สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา

ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 2013 รหัสโครงการ 2555A10802023

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการนำไปใช้ในระดับเซลล์ของส่วนสกัดจากขลู่

Antioxidative effect and bioavailability of extracts from *Pluchea indica* Less.

โดย

ดร.ชัชวิน เพชรเลิศ

ว.บ.ท. 01773059
- 7 ก.ค. 2558
354928

ทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล)

มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๕

เริ่มบริการ
- 6 ต.ค. 2558

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยการได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก ทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๕

ผู้วิจัยต้องขอขอบคุณผ็ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข จากภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาที่ได้ให้คำปรึกษาในการทำวิจัยมาตั้งแต่ต้นจนทำให้งานวิจัยเรื่องนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

นอกจากนี้ยังต้องขอบคุณนิสิตชั้นปีที่ ๔ ของภาควิชาชีวเคมี และนิสิตระดับบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ ทุกคนที่ร่วมมือร่วมใจกันในการทำวิจัยจนทำให้ได้ผลการวิจัยอันน่าพึงพอใจ ตลอดจนคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ของภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้คำแนะนำและคอยช่วยเหลือในเรื่องอุปกรณ์และสารเคมีบางส่วนในโครงการวิจัยนี้

ดร.ชัชวิน เพชรเลิศ
หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการนำไปใช้ในระดับเซลล์ของส่วนสกัดจากขลู่

ชื่อโครงการ (ภาษาอังกฤษ) Antioxidative effect and bioavailability of extracts from *Pluchea indica* Less.

หัวหน้าโครงการวิจัย ดร.ชัชวิน เพชรเลิศ

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดชาขลู่ที่ซื้อมาจากวิสาหกิจชุมชนบ้านท่าสอน อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี โดยทำการสกัดด้วยน้ำร้อนเพื่อเลียนแบบลักษณะของชาที่ใช้ดื่ม จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาทำการทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ และอนุมูลไฮดรอกซิล นอกจากนี้ยังทำการวิเคราะห์หาผลต่อแอกติวิตี้ของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดรูปแบบของออกซิเจนที่มีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยา (Reactive oxygen species; ROS) ได้แก่ เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส เอนไซม์คะตาเลส เอนไซม์กลูตาไธโอนเพอร์ออกซิเดส และเอนไซม์กลูตาไธโอน รีดักเทส จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากชาขลู่สามารถกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ได้เป็นอย่างดี อีกทั้งฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ยังเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัด โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 266.72 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยิ่งไปกว่านั้นสารสกัดจากชาขลู่ยังสามารถกำจัดอนุมูลไฮดรอกซิลได้ดีโดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 196.38 ไมโครกรัมต่อมิลลิลตร นอกจากนี้สารสกัดชาขลู่สามารถช่วยเพิ่มแอกติวิตี้ของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทสได้อย่างชัดเจน แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดชาขลู่กลับไม่มีผลในการไปเพิ่มการทำงานของเอนไซม์คะตาเลส เอนไซม์กลูตาไธโอนเพอร์ออกซิเดส และเอนไซม์กลูตาไธโอน รีดักเทส จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบกลไกการออกฤทธิ์ที่มีต่อเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของอนุมูลที่มาจากออกซิเจน หรือ ROS ได้มากยิ่งขึ้นเพื่อนำไปสู่หนทางในการป้องกันหรือรักษาโรคที่มีความเกี่ยวข้องหรือเกิดจากอนุมูลต่างๆ เหล่านี้ต่อไป

Abstract

Antioxidant capacities of *Pluchea indica* Less. tea that obtained from Ban Tha Sorn community enterprise, Amphur Khlung, Chantaburi province were conducted by assays for radical scavenging against superoxide anion and hydroxyl radical as well as the modulative effect of the extract on the activity of antioxidant enzymes including superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathion reductase (GR) was also

determined. The results showed that *P. indica* tea extract (PITE) exhibited good free radical scvenging activity both on superoxide and hydroxyl radicals in a concentration-dependent manner with EC_{50} = 266.72 and 196.38 μg/ml, respectively. In addition, PITE could efficiently activate SOD activity. Conversely, it did not affect to the other 3 antioxidant enzymes. This study makes us to know the biological mechanism of PITE on the activity of various enzymes that relate to the biotransformation of reactive oxygen species (ROS). PITE has beneficial effects in prevention or treatment various ROS-induced chronic degenerative diseases.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
สารบัญ	ง
สารบัญรูป	จ
สารบัญตาราง	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	8
บทที่ 3 ผลการวิจัย	13
บทที่ 4 อภิปราย และสรุปผลการทดลอง	21
รายงานสรุปการเงิน	24
บรรณานุกรม	25
ประวัตินักวิจัย	29

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 3-1 ความสามารถในการกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ของสารสกัดชาขลู่ และสารมาตรฐานต่างๆ 14

รูปที่ 3-2 ความสามารถในการกำจัดอนุมูลไฮดรอกซิลของสารสกัดชาขลู่และ สารมาตรฐานต่างๆ 16

รูปที่ 3-3 แอกติวิตี้ของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเตส เมื่อทำปฏิกิริยากับสารสกัดชาขลู่ 17

รูปที่ 3-4 ผลของสารสกัดขลู่ต่อการทำงานของเอนไซม์คะตาเลส (CAT) กลูตาไธโอนเพอร์ออกซิเดส (GPx) และ กลูตาไธโอน รีดักเทส (GR) 20

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 3-1	ปริมาณสารสกัดและ % yield ของการสกัดชาขลู่แต่ละครั้ง	13
ตารางที่ 3-2	ฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ของสารสกัดชาขลู่และสารมาตรฐานต่างๆ	14
ตารางที่ 3-3	ค่า EC_{50} ในการกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ของสารสกัดชาขลู่และสารมาตรฐานต่างๆ	14
ตารางที่ 3-4	ฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลไฮดรอกซิลของสารสกัดชาขลู่และสารมาตรฐานต่างๆ	15
ตารางที่ 3-5	ค่า EC_{50} ในการกำจัดอนุมูลไฮดรอกซิลของสารสกัดชาขลู่และสารมาตรฐานต่างๆ	16
ตารางที่ 3-6	แอกติวิตี้ของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเตส เมื่อทำปฏิกิริยากับสารสกัดชาขลู่	17
ตารางที่ 3-7	แอกติวิตี้ของเอนไซม์คะตาเลสเมื่อทำปฏิกิริยากับสารสกัดชาขลู่	18
ตารางที่ 3-8	แอกติวิตี้ของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสเมื่อทำปฏิกิริยากับสารสกัดชาขลู่	19
ตารางที่ 3-9	แอกติวิตี้ของเอนไซม์กลูตาไธโอน รีดักเทสเมื่อทำปฏิกิริยากับสารสกัดชาขลู่	19

บทที่ 1

บทนำ

1.1 เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน

ขลู่ (*Pluchea indica* Less.) เป็นพืชในวงศ์ Compositae (Asteraceae) เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก ขึ้นอยู่รวมกันเป็นกอ มีกิ่งก้านสาขามาก สูง 1-1.5 เมตร มักชอบขึ้นริมน้ำตอนบนป่าชายเลน เติบโตได้รวดเร็วในทุกฤดูกาล แตกกิ่งก้านใหม่ได้มากขึ้นเมื่อมีการหักกิ่งก้านไปใช้ มีประโยชน์ทางด้านสมุนไพรในทุกส่วนของต้น โดยเฉพาะใบมีฤทธิ์แก้อักเสบ แก้แผลอักเสบ แก้โรคริดสีดวงทวาร แก้โรคบิด ขับเหงื่อ แก้เบาหวาน (Yuniarti, 2008)

ใบขลู่ประกอบด้วยสารพฤกษเคมีชนิดต่างๆ ได้แก่ สเตียรอล (sterols) เทอร์ปีน (terpenes) และลิกแนน ไกลโคไซด์ (lignan glycosides) (Biswas et al., 2005; Uchiyama et al., 1989; Uchiyama et al., 1991; Mukhopadhyay et al., 1983) และจากรายงานของ Andarwulan และคณะ (2010) พบว่าในขลู่มีฟลาโวนอยด์อยู่เป็นจำนวนมากซึ่งมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์แอนติออกซิแดนท์ Biswas และคณะ (2006) รายงานผลของสารบริสุทธิ์ R/J/3 ที่แยกได้จากส่วนสกัดเมทานอลของรากขลู่ พบว่าสารบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากส่วนสกัดเมทานอลของรากขลู่ คือ β-sitosterol และ stigmasterol สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ phospholipase A2 ในพิษงูแมวเซา สาร β-sitosterol และ stigmasterol ยังแสดงฤทธิ์ต้านพิษงูโดยยับยั้งอัตราการตายจากพิษงูเห่า ยับยั้งพิษต่อระบบประสาท และกล้ามเนื้อหัวใจ รวมทั้งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ phospholipase A2 ในพิษงูเห่า Ohtsuki และคณะ (2008) สกัดสาร quinic acid ester และ quercetin จากใบของต้นขลู่ และพบว่าสารทั้งสองมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ collagenase ในขณะที่สาร quinic acid ester ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ matrix metalloproteinase-2 และ matrix metalloproteinase-9

มีการค้นพบสารพฤกษเคมีในขลู่ เช่น สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) ที่มีฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชัน ลดความเสี่ยงจากอนุมูลอิสระที่เข้าไปทำลายเซลล์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดต่างๆ มีความสำคัญในการยับยั้งการเกิดมะเร็ง และมีคุณสมบัติต้านหรือยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ของสารก่อกลาย

