รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ **การศึกษาผลของสารสกัดมะเขือเทศราชินี ต่อความสามารถในการรักษาโรคความจำเสื่อม**

Effect of *Solanum lycopersicum* L. var. *cerasiforme* extracts in dementia therapy

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นิรมล ธรรมวิริยสติ
อาจารย์ ดร.จิราพร จรอนันต์
อาจารย์ ปองรุ้ง จันทรเจริญ

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล
(งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๗

รหัสโครงการ ๙๓๐๒๘
สัญญาเลขที่ ๑๒๓/๒๕๕๗

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ **การศึกษาผลของสารสกัดมะเขือเทศราชินี ต่อความสามารถในการรักษาโรคความจำเสื่อม**
Effect of *Solanum lycopersicum* L. var. *cerasiforme* extracts in dementia therapy

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นิรมล ธรรมวิริยสติ
(คณะสหเวชศาสตร์ สาขาเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยบูรพา)
อาจารย์ ดร.จิราพร จรอนันต์
(คณะสหเวชศาสตร์ สาขาเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยบูรพา)
อาจารย์ ปองรุ้ง จันทรเจริญ
(คณะสหเวชศาสตร์ สาขาชีวเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา)

หัวข้อวิจัย การศึกษาผลของสารสกัดมะเขือเทศราชินี ต่อความสามารถในการรักษาโรคความจำเสื่อม

ผู้ดำเนินการวิจัย นิรมล ธรรมวิริยสติ
จิราพร จรอนันต์
ปองรุ้ง จันทรเจริญ

ที่ปรึกษา -

หน่วยงาน คณะสหเวชศาสตร์
มหาวิทยาลัยบูรพา

ปี พ.ศ. 2558

มะเขือเทศราชินีเป็นพืชชนิดหนึ่งที่อุดมไปด้วยคุณค่าทางอาหาร นิยมใช้รับประทานสดและแปรรูปเป็นผลไม้แช่อิ่ม สามารถนำมาใช้เป็นพืชสมุนไพรแต่ยังไม่มีการรายงานผลในการรักษาโรคความจำเสื่อม การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติของมะเขือเทศ ต่อความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งสารอนุมูลอิสระจากการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆ ผลต่อการลดความรุนแรงของโรคจากภาวะ Oxidative stress ของเซลล์ประสาทที่เพาะเลี้ยง และการต้านภาวะสมองเสื่อมจากการขาดเลือด ต่อพฤติกรรมการเรียนรู้และการจำของหนูทดลอง ผลการทดสอบพบว่า สารสกัดมะเขือเทศราชินีด้วยน้ำและเอทานอล มีค่า SOD activity เท่ากับ 32.71% และ 57.41 % มีค่า GPx activity เท่ากับ 8.65 μmol/L และ 9.32 μmol/L มีค่า CAT activity 29.16 M และ 30.84 M ตามลำดับ ซึ่งสารสกัดด้วยเอทานอลมีกิจกรรมของเอนไซม์สำหรับต้านสารอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำ แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ ส่วนสารสกัดด้วยเอทานอลของมะเขือเทศราชินีสามารถใช้ความเข้มข้นน้อยที่สุด 250 mg/ml ต่อฤทธิ์ป้องกันการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงจากการชักนำของสาร H_2O_2 สารสกัดจากมะเขือเทศราชินีด้วยเอทานอลและวิตามินอีสามารถช่วยชะลอและป้องกันภาวะของการเรียนรู้และจดจำที่บกพร่องได้ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูถูกผูกหลอดเลือดอย่างเดียว ผลการทดสอบแสดงให้เห็นถึงแนวทางการป้องกันเบื้องต้นในการใช้สารสกัดมะเขือเทศด้วยเอทานอลที่มีฤทธิ์ต่อการต้านสารอนุมูลอิสระมาช่วยป้องกันภาวะตึงเครียดและโรคความจำเสื่อม

Research Title	Effect of *Solanum lycopersicum* L. var. *cerasiforme* extracts in dementia therapy
Researcher	Niramon Thamwiriyasati Chirapond Chonanant Pongrung Chancharoen
Research Consultants	-
Organization	Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University
Year	2015

Cherry tomato (*Solanum lycopersicum* L. var. cerasiforme) enrich with nutrient. Normally people eat fresh or preserve tomatoes. It is also used as herbal medicine however, there is no report on application as dementia therapy. The objective of this research was to study the effect of antioxidant activities by enzymatic assay, reduction of oxidative stress of nerve cell culture and test for memory and recognition against dementia resulted from OV rat. The result was found that the activity of superoxide dismutase (SOD) of cherry tomatoes extracts by water and ethanol was 32.71% and 57.41%, respectively. The activity of glutathione peroxidase (GPx) of cherry tomatoes extracts by water and ethanol was 65 μmol/L และ 9.32 μmol/L, respectively. The activity of catalase (CAT) of cherry tomatoes extracts by water and ethanol was 29.16 M and 30.84 M, respectively. It has been showed that tomato extract by ethanol was better antioxidant activities rather than its extract by water. The results have no significant potential effects. The minimal concentration of tomato extract by ethanol to protect nerve cell death induced by H_2O_2 was 250 mg/ml. Tomato extract by ethanol and vitamin E could reduce and protect learning and cognition when determining by OV rat model. These results were demonstrated that the pre-treatment of using tomato extract by ethanol which have antioxidant effects to protect oxidative stress and dementia.

กิตติกรรมประกาศ

รายงานการวิจัยฉบับนี้ทุนสนับสนุนการวิจัยจากทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๗ มหาวิทยาลัยบูรพา (เลขที่สัญญา ๑๒๓/๒๕๕๗) และขอขอบคุณคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับอุปกรณ์และสถานที่ทำการศึกษาวิจัยตลอดโครงการ

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณครอบครัว บุคคลอันเป็นที่รักทุกท่าน รวมถึงบุคคลที่ไม่ได้เอ่ยนามที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการทำโครงงานวิจัยครั้งนี้ สำหรับกำลังใจและความช่วยเหลือต่างๆ ตลอดการทำโครงการวิจัยนี้จนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

2559

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตการวิจัย	2
สมมติฐานการวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
รายละเอียดเกี่ยวกับพืชและสารเคมีที่นำมาศึกษา	5
อนุมูลอิสระ	13
สารต้านอนุมูลอิสระ	16
เอนไซม์ Superoxide dismutase	17
บทความและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	20
กรอบแนวคิดในการวิจัย	21
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	23
การสุ่มกลุ่มตัวอย่าง	23
เครื่องมือในการวิจัยและการตรวจสอบคุณภาพเครื่องมือ	23
สารเคมี	24

หน้า

วิธีการทดลอง 24
1) การสกัดสารจากมะเขือเทศ 24
2) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 25
3) การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระและการตายของเซลล์ประสาท เพาะเลี้ยง 27
4) การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดมะเขือเทศต่อการรักษาภาวะความจำเสื่อมในหนูทดลอง 32

บทที่ 4 ผลการวิจัย 33
ผลการทดสอบความปลอดภัยและการสกัดสารจากมะเขือเทศ 33
ผลการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีในสารสกัดจากมะเขือเทศ 33
ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 34
ผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระและการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง 36
ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดมะเขือเทศต่อการรักษาภาวะความจำเสื่อมในหนูทดลอง 45

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ 48
สรุปผลการวิจัย 48
อภิปรายผล 49
ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้ 54
ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป 54

ผลผลิต (Output) 55

บรรณานุกรม 56
บรรณานุกรมภาษาไทย 56
บรรณานุกรมภาษาต่างประเทศ 58

หน้า

ภาคผนวก 62

ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมี 63

ภาคผนวก ข การตรวจยาฆ่าแมลงในมะเขือเทศ 65

ประวัติผู้วิจัย 67

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	องค์ประกอบของวิตามิน และสารประกอบทุติยภูมิในผลมะเขือเทศสด 100 กรัม	8
3.1	ลำดับเบสของ primer ที่ใช้ในการศึกษา	29
3.2	ค่าความเข้มข้นของสารสกัดมะเขือเทศชนิดต่างๆ ที่ใช้ทำการทดสอบ	31
4.1	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดมะเขือเทศชนิดต่างๆที่ความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสงได้สูงสุดเท่ากับ 245 นาโนเมตร	33
4.2	ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี SOD ของสารสกัดมะเขือเทศ	34
4.3	ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Peroxidase ของสารสกัดมะเขือเทศ	35
4.4	ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Catalase ของสารสกัดมะเขือเทศ	35
4.5	เปรียบเทียบชนิดของสารสกัด ความเข้มข้นของสารสกัดและร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ (% cell viability)	44
4.6	เปรียบเทียบพฤติกรรมความสามารถในการเรียนรู้และจดจำของหนูทดลองด้วย Morris water maze test	45
4.7	เปรียบเทียบความสามารถในการจดจำของหนูทดลอง ด้วยวิธี probe test	47

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	ลักษณะของมะเขือเทศราชินี	5
2.8	โครงสร้างของไลโคปีน	7
2.9	โครงสร้างของวิตามินซี (Vitamin C) หรือ กรดแอล-แอสคอร์บิก	8
2.10	สูตรโครงสร้างของเรตินอล	10
2.11	โครงสร้างของสารต้านอนุมูลอิสระบางชนิด	17
2.12	แผนภาพโดยรวมของการดำเนินการวิจัย	22
3.1	ลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ (MSCs) เปรียบเทียบกับเซลล์ประสาท (neuron)	28
4.1	เซลล์ MSCs ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEMมีรูปร่างยาวรีคล้ายกระสวย (spindle shape)	36
4.2	ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ต้นกำเนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์	38
4.3	การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ต้นกำเนิดโดยย้อมสี hematoxylin	39
4.4	ผล RT-PCR เพื่อตรวจการแสดงออกของจีนเซลล์ประสาทใน Induced cells เปรียบเทียบกับ control cells	40
4.5	การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ H_2O_2 ในการชักนำการตายของเซลล์ประสาท	41
4.6	การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดมะเขือเทศในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาทจากการชักนำด้วยสาร H_2O_2 ความเข้มข้น 200 μM	43
4.7	กราฟแสดงความสามารถในการเรียนรู้จดจำของหนูทดลองด้วยวิธี Morris water maze	46
4.8	กราฟแท่งแสดงความสามารถในการจดจำของหนูทดลอง ด้วยวิธี probe test	47

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย

BHA	Butylatedhydroxyanisole
BME	β-mercaptoethanol
CAT	Catalase
DMSO	Dimethylsulfoxide
FBS	Fetal bovine serum
LDL	Low density lipoprotein
GPx	Glutathione peroxidase
MSCs	Mesenchymal stem cells
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
POD	Peroxidase
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
SOD	Superoxide dismutase

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญ

มะเขือเทศราชินี หรือที่เรียกกันว่ามะเขือเทศเชอร์รี่ เป็นมะเขือเทศผลเล็กที่มีรสชาติหวานอมเปรี้ยว เนื้อแน่นมีกลิ่นหอม และมีแหล่งสารอาหารที่สำคัญ ได้แก่ แร่ธาตุ วิตามินเอ และซี สารแคโรทีนอยด์ และโพลีฟีนอล มะเขือเทศราชินี มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Solanum lycopersicum* L. var. *cerasiforme* วงศ์ Solanaceae การปลูกจะเก็บเกี่ยวได้ภายใน 90 วัน ผลผลิตเฉลี่ย 2,000 - 4,000 กิโลกรัม/ไร่ นิยมรับประทานสด และสามารถแปรรูปผลผลิตทางเกษตรให้สามารถยืดอายุการเก็บรักษาให้ยาวนานและเพิ่มมูลค่าให้สิน**ค้า** ในรูปของมะเขือเทศราชินีอบแห้งและแช่อิ่ม (วีณา จิรัจฉริยากูล, 2553) จากการวิเคราะห์องค์ประกอบสำคัญที่พบได้ในผลมะเขือเทศราชินี พบว่า วิตามินเอ ซี และอี สารแคโรทีนอยด์และโพลีฟีนอล เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในกระบวนการต้านสารอนุมูลอิสระ ลดปริมาณไขมันไม่ดี (LDL-cholesterol) และลดอุบัติการณ์การเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจและมะเร็งต่อมลูกหมาก (สุธาทิพ ภมรประวัติ, 2552)

ถึงแม้วิตามินซีนั้นสามารถพบได้ในมะเขือเทศราชินี แต่ปริมาณวิตามินซีที่พบยังมีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับกลุ่มผลไม้ที่มีปริมาณวิตามินซีมากกว่า เช่น มะขามป้อม ฝรั่ง และส้ม อีกทั้งในกระบวนการอบแห้งและแช่อิ่มที่ใช้อุณหภูมิสูงสามารถทำลายวิตามินซีซึ่งสลายตัวได้ง่ายได้ อย่างไรก็ตาม ในกระบวนการอบแห้งทั่วไปสามารถมีการเสริมวิตามินซีเข้าไปในการผลิต และมีการแช่ผลไม้ในสารละลายกรด เช่น 1% กรดแอสคอร์บิค ที่ช่วยยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลในผลไม้และทำให้สีของผลไม้แห้งคงตัวมากขึ้น และในการทำผลไม้แช่อิ่มโดยการเคี่ยวในน้ำเชื่อม สามารถเพิ่มรสชาติโดยการเติมน้ำมะนาวซึ่งมีปริมาณวิตามินซีอยู่มากเช่นกัน จึงมีความน่าสนใจเป็นอย่างยิ่งที่จะศึกษาผลของการเสริมฤทธิ์ด้วยวิตามินซีต่อสารสกัดจากผลมะเขือเทศราชินีที่สามารถยับยั้งสารอนุมูลอิสระ (Ilahy *et al*, 2011) และความสามารถในการออกฤทธิ์รักษาโรคสมองเสื่อมหรือความจำเสื่อม ซึ่งงานวิจัยทางด้านนี้ยังไม่มีรูปแบบการศึกษาเป็นที่ทราบแน่ชัด

การทดลองนี้จึงตั้งอยู่สมมติฐานที่ว่า สารอาหารที่พบได้ในมะเขือเทศราชินีมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ โดยทำการตรวจสอบความสามารถความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของกิจกรรมเอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ Superoxide dismutase (SOD), Peroxidase (POD) และ Catalase (CAT) ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาทที่เลี้ยงในหลอดทดลอง โดยประเมินจากลักษณะการตายของเซลล์ด้วยสี Trypan blue การวัดค่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตโดยการทดสอบ MTT และทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการรักษาโรคสมองเสื่อมในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้สมองอยู่ในภาวะขาดเลือดจากการผูกหลอดเลือด 2VO โดย

งานวิจัยชิ้นนี้สามารถทำการศึกษาวิจัยต่อยอดถึงผลประโยชน์ของมะเขือเทศ/ มะเขือเทศราชินี ต่อความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในการป้องกันโรคสมองเสื่อม เปรียบเทียบกับผลความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากวิตามินซีและวิตามินอี โดยตรง ซึ่งองค์ความรู้เหล่านี้สามารถนำไปสู่การพัฒนาการใช้พืช ผักสมุนไพรที่มีสารต้านอนุมูลอิสระในการรักษาภาวะโรคความจำเสื่อม

ซึ่งงานวิจัยชิ้นนี้สามารถทำการศึกษาวิจัยต่อยอดถึงผลประโยชน์ของมะเขือเทศ/ มะเขือเทศราชินี ต่อความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของลิปิดที่เป็นสาเหตุสำคัญของไขมันอุดตันในหลอดเลือดและโรคหัวใจ และเผยแพร่คุณสมบัติในการต้านสารจุลชีพ โดยเฉพาะเชื้อราในช่องปาก ซึ่งสามารถค้นพบได้ในสารสกัดจากมะเขือเทศ อีกทั้งการศึกษาผลของการเพิ่มวิตามินซี ซึ่งจำเป็นต่อร่างกายมากและเป็นสารอาหารที่ร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์ได้เอง และมีความเกี่ยวข้องในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยตรง ซึ่งองค์ความรู้เหล่านี้สามารถนำไปสู่การพัฒนา ปรับปรุง และแปรรูปอาหารเพื่อเพิ่มคุณค่าของผลิตภัณฑ์ต่อสุขภาพมากยิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1) เพื่อศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดจากผลมะเขือเทศราชินี เปรียบเทียบกับวิตามินซีและวิตามินอี ต่อความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งสารอนุมูลอิสระ
2) เพื่อศึกษาผลของสารสกัด antioxidants ที่ได้จากผลมะเขือเทศ ในการลดความรุนแรงของโรคจากภาวะ oxidative stress ของเซลล์ประสาทที่เพาะเลี้ยง
3) เพื่อศึกษาผลของสารสกัดผลมะเขือเทศ ในการต้านภาวะสมองเสื่อมจากการขาดเลือด ต่อพฤติกรรมการเรียนรู้และการจำของหนูทดลอง

ขอบเขตการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้ กลุ่มผู้วิจัยจะทำการศึกษาสารอาหารที่พบได้ในมะเขือเทศราชินีที่มีคุณสมบัติในการต้านสารอนุมูลอิสระ ทำการสกัดผลมะเขือเทศราชินีสุกด้วยน้ำและตัวทำละลายเมทานอล ในรูปแบบของ Hydrophilic และ Lipophilic extracts เพื่อให้ได้สารที่มีคุณสมบัติที่ละลายน้ำและละลายไขมันในการทดสอบ โดยทำการทดสอบการออกฤทธิ์ต่อการต้านสารอนุมูลอิสระ โดยใช้วิธี Superoxide dismutase (SOD) ทำการทดสอบผลของสารสกัด antioxidants ที่ได้จากผลมะเขือเทศ ในการลดความรุนแรงของโรคจากภาวะ oxidative stress ของเซลล์ประสาทที่เพาะเลี้ยง และศึกษาผลของสารสกัด ในการต้านภาวะสมองเสื่อมจากการขาดเลือด ต่อพฤติกรรมการเรียนรู้และการจำของหนูทดลอง เพื่อศึกษาแนวโน้มของสารสกัดที่ได้ต่อแนวทางในการป้องกันหรือรักษาโรคสมองเสื่อม

สมมติฐานการวิจัย

จากการศึกษาพบว่า มะเขือเทศราชินีจัดเป็นพืชผักผลไม้ชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญกับประเทศไทยทั้งในด้านเศรษฐกิจและสังคม ที่ผู้บริโภคนิยมรับประทานสด หรือแปรรูปผลไม้แบบอบแห้ง และแช่อิ่ม นอกจากนี้ยังให้ประโยชน์ทางอ้อมกับสุขภาพร่างกายด้านอื่นๆ ด้วย เช่น ช่วยเสริมสร้างสุขภาพร่างกาย ต้านอนุมูลอิสระ สารต้านเชื้อราในช่องปาก และป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจและมะเร็งต่อมลูกหมาก จากรายงานวิจัยต่างๆ สนับสนุนว่า สารชนิดต่างๆ ที่เป็นส่วนประกอบที่อยู่ในมะเขือเทศ/มะเขือเทศราชินีเป็นแหล่งสำคัญในการนำมาใช้ต่อสู้กับความเจ็บป่วย รวมไปถึงโรคติดเชื้อได้เป็นอย่างดี

การทดลองนี้จึงตั้งอยู่สมมติฐานที่ว่า สารอาหารที่พบได้ในมะเขือเทศราชินีมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ โดยทำการทดสอบการออกฤทธิ์ต่อการต้านสารอนุมูลอิสระโดยวิธี TEAC และ SOD ฤทธิ์ของสารสกัดสามารถป้องกันสารอนุมูลอิสระของเซลล์ประสาทเลี้ยงในหลอดทดลอง และสามารถรักษาโรคสมองเสื่อมในหนูที่เหนี่ยวนำให้สมองอยู่ในภาวะขาดเลือดจากการผูกหลอดเลือดแบบ 2VO โดยประเมินจากการฟื้นฟูพฤติกรรมการเรียนรู้จดจำ และการเปลี่ยนแปลงของ antioxidant defense ที่พบในเลือด ซึ่งองค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยชิ้นนี้สามารถนำไปสู่การเพิ่มค่านิยมในการรับประทานมะเขือเทศราชินี และการหาแนวทางการพัฒนาแปรรูปผลิตภัณฑ์เพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการต่อสุขภาพและการรักษาโรคมากยิ่งขึ้น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. **บริการความรู้แก่ประชาชน**

ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เบื้องต้นที่ได้จากผลมะเขือเทศราชินีสุกอาจมีส่วนช่วยป้องกันโรคความจำเสื่อม การเกิดมะเร็ง โรคหลอดเลือดและหัวใจ จะเป็นการเพิ่มมูลค่าของพืชสมุนไพรและผลไม้ไทยในการนำมาใช้เป็นยารักษาโรค และการบ่งบอกคุณสมบัติในการต้านโรคหรือช่วยรักษาโรคต่างๆนี้จะเป็นการส่งเสริมการขายให้กลุ่มเกษตรกรและวิสาหกิจชุมชน ทำให้ผู้ซื้อมีความมั่นใจในผลิตภัณฑ์มากขึ้นและผู้ผลิตสามารถขยายตลาดออกไปสู่วงกว้างมากขึ้น

2. **บริการความรู้แก่ภาคธุรกิจ และนำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์**

จากผลการศึกษาที่ได้นี้สามารถนำมะเขือเทศ/มะเขือเทศราชินี เพื่อช่วยในการป้องกันการแก่ก่อนวัย (anti-aging) ความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สามารถช่วยป้องกันการเกิดโรคสมองเสื่อม หลอดเลือดและหัวใจและมะเร็ง สามารถนำข้อมูลที่ได้นี้บริการความรู้ ให้ข้อมูลแก่ภาคธุรกิจได้แก่ องค์การเภสัชกรรม หรือ บริษัทยาต่างๆ เพื่อนำไปผลิตในเชิงพาณิชย์ต่อไปเป็นการเพิ่มผลผลิตทางด้านธุรกิจและเชิงพาณิชย์

3. เป็นประโยชน์ต่อประชากรกลุ่มเป้าหมายและประชากร

ประชากรทั่วไปของประเทศไทยส่วนใหญ่ยังไม่ตระหนักถึงความสำคัญของการรับประทานผักผลไม้เท่าที่ควร ตัวอย่างที่เห็นเด่นชัด เช่น มะเขือเทศ/มะเขือเทศราชินี เนื่องจากการศึกษาผลประโยชน์และคุณค่าทางโภชนาการของผักผลไม้ไทยยังอยู่ในวงจำกัด และศึกษาผลไม่ชัดเจนแน่ชัดเมื่อเทียบกับพืชสมุนไพรชนิดอื่น เช่น ใบชะพลู ขมิ้นชัน การศึกษาองค์ความรู้เกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระและสารต้านจุลชีพในกลุ่มผลไม้ยังคงมีน้อย การเผยแพร่ข้อมูลยังไม่เพียงพอ ดังนั้นการวิจัยชิ้นนี้จะเป็นการส่งเสริมและเผยแพร่ความรู้ที่ได้แก่ประชาชนและชุมชนเป้าหมายที่มีอัตราเสี่ยงในการใช้ยาปฏิชีวนะ ยาแผนปัจจุบันในการรักษาโรค ผลข้างเคียงของการใช้ยาแผนปัจจุบัน ช่วยเสริมสร้างสุขภาพ เพิ่มภูมิคุ้มกันโรค

นอกจากนี้ในโครงการวิจัยนี้เมื่อแล้วเสร็จ คาดว่าจะเป็นโครงงานวิจัยย่อยแก่นิสิตระดับปริญญาตรีประมาณ 2 โครงงาน และหน่วยงานต่างๆสถาบันการศึกษาวิจัย ทั้งในด้านชีวเคมี เซลล์วิทยา สรีรวิทยาเภสัชเคมี และเทคนิคการแพทย์ ซึ่งสามารถนำไปศึกษาและพัฒนาต่อไปได้

4. เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป

ถึงแม้ว่า ความรู้เกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ต่อสารต้านอนุมูลอิสระของกลุ่มผักผลไม้ และพืชสมุนไพรจะมีการศึกษาเพิ่มขึ้นอย่างมากมายในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา แต่รายละเอียดความรู้เชิงลึก วิธีการวิเคราะห์ตลอดจนปริมาณของวิตามินและสารอนุพันธ์ทุติยภูมิจากสารสกัดทั้งที่ละลายน้ำและไขมันที่ได้ต่อผลการออกฤทธิ์นั้นยังมีไม่มากนัก โดยเฉพาะผลของความสารต้านอนุมูลอิสระที่พบได้ผักผลไม้ต่อการยับยั้งและป้องกันโรคความจำเสื่อม ยังไม่มีการศึกษาวิจัยที่มากพอในการแปรรูปให้อยู่ในรูปผลิตภัณฑ์ที่ใช้ได้จริง ดังนั้นเป้าหมายหลักของการศึกษานี้ จะมุ่งเน้นที่ความรู้ความเข้าใจในการสกัดสารจากผักผลไม้ การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระ ความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของลิปิดอันนำไปสู่การเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคสมองและความจำเสื่อม โรคไขมันในเลือดสูง โรคหัวใจ เบาหวาน มะเร็ง โรคไต รวมทั้งความแก่ชรา และการนำวิตามินซี/อี เข้ามาใช้ในผลิตภัณฑ์เพื่อเสริมคุณค่าทางโภชนาการของผลไม้ในการบริโภคมากยิ่งขึ้น อีกทั้งยังช่วยป้องกันและส่งเสริมสุขภาพให้แข็งแรง โดยที่ความรู้ความเข้าใจในการศึกษาผลของออกฤทธิ์ต่อผลไม้ชนิดนี้จะเป็นองค์ความรู้พื้นฐานที่สำคัญต่อพืชผลไม้ชนิดอื่น และสามารถศึกษาถึงผลกระทบของสารสกัดจากพืชในเชิงพิษวิทยา คุณค่าทางโภชนาการ ปริมาณที่เหมาะสมในการรับประทานหรือการรับประทานควบคู่กับพืชผลไม้ไทยชนิดอื่นเพื่อประโยชน์ในการป้องกันรักษา ซึ่งสามารถวิจัยต่อยอดในสัตว์ทดลอง หรือในกลุ่มคนตัวอย่างต่อผลการใช้ผลไม้ชนิดนี้ที่ชัดเจนมากขึ้นในอนาคต

