



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งกลไกการเกิดริ้วรอยก่อนวัยของต้นกระดุกไก่ดำ
The Study of *Gendarussa vulgaris* Extract on Anti-wrinkle Mechanisms

โดย

นสภ. มานิสา	จักร์มา	รหัสสถิติ	59210058
นสภ. ณัฏฐนิช	เลขานุกิจ	รหัสสถิติ	59210104
นสภ. พิชญานิน	เพชรสังข์	รหัสสถิติ	59210120

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2563

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งกลไกการเกิดริ้วรอยก่อนวัยของต้นกระดุกไก่อดำ
The study of *Gendarussa vulgaris* extract on anti-wrinkle mechanisms

โดย

นสภ. มานิสา	จักร์มา	รหัสนิติ	59210058
นสภ. ณัฏฐนิช	เลขานุกิจ	รหัสนิติ	59210104
นสภ. พิชญานิน	เพ็ชรลิ่งซ์	รหัสนิติ	59210120

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2563

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

รายงานฉบับนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากต้นกระดุกไ่ดำ ต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์การต้านการอักเสบ ฤทธิ์การยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอนด์โปรดักส์ เบื้องต้น และฤทธิ์การยับยั้งการทำลายคอลลาเจนของสารสกัดกระดุกไ่ดำ ซึ่งเหตุผลที่ทางคณะผู้จัดทำได้เลือกหัวข้อนี้เนื่องจากเห็นว่า ในปัจจุบันมูลค่าทางการตลาดของอุตสาหกรรมความงามมีการเติบโต และคาดการณ์ว่าในอนาคตจะเป็นตลาดที่มีการเติบโตสูงอย่างต่อเนื่อง โดยคนรุ่นใหม่นิยมใช้สมุนไพรเป็นทางเลือกในการดูแลสุขภาพ ซึ่งต้นกระดุกไ่ดำเป็นพืชที่เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว พบมากในเขตร้อน และมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาจำนวนมาก โดยเฉพาะฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งแอดวานซ์ไกลเคชันเอนด์โปรดักส์ ซึ่งเป็น 3 กลไกหลักที่ทำให้เกิดความแก่ชราของผิวหนัง คณะผู้จัดทำจึงนำต้นกระดุกไ่ดำมาทดสอบ เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาทั่วโลกในระดับโมเลกุล และเป็นการพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อต่อยอดด้านธุรกิจ คณะผู้จัดทำหวังว่าโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้จะให้ความรู้ และก่อให้เกิดประโยชน์แก่ผู้ที่ได้อ่านต่อไป

คณะผู้จัดทำ

29 มีนาคม 2564

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2563

เรื่อง การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งกลไกการเกิดริ้วรอยก่อนวัยของต้นกระดุกไก่ดำ

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. นสภ. มานิสสา จักรมา รหัส 59210058
2. นสภ. ณัฐนิช เลขานุกิจ รหัส 59210104
3. นสภ. พิชญานิน เพ็ชรสังข์ รหัส 59210120

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. ญ.อ.ดร. ภัทรวดี ศรีคุณ (ที่ปรึกษาหลัก)

บทคัดย่อ

กระบวนการในการเกิดริ้วรอยก่อนวัยเกี่ยวข้องกับหลายกลไก อาทิ ภาวะเครียดออกซิเดชัน กระบวนการอักเสบ กระบวนการไกลเคชันได้ผลผลิตเป็นแอดวานซ์ไกลเคชันเอนด์โปรดักส์ (AGEs) ซึ่งส่งผลทำลาย ECM ของชั้นผิวหนัง สารสกัดต้นกระดุกไก่ดำมีรายงานฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชัน และฤทธิ์ต้านการอักเสบ และการศึกษาเบื้องต้นด้านฤทธิ์ต้านการสร้าง AGEs ของคณะผู้วิจัย งานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ elastase ในการทำลาย elastin ที่เป็นส่วนประกอบของชั้นผิวหนัง โดยสกัดต้นกระดุกไก่ดำด้วย 30% ethanol ได้สารสกัดหยาบ และวิเคราะห์ด้วย FRAP, DPPH, proteinase inhibitory, protein denaturation assay และ *in vitro* AGEs formation จากนั้นวิเคราะห์การยับยั้งเอนไซม์ elastase พบค่า IC_{50} ที่ 0.71 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านการอักเสบ พบค่า IC_{50} ที่ 53.54 mg/ml และยืนยันฤทธิ์ต้านการสร้าง AGEs ที่ IC_{50} 10.97 mg/ml และเป็นที่น่าสนใจว่าพบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ elastase ที่ IC_{50} 10.97 mg/ml จากผลการทดลองทั้งหมดนี้ สารสกัดต้นกระดุกไก่ดำจึงมีความเป็นไปได้ที่จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดริ้วรอยก่อนวัย อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้เป็นเพียงการทดลองเบื้องต้น และต้องทำการศึกษาในขั้นต่อไปเพื่อประเมินประสิทธิภาพให้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก.....

Senior Project Academic Year 2020

: The study of *Gendarussa vulgaris* extract on anti-wrinkle mechanisms

By

1. Miss. Manisa Jakma ID 59210058

2. Miss. Nattanit Lekanukit ID 59210104

3. Miss. Pichayanin Pechsung ID 59210120

Advisor:

1. Dr. Pattaravadee Srikoon, R.Ph.

ABSTRACT

Several mechanisms involve in skin wrinkle formation such as oxidative stress, inflammation and glycation reaction producing advanced glycation-end products (AGEs). These factors result in ECM degradation of skin layer. *Gendarussa Vulgaris* Nees (GV) has been reported anti-oxidant and anti-inflammatory activities. Our group also found anti-AGEs formation preliminarily. Therefore, this study aimed to investigate elastase inhibitory activity of GV extract which responsible for skin elastin degradation. Thirty percent methanolic extract was analyzed by FRAP, DPPH, proteinase inhibitory, protein denaturation assay, and in *vitro* AGEs formation; consequently evaluated elastase inhibitory activity. The results showed anti-oxidant and anti-inflammatory activity at $IC_{50}=0.71$ and 53.54 mg/ml respectively. Anti-AGEs formation also found at $IC_{50}=10.97$ mg/ml. Interestingly, elastase activity was found significantly inhibited in concentration-dependent manner at $IC_{50}=10.97$ mg/ml. Thus methanolic extract of GV has a potential to decrease wrinkle formation by these mechanisms. However, this study has to be further evaluated to confirm the anti-wrinkle efficacy.

Major Advisor.....

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องมาจากความช่วยเหลือของ
ภญ.ดร.ภัทรวดี ศรีคุณ อาจารย์ที่ปรึกษา ที่ได้ให้คำปรึกษาคอยช่วยชี้แนะแนวทางในการค้นคว้าหา
ความรู้ช่วยดูแลการทำงานวิจัยให้เป็นไปอย่างราบรื่น และช่วยตรวจทานความถูกต้องให้แก่นิสิต จึง
ทำให้โครงการวิจัยฉบับนี้บรรลุตามวัตถุประสงค์

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ณิชนันต์ ภีระคำ, ภญ.อ.ดร.ธัญชนก ศิริรักษ์, ภญ.ดร.ขวัญชฎานวิศ
มาชะนา และภญ.ดร.ชฎาพร พรหมปัญญา ที่ได้ช่วยตรวจทานความถูกต้องของเล่มรายงาน ตลอดจน
ให้ข้อเสนอแนะ และคำแนะนำเกี่ยวกับกระบวนการวิจัย

ขอขอบพระคุณนักวิทยาศาสตร์ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ ช่วยจัดหาเครื่องมือ อุปกรณ์ในการ
ทำปฏิบัติการทดลองของงานวิจัยนี้ รวมไปถึงผู้ให้การสนับสนุนท่านอื่น ๆ ที่ได้ให้การช่วยเหลือมา
ณ โอกาสนี้

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ซ
บทที่	
1. บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.4 กรอบแนวคิด	3
2. ทบทวนวรรณกรรม	4
2.1 ลักษณะทั่วไปของต้นกระดุกไก่อดำ	4
2.2 องค์ประกอบทางเคมีของต้นกระดุกไก่อดำ	4
2.3 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของต้นกระดุกไก่อดำ	7
2.4 กระบวนการแก้ชราและการเกิดริ้วรอยของผิวหนัง	15
2.5 กระบวนการไกลเคชัน	17
3. วิธีดำเนินการวิจัย	24
3.1 ตัวอย่างพืชและการสกัด	24
3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	24
3.2.1 FRAP assay	24
3.2.2 DPPH assay	25
3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ	25
3.3.1 Proteinase inhibitory assay	25
3.3.2 Protein denaturation inhibitory assay	26
3.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอนดีโทเรติกส์	27

3.5 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำลาย elastin ของเอนไซม์ elastase	27
4. ผลการวิจัย	28
4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	28
4.1.1 FRAP assay	28
4.1.2 DPPH assay	30
4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ	34
4.2.1 Proteinase inhibitory assay	34
4.2.2 Protein denaturation inhibitory assay	39
4.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอนด์โปรดัคส์	42
4.4 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำลาย elastin ของเอนไซม์ elastase	45
5. สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	51
ข้อเสนอแนะ	51
บรรณานุกรม	52
ภาคผนวก	58
ภาคผนวก (ก) อักษรวิสุทธิ	59
ภาคผนวก (ข) แบบฟอร์มรายงานการเงิน	60

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. องค์ประกอบทางเคมีในแต่ละส่วนของต้นกระดุกไก่ดำจากตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ	5
2. การทดสอบฤทธิ์ protein denaturation inhibitory activity จากสารสกัดใบและรากของต้นกระดุกไก่ดำ	8
3. การทดสอบฤทธิ์ trypsin (proteinase) inhibitory assay จากสารสกัดใบและรากของต้นกระดุกไก่ดำ	9
4. ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของต้นกระดุกไก่ดำ	12
5. แสดงสารและกลไกที่สามารถยับยั้ง AGEs	21
6. แสดงค่า TEAC โดยวิธีวิเคราะห์ FRAP assay, DPPH assay, % inhibition และ IC ₅₀ ของ DPPH assay ของสารสกัดผงต้นกระดุกไก่ดำ	33
7. แสดงผลการยับยั้งการเสื่อมสภาพโปรตีนของ diclofenac sodium และสารสกัดผงต้นกระดุกไก่ดำด้วยวิธี proteinase inhibitory assay	39
8. แสดงผลการยับยั้งการเสื่อมสภาพโปรตีนของ diclofenac sodium และสารสกัดผงต้นกระดุกไก่ดำด้วยวิธี protein denaturation assay	40
9. แสดงผลการยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอนดีโปรดัคส์ของ aminoguanidine และสารสกัดผงต้นกระดุกไก่ดำด้วยวิธี AGEs Inhibitory Assay ที่เวลาบ่ม 24 ชั่วโมง	43
10. แสดงผลการยับยั้งการทำลาย elastin ของเอนไซม์ elastase ของ EGCG และสารสกัดผงต้นกระดุกไก่ดำด้วยวิธี anti-elastase activity assay	49

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่	หน้า
1. ต้นกระดุกไก่อดำ	6
2. รังสี UV-B เหนี่ยวนำกระบวนการอักเสบ	7
3. แสดงกระบวนการไกลเคชันในสิ่งมีชีวิต	18
4. แสดงกลไกการเกิดความแก่และริ้วรอยของผิวหนังมนุษย์	19
5. แสดงกราฟมาตรฐานของ Trolox ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP assay ที่ความยาวคลื่น 620 nm	28
6. กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 nm ของสารสกัดผงต้นกระดุกไก่อดำด้วยวิธีวิเคราะห์ FRAP assay	29
7. กราฟแสดงผล Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) ของสารสกัดต้นกระดุกไก่อดำด้วยวิธีวิเคราะห์ FRAP assay	29
8. แสดงกราฟมาตรฐานของ Trolox ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH assay ที่ความยาวคลื่น 492 nm	30
9. แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผงต้นกระดุกไก่อดำที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH assay ที่ความยาวคลื่น 492 nm	31
10. แสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผงต้นกระดุกไก่อดำด้วยวิธี DPPH assay	32
11. แสดงผล Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) ของสารสกัดต้นกระดุกไก่อดำด้วยวิธีวิเคราะห์ DPPH assay	32
12. แสดงกราฟค่าความขุ่น (%turbidity) ของสารเปรียบเทียบมาตรฐาน diclofenac sodium ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี proteinase inhibitory assay	35
13. แสดงผลการต้านการอักเสบของสารมาตรฐาน diclofenac sodium ด้วยวิธี proteinase inhibitory assay	35
14. แสดงกราฟการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm ของสารเปรียบเทียบมาตรฐาน diclofenac sodium ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี proteinase inhibitory assay	36
15. แสดงกราฟค่าความขุ่น (%turbidity) ของสารสกัดผงต้นกระดุกไก่อดำ ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี proteinase inhibitory assay	37
16. แสดงกราฟการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm ของสารสกัดผงต้นกระดุกไก่อดำที่วิเคราะห์ด้วยวิธี proteinase inhibitory assay	37

17. แสดงผลการต้านการอักเสบของสารสกัดต้นกระดุกไก่อดำด้วยวิธี proteinase inhibitory assay	38
18. แสดงผลการยับยั้งการเสื่อมสภาพโปรตีนของสารสกัดผงต้นกระดุกไก่อดำ ด้วยวิธี protein denaturation assay	40
19. แสดงความสามารถในการยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอนด์โปรดักส์ของสารเปรียบเทียบมาตรฐาน aminoguanidine ที่ความเข้มข้น 0, 50, 100, 200, 400 และ 800 mg/ml ที่เวลาบ่ม 24 ชั่วโมง	42
20. แสดงความสามารถในการยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอนด์โปรดักส์ของสารสกัดผงต้นกระดุกไก่อดำที่ความเข้มข้น 0, 1, 3, 10, 30 และ 100 mg/ml ที่เวลา 24 ชั่วโมง	44
21. แสดงกราฟมาตรฐานของ EGCG ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี anti-elastase activity assay ที่ความยาวคลื่น 405 nm	45
22. แสดงผลการยับยั้งการทำลาย elastin ของเอนไซม์ elastase ของสารมาตรฐาน EGCG ด้วยวิธี Anti-elastase activity assay	46
23. แสดงกราฟค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm ของสารสกัดผงต้นกระดุกไก่อดำด้วยวิธีวิเคราะห์ Anti-elastase activity assay	47
24. แสดงผลการยับยั้งการทำลาย elastin ของเอนไซม์ elastase ของสารสกัดผงต้นกระดุกไก่อดำด้วยวิธี anti-elastase activity assay	48

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

การเปลี่ยนแปลงของผิวหนัง ไม่ว่าจะเป็นการเปลี่ยนแปลงตามวัย หรือการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากสภาวะกระตุ้นที่เป็นปัจจัยภายนอก ส่งผลให้เกิดปัญหาผิวหนังซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่ได้รับผลกระทบมากที่สุด และสามารถสังเกตเห็นร่องรอยการแก่ชราได้อย่างชัดเจน เช่น ริ้วรอย ความแห้งกร้าน ปัจจัยที่ทำให้เกิดความแก่ชราของผิวหนัง (skin aging) มีทั้งปัจจัยภายนอก เช่น แสงแดด มลภาวะ ปัจจัยภายใน เช่น กระบวนการเสื่อมของเซลล์ ภาวะเครียดออกซิเดชัน (1) และมีกลไกการเกิด 3 กลไกหลัก ได้แก่ กระบวนการออกซิเดชัน กระบวนการเกิดการอักเสบ และกระบวนการไกลเคชันซึ่งจะสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอนโดโปรดักส์ (AGEs) โดยทั้งสามกระบวนการนี้จะส่งผลให้โครงสร้าง และการทำงานของโปรตีนภายในร่างกายเปลี่ยนแปลงไป โดยเฉพาะคอลลาเจนที่เป็นองค์ประกอบหลักที่สำคัญของผิวหนัง รวมทั้งโปรตีนชนิดอื่น ๆ เช่น อิลาสติน และไกลโคสมิโนไกลแคน ผลสุดท้ายคือ ทำให้เกิดริ้วรอย และความยืดหยุ่นของผิวหนังลดลง (2)

ในปี 2562 มูลค่าทางการตลาดของอุตสาหกรรมความงามในปี 2562 มีการเติบโตจากปีก่อนหน้านี้ 6.7% คิดเป็นมูลค่าตลาดรวม 2.18 แสนล้านบาท โดยกลุ่มผลิตภัณฑ์ดูแลผิวยังคงครองส่วนแบ่งการตลาดเป็นอันดับ 1 ด้วยสัดส่วน 42% (3) และในปีเดียวกัน ศูนย์วิจัยกสิกรไทยได้คาดการณ์ว่ามูลค่าทางการตลาดของตลาดสมุนไพรที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตผลิตภัณฑ์ในอุตสาหกรรมต่อเนื่อง (อาทิ อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อาหารเสริม ยาสมุนไพร) จะมีมูลค่าไม่ต่ำกว่า 18,200 ล้านบาทและในอนาคตจะเป็นตลาดที่มีการเติบโตสูงอย่างต่อเนื่อง โดยมีปัจจัยสนับสนุน คือ คนรุ่นใหม่ที่นิยมใช้สมุนไพรเป็นทางเลือกในการดูแลสุขภาพ และนโยบายส่งเสริมการใช้สมุนไพรจากภาครัฐ (4)

ต้นกระดุกไก่ดำ (*Justicia gendarussa*) เป็นพืชที่ชอบร่มเงา เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว มีถิ่นกำเนิดมาจากประเทศจีน และได้แพร่พันธุ์อย่างกว้างขวาง พบมากในเขตร้อนโดยมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาจำนวนมาก เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Anti-inflammation) (5), ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Anti-oxidant) (6), ฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Antibacterial activity) (7), ฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Anticancer) (8), ฤทธิ์ปกป้องตับจากสารพิษ (Hepatoprotective effect) (9) และฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ (Anti-angiogenic effect) (10) รวมทั้งมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ เช่น สถาบันการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศรที่ได้นำต้นกระดุกไก่ดำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สเปรย์กระดุกไก่ดำ และสารละลายสกัดจากต้นกระดุกไก่ดำ เพื่อใช้ในการแก้อาการฟกช้ำ ปวดเมื่อย รักษาอาการอักเสบของข้อต่อ และกล้ามเนื้อ