พันธุ์ได้ในปริมาณที่เหมาะสม Traithip (2005) ศึกษาสารพฤกษเคมีของส่วนสกัดเอทานอลจากใบขลู่ และศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging assay พบว่าสารสกัดของใบขลู่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีโดยมีค่า EC_{50} = 6.92 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ Sen และคณะ (2002) นำส่วนสกัดเมทานอลของรากขลู่มาทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันที่เกิดจากการเหนี่ยวนำโดยคาร์บอนเตตระคลอไรด์ (CCl_4) พบว่า สารสกัดจากขลู่มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลไฮดรอกซีอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยมีค่า IC_{50} = 10.77, 165.62 และ 61.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้นจึงน่าสนใจเป็นอย่างยิ่งที่จะศึกษาเพื่อให้เข้าใจกลไกในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดและส่วนสกัดต่างๆ ของใบขลู่

ที่สำคัญยังไม่พบข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับการนำไปใช้ในระดับเซลล์ว่า หลังจากการย่อยและการดูดซึมแล้วจะมีการเปลี่ยนแปลงของสารอย่างไร สารนั้นจะถูกนำเข้าไปภายในเซลล์ด้วยกลไกใด และมากน้อยเพียงใด ซึ่งปัจจุบันในการศึกษาการนำไปใช้ในระดับเซลล์ (Bioavailability) นั้นมีหลายวิธี แต่วิธีที่เป็นที่นิยมมากที่สุดคือ การใช้ Caco-2 cell line ซึ่งเป็นเซลล์ที่ถูกพัฒนามาจากเซลล์มะเร็งลำไส้ของมนุษย์ (human adenocarcinoma) ซึ่งเซลล์ชนิดนี้จะมีสารต่างๆ ภายในเซลล์เหมือนกับที่ไมโครวิลไลบนเซลล์เยื่อบุผิวของลำไส้เล็กมี และมีคุณลักษณะเหมือนกับ enterocytes ประกอบกับในปัจจุบันมีโมเดลที่จำลองการย่อยในระบบทางเดินอาหารร่วมด้วย เรียกว่า *in vitro* digestion ทำให้เราทราบข้อมูลเกี่ยวกับการย่อย การดูดซึม และการนำเข้าไปใช้ในระดับเซลล์ของสารต่างๆ ได้ง่ายขึ้น เช่น การศึกษาของ Glahn และคณะ (2000) ที่ทำการเปรียบเทียบ bioavailability ของเหล็กในรูปต่างๆ โดยใช้โมเดล *in vitro* digestion ควบคู่กับการใช้ Caco-2 cells นอกจากนี้ Salovaara และคณะ (2002) ยังได้ทำการศึกษาผลของกรดอินทรีย์ 9 ชนิดต่อการดูดซึมธาตุเหล็กโดยใช้ Caco-2 cells เป็นโมเดลของการศึกษา หรือแม้แต่การศึกษาเกี่ยวกับการย่อย การดูดซึม และการขนส่งเข้าไปภายในลำไส้เล็กเพื่อนำไปยังอวัยวะเป้าหมายของยา สารอาหาร xenobiotics หรือสารพิษต่างๆ ล้วนนิยมใช้โมเดลนี้ในการศึกษาแทบทั้งสิ้น (Glahn, Van Campen 1997; Liu and Hu 2002; Laurent et al. 2007)

1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

การศึกษาวิจัยเพื่อค้นหาสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ เป็นสิ่งที่สำคัญ หากแต่การศึกษาหาสิ่งที่จะนำมารักษาหรือลดความเสี่ยงของการเกิดโรคโดยเฉพาะสารที่ได้รับจากธรรมชาตินั้นน่าจะยิ่งมีความสำคัญมากกว่า ภายใต้ภาวะของอุบัติการณ์ของโรคร้ายต่างๆ ที่มีอยู่ในปัจจุบันโดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคเรื้อรังอันเกิดจากความไม่สมดุลของสารต่างๆ ภายในร่างกาย รูปแบบการดำรงชีวิตที่เปลี่ยนไป รูปแบบการบริโภคอาหารที่ล้วนเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคเหล่านี้แทบทั้งสิ้น

จากการศึกษาทางด้านระบาดวิทยาพบว่า อนุมูลอิสระมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเกิดโรค ทั้งเป็นต้นเหตุของการเกิดโรค และเป็นปัจจัยที่ทำให้ฌรคมีพัฒนาการอย่างรวดเร็วและมีความรุนแรงยิ่งขึ้น โดยเฉพาะโรคที่เกี่ยวกับความเสื่อมและความบกพร่องของเซลล์ประสาทและระบบสื่อประสาทในสมอง ภาวะขาดเลือดของอวัยวะที่สำคัญต่อการดำรงชีวิต คือ หัวใจ และสมอง นอกจากนี้อนุมูลอิสระยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ ทั้งยังมีส่วนช่วยให้แนวโน้มต่อการเป็นมะเร็งมีเพิ่มมากขึ้น อนุมูลอิสระเพียง 1 อนุมูลสามารถทำให้เกิดลิพิดเปอร์ออกไซด์เป็นจำนวนหลายร้อยโมเลกุลก่อนที่จะสิ้นสุดปฏิกิริยา ดังนั้นความเสียกายจะไม่ได้เกิดขึ้นเฉพาะกับเยื่อหุ้มเซลล์เท่านั้น แต่จะขยายวงกว้างไปยังองค์ประกอบอื่นๆ ภายในเซลล์ ซึ่งกระบวนการเหล่านี้อาจทำให้เกิดการตายของเซลล์ มีรายงานหลายฉบับที่แสดงให้เห็นถึงความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการป้องกันและลดการเกิดและดำเนินไปของโรคต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพที่เกิดจากออกซิเดชัน การศึกษาหาสารออกฤทธิ์จากพืชสมุนไพรที่จะมีผลต่อการลดความเสี่ยงอันอาจจะเกิดขึ้นจากอนุมูลอิสระจึงเป็นแนวทางที่น่าสนใจ เนื่องจากกระบวนการที่จะนำมาอธิบายให้ชัดเจนนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด มีเพียงสมมติฐานที่ตั้งขึ้นมาเป็นแนวทางเพื่อรอการพิสูจน์ต่อไป

นอกจากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแล้ว ในการวิจัยนี้ผู้วิจัยยังสนใจที่จะทำการศึกษาผลของสารสกัดจากขลู่ต่อการนำไปใช้ในระดับเซลล์ (bioavailability) ซึ่งยังขาดข้อมูลอยู่เป็นจำนวนมากการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นการศึกษาเกี่ยวกับการย่อย การดูดซึม และการขนส่งผ่านเซลล์ลำไส้ของมนุษย์ ซึ่งจะทำให้ได้ข้อมูลเชิงวิทยาศาสตร์และเชิงประจักษ์มากขึ้นเกี่ยวกับการนำเอาสารต่างๆ ที่มีอยู่ในพืชชนิดนี้เข้าไปใช้ได้ในระดับเซลล์ อันจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการพัฒนาและการต่อยอดองค์ความรู้ในทางการแพทย์ เภสัชศาสตร์ พิษวิทยา หรือแม้แต่การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อให้ร่างกายสามารถนำไปใช้ได้อย่างเต็มที่

ประเทศไทยเป็นประเทศในเขตร้อนชื้นซึ่งมีความหลากหลายของพืชสมุนไพรมากที่สุดแห่งหนึ่งของโลก โดยเฉพาะในเขตภาคตะวันออกของประเทศไทยที่เป็นเขตป่าดิบชื้นและป่าชายเลนที่มีความหลากหลายของระบบนิเวศน์และพันธุ์ไม้ต่างๆ อย่างอุดมสมบูรณ์ เป็นแหล่งสำคัญของสมุนไพรมาโดยตลอด นอกจากนี้ยังมีหมอยาพื้นบ้านและองค์ความรู้ที่ใช้สมุนไพรในการรักษาโรคต่างๆ จนถึงปัจจุบัน

ขลู่ (*Pluchea indica* Less.) เป็นพืชในวงศ์ Compositae (Asteraceae) ลักษณะเป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก ขึ้นอยู่รวมกันเป็นกอ มีกิ่งก้านสาขามาก สูง 1-1.5 เมตร มักชอบขึ้นริมน้ำตอนบนป่าชายเลน มีมากในจังหวัดจันทบุรี เติบโตได้รวดเร็วในทุกฤดูกาล แตกกิ่งก้านใหม่ได้มากขึ้นเมื่อมีการหักกิ่งก้านไปใช้ มีประโยชน์ทางด้วยสมุนไพรในทุกส่วนของต้น โดยเฉพาะใบมีฤทธิ์แก้อักเสบ แก้แผลอักเสบ แก้โรคริดสีดวงทวาร แก้โรคบิด ขับเหงื่อ แก้เบาหวาน จากการศึกษาเก็บข้อมูลเบื้องต้นจากกลุ่มวิสาหกิจชุมชน ที่เกิดการรวมตัวจากเวทีประชาพิจารณ์โครงการส่งเสริมจัดทำแผนการจัดการทรัพยากรชีวภาพระดับสถาบันและท้องถิ่น เทศบาลตำบลบ่อ อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี ได้พบว่าชาวบ้านรวมตัวกันทำผลิตภัณฑ์สบู่เหลว ผงสปาขัดผิว ครีมขัดผิวหน้าจากใบขลู่ รวมทั้งมีการทำชาใบขลู่ออกจำหน่าย แต่มีปัญหาในเรื่องการขาดหลักฐานทางวิทยาศาสตร์มารองรับการนำไปใช้ จึงทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะการศึกษาผลของส่วนสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์ที่ได้จากใบขลู่ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และศึกษาการนำไปใช้ในระดับเซลล์ เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่ช่วยสนับสนุนการใช้สมุนไพรพื้นบ้านจากขลู่ และเพื่อลดการนำเข้ายาและอาหารเสริมสุขภาพจากต่างประเทศ นอกจากนี้อาจได้สารที่จะนำพัฒนาเป็นยาต้นแบบรักษาโรคต่างๆ ต่อไป