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 รายละเอียดเกี่ยวกับพืชและสารเคมีที่นำมาศึกษา

2.1.1 มะเขือเทศราชินี

ชื่อวิทยาศาสตร์; *Solanum lycopersicum* L. Var. *cerasiforme*

วงศ์; SOLANACEAE

ชื่อพ้อง; *Lycopersicon esculentum* var. cerasiforme มะเขือเทศเชอร์รี่

ภาพที่ 2.1 ลักษณะของมะเขือเทศราชินี

ที่มา: http://missveggie.igetweb.com/product/390879/มะเขือเทศราชินี.html

ลักษณะทางพฤษศาสตร์ (สถาบันการแพทย์แผนไทย, 2542)

มะเขือเทศเป็นพืชล้มลุก สูงประมาณ 1-2 เมตร ลำต้นล้มง่าย มีขนอ่อนนุ่มปกคลุมใบ เป็นใบรวม ใบย่อยมีลักษณะยาวรี ขอบใบยักเว้าลึก ปลายใบแหลม ดอกออกเป็นช่อตามง่ามใบ ช่อละ 3-7 ดอก ดอกย่อยเป็นดอกเดี่ยวขนาดเล็กสีเหลือง ประกอบด้วยกลีบ 5-6 กลีบ โคนกลีบเชื่อมติดกันเป็นหลอดหรือจะออกเป็นดอกเดี่ยวก็มี ผลมีรูปร่างและขนาดแตกต่างกันได้ตามสายพันธุ์ อาจกลมหรือแบน ผลดิบมีสีเขียวเมื่อสุกมีสีแดงอมส้มหรือแดงสด เปลือกผลบาง ช้ำง่ายภายในมีเมล็ดสีขาวจำนวนมาก และมะเขือเทศเป็นพืชที่ชอบอากาศอบอุ่นและแสงแดดพอควร ขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด

สรรพคุณในตำรายาไทย (สถาบันการแพทย์แผนไทย, 2542)

ราก สรรพคุณแก้ปวดฟัน ชะล้างบาดแผล

ใบ มีสรรพคุณทาผิวหนังแก้แดดเผา

ผล เป็นยาบำรุงกระเพาะอาหาร ลำไส้ ไต เป็นยาเจริญอาหาร ยาระบายอ่อนๆ ช่วยขับพิษและสิ่งคั่งค้างในร่างกาย แก้กระหายน้ำ

สารสำคัญที่พบในมะเขือเทศ (อิสริยา เตชะธนะวัฒน์, 2008)

ผลมะเขือเทศมีสารที่สำคัญจำพวก carotenoid ที่ชื่อว่า lycopene ซึ่งเป็นสารสีแดงและ β-carotene และพบสารกลุ่ม glycol-alkaloid ที่ชื่อ tomatine และ salanine ในปริมาณต่ำที่ใบของมะเขือเทศ

*คุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของมะเขือเทศ (*อิสริยา เตชะธนะวัฒน์, 2008)

Tomatoside เป็นสารที่พบในกลุ่ม Steroidal glycoside ในมะเขือเทศ แสดงคุณสมบัติของ interferon ซึ่งอาจใช้ป้องกันและรักษาการติดเชื้อไวรัสในมนุษย์และสัตว์ นอกจากนี้มีการศึกษาการใช้สารเล็คตินสกัดจากมะเขือเทศสีดา พิสูจน์เชื้อเบต้าฮีโมลัยติคสเตร็ปโตค็อคคัส กลุ่มบี

มะเขือเทศมีสารต้านอนุมูลอิสระ คือ ไลโคปีน ที่มีคุณสมบัติสามารถลดการเกิดมะเร็งลำไส้และมะเร็งต่อมลูกหมาก โดยทานมะเขือเทศ 10 ครั้ง/สัปดาห์ จะช่วยลดอัตราการเกิดมะเร็งต่อมลูกหมากในเพศชายได้ถึง 45%

มะเขือเทศมีสรรพคุณทางยาค่อนข้างสูง เพราะมะเขือเทศมี วิตามินพี (citrin) ซึ่งจะช่วยป้องกันการแข็งตัวของหลอดเลือด มะเขือเทศยังมีฤทธิ์ขับปัสสาวะจึงสามารถแก้อาการความดันโลหิตสูง รักษาโรคตาจากอาการตาบอดกลางคืน (Night blindness) ที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งคือมีวิตามินซีมากทำให้สามารถป้องกันและรักษาโรคลักปิดลักเปิด

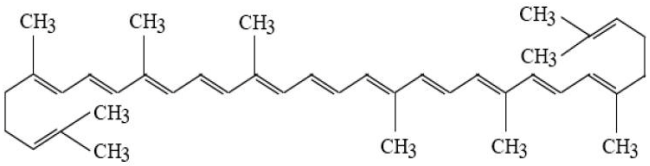
องค์ประกอบทางเคมี

แคโรทีนอยด์ เป็นสารสีธรรมชาติที่พบมากที่สุด พบในคลอโรพลาสต์ในรูป chromoproteins หากอยู่นอกคลอโรพลาสต์ จะพบเป็น acyclic carotenoids ซึ่งแคโรทีนอยด์ ที่เป็นสีของมะเขือเทศคือ ไลโคปีน และพบว่าไลโคปีน มีโครงสร้างโมเลกุลที่ยาวกว่าแคโรทีนอยด์ชนิดอื่นๆ ทำให้มีประสิทธิภาพและมีฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ ซึ่งจะช่วยลดความผิดปกติ ลดความเสื่อมของเซลล์ ที่เกิดจากการทำลายของอนุมูลอิสระ และคนที่รับประทานมะเขือเทศมากๆ จะลดอัตราเสี่ยงการเกิดมะเร็งบางชนิด โดยเฉพาะมะเร็งปอดและมะเร็งในช่องท้อง (วินัย ดะห์ลัน, 2550)

ไลโคปีน เป็นตัวช่วยป้องกันความเสียหายของไขมัน โปรตีน และดีเอ็นเอ ที่เกิดจากกระบวนการ Oxidative stress โดยสามารถทำปฏิกิริยากับออกซิเจน (จากปฏิกิริยา reactive ของออกซิเจน) แสดงให้เห็นได้ว่า ไลโคปีนอาจจะมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพกว่าแคโรทีนอยด์ตัวอื่นๆ ที่อยู่ใน

พลาสมา (Paolo et al., 1989) และมีงานวิจัยกล่าวว่า ไลโคปีนมีศักยภาพและมีความจำเพาะในการต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง ในกระบวนการ cell cycle ที่เซลล์มะเร็งจะมีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วและไม่สามารถควบคุมได้ ซึ่งการทำงานของไลโคปีนนั้นจะเข้าไปลดกระบวนการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งบางชนิด (Levy et al., 1995) ช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งต่อมลูกหมากได้ (William et al., 1999) ลดการเกิดมะเร็งเต้านมในผู้หญิง (Grant et al., 1999) ถ้าได้รับไลโคปีนในปริมาณสูงจะสามารถช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งกระเพาะอาหารได้อีกด้วย (Tsubono et al., 1999)

มะเขือเทศมีสารฟลาโวนอยด์มากในรูปของกลุ่มฟลาโวนอล โดยพบมากที่สุดในผิวมะเขือเทศ สารที่พบคือเควอร์เซติน (Quercetin) และแคมป์ฟีรอล (kaempferol) ส่วนสารไลโคพีนนั้นพบในมะเขือเทศมากกว่าผักผลไม้อื่น มี 288 ไมโครกรัม/กรัม ในมะเขือเทศ, 45 ไมโครกรัม/กรัม ในแตงโม และ 14 ไมโครกรัม/กรัม ในส้มโอสีชมพู นักวิจัยเชื่อว่าสารประกอบทุติยภูมิเหล่านี้มีส่วนช่วยลดอุบัติการณ์ของโรคหลอดเลือดหัวใจและมะเร็งต่อมลูกหมาก (สุธาทิพ ภมรประวัติ, 2552)



Lycopene ($C_{40}H_{56}$)

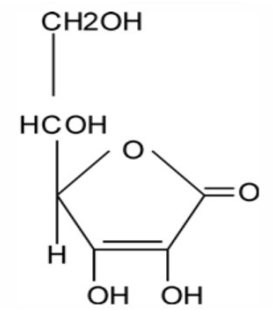
ภาพที่ 2.2 โครงสร้างของไลโคปีน
(ที่มา: วีระ วีระกุล และ วุฒิชัย ศรีวิกรานต์โยธิน, 2546)

ผลิตภัณฑ์จากมะเขือเทศเป็นแหล่งธาตุโพแทสเซียม สารโฟเลต วิตามินเอ ซี และอี ที่ดีมีปริมาณโพแทสเซียมและโฟเลตในปริมาณใกล้เคียงกับผักยอดนิยมหลายชนิด แต่มีวิตามินซีและอัลฟ่าโทโคฟีรอลมากกว่าผักอื่นๆ ดังแสดงตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงองค์ประกอบของวิตามิน และสารประกอบทุติยภูมิในผลมะเขือเทศสด 100 กรัม
(ที่มา: https://sites.google.com/site/mymint3003/bthkhwam-4/bthkhwamwichakar-2)

	ผลมะเขือเทศสด
โพแทสเซียม (มก.)	๒๓๗
อัลฟ่าโทโคฟีรอล (มก.)	๐.๕๔
วิตามินเอ (IU)	๘๓๓
วิตามินซี (มก.)	๑๒.๗
โฟเลต (มคก.)	๑๕
บีตาแคโรทีน (มคก.)	๔๔๙
อัลฟ่าแคโรทีน (มคก.)	๑๐๑
ไลโคพีน (มคก.)	๒,๕๗๓
ลูทีนและซีอาแซนทิน (มคก.)	๑๒๓
ไฟโทอีน (มคก.)	๑,๘๖๐
ไฟโทฟลูอีน (มคก.)	๘๒๐

2.1.2 วิตามินซี



ชื่อสารเคมีในระบบ

IUPAC; 2-oxo-L-threo-hexono-1,4-lactone-2,3-endiol

ชื่อพ้อง ; L-ascorbic acid, สูตรเคมี; $C_6H_8O_6$

น้ำหนักโมเลกุล; 176.14 กรัมต่อโมล

จุดหลอมเหลว; 190-192 °C

รูปที่ 2.3 โครงสร้างของวิตามินซี (Vitamin C) หรือ กรดแอล-แอสคอร์บิก
(ที่มา; http://www.bloggang.com/mainblog.php)

คุณสมบัติทางกายภาพ (ศิริวรรณ สุทธจิตต์, 2550)

วิตามินซี (Ascorbic acid) เป็นผงสีขาวสามารถละลายน้ำได้ดี ละลายเล็กน้อยในอะซิโตนและแอลกอฮอล์ มีฤทธิ์เป็นกรดอย่างแรง ดูดความชื้นในอากาศได้สลายตัวได้ง่ายเมื่อโดนความร้อน แสงสว่าง ด่าง และสารออกซิไดส์ ดังนั้นมักเก็บวิตามินซีไว้ในขวดสีชา

คุณสมบัติทางชีวภาพ (ศิริวรรณ สุทธจิตต์, 2550)

ช่วยในการดูดซึมธาตุเหล็กในทางเดินอาหาร ช่วยในการสลายตัวของโคเลสเตอรอล ช่วยในการสร้างสารสื่อประสาทและฮอร์โมน เป็น cofactor ในกระบวนการสร้าง collagen เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกัน

แหล่งของวิตามินซี (Carvilla et al., 2007)

อาหารที่จัดได้ว่ามีวิตามินซีสูงได้แก่ อาหารจำพวกผักและผลไม้ เช่น ส้ม ฝรั่ง มะละกอ มะนาว กีวี พริกหยวก ผักกาด มะเขือเทศ หน่อไม้ฝรั่งและบล็อกโคลี่ เป็นต้น วิตามินซีสามารถละลายน้ำได้ พบว่ามีบทบาทสำคัญในการต้าน Boron stress ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิด Reactive Oxygen Species (ROS)

คำแนะนำสำหรับการรับประทานวิตามินซี

Adult women	75 mg/day
Adult men	90 mg/day
Children 9-12 years	45 mg/day

ผลของการขาดวิตามินซี

การขาดวิตามินซีจะก่อให้เกิดโรคต่างๆ โดยมีลักษณะที่แสดงให้เห็น เช่น เลือดออกตามไรฟัน การซ่อมแซมบาดแผลช้า และเลือดจาง (Anemia) นอกจากนี้วิตามินซี ยังเป็น cofactor ที่สำคัญสำหรับปฏิกิริยาต่างๆ ประกอบด้วย การสังเคราะห์ collagen การสังเคราะห์ norepinephrine adrenal hormone รวมทั้งการสังเคราะห์ carnitine เป็นต้น (Phillips et al., 2010)

การขาดวิตามินซี ทำให้เกิดโรคลักปิดลักเปิด ซึ่งเกิดจากความบกพร่องของกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนคอลลาเจนในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ทำให้เนื้อเยื่อเหล่านี้ไม่แข็งแรง จึงมีเลือดออกง่าย เหงือกบวมและฟันหลุดได้ง่าย ปวดข้อและข้อบวม ผิวหนังมีการสมานแผลได้ช้าและยังทำให้ร่างกายติดเชื้อได้ง่าย (นภา หลิมรัตน์, 2550)

*ผลเสียจากการที่ได้รับวิตามินซีมากเกิน (*สมทรง เลขะกุล, 2543)

วิตามินซี หากได้รับมากเกินไปจะเปลี่ยนไปเป็นออกซาเลต ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดนิ่วในไตจากการที่มีออกซาเลตตกผลึกตามส่วนต่างๆของทางเดินปัสสาวะและกระเพาะปัสสาวะได้

การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี (Ronald, 2008)

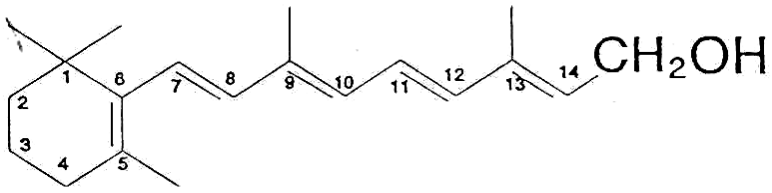
ค่าการดูดกลืนแสงของวิตามินซี จะขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรดหรือเบสของสาร แต่โดยส่วนมากจะมีค่าดูดกลืนแสงที่มากที่สุดในช่วง 245-265 นาโนเมตร นอกจากนี้ยังสามารถหาปริมาณวิตามินซี โดยวิธีการไทเทรต แบบ back titration

2.1.3 วิตามินเอ

สูตรเคมีของวิตามินเอ

วิตามินเอเป็น Long chain primary alcohol ที่มีไอโซเมอร์ได้หลายรูป เป็นผลึกสีเหลืองอ่อนละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์และไขมัน วิตามินเอในธรรมชาติส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของ trans form ของ retinol (ดังรูปที่ 2.9)

สูตรโครงสร้างของวิตามินเอ ประกอบด้วยส่วนสำคัญ 3 ส่วน คือ (1) Beta-ionone ring ซึ่งเป็น hydrophobic head (2) conjugated isoprenoid side chain ตรงส่วนนี้จะสามารถมี polymerization ได้เมื่อถูกแสง และ (3) polar terminal group ซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงได้เป็นสารเอสเพอร์ (Ronald, 2008)



รูปที่ 2.4 สูตรโครงสร้างของเรตินอล
(ที่มา; สมทรง เลขะกุล, 2543)

วิตามินเอ ทนต่อความร้อนได้ดีพอสมควร ดังนั้นในการประกอบอาหารหรือทำอาหารกระป๋องที่ใช้กรรมวิธี Pasteurization, Sterilization, หรือ Dehydration จึงทำให้สูญเสียวิตามินเอไปเพียงเล็กน้อยเท่านั้น แต่จะเสียง่ายเมื่อถูกแสงอุลตราไวโอเล็ท หรือถูกออกซิไดส์ เนื่องจากวิตามินเอและโปรวิตามินเอ มีคาร์บอนคู่ในอณูหลายแห่ง ดังนั้นในการเก็บจึงควรเก็บในขวดสีน้ำตาล และใส่สารช่วยป้องกันการออกซิเดชั่น เช่น วิตามินอี ลงไปด้วย (สมทรง เลขะกุล, 2543)

วิตามินเอ เป็นวิตามินตัวแรกที่ค้นพบ มีชื่ออื่นๆเช่น Anti-interfective vitamin, fats-solubel A, biostoerol, ophathalmin ซึ่งหมายถึงกลุ่มของสารเหล่านี้

(1) วิตามิน เอ$_1$ (retinol หรือ azerophthol)

(2) วิตามิน เอ$_2$ (3, 4-dehydroretinol)

(3) อนุพันธ์ของวิตามินเอ เช่น กรดเรติโนอิก (retinoic acid, RA) และ retinol

แหล่งกำเนิดและแหล่งที่พบ (ศิริวรรณ สุทธจิตต์, 2550)

วิตามินเอ พบได้ในอาหารและผลิตภัณฑ์จากพืชและจากสัตว์ทั่วไป ในพืชใบเขียวเข้ม วิตามินเอ จะอยู่ในรูปของ provitamin A ซึ่งมีเบต้าแคโรทีน (β-carotene) และมักรวมกับสารแคโรทีนอยด์อื่นๆ ซึ่งพบว่าแคโรทีนอยด์ พบมากในพืชทั่วไปที่มีสีเขียว และพบมากส่วนใหญ่ในพืชสีเหลือง สีส้ม และสีแดง ส่วนในผลิตภัณฑ์อาหารจากสัตว์ พบวิตามินเอในปริมาณสูงมาก เช่น นมสด เนื้อ ไข่ เนยเข็ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเครื่องในสัตว์และน้ำมันตับปลา ในปลาและสัตว์ทั่วไปจะพบวิตามิน เอ$_1$ ส่วนวิตามินเอ$_2$ พบเฉพาะในปลาน้ำจืด

แคโรทีนอยด์ เป็น Isoprenoids pigment ที่ได้จากพืช พบมากในพืชทั่วไปที่มีสีเขียว และส่วนใหญ่ของพืชสีเหลือง สีส้ม สีแดง เช่น β-carotene พบในตำลึง มะละกอสุก ฟักทอง ฟักข้าว ส่วน lycopene พบในมะเขือเทศ แตงโมและฟักข้าว เป็นต้น ทุกส่วนของพืชจะมีแคโรทีนอยด์ ส่วนมากจะมีปริมาณสูงในส่วนที่กำลังเจริญ เช่น

- ใบ มีแซนโตฟิลล์สูง และ 5-40% ของแคโรทีนอยด์ทั้งหมด เป็น β-carotene ดอก โดยทั่วไปจะเป็นแคโรทีน
- ดอกบางชนิดจะมีแคโรทีนอยด์ชนิดพิเศษเฉพาะตัวดอกสีเหลืองจะมีแซนโธฟิลล์สูง ดอกสีส้มแคโรทีนอยด์ส่วนใหญ่จะเป็น Lycopene เกสรตัวผู้ และละอองเกสร (pollen) ในพืชบางชนิดมีแคโรทีนอยด์ เช่น กุหลาบ ผล พบว่าชนิดและปริมาณของแคโรทีนอยด์ในผลต่างๆ จะต่างกัน เช่น มะม่วงสุก มีเบต้า-แคโรทีนสูง มะเขือเทศสุกมี lycopene สูงและปริมาณของแคโรทีนอยด์จะสูงมากขึ้นในผลไม้สุก
- เมล็ด จะมีแคโรทีนอยด์ต่ำ ราก รากของพืชส่วนมากมีแคโรทีนอยด์ปริมาณต่ำ ยกเว้น แครอทและมันเทศ

คุณสมบัติทางกายภาพของวิตามินเอ (ศิริวรรณ สุทธจิตต์, 2550)

วิตามินเอ ที่บริสุทธิ์มีลักษณะเป็นของเหลวคล้ายน้ำมันและทำให้เป็นผลึกได้รูปผลึกปริซึม มีสีเหลือง ผลึกของ neovitamin A เป็นรูปผลึกสีเหลืองอ่อน

Retinol ละลายได้ดีในน้ำมัน รวมทั้งตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหลาย ทนต่อความร้อนในที่ไม่มีอากาศ ทนต่อกรดได้ดีกว่าด่าง แต่ละลายได้ง่ายด้วยแสงและขบวนการออกซิเดชัน

เบต้า-แคโรทีน เป็นผลึกปริซึมหกเหลี่ยมสีม่วงเข้ม (ถ้าตกผลึกจากเบนซีนและเมทานอล) หรือ Rhombic square leaflets มีผลึกสีแดง (ถ้าตกผลึกจากปิโตรเลียมอีเทอร์) มีจุดหลอมเหลวที่ 183°C

คุณสมบัติทางเคมี (ศิริวรรณ สุทธจิตต์, 2550)

วิตามินเอ$_1$ (retinol, $C_{20}H_{30}O$) มีการดูดกลืนแสงได้มากที่สุดในช่วงความยาวคลื่นที่ 325 นาโนเมตร ในสารละลายแอลกอฮอล์ วิตามินเอ$_2$ (Dyhydroretinol, $C_{20}H_{28}O$) มีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกับวิตามินเอ$_1$ เพียงแต่มีพันธะคู่ใน ionone ring เพิ่มที่ C_3, C_4 และดูดกลืนแสงที่ดีที่สุดที่ 2 ช่วง คือ ที่ความยาวคลื่น 620 และ 693 นาโนเมตร

แคโรทีนอยด์ เป็นสารพวก Tetraterpenoids แบ่งออกเป็น 2 พวกใหญ่ๆ คือ carotenes และ xanthophylls ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของแอลกอฮอล์ α-carotene เป็นแคโรทีนที่สายไฮโดรคาร์บอนมี β-ionone ring และ α-ionone ring อย่างละ 1 วง ส่วน β-carotene มี β-ionone ring 2 วง และ γ-carotene มี β-ionone ring 1 วง

คุณสมบัติทางชีวภาพ (ศิริวรรณ สุทธจิตต์, 2550)

การมองเห็นของดวงตา

ในปี ค.ศ. 1967 Dr. George Wald ได้รับรางวัลโนเบลจากการพบว่า วิตามินเอ มีบทบาทต่อกลไกของการมองเห็น โดยเฉพาะการมองเห็นในที่มืด (scotopic vision) ต่อมามีการยืนยันว่าสารที่ทำหน้าที่สำคัญของวิตามินเอในตาคือ retinal ซึ่งเป็นส่วนสำคัญของจอประสาทตา

การเจริญเติบโตของกระดูกและเนื้อเยื่อบุผิว

กรดเรติโนอิกและ Retinol จำเป็นต่อการพัฒนาของตัวอ่อนในครรภ์ กรดเรติโนอิกควบคุมการทำงานของเซลล์ osteoblast และ osteoclast ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงกระดูกและฟันในร่างกายที่กำลังเจริญเติบโต ส่วนสาร retinol ทำหน้าที่ควบคุมและรักษารูปร่างและความแข็งแรงของเนื้อเยื่อบุผิวให้เป็นปกติเสมอ

วิตามินเอ มีบทบาทต่อการผลิตอสุจิ โดยการเปลี่ยนแปลงสภาพ (differentiation) ของเซลล์เริ่มต้นในการสร้างอสุจิ รวมทั้งพัฒนาการและการเจริญของตัวอ่อน (embryo) และรก (placenta)

ผลของการขาดวิตามินเอ (นภา หลิมรัตน์, 2550)

อาการแรกเริ่มของการขาดวิตามินเอ คือ ตาบอดกลางคืน กล่าวคือ มองเห็นได้ไม่ดีในขณะที่มีแสงสลัว และหากยังขาดวิตามินเออีกต่อไประยะเวลานานอาจทำให้เปลือกตาอักเสบ การทำงานของต่อมสร้างน้ำตาเสีย ซึ่งจะทำให้ผิวของลูกตาโดยเฉพาะส่วนของกระจกตา แห้ง อักเสบ และบวม หากปล่อยไว้เป็นเวลานานอาจทำให้ตาบอดได้

ผลเสียจากการที่ได้รับวิตามินเอมากเกิน (กิจจา ฤดีขจร 2551)