จากข้อมูลที่กล่าวมาจะเห็นว่าต้นกระดุกไก่อามีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาจำนวนมาก โดยเฉพาะฤทธิ์ด้านการอักเสบ, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และ ฤทธิ์ยับยั้งแอดวานซ์ไกลเคชันเอนโดพโรดัคส์ ซึ่งเป็น 3 กลไกหลักที่ทำให้เกิดความแก่ชราของผิวหนัง และการเกิดริ้วรอย (11) ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำมาทดสอบประสิทธิภาพการสมานริ้วรอยก่อนวัย ซึ่งผลที่ได้จะสามารถเป็นแนวทางในการศึกษากลไกในระดับโมเลกุลของสารสกัด รวมทั้งแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อต่อยอดด้านธุรกิจต่อไปได้

1.2 วัตถุประสงค์

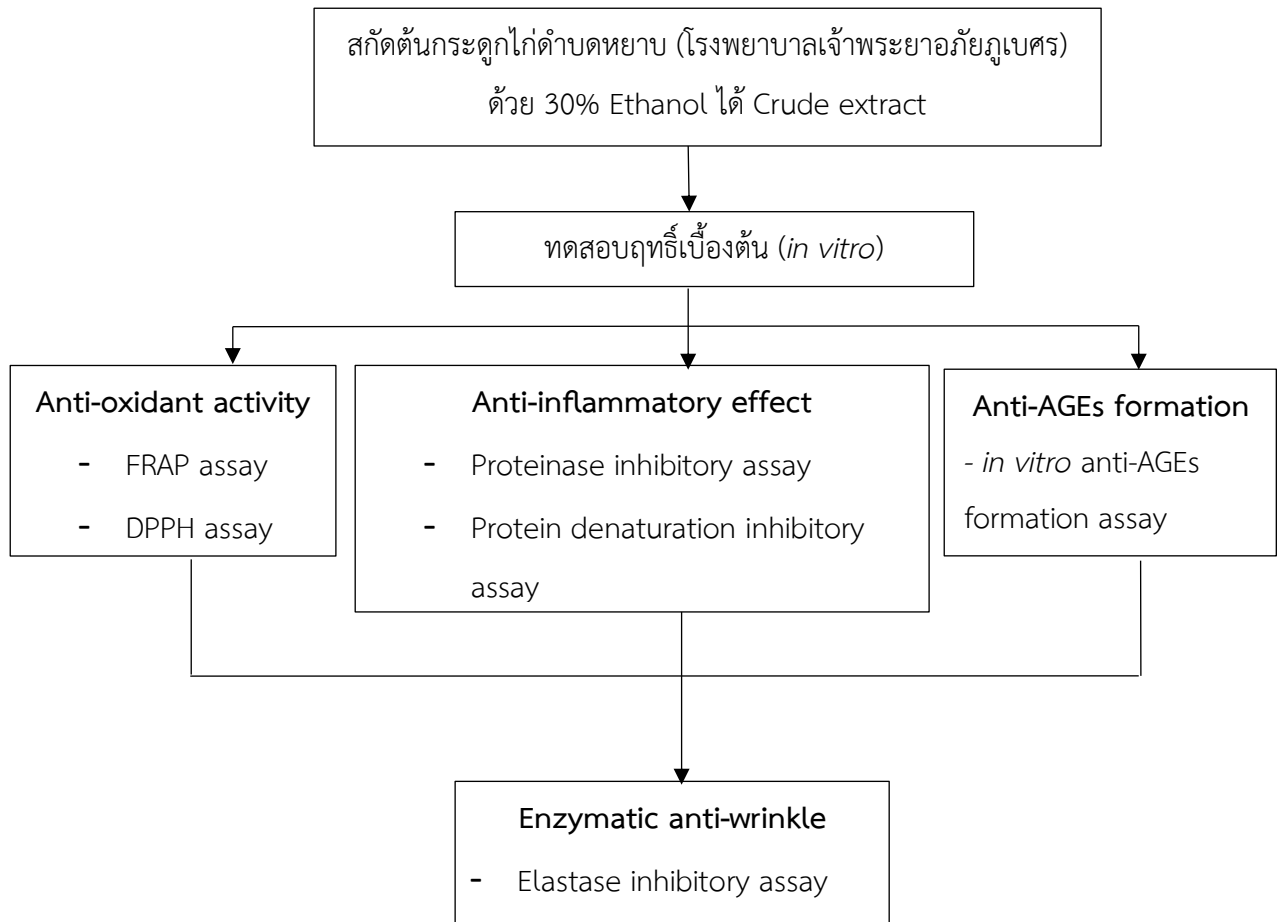
1.2.1 เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากต้นกระดุกไก่อามีต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์การต้านการอักเสบ และฤทธิ์การยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอนโดพโรดัคส์เบื้องต้น

1.2.2 เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการทำลายอีลาสตินของสารสกัดกระดุกไก่อามี

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 เป็นแนวทางในการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลของสารสกัด รวมทั้งเป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อต่อยอดด้านธุรกิจต่อไปได้

1.4 กรอบแนวคิด



บทที่ 2

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทั่วไปของต้นกระดุกไก๋ดำ

ต้นกระดุกไก๋ดำมีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Justicia gendarussa* Burm F. อยู่ในวงศ์ Acanthaceae เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก สูงประมาณ 1.5 เมตร ลำต้น และกิ่งมีข้อปล้องชัดเจน มีสีแดงเข้มถึงสีดำ ผิวเกลี้ยงมัน ใบเป็นใบเดี่ยว มีสีเขียว ดอกช่อ ออกที่ปลายกิ่ง ดอกย่อย เป็นหลอด กลีบดอกสีขาวมีลายสีชมพู โคนกลีบดอกเชื่อมติดกัน ปลายกลีบแยกเป็น 2 ปาก เป็นพรรณไม้ที่มักขึ้นตามลำธาร ในป่าดิบชื้น หรือมีการปลูกเองในบ้าน (12)

2.2 องค์ประกอบทางเคมีของต้นกระดุกไก๋ดำ

ต้นกระดุกไก๋ดำมีองค์ประกอบทางเคมีที่หลากหลาย โดยจะแตกต่างกันไปในแต่ละส่วนของต้น และแต่ละตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีในแต่ละส่วนของต้นกระดุกไ่ดำจากตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

ส่วน ของพืช	ตัวทำละลาย	องค์ประกอบทางเคมีที่พบ	แหล่ง อ้างอิง
ใบ	Hexane	Alkaloids, flavonoids, phenols, saponins, tannins	(13)
	Petroleum ether	Carbohydrates, carotenoids, flavonoids, oil and resins, Steroids, triterpenoids	(14) (15)
	Ethyl acetate	Alkaloids, fat and fixed oils, flavonoids, glycosides, phenols, saponins, tannins, terpenoids	(16)
	Chloroform	Alkaloids, carbohydrates, flavonoids, glycosides, oil and resins, phenols, saponins, steroids, tannins, terpenoids	(2) (15)
	Methanol	Anthraquinones, alkaloids, carbohydrates, flavonoids, glycosides, phenols, polyphenols, saponins, steroids ,tannins, terpenoids, triterpenoids	(13) (15) (17) (18)
	Ethanol	Alkaloids, carbohydrates, flavonoids, glycosides, phenols, protein and free amino acid, saponins, steroids, tannins, terpenoids	(17) (19)
	Water	Alkaloids, Anthraquinones, carbohydrates, flavonoids, glycosides, phenols, protein and free amino acid, saponins, tannins, terpenoids	(13) (17) (19)
ราก	Methanol	Glycosides, flavonoids, steroids, tannins	(17)
	Ethanol	Alkaloids, carbohydrates, flavonoids, glycosides, phenols, Quinones, saponins, steroids, tannins, terpenoids,	(20) (17)
	Water	Glycoside, flavonoids, tannins, terpenoids	(17)
ลำต้น	Methanol	Glycosides, flavonoids, phenols, steroids, Tannins	(17)
	Ethanol	glycosides, phenols, tannins	(17)

ส่วนของพืช	ตัวทำละลาย	องค์ประกอบทางเคมีที่พบ	แหล่งอ้างอิง
	Water	Glycosides, flavonoids, tannins, terpenoids	(17)
ส่วนที่อยู่เหนือดิน	Ethanol	Alkaloids, amino acids, Carbohydrates, flavonoids, glycosides, saponins, tannins	(21)

สารสกัดจากเอทานอลของกระตูดักดำพบว่ามีสารอัลคาลอยด์ (alkaloids) สเตียรอยด์ (steroids) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ฟีนอล (phenols) คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ซาโปนิน (saponins) คูมาริน (cumarins) และควิโนน (quinones) สารสกัดกระตูดักดำจากเมทานอลพบว่ามีสารฟลาโวนอยด์ สารกลุ่มฟีนอลิก คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ รีติวซิงซูการ์ และเทอร์ฟีนอยด์ และสารที่สกัดด้วยเมทานอลพบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ในปริมาณมากเมื่อเทียบกับการสกัดด้วยน้ำ (6)



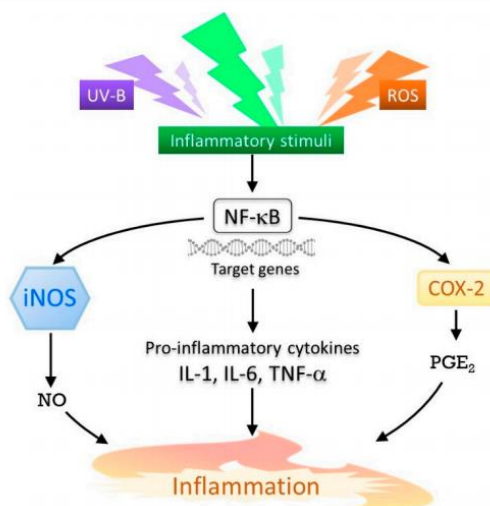
ภาพที่ 5 ต้นกระตูดักดำ (22)

2.3ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของต้นกระดุกไ่ดำ

ต้นกระดุกไ่ดำจัดเป็นพืชที่มีความสำคัญทางการแพทย์ ในประเทศอินเดีย จีน ศรีลังกา มาเลเซีย ส่วนของต้นกระดุกไ่ดำที่นิยมนำมาใช้คือใบ โดยต้นกระดุกไ่ดำได้นำมาใช้ในการรักษาอย่างมากมาย เช่น อาการไข้, อัมพาตครึ่งซีก, โรคไขข้ออักเสบ, ปวดหัว, ปวดหู, ปวดกล้ามเนื้อ, ความผิดปกติของระบบทางเดินหายใจ และทางเดินอาหาร (23) ซึ่งสอดคล้องกับหลายงานวิจัยที่พบว่าต้นกระดุกไ่ดำสามารถต้านการสร้างหลอดเลือดใหม่ (antiangiogenic) ต้านอนุมูลอิสระ ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา ต้านภาวะข้อต่ออักเสบ ต้านการอักเสบ ระวังอาการปวด รักษาอาการป่วย และยังต่อต้าน HIV Type1 reverse transcriptase ซึ่งฤทธิ์ต้าน HIV ยังเป็นฤทธิ์ที่ค้นพบได้ในเพียงหลอดทดลอง อีกทั้งในหลายๆ งานวิจัยได้มีการอธิบายถึงฤทธิ์ของต้นกระดุกไ่ดำ (12) ดังนี้

2.3.1 ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory)

การอักเสบเป็นปฏิกิริยาที่ตอบสนองของร่างกายต่อสิ่งแปลกปลอมที่มารกระตุ้นหรือรบกวน ทำลายเนื้อเยื่อจนเกิดความเสียหาย โดยการอักเสบมีลักษณะสำคัญที่สามารถสังเกตได้ 5 ลักษณะหลัก ๆ ได้แก่ อาการปวด อุณหภูมิสูงขึ้น ผิวหนังแดงและบวมบริเวณที่เกิดการอักเสบ เนื้อเยื่อบริเวณนั้นๆ สูญเสียหน้าที่การทำงาน ซึ่งทั้งหมดนี้เป็นผลมาจากกระบวนการฟาโกไซโทซิส หรือกระบวนการกินของเซลล์ (phagocytosis) ได้แก่ เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล (neutrophils) และแมคโครฟาจ (macrophage) ซึ่งจะไปกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ (leukocyte chemotaxis) จากภายในหลอดเลือดไปยังบริเวณที่ถูกทำลาย ทำให้หลั่งไซโตไคน์ (cytokines) กระตุ้นให้เกิดการอักเสบ (5)



ภาพที่ 6 รังสี UV-B เหนี่ยวนำกระบวนการอักเสบ (5)

หลักการทำงานของกระบวนการอักเสบคือการยับยั้งเอนไซม์ไซโคลออกซีจีเนส (cyclooxygenase, COX) ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยน กรดอะราคิโดนิก (arachidonic) เป็นโพรสตาแกลนดิน (prostaglandins) และ 5-ไลโปออกซีจีเนส (5-lipoxygenase, 5-LOX) ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยนกรด arachidonic เป็นลิวโคไตรอีน (leukotrienes) (5)

สารสกัดเมทานอลจากต้นกระตูดไก่ดำมีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง COX, 5-LOX, interleukin-6 (IL-6) และ nuclear factor kappa B (NF-KB) ใน lipopolysaccharide ซึ่งจะไปกระตุ้น human peripheral blood mononuclear cells (hPBMCs) สามารถลด Lipopolysaccharide ที่จะไปกระตุ้นให้เกิด iNOS และ COX-2 ซึ่งเป็นสาเหตุของการอักเสบ อีกทั้งสารสกัดยังมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ apigenin ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ลดระดับ NF-KB, COX-2, IL-1 และ THF- α ซึ่งเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ นอกจากนี้ apigenin ยังช่วยเพิ่มระดับ cytokine และ IL-10 อีกด้วย (5)

จากการทบทวนวรรณกรรมการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบด้วยวิธี protein denaturation inhibitory activity จากการสกัดต้นของต้นกระตูดไก่ดำด้วยเมทานอล มีค่า IC_{50} เท่ากับ 180.24 $\mu\text{g/ml}$ เทียบกับสารมาตรฐาน indomethacin ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 19.41 $\mu\text{g/ml}$ ดังตารางที่ 2 และวิธี trypsin (proteinase) inhibitory assay จากการสกัดต้นกระตูดไก่ดำด้วยเมทานอล มีค่า IC_{50} เท่ากับ 209.01 $\mu\text{g/ml}$ เทียบกับสารมาตรฐาน indomethacin ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 11.57 $\mu\text{g/ml}$ (24) ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 2 การทดสอบฤทธิ์ protein denaturation inhibitory activity จากสารสกัดใบและรากของต้นกระตูดไก่ดำ (24)

Test Extracts	IC_{50} $\mu\text{g/ml}$
L1- Methanolic extract of leaf	0180.24
L2-Toluene soluble fraction of leaf	0153.25
L3-Toluene insoluble fraction	Inactive
L4- Acetone soluble fraction	Inactive
R1-Methanolic extract of root	0135.80
R2- Acetone soluble fraction of root	1246.00
R3- Ether soluble fraction of root	5024.65

ตารางที่ 3 การทดสอบฤทธิ์ trypsin (proteinase) inhibitory assay จากสารสกัดใบและรากของต้นกระตึกไก่ดำ (24)

Test Extracts	IC ₅₀ µg/ml
L1- Methanolic extract of leaf	0209.01
L2-Toluene soluble fraction of leaf	0034.85
L3-Toluene insoluble fraction	0950.13
L4- Acetone soluble fraction	1292.20
R1-Methanolic extract of root	0054.71
R2- Acetone soluble fraction of root	0340.74
R3- Ether soluble fraction of root	0657.85

2.3.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

อนุมูลอิสระคือ โมเลกุล หรือไอออนที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียร และมีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยา อนุมูลอิสระแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ ออกซิเจน และไนโตรเจน อนุมูลอิสระของออกซิเจน เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide) อนุมูลไฮดรอกซิล (hydroxyl radicals) และอนุมูลเปอร์ออกไซด์ (peroxyl radicals) โดยเรียกว่า reactive oxygen species (ROS) โดยอนุมูลอิสระเกิดจากการใช้ออกซิเจนในกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ และอนุมูลอิสระของไนโตรเจน โดยเรียกว่า reactive nitrogen species (RNS) เช่น ไนโตรเจนไดออกไซด์ (nitrogen dioxide) อนุมูลไนตริก ออกไซด์ (nitric oxide radicals) และเปอร์ออกซีไนไตรท์ ความเข้มข้นของ ROS ในระดับน้อยถึงปานกลางสามารถป้องกันการติดเชื้อ และกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส แต่หากความเข้มข้นของ ROS ในระดับสูงจะสามารถทำลายความสมดุลของสารต้านอนุมูลอิสระในสิ่งมีชีวิต ระดับ ROS ที่สูงเกินไปจะทำลายการทำงานของเซลล์ไขมัน เปลี่ยนสภาพโปรตีน ทำลายโครงสร้าง DNA ซึ่งก่อให้เกิดโรค เช่น มะเร็ง เบาหวาน โรคที่สัมพันธ์กับการอักเสบ โรคเกี่ยวกับระบบประสาท และระบบภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้การทดลองในสัตว์จำพวกหนูยังพบว่าการออกกำลังกายสามารถลดภาวะความไม่สมดุลของการเกิดอนุมูลอิสระ (oxidative stress) และในการออกกำลังกายในระดับปานกลางทำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ในการต้านอนุมูลอิสระทำให้ภาวะความไม่สมดุลของการเกิดอนุมูลอิสระลดลง (5)

จากการทบทวนวรรณกรรมการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบกระดุกไก่ดำ มีการสกัดด้วยตัวทำละลายหลายชนิด เช่น hexane, chloroform, ethyl acetate, methanol, ethanol และ aqueous โดยพบว่าผงใบกระดุกไก่ดำที่สกัดด้วย ethanol มีสารประกอบอินทรีย์มากที่สุด (25)

