รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหลังจากถูกย่อยและดูดซึมผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ของน้ำชาขลู่

Antioxidative effect after digestion and absorption through intestinal epithelial cells of *Pluchea indica* Less. tea

โดย

ดร.ชัชวิน เพชรเลิศ

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๘
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2558A10802009

สัญญาเลขที่ 56/2558

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหลังจากถูกย่อยและดูดซึมผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ของน้ำชาขลู่

Antioxidative effect after digestion and absorption through intestinal epithelial cells of *Pluchea indica* Less. tea

โดย

ดร.ชัชวิน เพชรเลิศ

สิงหาคม พ.ศ. ๒๕๖๐

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยการได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก ทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๘

ผู้วิจัยต้องขอขอบคุณ รศ.ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข จากภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาที่ได้ให้คำปรึกษาในการทำวิจัยมาตั้งแต่ต้นจนทำให้งานวิจัยเรื่องนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

นอกจากนี้ยังต้องขอบคุณนิสิตชั้นปีที่ ๔ ของภาควิชาชีวเคมี และนิสิตระดับบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ ทุกคนที่ร่วมมือร่วมใจกันในการทำวิจัยจนทำให้ได้ผลการวิจัยอันน่าพึงพอใจ ตลอดจนคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ของภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้คำแนะนำและคอยช่วยเหลือในเรื่องอุปกรณ์และสารเคมีบางส่วนในโครงการวิจัยนี้

ดร.ชัชวิน เพชรเลิศ
หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหลังจากถูกย่อยและดูดซึมผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ของน้ำชาขลู่

ชื่อโครงการ (ภาษาอังกฤษ) Antioxidative effect after digestion and absorption through intestinal epithelial cells of Pluchea indica Less. tea

หัวหน้าโครงการวิจัย ดร.ชัชวิน เพชรเลิศ

บทคัดย่อ

ขลู่เป็นพืชไม้พุ่มที่พบมากตามพื้นที่ป่าชายเลนในประเทศอินเดีย บังคลาเทศ เมียนมาร์ จีน ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย ประเทศไทย และออสเตรเลีย ขลู่เป็นพืชที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ อย่างไรก็ตาม การศึกษาถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบชาขลู่หลังจากที่ถูกย่อยยังไม่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้ ดังนั้น การศึกษานี้จึงต้องการที่จะศึกษาฤทธิ์ดังกล่าวของชาขลู่ทั้งก่อนและหลังการย่อยในหลอดทดลอง รวมทั้งเมื่อถูกดูดซึมโดยเซลล์ Caco-2 ซึ่งฤทธิ์ดังกล่าวจะถูกตรวจสอบโดยใช้วิธี DPPH radical scavenging assayนอกจากนี้ยังมีการหาปริมาณฟีนอลรวมและฟลาโวนอยด์รวมด้วยจากการศึกษาพบว่า ชาขลู่ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml ก่อนที่จะถูกย่อยแสดงฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH ถึง 84.77%. ค่า IC_{50}ถูกนำมาพิจารณาเพื่อแสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ดังกล่าว โดยค่า IC_{50}ของชาขลู่ในสภาวะการย่อยของลำไส้เล็กมีค่าน้อยที่สุดคือ 0.0187±0.008 mg/ml เมื่อเปรียบเทียบกับในสภาวะการย่อยที่ปากและกระเพาะอาหาร จากนั้นทำการศึกษาฤทธิ์ดังกล่าวหลังจากถูกดูดซึมโดยเซลล์ Caco-2 ผลการทดลองพบว่า ชาขลู่น่าจะถูกดูดซึมได้โดยเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้จึงส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลลดลงทางด้านล่างของ transwellอย่างไรก็ตาม ชาขลู่ยังคงมีฤทธิ์ดังกล่าวแม้ว่าจะน้อยลงกว่าด้านบนของ transwell ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่า ปริมาณฟีนอลและฟลาโวนอยด์รวมของชาขลู่ก่อนการย่อยมีปริมาณที่ค่อนข้างสูง (196.56±0.02 และ 243.75±0.01 mg QE/g extractตามลำดับ) แต่ปริมาณฟีนอลรวมของชาขลู่หลังการย่อยกลับลดลงประมาณ 7เท่าส่วนปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของชาขลู่ลดลงหลังการย่อยที่ปากและกระเพาะอาหารแต่กลับเพิ่มขึ้นหลังการย่อยที่ลำไส้เล็กเป็น 286.58±0.05 mg QE/g extractหลังการดูดซึมผ่านเซลล์ Caco-2 ชาขลู่สามารถผ่านเซลล์ลงไปยังด้านล่าง (basolateral side) ได้ อย่างไรก็ตาม ปริมาณฟีนอลและฟลาโวนอยด์รวมก็ลดลงอย่างเห็นได้ชัดทั้งทางด้านบนและด้านล่างของ transwellโดยสรุป ชาขลู่น่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการดูแลสุขภาพของผู้บริโภคได้

Abstract

Pluchea indica Less. is an evergreen large shrub found abundantly in salt marshes and mangrove swamps in India, Bangladesh, Myanmar, China, the Philippines, Malaysia, Thailand and Australia. *P. indica* is a plant with anti-inflammatory and antioxidant medicinal properties. However, antioxidant activity of *P. indica* tea extract (PITE) after *in vitro* digestion have not ever been studied. This study aimed to investigate antioxidant activity of PITE both pre and post-*in vitro* digestion including absorption by Caco-2 cells. Such activities were performed using DPPH radical scavenging assay, total phenolic and total flavonoid contents. Pre-digestion of PITE at 0.1 mg/ml showed a strong scavenging activity on DPPH by 84.77%. When IC_{50} was considered to indicate the potential of this activity, the value in the intestinal digestion had the lowest value with 0.0187±0.008 mg/ml when compared to all phases. DPPH radical scavenging activity of PITE has been studied across Caco-2 cell monolayers. The results showed that PITE might be accessible via the epithelial cells that resulted in the reduction of percent scavenging activity in the basolateral side of transwell. However, *P. indica* tea was still effective for this activity. In addition, total phenolic and total flavonoid contents of PITE in pre-digestion showed high amount were 196.56±0.02 and 243.75±0.01 mg QE/g extract, respectively. Total phenolic content of PITE in post-digestion decreased nearly seven folds. Total flavonoid content of PITE was attenuated in oral and gastric digestion, but it increased after intestinal digestion (286.58±0.05 mg QE/g extract). Then total phenolic and total flavonoid content of PITE has been studied across Caco-2 monolayers. PITE could pass through the Caco-2 cells to basolateral side. However, total phenolic and total flavonoid contents were significantly decreased in the apical and basolateral sides. In conclusion, *P. indica* tea may be considered as an alternative healthcare to consumers.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อ	ง
สารบัญ	ฉ
สารบัญภาพ	ช
สารบัญตาราง	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	7
บทที่ 3 ผลการวิจัย	13
บทที่ 4 อภิปราย และสรุปผลการทดลอง	20
รายงานสรุปการเงิน	26
บรรณานุกรม	27
ประวัตินักวิจัย	31

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 3-1	การกำจัดอนุมูล DPPH ของน้ำชาใบขลู่ก่อนการย่อย	14
ภาพที่ 3-2	ฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH ของชาใบขลู่หลังจากผ่านการย่อยมาสู่เซลล์ Caco-2 นำเซลล์มาบ่มกับน้ำชาใบขลู่เป็นเวลา 3 ชั่วโมงบน transwellsจากนั้นสารละลายทั้งจากด้านบนและด้านล่างจะถูกนำมาศึกษาฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH หลังผ่านการดูดซึม	17
ภาพที่ 3-3	ปริมาณฟีนอลรวมของชาใบขลู่หลังผ่านการย่อยในหลอดทดลองมาสู่การดูดซึมโดยเซลล์ Caco-2 เซลล์ถูกบ่มพร้อมกับชาใบขลู่เป็นเวลา 3 ชั่วโมงบน transwells จากนั้นสารละลายทั้งจากส่วนบนและส่วนล่างของเซลล์ถูกนำมาหาปริมาณฟีนอลรวมหลังการดูดซึมผ่านเซลล์ TA98 และ TA100 ที่บ่มกับสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน	18
ภาพที่ 3-4	ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของชาใบขลู่หลังผ่านการย่อยในหลอดทดลองแล้วนำมาบ่มกับเซลล์ Caco-2 เป็นเวลา 3 ชั่วโมงบน transwells จากนั้นนำสารละลายจากทั้งด้านบนและด้านล่างถูกนำมาศึกษาการดูดซึมของสารประกอบฟลาโวนอยด์	19

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 3-1	ปริมาณสารสกัดและ %yield ของการสกัดชาขลู่แต่ละครั้ง	13
ตารางที่ 3-2	ฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH ของน้ำชาใบขลู่ทั้งก่อนและหลังการย่อยในหลอดทดลอง(*in vitro* digestion)	15
ตารางที่ 3-3	ฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH ของเควอร์เซตินทั้งก่อนและหลังการย่อยในหลอดทดลอง	15
ตารางที่ 3-4	ปริมาณฟีนอลรวมและฟลาโวนอยด์รวมของชาใบขลู่หลังดูดซึมผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ Caco-2 (ใช้ความเข้มข้นที่0.0219 mg/ml และใช้ quercetin เป็นสารมาตรฐาน)	19

บทที่ 1

บทนำ

1.1 เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน

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

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

มีการค้นพบสารพฤกษเคมีในขลู่ เช่น สารประกอบฟีนอล(phenolic compounds) ที่มีฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชัน ลดความเสี่ยงจากอนุมูลอิสระที่เข้าไปทำลายเซลล์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดต่างๆ มีความสำคัญในการยับยั้งการเกิดมะเร็ง และมีคุณสมบัติต้านหรือยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ของสารก่อกลายพันธุ์ได้ในปริมาณที่เหมาะสม Traithip (2005) ศึกษาสารพฤกษเคมีของส่วนสกัดเอทานอลจากใบขลู่ และศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูล

อิสระด้วยวิธี DPPH scavenging assay พบว่าสารสกัดของใบขลู่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีโดยมีค่า EC_{50} = 6.92 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ Sen และคณะ (2002) นำส่วนสกัดเมทานอลของรากขลู่มาทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันที่เกิดจากการเหนี่ยวนำโดยคาร์บอนเตตระคลอไรด์ (CCl_4) พบว่า สารสกัดจากขลู่มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลไฮดรอกซี อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยมีค่า IC_{50} = 10.77, 165.62 และ 61.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้นจึงน่าสนใจเป็นอย่างยิ่งที่จะศึกษาเพื่อให้เข้าใจกลไกในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดและส่วนสกัดต่างๆ ของใบขลู่