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อแยกส่วนสกัดหยาบจากใบชาขลู่ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

2. เพื่อวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการนำไปใช้ในระดับเซลล์ของสารสกัดขลู่และในแต่ละส่วนสกัดย่อยจากขลู่ที่เก็บมาจากจันทบุรีและแหล่งอื่นๆ

3. เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของส่วนสกัดและสารบริสุทธิ์จากใบขลู่ในการออกฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชันจากสารสกัดขลู่และในแต่ละส่วนสกัดย่อยจากขลู่ที่เก็บมาจากจันทบุรีและแหล่งอื่นๆ

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

นำใบขลู่จากกลุ่มวิสาหกิจชุมชน โครงการส่งเสริมจัดทำแผนการจัดการทรัพยากรชีวภาพระดับสถาบันและท้องถิ่น เทศบาลตำบลบ่อ อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี มาสกัด 2 วิธี คือ วิธีแรกนำใบขลู่คั่วแห้งมาสกัดด้วยน้ำร้อนแบบการชงชา ตามด้วยการสกัดน้ำชาที่ได้ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ และวิธีที่สองนำใบขลู่อบแห้งมาสกัดด้วยเอทานอล และสกัดแยกส่วนด้วยเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และน้ำ ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและศึกษาการนำไปใช้ในระดับเซลล์ จากนั้นนำส่วนสกัดย่อยไปแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสามารถนำไปใช้ในระดับเซลล์ได้มากที่สุด แล้วศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของส่วนสกัดย่อยนั้นและสารบริสุทธิ์ในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

1.5 วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุป ทฤษฎี และ/หรือ แนวทางความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย

ขลู่ (*Pluchea indica* Less.) เป็นพืชในวงศ์ Compositae เป็นสมุนไพรที่ใช้ในงานสาธารณสุขมูลฐานของประเทศไทย มีสรรพคุณทางยาหลายด้าน เช่น รักษาผดผื่นคัน ลดระดับน้ำตาลในเลือด ความดัน และโรคหัวใจ รักษาอาการ ขัดเบา ปัสสาวะพิการ ขับปัสสาวะ ริดสีดวงทวาร แก้กระษัย ขับนิ่ว ขับปัสสาวะ ใช้เป็นยาอายุวัฒนะ แก้ไข้ขับเหงื่อ และแก้เบาหวาน รักษาอาการเส้นตึง หรือนำมาทำเป็นขี้ผึ้งรักษาแผลเรื้อรัง ใบสดตำพอกบริเวณที่เป็นแผล แก้อักเสบ แก้ริดสีดวงจมูก ขับนิ่วในทางเดินปัสสาวะ ใบและราก แก้โรคบิด ขับเหงื่อ แก้แผลอักเสบ รากสดตำพอกบริเวณแผล (มาโนช วามานนท์, เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ, 2540) ในมาเลเซีย หมอยาสมุนไพรเชื่อว่าใบขลู่ (*Pluchea indica (L.)* Less) ใช้รักษาโรคบิด ไขข้ออักเสบ ระงับกลิ่นปากและลมหายใจ ระงับกลิ่นตัว แผลพุพองและแผลเปื่อย ส่วนของรากใช้รักษาอาการไข้ อาหารไม่ย่อย และปวดศีรษะ (Ong, 2004) ปัจจุบันจึงมีการนำขลู่มาทำเป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพ เช่น ชาขลู่ ผงขัดผิวเพื่อใช้ทำสปาผิว สบู่ ยาสระผม กันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในท้องถิ่นที่มีพื้นที่ป่าชายเลน ซึ่งเป็นพื้นที่ที่เหมาะสำหรับการเจริญของต้นขลู่ ถึงแม้ว่าจะเป็นที่ทราบกันดีในกลุ่มหมอยาและแพทย์แผนไทยว่าขลู่มีสรรพคุณต่างๆ มากมาย แต่หลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่มีรายงานส่วนใหญ่มักจะเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติในการลดน้ำตาล ลดความดัน และการขับปัสสาวะ และรายงานจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ว่าน้ำยาชงขลู่ไม่มีความเป็นพิษเฉียบพลันในหนูถีบจักร (มาโนช วามานนท์, เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ, 2540) แต่ข้อมูลเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชันยังมีค่อนข้างจำกัด และการนำไปใช้ในระดับเซลล์อย่างไรนั้นยังไม่พบข้อมูลในส่วนนี้มา

ก่อน ซึ่งทำให้เกิดข้อกังขาได้ว่าการรับประทานผลิตภัณฑ์จากขลู่เป็นประจำเพื่อใช้เป็นยาอายุวัฒนะจะมีผลต่อกระบวนการต่างๆ เหล่านี้หรือไม่ สารที่ได้จากขลู่จะสามารถถูกย่อย ดูดซึม และขนส่งผ่านเซลล์ลำไส้ได้มากน้อยเพียงใด ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะทดสอบสมมติฐานดังกล่าวซึ่งข้อมูลที่ได้จะนำมาใช้เพื่อเป็นหลักฐานสนับสนุนถึงความปลอดภัยและเห็นคุณค่าของการใช้ขลู่เป็นยาสมุนไพรในงานสาธารณสุขมูลฐานและส่งเสริมคุณค่าของผลิตภัณฑ์เพื่อเป็นสินค้าเพื่อสุขภาพในลำดับต่อไป

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป

องค์ความรู้ใหม่ที่ได้จากการสกัดสารที่มีฤทธิ์การยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและฤทธิ์แอนติออกซิแดนท์ของส่วนสกัดจากพืชสมุนไพรจะสามารถนำไปเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่สนับสนุนคุณค่าทางยาของพืชสมุนไพร หรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่ได้จากพืชสมุนไพร และนำข้อมูลที่ได้จดองค์ความรู้ที่ได้ในรูปสิทธิบัตรได้ ทำให้องค์ความรู้นี้เป็นของประเทศไทย และยังสามารถตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานทางวารสารวิชาการเป็นการสร้างชื่อเสียงให้แก่ประเทศไทย นอกจากนี้สามารถใช้ข้อมูลที่ได้รับจากงานวิจัยไปเป็นพื้นฐานและองค์ความรู้ที่สามารถนำไปต่อยอด และผลิตเป็นยาชนิดใหม่ได้

1.6.2 บริการความรู้แก่ประชาชน

องค์ความรู้ใหม่ที่ได้จากการสกัดสารที่มีฤทธิ์แอนติออกซิแดนท์ของส่วนสกัดจากพืชสมุนไพร จะสามารถนำไปเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่สนับสนุนคุณค่าทางยาของสมุนไพร เพื่อส่งเสริมให้มีการเพาะปลูกและอนุรักษ์พืชสมุนไพรมากขึ้น โดยทำการเผยแพร่ผ่านสื่อต่างๆ เช่นรายการวิทยุเพื่อประชาชน และวารสารต่างๆ รวมทั้งข้อมูลที่ได้จะถูกนำเผยแพร่ต่อไป

1.6.3 บริการความรู้แก่ภาคธุรกิจ และนำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์

ต้นขลู่เป็นพืชที่ศักยภาพต่อการพัฒนาในเชิงพาณิชย์ได้ เพราะมีการเจริญเติบโตได้เร็วเมื่อมีการเก็บเกี่ยว ขึ้นได้ทั่วไปในเขตป่าชายเลนและใกล้เคียง ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่ได้จะเป็นสิ่งยืนยันของประสิทธิภาพของใบขลู่ในการนำมาใช้เป็นชา หรือเป็นสมุนไพรในเครื่องสำอาง ส่งเสริมการขายให้กลุ่มวิสาหกิจชุมชน ทำให้ผู้ซื้อมีความมั่นใจในผลิตภัณฑ์มากขึ้น และผู้ผลิตสามารถขยายตลาดออกไปสู่วงกว้างมากขึ้น รวมทั้งการนำความรู้นี้ไปประยุกต์ใช้ทำยา เครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารอย่างอื่นได้อีก

นอกจากนี้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและฤทธิ์ยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ของส่วนสกัดจากขลู่ที่แยกได้อาจเป็นสารชนิดใหม่และมีประสิทธิภาพดีกว่าสารแอนติออกซิแดนท์เดิมในอุตสาหกรรมอาหารและยา หลังจากจดสิทธิบัตรแล้วสามารถให้ข้อมูลแก่ภาคธุรกิจได้แก่ องค์การเภสัชกรรม หรือ บริษัทยา เช่น บริษัท ดอกบัวคู่ จำกัด เป็นต้น เพื่อนำไปผลิตเป็นสูตรยาในเชิงพาณิชย์ต่อไป

