

4.2.2 เนื่องจากฝาดดอกแดงเป็นพืชป่าชายเลน เจริญเติบโตตามแนวชายฝั่งทะเล การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสัตว์น้ำบางชนิด ด้วยสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ นับว่าเป็นงานทดสอบที่น่าสนใจ

4.2.3 ทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ เช่นฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง หรือฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคผิวหนัง หรือทางเดินอาหาร หรืออื่น ๆ เพื่อตรวจหาความหลากหลายของพืชต่อการออกฤทธิ์นั้น ๆ

จากนั้นนำข้อมูลองค์ประกอบทางพฤษเคมีทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ อธิบายผลการทดลอง สนับสนุนข้อมูลการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสัตว์น้ำ หรือฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง เป็นการเพิ่มองค์ความรู้ต่อยอดงานวิจัย และเป็นประโยชน์ต่อผู้ค้นคว้าศึกษาต่อไป

เอกสารอ้างอิง

การจัดการสวนป่าชายเลนแบบผสมผสานเพื่อการพัฒนาทรัพยากรและสิ่งแวดล้อมบริเวณชายฝั่ง
ทะเลของประเทศไทย. 2547. ห้างจำกัดประสุขชัยการพิมพ์. กรุงเทพมหานคร.

การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม. สำนักพิมพ์สุขไพศาล. กรุงเทพฯ.

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรม
ราชกุมารี. ข้อมูลพรรณไม้ : โกงกางใบเล็ก. แหล่งข้อมูล : [http://www.rspg.or.th/
plants_data/plantdat/rhizopho/rapicu_1.htm](http://www.rspg.or.th/plants_data/plantdat/rhizopho/rapicu_1.htm), 20 พฤษภาคม 2558.

ธีรวุฒิ เลิศสุทธิขวาล, อุไรวรรณ วัฒนกุล และ วันเพ็ญ สายน้ำ. 2552. ประสิทธิภาพของสารสกัด
หายาจากฝาดดอกแดง (*Lumnitzera littorea*) ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* sp.
วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง. 3 (1): 97-103.

ฝาดดอกแดง. แหล่งข้อมูล : http://tanhakit.blogspot.com/2010/12/blog-post_3764.html,
9 กรกฎาคม 2563.

พงศ์ศักดิ์รัตน์ชัยกุลโสภณและปาริชาติพุ่มขจร. 2553. การใช้สมุนไพรในการป้องกันและรักษาโรคในปลา.
วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 12(4): 63-71.

พรรณไม้สมุนไพรในป่าชายเลน บ้านทุ่งตะเชะ จังหวัดตรัง. 2555. ห้างจำกัดประสุขชัยการพิมพ์.

พัฒน์ สุจ้านงค์. กฎหมายควบคุมอาหารและมาตรฐานอาหาร. 2522. โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์และ นิธิยา รัตนาปนนท์. ม.ป.ป. Phenolic compounds /สารประกอบฟีนอล.
แหล่งที่มา : [http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2585/
phenolic-compound](http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2585/phenolic-compound), 30 พฤษภาคม 2560.

ลักขมี วิทยา และ ชาคริยา ฉลาด. 2558. ผลของตัวทำละลายต่อฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัด
ป่าชายเลน. **รายงานการวิจัย**. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย, ตรัง.

วัลลภ วิเชษฐ์สรณ์และปราณีต โอปณะโสภิต. ภาพรวมของอนุมูลอิสระและการทดสอบฤทธิ์
ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากพืชในหลอดทดลอง. **วารสารศรีนครินทร์วิโรฒเภสัชสาร**.
9(1): 73-80.

ศรินรัตน์ ฉัตรธีระนันท์, วราภคณา สบายใจ และ สิริมาส นิยมไทย. 2556. การทดสอบ
องค์ประกอบทางพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของใบข่อยดำ. **วารสารวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น** 41(3) : 723-730.

สิทธิโชค จันทร์ย่อง. 2552. **พันธุ์ไม้ป่าชายเลนและป่าชายหาดชายฝั่งอ่าวสิเกา จังหวัดตรัง**. นีโอพ้อยท์.
138 น.

สมอพิภก. แหล่งที่มา : <https://medthai.com/%E0%B8%AA%E0%B8%A1%E0%B8%AD%E0%B8%9E%E0%B8%B4%E0%B9%80%E0%B8%A0%E0%B8%81/>, 9 กรกฎาคม 2563.

หนังสือพรรณไม้ในป่าชายเลน สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2549.

หูกวาง. แหล่งที่มา : <https://medthai.com/%E0%B8%AB%E0%B8%B9%E0%B8%81%E0%B8%A7%E0%B8%B2%E0%B8%87/>, 9 กรกฎาคม 2563.

อัญชลี ชำรงคคงสถิต และจิราพร โรจนทินกร. 2550. ประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรไทยในการ
ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งก้ามกราม. **วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง** 1: 192-200.

Ames, B.N., Shigenaga, M.K. and Hagen, T.M. 1993. Antioxidants, and the degenerative
diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 90
(17): 7915-7922.

- Anonymous. 2016. หยีทะเล. แหล่งที่มา : <http://www.thaikasetsart.com/%E0%B8%AB%E0%B8%A2%E0%B8%B5%E0%B8%97%E0%B8%B0%E0%B9%80%E0%B8%A5/>, 30 May 2017.
- Cai, Y.Z., San, M., Corke, H. 2003. Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae. **Journal of Agriculture Food Chemistry** 51: 2288-2294.
- Citarasu, T. 2010. Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. **Aquaculture International** 18(3): 403-414.
- Chopade, V.V., Tankar, A.N., Pande, V.V., Tekade, A.R., Gowekar, N.M., Bhandari, S.R., Khandake, S.N. 2008. Pongamia pinnata: Phytochemical constituents, Traditional uses and Pharmacological properties: A review. **International Journal of Green Pharmacy** 72-75.
- Gan, R.Y., Xu, X.R., Song, F.L., Kuang, L., Li, H.B. 2010. Antioxidant activity and total phenolic content of medicine plants associated with prevention and treatment of cardiovascular and cerebrovascular diseases. **Journal of Medicine Plants Research** 4: 2438-2444.
- Harborne, J.B. 1998. **Textbook of Phytochemical Methods**. A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis. 5th Edition, Chapman and Hall Ltd, London, 21-72.
- Khan, M.R., Omoloso, A.D., Barewai, Y. 2006. Antimicrobial activity of the Derris elliptica, *Derris indica* and *Derris trifoliata* extractives. **Fitoterapia** 77: 327-330.
- Kaewpiboon, C., Lirdprapamongkol, K., Srisomsap, C., Winyanu Wattikun, P., Yongvanich, T., Puwaprisirisan, P., Svasti, J. and Assavalapsakul, W. 2012. Studies of the *in vitro* cytotoxic, antioxidant, lipase inhibitory and antimicrobial activities of selected Thai medicinal plants. **BMC Complementary and Alternative Medicine** 12: 217.