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

1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

การศึกษาวิจัยเพื่อค้นหาสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ เป็นสิ่งที่สำคัญ หากแต่การศึกษาหาสิ่งที่จะนำมารักษาหรือลดความเสี่ยงของการเกิดโรคโดยเฉพาะสารที่ได้รับจากธรรมชาตินั้นน่าจะยิ่งมีความสำคัญมากกว่า ภายใต้ภาวะของอุบัติการณ์ของโรคร้ายต่างๆ ที่มีอยู่ในปัจจุบันโดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคเรื้อรังอันเกิด

จากความไม่สมดุลของสารต่างๆ ภายในร่างกาย รูปแบบการดำรงชีวิตที่เปลี่ยนไป รูปแบบการบริโภคอาหารที่ล้วนเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคเหล่านี้แทบทั้งสิ้น

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

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

ประเทศไทยเป็นประเทศในเขตร้อนชื้นซึ่งมีความหลากหลายของพืชสมุนไพรมากที่สุดแห่งหนึ่งของโลก โดยเฉพาะในเขตภาคตะวันออกของประเทศไทยที่เป็นเขตป่าดิบชื้นและป่าชายเลนที่มีความหลากหลายของระบบนิเวศน์และพันธุ์ไม้ต่างๆ อย่างอุดมสมบูรณ์ เป็นแหล่งสำคัญของสมุนไพรมาโดยตลอด นอกจากนี้ยังมีหมอยาพื้นบ้านและองค์ความรู้ที่ใช้สมุนไพรในการรักษาโรคต่างๆ จนถึงปัจจุบัน

ขลู่ (*Pluchea indica* Less.) เป็นพืชในวงศ์ Compositae (Asteraceae) ลักษณะเป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก ขึ้นอยู่รวมกันเป็นกอ มีกิ่งก้านสาขามาก สูง 1-1.5 เมตร มักชอบขึ้นริมน้ำตอนบนป่าชายเลน มีมากใน

จังหวัดจันทบุรี เติบโตได้รวดเร็วในทุกฤดูกาล แตกกิ่งก้านใหม่ได้มากขึ้นเมื่อมีการหักกิ่งก้านไปใช้ มีประโยชน์ทางด้วยสมุนไพรในทุกส่วนของต้น โดยเฉพาะใบมีฤทธิ์แก้อักเสบ แก้แผลอักเสบ แก้โรคริดสีดวงทวาร แก้โรคบิด ขับเหงื่อ แก้เบาหวาน จากการศึกษาเก็บข้อมูลเบื้องต้นจากกลุ่มวิสาหกิจชุมชน ที่เกิดการรวมตัวจากเวทีประชาพิจารณ์โครงการส่งเสริมจัดทำแผนการจัดการทรัพยากรชีวภาพระดับสถาบันและท้องถิ่น เทศบาลตำบลบ่อ อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี ได้พบว่าชาวบ้านรวมตัวกันทำผลิตภัณฑ์สบู่เหลว ผงสปาขัดผิว ครีมขัดผิวหน้าจากใบขลู่ รวมทั้งมีการทำชาใบขลู่ออกจำหน่าย แต่มีปัญหาในเรื่องการขาดหลักฐานทางวิทยาศาสตร์มารองรับการนำไปใช้ จึงทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะทำการศึกษาผลของน้ำชาใบขลู่ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และเปรียบเทียบฤทธิ์ดังกล่าวหลังจากถูกย่อยและดูดซึมผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่ช่วยสนับสนุนการใช้สมุนไพรพื้นบ้านจากขลู่ และเพื่อลดการนำเข้ายาและอาหารเสริมสุขภาพจากต่างประเทศ นอกจากนี้อาจได้สารที่จะนำพัฒนาเป็นยาต้นแบบรักษาโรคต่างๆ ต่อไป

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อแยกส่วนสกัดหยาบจากใบขลู่ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
2. เพื่อวิเคราะห์และเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระก่อนและหลังจากถูกย่อยและดูดซึมผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ของน้ำชาขลู่ที่เก็บมาจากจันทบุรี

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

นำชาใบขลู่จากกลุ่มวิสาหกิจชุมชน โครงการส่งเสริมจัดทำแผนการจัดการทรัพยากรชีวภาพระดับสถาบันและท้องถิ่น เทศบาลตำบลบ่อ อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี มาต้มให้เป็นลักษณะของน้ำชาที่ใช้ดื่มโดยทั่วไป ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ทั้งก่อนและหลังจากถูกย่อยและดูดซึมผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ (Caco-2 cell lines)

1.5 วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุป ทฤษฎี และ/หรือ แนวทางความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย

ขลู่ (*Pluchea indica* Less.) เป็นพืชในวงศ์ Compositae เป็นสมุนไพรที่ใช้ในงานสาธารณสุขมูลฐานของประเทศไทย มีสรรพคุณทางยาหลายด้าน เช่น รักษาผดผื่นคัน ลดระดับน้ำตาลในเลือด ความดัน และโรคหัวใจ รักษาอาการ ขัดเบา ปัสสาวะพิการ ขับปัสสาวะ ริดสีดวงทวาร แก้กระษัย ขับนิ่ว ขับปัสสาวะ ใช้เป็นยาอายุวัฒนะ แก้ไข้ขับเหงื่อ และแก้เบาหวาน รักษาอาการเส้นตึง หรือนำมาทำเป็นขี้ผึ้งรักษาแผลเรื้อรัง

ใบสดตำพอกบริเวณที่เป็นแผล แก้อักเสบ แก้ริดสีดวงจมูก ขับนิ่วในทางเดินปัสสาวะ ใบและราก แก้โรคบิด ขับเหงื่อ แก้แผลอักเสบ รากสดตำพอกบริเวณแผล (มาโนช วามานนท์, เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ, 2540) ในมาเลเซีย หมอยาสมุนไพรเชื่อว่าใบขลู่ (*Pluchea indica (L.)* Less) ใช้รักษาโรคบิด ไขข้ออักเสบ ระงับกลิ่นปากและลมหายใจ ระงับกลิ่นตัว แผลพุพองและแผลเปื่อย ส่วนของรากใช้รักษาอาการไข้ อาหารไม่ย่อย และปวดศีรษะ (Ong, 2004) ปัจจุบันจึงมีการนำขลู่มาทำเป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพ เช่น ชาขลู่ ผงขัดผิวเพื่อใช้ทำสปาผิว สบู่ ยาสระผม กันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในท้องถิ่นที่มีพื้นที่ป่าชายเลน ซึ่งเป็นพื้นที่ที่เหมาะสำหรับการเจริญของต้นขลู่ ถึงแม้ว่าจะเป็นที่ทราบกันดีในกลุ่มหมอยาและแพทย์แผนไทยว่าขลู่มีสรรพคุณต่างๆ มากมาย แต่หลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่มีรายงานส่วนใหญ่มักจะเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติในการลดน้ำตาล ลดความดัน และการขับปัสสาวะ และรายงานจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ว่าน้ำยาชงขลู่ไม่มีความเป็นพิษเฉียบพลันในหนูถีบจักร (มาโนช วามานนท์, เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ, 2540) แต่ข้อมูลเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชันยังมีค่อนข้างจำกัด และการนำไปใช้ในระดับเซลล์อย่างไรนั้นยังไม่พบข้อมูลในส่วนนี้มาก่อน ซึ่งทำให้เกิดข้อกังขาได้ว่าการรับประทานผลิตภัณฑ์จากขลู่เป็นประจำเพื่อใช้เป็นยาอายุวัฒนะจะมีผลต่อกระบวนการต่างๆ เหล่านี้หรือไม่ สารที่ได้จากขลู่จะสามารถถูกย่อย ดูดซึม และขนส่งผ่านเซลล์ลำไส้ได้มากน้อยเพียงใด ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะทดสอบสมมติฐานดังกล่าวซึ่งข้อมูลที่ได้จะนำมาใช้เพื่อเป็นหลักฐานสนับสนุนถึงความปลอดภัยและเห็นคุณค่าของการใช้ขลู่เป็นยาสมุนไพรในงานสาธารณสุขมูลฐานและส่งเสริมคุณค่าของผลิตภัณฑ์เพื่อเป็นสินค้าเพื่อสุขภาพในลำดับต่อไป

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป

องค์ความรู้ใหม่ที่ได้จากการสกัดสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำชาใบขลู่จะสามารถนำไปเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่สนับสนุนคุณค่าทางยาของใบขลู่ หรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่ได้จากใบขลู่ และนำข้อมูลที่ได้จดองค์ความรู้ที่ได้ในรูปสิทธิบัตรได้ ทำให้องค์ความรู้นี้เป็นของประเทศไทย และยังสามารถตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานทางวารสารวิชาการเป็นการสร้างชื่อเสียงให้แก่ประเทศไทย นอกจากนี้สามารถใช้ข้อมูลที่ได้รับจากงานวิจัยไปเป็นพื้นฐานและองค์ความรู้ที่สามารถนำไปต่อยอด และผลิตเป็นยาชนิดใหม่ได้

1.6.2 บริการความรู้แก่ประชาชน

องค์ความรู้ใหม่ที่ได้จากการสกัดสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำชาใบขลู่จะสามารถนำไปเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่สนับสนุนคุณค่าทางยาของใบขลู่ เพื่อส่งเสริมให้มีการเพาะปลูกและอนุรักษ์ต้นขลู่ให้มากขึ้น โดยทำการเผยแพร่ผ่านสื่อต่างๆ เช่นรายการวิทยุเพื่อประชาชน และวารสารต่างๆ รวมทั้งข้อมูลที่ได้จะถูกนำเผยแพร่โดยศูนย์การเรียนรู้และท่องเที่ยวเชิงนิเวศป่าชายเลนลุ่มแม่น้ำเวฬุ สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสอน จันทบุรี) อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

1.6.3 บริการความรู้แก่ภาคธุรกิจ และนำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์