การได้รับวิตามินเอที่มากเกินจะทำให้ มีอาการอ่อนเพลียและอาเจียน แต่ถ้าหากได้รับเป็นระยะนานเกิน อาจทำให้เกิดโรคตับขั้นรุนแรง (โรคตับแข็ง) หากได้รับมากเกินไป จะทำให้ผิวหนังแห้ง ตกสะเก็ด เล็บเปราะ ผมร่าง

วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณของวิตามินเอ (สมทรง เลขะกุล, 2543)

การวิเคราะห์หาปริมาณของวิตามินเอ มีหลายวิธี เช่น วิธีการใช้ Colorimetry, Fluorometry และ High performance liquid chromatography (HPLC) โดยมี UV detector เป็นเครื่องตรวจวัด ในปัจจุบันนี้นิยมใช้วิธี HPLC เพราะจัดเป็นวิธีการที่มีความถูกต้องมากวิธีหนึ่ง

2.2 **อนุมูลอิสระ** (Free radicals)

อนุมูลอิสระ (free radicals) หมายถึง สารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (unpaired electrons) ในอะตอมหรือโมเลกุล พบได้ทุกแห่งทั้งในสิ่งแวดล้อม ในสิ่งมีชีวิต และในเซลล์ โดย เฉพาะอย่างยิ่ง กระบวนการผลิตพลังงานภายในเซลล์ หรือจากกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) โดยมีการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนออกจากโมเลกุลของออกซิเจน ทำให้อิเล็กตรอนในโมเลกุลออกซิเจนไม่สมดุล กลายเป็นอนุมูลอิสระและว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยามาก และสามารถดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่อิเล็กตรอนที่ขาดหายไปเพื่อให้ตัวเองเกิดความสมดุลหรือเสถียร ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ และเกิดขึ้นในเซลล์ตลอดเวลา (ดังสมการ 1 และ 2)

$$R^{\bullet} + O_2 \rightarrow ROO^{\bullet} \qquad \text{(สมการที่1)}$$

$$ROO^{\bullet} + RH \rightarrow ROOH + R^{\bullet} \qquad \text{(สมการที่2)}$$

อนุมูลอิสระที่สำคัญที่สุดที่เกิดในเซลล์ที่ใช้ออกซิเจน ได้แก่ oxygen radical, อนุพันธ์ของ oxygen radical (เช่น superoxide radical และ hydroxyl radical), hydrogen peroxide, transition metals (โลหะทรานซิชัน), carbonate radical ($CO_3^{\bullet-}$), nitrate radical($NO_3^{\bullet}$), methyl radical ($CH_3^{\bullet}$), superoxide radical ($O_2^{\bullet}$), peroxyl radical ($ROO^{\bullet}$), reactive oxygen species (ROS) เป็นต้น(27)นอกจากนี้อนุมูลอิสระสามารถทำลายชีวโมเลกุลทุกประเภท ทั้งในเซลล์และส่วนประกอบของเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น ลิพิด (lipid) โปรตีน

(protein) เอนไซม์ (enzyme) ดีเอ็นเอ (DNA) อาร์เอ็นเอ (RNA) คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) เซลล์เมมเบรน (cell membrane) คอลลาเจน(collagen) ไมโตคอนเดรีย (mitochondria) และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissues) ซึ่งเป็นสาเหตุให้เซลล์ตาย การเกิดการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอในเซลล์ และก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ ได้แก่ โรคชรา (aging) โรคมะเร็ง (cancer) โรคหัวใจขาดเลือด (coronary heart disease) โรคความจำเสื่อม (Alzheimer's disease) โรคข้ออักเสบ (arthritis) โรคภูมิแพ้(allergies) โรคความดันโลหิต โรคเหงือก โรคเกี่ยวกับสายตา ความผิดปกติของปอดและระบบประสาท โรคเกี่ยวกับทางเดินหายใจ โรคเกี่ยวกับความผิดปกติของผิวหนัง และโรคลำไส้อักเสบเป็นต้น (Ames et al., 1993)

อนุมูลอิสระนอกจากจะเกิดภายในสิ่งมีชีวิตแล้วอนุมูลอิสระสามารถเกิดจากภายนอกสิ่งมีชีวิตหรือในสิ่งแวดล้อม ได้แก่ การได้รับเชื้อโรคเช่น การติดเชื้อโรคไวรัสหรือเชื้อแบคทีเรีย โรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน (immune diseases) เช่น ข้ออักเสบรูมาตอยด์ เป็นต้น จากรังสี เช่น รังสีอัลตราไวโอเลต รังสีเอ็กซ์ รังสีแกมมา จากมลภาวะ เช่น ควันบุหรี่ แก๊สจากท่อไอเสีย เช่น ไนตรัสออกไซด์ ไนโตรเจนไดออกไซด์ เขม่าจากเครื่องยนต์ ฝุ่น จากกระบวนการประกอบอาหาร เช่น การย่างเนื้อสัตว์ที่มีส่วนประกอบของไขมันสูง การนำน้ำมันที่ใช้ทอดอาหารที่มีอุณหภูมิสูง ๆ กลับมาใช้อีก การทำให้เกิดอาหารประเภทเกรียม ไหม้ หรือเกิดจากการปิ้งย่าง จากยาบางชนิด เช่น โดโซรูบิซิน (doxorubicin) เพนนิซิลลามิน (penicillamine) พาราเซตามอล (paracetamol) (ไมตรี สุทธจิตต์, 2555)

แหล่งกำเนิดอนุมูลอิสระ (Sources of free radical) (เจนจิรา จิรัมย์ และคณะ, 2554)

ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่ใช้ออกซิเจนในการดำรงชีพ จะมีอนุมูลอิสระของออกซิเจน เกิดขึ้นอยู่ตลอดเวลา การเกิดอนุมูลอิสระเหล่านี้ มีสาเหตุมาจากปัจจัย ทั้งภายในและภายนอกร่างกายดังนี้

ปัจจัยภายในร่างกาย) (ไมตรี สุทธจิตต์, 2555)

ในร่างกายของสิ่งมีชีวิตจะมีปฏิกิริยามากมายที่เกี่ยวข้องทั้งการสร้างและการสลายโมเลกุลของสารที่เรียกว่ากระบวนการเมทาบอลิซึมซึ่งถือป็นสาเหตุหลักอย่างหนึ่งที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ตัวอย่างปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระได้แก่

ปฏิกิริยาออกซิเดชั่นที่เกิดขึ้นเอง (Auto-oxidation) เช่น การเกิดออกซิเดชั่นของไขมัน ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ

1) ระยะเหนี่ยวนำเริ่มต้น (initiation) เป็นระยะที่กรดไขมันแตกตัวเป็นอนุมูลอิสระ โดยมีแสงหรืออุณหภูมิเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

2) ระยะเพิ่มจำนวน (propagaton) เป็นระยะที่อนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับออกซิเจนเกิดเป็นอนุมูลเปอร์ออกซี่ (peroxy radical) แล้วทำปฏิกิริยาต่อกับกรดไขมันเกิดเป็นไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (hydro peroxide)

และอนุมูลอิสระ ซึ่งถ้ามีแสงและความร้อนเป็นตัวเร่งก็จะเกิดปฏิกิริยาต่อ ทำให้อนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น แล้วอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นก็สามารถทำปฏิกิริยากับออกซิเจนใหม่ได้ต่อเนื่องไปเรื่อยๆ

3) ระยะสิ้นสุด (Termination) เป็นระยะที่อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นรวมตัวกันกลายเป็นโมเลกุลที่เสถียร

ปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง การทำงานของเอ็นไซม์สำคัญ 2 ชนิดที่มีผลกระตุ้นการสร้างอนุมูลอิสระภายในร่างกาย ได้แก่

1) เอ็นไซม์ แซนธีนออกซิเดส (xantine oxidase : XO) ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการสลายเบสพิวรีน (purine) โดยเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนไฮโปแซนธีน (hypoxantine)เป็นแซนธีน (xantine) และแซนธีน เป็น กรดยูริก (uric acid) พร้อมๆกับเคลื่อนย้ายอิเล็คตรอนให้ออกซิเจน เกิดเป็นอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ (O_2^-)

2) เอ็นไซม์ไลโพออกซีจีเนส (lipoxygenase :LOX) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (polyunsaturated fatty acid) ภายในโมเลกุลของเอนไซม์นี้มีเหล็ก (Fe^{2+}) เป็นส่วนประกอบอยู่ทำหน้าที่ดึงอะตอมไฮโดรเจนจากกรดไขมันและเติมออกซิเจนให้กับกรดไขมันเกิดเป็นไฮโดรเพอรอกไซด์ ซึ่งจะสลายตัวเป็นอนุมูลของกรดไขมันต่อไป

โลหะทรานซิชั่น (transition metal) โลหะทรานซิชั่น 2 ชนิดคือ เหล็ก (Fe^{2+}) และทองแดง (Cu^{2+}) ที่มีอยู่ทั่วไปในร่างกายสามารถเร่งการสร้างอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลจากซูปเปอร์ออกไซด์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogenperoxide, H_2O_2) ในปฏิกิริยา Fenton (Fenton's reaction)

ปัจจัยภายนอกร่างกาย (ไมตรี สุทธจิตต์, 2555)

ยารักษาโรค ยาบางชนิดที่รับประทานเข้าไป ในร่างกายสามารถก่อให้เกิดอนุมูลอิสระได้ โดย เฉพาะอย่างยิ่ง ยาในกลุ่มต้านจุลชีพและต้านมะเร็ง เช่น บลีโอไมซิน (bleomycin), แอนทราไซคลินส์ (antracyclines) และ เมโธทรี เสต (methotrexate) เนื่องจากมีฤทธิ์เสริมปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (pro-oxidation)

รังสี การใช้รังสีรักษาโรค เช่น รังสีเอกซ์ (X-ray), รังสีแกมมา (γ-ray) อาจเป็นสาเหตุทำให้เกิด อนุมูลอิสระขึ้นในร่างกายจากการถ่ายทอดพลังงาน ให้กับน้ำ ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเซลล์แล้วก่อให้เกิด ปฏิกิริยาขั้นต่อไป (secondary reaction) กับ ออกซิเจนที่ละลายอยู่ในเซลล์นั้นได้อนุมูลอิสระ

ควันบุหรี่ ในควันบุหรี่มีส่วนประกอบของ ไน ตริกออกไซด์ (NO), ไนโตรเจนออกไซด์ (NO_2) และ เพ อรอกซีไนไตรท์ ($ONOO^-$) รวมทั้งสารมลพิษได้แก่ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) และ คาร์บอนเตรตตะคลอ ไรด์ (CCl_4) ซึ่งจะถูกกำจัดออกจากร่างกายโดยการทำงานของเอ็นไซม์ ไซโทโครม P-450 ไฮดรอกซีเจส (cytochrome P-450 hydroxylase) ที่มีอยู่มากใน เซลล์ตับและพบได้บ้างในเซลล์ ปอดและลำไส้เล็ก ทำให้เป็นสาเหตุของการสร้างอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ภายในเซลล์ดังกล่าว

โอโซน โอโซนไม่ได้เป็นอนุมูลอิสระแต่จัดเป็น สารออกซิไดส์แรงสูงซึ่งสามารถเปลี่ยนรูปเป็นอนุมูลไฮดรอกซิลได้จากการกระตุ้นของคลื่นแสง

2.3 **สารต้านอนุมูลอิสระ** (Antioxidant)

คือ สารที่ทำหน้าที่ยับยั้ง ต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน หรือสารที่สามารถขจัดอนุมูลอิสระออกจากร่างกาย ระบบต้านออกซิเดชันในร่างกาย แบ่งได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ ได้แก่ ประเภทที่ป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระเช่น เอนไซม์ superoxide dismutase, glutathione peroxidase และ catalase เป็นต้น ส่วนอีกประเภทคือ ประเภทที่ทำลายปฏิกิริยาลูกโซ่ เช่น วิตามินอี, เบตาแคโรทีน และวิตามินซี เป็นต้น (Velloglu et al., 1998) สารต้านอนุมูลอิสระสามารถพบมากในผักและผลไม้ เช่น วิตามินอี (alpha-tocopherol) พบได้ในอัลมอนด์และน้ำมันต่างๆ เป็นต้น (Herrera and Barbas, 2001) เบตาแคโรทีนพบมากในอาหารที่มีสีส้ม เช่น มันฝรั่ง, แครอท และแคนตาลูป เป็นต้น (Borek, 1991)

2.3.1 **ประเภทของสารต้านอนุมูลอิสระ**

สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ primary หรือ natural antioxidants และ secondary or synthetic antioxidants

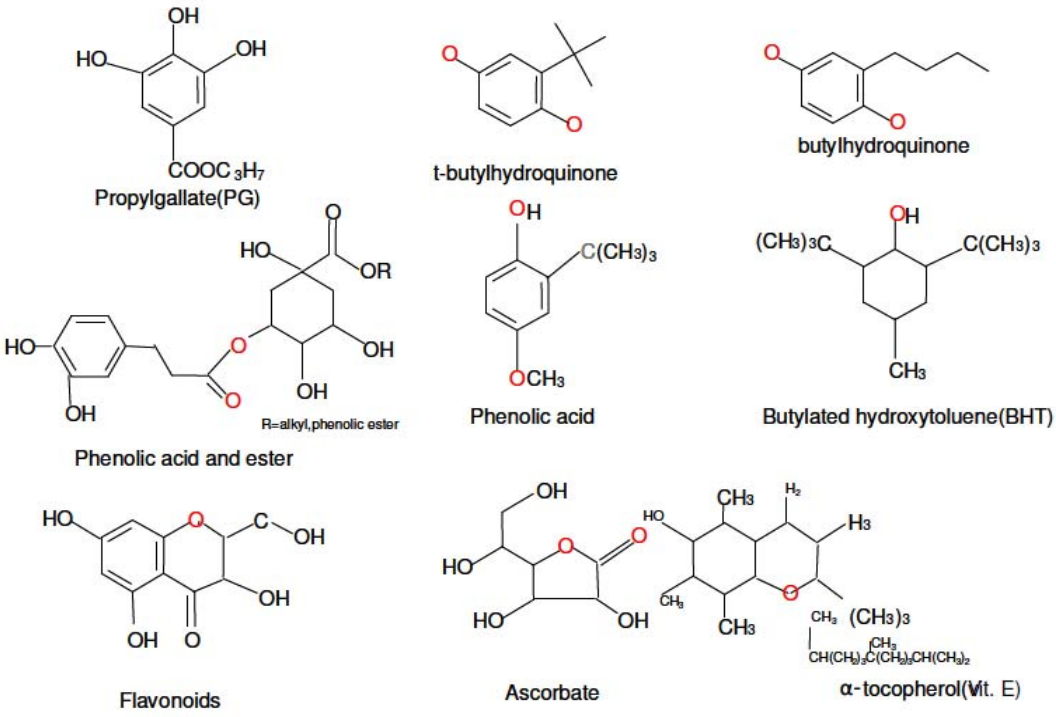
1. primary or natural antioxidants เป็นกลุ่มที่ทำหน้าที่ยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ โดยไปทำปฏิกิริยากับอนุมูลของไขมัน ให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความเสถียร สารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มนี้จะมีฟีโนลิก (phenolic) เป็นโครงสร้างหลัก (Hurrell, 2003) ซึ่งได้แก่

1.1 antioxidants minerals ทำหน้าที่เป็นโคแฟคเตอร์ (cofactor) ของเอนไซม์ที่ต้านการออกซิเดชัน โดยพบว่าไม่ส่งผลกระทบต่อโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น คาร์โบไฮเดรต ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มนี้ ได้แก่ selenium, copper, iron, zinc และ manganese

1.2 antioxidants vitamins มีความจำเป็นต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของร่างกาย ประกอบด้วย วิตามินซี วิตามินอี และวิตามินบี

1.3 phytochemicals เป็นสารประกอบฟีโนลิกที่ไม่ใช่ทั้งวิตามินและแร่ธาตุ

2. secondary or synthetic antioxidants เป็นสารประกอบฟีโนลิกที่ทำหน้าที่จับกับอนุมูลอิสระและหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ สารเหล่านั้นประกอบด้วย Butylated hydroxyl anisole (BHA), Butylated hydroxyrotoluene (BHT), Propyl gallate (PG), metal chelating agent (EDTA), Tertiary butyl hydroquinone (TBHQ) และ Nordihydro guaretic acid (NDGA)



ภาพที่ 2.11 โครงสร้างของสารต้านอนุมูลอิสระบางชนิด

(ที่มา: Hamid , 2010)

2.3.2 กลไกการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระ

สามารถแบ่งได้เป็น 3 ชนิด (Lobo et al., 2010) ดังนี้

1. ป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ (Preventive antioxidant)

โดยการเปลี่ยนอนุมูลอิสระให้อยู่ในรูปของโมเลกุลที่มีความเสถียรก่อนที่จะไปทำปฏิกิริยากับสารอื่น ช่วยกำจัดไอออนของเหล็ก และ ROS สารในกลุ่มนี้ ได้แก่ Glutathione peroxidase, Glutathione-s-transferase, Phospholipid hydroperoxide, Catalase (CAT), Superoxide dismutase (SOD)

2. ทำลายหรือยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น (Scavenging antioxidant)

เป็นการกำจัดอนุมูลอิสระหรือจับอนุมูลอิสระ เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ในขั้นตอน initiation และ propagation ซึ่งจะทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นอย่างไม่สิ้นสุด สารในกลุ่มนี้แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย กลุ่มแรก คือ hydrophilic เช่น Vitamin C, uric acid, bilirubin, albumin, และ thiols ส่วนกลุ่มที่สอง คือ ipophilic เช่น vitamin E และ ubiquinol

3. หยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระ (Chain breaking antioxidant)

เป็นการซ่อมแซมสารชีวโมเลกุลที่เกิดความเสียหาย สารในกลุ่มนี้คือ คือ proteolytic enzymes, proteinases, proteases, peptidases, glycol - sylases และ nucleases เป็นต้น

2.4 เอนไซม์ Superoxide dismutases (SOD)

SOD เป็นเมทัลโลเอนไซม์ (metalloenzyme) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการกำจัดหรือต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ superoxide anion (O_2 -) ซึ่งเป็นอนุมูลเริ่มแรกที่เกิดขึ้นจากเมแทบอลิซึมของเซลล์ที่มีการใช้ออกซิเจน และจากกระบวนการ respiratory burst ที่เกิดระหว่างการกำจัดสิ่งแปลกปลอมแบบ phagocytosis หรือ encapsulation ของเซลล์เม็ดเลือด (Holmblad and Söderhäll, 1999) โดย peroxinectin จะช่วยในการส่งเสริมให้มีการกำจัดสิ่งแปลกปลอม ซึ่งเอนไซม์ NADPH oxidase จะเปลี่ยนโมเลกุลของออกซิเจน (O_2) เป็นซุปเปอร์ออกไซด์แอนอิออน (superoxide anion) จากนั้น SOD จะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน superoxide anion ไปเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide, H_2O_2) โดย peroxinectin ซึ่งเป็นโปรตีน ที่ช่วยส่งเสริมกระบวนการ phagocytosis จะเปลี่ยน hydrogen peroxide ให้อยู่ในรูปของกรดไฮโปคลอรัส (hypochlorous acid, HOCl) เพื่อทำลายสิ่งแปลกปลอม (รพีพร ฤกษ์พุฒ และจินตนา สและน้อย, 2556) เอนไซม์ชนิดนี้สามารถพบได้ทั้งในพืชและสัตว์ โดยพบมากที่สมอง, ตับ, หัวใจ, เม็ดเลือดแดง และไต (Malmstrom et al., 1975)

2.4.1 กลไกการทำงานของเอนไซม์ SOD

กลไกการทำงานของเอนไซม์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ จะมีความสัมพันธ์กันเป็นห่วงโซ่ โดย SOD จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาระหว่าง superoxide anion กับน้ำ เปลี่ยนเป็น hydrogen peroxide และออกซิเจน จากนั้น hydrogen peroxide จะถูกกำจัดต่อโดยเอนไซม์แคตาเลส (catalase) และเพอร์รอกซิเดส (peroxidase) ดังสมการ

Superoxide dismutase: $2O_2^- + 2H \longrightarrow H_2O_2 + O_2$

Catalase: $2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$

Peroxidase: $H_2O_2 + AH_2 \longrightarrow 2H_2O + A$

2.4.2 การแบ่งกลุ่มของ SOD

ในมนุษย์พบได้ 3 ไอโซฟอร์ม คือ คอปเปอร์ซิงค์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (Cu/Zn-SOD, SOD 1), แมงกานีสซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (Mn-SOD, SOD 2) และเอ็กซ์ตราเซลลูลาร์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (extracellular SOD, SOD 3) (Sandstrom, 1994)

1. Cu/Zn SOD มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 32 kDa เป็นเอนไซม์ที่มีโครงสร้างแบบโฮโมไดเมอร์ (homodimer) ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย แต่ละหน่วยย่อยมีกลุ่มของโลหะ ได้แก่ คอปเปอร์และสังกะสี ที่บริเวณเร่งปฏิกิริยา เชื่อมโมเลกุลด้วยฮิสติดีน 61 (histidine 61) ถูกควบคุมการสร้างโดยยีน *CuZn-SOD* ซึ่งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 21 บริเวณตำแหน่ง 21q22 (Zelko et al., 2002) เอนไซม์ชนิดนี้มักพบในสิ่งมีชีวิตที่เป็น eukaryote เป็นส่วนใหญ่ แต่ก็สามารถพบได้ในแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Photobacterium leiognathi*, *Caulobacter crescentus* และ Pseudomonads Cu/Zn SOD ที่พบในเซลล์พืช สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกเป็นโฮโมไดเมอร์ (homodimer) พบอยู่ในไซโตพลาซึม (cytoplasm) และเพอริพลาซึม (periplasm) ส่วนกลุ่มที่สองเป็นโอโมเตตระเมอร์ (homotetramer)พบอยู่ในคลอโรพลาสต์ (chloroplast) และเอ็กซ์ตราเซลลูลาร์ (extracellular) (Bordo et al., 1994)

2. Mn SOD มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 96 kDa เป็นเอนไซม์ที่มีแมงกานีสเป็นโคแฟกเตอร์ ถูกควบคุมการสร้างโดยยีน *Mn-SOD* ซึ่งจากการศึกษาในเซลล์ลูกผสมของมนุษย์กับหนูเมาส์ (mouse/human hybrids) พบว่ายีนดังกล่าวอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 6 บริเวณตำแหน่ง 6q25 โดยเอนไซม์ชนิดนี้มีหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระภายในไมโตคอนเดรีย (Zelko et al., 2002) สามารถพบได้ทั้งสิ่งมีชีวิต prokaryote และ eukaryote โดยพบในไมโตคอนเดรีย และ peroxisomes มีโครงสร้างปฐมภูมิ, ทุติยภูมิ และตติยภูมิ คล้ายคลึงกับ Fe SOD (Fridovich, 1986) มีทั้งชนิดที่เป็นโฮโมไดเมอร์ และโฮโมเตตระเมอร์ เอนไซม์ชนิดนี้จะไม่ถูกยับยั้งโดย KCN (potassium cyanide) หรือถูก inactivate โดย H_2O_2 (Bowler et al., 1994) ในสาหร่ายสีเขียวและกลุ่มไซยาโนแบคทีเรีย จะพบเอนไซม์ชนิดนี้ได้ในบริเวณ thylakoid membrane (Kanematsu and Asada, 1979)

3. extracellular SOD มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 135 kDa เป็นเอนไซม์ที่มีโครงสร้างเป็นแบบเตตระเมอร์ ประกอบด้วยคอปเปอร์ สังกะสีและไกลโคโปรตีน (glycoprotein) เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะพบเฉพาะในกลุ่มสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ถูกควบคุมการสร้างโดยยีน *EC-SOD* ซึ่งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 4 บริเวณตำแหน่ง 4p-q21เอนไซม์ชนิดนี้เป็นเอนไซม์หลักที่ช่วยในการกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในช่องว่างของผนังหลอดเลือด (Zelko et al., 2002) โดยจะพบเอนไซม์ชนิดนี้อยู่ภายนอกเซลล์ บริเวณช่องว่างระหว่างเนื้อเยื่อและเมทริกซ์ที่อยู่ภายนอกเซลล์ และพบมากในพลาสมา น้ำเหลือง น้ำไขข้อและของเหลวภายในสมองและไขสันหลัง (Carlsson et al., 1995)

นอกจากนี้ยังมีไอออนซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (Fe SODs) ซึ่งไม่พบในมนุษย์ แต่ก็สามารถพบได้ทั้งในสิ่งมีชีวิตที่เป็น prokaryote และ eukaryote โดยใน eukaryote สามารถสกัดได้จาก *Euglena gracilis* (Kanematsu and Asada, 1979) เอนไซม์ชนิดนี้จะถูก inactivate โดย H_2O_2 และทนทานต่อการยับยั้งของโพแทสเซียมไซยาไนด์ (KCN) โดย Fe SOD สามารถแบ่งกลุ่มได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกเป็นโฮโมไดเมอร์ มีน้ำหนักโมเลกุล 20kDa ซึ่งสกัดได้จากแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Esterichia coli* (Yost and Fridovich, 1973) และกลุ่มที่สองเป็นเตตระเมอร์ มีน้ำหนักโมเลกุล 80-90 kDa ซึ่งพบในพืชชั้นสูง และสามารถสกัดจาก prokaryote ได้ เช่น *Mycobacterium tuberculosis* (Kusunose et al., 1976) และใน eukaryote คือ *Tetrahymena pyridornis* (Barro et al., 1990)