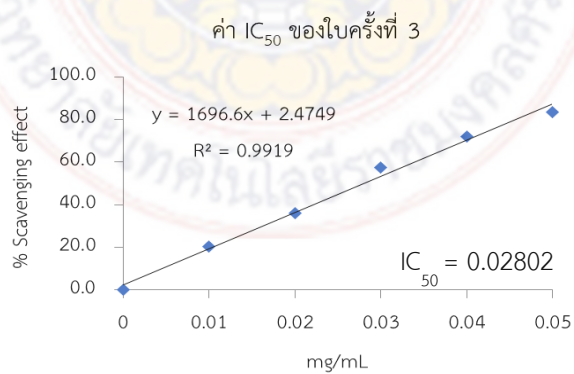
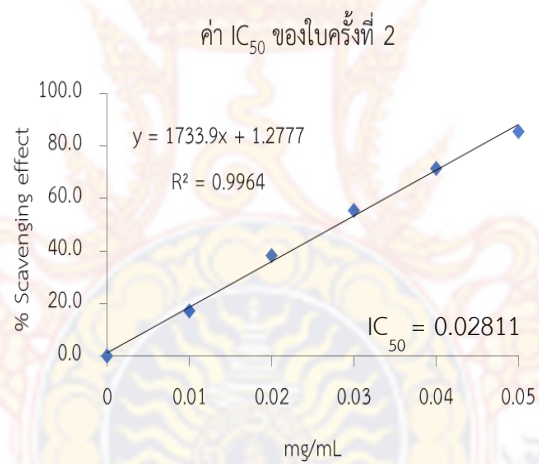
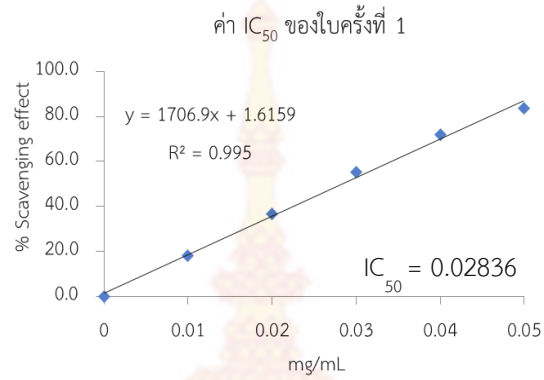
- Koysomboon, S., Altena, I.V, Kato, S, Chantrapromma, K. 2006. Antimycobacterial flavonoids from *Derris indica*. **Phytochemistry** 67: 1034-1040.
- Premanathan, M., Arakaki, R., Izumi, H., Kathiresan, K., Nakano, M., Yamamoto, N. and Nakashima, H. 1999. Antiviral properties of a mangrove plant, *Rhizophora apiculata* Blume, against immunodeficiency virus. **Antiviral Research** 44: 113-122 .
- Rahim, A.A., Rocca, E., Steinmetz, J., Jain Kassim, M., Sani Ibrahim, M. and Osman, H. 2008. Antioxidant activities of mangrove *Rhizophora apiculata* bark extracts. **Food Chemistry** 107(1): 200-207.
- Rastogi, R. P. and Mehrotra, B. N. 1991. **Compendium of Indian medicinal plants**. Publications & Information Directorate. New Delhi 1.
- Rao, R. R., Tiwari, A.K., Reddy, P.P., Babu, K. S., Ali, A.Z., Madhusudana. K., Rao, J.M. 2009. New furanoflavanoids, intestinal α -glucosidase inhibitory and free-radical (DPPH) scavenging, activity from antihyperglycemic root extract of *Derris indica* (Lam.). **Bioorganic & Medicinal Chemistry** 17: 5170–5175.
- Saad, S., Taher, M., Susanti, D., Qaralleh, H., Binti, N.-A. and Rahim, A. 2011. Antimicrobial activity of mangrove plant (*Lumnitzera littorea*). **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine** 523-525.
- Seethalaxmi, M.S., Shubharani, R., Nagananda, G.S. and Sivaram, V. 2012. Phytochemical analysis and free radical scavenging potential of *Baliospermum montanum* (Willd.) Müell. leaf. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research** 5(2): 135-137.

- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., Kaur, H. 2011. Phytochemical screening and Extraction: A Review. **Internationale Phamaceutica Scientia** 1(1): 98-106.
- Trease, G.E. and Evans, W.C. 2002. Pharmacognosy. 15th ed. Edinburgh: W.B. Saunders. pp. 221- 224, 303-306.
- Vittaya, L., Chalad, C., Khongsai, S. and Ritthiwigrom, T. 2014. Phytochemical Screening, Total phenolic Content, and Antibacterial activity of *Derris trifoliata* extracts. **Thai Journal of Botany** 6(special Iss): 109-115.
- Vittaya, L. and Chalad, C. 2016. Effect of Solvents on Phytochemical Analysis and Antibacterial Activity of Leaf and Bark Extracts from *Rhizophora apicalata*. **RMUTSV Research Journal** 8(1): 31-38.
- Vittaya, L., Khongsai, S and Leesakul, N. 2017. Mangrove plants as potential source of natural antioxidant. The 2th International Conference on Herbal and Traditional Medicine, 25th-26th January 2015, The Asia Hotel, Bangkok, Thailand, p.277-282.
- Wongsomboon, P., Maneerat, W., Pyne, S.P. Vittaya, L. and Limtharakul, T. 2018. "12-Hydroxycorniculatolide A from the Mangrove Tree, *Lumnitzera littorea*. **Natural Product Communication** 13(10): 1327-1328.

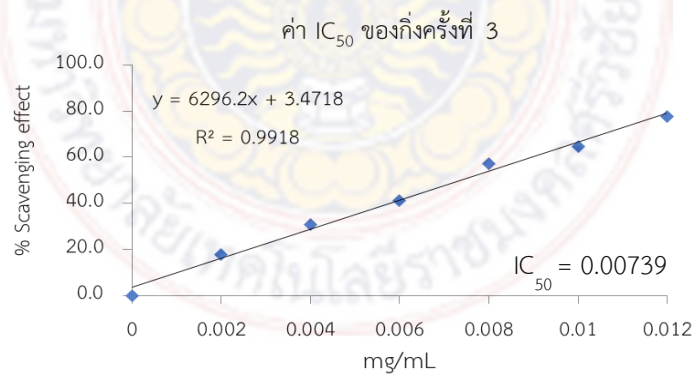
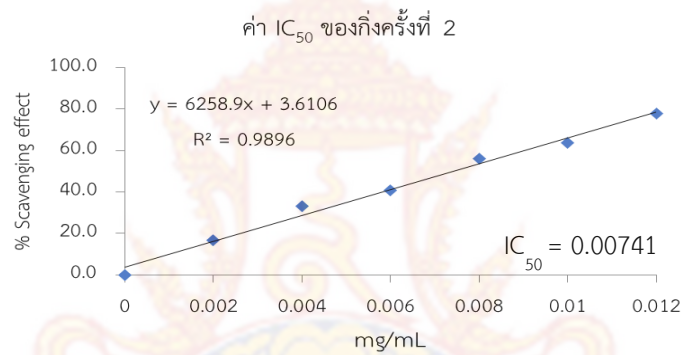
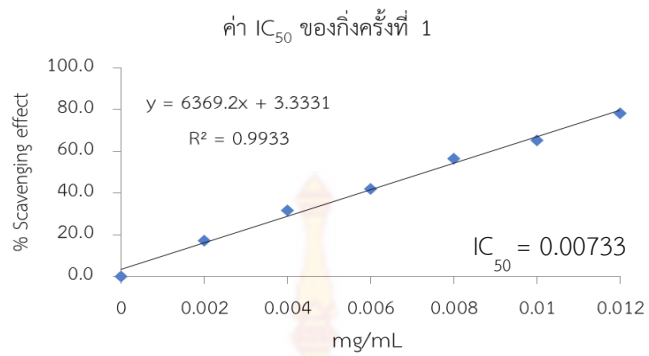
ภาคผนวก



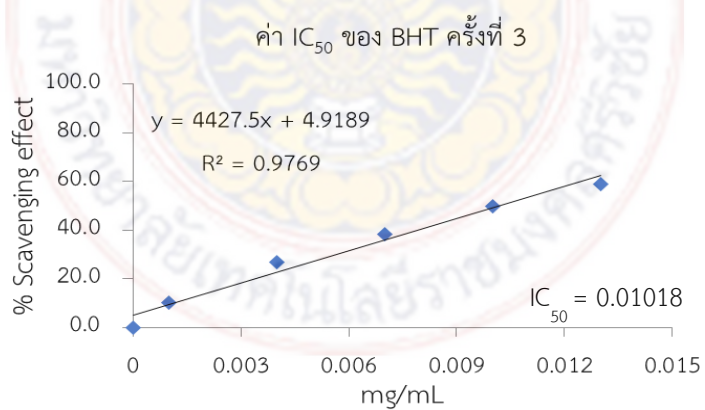
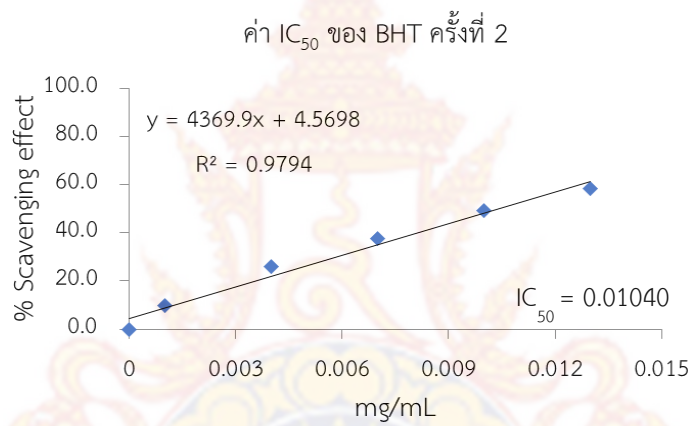
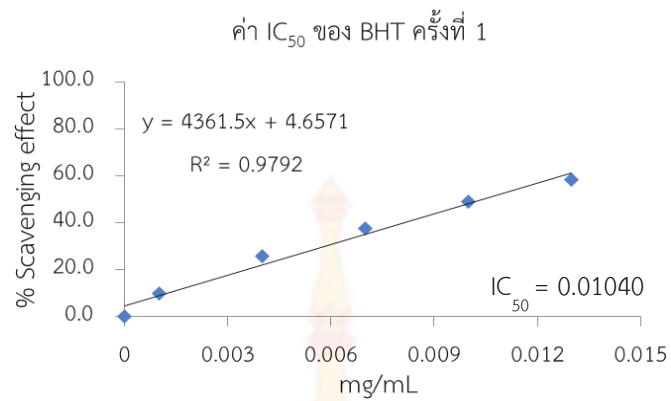
กราฟการหา IC₅₀ ของสารสกัดใบและกิ่งฝาดดอกแดงและสารมาตรฐาน