ต้นขลู่เป็นพืชที่ศักยภาพต่อการพัฒนาในเชิงพาณิชย์ได้ เพราะมีการเจริญเติบโตได้เร็วเมื่อมีการเก็บเกี่ยว ขึ้นได้ทั่วไปในเขตป่าชายเลนและใกล้เคียง ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่ได้จะเป็นสิ่งยืนยันถึงประสิทธิภาพของใบขลู่ในการนำมาใช้เป็นชา หรือเป็นสมุนไพรในเครื่องสำอาง ส่งเสริมการขายให้กลุ่มวิสาหกิจชุมชน ทำให้ผู้ซื้อมีความมั่นใจในผลิตภัณฑ์มากขึ้น และผู้ผลิตสามารถขยายตลาดออกไปสู่วงกว้างมากขึ้น รวมทั้งการนำความรู้นี้ไปประยุกต์ใช้ทำยา เครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารอย่างอื่นได้อีก นอกจากนี้องค์ความรู้ใหม่ที่ได้จากการสกัดสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำชาใบขลู่อาจเป็นสารชนิดใหม่และมีประสิทธิภาพดีกว่าสารแอนติออกซิแดนท์เดิมในอุตสาหกรรมอาหารและยา หลังจากจดสิทธิบัตรแล้วสามารถให้ข้อมูลแก่ภาคธุรกิจได้แก่ องค์การเภสัชกรรม หรือ บริษัทยา เช่น บริษัท ดอกบัวคู่ จำกัด เป็นต้น เพื่อนำไปผลิตเป็นสูตรยาในเชิงพาณิชย์ต่อไป

1.6.4 เป็นประโยชน์ต่อประชากรกลุ่มเป้าหมาย

ประชากรทั่วไปของประเทศไทยโดยเฉพาะผู้สูงอายุที่มีความเสี่ยงที่จะเกิดโรคที่เกิดจากความเสื่อมและโรคที่เกิดจากอนุมูลอิสระกันมาก จะสามารถได้ใช้ยาที่มีคุณภาพมากกว่าเดิม และผลข้างเคียงน้อยลง นอกจากนี้ในโครงการวิจัยนี้เมื่อแล้วเสร็จ คาดว่าจะสามารถผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่ภายใต้การศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จำนวนไม่น้อยกว่า 1 คน หน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ได้แก่ สถาบันการศึกษาวิจัย ทั้งในด้านชีวเคมี เภสัชเคมี เช่น คณะวิทยาศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ ในการนำผลการศึกษาไปศึกษาต่อยอด และองค์การเภสัชกรรม หรือหน่วยงาน บริษัทอุตสาหกรรมยา ในการนำไปพัฒนาเป็นสูตรยา และชุมชน และประชาชนมีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์รองรับการใช้สมุนไพรใบขลู่

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 วัสดุและอุปกรณ์

2.1.1 ชุดเครื่องแก้วและเครื่องมือมาตรฐาน

1. Centrifuge (K240R, Centurion Scientific, UK)
2. Chromatography paper number 1 (Whatman, UK)
3. Chromatography paper number 3 (Whatman, UK)
4. Freeze-dryer (GAST, USA)
5. Grinder (Moulinex, Type MCU 1 A, France)
6. Rotary evaporator
7. Vacuum pump (GAST, USA)
8. 96 well microplate (Sterilin, USA)
9. Autopipettes (Gilson, France)
10. พาราฟิล์ม (parafilm) บริษัท National Can ประเทศสหรัฐอเมริกา
11. อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
12. Microplate reader (Versamax, USA)
13. 713 pH meter (Metrohm, France)
14. CO_2 Incubator (CB210, Binder, Germany)
15. Inverted microscope (OLYMPUS IX70, Japan)
16. Biosafety cabinet class II (NU-440, NUAIRE, USA)
17. Transwell inserts (SPL life science)

2.2 สารเคมี

1. Aluminiumtrichloride (Merck, Germany)
2. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Fluka, Germany)

3. Folin-Ciocalteu reagent (Carlo erba, Germany)
4. Hydrochloric acid (Carlo erba, Germany)
5. Hydrochloric acid (Merck, Germany)
6. Iron (III) Chloride hexahydrate (MERCK, Germany)
7. Magnesium Powder (Lab chem., Australia)
8. Methyl alcohol (Carlo erba, Germany)
9. Octyl alcohol (Fluka, Germany)
10. Potassium chloride (Fluka, Germany)
11. Potassium dihydrogen phosphate (Carlo erba, Germany)
12. Potassium ferricyanide (BIO BASIC., Canada)
13. Quercetin (Sigma, Germany)
14. Sodium carbonate (Carlo erba, Germany)
15. Sodium chloride (Germany
16. Sodium hydroxide (Carlo erba , Germany)
17. Sodium nitrite (Univar, Australia)
18. Sodium chloride (Germany)
19. Trichloroacetic acid (TCA) (Panreac Quimica SA, Spain)
20. α-amylase (Fluka, Germany)
21. Bile extract (BIO BASIC, Canada)
22. Hydrochloric acid (Carlo erba, Germany)
23. Hydrochloric acid (Merck, Germany)
24. Pancreatin (BIO BASIC, Canada)
25. Pepsin (Merck, Germany)
26. Potassium chloride (Fluka, Germany)
27. Quercetin (Sigma, Germany)
28. Sodium carbonate (Carlo erba,Germany)

29. Sodium chloride (Germany)

30. Sodium hydrogen carbonate (Carlo erba, Germany)

31. Sodium hydroxide (Carlo erba, Germany)

32. Sodium chloride (Germany)

33. Tris-Hydrochloric acid (Vivantis, Malaysia)

34. Dulbecco's Modified Eagle Medium with phenol red, DMEM (Gibco, USA)

35. Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) (-Ca^{2+},-Mg^{2+}) (Gibco, USA)

36. Fetal bovine serum, FBS (Gibco, USA)

37. Fongizone (Gibco, USA)

38. L-glutamine (Gibco, Brazil)

39. Nonessential amino acids (Gibco, USA)

40. Penicillin/Streptomycin (Gibco-Invitrogen, USA)

41. Trypan blue stain (Gibco, USA)

42. 0.05%Trypsine-EDTA (Gibco, Canada)

2.2 การเตรียมตัวอย่างพืชที่นำมาใช้ในการศึกษา

การเตรียมตัวอย่างชาขลู่ คือ นำใบชาขลู่ *(Pluchea indica* Less.) ที่ซื้อมาจากวิสาหกิจชุมชนบ้านท่าสอน อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี บดให้เป็นผงละเอียดแบ่งมา 100 กรัม นำไปต้มในน้ำเดือด 1 ลิตร เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นสารสกัดถูกกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1 ที่อุณหภูมิห้องและนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 3,000xg เป็นเวลา 10 นาที ส่วนตะกอนที่เหลือจะถูกนำมาสกัดซ้ำอีกรอบ หลังจากนั้นนำส่วนสกัดที่ได้ทั้งหมดเข้าเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) เพื่อให้สารสกัดเข้มข้นมากขึ้น และนำไปเข้าเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilizer)สารสกัดทั้งหมดจะถูกเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทดสอบ

2.3 การหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Bozin และคณะ, 2008)

นำน้ำชาที่ความเข้มข้นต่างๆ กันมาผสมกับ 5% $NaNO_3$ 0.03 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5-6 นาที แล้วเติม 10% $AlCl_3$ 0.03 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที เติม 1 มิลลิโมลาร์ NaOH 0.2 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร ปริมาณฟลาโวนอยด์แสดงเป็นมิลลิกรัมของ quercetin equivalent (QE) ต่อน้ำชาขลู่ 1 มิลลิลิตร

2.4 การหาปริมาณฟีนอลรวม

นำตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร และ Folin-Ciocalteu reagent ที่เจือจางในน้ำกลั่น (1:5) 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที จากนั้นเติม 10% Na_2CO_3 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 725 นาโนเมตร ปริมาณฟีนอลทั้งหมดถูกแสดงเป็น มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก gallic acid equivalent (GAE) ต่อตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร

2.5 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging activity ตามวิธีของ Brand-Williams, Cuvelierและ Berset (1995)

นำตัวอย่าง 40 มิลลิลิตร มาผสมกับ 6×10^{-5}โมล/ลิตร DPPH ในเมทานอล 3.92 มิลลิลิตร บ่มเป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร โดยใช้เมทานอลเป็นตัวควบคุม %scavenging คำนวณจากสูตร $[(A_{C(0)} - A_{A(t)}) / A_{C(0)}] \times 100$ โดยที่ $A_{C(0)}$คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุมที่ 0 นาที ส่วน $A_{A(t)}$คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างหลังจากบ่มครบ 60 นาที

2.6 การศึกษาการย่อย การดูดซึม และการนำไปใช้ในระดับเซลล์

13.6.1 เซลล์ที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ Caco-2 cell lines ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ที่ทำการเสริมด้วย 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 2% (v/v) L-glutamine (Gln), 1% nonessential amino acid solution (NEAA), 1% antibiotics (10,000 units/ml penicillin G sodium and 10,000 g/ml streptomycin sulfate in 0.85% saline) and 1% antifungal solution (fongizone) โดยสภาวะของเซลล์ที่ใช้ในการทดลองควรอยู่ในช่วง passage ที่ 10-55 เลี้ยงอยู่ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 ซม.^{2}ที่ 37^0C ในตู้บ่มเชื้อที่ควบคุมปริมาณก๊าซ CO_2/air เท่ากับ 5%/95% และความชื้นคงที่

13.6.2 เซลล์จะถูก subculture ที่ 80-90% confluency จนกระทั่งเกิดเป็นลักษณะ monolayer จากนั้นเก็บเซลล์โดยเติม 0.25% trypsin และ 1mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 1200 rpm, 37^{0}C เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอน แล้วล้างอีกครั้งด้วย DMEM 10 มล. นำไปเซนตริฟิวจ์อีกครั้ง

13.6.3 จากนั้นเติม DMEM 2 มล. นับเซลล์ที่ยังมีชีวิตโดยผสมกับ blue trypan solution ใช้ Neubauer® counting slide เพื่อดูเซลล์และคำนวณจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิต จากนั้นนำเซลล์ลงไปเพาะบนหลุมตามจำนวนที่ต้องการ