2.5 **บทความและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**

Phillip et al., 2010 ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับเสถียรภาพของวิตามินซีในผัก ผลไม้สดปั่นแช่แข็งเมื่อเก็บไว้เป็นระยะเวลา 1 ปี โดยทำการเลือกผักผลไม้ มา 3 ชนิด ประกอบด้วย collard greens (*Brassica oleracea* var. viridis), clementines (*Citrus clementina* hort. ex Tanaka), and potatoes (*Solanum tuberosum*) มาหั่นให้เป็นชิ้นประมาณ ชิ้นละ 2×2 มิลลิเมตร จากนั้นแช่ใน liquid nitrogen ปั่นให้ละเอียด centrifuge เก็บส่วนของ supernatant ไว้ในขวดสีชา ที่ -60 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีด้วยเครื่อง HPLC โดยทำการวิเคราะห์ 7 ช่วงเวลา คือ 0.5, 1, 2, 3, 4, 6,และ 12 เดือน ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ พบว่า ความเข้มข้นของตามินซีใน clementines ไม่มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 1 ปี ส่วนความเข้มข้นของวิตามินซีใน collard greens และ potatoes มีปริมาณที่ลดลง ตามลำดับเวลา กล่าวคือ เมื่อเก็บไว้ระยะเวลานานขึ้น จะทำให้ปริมาณวิตามินซีลดลง ซึ่งสังเกตได้จากกราฟของสารตัวอย่างเทียบกับกราฟของวิตามินซีมาตรฐาน

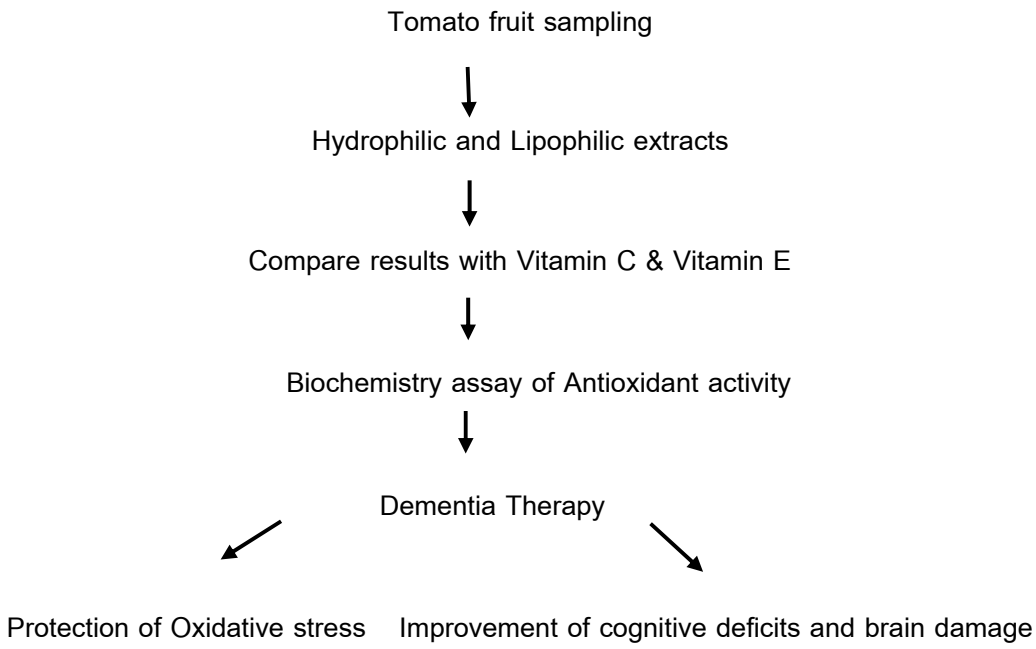
วีระ วีระกุล และวุฒิชัย ศรีวิกรานต์โยธิน, 2556 ได้ทำการศึกษาและรายงานว่า มะเขือเทศมีถิ่นกำเนิดในประเทศเปรูและเอกวาดอร์ มะเขือเทศจัดเป็นพืชผักที่มีความสำคัญในแง่อุตสาหกรรมและบริโภค เนื่องจากมีสารสำคัญที่มีคุณประโยชน์ต่อสุขภาพ เพราะในมะเขือเทศประกอบไปด้วยวิตามินหลายชนิด เช่น วิตามินเอ วิตามินซี และแร่ธาตุหลายชนิด ภายในมะเขือเทศยังประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระที่มีชื่อว่า ไลโคพีน ซึ่งช่วยลดอัตราการเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งหลายชนิด และยังช่วยให้สุขภาพผิวดีขึ้นอีกด้วย การทดลองเริ่มต้นจากการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินเอ วิตามินซีในมะเขือเทศ โดยในการหาปริมาณวิตามินเอ ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย และวิตามินซีใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย จากการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินเอ วิตามินซี โดยใช้เครื่องยูวีวิสสิเบิล สเปคโตรโฟโตมิเตอร์พบว่าวิตามินเอ และวิตามินซีในมะเขือเทศ1 กิโลกรัมเท่ากับ 0.148 กรัมและ 19.22 กรัม ตามลำดับ ส่วนการศึกษาตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารไลโคพีน โดยใช้ คลอโรฟอร์ม

เบนซีน และอะซีโตนเป็นตัวทำละลาย จากการวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC วิเคราะห์พบว่าตัวทำละลายที่สกัดไลโคพีนได้ดีที่สุดคือ อะซีโตน รองลงมาคือ คลอโรฟอร์ม และเบนซีน ตามลำดับ

จากข้อมูลพื้นฐานทางโภชนาการและประโยชน์ที่พบในมะเขือเทศ รวมทั้งผลงานวิจัยที่ศึกษาก่อนหน้านี้ ชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของคุณสมบัติองค์ประกอบต่างๆที่ดีต่อสุขภาพผู้บริโภค โดยเฉพาะอย่างยิ่งฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระ ซึ่งยังคงไม่มีข้อมูลการศึกษาที่ออกมาแน่ชัดทำให้มะเขือเทศสีดา มะเขือเทศราชินี และมะเขือเทศลูกใหญ่ซึ่งเป็นผลไม้ที่นิยมรับประทานสด ถูกเลือกมาทำการสกัดธรรมชาติ (Natural extracts) ในรูปแบบละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

กรอบแนวคิดในการวิจัย

การทำการวิจัยในครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาผลของสารสกัดมะเขือเทศที่มีฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระต่อการรักษาโรคความจำเสื่อม กลุ่มผู้วิจัยจะทำการสกัดผลมะเขือเทศราชินีสุกในรูปแบบสารสกัดที่ละลายน้ำ และตัวทำละลายที่สกัดสารละลายในไขมัน จากนั้นทดสอบการออกฤทธิ์ต่อการต้านสารอนุมูลอิสระประเภทที่เป็นเอนไซม์ อย่างน้อย 3 ชนิด ได้แก่ การวัดกิจกรรมเอนไซม์ SOD, Glutathione peroxidase และ Catalase ของสารสกัดที่ได้ ทดสอบผลของสารสกัดต่อการยับยั้งสารอนุมูลอิสระในเซลล์สมอง/เซลล์ประสาทที่เพาะเลี้ยงในห้องทดลอง ฤทธิ์ในการป้องกันการตายของเซลล์ โดยการย้อมเซลล์ด้วยสี Trypan blue และทดสอบ MTT จากนั้นทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเมื่อประยุกต์ในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้สมองเสื่อมจากการผูกหลอดเลือดคอมมอนคาโรติดทั้งสองข้างต่อพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำ และศึกษาผลการทำงานของเอนไซม์ในเลือด เซลล์ และเนื้อเยื่อที่เปลี่ยนแปลงไป เปรียบเทียบกับวิตามินซีและอี ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเช่นเดียวกัน



รูปที่ 2.12 แผนภาพโดยรวมของการดำเนินการวิจัย

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การสุ่มกลุ่มตัวอย่าง

มะเขือเทศราชินี

ผลมะเขือเทศราชินีสดที่ใช้ในการทดลอง ซื้อจาก Top supermarket และจากรถขายผลไม้ของนางบังอร จ.ชลบุรี ในช่วงเดือนพฤศจิกายน ถึง มกราคม พ.ศ. 2556 ที่ผ่านการตรวจสอบสารกลุ่ม Organophosphate รับรองผลิตภัณฑ์ปราศจากยาฆ่าแมลงสารตกค้าง

ผลมะเขือเทศราชินีสดที่ใช้ในการทดลอง ซื้อจากร้าน รักผัก อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี ในช่วงเดือนตุลาคม ถึง พฤศจิกายน พ.ศ. 2557 ที่ผ่านการตรวจสอบสารกลุ่ม Organophosphate รับรองผลิตภัณฑ์ปราศจากยาฆ่าแมลงสารตกค้าง

เครื่องมือในการวิจัยและการตรวจสอบคุณภาพเครื่องมือ

1) ชุดสกัดสาร
   - โกร่งบด (Motar w/spout และ pestle 'porcelain'dia.130mm)
   - บีกเกอร์
   - ฟอร์ย
   - เครื่อง magnetic sterling
2) ชุดกรองสาร
   - ผ้าขาวบาง
   - กรวยกรอง
   - กระดาษกรอง (Whatmam®เบอร์ 1 UK)
   - ชุดทดสอบยาฆ่าแมลง: ชุดน้ำยาตรวจสอบสารพิษตกค้าง GT KIT, กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
3) หลอดทดลอง, Pyrex
4) เครื่องชั่ง, Satorius
5) Incubator
6) Shaker Incubator
7) UV / Vis Spectrophotometer (Genesys 10s UV-Vis)

สารเคมี

1) เอทานอล (Analytical grade, Carlo)
2) น้ำปราศจากเชื้อ
3) วิตามินซีบริสุทธิ์ (Sigma-Aldrich)
4) β-carotene (Sigma-Aldrich)
5) SOD assay kit (Sigma-Aldrich)
6) Hydrogen peroxide

วิธีการทดลอง

1) การสกัดสารจากมะเขือเทศ

ผลมะเขือเทศสุกที่จะทำการทดลองต้องผ่านการทดสอบความปลอดภัยจากยาฆ่าแมลง โดยใช้ชุดทดสอบหายาฆ่าแมลงในผักและผลไม้ TM kit ในการตรวจสอบและยืนยันผล (วิธีการทดลองดังในภาคผนวก การตรวจหายาฆ่าแมลงในมะเขือเทศ) ล้างด้วยน้ำด่างทับทิม เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วยน้ำเปล่า เป็นเวลา 2 นาที ก่อนทำการสกัดด้วยวิธีต่างๆ

การสกัดสารจากมะเขือเทศด้วยน้ำปราศจากเชื้อ

นำผลมะเขือเทศสุก สด มาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆให้มีขนาดประมาณชิ้นละ 5 X 5 มิลลิเมตร ชั่งน้ำหนัก 20 กรัม ใส่ลงไปในบีกเกอร์ เติมน้ำปราศจากเชื้อ 0.4 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นของสารสกัด 50 กรัมน้ำหนักสดต่อมิลลิลิตร) ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นบดมะเขือเทศด้วยโกร่งให้ละเอียด กรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อเอากากออก และกรองสารสกัดที่ได้ด้วยกระดาษกรอง Whatman ®เบอร์4 เก็บตัวอย่างที่จะทดสอบไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส

การสกัดสารจากมะเขือเทศด้วยเอทานอล

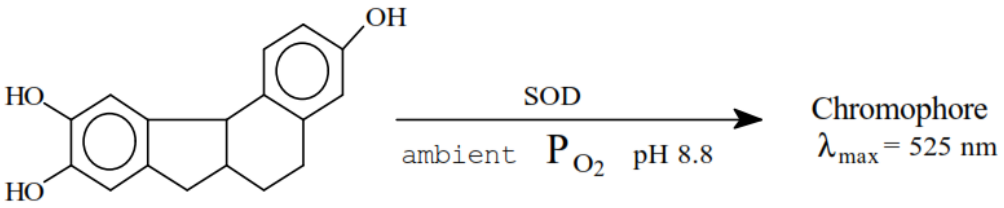
นำผลมะเขือเทศสุก สด มาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆให้มีขนาดประมาณชิ้นละ 5X5 มิลลิเมตร ชั่งน้ำหนัก 20 กรัม ใส่ลงไปในบีกเกอร์ เติมเอทานอล 12 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นของสารสกัด 1.67กรัมน้ำหนักสดต่อมิลลิลิตร) คนสารให้เข้ากันด้วยเครื่อง magnetic sterling เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อเอากากออก และกรองสารสกัดที่ได้ด้วยกระดาษกรอง Whatman ® เบอร์4 เก็บตัวอย่างที่จะทดสอบไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

2) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

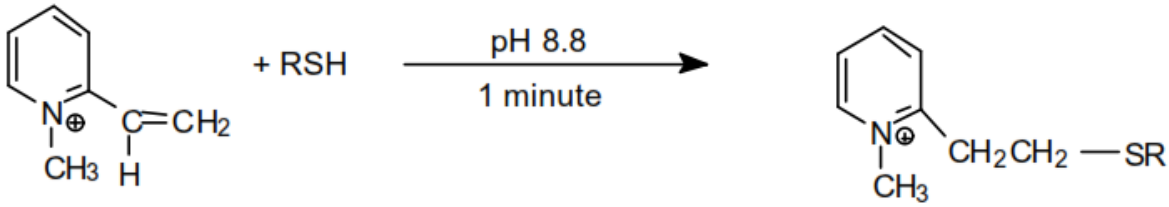
ทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ชนิดต่างๆดังนี้ คือ Superoxide dismutase โดยวัดผ่านเครื่องสเปกโตรโฟโตรมีเตอร์ และหาค่าความเข้มข้นของโปรตีนโดยการใช้ Bradford method เทียบกับ BSA standard

1 Superoxide Dismutase (SOD) assay (Beyer *et al,* 1991; Nebot *et al,* 1993)

ทำการสังเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ SOD โดยวัดอัตราการเกิด autoxidation ของสาร 5,6,6a,11b-tetrahydro-3,9,10-trihydroxybenzo[c]fluorine:R1 ในสารละลาย alkaline solution ได้ผลิตภัณฑ์เป็น chromophore ที่สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดที่ 525 nm ดังภาพ



การรบกวนของ Mercaptans (RSH) เช่น reduced glutathione สามารถควบคุมได้โดย pretreat สารตัวอย่างด้วย 1-methyl-2-vinylpyridinium R2 ซึ่งสามารถกำจัด mercaptans จากปฏิกิริยาที่เป็นด่าง alkylation



วัดค่าดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่เปลี่ยนไป คำนวณค่า kinetic measurement เป็น Unit enzyme ค่า SOD activity คำนวณจากค่า Vs/Vc ratio ของอัตราการเกิด autoxidation ของสารสกัด (Vs) เทียบกับสารละลายที่ไม่มี SOD (Vc) จากสารประกอบเชิงโมเลกุลชนิดต่างๆของ SOD เช่น Cu/Zn-SOD, Mn-SOD และ Fe-SOD

ในการทดสอบครั้งนี้เป็นวิธีการตรวจหาระดับของอนุมูลอิสระทางอ้อม ด้วยวิธีทำให้เกิดสี (colorimetric method) โดยใช้สาร nitroblue tetrazolium (NBT) หลักการของวิธีนี้ คือ เอนไซม์ xanthine oxidase จะเป็นตัวปลดปล่อยอนุมูลอิสระ superoxide anion ออกมา และเกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์ SOD จากนั้น superoxide anion จะเกิดปฏิกิริยารีดักชันกับเกลือ tetrazolium ได้ผลิตภัณฑ์เป็น formazan ซึ่งเป็นสารที่มีสี ตรวจวัดสีที่เกิดขึ้น โดยใช้ชุดทดสอบมาตรฐาน 19160 SOD Determination Kit (Sigma-aldrich)

เริ่มต้นโดยการตัวอย่าง ตัวอย่างละ 20 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของ microplate ใส่ pool ซีรั่มของตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในหลุมของ Blank 2 และใส่ ddH_2O ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในหลุมของ Blank 1 และ Blank 3 จากนั้นเติม WST working solution ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุม แล้วเติม Dilution Buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในหลุม Blank 2 และ Blank 3 สุดท้ายเติม Enzyme Working Solution ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในหลุมของซีรั่มตัวอย่าง และ Blank 1 แล้วผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง VersaMax ELISA Microplate reader แล้วนำมาคำนวณหาฤทธิ์ของการต้านออกซิเดชัน ตามสมการดังนี้

$$\text{SOD activity (inhibition rate\%)} = \frac{(Ablank\,1 - Ablank\,3) - (Asample - Ablank\,2)}{(Ablank\,1 - Ablank\,3)} \times 100$$

2. Glutathione Peroxidase (GPx) assay (Paglia, *et al.,* 1967**)**

เป็นการวัดการทำงานของเอนไซม์ Glutathione Peroxidase ที่ catalyze H_2O_2 ในปฏิกิริยาควบคู่ (Couple reaction) ระหว่าง Glutathione reductase (GR) และ oxidized Glutathione (GSSG) โดยการใช้เอนไซม์ GPx ผ่านกระบวนการ Oxidation-reduction ของ NADPH ซึ่งเป็นผลให้ค่าดูดกลืนแสงลดลง ที่ความยาวคลื่น 340 nm ดังสมการ

$$R\text{-}O\text{-}O\text{-}H + 2GSH \xrightarrow{GPx} R\text{-}O\text{-}H + GSSG + H_2O$$

$$GSSG + 2NADPH + H^+ \xrightarrow{GR} 2GSH + NADP^+$$

3 Catalase (CAT) assay (Aebi, 1984)

เป็นการทดสอบความสามารถในการออกซิไดส์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ H_2O_2 ให้ได้น้ำ H_2O และออกซิเจน O_2 ดังสมการ

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} 2H_2O + O_2$$

โดยการใช้สารตั้งต้น 10 mM H_2O_2 ตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็ง วัดค่าดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปที่ความยาวคลื่น 240 nm (t0) จนครบ 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (t3min) กำหนดให้ CAT activity มีค่า extinction coefficient เท่ากับ 39.4 mM-1cm-1 **ที่** 240 nm เป็นเวลา 3 min (Aebi, 1984) ซึ่งสามารถพัฒนาเป็นการวัดผลของสีที่เกิดขึ้นแบบ coloric methods โดยการใช้ 4-Amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole ที่เป็น chromogen ให้สาร purpald ที่ถูก oxidize ได้ด้วย potassium periodate ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm

3) การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระและการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ (Mesenchymal stem cells, MSCs)

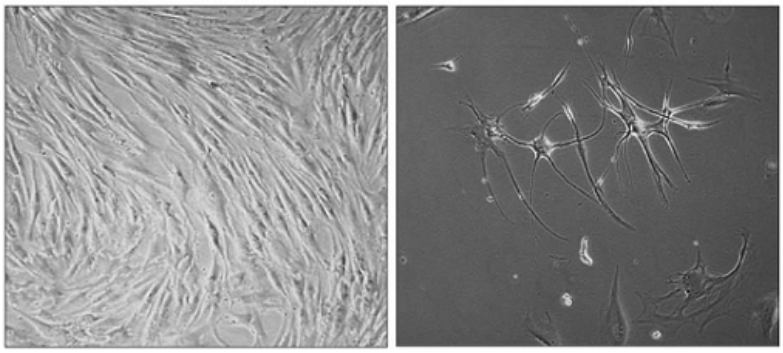
การศึกษาครั้งนี้จะใช้เซลล์ประสาทที่ได้จากการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิด MSCs ที่แยกได้จากไขกระดูกให้พัฒนาเป็นเซลล์ประสาท (neuron) ซึ่งศาสตร์นี้กำลังเป็นที่สนใจของนักวิจัยทั่วโลกในการนำมาประยุกต์ใช้รักษาโรคที่เกิดจากความเสื่อมของเซลล์ประสาทหรือนำมาใช้เป็นเซลล์ต้นแบบ (model) ในการศึกษาชีววิทยาของเซลล์ประสาท โดยเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด MSCs ใน flask T75 ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM, 10% fetal bovine serum (FBS), 2mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin เลี้ยงเซลล์ที่ 37°C, 5% CO_2 เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ ทุกๆ 2-3 วัน เป็นระยะเวลาประมาณ 1 เดือน เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ให้มากพอในการทำการทดลอง

2. การเหนี่ยวนำ MSCs เป็นเซลล์ประสาท (Cell culture and neuronal differentiation)

เมื่อเพิ่มจำนวนเซลล์มากพอ ทำการ trypsinized เซลล์ โดยใช้ trypsin-EDTA และเลี้ยงเซลล์จำนวนประมาณ$1x10^3$ cells/cm^2 ใน 6-well plate ที่เคลือบด้วยสาร laminin จากนั้นเติม Neuronal medium ซึ่งมี 1 mM β-mercaptoethanol (BME), 10% FBS, 10 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF), 2% dimethylsulfoxide (DMSO) และ 200 mM butylated hydroxyanisole (BHA) ในการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดเป็นเซลล์ประสาท เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ ทุกๆ 2-3 วัน จนครบ 5 วัน

2.1 การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์ประสาทภายใต้กล้องจุลทรรศน์

สังเกตดูการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทุก ๆ 24 ชม. หลังการเหนี่ยวนำ โดยเซลล์ประสาทจะมีส่วนของ Cytoplasm หดแคบเข้า แต่มีส่วนของ protoplasm ยื่นออกไปจากตัวเซลล์เป็นจำนวนมาก เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้เหนี่ยวนำ (control cell หรือ non-induced cells) ซึ่งจะมีลักษณะยาวรีคล้ายกระสวย (spindle shape)



รูปที่ 3.1 ลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ (MSCs) เปรียบเทียบกับเซลล์ประสาท (neuron)

2.2 Semi-quantitative RT-PCR

Semi-quantitative RT-PCR ตรวจสอบการแสดงออกของจีนจำเพาะกับเซลล์ประสาท (neuronal marker genes) หลังการเหนี่ยวนำ 5 วัน เปรียบเทียบกับ control cell โดยสกัด RNA จากเซลล์ประสาทที่เหนี่ยวนำครบ 5 วัน และเปลี่ยน RNA เป็น cDNA เพื่อทำ semi-quantitative RT-PCR ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้ GAPDH เป็น control ในการเปรียบเทียบความเข้มของจีนจำเพาะกับเซลล์ประสาท โดยในการศึกษาครั้งนี้จะตรวจสอบการแสดงออกของจีนจำเพาะต่อเซลล์ประสาท (neural marker genes) 4 ชนิด โดยจีนแต่ละชนิดมีหน้าที่ดังนี้

1. **Neurogenin (NGNs)** เป็น transcript factor ที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมกระบวนการถอดรหัสในการพัฒนาของเนื้อเยื่อประสาท (neurogenesis) จะพบการแสดงออกของจีนนี้ในระหว่างที่มีการสร้างระบบประสาท

2. **Nuclear receptor related 1 protein (Nurr)** เป็น transcript factor ที่มีบทบาทสำคัญในการป้องกันการอักเสบของเซลล์ประสาทและคงสภาพของ dopamine ให้อยู่ในภาวะปกติพบการแสดงออกของNurrในระหว่างการพัฒนาของระบบประสาทส่วนกลาง (Central nervous system)

3. Nestin เป็นintermediate filament ที่สำคัญในระบบประสาทพบการแสดงออกของจีนนี้ในเซลล์ของระบบประสาทส่วนกลาง (Central nervous system) และระบบประสาทส่วนปลาย (peripheral nervous system)

4. β-Tubulin III เป็นโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของไมโครทูบูล (microtubule) ของเซลล์ประสาท

การตรวจสอบการแสดงออกของจีน *NGN, Nurr, Nestin* และ*Tubulin* จะเปรียบเทียบกันระหว่าง Control cells กับ Induced cells และใช้จีน glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase *(GAPDH)* เป็นจีนควบคุมหรือ housekeeping gene โดยจะสกัด RNA จาก Induced cellsและ control cellsจากนั้นทำการสังเคราะห์ cDNA และตรวจสอบการแสดงออกของ neuron marker genes ด้วยเทคนิค Semi quantitative RT-PCRโดยใช้ primer ดัง**ตารางที่** 1

ตารางที่ 3.1 ลำดับเบสของ primer ที่ใช้ในการศึกษา

Primer	Sequences	Primer length	Size (bp)
NGN	Forward: 5' - AGT GAC CTA TCC GGC TTC CT - 3'	20 bp	368
	Reverse: 5' - TCA AGT TGT GCA TGC GGT TG - 3'	20 bp	
Nurr	Forward: 5' - TTC CAC CAG AAC TAC GTG GC - 3'	20 bp	419
	Reverse: 5' - ACT GTG CGC TTA AAG AAG CC - 3'	20 bp	
β-tubulin III	Forward: 5' - ACC TAC TGC ATC GAC AAC GA - 3'	20 bp	383
	Reverse: 5' - ACC TCC TTC ATG GAC ATG CG - 3'	20 bp	
Nestin	Forward: 5' AAA GAG GGT TCA GGG CTT GG - 3'	20 bp	216
	Reverse: 5' CAA GGT GAA GGG GCA TCA CT - 3'	20 bp	
GAPDH	Forward: 5' - GAG AAG GCT GGG GCT CAT TT - 3'	20 bp	231
	Reverse: 5' - AGT GAT GGC ATG GAC TGT GG - 3'	20 bp	