2.3.3 ฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสเอชไอวี (Anti-HIV)

Human Immunodeficiency Virus (HIV) เป็น retrovirus ที่ติดเชื้อในระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ HIV จะทำลายระบบภูมิคุ้มกันโดยไปทำลาย T lymphocyte cell และเมื่อจำนวน T-CD4 lymphocyte cells ลดลง ทำให้เกิดอาการอ่อนแอนำไปสู่การติดเชื้อไวรัส และหากติดเชื้อไวรัสแล้วจะทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของไวรัส จนในที่สุดจะนำไปสู่ ภาวะความสามารถของระบบภูมิคุ้มกันในการต่อต้านการติดเชื้อเกิดการบกพร่องอย่างรุนแรง (acquired immunodeficiency syndrome, AIDs) (26)

การติดเชื้อ HIV ทำให้ CD4 cell และ T-cell ลดลงและสารที่มีคุณสมบัติเป็น anti-HIV จะสามารถยับยั้ง HIV replication ได้โดยการลดจำนวนของ p24 และยับยั้งการเติบโตของเซลล์ ซึ่งต้นกระดุกไก่ดำมีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง HIV โดยจะยับยั้ง HIV reverse transcriptase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยน RNA ของเชื้อให้เป็น single stranded DNA ก่อนที่จะถูกเปลี่ยนต่อไปให้อยู่ในรูป double stranded DNA และเข้าไปเชื่อมต่อกับโครโมโซมของ host cell (26)

2.3.4 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Antibacterial)

การติดเชื้อแบคทีเรียสามารถเกิดขึ้นได้ในทุกส่วนของร่างกาย ซึ่งแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีความจำเพาะในการก่อโรคที่ต่างบริเวณกัน เช่น เชื้อ *Neisseria meningitidis* โดยปกติจะเกิดการติดเชื้อที่เยื่อหุ้มสมองในระบบประสาท เป็นเหตุให้เกิดโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ นอกจากนี้ยังสามารถก่อโรคที่ปอดเป็นสาเหตุให้เกิดปอดอักเสบ เชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็นสาเหตุของการติดเชื้อที่ผิวหนังหรือเนื้อเยื่อ และแพร่กระจายได้รวดเร็วผ่านทางกระแสเลือดจึงสามารถเกิดการติดเชื้อไปยังบริเวณอื่น ๆ เช่น ปอด ช่องท้อง หัวใจ หลอดเลือด เป็นต้น (7)

โรคต่าง ๆ เกิดได้จากการที่เซลล์ร่างกายถูกทำลายด้วยระบบภูมิคุ้มกันที่มาตอบสนองการติดเชื้อ ซึ่งอาการที่ร่างกายตอบสนองต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย เกิด

จากการปล่อย cytokines ออกมาจำนวนมาก จนอาจพัฒนาไปเป็นภาวะติดเชื้อที่อันตรายมากขึ้นจนอวัยวะต่าง ๆ ล้มเหลว และเสียชีวิตได้ จึงต้องใช้สารที่มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียเพื่อลดกระบวนการเหล่านี้ (7)

ในสารสกัดกระดูกไก่ดำที่ได้จากขั้นตอนการหมักและทำให้อยู่ในรูปซีฟิ่ง หรือครีมจะมีคุณสมบัติเกี่ยวข้องกับการช่วยสมานแผล และยังมีประสิทธิภาพในยับยั้งแบคทีเรียหลายชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus mutans*, *Micrococcus luteus*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae* และ *Shigella flexneri* ซึ่งประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน (7) ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของต้นกระดุกไก่อดำ

Test microorganisms	Zone of inhibition (mm)						
	Positive control	Solvent control	Hexane	DEE	DCM	Ethyl acetate	Methanol
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	-	6	5	4	5	7
<i>Staphylococcus mutans</i>	13	-	7	6	4	7	9
<i>Bacillus subtilis</i>	15	-	6	5	3	5	12
<i>Micrococcus luteus</i>	18	-	4	6	5	7	11
<i>Proteus vulgaris</i>	13	-	6	5	4	6	8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	17	-	6	5	6	8	9
<i>Escherichia coli</i>	12	-	5	6	7	6	12
<i>Shigella flexneri</i>	15	-	6	7	5	3	9

DEE: Diethyl ether, DCM: Dichloromethane, Positive control: Gentamycin

2.3.5 ฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Anticancer)

มะเร็งคือโรคที่เกิดจากความผิดปกติของเซลล์ที่อวัยวะต่าง ๆ ในร่างกาย โดยจะมีการเจริญที่ผิดปกติ เกิดเป็นก้อนเนื้อที่มีการลุกลามไปยังอวัยวะข้างเคียง และอาจกระจายไปยังส่วนอื่น ๆ ของร่างกายได้ผ่านทางระบบหลอดเลือด หรือระบบทางเดินน้ำเหลือง ซึ่งมีสาเหตุของการเกิดได้หลายสาเหตุ และถือเป็นปัญหาสุขภาพที่สำคัญของคนในปัจจุบัน จึงมีการศึกษาค้นคว้าหาวิธีการรักษา ทั้งด้านยา และการทำเคมีบำบัด ซึ่งการลดลงของเซลล์มะเร็งจะมีความเชื่อมโยงเกี่ยวกับพฤติกรรมบริโภคผัก และผลไม้รวมถึงผลจากการป้องกันสารเคมี มีสารสำคัญที่เกี่ยวข้องคือสาร kaempferol เป็นสารสำคัญในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) พบได้ในผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติหลากหลายชนิด เช่น ถั่ว บล็อกโคลี่ ผักกาด เมล็ดเชีย กระเทียม ฯลฯ ซึ่ง kaempferol มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ได้แก่ การต้าน

เชื้อแบคทีเรีย ด้านการอักเสบ ด้านอนุมูลอิสระ ป้องกันโรคหัวใจ ป้องกันระบบประสาท ป้องกันเบาหวาน และนำมาปรับใช้ในการทำเคมีบำบัด อีกทั้ง kaempferol ยังสัมพันธ์กับการลดความเสี่ยงในการเจริญของมะเร็งบางชนิด เช่น มะเร็งผิวหนัง มะเร็งตับ และมะเร็งลำไส้ (27)

จากงานวิจัยที่ทดลองฤทธิ์ของสารสกัดในเซลล์ พบว่าสารสกัดกระดุกไก่ดำ มีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ 2 ชนิด ได้แก่ kaempferol และ naringenin ซึ่ง kaempferol มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งตับอ่อน และเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งตาย และ naringenin สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว นอกจากนี้สารสกัดยังสามารถยับยั้งมะเร็งเต้านมได้อีกด้วย (27)

2.3.6 ฤทธิ์ปกป้องตับจากสารพิษ (Hepatoprotective)

ตับเป็นอวัยวะที่สำคัญในควบคุมระบบเมแทบอลิซึม การหลั่งสาร การกักเก็บสาร และการกำจัดสารพิษในร่างกาย เซลล์ตับมีกลไกการซ่อมแซมตัวเองโดยเกิดการเหนี่ยวนำสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase, SOD), ตัวเร่งปฏิกิริยา (catalase), กลูตาไทโอนเปอร์ออกไซด์ (glutathione peroxide, GSHPx) ไปจัดการกับ ROS ทั้งโมเลกุลขนาดเล็กและขนาดใหญ่ที่มีการสร้างอย่างต่อเนื่องจนนำไปสู่การทำลายเซลล์ในร่างกาย ซึ่งหากตับถูกทำลายจนเกิดความเสียหายมากจะทำให้การทำงานของตับผิดปกติไป (9)

สารที่เป็นตัวเหนี่ยวนำความเสียหายของตับมี 2 ชนิด คือ พาราเซตามอล (acetaminophen, APAP) และคาร์บอนเตตระคลอไรด์ (CCl_4) ซึ่ง APAP จะถูกเมแทบอลิซึมผ่านตับเป็นส่วนใหญ่ และถูกขับออกในรูป glucuronide และ sulfate conjugates โดย CCl_4 มีกลไกการเกิดพิษจากการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ไซโตโครม P450 (cytochrome P450) ในกระบวนการเมแทบอลิซึม และเกิดเป็นอนุมูลอิสระที่เรียกว่า ไตรคลอโรเมทิล (trichloromethyl) ส่งผลให้เกิดกระบวนการ ลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) ซึ่งถูกตรวจพบมาลอนไดแอลดีไฮด์ (malondialdehyde, MDA) ในปริมาณที่สูงขึ้น อย่างไรก็ตาม APAP จะถูกเมแทบอลิซึมผ่านเอนไซม์ไซโตโครม P450 (cytochrome P450) และกลายเป็น n-acetyl-P-benzoquinoneimine (NAPQI) ซึ่งมีความเป็นพิษ แต่ใน

ระยะเริ่มต้น จะเกิดสาร NAPQI เพียงเล็กน้อย ซึ่งสามารถจับกับ glutathione และได้เป็น mercapturic acid ที่ไม่เป็นพิษ แต่หากมีภาวะที่ได้รับ APAP เกินขนาด จะทำให้เกิด NAPQI เพิ่มขึ้น และเกิดการออกซิไดซ์โมเลกุลของเนื้อเยื่อ เช่น ไขมัน และโปรตีนที่โมเลกุลพันธะซัลไฮดริล (S-H) และควบคุม calcium homeostasis ที่เปลี่ยนแปลงจากการที่ระดับ GSH ลดลง (9)

สารสกัดใบกระดุกโกดำที่สกัดจากเมทานอล พบสารกลุ่มฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ โดยสารทั้งสองมีฤทธิ์ antioxidant และ hepatoprotective จากการทดลองที่ใช้ CCl_4 เป็นสารทำลายเซลล์ตับ ซึ่งสารสกัดกระดุกโกดำสามารถยับยั้ง CCl_4 ที่ทำลายเซลล์ตับดังกล่าวได้โดยการลดระดับค่าตับคือค่า aspartate transaminase (AST) และ alanine transaminase (ALT) และยังเพิ่มระดับ antioxidant enzymes (9)

2.3.7 ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ (Antiangiogenesis)

Angiogenesis หรือ neovascularization คือกระบวนการทางสรีรวิทยาที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเส้นเลือดใหม่ เกี่ยวกับการกระตุ้น การเพิ่มจำนวน การย้ายที่ของ endothelial cells เป็นกระบวนการปกติที่สำคัญในการเจริญเติบโต และการพัฒนาของร่างกาย รวมทั้งเพื่อซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอเมื่อเกิดบาดแผลในส่วนต่าง ๆ ของร่างกายแต่ยังมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดพยาธิสภาพในโรคเบาหวาน จอประสาทตา โรคข้ออักเสบรวมถึงการเจริญเติบโตของเนื้องอก และในภาวะที่มีความไม่สมดุลในร่างกายจะทำให้เกิดการสร้างหลอดเลือดขึ้นมาในปริมาณมากได้ (10)

ในประเทศอินเดียมีรายงานว่า *Centella asiatica*, *Justicia gendarussa* และ *Imperata cylindrica* มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคความดันโลหิตสูง ภาวะความไม่สมดุลของการเกิดอนุมูลอิสระมีบทบาทในการเกิดโรคความดันโลหิตสูงซึ่งจะทำให้เกิดหัวใจห้องล่างซ้ายขยายตัว (left ventricular hypertrophy) จากการศึกษาพบว่าสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด สามารถยับยั้งการเปลี่ยนแปลงหัวใจของหนูที่เป็นความดันโลหิตสูง โดยผ่านกลไก NADPH oxidase (NOXs) ซึ่ง NOX มีบทบาทสำคัญในการพัฒนาเป็นโรคหัวใจ และหลอดเลือด เช่น โรคหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis), ความดันโลหิตสูง (hypertension), กล้ามเนื้อหัวใจหนาผิดปกติ และเกิดการเปลี่ยนแปลง (cardiac hypertrophy และ remodeling), การสร้าง

หลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) และอาจเกิดภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด และ เกิดหัวใจล้มเหลว (stroke and heart failure) (10)

2.4 กระบวนการแก่ชราและการเกิดริ้วรอยของผิวหนัง

ความแก่ชราเป็นกระบวนการที่มีชีวิตทุกชนิดต้องพบเจอ ไม่สามารถหลีกเลี่ยงได้ ในมนุษย์ผิวหนังเป็นเนื้อเยื่อที่ได้รับผลกระทบจากความแก่ชรามากที่สุด ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับผิวหนังคนแก่กับผิวหนังวัยหนุ่มสาวพบว่า ผิวหนังของคนที่มีอายุจะมีปริมาณของ เซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblasts) ลดลง ทำให้การสร้างคอลลาเจน (collagen) อีลาสติน (elastin) และไกลโคสะมิโนไกลแคน (glycosaminoglycans) ลดลง ผลลัพธ์ทำให้เกิดริ้วรอย (wrinkle) (28)

โดยมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องคือปัจจัยภายนอกซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากการได้รับแสงแดด เรียกว่า “Photoaging” จากการที่สัมผัสกับรังสีอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet, UV) เป็นเวลานาน ซึ่งรังสีที่มีผลกระทบต่อผิวหนังคือรังสี UV-A และ UV-B เนื่องจากเป็นเป็นสารก่อมะเร็ง สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดสารอนุมูลอิสระได้ (29) โดยการสัมผัสรังสี UV เป็นเวลานาน จะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ collagenase ส่งผลให้ผิวหนังเกิดริ้วรอย ผิวหยาบแห้ง การสร้างเมตริกซ์ผิดปกติ ซึ่งการเกิดความแก่ของผิวหนังเกิดจากปัจจัยภายนอก (28)

2.4.1 ปัจจัยภายนอกที่ส่งผลต่อการเกิดความแก่ของผิวหนัง

1) การเปลี่ยนแปลงของแมทริกซ์ที่อยู่นอกเซลล์ (Extracellular matrix cell)

Extracellular matrix cell หรือ ECM เป็นโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นร่างแห มีความจำเป็นในการเจริญเติบโตและเพิ่มความยืดหยุ่นให้ผิวหนัง และมีบทบาทสำคัญในการค้ำจุนร่างกายของร่างกาย โดย ECM มีคอลลาเจน และอีลาสตินเป็นส่วนประกอบหลัก และยังประกอบด้วยไกลโคสะมิโนไกลแคน การเสื่อมสลายของ ECM มีความเชื่อมโยงกับความแก่ชราโดยตรง มีความสัมพันธ์เกี่ยวกับการลดลงของคอลลาเจน อีลาสติน และไกลโคสะมิโนไกลแคน ซึ่งสาเหตุหลักของการเสื่อมสลายของคอลลาเจนเกิดจากการที่เอนไซม์ไฮยาลูนิเดส (hyaluronidase), เอนไซม์อีลาสเทส (elastase) และเอนไซม์คอลลาจีเนส (collagenase) ทำงานเพิ่มขึ้น เนื่องจากถูกกระตุ้นด้วย neutrophils, IL-1, IL-6 และ TNF-alpha (30)

2) การเพิ่มขึ้นของ Matrix metalloproteinase (MMPs) และการส่งทอดสัญญาณเข้าสู่เซลล์ (Cellular signal transduction)

Matrix metalloproteinases (MMPs) มีส่วนประกอบเป็น proteinases ที่มีความสามารถในการย่อย ECM ซึ่งเป็นส่วนประกอบของโครงสร้างของผิวหนัง ในสภาวะปกติ ร่างกายจะมีปริมาณของ MMPs ค่อนข้างต่ำ แต่จะมีปริมาณสูงขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตคือ เมื่อผิวหนังดูดซับรังสีอัลตราไวโอเล็ต จะนำไปสู่การสร้าง ROS ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งจะกระตุ้น growth factor และ cytokine receptors ผ่านทาง MAP kinase pathway ส่งผลทำให้เกิดการส่งสัญญาณไปยัง Protein kinase แล้วกระตุ้น Activating protein-1 (AP-1) ที่ประกอบด้วยโปรตีน c-Jun และ c-Fos และยังกระตุ้น Nuclear factor-B (NF- κ B) ในนิวเคลียส การเพิ่มขึ้นของ ระดับ AP-1 จะเหนี่ยวนำทำให้ปริมาณของเอนไซม์ MMPs เพิ่มขึ้น เช่น MMP-1, MMP-3, MMP-8 และ MMP-9 และเกิดการเสื่อมสลายของแมทริกซ์ที่อยู่นอกเซลล์ ซึ่งประกอบไปด้วยคอลลาเจน (collagen), อิลาสติน (elastin) และไกลโคสะมิโนไกลแคน (glycosaminoglycans) ในผิวหนัง (29)

2.4.2 ปัจจัยภายนอกที่ส่งผลต่อการเกิดความแก่ของผิวหนัง

1) กระบวนการเสื่อมของเซลล์ (Cellular senescence)

ในเซลล์ fibroblast ของผิวหนังจะมีเอนไซม์ MMPs ทำหน้าที่ย่อย ECM (collagen, elastin, glycosaminoglycan) เช่น เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยคอลลาเจน (collagenase หรือ metalloproteinase-1, MMP-1) ซึ่งในสภาวะปกติจะพบเอนไซม์ชนิดนี้ในปริมาณต่ำ และมีเอนไซม์ tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) ซึ่งทำหน้าที่ยับยั้งเอนไซม์ MMPs ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง แต่ในเซลล์ fibroblasts ที่เกิดกระบวนการแก่ชรา จะมีปริมาณ MMPs ค่อนข้างสูงและมี TIMPs ค่อนข้างต่ำ ส่งผลให้การสังเคราะห์คอลลาเจนลดลง ทำให้โครงสร้างของผิวหนังเกิดการเปลี่ยนแปลงซึ่งเป็นสาเหตุทำให้ผิวหนังฝ่อและเกิดริ้วรอย (31)

2) ภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress)

เกิดจากความไม่สมดุลระหว่างอนุมูลอิสระ (free radical และ ROS) ทั้งที่เกิดจากปัจจัยภายนอก และภายในร่างกาย และสารต้านอนุมูล