13.6.4 โมเดลการย่อยในหลอดทดลอง (*in vitro* digestion) เป็นการเลียบแบบสภาวะการย่อยในระบบย่อยอาหารของมนุษย์ตั้งแต่ปาก กระเพาะอาหาร และลำไส้ วิธีที่ใช้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Glahn และ Van Campen (1997) และวิธีของ Laurent และคณะ (2007) โดยควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 37^{0}C และเขย่าเบาๆ ตลอดเวลา เอนไซม์ต่างๆ เช่น pepsin (800–1000 U/mg protein), pancreatin (activity, 4x USP specifications) และ bile extract (glycine และ taurine conjugates ของ hydroxycholic acids and other bile salts) ปรับ pH ให้เท่ากับ 4 ด้วย 1N HCl และ 0.05 ml pepsin (25 mg/ml in 0.1N HCl, pH4) ถูกเติมลงไปต่อสารสกัด 1 มล. บ่มเป็นเวลา 60 min พร้อมกับเขย่าไปด้วยที่ 55 รอบต่อนาที 37^{0}C จากนั้นปรับ pH ให้เป็น 6 โดยการเติม 1M $NaHCO_3$และ 0.25 ml pancreatin-bile extract solution (2g/l pancreatin และ 12g/l bile extract ใน 0.1M $NaHCO_3$) ถูกเติมต่อสารสกัด 1 ml ปรับ pH ให้เท่ากับ 7 ด้วย 1N NaOH แล้วเจือจางตัวอย่าง 2:3 ด้วย 120mM NaCl/5mM KCl solution บ่มปฏิกิริยาเป็นเวลา 120 นาที พร้อมเขย่าโดยใช้ความเร็ว 6 รอบต่อนาที ที่ 37^{0}C ซึ่งเราจะเรียกสารที่ได้ในขั้นนี้ว่า “digestate” นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 1200 rpm เป็นเวลา 15 นาที 37^{0}C ดูดส่วนน้ำ 0.5 มล. เติมลงในหลุม (well) เพื่อทำการทดลองในขั้นต่อไป หรือเก็บที่ -80^{0}C จนกระทั่งนำไปวิเคราะห์

13.6.5 จากนั้นนำ digestate ที่ได้มาผ่านการดูดซึมผ่านเซลล์ Caco-2 ซึ่งเป็นเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ของมนุษย์ที่เพาะเลี้ยงอยู่บน insert ใน Transwell® plate ประมาณ 0.5 มล. เติม DMEM ลงไปที่ชั้นล่าง (Basolateral) ประมาณ 1 มล. จากนั้นทำการบ่มที่เวลาต่างๆ หลังจากนั้นดูดสารละลายทั้งชั้นบนและชั้นล่างเก็บใส่ eppendorfs เพื่อไปทำการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อไป จากนั้นตรึงเซลล์ด้วย 4% p-formaldehyde จากนั้นล้างด้วย phosphate buffer saline (PBS) 2 ครั้ง เติม 0.05% Triton x-100 ทิ้งไว้

เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม 1:300000 phalloidin และ/หรือ 1% DAPI บ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง

13.6.6 นำเมมเบรนมาวางบนสไลด์ เติม Prolong® Gold antifade reagent แล้วปิดด้วยกระจก ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้อง fluorescent microscope วิเคราะห์ภาพที่ได้ด้วยโปรแกรม Mac Biophotonics ImageJ

2.6 การวิเคราะห์ผล

แสดงข้อมูลที่ได้ในรูปค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน และการทดลองแต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ คำนวณหา IC_{50}ของการยับยั้งโดยการวิเคราะห์แบบถดถอย วิเคราะห์ข้อมูลการทดลองที่ได้ โดยค่าเฉลี่ยของข้อมูลจากแต่ละสภาวะ โดยเปรียบเทียบแบบ Student‘s t-test หรือ one way ANOVA ($P<0.05$) โดยใช้โปรแกรม StatView เวอร์ชัน 5.0

บทที่ 3

ผลการวิจัย

3.1 การเตรียมสารสกัดจากชาขลู่

จากการเตรียมชาใบขลู่อบแห้งซึ่งทำการสกัด 3 ครั้ง แต่ละครั้งเว้นระยะ 1 เดือน ทำให้ได้ yield เท่ากับ 71.70, 68.40 และ 70.10 กรัม หรือเท่ากับร้อยละ 35.85, 34.20 และ 35.05 ของน้ำหนักแห้งตามลำดับ(ตารางที่ 3-1)

ตารางที่ 3-1 ปริมาณสารสกัดและ %yield ของการสกัดชาขลู่แต่ละครั้ง

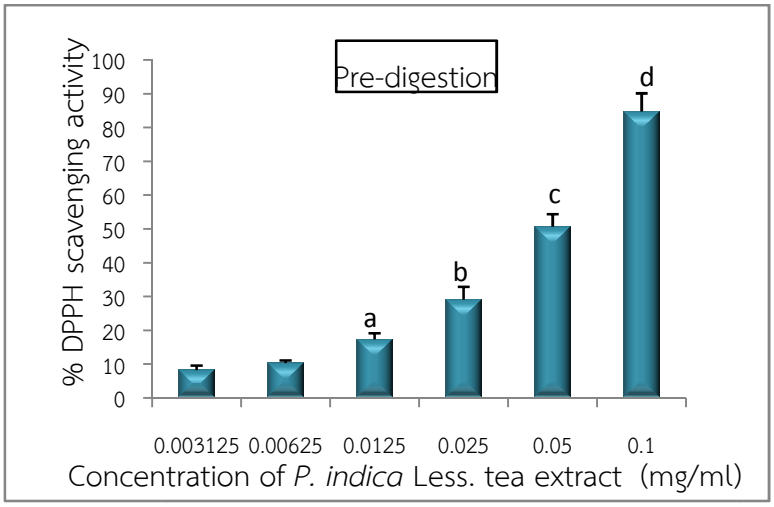
ครั้งที่	น้ำหนักก่อนสกัด (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	% yield
1	200	71.70	35.85
2	200	68.40	34.20
3	200	70.10	35.05

3.2 ปริมาณฟีนอลรวมและฟลาโวนอยด์รวม (Total phenolic and total flavonoid contents)

เป็นที่รู้กันโดยทั่วไปว่าสารประกอบฟีนอลเป็นสารประกอบหลักที่มีอยู่ในพืชโดยทั่วไปที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ในบรรดาสารประกอบฟีนอลต่างๆ นั้น สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบฟีนอลที่มีมากที่สุดและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างดี ที่สำคัญคือสารประกอบเหล่านี้สามารถหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ที่เป็นผลมาจากอนุมูลอิสระได้ (free radical chain reaction) สารสกัดจากชาขลู่มีปริมาณฟีนอลรวมในระหว่างการเก็บเป็นระยะ 2 เดือนเท่ากับ 781.5±0.57 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อตัวอย่าง 1 กรัม ซึ่งเพิ่มขึ้นจากปริมาณตอนเริ่มทำการทดลอง (544.28±0.01 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อตัวอย่าง 1 กรัม) นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณฟลาโวนอยด์รวมหลังจากที่เก็บไว้เป็นระยะเวลา 2 เดือนมีค่าเป็น 188.75±0.002 มิลลิกรัมสมมูลของเควอร์เซตินต่อตัวอย่าง 1 กรัม ซึ่งลดลงจากตอนเริ่มทำการทดลองที่มีค่าเท่ากับ 482.76±0.001 มิลลิกรัมสมมูลของเควอร์เซตินต่อตัวอย่าง 1 กรัม จากผลดังกล่าวพบว่าระยะเวลาการเก็บมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารออกฤทธิ์อย่างมีนัยสำคัญ

3.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging activity

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระถูกทดสอบด้วยวิธี DPPH assay โดยอาศัยการรีดิวซ์ของ DPPH ซึ่งจะสามารถวัดได้ที่ความยาวคลื่น 517 nm (สีม่วง) (Rajesh & Natvar, 2011) ผลของการวิเคราะห์พบว่า เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH ทั้งก่อนและหลังการย่อยในปาก กระเพาะอาหาร และลำไส้เล็กเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของชาขลู่สารสกัดชาขลู่ก่อนถูกย่อยที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดลอง (0.1 mg/ml) แสดงฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH ได้สูงถึง 84.77% (ภาพที่ 3-1). อย่างไรก็ตาม ฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH หลังจากถูกย่อยในปากจะเพิ่มขึ้นเป็น 88.21% ที่ความเข้มข้น0.1429 mg/ml จากนั้นฤทธิ์นี้จะลดลงเหลือ84.10% ในกระเพาะอาหารที่ความเข้มข้น0.1361 mg/ml และเหลือ 75.85% ที่ความเข้มข้น 0.0437 mg/ml ในสภาวะของลำไส้ แต่โดยรวมแล้วจะเห็นได้ว่า เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH แตกต่างกันเพียงเล็กน้อยหลังจากที่น้ำชาใบขลู่ถูกย่อยแล้ว (ตารางที่3-2) เมื่อพิจารณาจากค่า IC_{50}แล้วจะแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการกำจัดอนุมูลของชาขลู่ โดยจะเห็นได้จากค่า IC_{50}ที่น้อยที่สุด (0.0187±0.0008 mg/ml) ที่พบในสภาวะของการย่อยที่ลำไส้เล็กเมื่อเปรียบเทียบกับในสภาวะอื่นๆ(ตารางที่3-2). IC_{50}ของเควอร์เซตินซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐานในสภาวะที่ยังไม่ถูกย่อยมีค่าเท่ากับ 0.0074 ± 0.0005 mg/ml ในขณะที่ค่า IC_{50}ของเควอร์เซตินหลังจากถูกย่อยแล้วมีค่าเท่ากับ 0.0099±0.0012 mg/ml (ปาก) 0.0103±0.0010 mg/ml (กระเพาะอาหาร) และ 0.0038±0.0005 mg/ml (ลำไส้)ตามลำดับ (ตารางที่ 3-3) ซึ่งจะเห็นว่าค่าIC_{50}ของเควอร์เซตินหลังจากถูกย่อยในลำไส้มีค่าน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับในสภาวะอื่นๆ เช่นเดียวกับชาใบขลู่ แสดงว่าทั้งชาใบขลู่และเควอร์เซตินจะมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนหลังจากผ่านกระบวนการย่อยที่ลำไส้เล็ก



ภาพที่ 3-1การกำจัดอนุมูล DPPH ของน้ำชาใบขลู่ก่อนการย่อย

$^{a, b, c, d}$แสดงถึงความแตกต่างของแต่ละความเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P<0.05$

ตารางที่ 3-2 ฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH ของน้ำชาใบขลู่ทั้งก่อนและหลังการย่อยในหลอดทดลอง (*in vitro* digestion)

การย่อย	ความเข้มข้น(mg/ml)	% การกำจัดอนุมูล DPPH	IC_{50}(mg/ml)
Pre-digestion	0.0031	8.34	0.0538±0.0045[a]
	0.0063	10.37	
	0.0125	17.35[a]	
	0.0250	29.09[b]	
	0.0500	50.68[c]	
	0.1000	84.77[d]	
Oral	0.0030	20.15	0.0498±0.0080[a]
	0.0060	27.68	
	0.0119	37.11[a]	
	0.0357	51.93[b]	
	0.0714	68.85[c]	
	0.1429	88.21[d]	
Gastric	0.0043	20.39	0.0536±0.0063[a]
	0.0085	24.35[a]	
	0.0170	33.26[a]	
	0.0340	44.57[b]	
	0.0680	66.85[c]	
	0.1361	84.10[d]	
Intestinal	0.0014	18.83	0.0187±0.0008
	0.0027	26.10[a]	
	0.0055	34.07[b]	
	0.0109	47.31[c]	
	0.0219	64.27[d]	
	0.0437	75.85[e]	