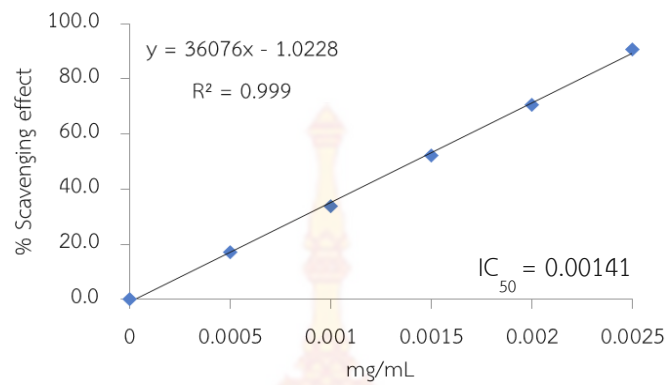
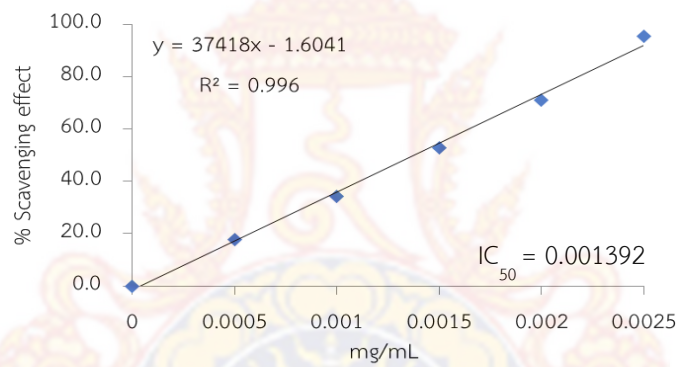
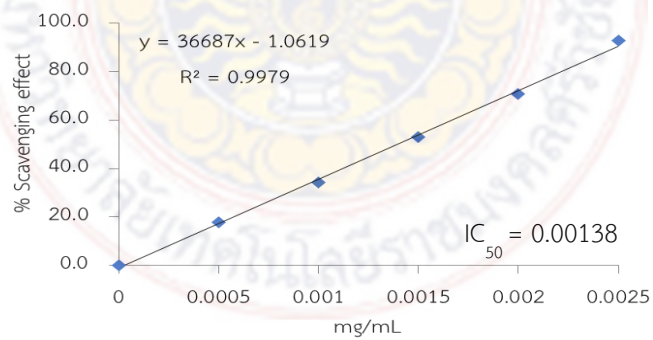
ภาพผนวก ก1 กราฟแสดงค่า IC₅₀ ของสารสกัดใบฝาดดอกแดง
จากการทดลอง 3 ครั้ง โดยวิธี DPPH



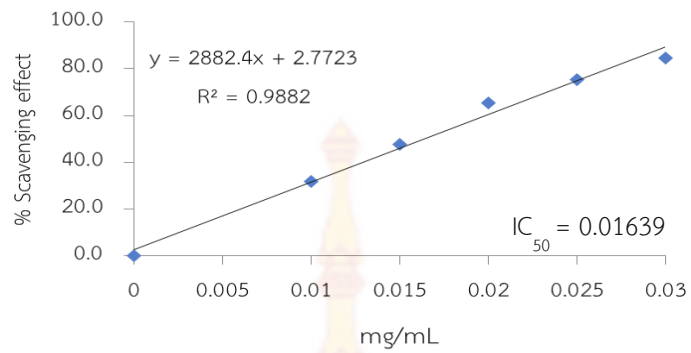
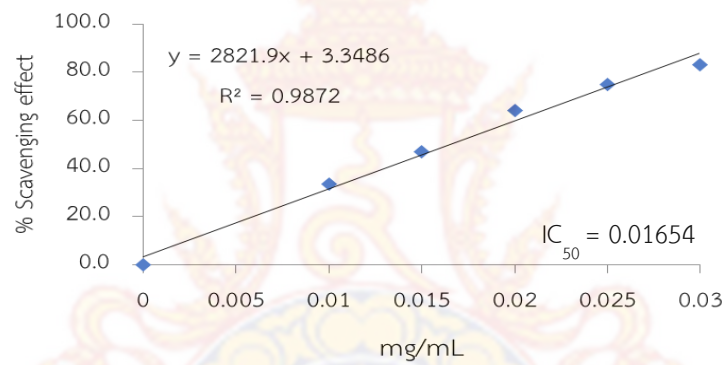
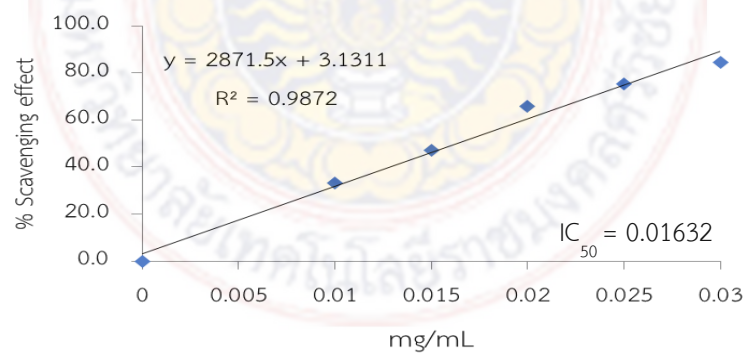
ภาพผนวก ก2 กราฟแสดงค่า IC_{50} ของสารสกัดกิ่งฝาดดอกแดง
จากการทดลอง 3 ครั้ง โดยวิธี DPPH



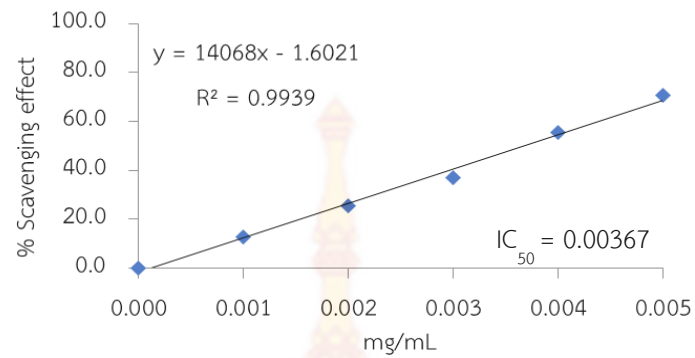
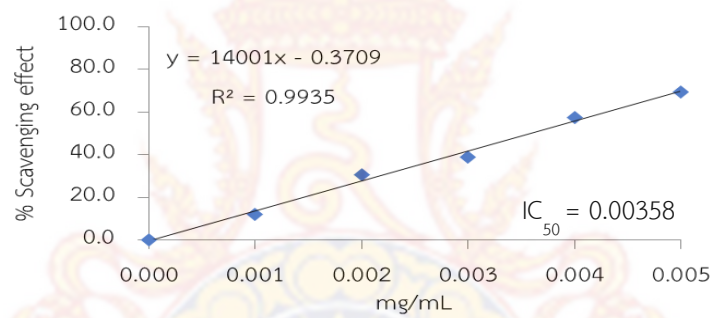
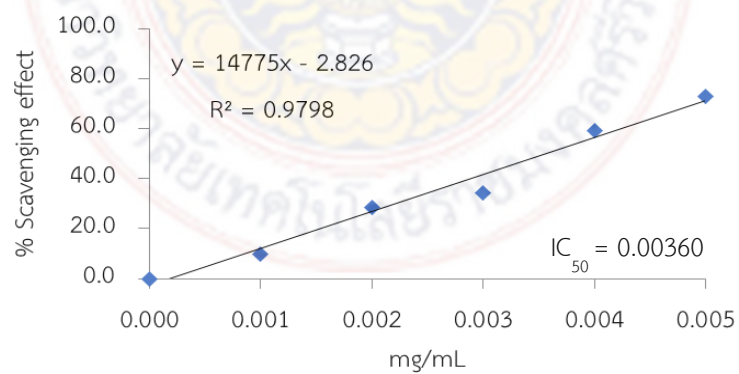
ภาพผนวก ก3 กราฟแสดงค่า IC_{50} ของสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ BHT
จากการทดลอง 3 ครั้ง โดยวิธี DPPH

ค่า IC_{50} ของ Vit. C ครั้งที่ 1ค่า IC_{50} ของ Vit. C ครั้งที่ 2ค่า IC_{50} ของ Vit. C ครั้งที่ 3