2.3 Hematoxylin staining เพื่อให้การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ต้นกำเนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ให้ชัดเจนยิ่งขึ้น โดยทำการย้อม Hematoxylin ในเซลล์ต้นกำเนิดที่เลี้ยงในอาหารที่เติม neuronal medium เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์ด้วย PBS และ fixed เซลล์ด้วย 10% neutral buffer formalin 20 นาที จากนั้นล้างเซลล์อีกครั้งด้วย PBS และเติม Hematoxylin ให้ท่วมเซลล์เป็นระยะเวลา 30 นาที ล้างเซลล์ด้วย PBS อีกครั้งก่อนส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

3. การชักนำเซลล์ประสาทให้เกิดภาวะ oxidative stress ด้วยสาร hydrogen peroxide (H_2O_2)

การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ H_2O_2 ในการชักนำการตายของเซลล์ประสาททำได้โดยนำเซลล์ต้นกำเนิดจำนวน $1x10^3$ cell/well มาเพาะเลี้ยงใน 96-well plate และเหนี่ยวนำเป็นเซลล์ประสาทโดยเติม neural medium ลงไป 100 ul/well เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมทิ้งไป แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี H_2O_2 ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 30, 60, 100 และ 200 μM (Xin *et al*., 2001) เป็นระยะเวลา 24ชั่วโมง โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ (n = 3) เมื่อครบเวลา ทำการวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดด้วยวิธี Sulforhodamine B (SRB Assay) การทดสอบทำโดย fix เซลล์ที่มีชีวิตด้วย 40% trichloroacetic acid (TCA) และย้อมด้วย SRB ซึ่งเป็น aminoxanthene dye สามารถจับกับ basic amino acid ของโปรตีนภายในเซลล์ที่รอดชีวิตได้ ความเข้มข้นของสี SRB ที่วัดด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ช่วงความยาวคลื่น 570 nm แสดงถึงจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดซึ่งวิธีนี้สามารถลดการรบกวนค่าดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่อาจเกิดจากสีของสารสกัดได้

การคำนวณหา % cell viability

$$\% \text{ cell viability} = \frac{\text{Absorbance of treated cell x 100}}{\text{Absorbance of control cell}}$$

4 การทดสอบ Sulforhodamine B colorimetric (SRB) assay เพื่อวัดความเป็นพิษของสาร H_2O_2 ต่อเซลล์

นำเซลล์ที่ผ่านการชักนำให้เกิดภาวะ oxidative stress มาย้อมสี SRB เพื่อดูการตายของเซลล์เพาะเลี้ยง หลังจากบ่มเซลล์เพาะเลี้ยงใน 96 well plates เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำ 96 well plates ออกมาจากตู้ CO_2 incubator เติม 10 % TCA ปริมาตร 100 ul ในแต่ละหลุม โดยไม่ต้องทิ้ง supernatant ทำการห่อด้วยกระดาษฟอยด์แล้วไปบ่มที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 ชม. เมื่อครบเวลาล้าง 96 well plates ด้วยน้ำประปา 3 ครั้ง เช็ดน้ำส่วนเกินแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องรอให้แห้ง เมื่อ 96 well plates แห้ง นำมาเติม SRB solution ปริมาตร 100 ul ห่อกระดาษฟอยด์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำมาล้างด้วย 1% acetic acid ทันที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำมาล้างด้วย 1% acetic acid ทันที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องรอให้แห้ง เมื่อ 96 well plates แห้ง นำมาเติม 10 mM TBS ปริมาตร 200 ul ดูดขึ้นลงให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ช่วงความยาวคลื่น 570 nm (ทำการทดลอง 3 ครั้ง)

5. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดมะเขือเทศในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาท

นำเซลล์ต้นกำเนิด MSCs จำนวน $1x10^3$ cell/well มาเพาะเลี้ยงใน 96-well plate และเหนี่ยวนำเป็นเซลล์ประสาทโดยเติม neural medium ลงไป 100 ml/well เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมทิ้งไป แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดแต่ละความเข้มข้น (ตารางที่ 2) ลงในแต่ละหลุม (n = 3) เลี้ยงเซลล์ที่ 37°C, 5% CO_2เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเมื่อครบเวลา ถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมทิ้งไป แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี H_2O_2 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อชักนำการตายของเซลล์ประสาท โดยบ่มเซลล์ที่ 37°C 5% CO_2เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ล้างเซลล์ด้วย PBS เพื่อทำ SRB assay เพื่อวัดค่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่

ฤทธิ์ของสารสกัดในการป้องกันการตายของเซลล์นี้จะถูกเปรียบเทียบผลกับการเติมวิตามินซี (Vitamin C) และวิตามินเอ (Vitamin A) ความเข้มข้น 25 และ 50 mg/ml เพื่อดูว่าสารสกัดที่ได้จากมะเขือเทศมีคุณสมบัติป้องกันการตายของเซลล์จากภาวะ oxidative stress ที่ชักนำโดย H_2O_2 เทียบเท่าหรือดีกว่าสารมาตรฐาน

ตารางที่ 3.2 ค่าความเข้มข้นของสารสกัดมะเขือเทศชนิดต่างๆ ที่ใช้ทำการทดสอบ

ชนิดของสารสกัด	**ความเข้มข้นสุดท้ายที่ใช้ทำการทดสอบ** (mg/ml)
มะเขือเทศสีดา (ใช้น้ำสกัด)	125 และ 250
มะเขือเทศสีดา (ใช้ ethanol สกัด)	180 และ 370
มะเขือเทศราชินี (ใช้น้ำสกัด)	125 และ 250
มะเขือเทศราชินี (ใช้ ethanol สกัด)	180 และ 370
Vitamin C	25 และ 50
Vitamin A	25 และ 50

4) การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดมะเขือเทศต่อการรักษาภาวะความจำเสื่อมในหนูทดลอง

ใช้หนูขาวถีบจักรเพศผู้พันธุ์ ICR หนัก 15-20 กรัม ให้อยู่ใน light/dark cycle 23°C และให้กินอาหารและน้ำตามปกติเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นทำการสลบหนูด้วย pentobarbital-sodium 50 mg/kg ผ่าตัดตามแนวกลาง cervical แล้วแบ่งหนูออกเป็น 2 กลุ่ม

โดยกลุ่มที่ 1 ผูกเส้นเลือด common carotid artery ทั้งสองเส้น (หนู 2VO) เพื่อจำลองภาวการณ์ไหลเวียนเลือดในสมองต่ำ (Farkas *et al*., 2007) กลุ่มที่ 2 ไม่ได้ผูกเส้นเลือด (หนู Sham) จากนั้น 8 สัปดาห์หลังการผ่าตัด ทดสอบ Morris water maze test ต่อเนื่องกัน 5 วัน และทดสอบ probe test ในวันที่ 5 หลังจากนั้นแบ่งหนู 2VO ออกเป็น 4 กลุ่มย่อย โดยกลุ่มที่ 1 ได้รับ saline (2VO+ saline), กลุ่มที่ 2 ได้รับ vitamin C หรือ vitamin E 10-20 mg/kg กลุ่มที่ 3 และ 4 ได้รับสารสกัดจากมะเขือเทศที่ละลายในตัวทำละลายที่ความเข้มข้นต่างๆกัน ประมาณ 10 และ 20 mg/kg ตามลำดับ และกลุ่มที่ 5 เป็นหนู sham และได้รับ saline โดยทำการป้อนสารให้หนูขาวทุกๆวันต่อเนื่องกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วทำการทดสอบ Morris water maze test อีกครั้งในวันที่ 85-90 เพื่อทดสอบผลของสารสกัดมะเขือเทศต่อความสามารถในการเรียนรู้จดจำ (Farkas *et al*., 2007) จากนั้นเจาะเลือดแบบ cardiac puncture จากหนูทดลองมาทดสอบทาง Biochemical assay นำหนูมาสลบแล้วผ่าสมองส่วน cortex และ hippocampus ออกมาแช่ในน้ำแข็ง ใส่ 10%ice-cold saline แล้ววิเคราะห์ระดับ SOD, Px และ Catalase ของเนื้อเยื่อสมองของหนูที่ได้รับสารสกัดมะเขือเทศ เทียบกับหนูที่ได้รับวิตามินซีหรือวิตามินอี

4.1 การทดสอบพฤติกรรมความสามารถในการเรียนรู้และจดจำ ด้วย Morris water maze test

การทดสอบ Morris water maze test จะใช้ภาชนะทึบทรงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 cm ลึก 20 cm ใส่น้ำลึกประมาณ 15 cm และมี platform แบ่งพื้นที่ภาชนะออกเป็น 4 quadrant เท่าๆกัน วาง platform อยู่ใต้น้ำอย่างน้อย 3-5 cm.อยู่ใน quadrant ใด quadrant หนึ่ง เริ่มทดลองโดยวางให้หนูอยู่บน platform 20 วินาที ในครั้งแรก จากนั้นค่อยๆปล่อยหนูลงในน้ำ ให้ว่ายอย่างอิสระจนกระทั่งหนูหา platform เจอและปีนขึ้นไปหยุดอยู่บน platform และบันทึกเวลาที่หนูใช้ในการหา platform โดยหนูแต่ละตัวจะถูกทดสอบ 2 ครั้ง/วัน ต่อเนื่องกันเป็นเวลา 5 วัน

4.2 การทดสอบพฤติกรรมความสามารถในการเรียนรู้และจดจำ ด้วย Probe test

การทดสอบ Probe test จะทำในวันสุดท้ายของการทดลอง เพื่อทดสอบความสามารถในการเรียนรู้และจดจำ โดยการนำเอา platform ออกไปจากภาชนะ และทดสอบให้หนูว่ายน้ำในภาชนะนั้น เป็นเวลา 1 นาที สังเกตและจับเวลาที่หนูว่ายวนอยู่ในตำแหน่งที่เคยมี platform

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ผลการตรวจสอบความปลอดภัยการสกัดสารจากมะเขือเทศ

ผลการทดสอบยาฆ่าแมลงในมะเขือเทศราชินี โดยใช้ชุดทดสอบหายาฆ่าแมลงในผักและผลไม้ในการยืนยันผลการตรวจสอบ พบว่ามะเขือเทศที่นำมาทำการทดลองมีความปลอดภัยปราศจากยาฆ่าแมลงของสารกลุ่ม Organophosphate

ผลมะเขือเทศสุกที่ผ่านการทดสอบความปลอดภัยจากยาฆ่าแมลงจะถูกนำมาสกัดด้วยน้ำปราศจากเชื้อและเอทานอลได้สารสกัดที่มีลักษณะเป็นของเหลวใสและมีสีเหลืองใส ตามลำดับ

4.2 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีในสารสกัดจากมะเขือเทศ

จากการคำนวณวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีในสารสกัดมะเขือเทศราชินี, มะเขือเทศสีดา และมะเขือเทศลูกใหญ่ที่สกัดด้วยน้ำมีค่าความเข้มข้นที่ 316,181 และ 195 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเทียบกับความเข้มข้นของสารละลายวิตามินซีบริสุทธิ์มาตรฐาน

จากการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีในสารสกัดมะเขือเทศราชินี, มะเขือเทศสีดา และมะเขือเทศลูกใหญ่ที่สกัดด้วยเอทานอลมีค่าความเข้มข้นที่ 396 ,284 และ 295 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เทียบกับความเข้มข้นของวิตามินซีบริสุทธิ์มาตรฐาน

ตารางที่ 4-1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดมะเขือเทศชนิดต่างๆที่ความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสงได้สูงสุดเท่ากับ 245 นาโนเมตร

ประเภทของการสกัด	**ชนิดของสารสกัดมะเขือเทศ**	**ค่า Absorbance ที่ 245 นาโนเมตร**				**ความเข้มข้น (mg / ml)**
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	
สกัดด้วยน้ำ	มะเขือเทศราชินี	0.677	0.631	0.571	0.626	316.00
	มะเขือเทศสีดา	0.395	0.357	0.322	0.358	180.72
	มะเขือเทศลูกใหญ่	0.357	0.400	0.395	0.387	195.36
สกัดด้วยเอทานอล	มะเขือเทศราชินี	0.734	0.804	0.817	0.785	396.26
	มะเขือเทศสีดา	0.512	0.595	0.582	0.563	284.20
	มะเขือเทศลูกใหญ่	0.588	0.645	0.524	0.585	295.31

หมายเหตุ ผลการวัดจากการเจือจางสาร 10 เท่า (dilution factor = 10)

4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

4.3.1 ผลการทดลองฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี SOD

ทำการสังเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ SOD โดยวัดอัตราการเกิด autoxidation ของสาร 5,6,6a,11b-tetrahydro-3,9,10-trihydroxybenzo[c]fluorine:R1 ในสารละลาย alkaline solution ได้ผลิตภัณฑ์เป็น chromophore ที่สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดที่ 525 nm ได้ผลดังตาราง

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี SOD ของสารสกัดมะเขือเทศ

ชนิดของสารสกัด	A_{blank}	$A_{sample\ 20\ min}$	ΔA450	SOD activity (% inhibition rate)
สีดา (et)	0.474	0.616	0.142	29.96
สีดา (น้ำ)	0.391	0.500	0.109	27.88
ราชินี (et)	0.378	0.595	0.217	57.41
ราชินี (น้ำ)	0.425	0.564	0.139	32.71
ใหญ่ (et)	0.459	0.656	0.197	42.92
ใหญ่ (น้ำ)	0.610	0.730	0.120	19.67

4.3.2 ผลการทดลองฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Peroxidase

วัดการทำงานของเอนไซม์ Glutathione Peroxidase ที่ catalyze H_2O_2 ในปฏิกิริยาควบคู่ (Couple reaction) ระหว่าง Glutathione reductase (GR) และ oxidized Glutathione (GSSG) โดยการใช้เอนไซม์ GPx ผ่านกระบวนการ Oxidation-reduction ของ NADPH ซึ่งเป็นผลให้ค่าดูดกลืนแสงลดลง ที่ความยาวคลื่น 340 nm (เมื่อกำหนดให้ molar absorptivity of NADH ที่ 340 nm = 6.22×10^3 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$)

ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Peroxidase ของสารสกัดมะเขือเทศ

ชนิดของสารสกัด	0 min	3 min	Δ A	c = A/εb (mol/L)	GPx activity (μmol/L)
ราชินี (et)	1.057	0.477	0.58	0.0000932	9.32
ราชินี (น้ำ)	1.074	0.536	0.538	0.0000865	8.65

4.3.2 **ผลการทดลองฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี** Catalase

ใช้สารตั้งต้น 10 mM H_2O_2 ตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็ง วัดค่าดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปที่ความยาวคลื่น 240 nm (t0) จนครบ 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (t3min) กำหนดให้ CAT activity มีค่า extinction coefficient เท่ากับ 39.4 mM-1cm-1 **ที่** 240 nm เป็นเวลา 3 min (Aebi, 1984) ซึ่งสามารถพัฒนาเป็นการวัดผลของสีที่เกิดขึ้นแบบ coloric methods โดยการใช้ 4-Amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole ที่เป็น chromogen ให้สาร purpald ที่ถูก oxidize ได้ด้วย potassium periodate ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm ได้ผลดังตาราง

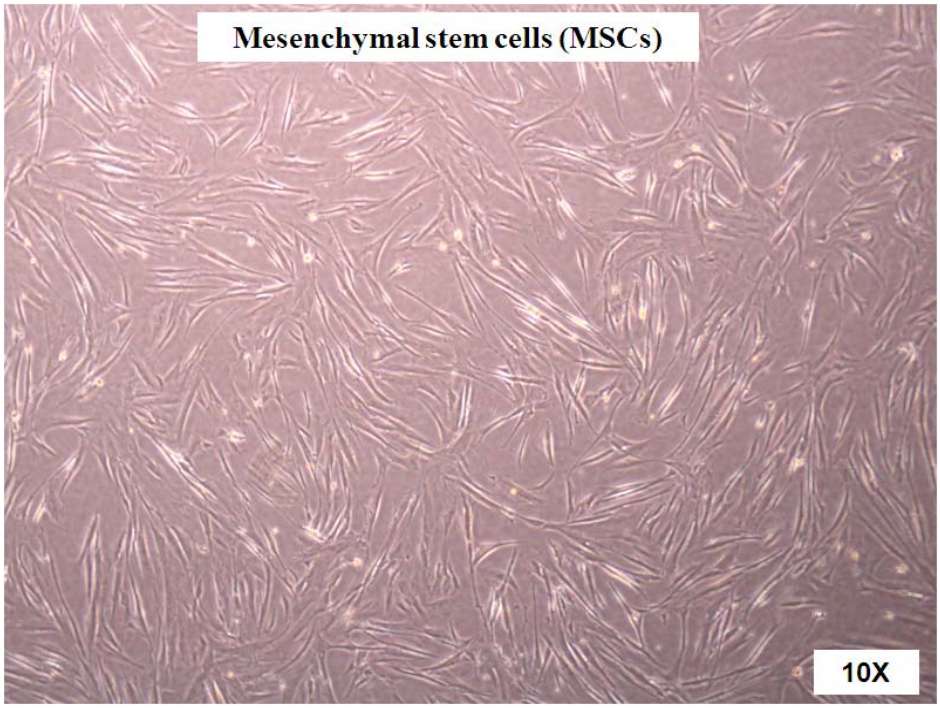
ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Catalase ของสารสกัดมะเขือเทศ

ชนิดของสารสกัด	0 min	3 min	Δ A	c = A/εb (mM)	CAT activity (M)
สีดา (et)	1.861	0.784	1.077	0.03	27.34
สีดา (น้ำ)	1.728	0.769	0.959	0.02	24.34
ราชินี (et)	1.969	0.754	1.215	0.03	30.84
ราชินี (น้ำ)	1.617	0.468	1.149	0.03	29.16
ใหญ่ (et)	1.825	0.716	1.109	0.03	28.15
ใหญ่ (น้ำ)	1.806	0.78	1.026	0.03	26.04

4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระและการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง

1. **การเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์** (Mesenchymal stem cells, MSCs)

การศึกษาครั้งนี้จะใช้เซลล์ประสาทที่ได้จากการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิด MSCsให้พัฒนาเป็นเซลล์ประสาท (neuron)โดยเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด MSCs ใน flask T75 ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM,10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine และ100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin เลี้ยงเซลล์ที่ 37°C, 5% CO_2เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ ทุกๆ 2-3 วัน เป็นระยะเวลาประมาณ 1 เดือน เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ให้มากพอในการทำการทดลองเมื่อสังเกตลักษณะของเซลล์ MSCs ภายใต้กล้อง Inverted light microscope จะพบว่าเซลล์มีรูปร่างยาวรีคล้ายกระสวย (spindle shape) ดัง**รูปที่** 4.1

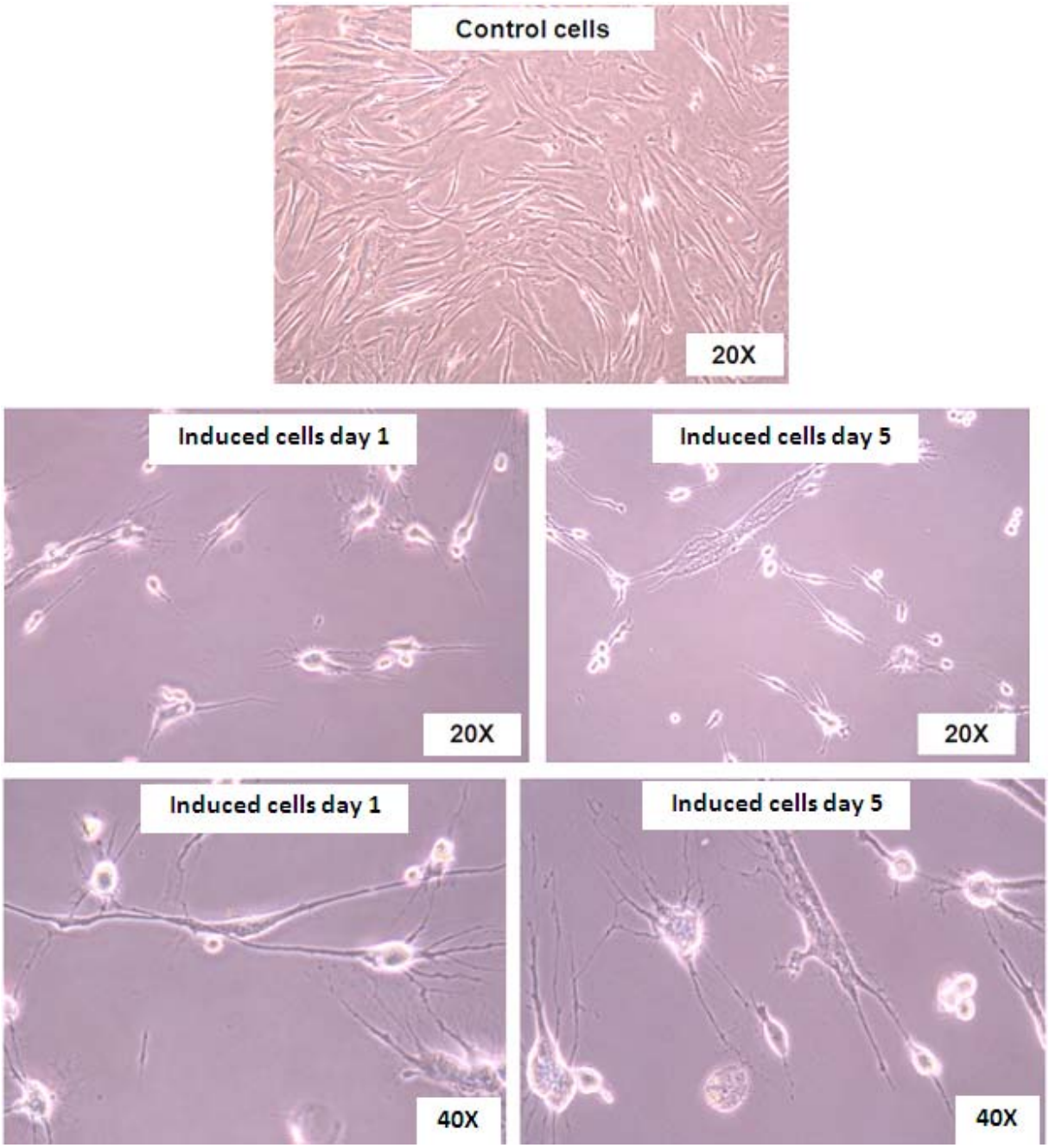


รูปที่ 4.1 เซลล์ MSCs ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM มีรูปร่างยาวรีคล้ายกระสวย (spindle shape)

2. การเหนี่ยวนำ MSCs ให้พัฒนาเป็นเซลล์ประสาท (Cell culture and neuronal differentiation)

ในการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดให้พัฒนาเป็นเซลล์ประสาท ทำได้โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ MSCs จำนวน1x10^3 cells/cm^2 ใน 6-well plate ที่เคลือบด้วยสาร laminin จากนั้นเติม Neuronal medium ซึ่งประกอบไปด้วย 1mM β-mercaptoethanol (BME), 10% FBS, 2% dimethylsulfoxide (DMSO) และ 200 uM butylatedhydroxyanisole (BHA) เป็นระยะเวลา 5 วัน จากนั้นทำการตรวจสอบการพัฒนาจาก MSCs เป็นเซลล์ประสาทโดยการดูการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์และใช้เทคนิค Semi-quantitative RT-PCR ตรวจสอบการแสดงออกของจีนเซลล์ประสาท (neural marker genes) โดยเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่เติม neuronal medium (Induced cells) กับเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่ได้เติม neuronalmedium (Control cells)