อิสระภายในร่างกาย (anti-oxidant) โดยมีกลไกคือ ROS ที่เกิดขึ้นจะไปกระตุ้น growth factor cytokine receptors บนผิวของเซลล์ fibroblasts ส่งผลให้เกิดการส่งสัญญาณไปยัง protein kinase ไปกระตุ้น activating protein-1 (AP-1) ในนิวเคลียส ทำให้ปริมาณของเอนไซม์ MMPs เพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดการทำลาย DNA และ collagen และในขณะเดียวกัน ROS ก็จะไปกระตุ้นการสร้าง IL-1, IL-6, TNF-alpha และ CCN-1 ส่งผลให้การสร้าง collagen ลดลง (32) และ ROS ยังเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ elastase ในการทำลาย elastin ซึ่งมีหน้าที่เพิ่มความยืดหยุ่นแก่ผิวหนัง ทำให้ elastin ในผิวลดลง ส่งผลให้เกิดริ้วรอยได้ (43)

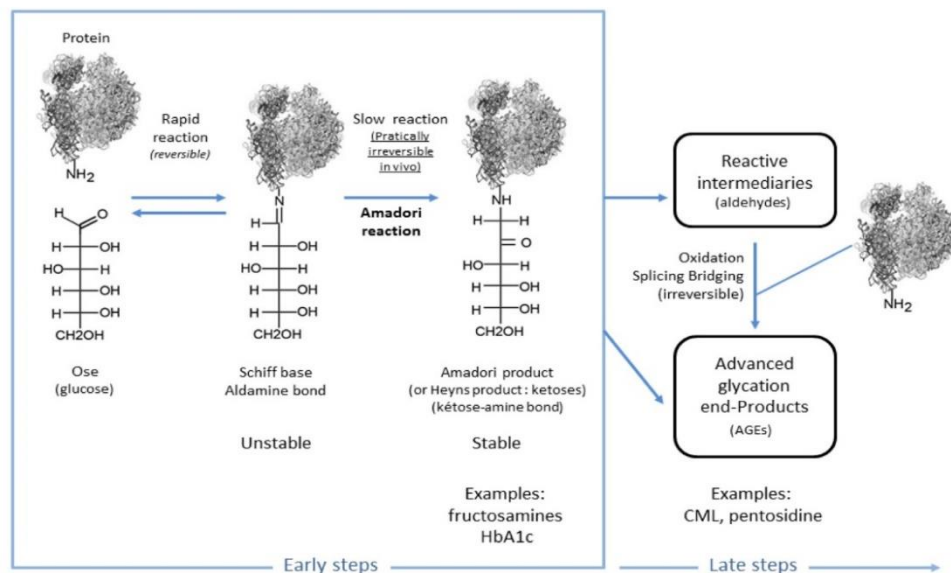
กระบวนการแก่ชราของผิวหนังมี 3 กระบวนการหลักที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ กระบวนการออกซิเดชัน กระบวนการอักเสบ และกระบวนการไกลเคชันซึ่งจะสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอนด์โปรดักส์ (29)

โดยกระบวนการอักเสบที่เกี่ยวข้องกับการเกิดริ้วรอยมักเกิดจากปัจจัยภายนอกอย่างแสงแดด และมลภาวะต่าง ๆ ที่มากระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระผ่านกระบวนการออกซิเดชัน อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะไปกระตุ้น pathway ต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เกิดการหลั่ง NF-kB และ AP-1 ซึ่งทั้งสองตัวนี้จะกระตุ้นให้เอนไซม์ collagenase ทำงานเพิ่มขึ้น ในขณะเดียวกันก็เกิดการหลั่ง IL-1, IL-6, TNF-alpha และ CCN-1 จากกระบวนการอักเสบด้วย โดยทั้ง 4 ตัวจะส่งผลให้สร้างคอลลาเจนและอีลาสตินลดลง ส่งผลให้เกิดริ้วรอยได้ (29)

2.5 กระบวนการไกลเคชัน

ไกลเคชัน คือ กระบวนการเกิดปฏิกิริยาระหว่างหมู่คาร์บอนิลของน้ำตาลรีดิวซิงอิสระกับหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีน DNA และไขมันซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ หลังจากทำปฏิกิริยากันแล้วจะเกิด Schiff base ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่ไม่เสถียร สามารถผันกลับไปเป็นน้ำตาลรีดิวซิงอิสระกับโปรตีนได้ เมื่อเวลาผ่านไปหลาย ๆ วันจะเกิด amadori product ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่มีความเสถียร ไม่สามารถผันกลับไปเป็น Schiff base ได้ และสุดท้ายจะกลายมาเป็นแอดวานซ์ไกลเคชันเอนด์โปรดักส์ หรือ AGEs และมีการสะสมอยู่ในร่างกาย (33) ความหลากหลายของ AGEs ขึ้นกับ glycating agent ยกตัวอย่างเช่น AGEs ที่ได้จาก glyoxal ได้แก่ carboxymethyl lysine (CML), glyoxal lysine dimer (GOLD) AGEs ที่ได้จาก

methyglyoxal ได้แก่ carboxyethyl lysine (CEL), argpyrimidine, methyglyoxal lysine dimers (MOLD) และอื่น ๆ และ AGEs ที่ได้จาก 3-deoxyglucosone (3DG) ได้แก่ pyralline and deoxyglucosone-derived lysine dimer (DOLD) (33)



ภาพที่ 7 แสดงกระบวนการไกลเคชันในสิ่งมีชีวิต

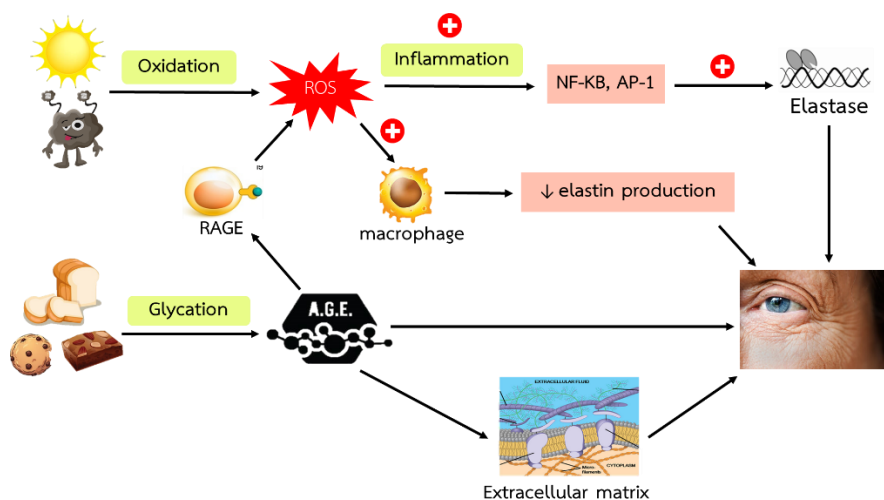
AGEs สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดความเสียหายแก่ ECM และเซลล์ผ่าน 3 กลไกหลัก ดังนี้

1. สะสมอยู่ใน ECM เช่น collagen และ elastic fiber และเกิดการ cross-linking ระหว่าง AGEs กับ และ ECM ทำให้เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) สูญเสียความยืดหยุ่น โดยเฉพาะการ cross-linking ระหว่าง AGEs และ คอลลาเจน จะทำให้คุณสมบัติเชิงกลของคอลลาเจนเปลี่ยนแปลงไป ส่งผลให้เกิดริ้วรอยได้ (34)

2. AGEs ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงโปรตีนภายในเซลล์ผ่านกระบวนการไกลเคชันจะทำให้เซลล์สูญเสียการทำงานเดิม โดยถ้าหากมีการเปลี่ยนแปลงโปรตีนที่เป็นตัวส่งสัญญาณ จะทำให้การทำงานของเซลล์ และการแสดงออกของยีนเปลี่ยนแปลง เช่น จะไปลดการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant enzyme) รวมทั้ง ตัวเร่งปฏิกิริยา (catalase), กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione

peroxidase) และกลูตาไธโอนรีดักเทส (glutathione reductase) ซึ่งการไปลดการทำงานของเอนไซม์เหล่านี้จะทำให้ภาวะเครียดออกซิเดชันในเซลล์เพิ่มขึ้น ยิ่งไปกว่านั้น โปรตีนที่ผ่านกระบวนการไกลเคชันจะถูกกำจัดผ่าน ubiquitin-dependent 20S proteasome-mediated proteolysis ซึ่ง AGEs สามารถไปรบกวนกระบวนการนี้ได้ ทำให้โปรตีนที่ผ่านกระบวนการไกลเคชันในเซลล์เพิ่มสูงขึ้น (34)

3. จับกับ Receptor (RAGE) โดย RAGE เป็นโมเลกุลที่อยู่บริเวณผิวเซลล์ที่โดดเด่นในการจดจำ AGEs การจับกันระหว่าง RAGE และ AGEs จะเปลี่ยนแปลงการทำงานของเซลล์ ซึ่งส่วนใหญ่จะเกิดผ่านโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ โดยกระตุ้นให้เกิดการอักเสบผ่าน inflammatory signaling pathway นำไปสู่การแก่ชรา นอกจากนี้ RAGE ยังมีหน้าที่ควบคุมกระบวนการทำงานที่สำคัญของเซลล์อีกหลายอย่าง เช่น การตาย (apoptosis) การส่งสัญญาณ ROS การเพิ่มจำนวนเซลล์ และการกลืนกินตัวเอง (autophagy) (34)



ภาพที่ 8 แสดงกลไกการเกิดความแก่และริ้วรอยของผิวหนังมนุษย์

2.5.1 AGEs inhibitor

Aminoguanidine เป็นสารตัวแรกที่ถูกนำมาใช้ในการยับยั้ง AGEs โดย AGEs inhibitor ทั้ง aminoguanidine และ pyridoxamine สามารถป้องกันการสะสม AGE โดยจับกับหมู่คาร์บอนิลที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา และทำหน้าที่คล้ายเป็นตัวจับคาร์บอนิล (carbonyl trap) ในงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า aminoguanidine

สามารถป้องกันภาวะแทรกซ้อนที่ไต ตา ระบบประสาทที่เกิดจากเบาหวาน โดยการยับยั้งการสร้าง AGEs แต่อย่างไรก็ตาม aminoguanidine ไม่สามารถนำมาใช้ในทางคลินิกได้ เนื่องจากเหตุผลด้านความปลอดภัยจากทั้งผลข้างเคียงและการเป็น pro-oxidant (34)

ผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรได้รับการยอมรับว่าค่อนข้างปลอดภัยต่อการบริโภคเมื่อเทียบกับยาที่ได้จากการสังเคราะห์ ดังนั้น การหาสารต้าน AGEs โดยใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติจึงมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ ซึ่งผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติหลายชนิด มีฤทธิ์ต้านการทำงานของกระบวนการไกลเคชันซึ่งฤทธิ์นี้อาจจะเหมือนหรือแรงกว่า aminoguanidine ยกตัวอย่างเช่น polyphenol หลายตัวสามารถยับยั้งกระบวนการไกลเคชันได้ในหลอดทดลอง ฟลาโวนอยด์จัดเป็นสารกลุ่มหลักของ polyphenol มีรายงานออกมาว่าสารฟลาโวนอยด์หลายตัว เช่น kaemferol, genistin, quercitrin และ quercetin มีคุณสมบัติในการต้านการเกิดกระบวนการไกลเคชัน และเมื่อไม่นานมานี้มีการค้นพบว่าสาร epicatechin มีคุณสมบัติในการทำลาย AGE ทั้งในหลอดทดลอง และในสิ่งมีชีวิต โดยสารประกอบชนิดนี้ทำลาย serum albumin ที่ถูก glycated ในหลอดทดลองและลดการสะสม AGEs ใน retinal tissue ของหนูทดลองที่ถูกฉีด AGEs เข้าไป โดยมีการคาดการณ์ว่า side chain ที่ติดกับ pyrrole ring ที่เป็นคาร์บอนในโครงสร้างของ AGE เป็นบริเวณที่เกิด nucleophilic attack เนื่องจาก C6 และ C8 บน A-ring ของ epicatechin เป็น nucleophilic ดังนั้น epicatechin จึงสามารถเข้ามาจับและทำลาย AGEs ที่เกิดการ cross-link (34) นอกจากนี้ยังมีสารอื่น ๆ ที่สามารถยับยั้ง AGEs ได้ ดังตารางที่ 5 ต่อไปนี้

ตารางที่ 5 แสดงสารและกลไกที่สามารถยับยั้ง AGEs

สาร	กลไก
Aminoguanidine	จับกับสารประกอบคาร์บอนิลที่พร้อมจะเกิดปฏิกิริยา (reactive carbonyls) ในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด โดยเฉพาะสารประกอบแอมาดอรี และจับกับสารประกอบไดคาร์บอนิล เช่น methylglyoxal, glyoxal, และ 3-deoxyglucosone ด้วย (35)
<i>N</i> -(2Acetamidoethyl) hydrozinecarboximidamide hydrochloride (ALT-946)	ยับยั้งกระบวนการเหนี่ยวนำให้เกิดการ cross-links กับ AGEs (36)
(±)-2-isopropylidenehydrazono-4-oxothiazolidin-5-ylacetanidide (OPB-9195)	จับกับสารตัวกลางคาร์บอนิล เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไฟล์ในโปรตีน
4,5-Dimethyl-3-phenacylthiozolium chloride (ALT-711)	ทำลาย cross-links ของ AGEs ทำลายพันธะระหว่างคาร์บอนกับคาร์บอนของสารประกอบ alpha-carbonyl (37)
Pyridoxamine	ยับยั้งการสร้าง AGEs ผ่าน 3 กลไก ได้แก่ 1. ปิดกั้นกระบวนการย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบแอมาดอรีในปฏิกิริยาเมลลาร์ด 2. จับกับผลิตภัณฑ์คาร์บอนิลของกลูโคสและไขมันที่สลายตัวที่เป็นพิษ 3. จับอนุมูลอิสระ (38)

2.5.2 สารพฤกษเคมี (Phytochemicals) ที่เกี่ยวกับฤทธิ์ต้านไกลเคชั่น

ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ที่ได้จากพืชได้รับการพิสูจน์ว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความปลอดภัยต่อการบริโภคของมนุษย์ และสารสกัดจากพืชหลายชนิดได้รับการประเมินความสามารถในการป้องกันการสร้าง AGEs การแพทย์ทางเลือกได้รับความสนใจให้มีการพัฒนาเป็นอย่างมาก สำหรับภาวะความไม่สมดุลของการเกิดอนุมูลอิสระ (oxidative stress) มีการรายงานว่ามีการนำผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติมาใช้ในการรักษาโรคเบาหวาน และโรคเบาหวานที่มีภาวะแทรกซ้อน สารอาหารในผัก และผลไม้ได้ถูกศึกษาเพื่อที่จะป้องกันโรคเรื้อรังจากอวัยวะเสื่อมสภาพเนื่องจากผัก และผลไม้มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สารเหล่านี้จะออกฤทธิ์ที่เป้าหมายอย่างจำเพาะเจาะจงรวมถึงฤทธิ์การต้านไกลเคชั่น สารประกอบที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น สารกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenols) ที่ได้รับการพิสูจน์ว่ามีฤทธิ์ในการต้านไกลเคชั่นทางสรีรวิทยา ถึงแม้จะมีรายงานว่าฤทธิ์ในการต้านไกลเคชั่นขึ้นอยู่กับระบบที่ใช้ ส่วนประกอบของพืชมีสารประกอบที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) เช่น ซาโปจีนิน (sapogenins) ของกรดเอโซลิก (ursolic) และ กรดโอลีโนโนอิก (oleanolic acid) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดต่ำกว่าปกติ (hypoglycemic) โดยสารประกอบที่ไม่ชอบน้ำมีฤทธิ์ต้านไกลเคชั่น อยู่ในรูปของสารสกัดที่ไม่มีขี้ การศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์การต้านไกลเคชั่น และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากแหล่งธรรมชาติต่าง ๆ จึงได้รับความนิยม ซึ่งพืชที่มีสารกลุ่มไตรเทอร์พีนอยด์ (riterpenoids) และฟีนอลิก (phenolic) จะได้รับความสนใจเนื่องจากมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านไกลเคชั่น สารสกัดธรรมชาติหรือสารประกอบที่มีทั้งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านไกลเคชั่นจะมีความสามารถในการรักษาภาวะแทรกซ้อนจากโรคเบาหวานที่ดี (37)

จากการทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับลักษณะทางพฤกษศาสตร์ องค์ประกอบทางเคมี ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของต้นกระดุกไก่อดำ พบว่าเป็นพืชสมุนไพรที่มีความน่าสนใจ เนื่องจากสามารถเพาะปลูกได้ง่าย เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่พบนั้นสัมพันธ์กับกระบวนการต้านการเกิดริ้วรอย รวมทั้งได้ทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับกระบวนการ และกลไกในการเกิดริ้วรอยบริเวณผิวหนังพบว่ามี 3 กลไกหลักที่ทำให้เกิดริ้วรอย ได้แก่ กระบวนการออกซิเดชัน กระบวนการเกิดการอักเสบ และกระบวนการไกลเคชั่นซึ่งจะสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอนโดโปรตีนส์ขึ้นมา โดยยังไม่มีงานวิจัยที่ศึกษาฤทธิ์ต้านการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอนโด

โปรตีนของต้นกระดุกไก่อดำ ซึ่งแอดวานซ์ไกลเคชันเอนด์โปรตีนเป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดริ้วรอยได้ และจากการรายงานพบว่าต้นกระดุกไก่อดำมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ และฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ซึ่งทั้งกระบวนการต้านการอักเสบ และกระบวนการต้านออกซิเดชัน มีกลไกร่วมกันผ่าน NF- κ B ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดริ้วรอย ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาฤทธิ์ต้านการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอนด์โปรตีน และฤทธิ์อื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องของสารสกัดจากใบกระดุกไก่อดำขึ้นมาเพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ด้านริ้วรอย และเป็นแนวทางในการต่อยอดเพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลต่อไป