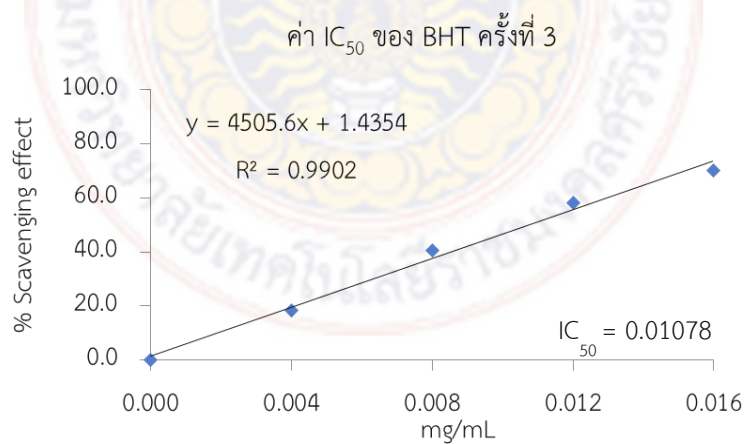
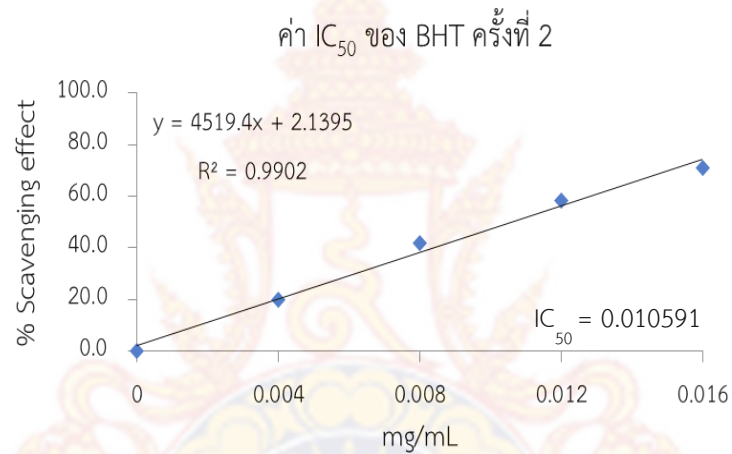
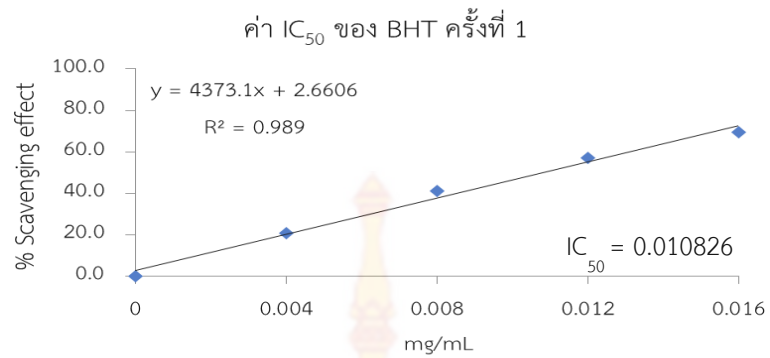
ภาพผนวก ก4 กราฟแสดงค่า IC_{50} ของสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ Vit. C จากการทดลอง 3 ครั้ง โดยวิธี DPPH

ค่า IC_{50} ของใบครั้งที่ 1ค่า IC_{50} ของใบครั้งที่ 2ค่า IC_{50} ของใบครั้งที่ 3

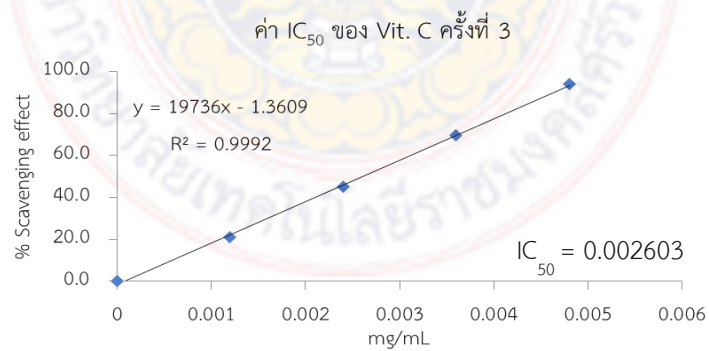
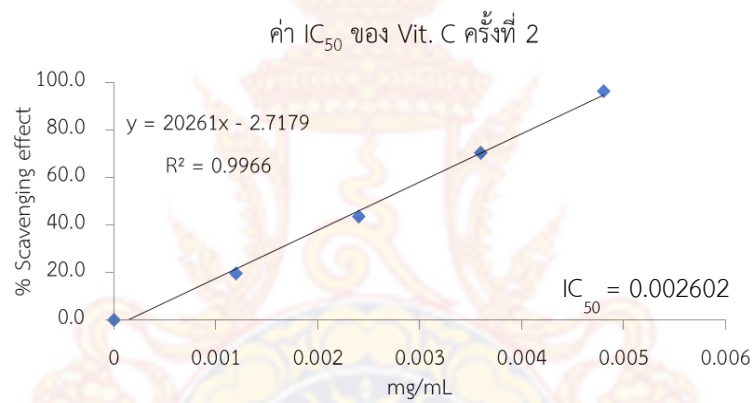
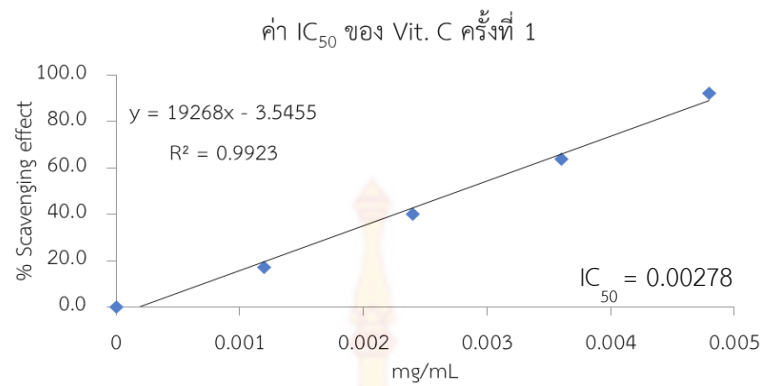
ภาพผนวก ก5 กราฟแสดงค่า IC_{50} ของสารสกัดใบฝาดดอกแดง
จากการทดลอง 3 ครั้ง โดยวิธี ABTS

ค่า IC_{50} ของกิ่งครั้งที่ 1ค่า IC_{50} ของกิ่งครั้งที่ 3ค่า IC_{50} ของกิ่งครั้งที่ 2

ภาพผนวก ก6 กราฟแสดงค่า IC_{50} ของสารสกัดกิ่งฝาดดอกแดง
จากการทดลอง 3 ครั้ง โดยวิธี ABTS



ภาพภาคผนวก ก7 กราฟแสดงค่า IC_{50} ของสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ BHT จากการทดลอง 3 ครั้ง โดยวิธี ABTS



ภาพผนวก ก8 กราฟแสดงค่า IC_{50} ของสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ Vit. C
จากการทดลอง 3 ครั้ง โดยวิธี ABTS

ตารางฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนใบและกิ่งฝาดดอกแดงและสารมาตรฐานโดยวิธี DPPH และ ABTS

ตารางภาคผนวก ก1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนใบและกิ่งฝาดดอกแดง และสารมาตรฐาน โดยวิธี DPPH

ส่วนพืช	ครั้งที่ทำการทดลอง	สมการ	R ²	IC ₅₀ (mg/mL)	ค่าเฉลี่ย	SD
ใบ	1	$y = 1706.9x + 1.6159$	$R^2 = 0.9950$	0.02836		
	2	$y = 1733.9x + 1.2777$	$R^2 = 0.9964$	0.02811	0.02817	0.0001
	3	$y = 1696.6x + 2.4749$	$R^2 = 0.9919$	0.02802		
กิ่ง	1	$y = 6369.2x + 3.3331$	$R^2 = 0.9933$	0.00733		
	2	$y = 6258.9x + 3.6106$	$R^2 = 0.9896$	0.00741	0.00738	0.00004
	3	$y = 6296.2x + 3.4718$	$R^2 = 0.9918$	0.00739		
BHT	1	$y = 4361.5x + 4.6571$	$R^2 = 0.9792$	0.01040		
	2	$y = 4369.9 + 4.5698$	$R^2 = 0.9794$	0.01040	0.01033	0.00013
	3	$y = 4427.5x + 4.9189$	$R^2 = 0.9769$	0.01018		
Vit. C	1	$y = 36076x - 1.0228$	$R^2 = 0.9990$	0.00141		
	2	$y = 37418x - 1.6041$	$R^2 = 0.9960$	0.00138	0.00139	0.00002
	3	$y = 36687x - 1.0619$	$R^2 = 0.9979$	0.00139		