1.6.4 เป็นประโยชน์ต่อประชากรกลุ่มเป้าหมาย

ประชากรทั่วไปของประเทศไทยโดยเฉพาะผู้สูงอายุที่มีความเสี่ยงที่จะเกิดโรคที่เกิดจากความเสื่อมและโรคที่เกิดจากอนุมูลอิสระกันมาก จะสามารถได้ใช้ยาที่มีคุณภาพมากกว่าเดิม และผลข้างเคียงน้อยลง นอกจากนี้ในโครงการวิจัยนี้เมื่อแล้วเสร็จ คาดว่าจะสามารถผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่ภายใต้การศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จำนวนไม่น้อยกว่า 2 คน และเป็นโครงงานวิจัยย่อยแก่นิสิตระดับปริญญาตรีประมาณ 2 โครงงาน

หน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ได้แก่ สถาบันการศึกษาวิจัย ทั้งในด้านชีวเคมี เภสัชเคมี เช่น คณะวิทยาศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ ในการนำผลการศึกษาไปศึกษาต่อยอด และองค์การเภสัชกรรม หรือหน่วยงาน บริษัทอุตสาหกรรมยา ในการนำไปพัฒนาเป็นสูตรยา และชุมชน และประชาชนมีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์รองรับการใช้สมุนไพรใบขลู่

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 วัสดุและอุปกรณ์

2.1.1 ชุดเครื่องแก้วและเครื่องมือมาตรฐาน

1. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 (Whatman, ประเทศสหราชอณาจักร)
2. ปิเปตอัตโนมัติขนาด 2-20 ไมโครลิตร, 20-200 ไมโครลิตร และ 100-1000 ไมโครลิตร (Gilson, ประเทศสาธารณรัฐฝรั่งเศส)
3. ไมโครเพลท (Sterilin Limited, ประเทศสหราชอณาจักร)
4. ตู้อบ (BINDEA, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)
5. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Sartorius, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)
6. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Precsia, ประเทศสมาพันธรัฐสวิตเซอร์แลนด์)
7. เครื่องปั่นน้ำผลไม้ (Electrolux, ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน)
8. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Hettich ZENTRIFUGEN, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)
9. เครื่องดูดสุญญากาศ (vacuum pump) (GAST Mfg. Corp., ประเทศสหรัฐอเมริกา)
10. เครื่อง rotary vacuum evaporator (EYELA, ประเทศญี่ปุ่น)
11. เครื่องผสมสาร (vortex) (IKA work, ประเทศมาเลเซีย)
12. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท (VERSAMAX, ประเทศแคนาดา)
13. เครื่องวัดพีเอช (pH meter) รุ่น 713 pH Meter (Metrohm, ประเทศสาธารณรัฐฝรั่งเศส)

2.2 สารเคมี

1. Aluminium chloride (Merck, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)
2. Ammonia solution (Merck, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)

3. Pyrogallol (Sigma, ประเทศสาธารณรัฐสิงคโปร์)

4. Gallic acid (Fluka, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)

5. 2-Deoxy-D- ribose (Sigma, ประเทศสาธารณรัฐสิงคโปร์)

6. Iron (III) Chloride hexahydrate (MERCK, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)

7. L- ascorbic acid (Unilab, ประเทศเครือรัฐออสเตรเลีย)

8. Ascorbic acid (Sigma, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)

9. Methyl alcohol (Carlo erba, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)

10. Octyl alcohol (Fluka, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)

11. Potassium dihydrogen phosphate (Carlo erba, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)

12. Potassium ferricyanide ($K_3Fe(CN)_6$) (BIO BASIC., ประเทศแคนนาดา)

13. Potassium hydroxide (pellets) (Carlo erba, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)

14. Quercetin (Sigma, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)

15. Sodium carbonate (Carlo erba, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)

16. Sodium nitrite (Univar, ประเทศเครือรัฐออสเตรเลีย)

17. Trichloroacetic acid (TCA) (Panreac, สหภาพยุโรป)

18. Zinc (Fluka, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)

19. 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT) (Acros organics, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

20. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Fluka, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)

21. Hydrogen peroxide (MERCK, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)

22. Acetic acid glacial (MERCK, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)

23. Chloroform (CARLO ERBA, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)

24. Ethyl alcohol (MERCK, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)

25. Hydrochloric (HCL) (CARLO ERBA, ประเทศฝรั่งเศส)

26. Malondialdehyde (MERCK ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)

27. Methyl Alcohol (CARLO ERBA ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)

28. Potassium iodide (MERCK ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)

29. Sodium hydroxide (MERCK ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)

30. Sodium thiosulfate (MERCK ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)

31. Tris – HCl buffer, pH 8.2

32. Thiobarbituric acid (TBA) (MERCK ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)

33. Trichloroacetic acid (TCA) (PANCEAC สหภาพยุโรป)

34. EDTA

2.2 การเตรียมตัวอย่างพืชที่นำมาใช้ในการศึกษา

การเตรียมตัวอย่างชาขลู่ คือ นำใบชาขลู่ *(Pluchea indica* Less.) ที่ซื้อมาจากวิสาหกิจชุมชนบ้านท่าสอน อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี บดให้เป็นผงละเอียดแบ่งมา 100 กรัม นำไปต้มในน้ำเดือด 1 ลิตร เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นสารสกัดถูกกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1 ที่อุณหภูมิห้องและนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 3000 xg เป็นเวลา 10 นาที ส่วนตะกอนที่เหลือจะถูกนำมาสกัดซ้ำอีกรอบ หลังจากนั้นนำส่วนสกัดที่ได้ทั้งหมดเข้าเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) เพื่อให้สารสกัดเข้มข้นมากขึ้น และนำไปเข้าเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilizer) สารสกัดทั้งหมดจะถูกเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทดสอบ

2.3 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

2.3.1 **การทดสอบการยับยั้ง superoxide anion radical** ดัดแปลงมาจากวิธีของ Beauchamp and Fridovich (1971) โดยเตรียมสารละลายทุกชนิดโดยนำไปละลายใน 0.05 mol ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.8) เตรียมสารละลายต่างๆ ให้ได้ความเข้มข้นในช่วง 50-200 μg/ml และปริมาตรทั้งหมดรวมเป็น 5 ml และความเข้มข้นของ riboflavin, methionine และ nitro blue tetrazolium (NBT) เท่ากับ 3×10^{-6}, $1 \times$

10^{-2}, 1 × 10^{-4} mol/l ตามลำดับ จากนั้นนำไปส่องกับหลอดฟลูออเรสเซนต์ 20W ที่ 25^{0}C เป็นเวลา 25 นาที เพื่อกระตุ้นให้สร้าง superoxide anion radical ซึ่งจะไปรีดิวซ์ NBT ให้เป็น formazan ซึ่งมีสีน้ำเงิน ใช้หลอดที่ไม่ได้ส่องกับหลอดฟลูออเรสเซนต์เป็น blank วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 nm เติมส่วนสกัดลงไป ถ้าสามารถยับยั้ง superoxide anion radical ได้ การรีดิวซ์ NBT จะถูกยับยั้งตามไปด้วย จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% scavenging) จากสมการ Scavenging (%) = (A-A_1/A) × 100

2.3.2 การทดสอบการยับยั้ง hydroxyl radical ใช้วิธี deoxyribose ซึ่งนำมาจากวิธีของ Siddhuraju (2007) นำสารต่างๆ (2.8 mmol deoxyribose, 2.8 mmol H_2O_2, 25 μmol $FeCl_3$, 100 μmol EDTA และส่วนสกัด (250 μg/ml) มาละลายใน 10 mmol phosphate buffer (pH 7.4) จากนั้นเติมกรดแอสคอร์บิกเพื่อเริ่มปฏิกิริยา จนกระทั่งความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 μmol incubate ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37^{0}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม 1% thiobarbituric acid ตามด้วย 2.8% trichloroacetic acid ที่เย็น นำไปต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิอีกครั้งที่ 95-100^{0}C เป็นเวลา 20 นาที แล้วทำให้เย็น สกัด chromophore ด้วย n-butanol แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 nm โดยใช้ n-butanol เป็น blank หลอดที่ไม่มีสารสกัดใช้เป็นตัวควบคุม ฤทธิ์ในการยับยั้ง hydroxyl radical คำนวณจาก เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% scavenging) = (1-A_{532} ของหลอดที่มีสารสกัด / A_{532} ของหลอดที่ไม่มีสารสกัด) × 100

2.4 การวิเคราะห์ผลต่อแอกติวิตี้ของเอนไซม์ต่างๆ

2.4.1 Catalase (CAT) ใช้วิธีของ Sinha (1972) โดยการวัดสีเขียวที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 590 nm แอกติวิตี้ถูกแสดงเป็น units/mg protein โดยที่ 1 unit คือปริมาณของเอนไซม์ที่ถูกใช้กับ H_2O_2 1 mmol ต่อนาที

2.4.2 Superoxide dismutase (SOD) ใช้วิธีของ Marklund and Marklund (1974) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 470 nm ทุกๆ 60 วินาที เป็นเวลา 3 นาที แอกติวิตี้แสดงเป็น units/min/mg โปรตีน โดยที่ 1 unit คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยา auto-oxidation ของ pyrogallol ได้ 50%

2.4.3 Glutathione peroxidase (GPx) ตามวิธีของ Rotruck และคณะ (1973) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 412 nm แอกติวิตี้แสดงเป็น units/mg โปรตีน โดย 1 unit คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยน 1 μmol ของ GSH ให้เป็น GSSG ในขณะที่มี H_2O_2 ต่อนาที