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ตัวอย่างพืชและการสกัด

ผงต้นกระดุกไก่ดำ ได้รับความอนุเคราะห์จาก รพ.เจ้าพระยาอภัยภูเบศร จ.ปราจีนบุรี ทำการสกัดด้วย 30% ethanol จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไประเหยด้วยเครื่อง Evaporator (Buchi Rotavapor R-100, BUCHI, Germany) ได้สารสกัดเอทานอล ซึ่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้ คำนวณ %yield และเก็บไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในสภาวะปราศจากแสงจนกระทั่งกระบวนการวิเคราะห์

3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ได้ใช้วิธีการวิเคราะห์ 2 วิธี ได้แก่ FRAP assay และ DPPH assay

3.2.1 FRAP assay

การวิเคราะห์ Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP assay) เป็นการวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งสามารถถ่ายอิเล็กตรอนให้กับสารประกอบเชิงซ้อน Fe^{3+} -TPTZ ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปเป็น Fe^{2+} -TPTZ ดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 593 nm โดยปริมาณ Fe^{2+} -TPTZ ที่เกิดขึ้นสามารถประมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้เทียบกับกราฟมาตรฐานของ Trolox

การวิเคราะห์ FRAP ในการทดลองนี้ ดัดแปลงมาจากวิธีของ Kristof Csepregi และคณะ โดยเตรียม FRAP reagent จาก 300 mM acetate buffer pH 3.6 ปริมาตร 100 ml, 10 mM 2,4,6-Tri (2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) ใน 40 mM HCl ปริมาตร 10ml และ 20mM ferric chloride ปริมาตร 10 ml ทำการวิเคราะห์โดยปิเปตสารสกัดผงต้นกระดุกไก่ดำที่ความเข้มข้น 0, 1, 25, 50 และ 100 mg/ml ใน DI water ปริมาตร 10 μl ผสมกับสารละลาย FRAP reagent ปริมาตร 190 μl ใน 96-well plate ผสมให้เข้ากัน แต่ละความเข้มข้น ทำซ้ำ 3 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที นำมาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader รุ่น Crocodile 5-in-one ELISA miniWorkstation โดยใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ เทียบจากสารละลายมาตรฐาน Trolox โดยคำนวณเป็นค่า Trolox equivalent

antioxidant capacity (TEAC) เทียบเป็นหน่วยความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารทดสอบ (M Trolox/g) (38) โดยกำหนดค่า %inhibition cut off เท่ากับ 80% (6)

3.2.2 DPPH assay

เป็นวิธีทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระ คือ อนุมูลอิสระDPPH ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปสารที่คงตัว และมีสีม่วงดุกกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 515 nm

เมื่อ DPPH[•] ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระละลายในเอทานอล (สารที่ให้อิเล็กตรอน) จะทำให้สีม่วงจางลงจนเป็นสีเหลือง ซึ่งก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงต้องตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาทีเพื่อรอให้เกิดปฏิกิริยา ดังนั้นจึงสามารถหาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างจากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้ง DPPH[•] (37)

ในการวิเคราะห์ด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity assay ดัดแปลงมาจากวิธีของ Wahyu Widowati และคณะ โดยเติมสารสกัดผงต้นกระตึกไก่ดำ ที่ความเข้มข้น 0, 1, 25, 50 และ 100 mg/ml ใน 90% methanol แต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 3 ครั้ง ปริมาตร 20 µl และเติมสารละลาย 0.15 mM DPPH ปริมาตร 180 µl ลงใน 96-well plate ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที นำมาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader รุ่น Crocodile 5-in-one ELISA miniWorkstation โดยใช้ Trolox เป็นสารละลายมาตรฐาน และรายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการคำนวณ %inhibition ของสารสกัดเทียบกับตัวควบคุม โดยสูตร

$$\% \text{ inhibition} = (1 - A_{\text{sample}} / A_{\text{control}}) \times 100$$

และคำนวณหาค่า IC₅₀ ของสารสกัดจากผงต้นกระตึกไก่ดำ (37)

3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ

ในการทดสอบฤทธิ์การต้านอักเสบ ใช้วิธีวิเคราะห์ 2 วิธี ได้แก่ proteinase inhibition assay และ protein denaturation assay

3.3.1 การยับยั้งเอนไซม์ proteinase (Proteinase inhibitory assay)

การวิเคราะห์ Proteinase inhibitory assay ดัดแปลงมาจากวิธีของ Gunathilake และคณะ โดยใส่สารสกัดผงต้นกระตึกไก่ดำที่แต่ละความเข้มข้น ได้แก่ 0, 0.3, 1, 3 และ 10 mg/ml ปริมาตร 1 ml และ trypsin 0.6 mg/ml ในสารละลาย 25 mM Tris-HCl buffer,

pH 7.5 ปริมาตร 1 ml ลงใน Falcon tube จากนั้นนำไป incubate ใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และเติม casein solution ปริมาตร 1 ml นำไป incubate ต่อใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม 70% perchloric acid ปริมาตร 2 ml ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge รุ่น Sorvall Legend X1R ที่ความเร็ว 5,000 RPM เป็นเวลา 10 นาที และนำของเหลวเหนือตะกอน (supernatant) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer รุ่น U-2900 ที่ความยาวคลื่น 280 nm โดยใช้ diclofenac sodium เป็นสารละลายมาตรฐาน โดยฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ คำนวณจาก %inhibition ของสารสกัดเทียบกับตัวควบคุม (39)

3.3.2 การยับยั้งการเสียสภาพของโปรตีน (Protein denaturation inhibitory assay)

การวิเคราะห์ Protein denaturation assay ดัดแปลงมาจากวิธีของ Williams และคณะโดยนำสารสกัดผงต้นกระตูดำที่แต่ละความเข้มข้น ได้แก่ 0, 0.1, 1, 10, 100 และ 1000 mg/ml ในสารละลาย TBS ปริมาตร 150 μ l ผสมกับ 0.2% w/v BSA ปริมาตร 2,850 μ l นำไป incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที และ นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้สารเย็นลง และนำไปวัด %turbidity ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer รุ่น U-2900 ที่ความยาวคลื่น 660 nm โดยใช้ diclofenac sodium เป็นสารละลายมาตรฐาน ฤทธิ์ในการต้านการอักเสบคำนวณจาก %inhibition ของสารสกัด (40)

3.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอนด์โปรดักส์

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอนด์โปรดักส์ (Advanced glycation end products: AGEs) ด้วยการสร้าง AGEs ในหลอดทดลอง ดัดแปลงมาจากวิธีของ Singh และคณะ โดยเติมสารละลาย 100 mg/ml bovine serum albumin (BSA) ใน 1M PBS-azide และ 5M fructose ปริมาตรสุทธิ 2.7 ml และเติมสารละลายสารสกัดกระดูกไก่ดำที่เตรียมใน 1M PBS-azide แต่ละความเข้มข้น ได้แก่ 0, 1, 3, 10, 30 และ 100 mg/ml ปริมาตร 0.3 ml แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสในอ่างควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดแสงฟลูออเรสเซนส์ของ AGEs ด้วยเครื่อง multimode plate reader (FLUOstar Omega, BMG Labtech, Germany) ที่ความยาวคลื่น excitation/emission เท่ากับ 355-20/460 เทียบกับสารมาตรฐาน aminoguanidine ซึ่งเป็น AGEs inhibitor และคำนวณหาความสามารถในการยับยั้งการสร้าง AGEs ได้จากสูตร

$$\%inhibiton = 100 \times (Intensity_{control} - Intensity_{sample})/Intensity_{control} \quad (31)$$

3.5 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำลาย elastin ของเอนไซม์ elastase

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำลาย elastin ของเอนไซม์ elastase ในงานวิจัยนี้ ดัดแปลงมาจากวิธีของ Thring และคณะ โดยเติมสารสกัดต้นกระดูกไก่ดำ ที่ความเข้มข้น 0, 1, 3, 10, 30, 100 และ 300 mg/ml ปริมาตร 50 µl ตามด้วย porcine pancreatic elastase ปริมาตร 50 µl ลงใน 96-well ELISA plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide (AAPVN) ซึ่งทำหน้าที่เป็น substrate ลงไป แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm คำนวณหาความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้จากสูตร

$$\%Enzyme \ inhibition \ activity = 100 \times (OD_{control} - OD_{sample})/OD_{control} \quad (41)$$

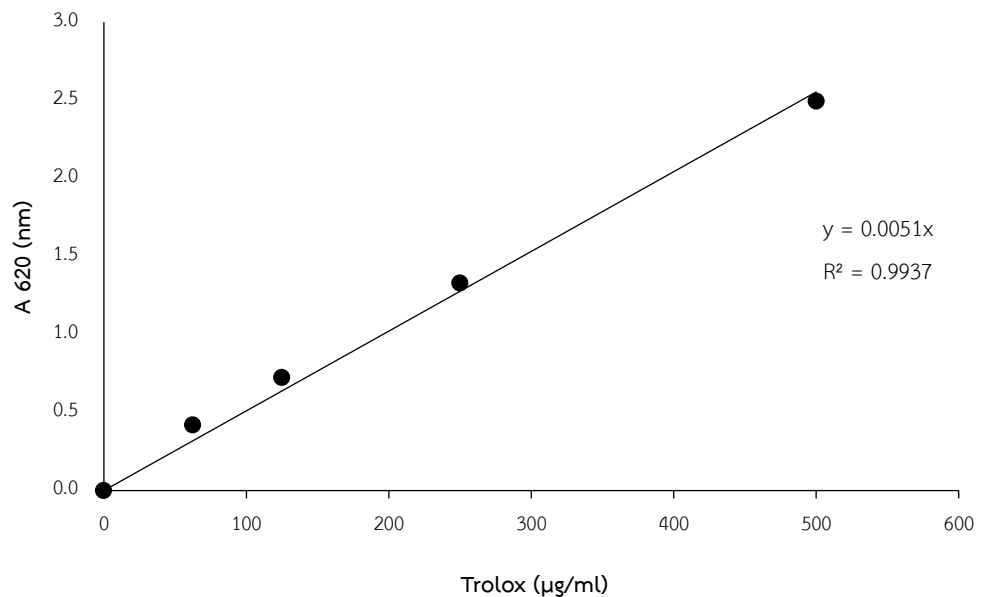
บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปราย

4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

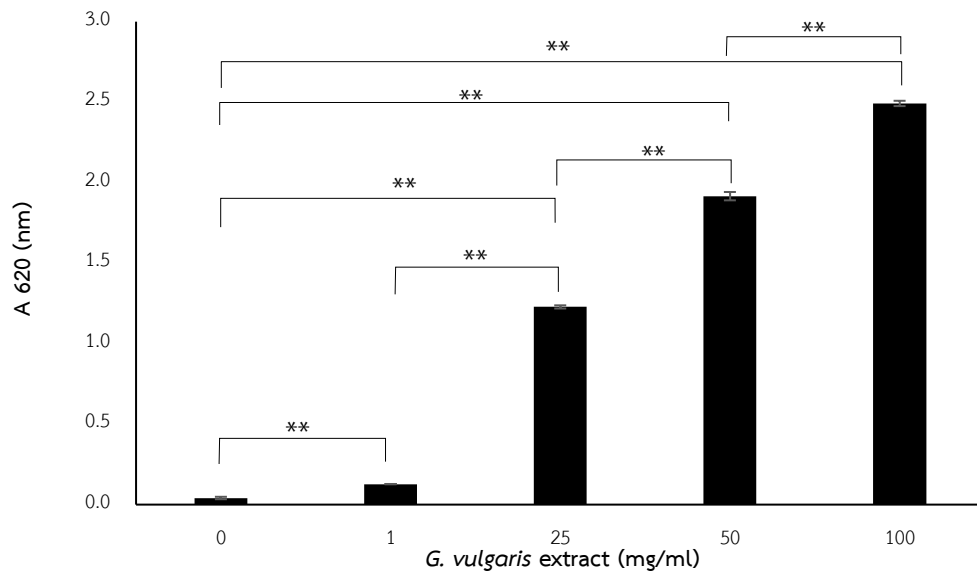
4.1.1 FRAP assay

หลักการของวิธี FRAP assay ขึ้นอยู่กับความสามารถในการรับอิเล็กตรอนของสารประกอบเชิงซ้อน Fe^{3+} -TPTZ ซึ่งมีสีเหลือง ให้กลายเป็น Fe^{2+} -TPTZ ซึ่งมีสีน้ำเงิน จากสารต้านอนุมูลอิสระ และการกำจัดารดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{2+} -TPTZ ที่ความยาวคลื่น 620 nm โดยในการศึกษานี้ใช้ Trolox เป็นสารเปรียบเทียบกับมาตรฐาน ดังแสดงในภาพที่ 5

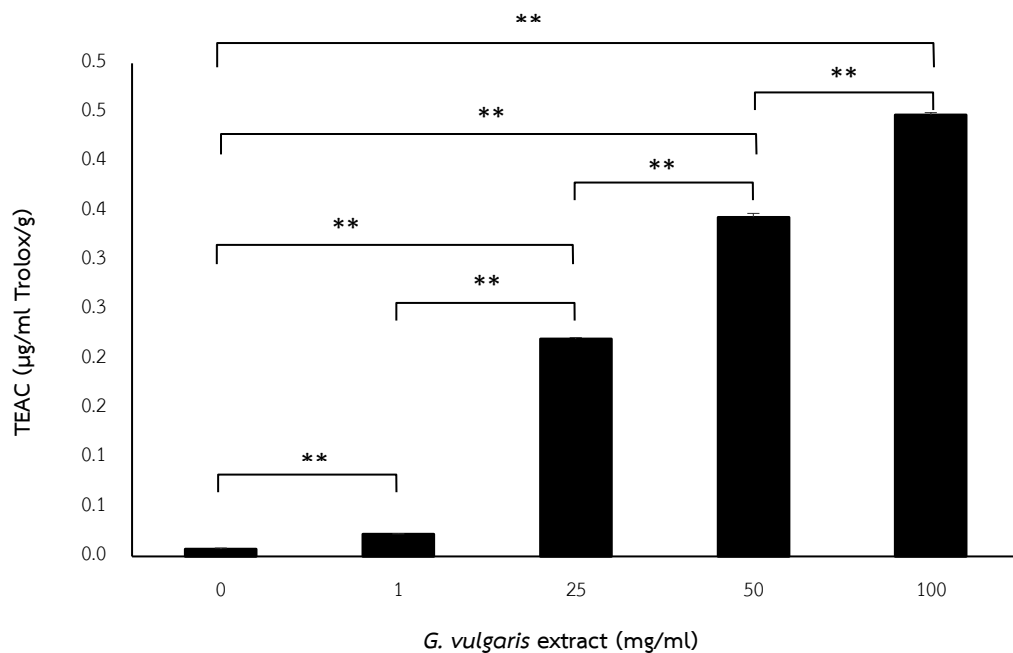


ภาพที่ 5 แสดงกราฟมาตรฐานของ Trolox ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP assay ที่ความยาวคลื่น 620 nm

กราฟมาตรฐานของ Trolox พบความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Trolox กับค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อน Fe^{2+} -TPTZ ที่ $y = 0.0051x$ เมื่อ x คือ ความเข้มข้นของ Trolox (µg/ml) และ y คือค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 nm โดยได้นำสมการเส้นตรงที่ได้ไปใช้คำนวณค่า Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 nm ที่วัดได้จากผลของสารละลายตัวอย่าง



ภาพที่ 6 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 nm ของสารสกัดผงต้นกระดุกไ่ดำ ด้วยวิธีวิเคราะห์ FRAP assay ค่าที่แสดงเป็น mean $\pm$ SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ (** $p < 0.01$)

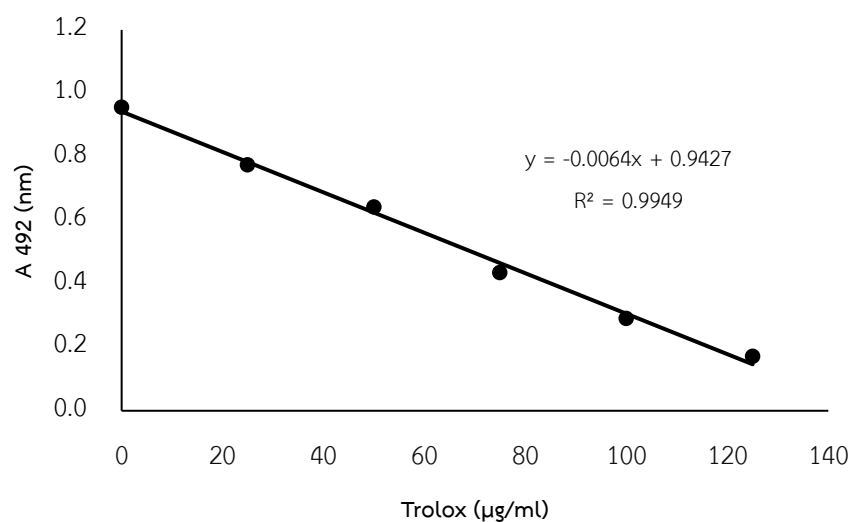


ภาพที่ 7 กราฟแสดงผล Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) ของสารสกัด ต้นกระดุกไ่ดำด้วยวิธีวิเคราะห์ FRAP assay ค่าที่แสดงเป็น mean $\pm$ SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ (** $p < 0.01$)

จากการวิเคราะห์สารสกัดผงต้นกระดุกไก่อัดด้วยวิธี FRAP assay โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 nm ที่ความเข้มข้น 0, 1, 25, 50 และ 100 mg/ml พบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในภาพที่ 6 หลังจากนั้นได้นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาค่า TEAC โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยที่สารสกัดความเข้มข้น 0, 1, 25, 50 และ 100 mg/ml มีค่า TEAC เท่ากับ 0.007 ± 0.001 , 0.023 ± 0.000 , 0.220 ± 0.001 , 0.344 ± 0.001 และ 0.447 ± 0.002 $\mu\text{g/ml Trolox/g}$ ตามลำดับ สัมพันธ์กับความเข้มข้น (dose-dependent manner) ในแต่ละความเข้มข้น ค่า TEAC มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) ดังแสดงในภาพที่ 7 และตารางที่ 6