ตารางภาคผนวก ก2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนใบและกิ่งฝาดดอกแดง และสารมาตรฐาน โดยวิธี ABTS

ส่วน	ครั้งที่	สมการ	R ²	IC ₅₀ (mg/mL)	ค่าเฉลี่ย	SD
พืช	ทำการทดลอง					
ใบ	1	$y = 2882.4x + 2.7723$	$R^2 = 0.9882$	0.01639		
	2	$y = 2821.9x + 3.3486$	$R^2 = 0.9872$	0.01654	0.01642	0.00011
	3	$y = 2871.5x + 3.1311$	$R^2 = 0.9872$	0.01632		
กิ่ง	1	$y = 14068.0x - 1.6021$	$R^2 = 0.9939$	0.00367		
	2	$y = 14775.0x - 2.826$	$R^2 = 0.9798$	0.00358	0.00361	0.00004
	3	$y = 14001.0x - 0.3709$	$R^2 = 0.9935$	0.00360		
BHT	1	$y = 4373.1x + 2.6606$	$R^2 = 0.9890$	0.01083		
	2	$y = 4519.4x + 2.1395$	$R^2 = 0.9902$	0.01059	0.01073	0.00012
	3	$y = 4505.6x + 1.4354$	$R^2 = 0.9902$	0.01078		
Vit. C	1	$y = 19.268x - 3.5455$	$R^2 = 0.9923$	0.00278		
	2	$y = 20.261x - 2.7179$	$R^2 = 0.9966$	0.00260	0.00266	0.00010
	3	$y = 19.736x - 1.3609$	$R^2 = 0.9992$	0.00260		

ภาคผนวก ข

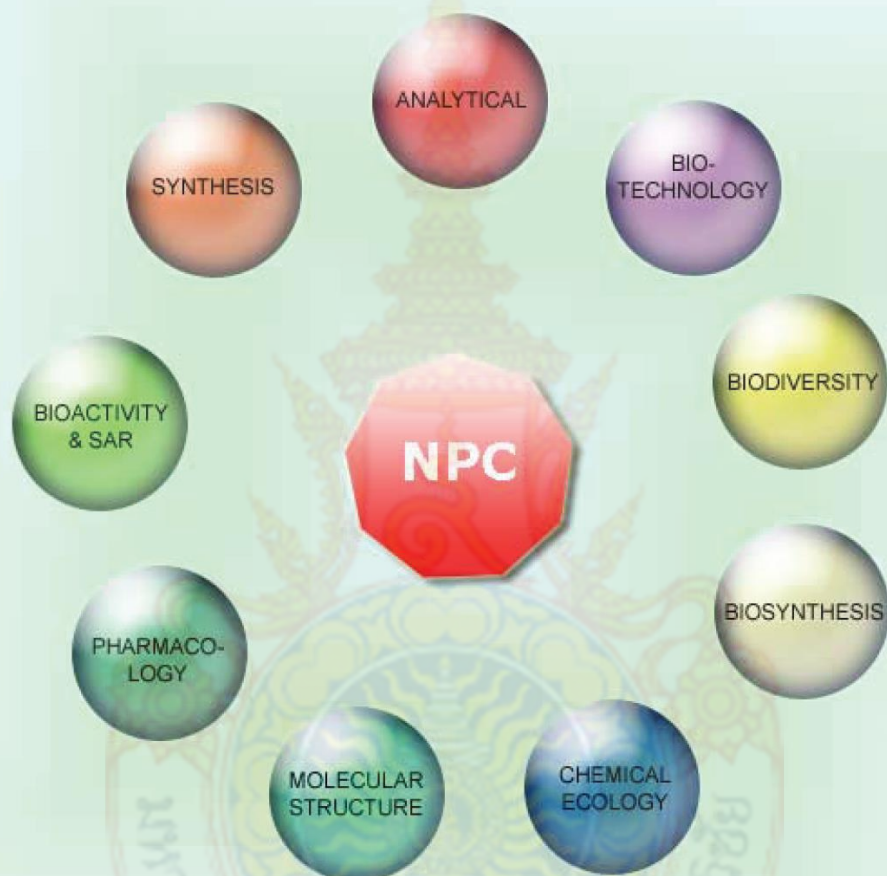
เอกสารงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่

1. Wongsomboon, P., Maneerat, W., Pyne, S.P. **Vittaya, L.** and Limtharakul, T. 2018. “12-Hydroxycorniculatolide A from the Mangrove Tree, *Lumnitzera littorea*”, *Nat. Prod. Commun.*, 13(10): 132-1328. (ISI Q3)



NATURAL PRODUCT COMMUNICATIONS

An International Journal for Communications and Reviews Covering all
Aspects of Natural Products Research



Volume 13, Issue 10, Pages 1235-1418, 2018
ISSN 1934-578X (printed); ISSN 1555-9475 (online)
www.naturalproduct.us

NPC**Natural Product Communications****EDITOR-IN-CHIEF**

DR. PAWAN K AGRAWAL
Natural Product Inc.
 7963, Anderson Park Lane,
 Westerville, Ohio 43081, USA
 agrawal@naturalproduct.us

EDITORS

PROFESSOR MAURIZIO BRUNO
Department STEBICEF,
University of Palermo, Viale delle Scienze,
Parco d'Orleans II - 90128 Palermo, Italy
 maurizio.bruno@unipa.it

PROFESSOR CARMEN MARTIN-CORDERO
Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy,
University of Seville, Seville, Spain
 carmenmc@us.es

PROFESSOR VLADIMIR I. KALININ
G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry,
Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences,
Pr. 100-letya Vladivostoka 159, 690022,
Vladivostok, Russian Federation
 kalinin@pihoc.dvo.ru

PROFESSOR YOSHIHIRO MIMAKI
School of Pharmacy,
Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences,
Hornouchi 1452-1, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan
 mimaki@ps.toyaku.ac.jp

PROFESSOR STEPHEN G. PYNE
Department of Chemistry, University of Wollongong,
Wollongong, New South Wales, 2522, Australia
 spyne@uow.edu.au

PROFESSOR MANFRED G. REINECKE
Department of Chemistry, Texas Christian University,
Forts Worth, TX 76129, USA
 m.reinecke@tcu.edu

PROFESSOR WILLIAM N. SETZER
Department of Chemistry, The University of Alabama in Huntsville,
Huntsville, AL 35809, USA
 wsetzer@chemistry.uah.edu

PROFESSOR PING-JYUN SUNG
National Museum of Marine Biology and Aquarium
Checheng, Pingtung 944
Taiwan
 pjsung@mimba.gov.tw

PROFESSOR YASUHIRO TEZUKA
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokuriku University,
Ho-3 Kanagawa-machi, Kanazawa 920-1181, Japan
 y-tezuka@hokuriku-u.ac.jp

PROFESSOR DAVID E. THURSTON
Institute of Pharmaceutical Science
Faculty of Life Sciences & Medicine
King's College London, Britannia House
7 Trinity Street, London SE1 1DB, UK
 david.thurston@kcl.ac.uk

HONORARY EDITOR

PROFESSOR GERALD BLUNDEN
The School of Pharmacy & Biomedical Sciences,
University of Portsmouth,
Portsmouth, PO1 2DT U.K.
 acuf64@dsl.pipex.com

ADVISORY BOARD

Prof. Giovanni Appendino
Novara, Italy

Prof. Norbert Arnold
Halle, Germany

Prof. Yoshinori Asakawa
Tokushima, Japan

Prof. Vassya Bankova
Sofia, Bulgaria

Prof. Roberto G. S. Berlinck
São Carlos, Brazil

Prof. Anna R. Bilia
Florence, Italy

Prof. Geoffrey Cordell
Chicago, IL, USA

Prof. Fatih Demirci
Eskişehir, Turkey

Prof. Francesco Epifano
Chieti Scalo, Italy

Prof. Ana Cristina Figueiredo
Lisbon, Portugal

Prof. Cristina Gracia-Viguera
Murcia, Spain

Dr. Christopher Gray
Saint John, NB, Canada

Prof. Dominique Guillaume
Reims, France

Prof. Duvvuru Gunasekar
Tirupati, India

Prof. Hisahiro Hagiwara
Niigata, Japan

Prof. Judith Hohmann
Szeged, Hungary

Prof. Tsukasa Iwashina
Tsukuba, Japan

Prof. Leopold Jurovetz
Vienna, Austria

Prof. Phan Van Kiem
Hanoi, Vietnam

Prof. Niel A. Koorbanally
Durban, South Africa

Prof. Chiaki Kuroda
Tokyo, Japan

Prof. Hartmut Laatsch
Göttingen, Germany

Prof. Marie Lacaille-Dubois
Dijon, France

Prof. Shoen-Sheng Lee
Taipei, Taiwan

Prof. M. Soledade C. Pedras
Saskatoon, Canada

Prof. Luc Pieters
Antwerp, Belgium

Prof. Peter Proksch
Düsseldorf, Germany

Prof. Phila Raharivelomanana
Tahiti, French Polynesia

Prof. Stefano Serra
Milano, Italy

Dr. Bikram Singh
Palampur, India

Prof. Marina Stefova
Skopje, Republic of Macedonia

Prof. Leandros A. Skaltsounis
Zografou, Greece

Prof. John L. Sorensen
Manitoba, Canada

Prof. Johannes van Staden
Scottsville, South Africa

Prof. Valentin Stonik
Vladivostok, Russia

Prof. Winston F. Tinto
Barbados, West Indies

Prof. Sylvia Urban
Melbourne, Australia

Prof. Karen Valant-Vetschera
Vienna, Austria

INFORMATION FOR AUTHORS

Full details of how to submit a manuscript for publication in Natural Product Communications are given in Information for Authors on our Web site <http://www.naturalproduct.us>.