2.4.4 Glutathione reductase (GR) วิเคราะห์ตามวิธีของ Staal และคณะ (1969) อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 nm ทุกๆ 30 วินาที เป็นเวลา 2 นาที แอกติวิตี้แสดงเป็น nmol ของ NADPH ที่ถูกออกซิไดส์/นาที/mg โปรตีน

2.5 การวิเคราะห์ผล

แสดงข้อมูลที่ได้ในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน และการทดลองแต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ คำนวณหา IC50 ของการยับยั้งโดยการวิเคราะห์แบบถดถอย วิเคราะห์ข้อมูลการทดลองที่ได้ โดยค่าเฉลี่ยของข้อมูลจากแต่ละสภาวะ โดยเปรียบเทียบแบบ Student's t-test หรือ one way ANOVA ($P<0.05$) โดยใช้โปรแกรม StatView เวอร์ชัน 5.0

บทที่ 3

ผลการวิจัย

3.1 การเตรียมสารสกัดจากชาขลู่

จากการเตรียมชาใบขลู่อบแห้งซึ่งทำการสกัด 3 ครั้ง แต่ละครั้งเว้นระยะ 1 เดือน ทำให้ได้ yield เท่ากับ 71.70, 68.40 และ 70.10 กรัม หรือเท่ากับร้อยละ 35.85, 34.20 และ 35.05 ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

ตารางที่ 3-1 ปริมาณสารสกัดและ % yield ของการสกัดชาขลู่แต่ละครั้ง

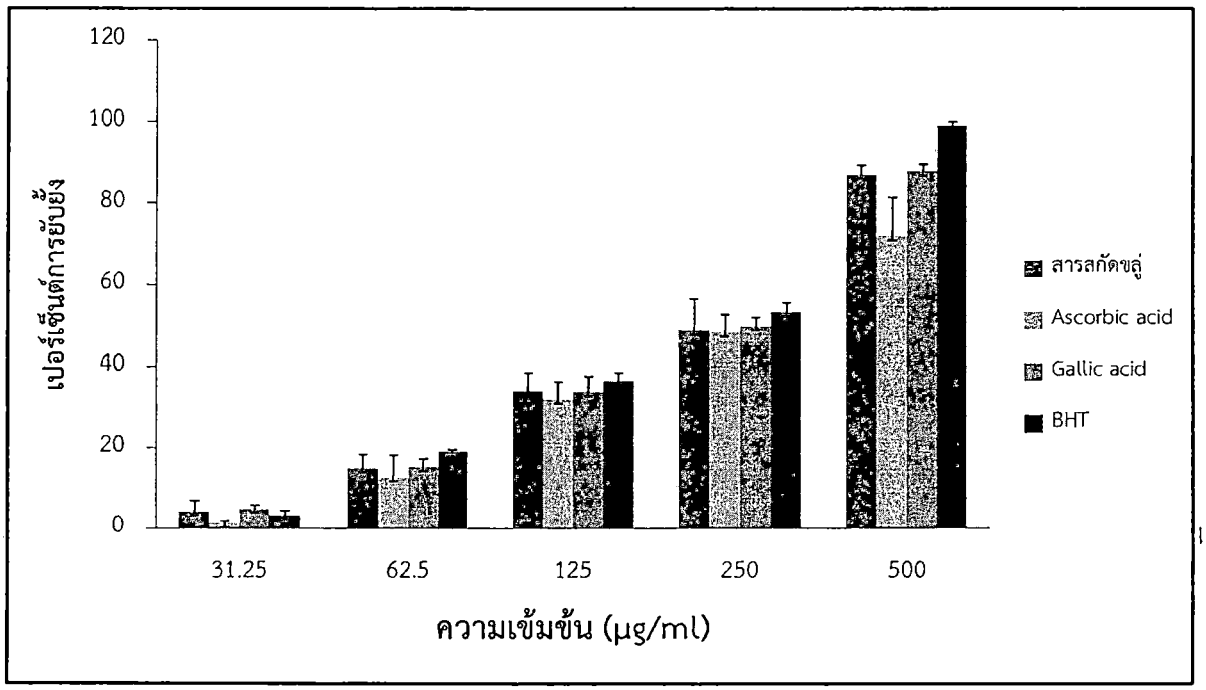
ครั้งที่	น้ำหนักก่อนสกัด (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	% yield
1	200	71.70	35.85
2	200	68.40	34.20
3	200	70.10	35.05

3.2 ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide radicals)

การทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์โดยใช้ความเข้มข้นที่ 31.25-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า ในภาพรวมสารสกัดจากชาขลู่สามารถกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ได้ดีพอๆ กับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานต่างๆ ทั้งวิตามินซี กรดแกลลิก และ BHT จากรูปที่ 3-1 จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่าฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลดังกล่าวเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสาร (ตารางที่ 3-2 และรูปที่ 3-1) โดยที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดลอง (500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จะมีเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลดังกล่าวได้ถึง 87.17% ซึ่งมีฤทธิ์ดีพอๆ กับกรดแกลลิกที่มีเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลดังกล่าวเท่ากับ 87.92% ถึงแม้จะมีฤทธิ์น้อยกว่า BHT ที่มีเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลชนิดนี้อยู่ที่ 99.24% แต่ก็ยังมีฤทธิ์สูงกว่าวิตามินซีที่มีเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลชนิดนี้เท่ากับ 77.11% ทั้งนี้สัมพันธ์กับค่า EC_{50} ของสารต่างๆ ดังตารางที่ 3-3

ตารางที่ 3-2 ฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ของสารสกัดชาขลู่และสารมาตรฐานต่างๆ

ความเข้มข้น	เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์			
(µg/ml)	สารสกัดขลู่	Ascorbic acid	Gallic acid	BHT
31.25	4.11±2.82	1.35±0.54	4.91±0.75	3.33±1.07
62.5	14.81±3.69	12.53±5.58	15.16±2.01	19.07±0.45
125	34.15±4.46	31.97±4.36	33.78±3.93	36.61±1.92
250	49.00±7.76	48.53±4.34	50.04±1.75	53.48±0.71
500	87.17±2.26	72.11±9.37	87.92±6.51	99.24±6.41



รูปที่ 3-1 ความสามารถในการกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ของสารสกัดชาขลู่และสารมาตรฐานต่างๆ

ตารางที่ 3-3 ค่า EC_{50} ในการกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ของสารสกัดชาขลู่และสารมาตรฐานต่างๆ

ชนิดของสาร	EC_{50} (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
สารสกัดชาขลู่	266.72
กรดแอสคอร์บิก	312.47
กรดแกลลิก	263.19
BHT	234.42

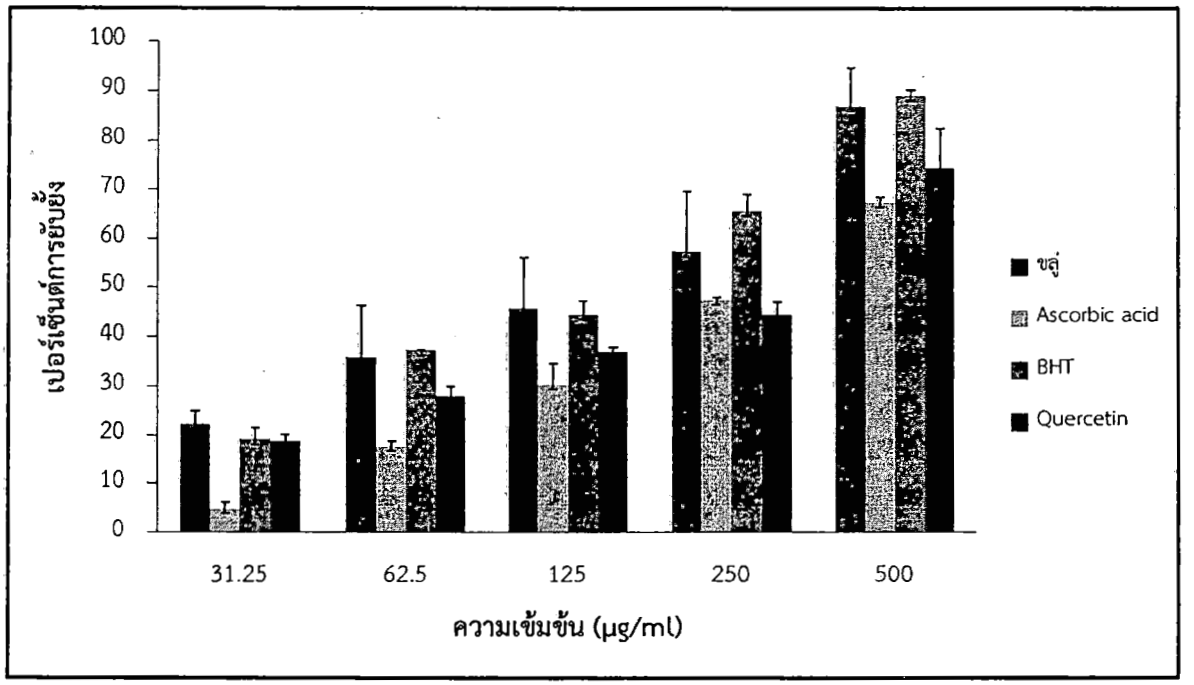
3.3 ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลไฮดรอกซิล (hydroxyl radicals)

การทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลไฮดรอกซิลโดยใช้ความเข้มข้นที่ 31.25-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า ในภาพรวมสารสกัดจากชาขลู่สามารถกำจัดอนุมูลไฮดรอกซิลได้ดีพอๆ กับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานต่างๆ ทั้งวิตามินซี เควอร์เซติน และ BHT จากรูปที่ 3-2 จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่าฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลดังกล่าวเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสาร (ตารางที่ 3-4 และรูปที่ 3-2) โดยที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดลอง (500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จะมีเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลดังกล่าวได้ถึง 87.20% ซึ่งมีฤทธิ์ดีพอๆ กับ BHT ที่มีเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลดังกล่าวเท่ากับ 89.17% และมีฤทธิ์ดีกว่าเควอร์เซตินและวิตามินซีที่มีเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนูมูลชนิดนี้อยู่ที่ 74.70% และ 67.43% ตามลำดับ ทั้งนี้สัมพันธ์กับค่า EC_{50} ของสารต่างๆ ดังตารางที่ 3-5 จะเห็นได้ว่าค่า EC_{50} ของสารสกัดชาขลู่มีค่าใกล้เคียงกับของ BHT ซึ่งน้อยกว่าของเควอร์เซตินและวิตามินซีอย่างชัดเจน

ตารางที่ 3-4 ฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลไฮดรอกซิลของสารสกัดชาขลู่และสารมาตรฐานต่างๆ

ความเข้มข้น (µg/ml)	เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลไฮดรอกซิล			
	ขลู่	Ascorbic acid	BHT	Quercetin
31.25	22.23±2.62	4.97±1.42	19.13±2.29	18.77±1.33
62.50	35.77±10.66	17.63±1.20	37.3±0.10	27.93±1.95
125.00	45.83±10.35	30.43±4.31	44.5±2.82	36.93±0.95
250.00	57.53±12.14	47.6±0.56	65.7±3.36	44.57±2.59
500.00	87.20±7.41	67.43±1.10	89.17±1.16	74.70±7.91

หมายเหตุ : ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ



รูปที่ 3-2 ความสามารถในการกำจัดอนุมูลไฮดรอกซิลของสารสกัดชาขลู่และสารมาตรฐานต่างๆ

ตารางที่ 3-5 ค่า EC_{50} ในการกำจัดอนุมูลไฮดรอกซิลของสารสกัดชาขลู่และสารมาตรฐานต่างๆ

ชนิดของสาร	EC_{50} (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
สารสกัดชาขลู่	196.38
กรดแอสคอร์บิก	326.94
เควอร์เซติน	278.65
BHT	185.62

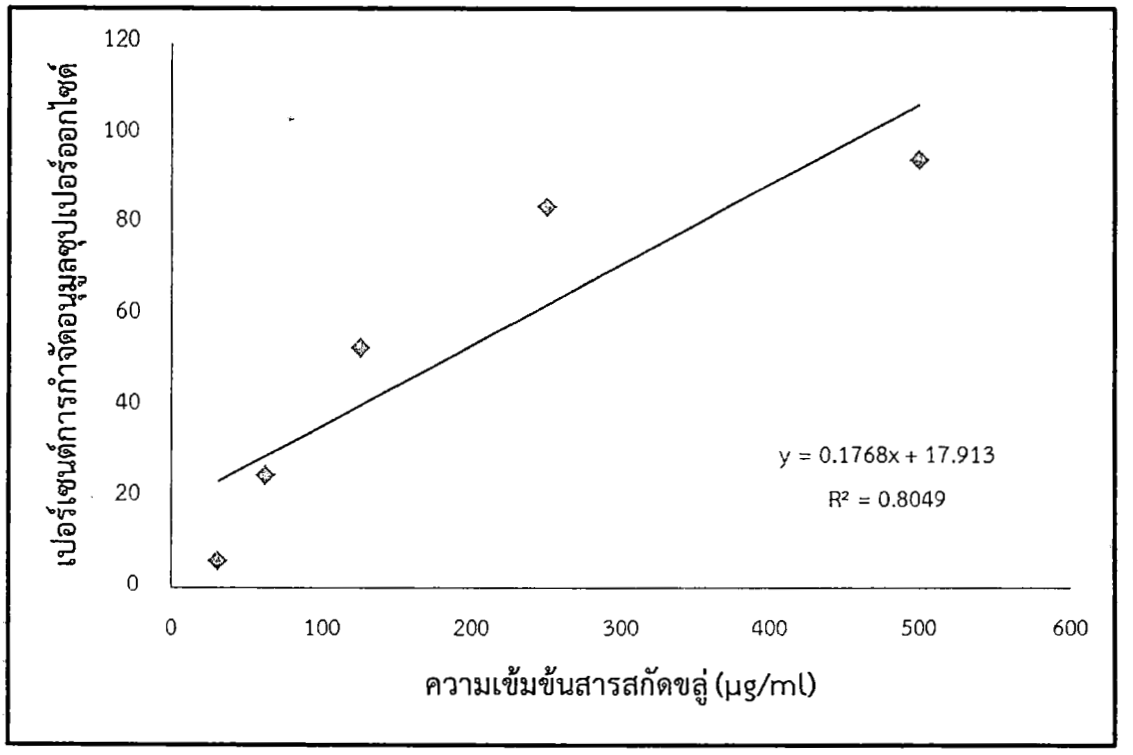
3.4 ผลต่อแอกติวิตี้ของเอนไซม์ต่างๆ

3.4.1 เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเตส (superoxide dismutase; SOD)

จากผลการทดลองในตารางที่ 3-6 และรูปที่ 3-3 จะเห็นได้ว่า สารสกัดชาขลู่ช่วยเพิ่มแอกติวิตี้ของเอนไซม์ SOD ได้อย่างชัดเจนตามความเข้มข้นที่เพิ่มมากขึ้น ที่ความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดชาขลู่ที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ (500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จะทำให้เอนไซม์ SOD มีค่าแอกติวิตี้สูงขึ้นถึง 94% อย่างไรก็ตาม จากรูปที่ 3-3 แสดงให้เห็นว่าถ้าเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดไปมากกว่านี้ก็อาจจะไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์อีกแล้ว เพราะเส้นกราฟเริ่มจะคงที่ในช่วงที่ความเข้มข้นของสารสกัดมีค่าสูงๆ จากกราฟรูปที่ 3-3 สามารถนำไปหาค่า EC_{50} ได้เท่ากับ 181.49 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 3-6 แอกติวิตี้ของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเตส เมื่อทำปฏิกิริยากับสารสกัดชาขลู่

ความเข้มข้นของสารสกัด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	SOD activity (% การกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์)
31.25	5.81±0.66
62.50	24.73±1.41
125	52.66±1.65
250	83.61±2.04
500	94.04±0.88



รูปที่ 3-3 แอกติวิตี้ของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเตส เมื่อทำปฏิกิริยากับสารสกัดชาขลู่

3.4.2 เอนไซม์คะตาเลส (catalase; CAT)

เอนไซม์คะตาเลส (CAT) มีหน้าที่ในการเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ให้กลายเป็นน้ำ (H_2O) ซึ่งจะทำให้ความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลดน้อยลง จากตารางที่ 3-7 และรูปที่ 3-4 จะเห็นได้ว่าสารสกัดชาขลู่มีแนวโน้มช่วยทำให้เอนไซม์ CAT ทำงานได้ดีขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แม้ว่าความเข้มข้นของสารสกัดจะเพิ่มขึ้นไปถึง 32 เท่าก็ตาม

ตารางที่ 3-7 แอกติวิตี้ของเอนไซม์คะตาเลสเมื่อทำปฏิกิริยากับสารสกัดชาขลู่

ความเข้มข้นของสารสกัด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	แอกติวิตี้ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
0	2.75±0.43
31.25	3.5±0.00
62.5	4.75±0.43
125	4.75±0.43
250	6.00±0.00
500	6.50±0.00
1000	7.00±0.00

3.4.3 เอนไซม์กลูตาไธโอนเพอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase; GPx)

เอนไซม์กลูตาไธโอนเพอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์อีกชนิดหนึ่งที่ใช้ในการเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้กลายเป็นน้ำ ฉะนั้นถ้าเอนไซม์ชนิดนี้มีแอกติวิตี้ที่สูงขึ้นก็จะเป็นการช่วยลดความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่จะเกิดขึ้นกับสิ่งมีชีวิตได้ แต่จากผลการศึกษาพบว่า สารสกัดจากชาขลู่มิได้มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้แต่อย่างใด ดังจะเห็นได้จากผลในตารางที่ 3-8 จะพบว่าทุกความเข้มข้นของสารสกัดจากชาขลู่ตั้งแต่ความเข้มข้นน้อยที่สุด (31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ไปจนถึงความเข้มข้นมากที่สุด (1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ไม่ได้ทำให้ค่าแอกติวิตี้ต่างไปจากกลุ่มควบคุมที่มีเพียงสารละลายเอนไซม์เพียงอย่างเดียว (ค่าอยู่ในช่วง 0.89-1.77 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ตรงกันข้ามกลับมีแนวโน้มว่าอาจจะไปทำให้แอกติวิตี้ของเอนไซม์ GPx ลดลง

ตารางที่ 3-8 แอกติวิตี้ของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสเมื่อทำปฏิกิริยากับสารสกัดชาขลู่