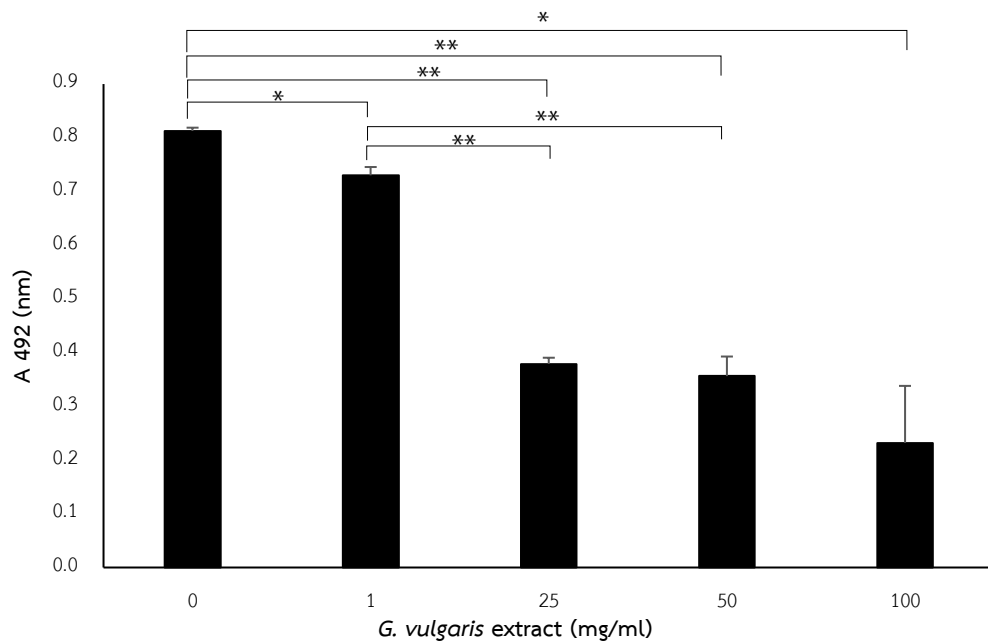
4.1.2 DPPH assay

ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยาของสาร DPPH เมื่อ DPPH[•] ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระละลายในเอทานอล (สารที่ให้อิเล็กตรอน) จะทำให้สีม่วงจางลงจนเป็นสีเหลือง ซึ่งก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงต้องตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาทีเพื่อรอให้เกิดปฏิกิริยา ดังนั้นจึงสามารถหาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างจากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้ง DPPH[•] และทำการเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากกราฟมาตรฐาน โดยใช้ Trolox เป็นสารเปรียบเทียบมาตรฐาน ดังแสดงในภาพที่ 8

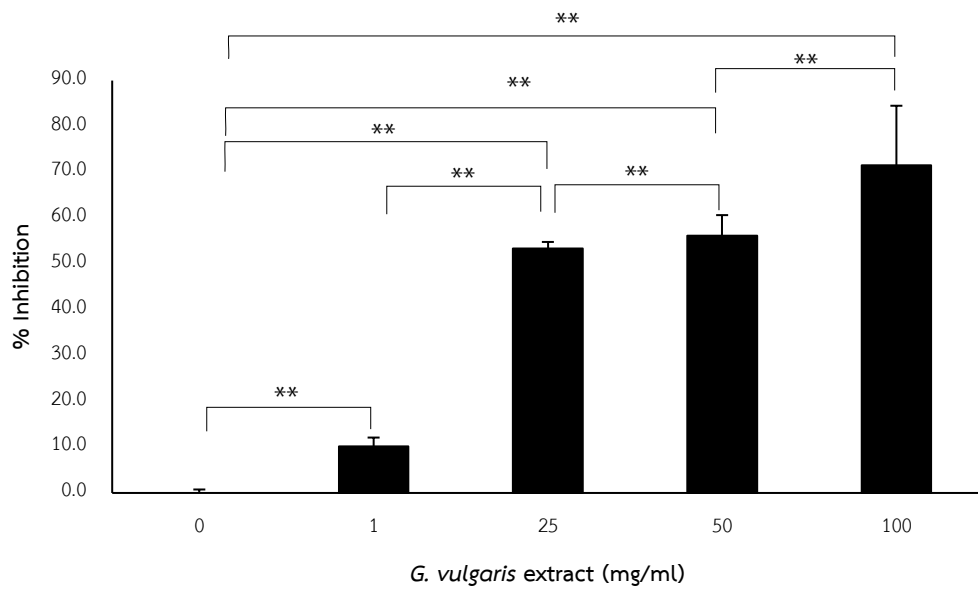


ภาพที่ 8 แสดงกราฟมาตรฐานของ Trolox ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH assay ที่ความยาวคลื่น 492 nm

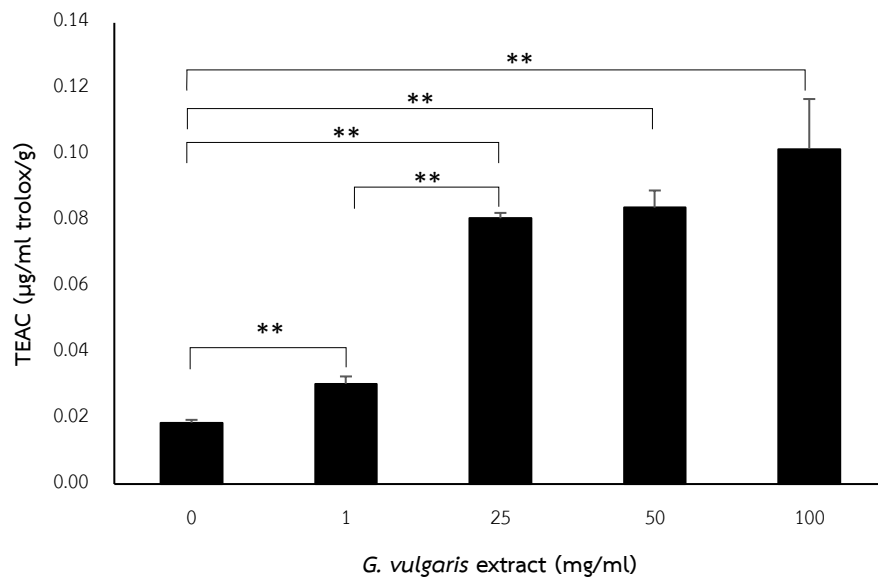
กราฟมาตรฐานของ Trolox พบความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Trolox กับ ค่าการดูดกลืนแสงของสาร DPPH[•] ที่ $y = -0.0064x + 0.9427$ เมื่อ x คือ ความเข้มข้นของ Trolox และ y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm โดยได้นำไปเพื่อใช้คำนวณค่า Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 nm ที่วัดได้จากผลของสารละลายตัวอย่าง ดังแสดงในภาพที่ 9



ภาพที่ 9 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผงต้นกระดุกไก่ดำที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH assay ที่ความยาวคลื่น 492 nm ค่าที่แสดงเป็น mean $\pm$ SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ (** $p < 0.01$)



ภาพที่ 10 แสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผงต้นกระดุกไก่ดำด้วยวิธี DPPH assay
ค่าที่แสดงเป็น mean $\pm$ SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ (** $p < 0.01$)



ภาพที่ 11 แสดงผล Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) ของสารสกัดต้น
กระดุกไก่ดำด้วยวิธีวิเคราะห์ DPPH assay ค่าที่แสดงเป็น mean $\pm$ SD
จากการทดลอง 3 ซ้ำ (** $p < 0.01$)

จากการวิเคราะห์สารสกัดผงต้นกระดุกไก่ดำด้วยวิธี DPPH assay ที่ความเข้มข้น 0, 1, 25, 50 และ 100 mg/ml พบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) หลังจากนั้นได้นำค่าการ

ดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาค่า TEAC โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Trolox ดังแสดงในตารางที่ 6 โดยมีค่า TEAC ที่ความเข้มข้น 0, 1, 25, 50 และ 100 mg/ml ในแต่ละความเข้มข้น ค่า TEAC มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) ดังแสดงในภาพที่ 11 เมื่อคำนวณค่า IC_{50} ของสารสกัดผงต้นกระตูดูกไก่ดำ พบว่ามีค่า 23.13 mg/ml ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงค่า TEAC โดยวิธีวิเคราะห์ FRAP assay, DPPH assay, %inhibition และ IC_{50} ของ DPPH assay ของสารสกัดผงต้นกระตูดูกไก่ดำ

สารสกัด (mg/ml)	TEAC ($\mu\text{g/ml Trolox/g}$) (mean $\pm$ SD)		%inhibition ของ DPPH (mean $\pm$ SD)	IC_{50} ของ DPPH (mg/ml)
	FRAP	DPPH		
0	0.007 $\pm$ 0.001	0.019 $\pm$ 0.001	0.00 $\pm$ 0.75	23.13
1	0.023 $\pm$ 0.000	0.030 $\pm$ 0.002	10.17 $\pm$ 1.92	
25	0.220 $\pm$ 0.001	0.081 $\pm$ 0.002	53.36 $\pm$ 1.42	
50	0.344 $\pm$ 0.004	0.084 $\pm$ 0.005	56.15 $\pm$ 4.49	
100	0.447 $\pm$ 0.002	0.102 $\pm$ 0.015	71.45 $\pm$ 13.06	

ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดต้นกระตูดูกไก่ดำด้วยตัวทำละลาย 30% ethanol ด้วยวิธี FRAP assay และ DPPH assay และรายงานผลเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ด้วยค่า TEAC พบว่า วิธี FRAP assay ได้ค่า TEAC ที่มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น (dose-dependent manner) ส่วนวิธี DPPH assay พบว่า มีค่า IC_{50} เท่ากับ 23.13 mg/ml โดยผลดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าสารสกัดผงต้นกระตูดูกไก่ดำสามารถต้านสารอนุมูลอิสระได้

จากงานวิจัยก่อนหน้าของ Alagan et al (2019) ที่ทำการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ที่สกัดต้นกระตูดูกไก่ดำด้วยตัวทำละลาย 95% ethanol เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบค่า IC_{50} เท่ากับ 0.25 mg/ml (42) และของ Mruthunjaya et al (2007) ที่ใช้ตัวทำละลายเป็น 70% ethanol ในการสกัด เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.12 mg/ml (25) ในขณะที่การสกัดด้วย 70% และ 95% ethanol ได้ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.12 (25) และ 0.25 mg/ml (42) ตามลำดับ และการสกัดด้วยน้ำได้ค่า IC_{50} เท่ากับ 141.49 mg/ml (43) และในงานวิจัยที่ใช้สารสกัดที่สกัดด้วย methanol (IC_{50} เท่ากับ 0.071 mg/ml) (44)

ซึ่งมีงานวิจัยที่ทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยตัวทำละลายหลายชนิด ได้แก่ hexane, chloroform, ethyl acetate, ethanol, น้ำ และ methanol โดยพบว่าสารสกัดด้วย methanol มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าการสกัดชนิดอื่น (6)

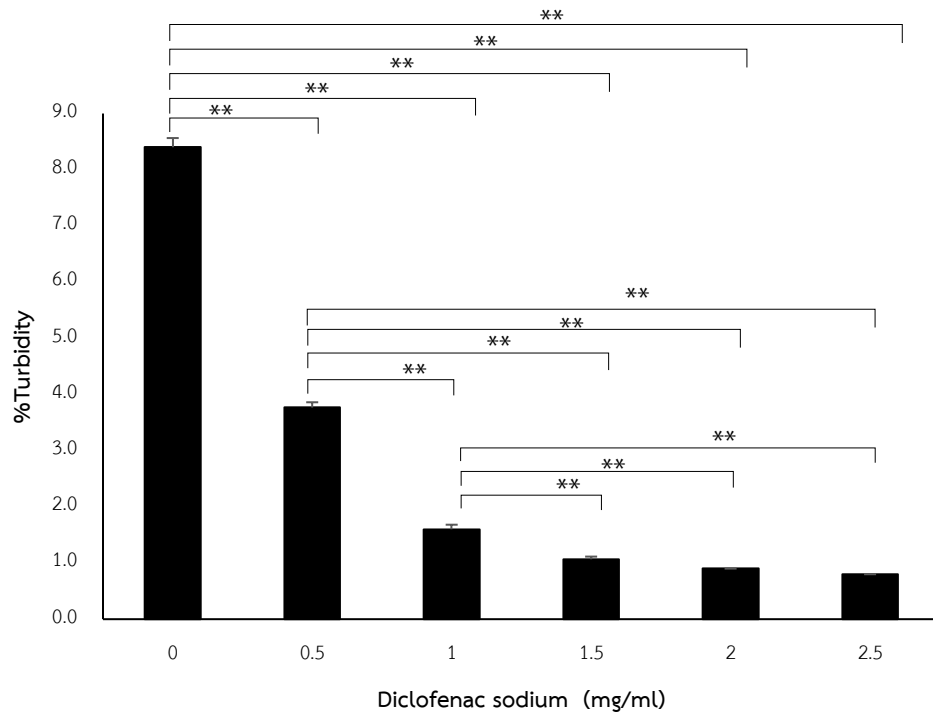
ซึ่งค่า IC_{50} ของทั้งสองงานวิจัยที่กล่าวถึงข้างต้น ในสารสกัดด้วย methanol มีค่า IC_{50} น้อยกว่างานวิจัยนี้ โดยอาจเป็นผลจากการใช้ความเข้มข้นของตัวทำละลายชนิดเดียวกันในการสกัดที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยหากใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วสูงขึ้น จะสกัดสารในกลุ่ม phenolic compound ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่พบในต้นกระดุกไก่อดำ และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้มากขึ้น จึงทำให้งานวิจัยนี้พบค่า IC_{50} ที่มากกว่างานวิจัยอื่นที่ใช้ตัวทำละลายต่างกัน ethanol ที่ความเข้มข้นสูง จะทำให้สกัดสารจำพวก phenols, flavonoids และ steroids ออกมาได้มาก เช่น aromadendrin, lupeol (45) (46) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (47) (48, 49) และ lupeol มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกับ ascorbic acid (50) แต่จะเห็นได้ว่างานวิจัยที่ใช้ 95% ethanol ในการสกัดมีค่า IC_{50} มากกว่างานวิจัยที่ใช้ 70% ethanol ในการสกัด อาจเป็นผลมาจากเวลาในการสกัด โดยงานวิจัยที่ใช้ 95% ethanol ในการสกัดใช้เวลาในการสกัดน้อยกว่า อาจจะทำให้ได้สารที่ออกฤทธิ์ออกมาได้ในปริมาณที่น้อยกว่า

นอกจากนี้ ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดของต้นกระดุกไก่อดำมีหลากหลายวิธี อาทิ DPPH assay, FRAP assay, hydrogen peroxide scavenging assay และ nitric oxide assay พบว่าสารสกัดต้นกระดุกไก่อดำ มีรายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วิเคราะห์ด้วยวิธีต่าง ๆ เช่น nitric oxide assay (6, 44) และการทดสอบด้วยวิธี Hydrogen peroxide scavenging assay (44) เป็นต้น

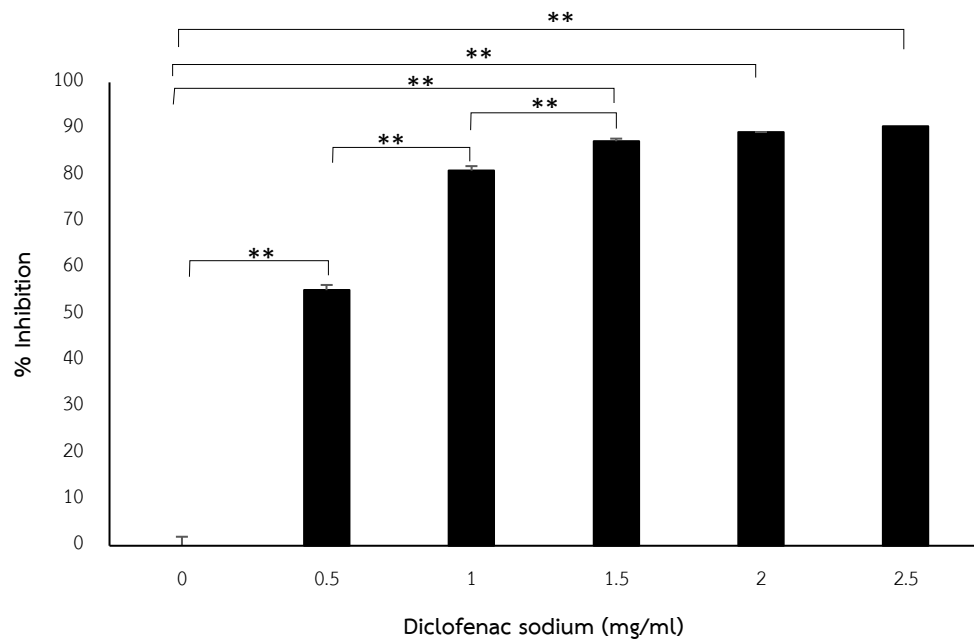
4.2 การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ

4.2.1 Proteinase inhibitory assay

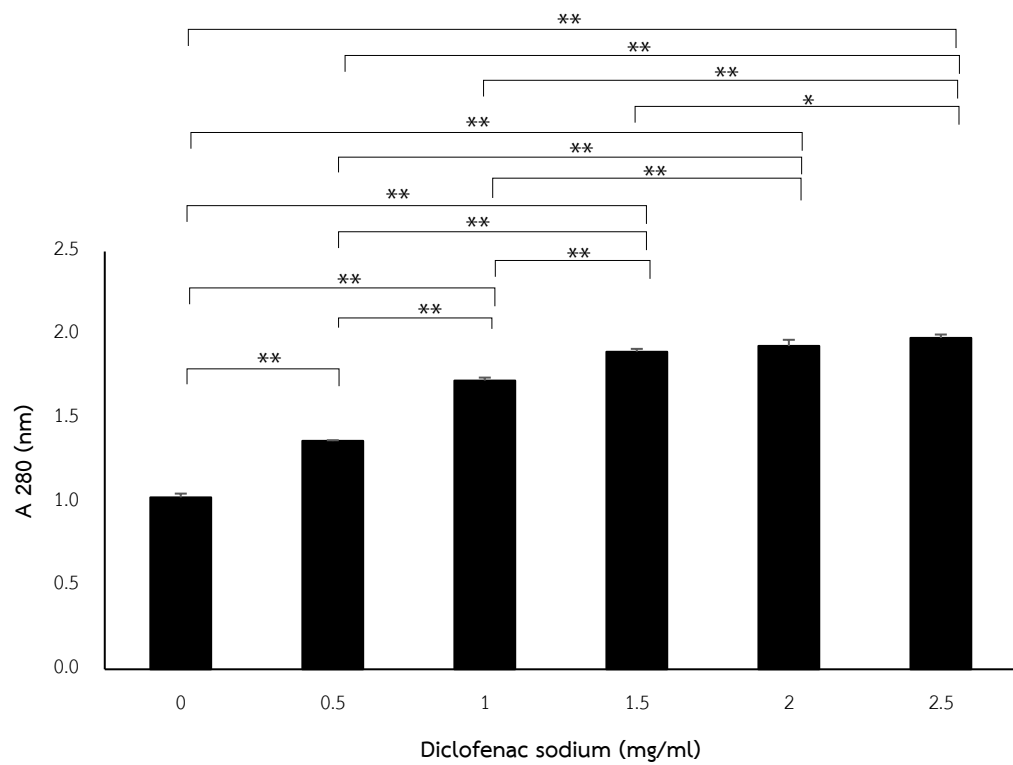
ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ด้านการอักเสบด้วยวิธี Proteinase inhibition assay ได้ทำการเทียบค่าความขุ่น (%turbidity) ที่ได้จากกราฟมาตรฐาน โดยใช้ diclofenac sodium เป็นสารที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ ซึ่งหากค่า %turbidity ต่ำ (แสงผ่านได้มาก) แสดงว่าเอนไซม์ proteinase ถูกยับยั้ง และด้านการอักเสบได้มาก ในทางกลับกันหากค่า %turbidity สูง (แสงผ่านได้น้อย) แสดงว่าเอนไซม์ proteinase ถูกยับยั้งได้น้อย และด้านการอักเสบได้น้อย ดังแสดงในภาพที่ 12-14 และทำการวิเคราะห์สารสกัดตัวอย่าง ดังแสดงในภาพที่ 15-17



ภาพที่ 12 แสดงกราฟค่าความขุ่น (%turbidity) ของสารเปรียบเทียบมาตรฐาน diclofenac sodium ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี proteinase inhibitory assay (** p < 0.01)

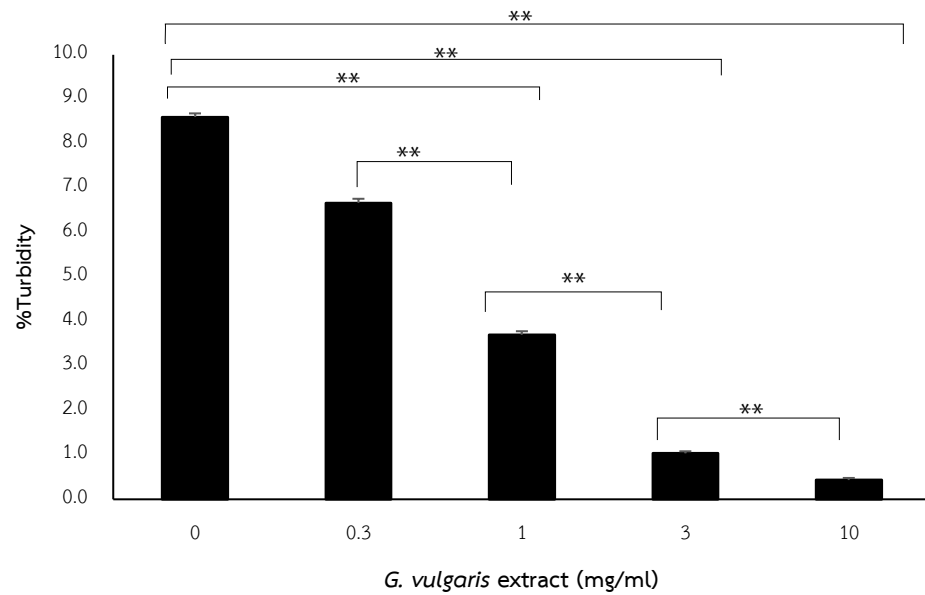


ภาพที่ 13 แสดงผลการต้านการอักเสบของสารมาตรฐาน diclofenac sodium ด้วยวิธี proteinase inhibitory assay (** p < 0.01)

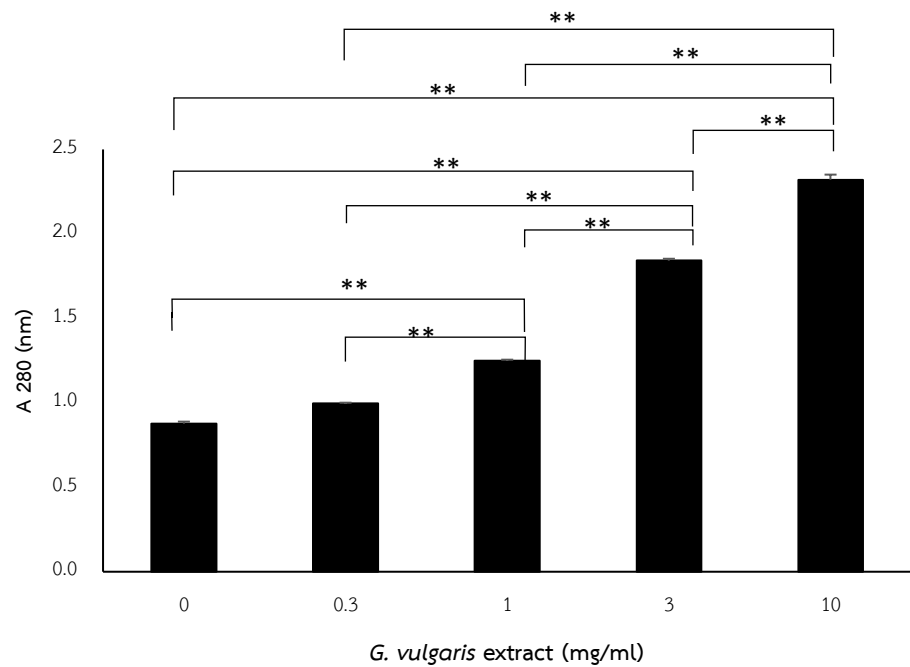


ภาพที่ 14 แสดงกราฟการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm ของสารเปรียบเทียบมาตรฐาน diclofenac sodium ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี proteinase inhibitory assay (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

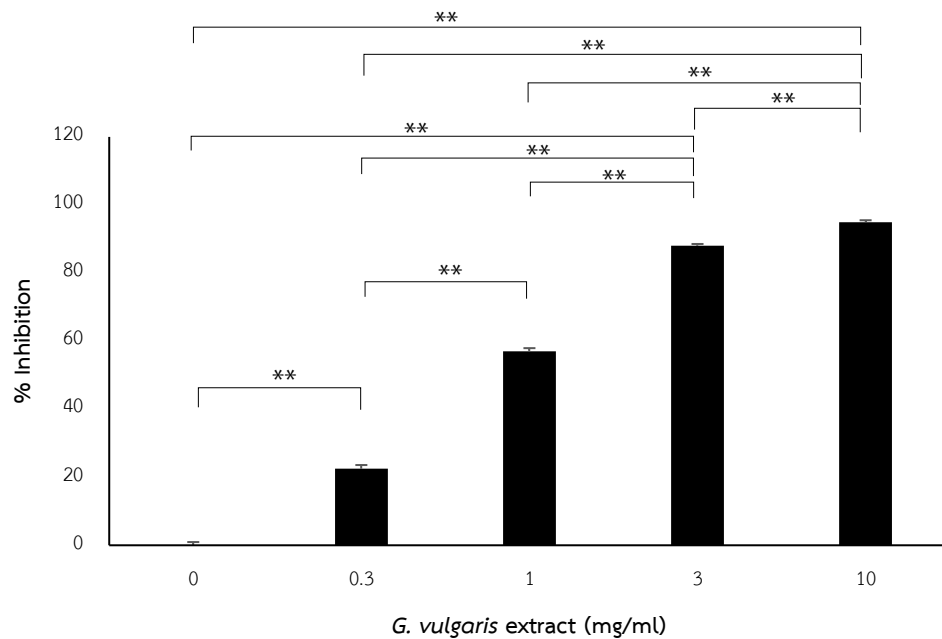
จากการวิเคราะห์สารสกัดผงต้นกระตือกวักด้วยวิธี proteinase inhibitory assay โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm ที่ความเข้มข้น , 0.5, 1, 1.5, 2 และ 2.5 mg/ml ดังแสดงในภาพที่ 14



ภาพที่ 15 แสดงกราฟค่าความขุ่น (%turbidity) ของสารสกัดผงต้นกระดุกไก่ดำ ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี proteinase inhibitory assay (** p<0.01)



ภาพที่ 16 แสดงกราฟการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm ของสารสกัดผงต้นกระดุกไก่ดำที่วิเคราะห์ด้วยวิธี proteinase inhibitory assay (** p<0.01)



ภาพที่ 17 แสดงผลการต้านการอักเสบของสารสกัดต้นกระดุกไก่อดำ
ด้วยวิธี proteinase inhibitory assay (** p < 0.01)

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยการหาความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ proteinase ของสารสกัดผงต้นกระดุกไก่อดำด้วยวิธี proteinase inhibitory assay พบว่าที่ความเข้มข้น 0, 0.3, 1, 3 และ 10 mg/ml มีค่าความขุ่น (%turbidity) เท่ากับ $8.6 \pm 0.082\%$, $6.7 \pm 0.094\%$, $3.7 \pm 0.082\%$, $1.0 \pm 0.047\%$ และ $0.4 \pm 0.047\%$ ตามลำดับ โดยในแต่ละความเข้มข้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในภาพที่ 15 และมีค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 280 nm ความเข้มข้น 0, 0.3, 1, 3 และ 10 mg/ml เท่ากับ 0.877 ± 0.012 , 0.995 ± 0.006 , 1.249 ± 0.007 , 1.842 ± 0.011 และ 2.321 ± 0.030 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 16 และเมื่อนำมาคำนวณหา %inhibition ที่ความเข้มข้น 0, 0.3, 1, 3 และ 10 mg/ml มีค่าเท่ากับ $0.0 \pm 0.9\%$, $22.5 \pm 1.1\%$, $57.0 \pm 1.0\%$, $88.0 \pm 0.5\%$ และ $95.0 \pm 0.5\%$ ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 17 และตารางที่ 7

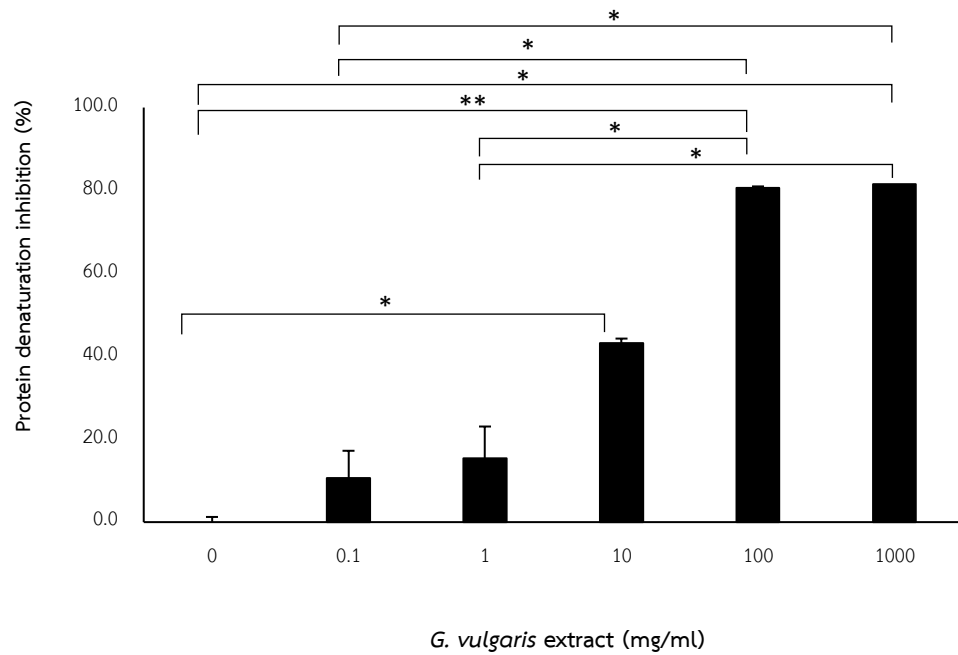
ตารางที่ 7 แสดงผลการยับยั้งการเสื่อมสภาพโปรตีนของ diclofenac sodium และสารสกัดผงต้นกระดุกไ่ดำด้วยวิธี proteinase inhibitory assay (ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD) และค่า IC_{50}

สาร	ความเข้มข้น (mg/ml)	% inhibition	IC_{50} (mg/ml)
Diclofenac sodium	0	0.0 ± 1.9	0.45
	0.5	55.2 ± 1.1	
	1	81.0 ± 1.0	
	1.5	87.3 ± 0.6	
	2	89.3 ± 0.0	
	2.5	90.5 ± 0.0	
สารสกัดผงต้น กระดุกไ่ดำ	0	0.0 ± 0.9	0.71
	0.3	22.5 ± 1.1	
	1	57.0 ± 0.9	
	3	88.0 ± 0.5	
	10	95.0 ± 0.5	

4.2.2 Protein denaturation inhibitory assay

สำหรับการศึกษาฤทธิ์ด้านการยับยั้งการเสื่อมสภาพด้วยวิธี protein denaturation assay ได้ทำการหาค่าการยับยั้งการเสื่อมสภาพของโปรตีน (%inhibition) กล่าวคือ ถ้าหากความเข้มข้นใดมีค่าการยับยั้งการเสื่อมสภาพของโปรตีนที่สูง จะมีฤทธิ์ด้านการยับยั้งการเสื่อมสภาพของโปรตีนที่ดีกว่าความเข้มข้นที่มีค่าการยับยั้งการเสื่อมสภาพของโปรตีนที่ต่ำกว่า

จากการศึกษาพบว่าสารสกัดต้นกระดุกไ่ดำที่ความเข้มข้น 1000 mg/ml มีค่าการยับยั้งการเสื่อมสภาพของโปรตีนสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ $81.5 \pm 0.4\%$ ตามมาด้วยความเข้มข้น 100, 10, 1, 0.1 และ 0 โดยมีค่า เท่ากับ $80.6 \pm 1.1\%$, $43.2 \pm 7.6\%$, $15.4 \pm 6.6\%$, $10.6 \pm 1.5\%$ และ $0.0 \pm 5.9\%$ ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 18 และตารางที่ 8



ภาพที่ 18 แสดงผลการยับยั้งการเสื่อมสภาพโปรตีนของสารสกัดผงต้นกระดุกไก่ดำ ด้วยวิธี protein denaturation assay (* p<0.05, ** p<0.01)

ตารางที่ 8 แสดงผลการยับยั้งการเสื่อมสภาพโปรตีนของ diclofenac sodium และสารสกัดผงต้นกระดุกไก่ดำด้วยวิธี protein denaturation assay (ค่าเฉลี่ย ± SD) และค่า IC₅₀

สาร	ความเข้มข้น (mg/ml)	%inhibition	IC ₅₀ (mg/ml)
Diclofenac sodium	0	0.0 ± 3.1	0.53
	0.1	8.3 ± 2.0	
	0.2	19.3 ± 5.8	
	0.4	36.8 ± 5.9	
	0.8	75.5 ± 2.6	
สารสกัดผงต้น กระดุกไก่ดำ	0	0.0 ± 5.9	53.54
	0.1	10.6 ± 1.5	
	1	15.4 ± 6.6	
	10	43.2 ± 7.6	
	100	80.6 ± 1.1	
	1000	81.5 ± 0.4	