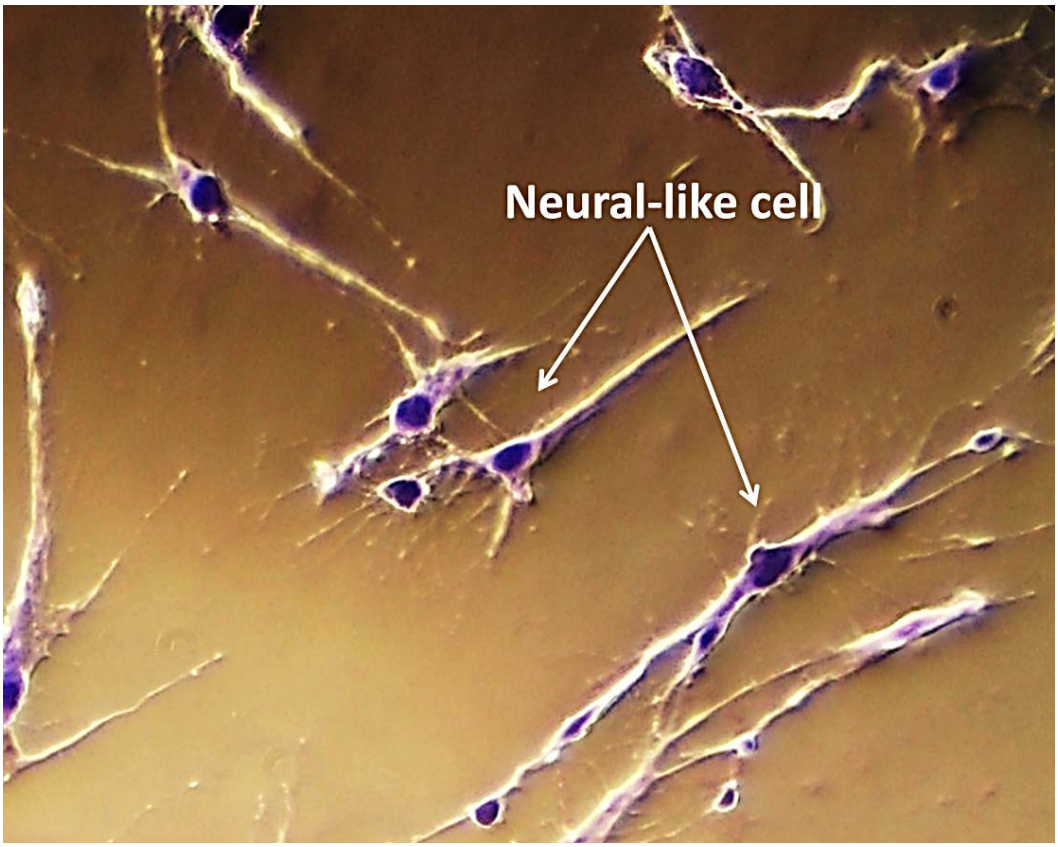
2.1 Neuronal morphology สังเกตดูการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หลังการเหนี่ยวนำโดยเปรียบเทียบรูปร่างของ Induced cellsกับ Control cells พบว่าInduced cellsมีรูปร่างแตกต่างจาก Control cells อย่างชัดเจน โดยcytoplasm ของเซลล์จะหดแคบเข้าและมีส่วนของ protoplasm ยื่นออกไปจากตัวเซลล์เป็นจำนวนมาก ซึ่งเป็นลักษณะพิเศษของเซลล์ประสาทดัง **รูปที่** 4.2



รูปที่ 4.2 ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ต้นกำเนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดชนิดMSCsในอาหารที่เติมneuronal medium (Induced cells) เป็นระยะเวลา 1 และ 5 วันโดย cytoplasm ของเซลล์จะหดแคบเข้าและมีส่วนของ protoplasm ยื่นออกไปจากตัวเซลล์เป็นจำนวนมาก ซึ่งเป็นลักษณะพิเศษของเซลล์ประสาทเปรียบเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่ได้เติม neuronal medium (control cells) ยังคงมีรูปร่างยาวรีคล้ายกระสวย (spindle shape)

2.2 **ย้อม** Hematoxylin

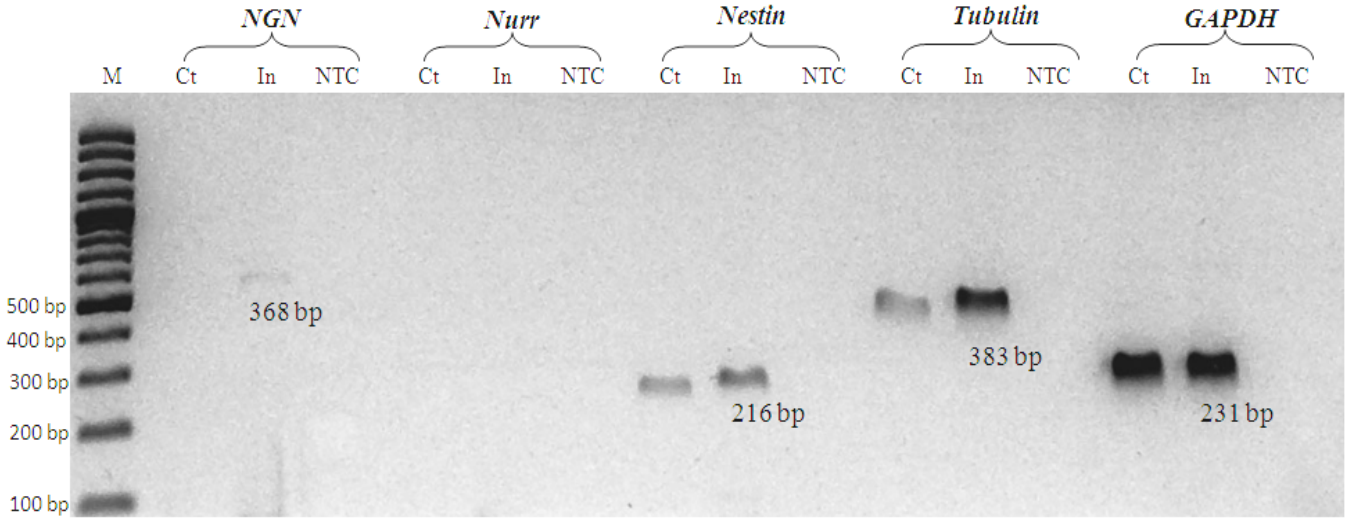
ผู้วิจัยได้เพิ่มเทคนิคการย้อม hematoxylin เพื่อให้การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ต้นกำเนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์เห็นชัดเจนยิ่งขึ้น โดยทำการย้อม hematoxylinในเซลล์ต้นกำเนิดที่เลี้ยงในอาหารที่เติมneuronal mediumเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งพบเซลล์ที่มีรูปร่างเหมือนเซลล์ประสาท (neural-like cell) ดัง**รูปที่** 4.3



รูปที่ 4.3 การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ต้นกำเนิดโดยย้อมสี hematoxylin หลังจากเหนี่ยวนำเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมneuronal medium (Induced cells) เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

2.3 Semi-quantitative RT-PCR ในการศึกษาครั้งนี้จะตรวจสอบการแสดงออกของจีนจำเพาะต่อเซลล์ประสาท (neural marker genes) 4 ชนิด คือ *Neurogenin (NGNs), Nuclear receptor related 1 protein (Nurr), Nestin* และ β*-Tubulin III* โดยการตรวจสอบการแสดงออกของจีนทั้ง 4 ชนิด จะเปรียบเทียบกันระหว่าง Control cells กับ Induced cells และใช้จีน glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase *(GAPDH)* เป็นจีนควบคุมหรือ housekeeping gene

จากผลการตรวจสอบการแสดงออกของจีนเซลล์ประสาททั้ง 4 ชนิด พบว่าในเซลล์ที่เหนี่ยวนำเป็นเซลล์ประสาทโดยการเลี้ยงในอาหารที่เติม neuronal medium เป็นระยะเวลา 5 วัน มีการแสดงออกของ *Nestin, Tubulin* และ*NGN* สูงกว่าใน control cells ในขณะที่จีน *Nurr*ไม่พบการแสดงออกทั้งในInduced cells และ Control cellsดังแสดงใน**รูปที่** 4.4



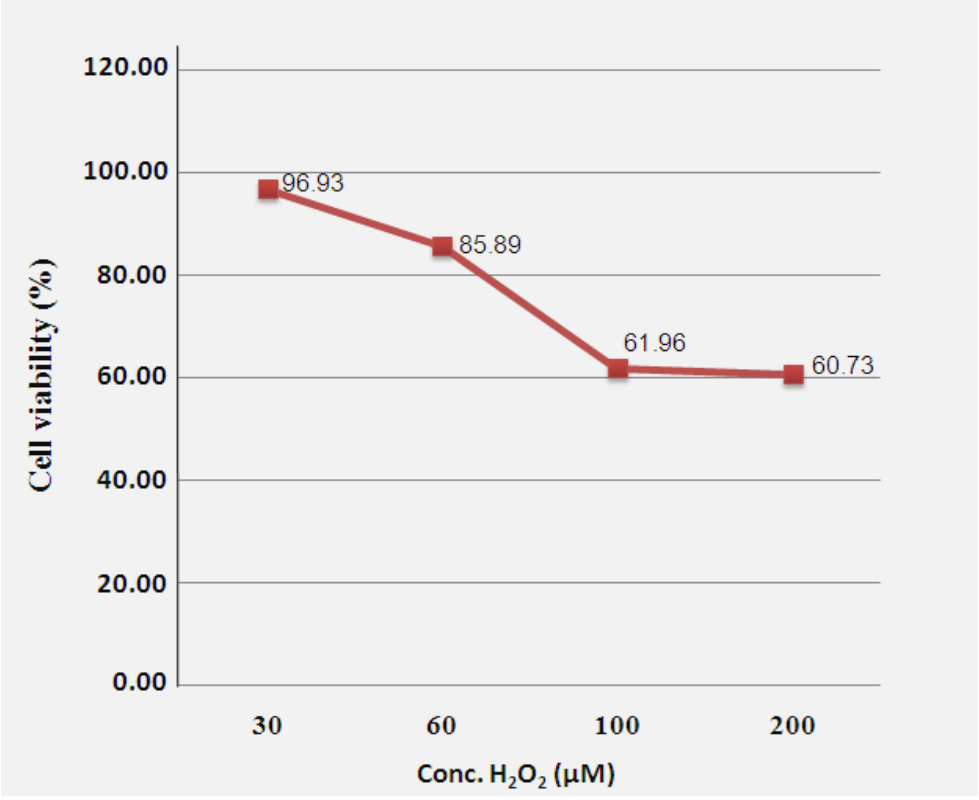
รูปที่ 4.4 ผล RT-PCR เพื่อตรวจการแสดงออกของจีนเซลล์ประสาทใน Induced cells เปรียบเทียบกับ control cells (Ct = Control cells, In = Induced cells, NTC = Non template control)

จากผลการทดลองสรุปได้ว่าการเลี้ยงเซลล์ MSCs โดยใช้ neuronal medium สามารถเหนี่ยวนำให้ MSCs มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างคล้ายเซลล์ประสาท (Neural-like cell) คือ cytoplasm ของเซลล์หดเล็กลงและมีแขนงยื่นยาวออกมาจำนวนมากเมื่อตรวจดูการแสดงออกของจีนเซลล์ประสาท พบว่าจีน *NGN, Nestin* และ *Tubulin* มีการแสดงออกใน Induced cells สูงกว่าใน control cells ดังนั้นผู้วิจัยจึงใช้เซลล์ที่ได้จากการเหนี่ยวนำครั้งนี้มาเป็นเซลล์ต้นแบบ (model) ในการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระและการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง

3. การชักนำเซลล์ประสาทให้เกิดภาวะ oxidative stress ด้วยสาร hydrogen peroxide (H_2O_2)

นำเซลล์ต้นกำเนิด MSCs จำนวน $1x10^3$ cell/well มาเพาะเลี้ยงใน 96-well plate และเหนี่ยวนำเป็นเซลล์ประสาทโดยเติม neural medium ลงไป 100 ml/well เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมทิ้งไป แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี H_2O_2 ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 30, 60, 100 และ 200 uM (Xin *et al*., 2001) เพื่อชักนำให้เซลล์อยู่ในภาวะ oxidative stress เป็นเวลา 24 ชม. แล้วล้างเซลล์ด้วย PBS และทำ Sulforhodamine B colorimetric (SRB) assay เพื่อวัดค่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่

จากผล SRB พบว่าอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ประสาทลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ H_2O_2มากขึ้น โดยที่ความเข้มข้นของ$H_2O_2$30 uM อัตราเซลล์มีชีวิต 96.93% ความเข้มข้น 60 uM พบเซลล์มีชีวิต 85.89% และที่ความเข้มข้น 100 uM พบเซลล์มีชีวิต 61.96%นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ H_2O_2เป็น 200 uM อัตราการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ไม่แตกต่างจากการใช้ความเข้มข้น $H_2O_2$100 uM โดยพบร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่60.73%ดัง**รูปที่** 4.5 ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงเลือกใช้ความเข้มข้นที่ 200 uM มาทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการป้องกันการตายของเซลล์จากการชักนำของสาร H_2O_2



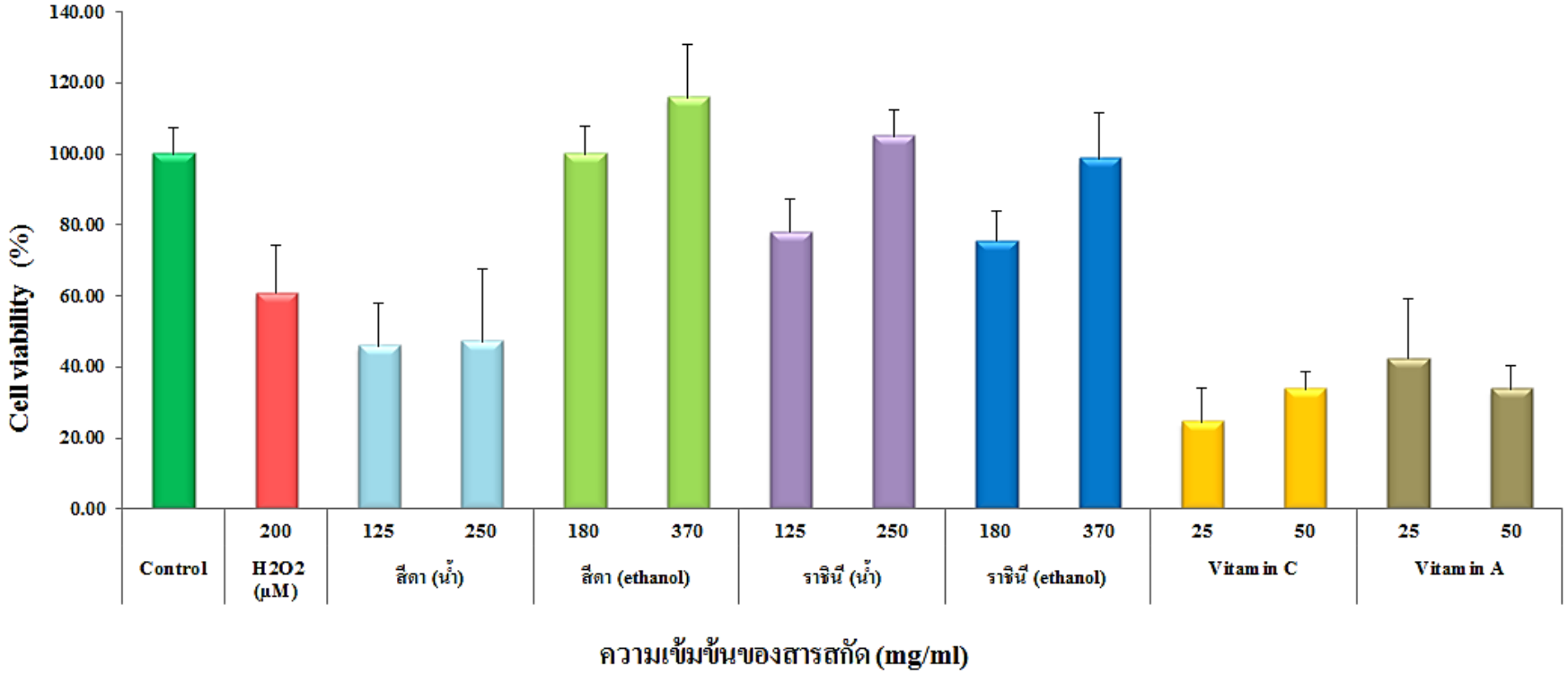
รูปที่ 4.5 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ H_2O_2 ในการชักนำการตายของเซลล์ประสาท

4. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดมะเขือเทศในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาท

นำเซลล์ต้นกำเนิด MSCs จำนวน $1x10^3$ cell/well มาเพาะเลี้ยงใน 96-well plate และเหนี่ยวนำเป็นเซลล์ประสาทโดยเติม neural medium ลงไป 100 ml/well เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมทิ้งไป แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดแต่ละความเข้มข้น 100 ul ลงในแต่ละหลุม (n = 3) เลี้ยงเซลล์ที่ 37°C, 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเมื่อครบเวลา ถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมทิ้งไป แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี H_2O_2 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อชักนำการตายของเซลล์ประสาท โดยบ่มเซลล์ที่ 37°C5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ล้างเซลล์ด้วย PBS เพื่อทำ SRB assay เพื่อวัดค่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่

ฤทธิ์ของสารสกัดในการป้องกันการตายของเซลล์นี้จะถูกเปรียบเทียบผลกับการเติมวิตามินซี (Vitamin C) และวิตามินเอ (Vitamin A) ความเข้มข้น 25 และ 50 mg/ml เพื่อดูว่าสารสกัดที่ได้จากมะเขือเทศมีคุณสมบัติป้องกันการตายของเซลล์จากภาวะ oxidative stress ที่ชักนำโดย H_2O_2 เทียบเท่าหรือดีกว่าสารมาตรฐาน

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดมะเขือเทศในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาทจากการชักนำด้วยสาร H_2O_2 ความเข้มข้น 200 uM พบว่าสารสกัดจากทั้งมะเขือเทศสีดาและราชินีที่สกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 180และ 370 mg/ml มีฤทธิ์ในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาทจากการชักนำด้วย H_2O_2 ส่วนสารสกัดจากมะเขือเทศสีดาและราชินีที่สกัดด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้น 125 และ 250 mg/ml พบว่าเฉพาะสารสกัดจากมะเขือเทศราชินีเท่านั้นที่มีฤทธิ์ในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาทจาก H_2O_2 ในขณะที่สารสกัดจากมะเขือเทศสีดาที่สกัดด้วยน้ำไม่พบฤทธิ์ในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาทดัง**รูปที่** 4.6 ส่วนสารมาตรฐาน Vitamin C และ Vitamin A ไม่พบฤทธิ์ในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาท อาจเกิดจากการศึกษาครั้งนี้ใช้ความเข้มข้นของ vitamin C และ Vitamin A น้อยเกินไปคือ 25 และ 50 mg/ml จึงไม่พบฤทธิ์ในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาท ตารางเปรียบเทียบชนิดของสารสกัด ความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ รวมทั้งฤทธิ์ในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาท ซึ่งแสดงเป็นร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ (% cell viability) แสดงใน**ตารางที่** 4.3



รูปที่ 4.6 แสดงการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดมะเขือเทศในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาทจากการชักนำด้วยสาร H_2O_2 ความเข้มข้น 200 □M ค่าที่แสดงในตาราง เป็นค่า mean ±SD (n = 3)

ตารางที่ 4.5 ตารางเปรียบเทียบชนิดของสารสกัด ความเข้มข้นของสารสกัดและร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ (% cell viability)

ชนิดของมะเขือเทศ	**ประเภทของการสกัด**	**ความเข้มข้น (mg /ml)**	**ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ (% cell viability)**
มะเขือเทศสีดา	เอทานอล	180	100 %
มะเขือเทศราชินี	น้ำ	250	100 %
มะเขือเทศสีดา	เอทานอล	370	100 %
มะเขือเทศราชินี	เอทานอล	370	98.7 %
มะเขือเทศราชินี	น้ำ	125	77.9 %
มะเขือเทศราชินี	เอทานอล	180	75.4 %
มะเขือเทศสีดา	น้ำ	250	47.2 %
มะเขือเทศสีดา	น้ำ	125	46.0 %
วิตามินเอ	-	25	42.3 %
วิตามินเอ	-	50	33.7 %
วิตามินซี	-	50	33.7 %
วิตามินซี	-	25	24.5 %

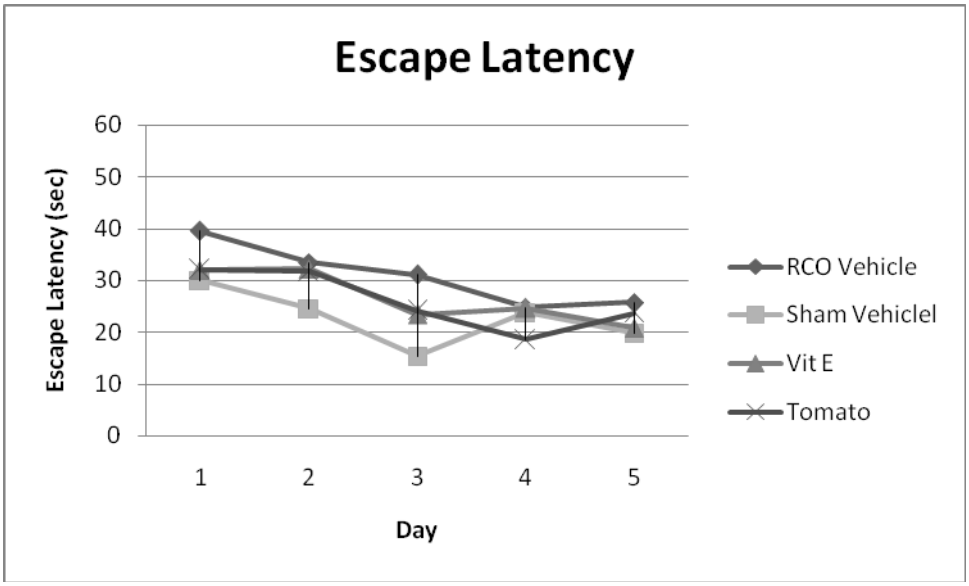
4.5 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดมะเขือเทศต่อการรักษาภาวะความจำเสื่อมในหนูทดลอง

4.5.1การทดสอบพฤติกรรมความสามารถในการเรียนรู้และจดจำ ด้วย Morris water maze test

การทดสอบพฤติกรรมความสามารถในการเรียนรู้และจดจำของหนุทดลองด้วย Morris water maze test โดยให้หนูทดลองว่ายอย่างอิสระจนเป็นเวลา 60 วินาที เพื่อเรียนรู้และจดจำตำแหน่งของ platform จนกระทั่งสามารถเรียนรู้และจดจำตำแหน่งของ platform และปีนขึ้นไปหยุดอยู่บน platform และบันทึกเวลาที่หนูใช้ในการหา platform โดยหนูแต่ละตัวจะถูกทดสอบ 4 ครั้ง/วัน ต่อเนื่องกันเป็นเวลา 5 วัน จากผลการทดลองพบว่า หนูกลุ่มที่ถูกผูกหลอดเลือด (RCO vehicle) มีความสามารถในการเรียนรู้แย่ที่สุด เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Sham vehicle) กลุ่มที่ถูกผูกหลอดเลือดและได้รับการป้อนสารสกัดจากมะเขือเทศราชินี และวิตามินอี ความเข้มข้น 30 mg/Kg มีความสามารถในการเรียนรู้ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่าทั้งสารสกัดจากมะเขือเทศและวิตามินอี สามารถช่วยชะลอและป้องกันภาวะของการเรียนรู้และจดจำที่บกพร่องได้เมื่อเปรียบเทียบกับหนูถูกผูกหลอดเลือดอย่างเดียว

ตารางที่ 4.6 ตารางเปรียบเทียบพฤติกรรมความสามารถในการเรียนรู้และจดจำของหนุทดลองด้วย Morris water maze test

Group	avg d1 (sec)	avg d2 (sec)	avg d3 (sec)	avg d4 (sec)	avg d5 (sec)
RCO Vehicle	39.47	33.42	31.14	24.81	25.72
Sham Vehiclel	29.94	24.53	15.33	23.75	19.81
Vit E	31.94	32.22	23.44	24.66	20.78
Tomato	32.09	31.75	24.14	18.50	23.68



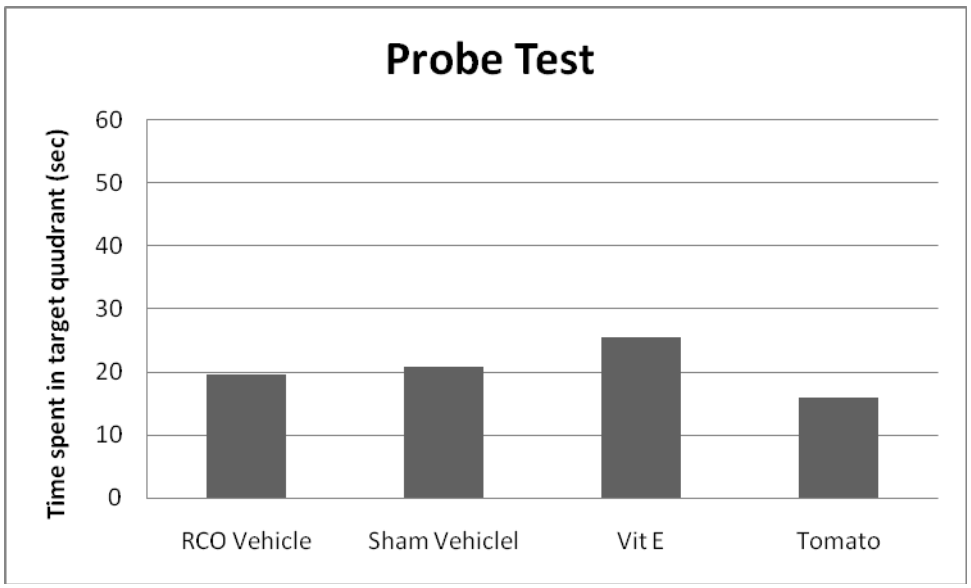
รูปที่ 4.7 กราฟแสดงความสามารถในการเรียนรู้จดจำของหนูทดลอง ด้วยวิธี Morris water maze