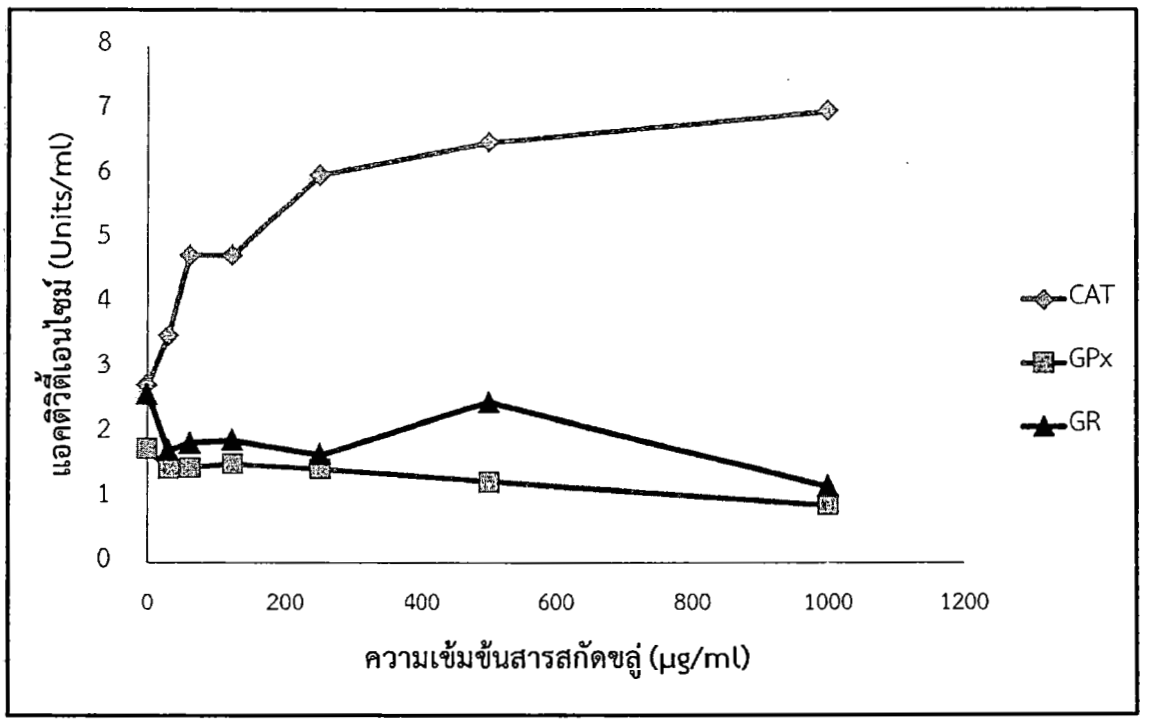
ความเข้มข้นของสารสกัด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	แอกติวิตี้ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
0	1.77±0.03
31.25	1.45±0.01
62.5	1.48±0.03
125	1.53±0.05
250	1.45±0.03
500	1.25±0.01
1000	0.89±0.03

3.4.4 เอนไซม์กลูตาไธโอน รีดักเทส (glutathione reductase; GR)

เอนไซม์กลูตาไธโอน รีดักเทสเปรียบเสมือนผู้ช่วยของเอนไซม์ GPx เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่ช่วยในการส่งอิเล็กตรอนไปให้กับเอนไซม์ GPx ถ้าพิจารณาจากผลในตารางที่ 3-9 และรูปที่ 3-4 จะเห็นได้ว่าสารสกัดชาขลู่ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ GR ดังจะเห็นได้จากค่าแอกติวิตี้ใกล้เคียงกันมากในทุกความเข้มข้นที่ทำการศึกษา (1.18-2.48 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) และมีแนวโน้มที่จะมีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดชาขลู่เพิ่มสูงขึ้นเช่นเดียวกับผลที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ GPx

ตารางที่ 3-9 แอกติวิตี้ของเอนไซม์กลูตาไธโอน รีดักเทสเมื่อทำปฏิกิริยากับสารสกัดชาขลู่

ความเข้มข้นของสารสกัด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	แอกติวิตี้ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
0	2.61±1.04
31.25	1.74±0.14
62.5	1.86±0.30
125	1.90±0.08
250	1.68±0.40
500	2.48±0.76
1000	1.18±0.29



รูปที่ 3-4 ผลของสารสกัดขลู่ต่อการทำงานของเอนไซม์คะตาเลส (CAT) กลูตาไธโอนเพอร์ออกซิเดส (GPx) และ กลูตาไธโอน รีดักเทส (GR)

บทที่ 4

อภิปราย และสรุปผลการทดลอง

4.1 อภิปรายผลการทดลอง

ในการศึกษานี้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดชาขลู่ที่ซื้อมาจากวิสาหกิจชุมชนบ้านท่าสอน อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี โดยทำการสกัดด้วยน้ำร้อนเพื่อเลียนแบบลักษณะของชาที่ใช้ดื่ม โดยในการสกัดทั้ง 3 ครั้งได้ %yield พอๆ กันคือ ประมาณ 35% เมื่อเทียบกับน้ำหนักของสารก่อนทำการสกัด จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาทำการทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ และอนุมูลไฮดรอกซิล นอกจากนี้ยังทำการวิเคราะห์หาผลต่อแอกติวิตี้ของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดรูปแบบของออกซิเจนที่มีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยา (Reactive oxygen species; ROS) ได้แก่ เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส เอนไซม์คะตาเลส เอนไซม์กลูตาไธโอนเพอร์ออกซิเดส และเอนไซม์กลูตาไธโอน รีดักเทส

เป็นที่ทราบกันดีว่าอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ และอนุมูลไฮดรอกซิลที่เกิดขึ้นในระบบทางชีวภาพมีความว่องไวมากในการเกิดปฏิกิริยาโดยเฉพาะกับมหโมเลกุลต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต เช่น น้ำตาล โปรตีน ไขมัน กรดนิวคลีอิก จากผลการทดลองจะเห็นว่า สารสกัดจากชาขลู่สามารถกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ได้ดีพอๆ กับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานต่างๆ ทั้งวิตามินซี กรดแกลลิก และ BHT อย่างชัดเจน อีกทั้งฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ยังเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดอีกด้วย ดังจะเห็นได้จากค่า EC_{50} ที่มีค่าใกล้เคียงกับกรดแกลลิกและไม่ต่างจาก BHT มากนัก เป็นไปทิศทางเดียวกันกับการศึกษาของ Sen และคณะ (2002) ที่ทำการศึกษาฤทธิ์แอนติออกซิแดนท์ของส่วนสกัดเมทานอลจากรากของขลู่ โดยพบว่าสารสกัดเมทานอลจากรากของขลู่สามารถยับยั้งการเกิดซูเปอร์ออกไซด์ แอนอิออนได้ ซึ่งน่าจะมาจากการที่สารสกัดจากชาขลู่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น เควอร์เซติน เป็นองค์ประกอบ (Srisook et al., 2012)

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลไฮดรอกซิล พบว่า ในภาพรวมสารสกัดจากชาขลู่สามารถกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ได้ดีพอๆ กับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานต่างๆ ทั้งวิตามินซี เควอร์เซติน และ BHT ตารางที่ 3-5 จะเห็นได้ว่าค่า EC_{50} ของสารสกัดชาขลู่มีค่าใกล้เคียงกับของ BHT ซึ่งน้อยกว่าของเควอร์เซตินและวิตามินซีอย่างชัดเจน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Srisook และคณะ (2012) ที่ทำการศึกษาส่วนสกัด

น้ำร้อนของใบชลู่ ซึ่งก็พบว่า สารสกัดที่ได้มีฤทธิ์ในการกำจัดทั้งอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ และอนุมูลไฮดรอกซิลได้เช่นกัน โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 446.3±12.1 และ 706.3±16.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ในระบบทางชีวเคมีอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์สามารถถูกเปลี่ยนให้เป็นไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ได้โดยใช้เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งเป็นการทำให้อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์มีจำนวนลดน้อยลง ในขณะที่ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่เพิ่มขึ้นก็จะถูกเอนไซม์คะตาเลส หรือเอนไซม์กลูตาไธโอนเพอร์ออกซิเดส เปลี่ยนไปเป็นน้ำซึ่งไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิต อย่างไรก็ตามเอนไซม์กลูตาไธโอนเพอร์ออกซิเดสจะทำงานได้ต้องมีเอนไซม์อีกชนิดหนึ่ง คือ เอนไซม์กลูตาไธโอน รีดักเทสเป็นตัวช่วยในการขนส่งอิเล็กตรอนให้อีกทอดหนึ่ง ดังนั้น การศึกษาวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดชาขลู่ที่มีต่อแอกติวิตี้ของเอนไซม์เหล่านี้ด้วย

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า สารสกัดชาขลู่ช่วยเพิ่มแอกติวิตี้ของเอนไซม์ SOD ได้อย่างชัดเจนตามความเข้มข้นที่เพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตาม จากรูปที่ 3-3 แสดงให้เห็นว่าถ้าเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดไปมากกว่านี้ก็อาจจะไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์อีกแล้ว จากกราฟรูปที่ 3-3 สามารถนำไปหาค่า EC_{50} ได้เท่ากับ 181.49 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น เควอร์เซติน หรือกรดคลอโรเจนิกที่มีอยู่ในสารสกัดจากชลู่ (Srisook et al., 2012) ซึ่งสารเหล่านี้มีผู้วิจัยที่ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ของเควอร์เซติน วิตามินซี และกลูตาไธโอนต่อการทำงานของเอนไซม์ SOD ที่จะมีผลต่อการผลิตไนตริกออกไซด์ด้วย ผลปรากฏว่า เควอร์เซตินสามารถช่วยให้การทำงานของเอนไซม์ Cu/Zn SOD มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น (Ertuğ et al., 2013) อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดจากชาขลู่ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ที่เหลืออีก 3 ชนิดมากนัก โดยที่สารสกัดชาขลู่มีผลทำให้แอกติวิตี้ของเอนไซม์ CAT เพิ่มมากขึ้นเพียงเล็กน้อย ในขณะที่สารสกัดชาขลู่แทบจะไม่มีผลไปเพิ่มแอกติวิตี้ของเอนไซม์ GPx และ GR เลย ตรงกันข้ามกลับจะทำให้เอนไซม์ทำงานได้น้อยลงบ้างเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้เพิ่มสูงขึ้น