Authors may reproduce/republish portions of their published contribution without seeking permission from NPC, provided that any such republication is accompanied by an acknowledgment (original citation)-Reproduced by permission of Natural Product Communications. Any unauthorized reproduction, transmission or storage may result in either civil or criminal liability.

The publication of each of the articles contained herein is protected by copyright. Except as allowed under national "fair use" laws, copying is not permitted by any means or for any purpose, such as for distribution to any third party (whether by sale, loan, gift, or otherwise); as agent (express or implied) of any third party; for purposes of advertising or promotion; or to create collective or derivative works. Such permission requests, or other inquiries, should be addressed to the Natural Product Inc. (NPI). A photocopy license is available from the NPI for institutional subscribers that need to make multiple copies of single articles for internal study or research purposes.

To Subscribe: Natural Product Communications is a journal published monthly. 2018 subscription price: US\$2,595 (Print, ISSN# 1934-578X); US\$2,595 (Web edition, ISSN# 1555-9475); US\$2,995 (Print + single site online); US\$595 (Personal online). Orders should be addressed to Subscription Department, Natural Product Communications, Natural Product Inc., 7963 Anderson Park Lane, Westerville, Ohio 43081, USA. Subscriptions are renewed on an annual basis. Claims for nonreceipt of issues will be honored if made within three months of publication of the issue. All issues are dispatched by airmail throughout the world, excluding the USA and Canada.

12-Hydroxycorniculatolide A from the Mangrove Tree, *Lumnitzera littorea*

Puttandon Wongsomboon^{a,b}, Wisanu Maneerat^{c,d}, Stephen G Pyne^e, Luksamee Vittaya^{f,*} and Thunwadee Limtharakul (née Ritthiwigrom)^{a,g,*}

^aDepartment of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University, Sutep Muang, Chiang Mai, 50200, Thailand

^bThe Graduate School, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200, Thailand

^cSchool of Science, Mae Fah Luang University, Chiang Rai, 57100, Thailand

^dCenter of Chemical Innovation for Sustainability (CIS), Mae Fah Luang University, Chiang Rai 57100, Thailand

^eSchool of Chemistry, University of Wollongong, NSW, 2522, Australia

^fFaculty of Science and Fisheries Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Trang, 92150, Thailand

^gResearch Center on Chemistry for Development of Health promoting Products from Northern Resources, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200, Thailand

thunwadee.r@cmu.ac.th (T. Limtharakul), nokluksamee@hotmail.com (L. Vittaya)

Received: June 20th, 2018; Accepted: August 26th, 2018

A new macrocyclic lactone, 12-hydroxycorniculatolide A (1), along with three known compounds, corniculatolide A (2), 12-hydroxy-11-*O*-methylcorniculatolide A (3) and 6,7-dimethoxycoumarin (4) were isolated from the methanolic extract of the twigs of *Lumnitzera littorea*. All compounds were characterized using spectroscopic methods. All compounds were screened against a panel of six Gram positive and five Gram negative bacteria.

Keywords: *Lumnitzera littorea*, Macrocyclic lactone, 12-Hydroxycorniculatolide A, Antibacterial activity.

Lumnitzera littorea (Jack) Voigt. (Combretaceae) is a small mangrove tree that is spread over the coast of the tropical and subtropical areas of Australia, Polynesia and Southeast Asia to the East coast of Africa. In traditional medicine, this plant is used for the treatment of diarrhea in Malaysia [1]. Only two species are found in Thailand, *L. racemosa* has been reported to have various types of secondary metabolites, however flavonoid glycosides are the principle constituents [2]. Of these myricetrin exhibited hepatoprotective activity against acetaminophen-induced hepatotoxicity using human Hep-G2 cells [3], it also showed potent antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa* [4] and exerted cytotoxicity against HL-60 cells [5]. For the other Thai species, *L. littorea*, there are no phytochemistry reports. Herein, we reported the isolation and structural characterization of a new macrocyclic lactone (1) together with three known compounds (2-4) from the crude methanolic extract of the twigs of *L. littorea*.

Compound 1 was obtained as a brown viscous oil with a molecular formula of C₁₈H₁₈O₅ from the HRESI-MS ion peak at *m/z* 313.10822 [M-H]⁻ (calculated for C₁₈H₁₇O₅ 313.10705). The UV spectrum showed a maximum absorption band at λ_{max} 273 nm. The IR spectrum revealed a hydroxy (OH) stretch at 3548 cm⁻¹, an ester carbonyl stretch at 1712 cm⁻¹ and the aromatic C=C stretch at 1600 and 1506 cm⁻¹. The ¹H-NMR spectrum of compound 1 displayed resonances for a *para*-disubstituted aromatic ring [δ_H 7.28 and 7.00 (each *d*, *J*=8.4 Hz, 2H)], two *meta*-coupled aromatic protons [δ_H 6.33 and 4.86 (each *d*, *J*=1.9 Hz, 1H)], oxymethylene protons at δ_H 4.04 and four methylene protons [δ_H 2.80, 2.78, 2.24 and 2.09 (each *m*, 2H)]. The ¹³C-NMR and DEPT90 spectrum showed resonances for an ester carbonyl carbon (δ_C 174.0), six quaternary aromatic carbons (δ_C 154.5, 149.5, 144.4, 138.0, 132.6, 130.0), six aromatic methine carbons (δ_C 131.1 (2C), 123.6 (2C), 108.5, 105.0), one oxymethylene carbon (δ_C 64.0) and four methylene carbons

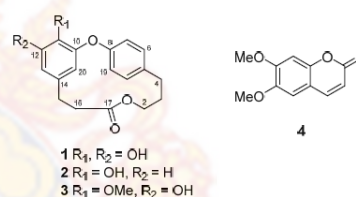


Figure 1: Structure of all isolated compounds (1-4) from *L. littorea*

(δ_C 34.1, 32.7, 28.8, 27.4) (Table 1). The NMR spectroscopic data of compound 1 (Figure 1) were similar to those of 12-hydroxy-11-*O*-methylcorniculatolide A (compound 3) [6], except for the lack of the resonance for the methoxy group in compound 1, which was also indicated from the *m/z* 14 difference in their MS molecular ion peaks. Moreover, the ¹³C-NMR chemical shift of C-11 (δ_C 133.4) in compound 3 changed to δ_C 130.0 in compound 1. Therefore, the structure of compound 1 was elucidated as 12-hydroxycorniculatolide A. The other three known compounds were identified as corniculatolide A (2) [6], 12-hydroxy-11-*O*-methylcorniculatolide A (3) [6] and 6,7-dimethoxycoumarin (4) [7] after comparisons were made with the published spectroscopic data. All compounds were screened against a panel of six Gram positive (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Streptococcus mutans*) and five Gram negative (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholera* and *Shigella flexneri*) bacteria (see SI). These compounds were found in general to be inactive (MICs > 200 μg/mL) or weakly active (MIC = 128 μg/mL). However, compound 1 showed modest antibacterial activity (MIC = 64 μg/mL) against *Staphylococcus aureus*. The macrocyclic lactone compounds 1, 2 and 3 were found for the first time from this genus.

Table 1: NMR spectroscopic data of 12-hydroxycorniculatolide A (**1**) in CDCl₃.