4.5.2 การทดสอบพฤติกรรมความสามารถในการเรียนรู้และจดจำ ด้วย Probe test

การทดสอบพฤติกรรมความสามารถในการจดจำของหนูทดลองด้วย probe test โดยการนำเอา platform ออกไปจากอ่างน้ำ และให้หนูทดลองว่ายอย่างอิสระจนเป็นเวลา 60 วินาที เพื่อทดสอบความสามารถในการเรียนรู้และจดจำตำแหน่งของ platform เดิม บันทึกเวลาที่หนูใช้ในการว่ายวนหา platform ใน target quadrant จากผลการทดลองพบว่าหนูทุกกลุ่มมีความสามารถในการเรียนรู้และจดจำตำแหน่งของ platform ไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 4.7 เปรียบเทียบความสามารถในการจดจำของหนูทดลอง ด้วยวิธี probe test

Group	Probe (sec)	sd
RCO Vehicle	19.56	10.86
Sham Vehiclel	20.89	7.20
Vit E	25.50	3.10
Tomato	16.00	7.67



รูปที่ 4.8 กราฟแท่งแสดงความสามารถในการจดจำของหนูทดลอง ด้วยวิธี probe test

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

จากการทดลองหาสารองค์ประกอบสำคัญในสารสกัดจากมะเขือเทศที่ใช้น้ำปราศจากเชื้อและเอทานอลเป็นตัวทำละลาย พบว่า สารสกัดจากมะเขือเทศราชินีด้วยน้ำปราศจากเชื้อที่ความเข้มข้น 50 กรัมต่อมิลลิลิตร พบปริมาณวิตามินซีเท่ากับ 0.32 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารสกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 1.67 กรัมต่อมิลลิลิตร พบปริมาณวิตามินเอเท่ากับ 0.009 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อนำสารสกัดจากมะเขือเทศที่ได้มาศึกษาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของมะเขือเทศ การวิจัยนี้ได้เลือกทดสอบที่มีหลักการแตกต่างกัน 3 วิธี คือ SOD GPx และ CAT ซึ่งเป็นการวัดกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี SOD พบว่าสารสกัดจากมะเขือเทศราชินีที่สกัดด้วยน้ำมีค่าเท่ากับ 32.71 % inhibition rate ส่วนสารสกัดจากมะเขือเทศราชินีที่สกัดด้วยเอทานอลมี **57.41** % inhibition rate ดังนั้นสารสกัดมะเขือเทศที่สกัดด้วยเอทานอลมีความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดมะเขือเทศที่สกัดด้วยน้ำ

ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี GPx พบว่าสารสกัดมะเขือเทศที่สกัดด้วยเอทานอลสามารถทำลายอนุมูลอิสระ หรือ catalyze H_2O_2 ได้ โดยมีค่า **GPx activity** เท่ากับ 9.32 **μmol/L** ได้ดีกว่าสารสกัดมะเขือเทศที่สกัดด้วยน้ำ 8.65 **μmol/L**

ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี CAT พบว่าสารสกัดมะเขือเทศที่สกัดด้วยเอทานอลความสามารถในการออกซิไดส์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ H_2O_2 ให้ได้น้ำ H_2O และออกซิเจน โดยมีค่า CAT activity เท่ากับ 30.84 M ได้ดีกว่าสารสกัดมะเขือเทศที่สกัดด้วยน้ำ 29.16 M

ส่วนการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดมะเขือเทศราชินีและมะเขือเทศสีดาในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงจากการชักนำภาวะ oxidative stress ด้วยสาร H_2O_2 โดยโมเดลของเซลล์ประสาทที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้มาจากการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ให้พัฒนาเป็นเซลล์ประสาท พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ (Mesenchymal stem cells, MSCs) ถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของจีนเซลล์ประสาทเพิ่มมากขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มีสาร butylatedhydroxyanisole (BHA) และ β-mercaptoethanol (BME) นอกจากนี้เซลล์เหนี่ยวนำยังเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากเดิมซึ่งมีลักษณะยาวรีคล้ายกระสวยไปเหมือนเซลล์ที่มี

ลักษณะคล้ายเซลล์ประสาท คือ cytoplasm ของเซลล์มีการหดแคบเข้าและมีส่วนของ protoplasm ยื่นออกไปจากตัวเซลล์เป็นจำนวนมาก เมื่อนำเซลล์เหนี่ยวนำไปทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดมะเขือเทศราชินีและมะเขือเทศสีดาในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงจากการชักนำของสาร H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 200 uM พบว่าสารสกัดที่มีฤทธิ์ป้องกันเซลล์ตายดีที่สุด โดยมีร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ เป็น 100% และใช้ความเข้มข้นน้อยที่สุด คือ สารสกัดด้วยเอทานอลของมะเขือเทศสีดาที่ความเข้มข้น 180 mg/ml รองลงมาคือ สารสกัดด้วยน้ำของมะเขือเทศราชินี ที่ความเข้มข้น 250 mg/ml

ผลการทดสอบพฤติกรรมความสามารถในการเรียนรู้และจดจำของหนูทดลองด้วย Morris water maze test จากผลการทดลองพบว่า หนูกลุ่มที่ถูกผูกหลอดเลือด (RCO vehicle) มีความสามารถในการเรียนรู้แย่ที่สุด เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Sham vehicle) กลุ่มที่ถูกผูกหลอดเลือดและได้รับการป้อนสารสกัดจากมะเขือเทศราชินี และวิตามินอี ความเข้มข้น 30 mg/Kg มีความสามารถในการเรียนรู้ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่าทั้งสารสกัดจากมะเขือเทศและวิตามินอีสามารถช่วยชะลอและป้องกันภาวะของการเรียนรู้และจดจำที่บกพร่องได้ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูถูกผูกหลอดเลือดอย่างเดียว

ผลการทดสอบพฤติกรรมความสามารถในการจดจำของหนูทดลองด้วย probe จากผลการทดลองพบว่าหนูทุกกลุ่มมีความสามารถในการเรียนรู้และจดจำตำแหน่งของ platform ไม่แตกต่างกัน

อภิปรายผล

สารสกัดจากมะเขือเทศด้วยเอทานอล ได้สารสกัดที่สีเหลืองคล้ายน้ำมันพืช ซึ่งอาจจะเป็นสีของวิตามินเอบริสุทธิ์ เพราะผลจากการสกัดที่ได้นั้นมีความสอดคล้องกับบทความในหนังสือเรื่อง วิตามิน ที่กล่าวว่า “วิตามินเอบริสุทธิ์จะมีลักษณะเป็นของเหลวคล้ายน้ำมัน” (ศิริวรรณ สุทธจิตต์, 2550) เมื่อนำสารสกัดที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV/ Vis spectrophotometer พบว่าสารสกัดจากมะเขือเทศที่ใช้น้ำปราศจากเชื้อเป็นตัวทำละลายมีค่าความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสงได้สูงสุดเท่ากับ 245 นาโนเมตร ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงของวิตามินซี จากค่าความยาวคลื่นดังกล่าว สอดคล้องกับบทความในหนังสือ เรื่อง Vitamin analysis for the health and food sciences ที่กล่าวว่า “Ascorbic acid มีค่าความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสงได้สูงสุดเท่ากับ 245 นาโนเมตร (Ronald, 2008) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากมะเขือเทศด้วยน้ำปราศจากเชื้อที่ได้มีวิตามินซีเป็นองค์ประกอบ ส่วนสารสกัดจากมะเขือเทศที่ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย มีค่าความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสงได้สูงสุดเท่ากับ 450 นาโนเมตร ซึ่งเป็น

ค่าการดูดกลืนแสงของ β-carotene จากค่าความยาวคลื่นดังกล่าวสอดคล้องกับบทความในหนังสือ เรื่อง Vitamin analysis for the health and food sciences ที่กล่าวว่า "β-carotene มีค่าความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสงได้สูงสุดเท่ากับ 450 นาโนเมตร (Ronald, 2008) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากมะเขือเทศด้วยเอทานอลที่ได้มีวิตามินเอเป็นองค์ประกอบ

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณวิตามินซีที่ได้จากสารสกัดมะเขือเทศทั้ง 2 ชนิด กับตารางข้อมูลทางโภชนาการ (สุธาทิพ ภมรประวัติ, 2552) พบว่า ปริมาณวิตามินซีที่ได้มีปริมาณน้อยกว่าเมื่อเทียบกับตารางข้อมูลทางโภชนาการ (มะเขือเทศสด 100 กรัม) เนื่องจากในการสกัดเป็นการสกัดโดยวิธีทางธรรมชาติ จึงอาจส่งผลให้มีการสูญเสียวิตามินซีได้ ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Phillip K.M.และคณะ (Phillips et al., 2010) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับเสถียรภาพของวิตามินซีในผัก ผลไม้สดปั่นแช่แข็งเมื่อเก็บไว้เป็นระยะเวลา 1 ปี ที่กล่าวว่า "การสกัดสารจากผัก ผลไม้สด ควรทำภายใต้ตัวกรองรังสียูวี ทั้งนี้เพื่อเป็นการป้องกันสารองค์ประกอบสำคัญไม่ให้เสื่อมสลาย เช่น วิตามินซี เป็นต้น" ส่วนการเปรียบเทียบปริมาณวิตามินเอที่ได้จากสารสกัดมะเขือเทศทั้ง 2 ชนิด กับ ตารางข้อมูลทางโภชนาการ พบว่า วิตามินเอที่ได้มีปริมาณใกล้เคียงกับตารางข้อมูลทางโภชนาการ เนื่องจากตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เอทานอลมีประสิทธิภาพในการดึงวิตามินเอได้ดี ซึ่งตรงกับบทความในหนังสือเรื่อง วิตามินของ ศิริวรรณ สุทธจิตต์ ที่กล่าวว่า "วิตามินเอและอนุพันธ์จะลายได้ดีในไขมันและตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เอทานอล, เมทานอล เป็นต้น" (สุธาทิพ ภมรประวัติ, 2552) นอกจากนี้ยังขึ้นกับระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดด้วย ซึ่งตรงกับงานวิจัยของ วีระ วีระกุล และ วุฒิชัย ศรีวิกรานต์โยธิน ที่กล่าวว่า "เวลาเป็นส่วนสำคัญในการสกัด เพราะจะมีผลต่อการสกัดให้ได้วิตามินเอมากหรือน้อย ดังนั้นเมื่อสกัดสารจากมะเขือเทศจำเป็นต้องรอให้ตัวมะเขือเทศที่มีสีแดงให้มีสีจางลงมากที่สุด" (วีระ วีระกุล และ วุฒิชัย ศรีวิกรานต์โยธิน, 2546)

ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากการทำงานกิจกรรมเอนไซม์ สอดคล้องกับการศึกษาของ ชลดา จัดประกอบ และคณะ ที่ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดเห็ดหิ้งเกือกม้าที่สกัดด้วยเอทานอล น้ำ และแอลคาลอยด์ พบว่า การสกัดเห็ดหิ้งเกือกม้าด้วยวิธีแอลคาลอยด์ได้ % yield สูงสุด รองลงมาคือ การสกัดด้วยเอทานอล และการสกัดด้วยน้ำ ตามลำดับ ซึ่งการสกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพดีมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับ Ascorbic acid ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐาน ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าสารสกัดมะเขือเทศที่สกัดด้วยเอทานอล มีความสามารถใน

การต้านอนุมูลอิสระ ได้ดีกว่าสารสกัดมะเขือเทศที่สกัดด้วยน้ำปราศจากเชื้อ (ชลดา จัดประกอบ และคณะ 2013)

จากการเปรียบเทียบผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากมะเขือเทศทั้งสามชนิดมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสัมพันธ์กับปริมาณวิตามินซีที่พบในสารสกัดมะเขือเทศราชินีมากกว่ามะเขือเทศชนิดอื่น และสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Luengthanaphol *et al*. 2004 และ Sudjaroen *et al*., 2005 ที่พบว่า สารประกอบฟีนอลเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำหน้าที่เป็น free radical terminators (Abdel-Hameed, 2009) ที่โครงสร้างหลักประกอบด้วย aromatic ring แทนที่ด้วย hydroxyl group ที่สามารถใช้จับกับอนุมูลอิสระได้

เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ ซึ่งเป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่มีความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนสูง และสามารถแยกได้ง่ายจากไขกระดูก (bone marrow) เลือด (peripheral blood) และเลือดสายสะดือ (cord blood) นอกจากนี้เซลล์มีเซนไคม์ยังสามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ได้หลายชนิด เช่น เซลล์กระดูก (osteocyte) (Jiang Y et al., 2002; Pittenger MF et al., 1999) เซลล์ไขมัน (adipocyte) (Pittenger MF et al., 1999) เซลล์กระดูกอ่อน (chondrocyte) (Chonanant C et al., 2011; Indrawattana N et al., 2004) epithelial cell (Wang Y et al., 2009) และเซลล์ประสาท (neuron) (Choi CB et al., 2005; Krampera M et al., 2005; Cho KJ et al., 2005; Keenee CD et al., 2003) ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่ใช้ในการเหนี่ยวนำเซลล์ เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ. ดร. วิไลรัตน์ ลี้อนันต์ศักดิ์ศิริ อาจารย์ประจำสำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยเป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกได้จาก Wharton jelly ของรก ซึ่งเป็นการนำของเสียที่ไม่ได้ใช้ประโยชน์แล้ว กลับมาใช้ให้เกิดประโยชน์ในการแยกเซลล์ต้นกำเนิด ซึ่งถือว่าเป็นประโยชน์อย่างมากต่อวงการแพทย์ นอกจากนี้เซลล์ต้นกำเนิดที่แยกได้จาก Wharton jelly ของรกยังมีความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้นกันน้อย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการปลูกถ่ายเพราะสามารถลดอัตราการเกิด graft rejection ได้ เมื่อนำเซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้มาเลี้ยงในอาหาร Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่เติม 10% Fetal bovine serum และ 1% Penicillin/Streptomycin เซลล์จะเกาะบนพื้นผิวของภาชนะเพาะเลี้ยง และมีรูปร่างยาวรีคล้ายกระสวย (Fibroblast-like cells) ซึ่งเป็นลักษณะโดยทั่วไปของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ เมื่อนำเซลล์ชนิดนี้มาเพาะเลี้ยงเพื่อเหนี่ยวนำเป็นเซลล์ประสาท โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมสาร butylatedhydroxyanisole (BHA) และ β-mercaptoethanol (BME) (Woodbury D et al., 2000) เป็นตัวช่วยในการเหนี่ยวนำ เป็นระยะเวลา 5 วัน พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปอย่างชัดเจน โดย cytoplasm

ของเซลล์จะหดแคบเข้าและมีส่วนของ protoplasm ยื่นออกไปจากตัวเซลล์เป็นจำนวนมาก ซึ่งเป็นลักษณะพิเศษของเซลล์ประสาท ร่วมกันนั้นเซลล์เหนี่ยวนำยังมีการแสดงออกของจีนเซลล์ประสารท 3 ชนิด คือ *Nestin, Tubulin* และ *NGN* ซึ่งเป็นจีนที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมกระบวนการถอดรหัสในการพัฒนาของเนื้อเยื่อประสาท (neurogenesis) (Choi CB et al., 2005; Woodbury D et al., 2000; Benvenuti S et al., 2006) โดยพบการแสดงออกของจีนเซลล์ประสาทสูงขึ้นในเซลล์เหนี่ยวนำเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม (เซลล์ที่ไม่ได้เติมสารเหนี่ยวนำเซลล์ประสาทลงไป) ซึ่งบ่งบอกว่าเซลล์ต้นกำเนิด MSCs ถูกสาร butylatedhydroxyanisole (BHA) และ β-mercaptoethanol (BME) เหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของจีนเซลล์ประสาท ร่วมกับส่งผลให้เซลล์มีรูปร่างหน้าตาเปลี่ยนไปเป็นเซลล์ประสาทด้วย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาของ Woodbury D และคณะ (Woodbury D et al., 2000) ซึ่งใช้สาร butylatedhydroxyanisole (BHA) และ β-mercaptoethanol (BME) เหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกได้จากไขกระดูกของคนและของหนู rat ให้พัฒนาเป็นเซลล์ประสาท ผู้วิจัยจึงนำเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำนี้มาเป็นเซลล์ต้นแบบ (model) ในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดมะเขือเทศราชินี และมะเขือเทศสีดาในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงจากการชักนำของสาร H_2O_2

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากมะเขือเทศราชินี และมะเขือเทศสีดาในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงจากการชักนำภาวะ oxidative stress ด้วยสาร H_2O_2 ซึ่งจากการศึกษาการตายของเซลล์ประสาทที่เลี้ยงในอาหารที่เติม H_2O_2 พบว่าที่ความเข้มข้นของ H_2O_2 200 μM มีผลทำให้เซลล์ประสาทตาย 40% แต่เมื่อให้สารสกัดมะเขือเทศราชินีและมะเขือเทศสีดาแก่เซลล์ประสาทเป็นระยะเวลา 24 ช.ม. ก่อนที่เซลล์จะสัมผัสกับ H_2O_2 พบว่าสารสกัดด้วยน้ำของมะเขือเทศราชินีและสารสกัดด้วยน้ำและสารสกัดด้วยเอทานอลของมะเขือเทศสีดา สามารถยั้งยั้งหรือป้องกันการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงจากการชักนำของสาร H_2O_2 ได้ โดยพบว่าสารสกัดจากทั้งมะเขือเทศสีดาและราชินีที่สกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 180 และ 370 mg/ml มีฤทธิ์ในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาทจากการชักนำด้วย H_2O_2 ส่วนสารสกัดจากมะเขือเทศสีดาและราชินีที่สกัดด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้น 125 และ 250 mg/ml พบว่าเฉพาะสารสกัดด้วยน้ำจากมะเขือเทศราชินีเท่านั้นที่มีฤทธิ์ในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาทจาก H_2O_2 ในขณะที่สารสกัดจากมะเขือเทศสีดาที่สกัดด้วยน้ำไม่พบฤทธิ์ในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาท ส่วนสารมาตรฐาน Vitamin C และ Vitamin A ไม่พบฤทธิ์ในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาท อาจเกิดจากการศึกษาครั้งนี้ใช้ความเข้มข้นของ vitamin C และ Vitamin A น้อยเกินไปคือ 25 และ 50 mg/ml จึงไม่พบฤทธิ์ในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาท ประกอบกับสารสกัดที่ได้จาก

มะเขือเทศทั้ง 2 ชนิด อาจมีองค์ประกอบของสารชีวโมเลกุลอื่นๆ ปนอยู่ด้วยหลายชนิด จึงอาจมีผลป้องกันการตายของเซลล์ประสาทจากการเหนี่ยวนำด้วยสาร H_2O_2

เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบพบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลของมะเขือเทศสีดาที่ความเข้มข้น 180 mg/ml สามารถป้องกันการตายของเซลล์ประสาทได้ 100% ส่วนสารสกัดด้วยน้ำของมะเขือเทศราชินี ต้องใช้ความเข้มข้น 250 mg/ml จึงจะสามารถป้องกันการตายของเซลล์ประสาทได้เท่ากับสารสกัดด้วยเอทานอลของมะเขือเทศสีดา แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากมะเขือเทศด้วยเอทานอลซึ่งมีวิตามินเอเป็นองค์ประกอบสูง สามารถป้องกันการตายของเซลล์ประสาทได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับสารสกัดจากมะเขือเทศด้วยน้ำ ซึ่งองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นวิตามินซี หรืออีกนัยหนึ่งคือวิตามินเอมีความสามารถในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาทจากการเหนี่ยวนำให้เกิด oxidative stress ด้วย H_2O_2 ได้ดีกว่าวิตามินซี อย่างไรก็ตาม สารสกัดจากผลมะเขือเทศมีสารที่สำคัญหลายชนิด เช่น ไลโคปีนซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สามารถลดการเกิดมะเร็งลำไส้ มะเร็งต่อมลูกหมากลดอัตราเสี่ยงการเกิดมะเร็งบางชนิด โดยเฉพาะมะเร็งปอดและมะเร็งในช่องท้อง เนื่องจากไลโคปีนเป็นสารที่มีศักยภาพและมีความจำเพาะในการต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง ในกระบวนการ cell cycle ที่เซลล์มะเร็งจะมีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วและไม่สามารถควบคุมได้ ซึ่งการทำงานของไลโคปีนนั้นจะเข้าไปลดกระบวนการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งบางชนิด (Levy et al., 1995) ช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งต่อมลูกหมากได้ (William et al., 1999) ลดการเกิดมะเร็งเต้านมในผู้หญิง (Grant et al., 1999) ถ้าได้รับไลโคปีนในปริมาณสูงจะสามารถช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งกระเพาะอาหารได้อีกด้วย (Tsubono et al., 1999) นอกจากนี้สารสกัดจากผลมะเขือเทศยังมีสาร Tomatoside และ citrin ซึ่งช่วยป้องกันการแข็งตัวของหลอดเลือด รักษาการติดเชื้อไวรัสในมนุษย์และสัตว์ ได้ด้วย ดังนั้นผลการทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดจากมะเขือเทศที่สามารถยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทอาจเป็นผลจากสารสกัดที่ได้มีองค์ประกอบอื่น ๆ หรือมีสารชนิดอื่นที่พบร่วมกันในสารสกัดจากมะเขือเทศที่สามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี นอกเหนือจากวิตามินซีและวิตามินเอก็ได้

ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้

อุณหภูมิมีผลทำให้สารบางตัวสลายไป โดยเฉพาะวิตามินซีที่สลายตัวได้ง่ายเมื่อโดนความร้อน ดังนั้นในการสกัดสารจากมะเขือเทศจำเป็นต้องควบคุมอุณหภูมิ โดยใช้อุณหภูมิห้องเป็นมาตรฐาน สารองค์ประกอบบางตัวในสารสกัดจากมะเขือเทศอาจสลายไป เนื่องจากรังสียูวี ดังนั้นในขั้นตอนการสกัดควรทำภายใต้ตัวกรองรังสียูวีเพื่อเป็นการช่วยลดการสูญเสียสารองค์ประกอบที่สำคัญในมะเขือเทศ

การเก็บสารสกัดจากมะเขือเทศไว้เป็นระยะเวลานานๆ จะทำให้สารที่เป็นองค์ประกอบมีปริมาณเปลี่ยนแปลง ดังนั้นก่อนการศึกษาควรที่จะทดลองเก็บสารสกัดไว้เป็นระยะเวลาต่างๆ เพื่อที่จะวิเคราะห์ว่า สารที่เก็บนั้นมีปริมาณเปลี่ยนแปลงมากน้อยเพียงใด และเพื่อเป็นแนวทางที่จะคงสภาพสารองค์ประกอบให้คงที่

ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป

สารองค์ประกอบที่ได้จากสารสกัดเมื่อนำไปวิเคราะห์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงนั้นอาจให้ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบสารที่ไม่ครบถ้วนเพียงพอ ดังนั้นเพื่อความแม่นยำ ควรนำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง High-performance liquid chromatography (HPLC)

ควรมีการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอล หรือสารประกอบชนิดอื่น นอกจากวิตามินซี ที่สามารถพบได้ในผลมะเขือเทศ เพื่อหาสารที่เป็นปฏิภาคโดยตรงกับความเข้มข้นของสารสกัด

ผลผลิต
(Output)

ผลงานตีพิมพ์

การนำเสนอผลงานวิจัยชิ้นนี้ เพื่อเผยแพร่ผลงานวิจัยสู่สาธารณชน

- เสนอผลงานแบบโปสเตอร์ (Poster Presentation) หัวข้อเรื่อง Effect of antimicrobial activities of *Solanum lycopersicum* L. var. *cerasiforme* (การศึกษาผลของสารสกัดมะเขือเทศราชินี ต่อความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ) งานประชุมวิชาการเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ในโอกาสฉลองพระชนมายุ ๕ รอบ ๒ เมษายน ๒๕๕๘ การประชุมวิชาการโภชนาการแห่งชาติ ครั้งที่ ๙ “โภชนาการดีถ้วนหน้า ตามรอยพระบาทเจ้าฟ้านักโภชนาการ” 21-23 ตุลาคม 2558 ณ รอยัล พารากอน ฮอลล์ ชั้น 5 ศูนย์การค้าสยามพารากอน กรุงเทพฯ
- เสนอผลงานแบบโปสเตอร์ (Poster Presentation) หัวข้อเรื่อง Neural induction from Wharton’s jelly mesenchymal stem cells using LiCl. งานประชุมวิชาการ Genomics bioinformatics and system biology conference 2015, 10-11 กันยายน 2558, Bitec บางนา กรุงเทพฯ

บรรณานุกรม

บรรณานุกรมภาษาไทย

กิจจา ฤดีขจร. (2551). *คู่มือฉลาดใช้ วิตามิน แร่ธาตุและสมุนไพร*. พิมพ์ครั้งที่ 3. รีดเดอร์ส ไดเจสท์: กรุงเทพมหานคร.

จิราภรณ์ บุราคร และเรือนแก้ว ประพฤติ. (2555). *ผลของสารสกัดสมุนไพรพื้นบ้านไทยจำนวน 7 ชนิดต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Antibacterial Activities of Indigenous Vegetables.* [Online].แหล่งเข้าถึงข้อมูล http://thaicamdb.info/Downloads/PDF/ ผลของสารสกัดสมุนไพรพื้นบ้านไทย. สืบค้นเมื่อ 15 มกราคม 2556.