[a, b, c, d, e] แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของข้อมูลในคอลัมน์เดียวกัน (P<0.05)

ตารางที่ 3-3 ฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH ของเควอร์เซตินทั้งก่อนและหลังการย่อยในหลอดทดลอง

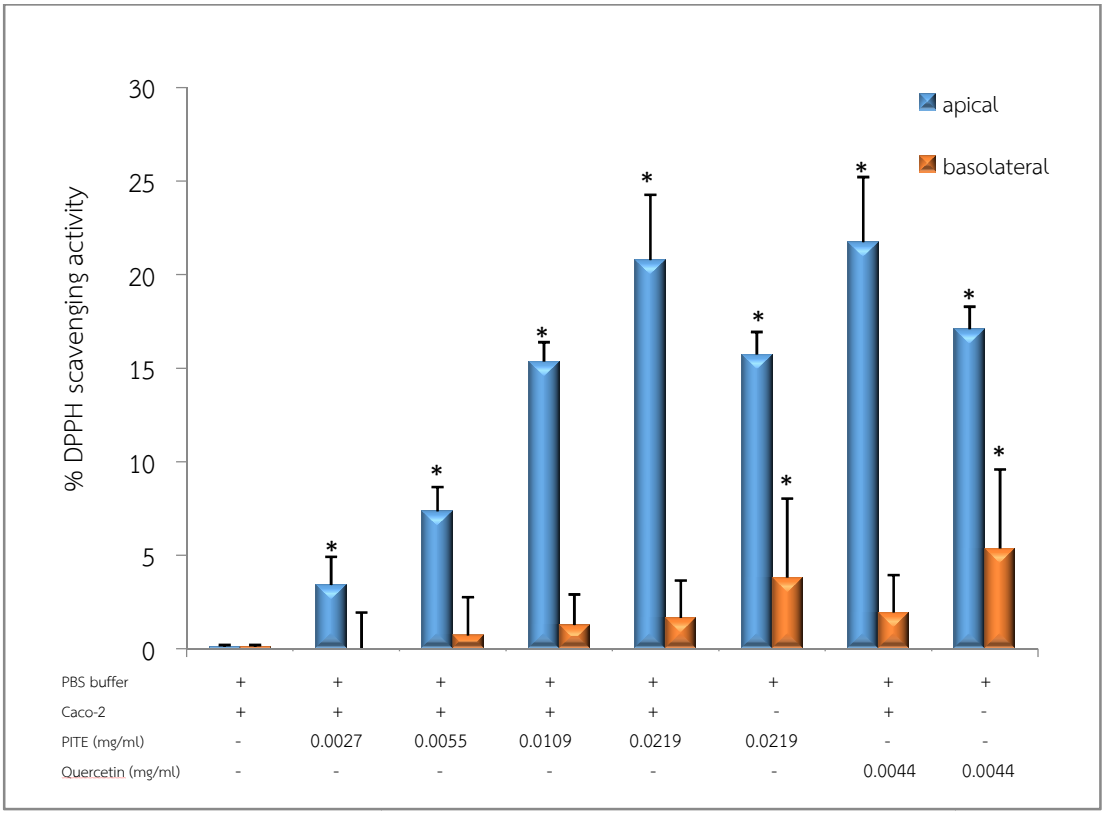
การย่อย	ความเข้มข้น(mg/ml)	% การกำจัดอนุมูล DPPH	IC_{50}(mg/ml)
Pre-digestion	0.0004	8.81	0.0074±0.0005[a]
	0.0008	13.53[a]	
	0.0016	18.28[a]	
	0.0031	27.54[b]	
	0.0063	44.50[c]	
	0.0125	78.43[d]	
Oral	0.0009	23.22	0.0099±0.0012[b]
	0.0018	25.96	
	0.0036	34.89[a]	

การย่อย	ความเข้มข้น(mg/ml)	% การกำจัดอนุมูล DPPH	IC_{50}(mg/ml)
	0.0071	49.86[a]	
	0.0143	77.75[b]	
	0.0286	84.47[b]	
Gastric	0.0009	23.58	0.0103±0.0010[b]
	0.0017	26.91	
	0.0034	36.16[a]	
	0.0068	48.31[a]	
	0.0136	71.29[b]	
	0.0272	78.91[b]	
Intestinal	0.0003	25.08	0.0038±0.0005
	0.0005	27.53	
	0.0011	33.11[a]	
	0.0022	45.43[a]	
	0.0044	64.36[b]	
	0.0087	73.99[b]	

[a, b, c, d] แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของข้อมูลในคอลัมน์เดียวกัน (P<0.05)

3.4 ฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH หลังจากการดูดซึมเข้าสู่เซลล์ Caco-2

เซลล์ Caco-2 ถูกบ่มกับชาใบขลู่ที่ถูกย่อยแล้วเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ความเข้มข้นของชาใบขลู่หลังผ่านการย่อยที่ลำไส้เล็กแล้วจะถูกทำให้เจือจางเมื่อผ่านเซลล์จากทางด้านบน (apical side)มาสู่ด้านล่าง (basolateral side) ชุดควบคุมที่มีเซลล์ไม่พบฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH ภาพที่3-2แสดงให้เห็นถึงการมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH ของชาใบขลู่ตามความเข้มข้นต่างๆ (0.0027, 0.0055, 0.0109 และ 0.0219 mg/ml) ทางด้านบนของเซลล์ขณะที่ทางด้านล่างของเซลล์แทบไม่พบความแตกต่างของฤทธิ์ดังกล่าว เมื่อพิจารณาที่ความเข้มข้นสูงสุดของชาใบขลู่ที่ใช้ในการศึกษาทั้งที่มีและไม่มีเซลล์ Caco-2 ต่อฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH จะเห็นได้ว่า ชาใบขลู่หรือแม้แต่เควอร์เซตินก็ตามอาจจะถูกดูดซึมโดยเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้จึงส่งผลทำให้เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลที่บริเวณ basolateral ของเซลล์ลดลงอย่างไรก็ตาม ฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH ของเควอร์เซตินก็ยังมากกว่าฤทธิ์ของชาใบขลู่อยู่ดี



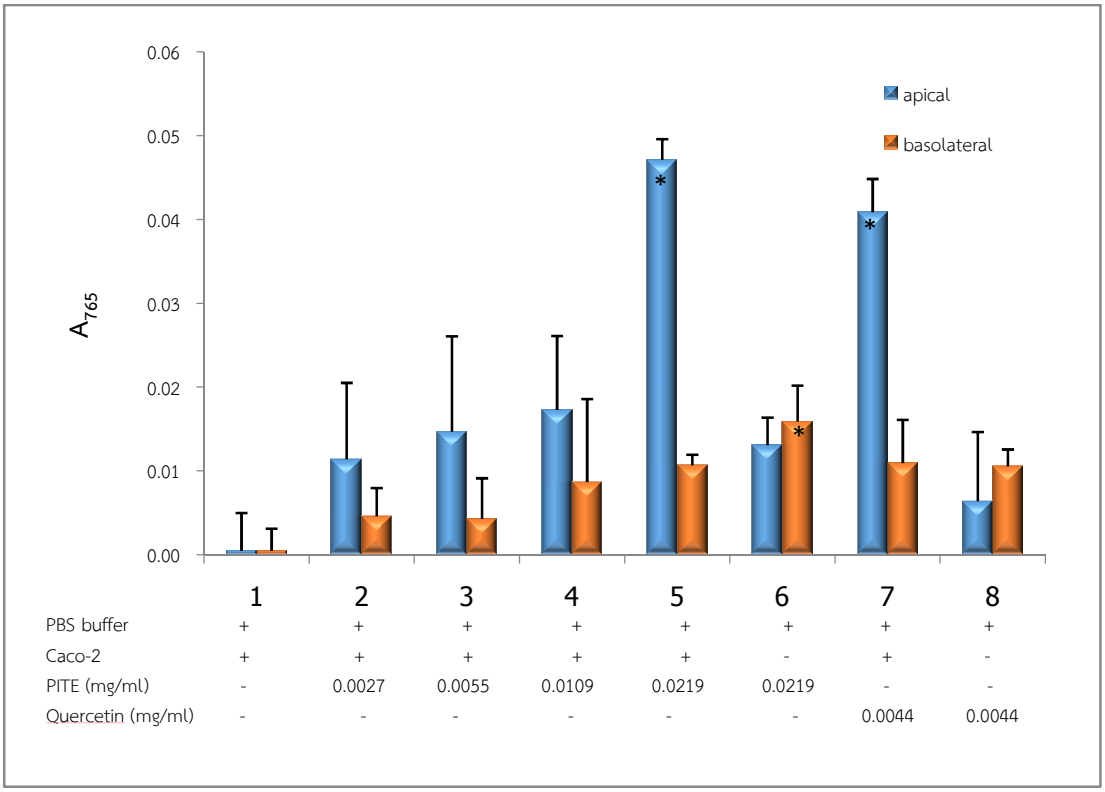
ภาพที่ 3-2 ฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH ของชาใบขลู่หลังจากผ่านการย่อยมาสู่เซลล์ Caco-2 นำเซลล์มาบ่มกับน้ำชาใบขลู่เป็นเวลา 3 ชั่วโมงบน transwells จากนั้นสารละลายทั้งจากด้านบนและด้านล่างจะถูกนำมาศึกษาฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH หลังผ่านการดูดซึม

* ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่$P<0.05$ เมื่อทำการเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