Position	δ_{H} , (mult, J in Hz)	δ_{C}	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)
2	4.04 (m)	64.0	CH ₂ C-3, C-4
3	2.09 (m)	28.8	CH ₂ C-2, C-4, C-5
4	2.80 (m)	34.1	CH ₂ C-2, C-3, C-5, C-6, C-18
5	-	138.0	-
6	7.28 (d, 8.4)	131.1	CH C-4, C-7, C-8, C-18
7	7.00 (d, 8.4)	123.6	CH C-5, C-8, C-19
8	-	154.5	-
10	-	144.4	-
11	-	130.0	-
12	-	149.5	-
13	4.86 (d, 1.9)	105.0	CH C-11, C-12, C-15, C-20
14	-	132.6	-
15	2.78 (m)	27.4	CH ₂ C-13, C-14, C-16, C-17, C-20
16	2.24 (m)	32.7	CH ₂ C-14, C-15, C-17
17	-	174.0	-
18	7.28 (d, 8.4)	131.1	CH C-4, C-6, C-8, C-19
19	7.00 (d, 8.4)	123.6	CH C-5, C-7, C-8
20	6.33 (d, 1.9)	108.5	CH C-10, C-11, C-13, C-15

Experimental

General: Melting points, SANYO Gallenkamp melting point apparatus; UV, Perkin-Elmer UV-Vis spectrometer; IR, Bruker Tensor 27 FT-IR spectrometer; NMR, 400 MHz Bruker Ultra Shield FT-NMR spectrometer; MS, Micro TOF, Bruker Daltonics mass spectrometer. Thin-layer chromatography (TLC) was performed on silica gel 60 GF₂₅₄ Merck. Column chromatography (CC) was performed on silica gel Merck (type 100, 63-200 μm and type 60, 5-40 μm) for quick column chromatography (QCC) and Sephadex LH-20. All solvents for extraction and chromatography were distilled prior to use.

Plant Material: *Lumnitzera littorea* (Jack) Voigt, was collected from Trang Province in Thailand (October 2015) and identified by Asst. Prof. Sittichoke Junyong (CMUB Herbarium, Chiang Mai University, voucher specimen number 39892).

Extraction and isolation: The air-dried twigs (5.2 kg) of *L. littorea* were extracted with MeOH (19 L) at room temperature. The organic solvent was removed and under reduced pressure to provide the crude methanol extract of twig (357.51 g), which was partitioned with acetone to provide the crude acetone extract (142.54 g). This crude extract was separated by QCC over silica gel and eluted with a gradient solvent system of hexanes-acetone (1:0 to 0:1 v/v) and acetone-methanol (1:0 to 0:1 v/v) to provide 11 fractions (A-K). Fraction E (576.6 mg) was separated by CC over Sephadex LH-20 (100% MeOH) to give six sub-fractions (E1-E6). Sub-fraction E5 (49.5 mg) was purified by CC over silica gel (100% DCM) to obtain compounds **2** (25.3 mg) and **3** (3.5 mg). Fraction F (508.1

mg) was further fractionated by CC over Sephadex LH-20 (100% MeOH) to obtain nine sub-fractions (F1-F9). Sub-fraction F3 was separated by CC over Sephadex LH-20 (100% MeOH) to provide six sub-fractions (F3A-F3F). Compound **4** (1.0 mg) was obtained from the combined sub-fractions F3C and F3D (9.0 mg) by CC over Sephadex LH-20 (100% MeOH) followed by CC over silica gel (EtOAc:hexane (3:7)). Fraction G (17.3 g) was isolated by CC over Sephadex LH-20 (100% MeOH) to get eight sub-fractions (G1-G8). Then, sub-fraction G3 (46.9 mg) was chromatographed over Sephadex LH-20 (100% MeOH) to give five sub-fractions (G3A-G3E). Finally, compound **1** (3.7 mg) was obtained from fraction G3C by CC over silica gel (MeOH:DCM (1:99)).

12-Hydroxycorniculatolide A (**1**)

Brown viscous oil.

IR (neat) ν : 3548, 1712, 1600 and 1506 cm⁻¹

UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ): 273 (3.3)

¹H NMR and ¹³C NMR: Table 1.

HRMS-ESI-TOF: m/z [M-H]⁻ calcd for C₁₈H₁₇O₅, 313.10705; found: 313.10822

Bioactivity assays: The activities against 11 species of bacterial strains were reported as the minimum inhibitory concentrations (MICs) value by a two-fold serial dilution method using Mueller Hinton broth according to the Clinical and Laboratory Standards Institute recommendations [8]. The bacterial strains, including six Gram positive; *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* TISTR 1248, *Micrococcus luteus* DMST 15503, *Staphylococcus aureus* TISTR 746, *Staphylococcus epidermidis* DMST 15505 and *Streptococcus mitis* DMST 1877, five Gram negative; *Escherichia coli* TISTR 527, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* DMST 562, *Vibrio cholera* DMST 2873 and *Shigella flexneri* DMST 4423 were derived from the Microbiological Resources Center of the Thailand Institute of Scientific and Technological Research. The compounds **1**, **2**, **3** and **4** were dissolved in DMSO. The standard compounds, vancomycin and gentamicin, were used as reference substances.

Supplementary data: Results of antibacterial assays.

Acknowledgements - PW thanks Promotion of Science and Technology Talents Project (DPST). We acknowledge the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC) and the Faculty of Science and Fisheries Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya for financial support.

References

- [1] Saad S, Taher M, Susanti D, Qaralleh H, Rahim NABA. (2011) Antimicrobial activity of mangrove plant (*Lumnitzera littorea*). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, **3**, 523-525.
- [2] Phuong NH, Thuy NTL, Duc NT, Tuyet NTA, Mai NTT, Phung NKP. (2017) A new glycoside and *in vitro* evaluation of α -glucosidase inhibitory activity of constituents of the mangrove *Lumnitzera racemosa*. *Natural Product Communications*, **12**, 1751-1754.
- [3] Darwish AGG, Samy MN, Sugimoto S, Otsuka H, Abdel-Salam H, Matsunami K. (2016) Effects of hepatoprotective compounds from the leaves of *Lumnitzera racemosa* on acetaminophen-induced liver damage *in vitro*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **64**, 360-365.
- [4] D'Souza L, Wahidulla S, Devi P. (2010) Antibacterial phenolics from the mangrove *Lumnitzera racemosa*. *Indian Journal of Marine Sciences*, **39**, 294-298.
- [5] Thao NP, Luyen BTT, Diep CN, Tai BH, Kim EJ, Kang HK, Lee SH, Jang HD, Cuong NT, Thanh NV, Cuong NX, Nam NH, Minh CV, Kim YH. (2015) *In vitro* evaluation of the antioxidant and cytotoxic activities of constituents of the mangrove *Lumnitzera racemosa* Willd. *Archives of Pharmacal Research*, **38**, 446-455.
- [6] Ponnappalli MG, Annam SCVAR, Ravirala S, Sukki S, Ankireddy M, Tuniki VR. (2012) Unusual isomeric corniculatolides from mangrove, *Aegiceras corniculatum*. *Journal of Natural Products*, **75**, 275-279.
- [7] Jerezano A, Jiménez F, Cruz MdC, Montiel LE, Delgado F, Tamariz J. (2011) New approach for the construction of the coumarin frame and application in the total synthesis of natural products. *Helvetica Chimica Acta*, **94**, 185-198.
- [8] Clinical and Laboratory Standards Institute (2015) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. In *Approved Standard-Tenth Edition*. CLSI document M07-A10. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania USA.