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

4.2 สรุปผลการวิจัย

จากผลการทดลองทั้งหมดพบว่า สารสกัดจากชาขลู่มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลในกลุ่ม ROS อย่างเช่น อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ และ อนุมูลไฮดรอกซิลได้เป็นอย่างดี โดยสารสกัดชาขลู่สามารถเพิ่มแอกติวิตี้ของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทสได้อย่างชัดเจน แต่อย่างไรก็ตาม สารสกัดชาขลู่กลับไม่มีผลในการไปเพิ่มการทำงานของเอนไซม์คะตาเลส เอนไซม์กลูตาไธโอนเพอร์ออกซิเดส และเอนไซม์กลูตาไธโอน รีดักเทส ตรงกันข้ามกลับจะทำให้เอนไซม์ทำงานได้น้อยลงบ้างเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้เพิ่มสูงขึ้น จากการศึกษานี้ทำให้ผู้วิจัยเข้าใจในกลไกการออกฤทธิ์ที่มีต่อเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของอนุมูลที่มาจากออกซิเจน หรือ ROS ได้มากยิ่งขึ้น ทั้งนี้อาจจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสารสกัดว่าเป็นสารชนิดใด และเมื่อถูกแยกออกมาแล้วยังจะมีฤทธิ์ดังกล่าวอยู่อีกหรือไม่ เพื่อนำไปสู่หนทางในการป้องกันหรือรักษาโรคที่มีความเกี่ยวข้องหรือเกิดจากอนุมูลต่างๆ เหล่านี้ต่อไป

633.88
ส359ก
ฉ.4

354928

บรรณานุกรม

พันธุ์ไม้ป่าชายเลนในประเทศไทย. (2549). สำนักงานอนุรักษ์ทรัพยากรป่าชายเลน กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม.

มาโนช วามานนท์, เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ, บรรณาธิการ. ยาสมุนไพรสำหรับงานสาธารณสุขมูลฐาน. พิมพ์ครั้งที่ 2. ม.ป.ท.: องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก; 2540.

สมพร ภูติยานันต์. ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับการแพทย์แผนไทย. พิมพ์ครั้งที่ 4. เชียงใหม่: ตุลย์การพิมพ์; 2546.

Alam MI, Auddy B, Gomes A. (1995). Viper venom neutralization by Indian medicinal plant (*Hemidesmus indicus* and *Pluchea indica*) root extracts. Phytotherapy Res. 10(1): 58-61.

Andarwulan N, Batari R, Sandrasari DA, Bolling B, Wijaya H. (2010). Flavonoid content and antioxidant activity of vegetables from Indonesia. Food Chem. 121(4): 1231-1235.

Biswas R, Dasguta A, Mitra A, Roy SK, Dutta PK, Achari B, Dastidar G, Chatterjee TK. (2005). Isolation, purification and characterization of four pure compounds from the root of Pluchea indica (L.) Less. and the potentiality of the root extract and pure compounds for antimicrobial activity. European Bulletin of Drug Research. 13: 63-70.

Bozin B, Mimica-Dukic N, Samojlik I, Goran A, Igic R. (2008). Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). Food Chem. 111: 925-929.

Chakravarty AK, Mukhopadhyay S. (1994). New thiopene derivatives from *Pluchea indica.* Indian J. Chem. 33B; 978-980.

Chandra PK, Plaban B, Ria B, Durba B, Moumita M, Chatterjee TK. (2006). Hypoglycemic and antihyperglycemic activity of leaf extract of *Pluchea indica* Less. Orient. Pharm. Exp. Med. 6(3): 232-236.

Ertuğ PU, Aydinoglu F, Goruroglu Ozturk O, Singirik E, Ögülener N. (2013). Comparative study of the quercetin, ascorbic acid, glutathione and superoxide dismutase for nitric oxide protecting effects in mouse gastric fundus. Eur. J. Pharmacol. 698(1-3): 379-387.

Glahn RP, Van Campen D. (1997). Iron uptake is enhanced in Caco-2 cell monolayers by cysteine and reduced cysteinyl glycine. J. Nutr. 127: 642-647.

Glahn RP, Chen Z, Welch RM. (2002). Comparison of iron bioavailability from 15 rice genotypes: studies using an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. J. Agric. Food Chem. 50: 3586-3591.

Gomes A, Saha A, Chatterjee I, Chakravarty AK. (2007). Viper and cobra venom neutralization by [beta]-sitosterol and stigmasterol isolated from the root extract of Pluchea indica Less. (Asteraceae). Phytomed. 14(9): 637-643.

Laurent C, Besançon P, Caporiccio B. (2007). Flavonoids from a grape seed extract interact with digestive secretions and intestinal cells as assessed in an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. Food Chem. 100: 1704-1712.

Liu Y, Hu M. (2002). Absorption and Metabolism of Flavonoids in the Caco-2 Cell Culture Model and a Perused Rat Intestinal Model. Drug Metab. Dispos. 30: 370-377.

Muangman V, Thithapandha A, Yoovathaworn K, Supavilai P, Arunnopparat W, Sriwatanakul K. (1998). Study on diuretic effects of *Pluchea indica* in man. Thai J. Urol. 19: 116-128.

Mukhopadhyay S, Cordell GA, Ruangrungsi N. (1983). Traditional Medicinal Plants of Thailand. IV. 3-(2', 3'-Diacetoxy-2'-methyl butyryl)-cuauhtehmone from *Pluchea indica*. J. Nat. Prod. 46: 671-674.

Ohtsuki T, Yokosawa E, Koyano T, Preeprame S, Kowithayakorn T, Sakai S, Toida T, Ishibashi M. (2008). Quinic acid esters from Pluchea indica with collagenase, MMP-2 and MMP-9 inhibitory activities. Phytother Res. 22(2): 264-266.

Ong HC. Beluntas. In *Tumbuhan liar: khasiat ubatan & kegunaan lain*. Utusan Publications & Distributors Sdn. Bhd, Kuala Lumpur. 54-55. 2004

Peryt B, Szymczyk T, Lesca P. (1994) Mechanism of antimutagenicity of wheat sprout extracts. Mutat. Res. 8 : 117-123.

Peungvicha P, Temsiririrkul R, Prasain JK, Tezuka Y, Kadota S, Thirawarapau SS, Watanabe H. (1999). The hypoglycaemic effect of *Pluchea indica* Less root in normal and diabetic rats. Thai J. Phytopharm. 6: 18-22.

Pramanik KC, Biswas R, Mitra A, Bandyopadhyay D, Mishra M, Chatterjee TK. (2006). Tissue culture of the plant *Pluchea indica* (L.) Less. and evaluation of diuretic potential of its leaves. Orient. Pharm. Exp. Med. 7(2): 197-204.

Roslida AH, Erazuliana AK, Zuraini A. (2008). Anti-inflammatory and Antinociceptive Activities of The Ethanolic Extract of Pluchea indica (L) Less Leaf. *Pharmacology online* 2: 349-360.

Sen T, Basu A, Ray RN, Chaudhuri AKN. (1993). Hepatoprotective effects of *Pluchea indica* (less) extract in experimental acute liver damage in rodents. Phytother. Res. 7(5): 352-355.

Sen T, Chaudhuri AKN. (1991). Antiinflammatory evaluation of a *Pluchea indica* root extract. J. Ethnopharmacol. 33(1-2): 135-141.

Sen T, Dhara AK, Bhattacharjee S, Pal S, Chaudhuri AKN. (2002). Antioxidant activity of the methanol fraction of *Pluchea indica* root extract. Phytother. Res. 16: 331-335.

Sen T, Ghosh TK, Bhattachajee S, Chaudhuri AKN. (1996). Action of *Pluchea indica* methanol extract as a dual inhibitor on PAF-induced paw oedema and gastric damage. Phytother. Res. 10: 74-76.

Sen T. (1993). Studies on the mechanism of anti-inflammatory and anti-ulcer activity of *Pluchea indica* - probable involvement of 5-lipooxygenase pathway. Life Sci. 52 (8): 737-743.

Srisook K, Buapool D, Boonbai R, Simmasut P, Charoensuk Y, Srisook E. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Pluchea indica* Less. herbal tea. J. Med. Plants Res. 6(23): 4077-4081.

Thongpraditchote S, Matsumoto K, Temsiririrkkul R, Tohda M, Murakami Y, Watanabe H. (1996). Neuropharmacological actions of *Pluchea indica* Less root extract in socialed mice [abstract]. Biol. Pharm. Bull. 19: 379-383.

Traithip A. (2005). Phytochemistry and antioxidant activity of *Pluchea indica*. Master Thesis (Pharmacognosy). Faculty of Graduate Studies, Mahidol University.

Uchiyama T, Miyase T, Ueno A, Usmanghani K. (1989). Terpenic glycosides from *Pluchea indica*. Phytochem. 28: 3369-3372.

Uchiyama T, Miyase T, Ueno A, Usmanghani K. (1991). Terpene and lignan glycosides from *Pluchea indica*. Phytochem. 30(2): 655-657.

Yuniarti, T. (2008). Ensiklopedia tanaman obat tradisional. Yogyakarta: MedPress.