3.5 ปริมาณฟีนอลรวมหลังการดูดซึมผ่านเซลล์ Caco-2

ปริมาณฟีนอลรวมของชาใบขลู่หลังผ่านการดูดซึมโดยเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ถูกศึกษา ภาพที่ 3-3 แสดงถึงการดูดซึมสารประกอบฟีนอลของชาใบขลู่จากทางด้านบนสู่ด้านล่างของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้โดยพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลของชาใบขลู่ที่อยู่ด้านบนของเซลล์มีปริมาณมากกว่าที่อยู่ด้านล่างของเซลล์ ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมทางด้านบนจะลดลงอย่างชัดเจนในช่วง 3 ชั่วโมงของการทดลอง อย่างไรก็ตามถ้าเปรียบเทียบปริมาณของสารประกอบฟีนอลระหว่างทั้งสองด้านจะพบว่าด้านบนของเซลล์มีปริมาณสารประกอบฟีนอลมากกว่าทางด้านล่างของเซลล์(ภาพที่3-5)ความเข้มข้นของชาใบขลู่ที่น้อยกว่า 0.0219 mg/ml ทั้งทางด้านบนและด้านล่างพบสารประกอบฟีนอลในปริมาณที่น้อยมาก โดยมีปริมาณลดลงจาก 10.49±0.003 mg QE/g extract ทางด้านบน เหลือ 0.80±0.001 mg QE/g extract ทางด้านล่างของเซลล์ ปริมาณฟีนอลรวมของชาใบขลู่ที่ความเข้มข้น 0.0219 mg/ml ทางด้านบนในขณะที่ไม่มีเซลล์มีค่าเท่ากับ

1.44±0.003 mg QE/g extract และ 2.18±0.004 mg QE/g extract ทางด้านล่าง (ตารางที่3-4). จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ชาขลู่และเควอร์เซตินอาจจะถูกดูดซึมผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ได้



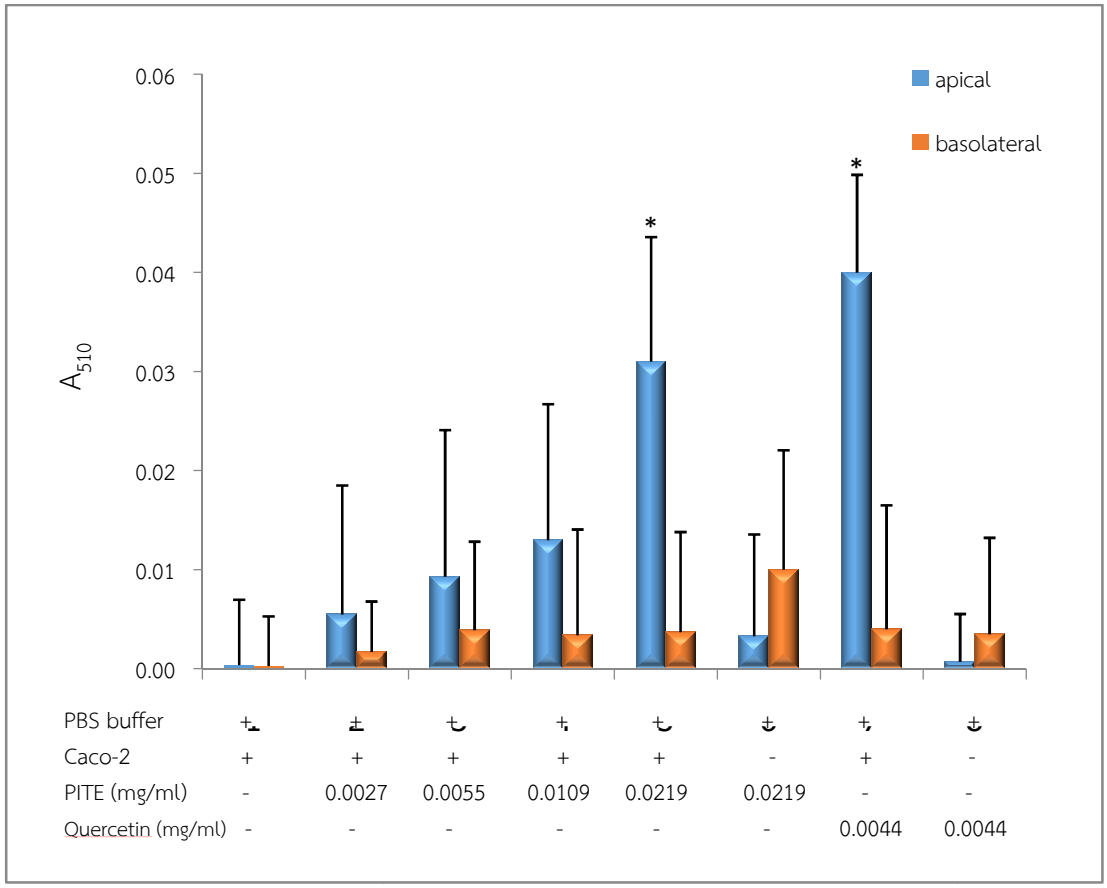
ภาพที่ 3-3 ปริมาณฟีนอลรวมของชาใบขลู่หลังผ่านการย่อยในหลอดทดลองมาสู่การดูดซึมโดยเซลล์ Caco-2 เซลล์ถูกบ่มพร้อมกับชาใบขลู่เป็นเวลา 3 ชั่วโมงบน transwells จากนั้นสารละลายทั้งจากส่วนบนและส่วนล่างของเซลล์ถูกนำมาหาปริมาณฟีนอลรวมหลังการดูดซึมผ่านเซลล์

* ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P<0.05$ โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

3.6 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมหลังการดูดซึมผ่านเซลล์ Caco-2

เซลล์ Caco-2 ถูกบ่มพร้อมกับชาใบขลู่ที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นเวลา 3 ชั่วโมงบน transwells ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของชาขลู่ทางด้านบนของเซลล์ลดลงอย่างเห็นได้ชัดในช่วงเวลาที่ทำการทดลอง (ภาพที่ 3-4) โดยที่ชุดควบคุมในหลุมที่มีเซลล์ไม่พบสารประกอบฟลาโวนอยด์แต่อย่างใด ที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 0.0219 mg/ml ทั้งด้านบนและด้านล่างพบสารประกอบฟลาโวนอยด์น้อยมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งทางด้านล่างมีสารประกอบฟลาโวนอยด์น้อยมากอย่างชัดเจน ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของชาขลู่ทางด้านบนในขณะที่มีเซลล์จะมีค่าลดลงจาก 96.53±0.07 mg QE/g extract เหลือเพียง 4.71±0.01 mg QE/g extract ทางด้านล่างของเซลล์ส่วนปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของชาขลู่ที่ 0.0219 mg/ml ในหลุมที่ไม่มีเซลล์มีค่าเท่ากับ

3.36±0.01 mg QE/g extract (ทางด้านบน) และ 25.90±0.01 mg QE/g extract (ทางด้านล่าง) (ตารางที่ 3-4).



ภาพที่ 3-4 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของชาใบขลู่หลังผ่านการย่อยในหลอดทดลองแล้วนำมาบ่มกับเซลล์ Caco-2 เป็นเวลา 3 ชั่วโมงบน transwells จากนั้นนำสารละลายจากทั้งด้านบนและด้านล่างถูกนำมาศึกษาการดูดซึมของสารประกอบฟลาโวนอยด์

* แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P<0.05$ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ตารางที่ 3-4 ปริมาณฟีนอลรวมและฟลาโวนอยด์รวมของชาใบขลู่หลังดูดซึมผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ Caco-2 (ใช้ความเข้มข้นที่0.0219 mg/ml และใช้ quercetin เป็นสารมาตรฐาน)

ปริมาณสาร	mg of quercetin equivalent / g of extract			
	Apical (+)	Basolateral (+)	Apical (-)	Basolateral (-)
ปริมาณฟีนอลรวม	10.49±0.003[a]	0.80±0.001	1.44±0.003	2.18±0.004
ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม	96.53±0.07[a]	4.71±0.01	3.36±0.01	25.90±0.01[b]

[a, b] ในแถวเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$), (+) บ่มกับเซลล์ and (-) ไม่มีเซลล์ Caco-2

บทที่ 4

อภิปราย และสรุปผลการทดลอง

4.1 อภิปรายผลการทดลอง

ขลู่ (*Pluchea indica* Less.) เป็นพืชในวงศ์ Asteraceae ซึ่งมีอยู่มากในหลายทวีปทั้งอเมริกาเหนือ อเมริกาใต้ แอฟริกา เอเชีย และออสเตรเลีย มักมีถิ่นกำเนิดในบริเวณพื้นที่เขตร้อนหรือเขตอบอุ่น (Sharma & Goyal, 2011) โดยมีรายงานว่า ขลู่มีฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Sen & Chaudhuri, 1991; Sen et al., 1993) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Sen et al., 2002) ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท ฤทธิ์ต้านจุลชีพ มีฤทธิ์ฝาดสมาน (Sen, Ghosh & Chauhuri, 1993) แก้ไข้ เป็นยาระบายอ่อนๆ รักษาอาการริดสีดวงทวาร ปัสสาวะกะปริดกะปรอย (Sharma & Goyal, 2011) สารเคมีที่พบในพืชตระกูลนี้ คือ สารในกลุ่ม eudesmane-type sesquiterpenoids, monoterpenes, lignan glycosides, triterpenoids และ flavonoids ซึ่งมีการศึกษาก่อนหน้านี้ถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดที่ได้จากลำต้นและรากของขลู่ (Noridayu et al., 2011; Sen et al., 1991; Sen et al., 1993; Gomes et al., 2007; Sen et al., 2002). แม้ว่าใบของขลู่จะถูกนำมาทำเป็นชาและยาพื้นบ้านแต่การศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพในใบชาขลู่ยังค่อนข้างน้อยมาก มีบางการศึกษาที่รายงานถึงการนำไปรักษาอาการอักเสบและบรรเทาอาการปวด นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Traithip (2005) ที่พบว่าขลู่ยังสามารถใช้เป็นยารักษาอาการความดันโลหิตสูง เบาหวาน โรคหัวใจ ยาขับปัสสาวะ

จากการศึกษาในปัจจุบันพบว่า %yield ที่ได้หลังจากการสกัดแล้วของน้ำชาใบขลู่ในช่วงระหว่างการเก็บ 0-3 เดือน เท่ากับ 34.8 35.85 34.2 และ 35.05% ตามลำดับ โดยน้ำหนักของสารสกัดที่ได้ขึ้นอยู่กับตัวทำละลาย เวลาที่ใช้ในการสกัด อุณหภูมิของการสกัด และคุณสมบัติทางเคมีของสารออกฤทธิ์ที่มีอยู่ในตัวอย่าง (Kaneria, Kanani & Chanda, 2012)

สารประกอบฟีนอลเป็นกลุ่มของสารทุติยภูมิที่มีอยู่มากที่สุดในพืช มีองค์ประกอบที่เป็นวงอะโรมาติกที่มีหมู่ไฮดรอกซิลหนึ่งหมู่หรือมากกว่านั้น ในธรรมชาติมักจะพบสารประกอบฟีนอลจับอยู่กับน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ทำให้มีแนวโน้มที่จะละลายน้ำได้ดีขึ้น สารประกอบฟีนอลมีหลายชนิด หนึ่งในนั้นได้แก่ สารประกอบฟลาโวนอยด์ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีการศึกษามากที่สุด สารประกอบฟลาโวนอยด์มีคาร์บอน 15 คาร์บอน ประกอบด้วยวงฟีนอล 2 วงที่ถูกเชื่อมกันด้วยคาร์บอน 3 ตัว (Manyadele& Ann, 1999) ปริมาณฟีนอลรวม