New Verrucosidin Derivatives from the Marine-Derived Fungus <i>Penicillium</i> sp. XL-01 Yan Xu, Miao Zhang, Qing-Ai Liu, Lian-Dong Hu, Wan Li, Hua-Jie Zhu, Li Liu and Fei Cao	1329
Vasorelaxation Caused by Eugenol, Curcumin and Nanocurcumin is Partially Mediated by Activation of Aminoguanidine-sensitive iNOS in the Middle Uterine Artery of Non-pregnant and Pregnant <i>Capra hircus</i> Harithalakshmi Jandhyam and Subas Chandra Parija	1333
Anti-invasive Activity of <i>Lawsonia inermis</i> Branch and Its Potential Target Protein Souichi Nakashima, Yoshimi Oda, Mariko Kishimoto, Miyako Uno, Mako Aoki, Seikou Nakamura, Hiroki Tanaka and Hisashi Matsuda	1337
Content of Phenolic Compounds and Antioxidant Properties in Seeds of Sweet and Bitter Cultivars of Lupine (<i>Lupinus angustifolius</i>) Angelika Król, Ryszard Amarowicz and Stanislaw Weidner	1341
Metabolite Profiling of <i>Commiphora wightii</i> (Guggul) with Respect to Seasons TushaTripathi, Anil Bhatia, Suruchi Singh, Kunwar Sarvendra, Abdul Rahman Khan, Om P. Sidhu and Raja Roy	1345
Metabolic Analysis of <i>Vigna unguiculata</i> Sprouts Exposed to Different Light-Emitting Diodes Hyeon Ji Yeo, Chang Ha Park, Kyoung Bok Lee, Jae Kwang Kim, Jong Seok Park, Jong-Won Lee and Sang Un Park	1349
Volatile Constituents of <i>Emilia sonchifolia</i> from India Rajesh K. Joshi	1355
Chemical Characterization of Wild Growing <i>Origanum vulgare</i> Populations in Montenegro Danijela Stešević, Željko Jačimović, Zlatko Šatović, Aida Šapčanin, Gordana Jančan, Milica Kosović, Biljana Damjanović-Vratnica	1357
Composition, <i>in vitro</i> Anti-mildew Fungal Activities of the Heartwood Essential Oil of <i>Chamaecyparis formosensis</i> from Taiwan Yu-Chang Su, Kuang-Ping Hsu and Chen-Lung Ho	1363
Chemical Composition and Phytotoxic Activity of <i>Rosmarinus officinalis</i> Essential Oil Lucia Caputo, Mariarosa Trotta, Angelica Romaniello and Vincenzo De Feo	1367
Floral Scents in <i>Pachira aquatica</i> (Malvaceae): A Species with Diverse Floral Visitors in a Mexican Lowland Forests Iván Pale-Ezquivel, Armando Aguirre-Jaimes, Javier Hernández, Rosamond Coates and Zaira Domínguez	1371
<u>Accounts/Reviews</u>	
Phenanthridone Alkaloids of the Amaryllidaceae as Activators of the Apoptosis-related Proteolytic Enzymes, Caspases Jerald J. Nair and Johannes van Staden	1375
Phytoconstituents and Biological Activities of <i>Panax vietnamensis</i> (Vietnamese Ginseng): A Precious Ginseng and Call for Further Research-A systematic review Quang-Ung Le, Homg-Liang Lay, Ming-Chang Wu, Thi Hong-Hanh Nguyen and Duy-Lam Nguyen	1381
Plants of the Genus <i>Lavandula</i>: From Farm to Pharmacy Bahare Salehi, Dima Mnayer, Beraat Özçelik, Gökce Altın, Kadriye Nur Kasapoğlu, Ceren Daskaya-Dikmen, Mehdi Sharifi-Rad, Zeliha Selamoglu, Krishnendu Acharya, Surjit Sen, Karl R. Matthews, Patrick Valere Tsouh Fokou, Farukh Sharopov, William N. Setzer, Miquel Martorell and Javad Sharifi-Rad	1385
<i>Lavandula</i> Essential Oils: A Current Review of Applications in Medicinal, Food, and Cosmetic Industries of Lavender Rebecca Wells, Felisha Truong, Ayelign M. Adal, Lukman S. Sarker and Soheil S. Mahmoud	1403

Natural Product Communications 2018

Volume 13, Number 10

Contents

<u>Original Paper</u>	<u>Page</u>
Briaviolide Q, a New Briarane from the Cultured <i>Briareum violaceum</i> Tsung-Chang Tsai, Jing-Hao Xu, Mu-Jang Li, Jih-Jung Chen, Jui-Hsin Su, Yang-Chang Wu, Zhi-Hong Wen and Ping-Jyun Sung	1235
Synthetic Esterification of Yacon Sesquiterpene Lactone, Sonchifolinic Acid led to Cytotoxic SARs Study Yurika Kitai, Hisashi Nishiwaki, Lina Yonekura and Hirotooshi Tamura	1239
New Diterpene Glycosides from <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni: Rebaudioside VIII and Rebaudioside IXd Gil Ma, Allison Bechman, Cynthia Bunders, Krishna P. Devkota, Romila D. Charan, Catherine Ramirez, Tara M. Snyder, Christopher Priedemann and Indra Prakash	1243
Rhabdaprovidines D–G, Four New 6,6,5-Tricyclic Terpenoids from the Vietnamese Sponge <i>Rhabdastrella providentiae</i> Duong Thi Dung, Dan Thi Thuy Hang, Nguyen Xuan Nhiem, Tran Hong Quang, Bui Huu Tai, Pham Hai Yen, Nguyen Thi Hoai, Do Cong Thung, Chau Van Minh and Phan Van Kiem	1251
A New Limonoid from <i>Chisocheton paniculatus</i> Fruit Collected in Vietnam and Its NO Production Inhibitory Activity Nguyen Thi Hoai, Ho Viet Duc, Ain Raal and Hiroyuki Morita	1255
Suppression of Release of Matrix Metalloprotease-1 from Human Gingival Fibroblasts by <i>Cimicifuga</i> Rhizome Extract and a Novel Cimigenol Xyloside as an Active Constituent Mami Honda-Yokota, Kazuya Murata, Takuya Anraku and Masahiro Iwaki	1259
Antiplasmodial Activity of <i>Gnetum gnemon</i> Leaves and Compounds Isolated from them Partha P Dutta, Manobjyoti Bordoloi, Sonali Roy, Bardwi Narzary, Kabita Gogoi, Dibya R Bhattacharyya, Pradyumna K Mohapatra and Bhaskar Mazumder	1263
Structure – Anti-influenza Type A Activity Relationship among a Series of Nitrogen Lupane Triterpenoids Irina E. Smimova and Oxana B. Kazakova	1267
Two New Steroidal Saponins from <i>Solanum procumbens</i> Truong Thi Thu Hien, Hoang Anh Tuan, Do Phuong Huong, Hoang Van Luong, Ngo Thi Tuyet Mai, Bui Huu Tai and Phan Van Kiem	1271
<i>Pantoea ananatis</i> Converts MBOA to 6-Methoxy-4-nitro-benzoxazolin-2(3H)-one (NMBOA) for Cooperative Degradation with its Native Root Colonizing Microbial Consortium Margot Schulz, Diana Hofmann, Dieter Sicker, Lothar Hennig, Vadim Schütz, Matthias Preusche and Björn Thiele	1275
Bioactive Aporphine Alkaloids from the Roots of <i>Artabotrys spinosus</i>: Cholinesterase Inhibitory Activity and Molecular Docking Studies Jirapast Sichaem, Santi Tip-pyang and Kiattisak Lugsanangarn	1279
Evaluation of <i>Alangium tamarckii</i> Bark for Antiplasmodial and Cytotoxic Constituents and Isolation of a Novel Tubulosine Analogue Venkata Siva Satyanarayana Kantamreddi, Genma Marston, Steven D. Shnyder and Colin W. Wright	1283
Cupolamide B, A Cyclic Heptapeptide from <i>Theonella cupola</i> Lea S. Bonnington and Junichi Tanaka	1287
Jaceosidin Inhibits Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes through the PPARγ Pathway Seul Gi Lee, Jongbeom Chae, Jin Soo Kim, Kyoungjin Min, Taeg Kyu Kwon and Ju-Ock Nam	1289
Biological Activities of Extracts from Different Parts of two Cultivars of <i>Prunus persica</i> ‘Akatsuki’ and ‘Fastigiata’ Toshinori Nakagawa, Ahmed E. Allam, Koichiro Ohnuki and Kuniyoshi Shimizu	1293
A New Anti-inflammatory Chromone from the Leaves of <i>Eucalyptus viminalis</i> Most Afia Akhtar, Gerald Münch, Francis Bodkin and Ritesh Raju	1297
Antibiotic Mycotoxins from an Endophytic <i>Fusarium acuminatum</i> Isolated from the Medicinal Plant <i>Geum macrophyllum</i> Trevor N. Clark, Madison Carroll, Katelyn Ellsworth, Roxann Guerette, Gilles A. Robichaud, John A. Johnson and Christopher A. Gray	1301
Bioactive Phenolic Compounds from the Roots of Danshen (<i>Salvia miltiorrhiza</i>) Nguyen Huu Tung, Le Quoc Hung, Ha Van Oanh, Duong Thi Ly Huong, Phuong Thien Thuong, Dinh Doan Long and Nguyen Thanh Hai	1305
Phenolic Compounds Isolated and Identified from Amla (<i>Phyllanthus emblica</i>) Juice Powder and their Antioxidant and Neuroprotective Activities Kenneth Rose, Chunpeng Wan, Amber Thomas, Navindra P. Seeram and Hang Ma	1309
Isolation and Structure Elucidation of Secondary Metabolites from a <i>Microcystis</i> sp. Bloom Material Collected in Southern Israel Ohad Hasin and Shmuel Carmeli	1313
Free Radical Scavenging Activity of Synthetic and Naturally Occurring Polyhydroxy-, Aminohydroxynaphthazarins and Related Compounds Nikita S. Polonik, Yuri E. Sabutskii and Sergey G. Polonik	1319
The Use of Trimethyl Orthoacetate for the Conversion of Natural Mono- and Dihydroxynaphthazarins and Related Compounds to Their Methyl Ethers Nadezhda N. Balaneva, Olga P. Shestak and Vyacheslav L. Novikov	1323
12-Hydroxycorniculatolide A from the Mangrove Tree, <i>Lumnitzera littorea</i> Puttandon Wongsomboon, Wisanu Maneerat, Stephen G Pyne, Luksamee Vittaya and Thunwadee Limtharakul (née Ritthiwigrom)	1327

Continued inside Backcover