เจนจิรา จิรัมย์ และ ประสงค์ สีหานาม. (2554). อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ: แหล่งที่มาและกลไก การเกิดปฏิกิริยา. [Online]: แหล่งเข้าถึงข้อมูล http://www.journal.ksu.ac.th/managefiles/ สืบค้นเมื่อ 28 พฤศจิกายน 2557.

ชลดา จัดประกอบ และพรพนนผร เหล่าวชิระสุวรรณ. (2013). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธ์ของสารสกัดเห็ดหิ้งเกือกม้า. [Online]: แหล่งเข้าถึงข้อมูล http://pharm.kku.ac.th/isan-journal/journal/volumn9 -no1 / 0 0 2 - Proceeding/Page175- 179.pdf สืบค้นเมื่อ 28 พฤศจิกายน 2557.

ณัฐวุฒิ สิบหมู่. (2552). *เภสัชวิทยา: เนื้อหาสำคัญและแบบฝึกหัด*.โฮลิสติกพับลิสชิ่ง: กรุงเทพมหานคร.

วัชรินทร์ รังสีภาณุรัตน์. (2553). *การวินิจฉัยโรคติดเชื้อแบคทีเรียทางการแพทย์*. (พิมพ์ครั้งที่ 3). สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย: กรุงเทพมหานคร.

นภา หลิมรัตน์. (2550). *ตำราชีวเคมี*. พิมพ์ครั้งที่ 5.โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา: กรุงเทพมหานคร.

นเรศ วโรภาสตระกูล. (2551). *Candidiasis* [Online]. แหล่งเข้าถึงข้อมูล http://microbio.md.kku.ac.th/site_data/mykku_microbio/3/Lecture/Candidiasis/hai.pdf. สืบค้นเมื่อ 12 กุมภาพันธ์ 2556.

บังอร วงศ์รักษ์ และ ศศิลักษณ์ ปิยะสุวรรณ์. (2549). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผักพืชบ้าน. [Online]: แหล่ง เข้าถึงข้อมูล http://www.pharmacy.mahidol.ac.th. สืบค้นเมื่ 25 พฤศจิกายน 2557.

ไมตรี สุทธจิตต์. (2555). ความรู้พื้นฐานของออกซิเดชัน, น. 1-14, ใน วรพล เองวานิช (บรรณาธิการ), อนุมูล อิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ, คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยาร่วมกับสมาคมเพื่อการวิจัย อนุมูลอิสระไทย, สำนักพิมพ์ นวัตกรรมสุขภาพ, เชียงใหม่.

พรรณทิพย์ ฉายากุล. (2548). *ตำราโรคติดเชื้อ 2*. โฮลิสติก พับลิชชิ่ง จำกัด: กรุงเทพมหานคร.

ภัทรชัย กีรติสิน. (2549). *ตำราวิทยาแบคทีเรียทางการแพทย์*. ห้างหุ้นส่วนจำกัด วี.เจ.พริ้นติ้ง: กรุงเทพมหานคร.

วีณา จิรัจฉริยากูล. (2543). มะเขือเทศ. *จุลสารข้อมูลสมุนไพร*. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ฉบับที่ 17 (3). หน้า 3-11.

วินัย ดะห์ลัน. (2550). *โภชนาการพื้นฐานเพื่อการมีสุขภาพสมบูรณ์สูงสุด*. เอกสารประกอบคำบรรยาย [Online]. แหล่งเข้าถึงข้อมูล http://anti-aging.in.th/thread-9-1-1.html. สืบค้นเมื่อ 21 มีนาคม 2556

ศิริวรรณ สุทธจิตต์. (2550). *วิตามิน*. The Knowledge Center: กรุงเทพมหานคร.

ศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ. (2541). *ปัญหาและสถานการณ์การดื้อยา* [Online]: แหล่งเข้าถึงข้อมูล http://www.dmsc.moph.go.th/webroot/Secretary/Homepage/news48/August/6.htm สืบค้นเมื่อ 19 กุมภาพันธ์ 2556.

สถาบันการแพทย์แผนไทย กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. (2542). *สมุนไพรกับวัฒนธรรมไทย ตอนที่ 2 ไม้ริมรั้ว*. พิมพ์ครั้งที่ 2. องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก: กรุงเทพมหานคร.

สถาบันวิจัยสมุนไพร. (2554). *ผลิตภัณฑ์สมุนไพร* [Online]: แหล่งเข้าถึงข้อมูล http://www.dmsc.moph.go.th/webroot/plant/mpri/Product.shtm สืบค้นเมื่อ 19 กุมภาพันธ์ 2556.

สมทรง เลขะกุล. (2543). *ชีวเคมีของวิตามิน*. พิมพ์ครั้งที่ 2.ศุภวนิชการพิมพ์: กรุงเทพมหานคร.

สมหมาย ปะติตัง. (2553). การต้านอนุมูลอิสระและการต้านการเติบโตของแบคทีเรียของสารสกัดพญาวานร. [Online]: แหล่งเข้าถึงข้อมูล http://journal.hcu.ac.th/pdffile/jn-27.pdf สืบค้นเมื่อ 28 พฤศจิกายน 2557.

สุธาทิพ ภมรประวัติ. (2552). มะเขือเทศราชินี. *นิตยสารหมอชาวบ้าน*. เล่มที่ 359. [Online]: แหล่งเข้าถึงข้อมูล http://www.doctor.or.th/article/detail/5888 สืบค้นเมื่อ 19 กุมภาพันธ์ 2556.

อิสยา จันทร์วิทยานุชิต และ วัชรินทร์ รังษีภาณุรัตน์. (2551). *แบคทีเรียทางการแพทย์*. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย: กรุงเทพมหานคร.

บรรณานุกรมภาษาต่างประเทศ

Abdel-Hameed, E.S. (2009). Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian Ficus species leaf samples. *Food Chemistry*, 114, 1271–1277.

Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1993; 90(17): 7915-7922.

Barro D., Schinina M.E., Bossa F., Puget K. and Durosay P. (1990). A tetrameric iron superoxide dismutase from the eukaryote *Tetrahymena pyridornis*. *Journal of biological chemistry,* 265, 17680-17687.

Benvenuti S, Saccardi R, Luciani P, et al. (2006). Neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells: changes in the expression of the Alzheimer's disease-related gene seladin-1. *Exp Cell Res*, 312(13): 2592-2604.

Boileau TW, Liao Z, Kim S, et al. (2003). Prostate carcinogenesis in N-methyl-N-nitrosourea (NMU)-testosterone-treated rats fed tomato powder, lycopene, or energy-restricted diets. *J Natl Cancer Inst*, 95(21): 1578-1586.

Bordo D., Djinovic K. and Bolognesi M. (1994). Conserved patterns in the Cu, Zn superoxide dismutase family. *J Mol Biol.,* 238(3), 366-386.

Carlsson L.M., Jonsson J., Edlund T. and Marklund S.L. (1995). Mice lacking extracellular superoxide dismutase are more sensitive to hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA,* 92, 6264-6268.

Carvilla LM, Blasco B, Rios JJ, et al. (2007) Oxidative stress and antioxidants in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants subjected to boron toxicity. *Ann Bot* 100(4): 747-756.

Choi CB, Cho YK, Prakash KV, et al. (2006). Analysis of neuron-like differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 350(1): 138-46.

Cho KJ, Trzaska KA, Greco SJ, et al. (2005). Neurons derived from human mesenchymal stem cells show synaptic transmission and can be induced to produce the neurotransmitter substance P by interleukin-1 alpha. *Stem Cells*, 23(3): 383-91.

Chonanant C, Jearanaikoon N, Leelayuwat C, et al. (2011). Characterisation of chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells using synchrotron FTIR microspectroscopy. *Analyst*, 136(12): 2542-51.

Di Mascio P, Kaiser S, Sies H, et al. *(*1989). Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys*, 274(2): 532-538.

Fridovich I. (1986). Superoxide dismutases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.,* 58, 61-97.

Fuhrman B, Ben-Yaish L, Attias J, et al. (1997). Tomato lycopene and beta-carotene inhibit low density lipoprotein oxidation and this effect depends on lipoprotein vitamin E content. *Nutr Metab Cardiovasc Dis,* 7: 433-443.

Giovannucci E, Ascherio A, Rimm EB, et al. (1995). Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. *J Natl Canc Inst,* 87: 1767-1776.

Grant WB, et al. (1999). An ecologic study of dietary links to prostate cancer. *Altern Med Rev,* 4(3): 162-169.

Hulten K, Van Kappel AL, Winkvist A, et al. (2001). Carotenoids, alpha-tocopherols, and retinol in plasma and breast cancer risk in northern Sweden. *Cancer Causes Control,* 12(6): 529-537.

Ilahya R, Hdiderb C, Lenucci MS, et al. (2011) Phytochemical composition and antioxidant activity of high-lycopene tomato (*Solanum lycopersicum L.*) Cultivars grown in Southern Italy Giuseppe Dalessandroc Scented Horticulturae.127: 255–261.

Indrawattana N, Chen G, Tadokoro M, et al. (2004). Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell. *Biochem Biophys Res Commun*, 320(3): 914-9.

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418(6893): 41-9.

Kanematsu S. and Asada K. (1979). Ferric and manganic superoxide dismutases in *Euglena gracilis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics,* 195, 535-545.

Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Jiang Y, et al. (2003). Neural differentiation and incorporation of bone marrow-derived multipotent adult progenitor cells after single cell transplantation into blastocyst stage mouse embryos. *Cell Transplant.*; 12(3): 201-13.

Krampera M, Marconi S, Pasini A, et al. (2007). Induction of neural-like differentiation in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, fat, spleen and thymus. *Bone*, 40(2): 382-90.

Levy J, Bosin E, Feldman B, et al. (1995). Lycopene is a more potent inhibitor of human cancer cell proliferation than either a-carotene or b-carotene. *Nutr Cancer*, 24: 257-267.

Luengthanaphol, S., Mongkholkhajornsilp, D., Douglas, S., Douglas, P.L., Pengsopa, L., & Pongamphai, S., (2004). Extraction of antioxidants from sweet Thai tamarind seed coat–preliminary experiments. *Journal of Food Engineering*, 63, 247–252.

Nahum A, Hirsch K, Danilenko M, et al. (2001). Lycopene inhibition of cell cycle progression in breast and endometrial cancer cells is associated with reduction in cyclin D levels and retention of p27(Kip1) in the cyclin E-cdk2 complexes. *Oncogene*, 20(26): 3428-3436.

Odriozola-Serrano I, Aguilo-Aguayo I, Soliva-Fortury R, et al. (2007) Lycopene, vitamin C, and antioxidant capacity of tomato juice as affected by high-intensity pulsed electric fields critical parameters. *J Agric Food Chem* 55(22): 9036-9042.

Phillips KM, Tarrgo-Trani MT, Gebhardt SE, et al. (2010) Stability of vitamin C in frozen raw fruit and vegetable homogenates. *J. Food Comp.* Anal 23, 253– 259.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411): 143-7.

Ribaya Mercado JD, Garmyn M, Gilchrest BA, et al. (1995). Skin lycopene is destroyed preferentially over beta-carotene during ultraviolet irradiation in humans. *J Nutr,* 125(7): 1854-1859.

Riso P, Visioli F, Grande S, et al. (2006). Effect of a tomato-based drink on markers of inflammation, immunomodulation, and oxidative stress. *J Agric Food Chem*. 54(7): 2563-2566.

Ronco A, De Stefani E, Boffetta P, et al. (1999). Vegetables, fruits, and related nutrients and risk of breast cancer: a case-control study in Uruguay. *Nutr Cancer,* 35(2): 111-119.

Ronald R.E. (2008). *Vitamin analysis for the health and food sciences.* United States of American on acid-free paper.

Sandstrom J., Nilsson P., Karlsson K. and Marklund S.L. (1994). 10-fold increase in human plasma extracellular superoxide dismutase content caused by a mutation in heparin- binding domain. *J. Biol. Chem,* 269(29), 19163-19166.

Sherr CJ, et al. (1995). D-type cyclins. *Trends Biochem Sci,* 20(5): 187-190.

Sesso HD, Buring JE, Norkus EP, et al. (2004). Plasma lycopene, other carotenoids, and retinol and the risk of cardiovascular disease in women. *Am J Clin Nutr,* 79(1): 47-53.

Sudjaroen,Y., Haubner, R.,W¨urtele, G., Hull,W.E., Erben, G., Spiegelhalder, B., Changbumrung, S., Bartsch, H., & Owen, R.W. (2005). Isolation and structure elucidation of phenolic antioxidants from Tamarind (Tamarindus indica L.) seeds and pericarp. *Food and Chemical Toxicology*, 43,1673–1682.

Stahl W, Sies H, et al. (1992). Uptake of lycopene and its geometrical isomers is greater from heat-processed than from unprocessed tomato juice in humans. *J Nutr,* 122(11): 2161-2166.

Taveira M, Silva LR, Vale-silva LA, et al. (2010) Lycopersicon esculentum Seeds: An Industrial Byproduct as an Antimicrobial Agent. *J. Agric. Food Chem,* 58: 9529-9536.

Tsubono Y, Tsugane S, Gey KF, et al. (1999). Plasma antioxidant vitamins and carotenoids in five Japanese populations with varied mortality from gastric cancer. *Nutr Cancer,* 34(1): 56-61.

Wang Y, Sun Z, Qiu X, et al. (2009). Roles of Wnt/beta-catenin signaling in epithelial differentiation of mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 390(4): 1309-14.

Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, et al. (2000). Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*, 61(4): 364-70.

Zelko I.N., Mariani T.J. and Folz R.J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD-1), Mn-SOD (SOD-2) and EC-SOD (SOD-3) gene structures, evolution and expression. *Free Radical Med Biol,* 33, 337-349.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมี

1. 0.85 % Normal Saline Solution

ประกอบด้วย

NaCl	0.85	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ชั่ง NaCl จำนวน 0.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไป autoclaved ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. 0.1 g/mL Vitamin C

ประกอบด้วย

Vitamin C	1	กรัม
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

ชั่ง Vitamin C จำนวน 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3. 3M H_2SO_4

ประกอบด้วย

H_2SO_4	11.20	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	88.80	มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลายกรดซัลฟิวริก 11.20 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 88.80 มิลลิลิตร

4. การวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD)

a. เตรียม WST working solution ปริมาตร 20 ml

- WST solution 1 ml
- Buffer solution 19 ml

b. เตรียม Enzyme working solution

Centrifuge the Enzyme solution tube 5 วินาที จากนั้น Mix ด้วย Auto pipette

- Enzyme solution 15 µl

- Dilution buffer 2.5 ml

c. เตรียม SOD solution ที่ความเข้มข้น 0.001 – 200 U/ml

ความเข้มข้น (U/ml)	Enzyme solution (µl)	Dilution buffer (µl)
0.001	10	90
0.01	20	80
0.05	50	50
0.1	10	90
1	20	80
5	50	50
10	50	50
20	40	60
50	50	50
100	50	50
200	33.33	66.67

ภาคผนวก ข
การตรวจหายาฆ่าแมลงในมะเขือเทศ

วัสดุ-อุปกรณ์

1.	ขวดพลาสติก (สำหรับสกัด)	1	ขวด
2.	หลอดทดสอบชนิดแก้ว	1	ขวด
3.	หลอดทดสอบชนิดพลาสติก	2	ขวด
4.	หลอดหยดขนาด 3 cc.	3	อัน
5.	บีกเกอร์	1	อัน

สารเคมี

1.	น้ำยาสกัด	1	ขวด
2.	น้ำกลั่น	1	ขวด
3.	น้ำยาทดสอบ 1	1	ขวด
4.	น้ำยาทดสอบ 2	1	ขวด
5.	น้ำยาทดสอบ 3	1	ขวด

วิธีการทดสอบ

1. หั่นผักหรือผลไม้ที่จะทดสอบให้เป็นชิ้นเล็กๆใส่ลงในขวดตัวอย่างให้ได้ 3 ขีดของขวด
2. เติมน้ำยาสกัด 6 ซีซี.ปิดผาขวดให้แน่น เขย่าแรงๆประมาณ 2 นาที
3. ค่อยๆเปิดฝาขวด รินน้ำยาสกัดลงในหลอดแก้วจนหมด
4. จุ่มหลอดแก้วลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำอุ่นอยู่ประมาณครึ่งแก้ว เพื่อระเหยน้ำยาสกัดออก
5. ขณะรอน้ำยาสกัดระเหย เติมน้ำกลั่น 1 ซีซี.ลงในขวดน้ำยาทดสอบ 1ตั้งทิ้งไว้
6. แกว่งหลอดที่จุ่มอยู่ในบีกเกอร์น้ำอุ่นจนน้ำยาสกัดเหลือประมาณ 1 หยด ยกออกหมุนจนหลอดแห้ง

7. เติมน้ำยาทดสอบ 2 ลงในหลอดแก้วข้อ 6 และหลอดควบคุม หลอดละ 3 ซีซี.
8. เติมน้ำยาทดสอบ 1 ที่เตรียมไว้ลงในหลอดแก้วและหลอดควบคุม หลอดละ 2 หยด เขย่าและตั้งทิ้งไว้
9. รินน้ำยาออกจากหลอดแก้วลงในขวดพลาสติก (หลอดตัวอย่าง)
10. เติมน้ำยาทดสอบ 3 ลงในหลอดตัวอย่างและหลอดควบคุม หลอดละ 2 หยด เขย่าให้เข้ากัน จับเวลา สังเกตสีที่เกิดขึ้นที่เวลา 5 นาทีพอดี

การอ่านผล

อ่านผลการทดสอบสีสารละลายที่เกิดขึ้นในหลอดตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับสีของหลอดควบคุม

หลอดควบคุม สีส้มเข้ม แปลผล ปลอดภัย

การแปลผล

สีส้มเข้มเหมือนหลอดควบคุม	ปลอดภัย
สีส้ม ปน ชมพู	ไม่ปลอดภัย
สีชมพู	ไม่ปลอดภัยมาก

ประวัติผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ชื่อ-สกุล	นิรมล ธรรมวิริยสติ Niramon Thamwiriyasati
คุณวุฒิ	ปร.ด.(อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม) มหาวิทยาลัยมหิดล
ตำแหน่งปัจจุบัน	อาจารย์
หน่วยงานที่สังกัด	สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ที่อยู่	169 ถ. ลงหาดบางแสน ต. แสนสุข อ. เมืองฯ จ. ชลบุรี 20131
โทรศัพท์	038-103-166
โทรศัพท์เคลื่อนที่	081-713-1556, 082-685-4567
โทรสาร	038-393-497
E-mail	niramon25@yahoo.com, niramon@buu.ac.th
สาขาวิชาที่มีความชำนาญ	Biochemistry and Molecular Biology, Bacterial Protein Toxins, Clinical chemistry, Microbiology

ผลงานที่เผยแพร่/ตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการทั้งในระดับชาติและนานาชาติ

1. Juntapremjit S, **Thamwiriyasati N**, Kurehong C, Prangkio P, Shank L, Powthongchin B, Angsuthanasombat C. Functional importance of the Gly cluster in transmembrane helix 2 of the *Bordetella pertussis* CyaA-hemolysin: implications for toxin oligomerization and pore formation. **TOXICON** 2015: 1-6. (Accepts: Manuscript Number: TOXCON-D-15-00247R1)
2. **Thamwiriyasati N**, Angsuthanasombat C. Kinetic characterization of the **CyaC enzyme** that activates *Bordetella pertussis* CyaA pore-forming toxin. Proceeding in Burapha University International Conference 2015, Bangsaen, Chonburi, Thailand: July 10th-12th, 2015.

3. **นิรมล ธรรมวิริยสติ**. การปรากฏขึ้นอีกครั้งของโรคไอกรน: ปัญหาและแนวทางการควบคุม. *ธรรมศาสตร์เวชสาร*, ๑๔(๒), ๒๓๗-๒๔๖.
4. **Thamwiriyasati N**, Angsuthanasombat C. *p*-Nitrophenyl palmitate mimics acyl-ACP as the acyl donor for activating proCyaA-PF *in vitro* by CyaC-acyltransferase. Proceeding in the 7th AOHUPO and the 9th International Symposium of the Protein Society of Thailand: August 6th -8th, 2014.
5. Yentongchai M, Angsuthanasombat C, **Thamwiriyasati N**. Generation of the *Bordetella pertussis* CyaA toxin fragment containing the hydrophobic region with an acylation site for structure-folding studies. Proceeding in Burapha University International Conference, Burapha University, Thailand: July 4th -5th, 2013. HSP342-9: page 706-712.
6. Kurehong C, Powthongchin B, **Thamwiriyasati N**. & Angsuthanasombat, C. Functional significance of the highly conserved Glu^{570} in the putative pore-forming helix 3 of the *Bordetella pertussis* haemolysin toxin. *Toxicon* 2011; 57: 897-903.
7. Pojanapotha P, **Thamwiriyasati N**, Powthongchin B, Katzenmeier G, Angsuthanasombat C. *Bordetella pertussis* CyaA-RTX subdomain requires calcium ions for structural stability against proteolytic degradation. *Protein Expr Purif* 2010; 75(2): 127-132.
8. **Thamwiriyasati N**, Sakdee S, Chuankhayan P, Katzenmeier G, Chen C.J, Angsuthanasombat C. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of a full-length active form of Cry4Ba toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Acta Crystallogr F* 2010; 66: 721-724.

9. **Thamwiriyasati N**, Powthongchin B, Kittiworakarn J, Katzenmeier G, Angsuthanasombat C. Esterase activity of *Bordetella pertussis* CyaC-acyltransferase against synthetic substrates: Implications for catalytic mechanism *in vivo*. *FEMS Microbiol Letters* 2010; 304(2): 183-190.
10. Ruchiwit K., **Thamwiriyasati N**., Sukavest P. & Na-Ubol M. The isolation of *Vibrio cholerae* in the lower Chao Phraya River: virulence genes and DNA patterns. *J. Med Tech Assoc. Thailand* 2003, 31: 450-62.

ผู้ร่วมงานวิจัย

ชื่อ-สกุล	จิราพร จรอนันต์
	Chirapond Chonanan
คุณวุฒิ	ปร.ด. (ชีวเวชศาสตร์) มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ตำแหน่งปัจจุบัน	อาจารย์
หน่วยงานที่สังกัด	สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ที่อยู่	169 ถ. ลงหาดบางแสน ต. แสนสุข อ. เมืองฯ จ. ชลบุรี 20131
โทรศัพท์	038-103-167
โทรศัพท์เคลื่อนที่	085-855-0460
โทรสาร	038-393-497
E-mail	chirapond@buu.ac.th, chirapond1502@hotmail.com
สาขาวิชาที่มีความชำนาญ	

ผลงานที่เผยแพร่/ตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการทั้งในระดับชาติและนานาชาติ

1. Chirapond Chonanant, Niramon Thamwiriyasati, Wilairat Leeanansaksiri. Neural induction from Wharton's jelly mesenchymal stem cells using LiCl. In Abstract of Genomics bioinformatics and system biology conference 2015; September 10-11, 2015, Bangkok, Thailand. (Fund: ทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทเงินรายได้ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2556 คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา)

2. **Chonanant C**, Bambery K, Jearanaikoon N, Chio-Srichan S, Limpaiboon T, Tobin M, et al. Discrimination of micromass-induced chondrocytes from human mesenchymal stem cells by focal plane array-Fourier transform infrared microspectroscopy. **Talanta**. 2014 Jun 130; 39–48. **(**Fund: Strategic Scholarships for Frontier Research Network grant from the Office of the Higher Education Commission, Thailand and Synchrotron Light Research Institute (Public Organization), Thailand.**)**
3. **Chonanant C**, Jearanaikoon N, Leelayuwat C, Limpaiboon T, Tobin MJ, Jearanaikoon P, et al. Characterisation of chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells using synchrotron FTIR microspectroscopy. **Analyst.** 2011 Jun 21; 136(12): 2542-51. **(**Fund: Strategic Scholarships for Frontier Research Network grant from the Office of the Higher Education Commission, Thailand and Synchrotron Light Research Institute (Public Organization), Thailand.

ผู้ร่วมงานวิจัย

ชื่อ-สกุล	ปองรุ้ง จันทรเจริญ Pongrung Chancharoen
คุณวุฒิ	วท.ม. (สรีรวิทยา) มหาวิทยาลัยมหิดล
ตำแหน่งปัจจุบัน	อาจารย์
หน่วยงานที่สังกัด	คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ที่อยู่	169 ถ. ลงหาดบางแสน ต. แสนสุข อ. เมืองฯ จ. ชลบุรี 20131
โทรศัพท์	038 745900 ต่อ 3166
โทรศัพท์เคลื่อนที่	087-863-8588
โทรสาร	038-393-497
E-mail	pongrung@buu.ac.th, porpia101@hotmail.com
สาขาวิชาที่มีความชำนาญ	กายภาพบำบัด, สรีรวิทยาระบบประสาท

ผลงานที่เผยแพร่/ตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการทั้งในระดับชาติและนานาชาติ

1. **Chancharoen P.**, Tilokskulchai K., Tantisira M., & Chompoopong S. Piperine and cognitive performance of discriminative learning task in rats with mild chronic cerebral hypoperfusion. Proc. Thai Neuroscience Society Conference. 2010, 27.