ของส่วนสกัดจะถูกทดสอบด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method (Simrany, 2003) โดยตัวอย่างที่มีสารประกอบฟีนอลจะถูกรีดิวซ์โดยสาร Folin-Ciocalteu เกิดผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน จากหลักการดังกล่าวถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดจากใบชาขลู่โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน มีหลายการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์น่าจะมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Rice-Evans et al., 1996; Manyadele & Ann, 1999) ดังนั้นเพื่อที่จะหาปริมาณฟีนอลและฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดจากชาใบขลู่ (ที่ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ในขณะที่เก็บชาไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดในช่วงระยะเวลาการเก็บ 0-3 เดือน ได้ผลดังตารางที่ 4-2 โดยสารประกอบฟีนอลรวมหลังจากที่เก็บไว้นาน 3 เดือนมีปริมาณที่สูงขึ้นกว่าตอนเริ่มการทดลอง (992.25±0.05 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/กรัมของส่วนสกัด) และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมหลังจากเก็บไว้ 2 เดือนก็พบว่าเพิ่มขึ้น (482.76±0.001 มิลลิกรัมสมมูลของเควอร์เซติน/กรัมของส่วนสกัด) มากกว่าตอนเริ่มการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการเพิ่มขึ้นนี้ทั้งของปริมาณฟีนอลและฟลาโวนอยด์รวมก็เพิ่มตามความเข้มข้นของสารสกัดด้วย ซึ่งการเพิ่มขึ้นของสารออกฤทธิ์นี้อาจจะเป็นผลมาจากการระเหยของน้ำในใบชาในระหว่างการเก็บเป็นเวลานานๆ อุณหภูมิ แสงแดด และสภาพอากาศ นอกจากนี้ยังมีปัจจัยต่างๆ เป็นจำนวนมากที่ส่งผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลในพืช เช่น ระยะเวลาการเก็บ สภาพของสิ่งแวดล้อมที่ปลูก กระบวนการแปรรูป และการเก็บเป็นเวลานานซึ่งอาจจะส่งผลต่อการสลายตัวของสารประกอบในกลุ่มนี้ อย่างไรก็ตาม จากตารางที่ 5-1 จะเห็นได้ว่าสารประกอบต่างๆ เหล่านี้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพดีซึ่งสัมพันธ์กับการศึกษาของ Pinitsoontorn et al. (2012) ที่แสดงให้เห็นว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างสูงถูกพบได้ในขลู่เช่นกัน โดยการศึกษาปัจจุบันพบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดจากใบชาขลู่ (R^2 = 0.92) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารประกอบดังกล่าวเป็นสารที่ส่งผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของชาขลู่ Pajaree (2006) พบว่า สภาวะของการเก็บอาจส่งผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลซึ่งถูกออกซิไดส์ได้ค่อนข้างง่าย ปฏิกิริยาออกซิเดชันส่งผลต่อการเกิดสารพอลิเมอร์ต่างๆ อันจะนำมาซึ่งการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของอาหารและเครื่องดื่มโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเรื่องสีและรสชาติ การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจส่งผลทั้งในแง่บวก (ในกรณีของชาดำ) และในแง่ลบที่จะเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลของใบชาซึ่งมีผลต่อการยอมรับของผู้บริโภค จากการศึกษาของ Siriporn (2006) แสดงให้เห็นว่า ปัจจัยในเรื่องสายพันธุ์และระยะเวลาการเก็บส่งผลต่อปริมาณฟีนอลรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่างๆ ของเหง้ากระชายดำ (*Kaempferia parviflora*) เช่นกัน ยิ่งไปกว่านั้น ยังพบว่าระยะเวลาการเก็บยิ่ง

นานยิ่งทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลของเหง้ากระชายดำเพิ่มมากขึ้นรวมทั้งทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นเช่นกัน การศึกษาของ Jamalomidi and Gholami (2013) ก็พบว่าปัจจัยเกี่ยวกับสิ่งแวดล้อมในช่วงการเก็บรักษามีผลทางอ้อมต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดพืชซึ่งเป็นผลมาจากปริมาณความชื้นของเมล็ด ดังนั้น วิธีบรรจุชาน่าจะสามารถลดความเสี่ยงต่อความชื้นที่จะเกิดขึ้นในขณะที่เก็บชาไว้เป็นเวลานานๆ จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการเก็บชาไว้กับทรายละเอียด (5% โดยน้ำหนัก) ในที่มืดโดยมีความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 95% และอุณหภูมิต่ำกว่า 10°C ตลอดระยะเวลาการเก็บ 6 เดือนก็ยังสามารถคงความสารถทางชีวภาพของชาเอาไว้ได้

โมเดลการย่อยในหลอดทดลอง (*in vitro* digestion) ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้าง ความสามารถในการย่อย และการนำเอาองค์ประกอบต่างๆ ในอาหารไปใช้ในสภาวะการเลียบแบบของระบบย่อยอาหารของมนุษย์อย่างไรก็ตาม ผลของการย่อยในหลอดทดลองอาจมีความแตกต่างจากผลที่ได้จากการย่อยในสัตว์ทดลองเนื่องจากความยากในการจำลองสภาวะที่แท้จริงของร่างกายซึ่งมีความซับซ้อนทางด้านสรีรวิทยามากกว่า (Hur et al., 2011). เซลล์ Caco-2 มักจะถูกใช้เพื่อศึกษาการดูดซึมในสภาวะของลำไส้เซลล์ชนิดนี้มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์มะเร็งลำไส้ของมนุษย์ (human colonic adenocarcinoma cell lines) โดยทั่วไป หลังจากที่เซลล์เจริญเติบโตได้ 21 วัน เซลล์จะมีการ differentiate เป็น monolayer ที่มีโครงสร้างที่เป็น microvillus และลักษณะทางชีวเคมีและหน้าที่ของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ของลำไส้เล็ก (Gan et al., 1993) ถ้าจะนำเซลล์ชนิดนี้มาศึกษาการขนส่งหรือการผ่านเข้า-ออกของสาร เซลล์จะถูกเพาะเลี้ยงบน permeable filters ในสารละลายที่เลียบแบบสภาวะในลำไส้เล็กที่ซึ่งบริเวณของ lumen จะถูกแยกออกจากบริเวณของเส้นเลือด (bloodstream) โดยเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้จะเป็นสิ่งที่กั้นระหว่างสองบริเวณนี้

อนุมูล DPPH ถูกใช้เป็นโมเดลในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากเป็นวิธีที่ค่อนข้างเร็ว และมีความแม่นยำสูงสำหรับการศึกษาฤทธิ์การกำจัดอนุมูลของสารที่เราต้องการจะศึกษาซึ่งอาศัยความสามารถในการให้อะตอมไฮโดรเจนกับอนุมูล DPPH ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดของอนุมูล DPPH ในสารละลายเมทานอลคือ 517 nm เนื่องมาจากอิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูล DPPH จะให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ค่าความยาวคลื่นนี้ โดยจะเห็นเป็นสีม่วง เมื่อมีการทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ สีม่วงของอนุมูล DPPH จะลดลงจนกระทั่งอาจจะมองเห็นการเปลี่ยนแปลงจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ชาใบขลู่มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH ทั้งก่อนและหลังการย่อย ชาขลู่ที่ยังไม่ถูกย่อยที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลได้ถึง 84.77%

และฤทธิ์นี้ก็เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของชาขลู่ อย่างไรก็ตาม เคยมีรายงานว่า สารสกัดน้ำร้อนของใบขลู่มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH สูงกว่า BHT แต่ก็ยังน้อยกว่ากรดแอสคอร์บิก(Srisooket al., 2012)ฤทธิ์ดังกล่าวหลังการย่อยที่ปากที่ความเข้มข้น0.1429 mg/ml มีค่าเท่ากับ 88.21% ที่ความเข้มข้น 0.1361 mg/ml ในกระเพาะอาหารมีค่า 84.10% และที่ความเข้มข้น 0.0437 mg/ml ในลำไส้เล็กมีค่าเท่ากับ75.85%เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์นี้โดยดูจากค่า IC_{50}ระหว่างก่อนและหลังการย่อยไม่พบความแตกต่างของการย่อยที่ปากและกระเพาะอาหาร ในขณะที่ในลำไส้เล็กมีค่าลดลงอย่างชัดเจน หลังการย่อยในลำไส้ ยังสามารถพบฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH แม้ว่าฤทธิ์การกำจัดอนุมูลของชาขลู่จะน้อยกว่าเควอร์เซตินก็ตาม หลังผ่านการย่อยจะทำให้ชาขลู่เจือจางมากขึ้นเนื่องจากในระบบของการย่อยจะประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิด เช่น □-amylase (pH 6.8) สำหรับการย่อยที่ปาก pepsin (pH 3-4) สำหรับการย่อยที่กระเพาะอาหาร และ pancreatin/bile salts (pH 7-8)สำหรับการย่อยที่ลำไส้เล็ก ผลของเอนไซม์และความเป็นกรด-ด่างในระบบทางเดินอาหารอาจจะส่งผลต่อฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPHของชาขลู่ เนื่องจากมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีอยู่ในใบขลู่(Martinez-Ortega et al., 2001) จากนั้นผู้วิจัยได้ทำการศึกษาฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH ของชาขลู่หลังผ่านการดูดซึมโดยใช้เซลล์ Caco-2 เป็นโมเดลกลุ่มควบคุมในขณะที่มีเซลล์ไม่พบฤทธิ์ดังกล่าวชาขลู่ที่ความเข้มข้นต่างๆ(0.0027, 0.0055, 0.0109 and 0.0219 mg/ml)ทางด้านบนยังคงแสดงฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลในขณะที่ไม่พบฤทธิ์นี้ทางด้านล่างของเซลล์เนื่องจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพบางอย่างอาจไม่สามารถถูกดูดซึมผ่านเซลล์ลงมายังด้านล่างได้ ยิ่งไปกว่านั้น ฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลของเควอร์เซตินซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์หลักในใบขลู่ (Ohtsuki, 2008)ก็ลดลงเช่นกันทางด้าน basolateral เช่นเดียวกับชาขลู่ แต่ก็ยังคงมีฤทธิ์มากกว่าชาขลู่อยู่ดี

สารประกอบฟีนอลเป็นสารทุติยภูมิที่มีอยู่มากที่สุดในพืชหลายชนิด สารประกอบฟีนอลในพืชส่วนมากมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ในการป้องกันโรคเรื้อรังที่เกี่ยวข้องกับภาวะเครียดออกซิเดชัน เช่น โรคมะเร็ง (Aberoumand & Deokule, 2008) สารประกอบเหล่านี้มีโครงสร้างเป็นวงอะโรมาติกที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อยหนึ่งถึงสองหมู่ รวมถึงอาจพบโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นพอลิเมอร์ด้วย (Nagendran et al., 2006) สารประกอบประเภทนี้มีฤทธิ์ในการscavengeอนุมูลและยังสามารถหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ที่เกิดจากอนุมูลด้วย(Normala et al., 2011) ก่อนหน้านี้ Noridayu (2011) พบว่า สารสกัดเมทานอลของใบขลู่มีปริมาณฟีนอลรวมที่ค่อนข้างสูงดังนั้น ปริมาณฟีนอลรวมของชาขลู่ทั้งก่อนและหลังการย่อยจึงถูกตรวจสอบโดยวิธี Folin-Ciocalteu ที่ถูกอธิบายไว้โดย Liu et al. (2002) ปริมาณฟีนอลรวมก่อนถูกย่อยมีค่าเท่ากับ

196.56±0.02 mg QE/g extract ขณะที่หลังจากถูกย่อยที่ปากปริมาณของสารประกอบฟีนอลจะลดลงเป็น 22.86±0.003mg QE/g extractที่กระเพาะอาหารจะมีค่า29.20±0.003mg QE/g extractและ29.94±0.003 mg QE/g extract ที่ลำไส้เล็ก ตามลำดับสภาวะในระบบทางเดินอาหารแต่ละสภาวะอาจจะส่งผลต่อการเปลี่ยนโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลซึ่งทำให้เกิดการแตกตัวเป็นไอออน (ionization) ของหมู่ไฮดรอกซิล (Tagliazucchi et al., 2010). ผลของเอนไซม์และ pH ในกระบวนการย่อยอาจส่งผลต่อปริมาณฟีนอลรวมของชาขลู่หลังจากนั้นทำการศึกษาปริมาณฟีนอลรวมของชาขลู่หลังจากบ่มพร้อมกับเซลล์ Caco-2ชุดควบคุมในขณะที่มีเซลล์ไม่พบว่ามีสารประกอบฟีนอล อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของชาขลู่ที่น้อยกว่า 0.0219 mg/mlพบว่ามีปริมาณฟีนอลรวมน้อยมากทั้งทางด้านบนและด้านล่างของเซลล์ ปริมาณฟีนอลของชาขลู่ที่ 0.0219mg/ml ทางด้านบนของเซลล์ลดลงจาก 10.49±0.003 mg QE/g extract เหลือเพียง 0.80±0.001 mg QE/g extract ในบริเวณด้านล่างของเซลล์ ในขณะที่ปริมาณฟีนอลรวมของชาขลู่ที่ความเข้มข้นเดียวกันในขณะที่ไม่มีเซลล์พบว่ามีปริมาณเท่ากับ 1.44±0.003 mg QE/g extract (ด้านบน) และ 2.18±0.004 mg QE/g extract (ด้านล่าง) โครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เล็กกว่าขนาดรูพรุนของ membrane filter ใน inserts บน transwells ทำให้สามารถผ่านจากด้านบนลงมาสู่ด้านล่างได้มากกว่าในขณะที่มีเซลล์ดังนั้น ปริมาณฟีนอลรวมจึงถูกตรวจสอบพบทางด้านล่างของเซลล์น้อยกว่าในขณะที่ไม่มีเซลล์หลังการบ่ม 3 ชั่วโมง ปริมาณฟีนอลรวมทางด้านบนลดลงอย่างชัดเจน แต่อย่างไรก็ตาม ทั้งเควอร์เซตินและชาขลู่มีแนวโน้มใกล้เคียงกัน ส่วนสาเหตุที่ปริมาณฟีนอลลดลงในชั้นล่างอาจจะเกิดจากการที่ความเข้มข้นของสารเหล่านี้ถูกทำให้เจือจางมากขึ้น หรืออาจจะเป็นความเป็นกรด-ด่าง ionic strength และระบบของเอนไซม์

4.2 สรุปผลการวิจัย

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของชาขลู่จะลดลงหลังจากถูกย่อยในหลอดทดลองและดูดซึมผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เนื่องมาจากการเจือจางของสารออกฤทธิ์ ผลของเอนไซม์ต่างในระบบทางเดินอาหาร การเปลี่ยนค่าความเป็นกรด-ด่าง โปรตีนที่ใช้ในการขนส่งสารซึ่งสามารถยับยั้งการดูดซึมเข้าสู่เซลล์ Caco-2 เป็นไปได้ว่าชาขลู่อาจถูกดูดซึมโดยวิธี transcellular passive permeability หรือ carrier-mediated transport หรืออาจจะใช้ paracellular passive permeability หรืออาจจะใช้หลายๆ วิธีร่วมกัน อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาพบว่ามีบางกลไกสามารถยับยั้งการดูดซึมสารออกฤทธิ์ที่มีอยู่ในใบชาได้ ซึ่งมีการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่า P-gp ซึ่ง

เป็น ATP-dependent efflux transporter และเอนไซม์ต่างๆ ภายในเซลล์อาจมีผลต่อการดูดซึมของสารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ(Praveen &Saeho, 2005).

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการ 2558A10802009

ทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล)

มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหลังจากถูกย่อยและดูดซึมผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ของน้ำชาขลู่

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน / ผู้วิจัย ดร.ชัชวิน เพชรเลิศ

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 27 ตุลาคม2557 ถึงวันที่ 30 กรกฎาคม 2560

ระยะเวลาดำเนินงาน 1 ปี ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2556 ถึงวันที่ 31 กันยายน 2557

<u>รายจ่าย</u>

หมวด	รายจ่ายสะสมจากรายงานครั้งก่อน	ค่าใช้จ่ายงวดปัจจุบัน	รวมรายจ่ายสะสมจนถึงงวดปัจจุบัน	งบประมาณรวมทั้งโครงการ	คงเหลือ (หรือเกิน)
1. ค่าตอบแทน	190,250.00	28,750.00	219,000.00	219,000.00	0.00
2. ค่าใช้สอย	4,320.00	136,790.00	141,110.00	139,000.00	-2,110.00
3. ค่าวัสดุ	48,190.25	393,009.75	441,200.00	434,000.00	-7,200.00
4. ค่าสาธารณูปโภค	44,000.00	35,200.00	79,200.00	88,000.00	8,800.00
รวม	**286,760.25**	**593,749.75**	**880,510.00**	**880,000.00**	**-510.00**

<u>จำนวนเงินที่ได้รับและจำนวนเงินคงเหลือ</u>

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1	396,000 บาท	เมื่อ 14พ.ย. 2557
งวดที่ 2	316,800 บาท	เมื่อ 25 พ.ค. 2558
รวม	**712,800 บาท**	

... .

หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน เจ้าหน้าที่การเงินโครงงานวิจัย

บรรณานุกรม

พันธุ์ไม้ป่าชายเลนในประเทศไทย. (2549). สำนักงานอนุรักษ์ทรัพยากรป่าชายเลน กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม.

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

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

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

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

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

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

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

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

Glahn, R.P., Chen, Z., and Welch, R.M. Comparison of iron bioavailability from 15 rice genotypes: studies using an *in vitro* digestion/Caco-2 cell culture model. J. Agric. Food Chem. 2002; 50: 3586-3591.

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

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

Liu, Y., and Hu, M. Absorption and metabolism of flavonoids in the Caco-2 Cell culture model and a pursuedrat intestinal model. Drug Metab. Dispos. 2002; 30: 370-377.

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

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

Ohtsuki T, Yokosawa E, Koyano T, Preeprame S, Kowithayakorn T, Sakai S, Toida T, Ishibashi M. (2008). Quinic acid esters from *Pluchea indica* with collagenase, MMP-2 and MMP-9 inhibitory activities. Phytother Res. 22(2):264-6.

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

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

Peungvicha P, Temsiririrkul R, Prasain JK, et al. Hypoglycemic effect of Pluchea indica Less. Root in normal and diabetic rats. Thai J Phytopharm 1999; 6(2): 18-22.

Pramanik KC, Bhattacharya P, Biswas R, et al. TK. Hypoglycemic and antihyperglycemic activity of leaf extract of *Pluchea indica* Less. Orient. Pharm. Exp. Med. 2006a; 6(3):232-236

Pramanik KC, Biswas R, Mitra A, et al. Tissue culture of the plant *Pluchea indica* (L.) Less. and evaluation of diuretic potential of its leaves. Orient. Pharm. Exp. Med. 2006b; 7(2),

Roslida AH, Erazuliana AK and Zuraini A (2008) Anti-inflammatory and antinociceptive activities of the ethanolic extract of *Pluchea indica* (L) lessleaf. Pharmacology online 2: 349-360.

Sen T, Nag Chaudhuri AK. Anti-inflammatory evaluation of a Pluchea indica root extract. J. Ethnopharmacol. 1991; 33(1-2): 135-141.

Sen T, Basu A, Ray RN, et al. Hepatoprotective effects of *Pluchea indica* (less) extract in experimental acute liver damage in rodents. Phytother. Res. 1992; 7(5): 352-355.

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

Sen T, Basu A, Ray RN, Nag Chaudhuri AK. Hepatoprotective effects of *Pluchea indica* (Less) extract in experimental acute liver damage in rodents [abstract]. Phytother Res. 1993; 7: 352-355.

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

Sen T, Dhara AK, Bhattacharjee S, Pal S, Nag Chaudhuri AK. Antioxidant activity of the methanol fraction of *Pluchea indica* root extract. Phytother Res 2002; 16(4): 331-335.

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

Thongpraditchote S, Matsumoto K, Temsirikul R, Tohda M, Murakami Y, Watanabe H. Neuropharmacological actions of *Pluchea indica* Less root extract in social mice [abstract]. Biol. Pharm. Bull. 1996; 19: 379-83.

Uchiyama T, Miyase T, Ueno A, et al. Terpenic glycosides from *Pluchea indica*. Phytochem. 1989; 28:3369-3372.

Uchiyama T, Miyase T, Ueno A, et al. Terpene and lignan glycosides from *Pluchea indica*. Phytochemistry 1991; 30(2): 655-657.

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