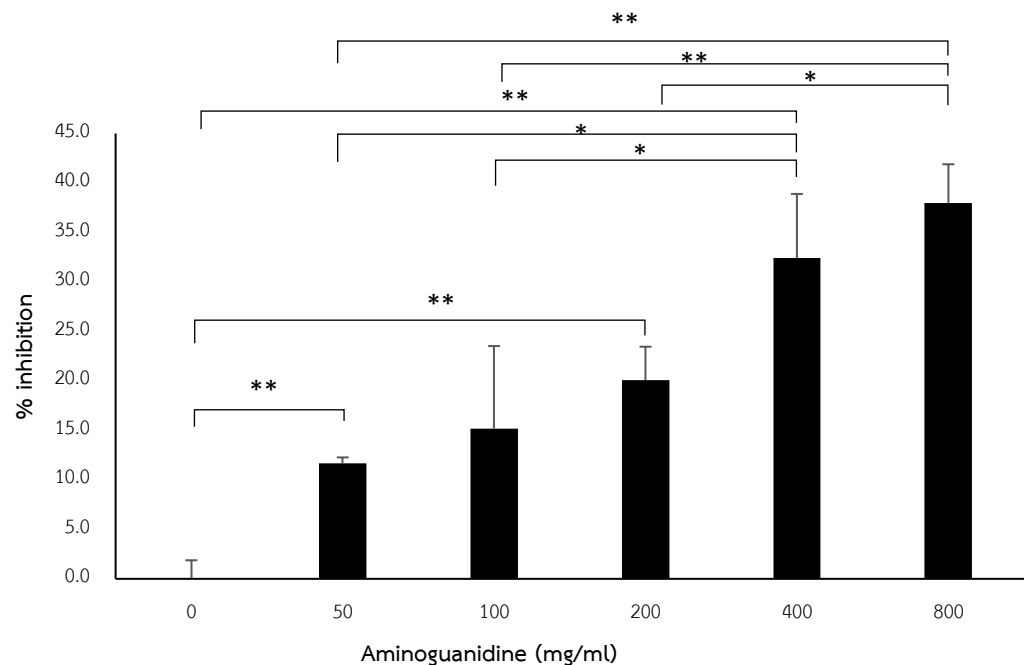
จากการทดลองวิเคราะห์ฤทธิ์ด้านการอักเสบด้วยวิธี proteinase inhibition assay และ protein denaturation assay พบว่าสารสกัดผงต้นกระดุกไก่ดำด้วย 30% ethanol มีค่า %inhibition สัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้นเป็น concentration-dependent manner แสดงให้เห็นว่าสารสกัดผงต้นกระดุกไก่ดำสามารถต้านการอักเสบได้ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.71 mg/ml และ 53.54 mg/ml ตามลำดับ และคำนวณค่า IC_{50} ของ final concentration ได้เท่ากับ 0.17 mg/ml และ 1.32 mg/ml ซึ่งสอดคล้องกับในงานวิจัยของ Patel และ Zaveri et al (2014) (24) ซึ่งได้วิเคราะห์ฤทธิ์ด้านการอักเสบด้วยวิธี proteinase inhibition assay และ protein denaturation assay ได้ค่า IC_{50} 0.21 mg/ml และ 0.18 mg/ml ตามลำดับ และค่า IC_{50} ของ proteinase inhibition assay ใกล้เคียงกับงานวิจัยที่นำมาอ้างอิง แต่ใน protein denaturation assay งานวิจัยที่นำมาอ้างอิงได้ค่า IC_{50} น้อยกว่าในงานวิจัยนี้ อาจเกิดจากงานวิจัยนี้ใช้ 30% ethanol ในการสกัด แต่ในงานวิจัยที่นำมาอ้างอิงใช้ 98% methanol ในการสกัด ซึ่งความเข้มข้น และช่วงที่สูงกว่าจะทำให้ได้สารที่ออกฤทธิ์ด้านการอักเสบได้มากกว่า เช่น apigenin (51) ซึ่งสามารถพบได้ในส่วนต้นของกระดุกไก่ดำ (52) (53)

นอกจากนี้ ในการศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดกระดุกไก่ดำมีรายงานอย่างแพร่หลายทั้ง *in vivo* และ *in vitro* study เช่น ใน *in vitro* ใช้วิธี HRBC membrane stabilization assay, LPS stimulated-murine macrophage cell line ส่วนใน *in vivo* ใช้ Carrageenan-induced rat paw edema model, cotton pellet granuloma method และใช้ตัวทำละลายในการสกัดที่แตกต่างกัน เช่น petroleum ether, ethyl acetate, methanol, ethanol, chloroform และน้ำ สำหรับการทดลองใน *in vitro* งานวิจัยของ Nirmalraj et al (2015) ใช้ methanol ในการสกัด และศึกษาด้วยวิธี HRBC membrane stabilization assay แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากต้นกระดุกไก่ดำมีความสามารถในการต้านการอักเสบได้อย่างมีนัยสำคัญในรูปแบบ concentration dependent manner (7) ในงานวิจัยของ Periya et al. (2011) ได้ทดสอบด้วยวิธี carrageenan-induced rat paw edema model และสกัดด้วย 95% ethanol พบว่าแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากต้นกระดุกไก่ดำมีความสามารถในการต้านการอักเสบได้อย่างมีนัยสำคัญในรูปแบบ concentration dependent manner (23) และงานวิจัยของ Dian Ratih Laksmiawati et al. (2016) ได้สกัดด้วย 96% ethanol ทดสอบใน LPS stimulated-murine macrophage cell line โดยวัดระดับ TNF- α และ IL-1 β พบว่าสาร

สัปดาห์แรกได้ดำเนินการระดับ inflammatory cytokine ทั้งสองตัวนี้ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (54) จากรายงานที่กล่าวมาข้างต้น ยืนยันได้ว่าสารสกัดต้นกระต๊ากไคมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ (23, 24) (51-54)

4.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอนโดโปรดักส์ (AGEs inhibitory assay)

ในการวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอนโดโปรดักส์ ใช้หลักการสร้าง AGEs ในหลอดทดลอง และเติมสารสกัดผงต้นกระต๊ากไคดำที่เตรียมใน 1M PBS-azide แต่ละความเข้มข้น พร้อมทั้งบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดแสงฟลูออเรสเซนส์ของ AGEs ด้วยเครื่อง multimode plate reader เทียบกับสารมาตรฐาน aminoguanidine ซึ่งเป็น AGEs inhibitor และคำนวณหาการยับยั้งการสร้าง AGEs



ภาพที่ 19 แสดงความสามารถในการยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอนโดโปรดักส์ของสารเปรียบเทียบกับมาตรฐาน aminoguanidine ที่ความเข้มข้น 0, 50, 100, 200, 400 และ 800 mg/ml ที่เวลาบ่ม 24 ชั่วโมง (*p value <0.05, **p value <0.01)

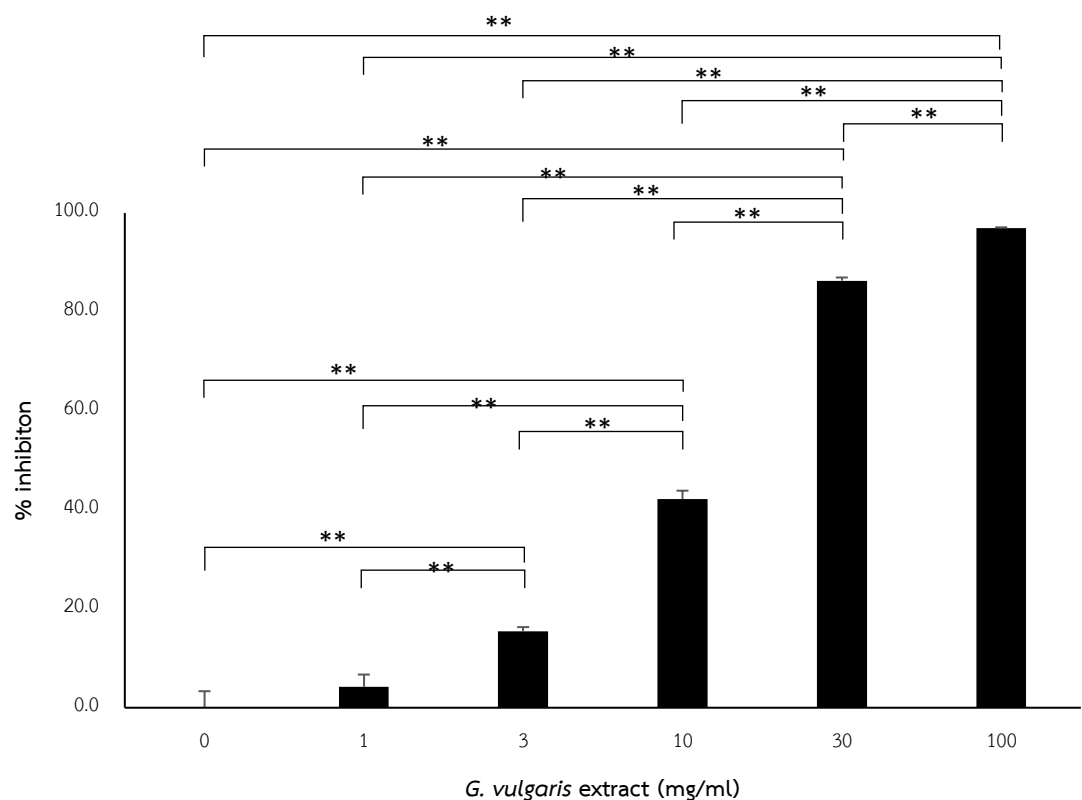
ตารางที่ 9 แสดงผลการยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอนโดพโรตักส์ของ aminoguanidine และสารสกัดผงต้นกระตูดูกไก่ดำ (ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD) และค่า IC_{50} ด้วยวิธี AGEs Inhibitory Assay ที่เวลาบ่ม 24 ชั่วโมง

สาร	ความเข้มข้น (mg/ml)	%inhibition	IC_{50} (mg/ml)
Aminoguanidine	0	0.00 ± 1.87	0.71
	0.05	11.69 ± 0.58	
	0.1	15.18 ± 8.34	
	0.2	20.10 ± 3.36	
	0.4	32.42 ± 6.47	
	0.8	37.96 ± 3.93	
สารสกัดผงต้น กระตูดูกไก่ดำ	0	0.00 ± 3.34	10.97
	1	4.25 ± 2.46	
	3	15.49 ± 0.81	
	10	42.19 ± 1.69	
	30	86.33 ± 0.64	
	100	96.91 ± 0.20	

จากการทดลองวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอนโดพโรตักส์ด้วย AGEs Inhibitory Assay พบว่าสารสกัดผงต้นกระตูดูกไก่ดำด้วย 30% ethanol ความเข้มข้น 0, 1, 3, 10, 30 และ 100 mg/ml มี %inhibition เท่ากับ 0.00 ± 3.34 , 4.25 ± 2.46 , 15.49 ± 0.81 , 42.19 ± 1.69 , 86.33 ± 0.64 และ 96.91 ± 0.20 mg/ml ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 20 แสดงฤทธิ์การยับยั้งที่สัมพันธ์กับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น (dose-dependent manner) ได้ค่า IC_{50} 10.97 mg/ml ดังแสดงในตารางที่ 9 และเมื่อคำนวณเป็น final concentration ได้ค่า IC_{50} เท่ากับ 1.35 mg/ml แสดงให้เห็นว่าสารสกัดผงต้นกระตูดูกไก่ดำสามารถยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอนโดพโรตักส์ได้

เป็นที่น่าสนใจที่สารสกัดผงต้นกระตูดูกไก่ดำยังไม่มีรายงานวิจัยมาก่อน โดยพบว่าสารสกัดจากผงต้นกระตูดูกไก่ดำมีฤทธิ์การยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอนโดพโรตักส์เช่นเดียวกัน ดังค่าที่แสดงในตารางที่ 9 อย่างไรก็ตาม ในงานวิจัยของ Izabela และคณะ

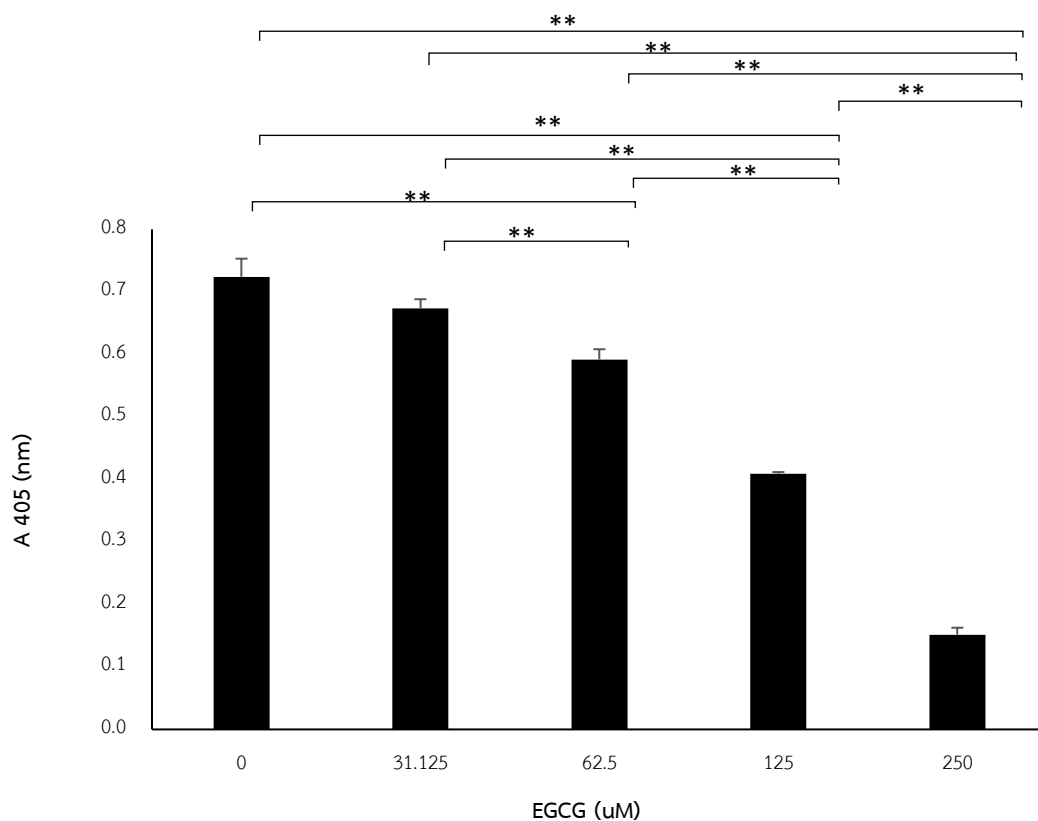
(47) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ในการต้านแอดวานซ์ไกลเคชันเอนโดพโรดักส์ของพืช *Scutellaria alpina* L. และ *S. altissima* L. (IC_{50} เท่ากับ 139.01 $\mu\text{g/ml}$ และ 57.92 $\mu\text{g/ml}$) จึงพบความสัมพันธ์ที่แข็งแรงระหว่างคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ และความสามารถในการต้านการเกิดกระบวนการไกลเคชัน โดยมี correlation coefficient (r) ระหว่าง 0.89 – 0.99 โดยการยับยั้งการเกิดแอดวานซ์ไกลเคชันเอนโดพโรดักส์ สัมพันธ์กับ FRAP assay มากกว่า DPPH assay ซึ่งสะท้อนให้เห็นว่ามีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการรีดักชันมากกว่า การจับอนุมูลอิสระในกระบวนการไกลเคชันโดยตรง แสดงให้เห็นว่าหากพืชมีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชัน จะมีแนวโน้มว่าจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดแอดวานซ์ไกลเคชันเอนโดพโรดักส์ด้วย และในงานวิจัยของ Harris et al. ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านแอดวานซ์ไกลเคชันเอนโดพโรดักส์ในพืชสมุนไพร 17 ชนิด ได้ค่า IC_{50} อยู่ระหว่าง 0.4 – 38.6 $\mu\text{g/ml}$ (55) ซึ่งมีค่าต่ำกว่าในงานวิจัยนี้



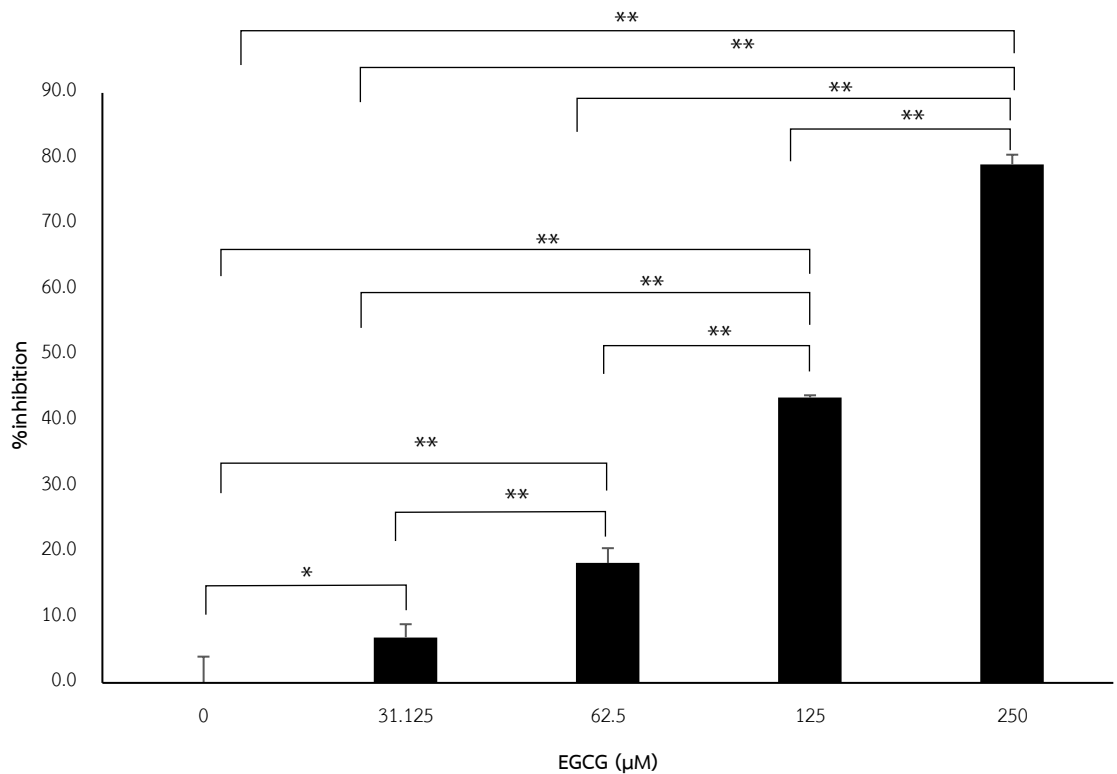
ภาพที่ 20 แสดงความสามารถในการยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอนโดพโรดักส์ของสารสกัดผงต้นกระตือรือร้นที่ความเข้มข้น 0, 1, 3, 10, 30 และ 100 mg/ml ที่เวลา 24 ชั่วโมง (**p value <0.01)

4.4 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำลาย elastin ของเอนไซม์ elastase (Anti-elastase activity assay)

สำหรับการศึกษาฤทธิ์ต้านการทำงานของเอนไซม์ elastase ด้วยวิธี anti-elastase activity assay ได้ทำการหาค่าการยับยั้งการทำลาย elastin ของเอนไซม์ elastase (%inhibition) กล่าวคือ ถ้าหากความเข้มข้นใดมีค่าการยับยั้งการทำลาย elastin ของเอนไซม์ elastase ที่สูง จะมีฤทธิ์ต้านการทำงานของเอนไซม์ elastase ที่ดีกว่าความเข้มข้นที่มีค่าการยับยั้งการทำลาย elastin ของเอนไซม์ elastase ที่ต่ำกว่า

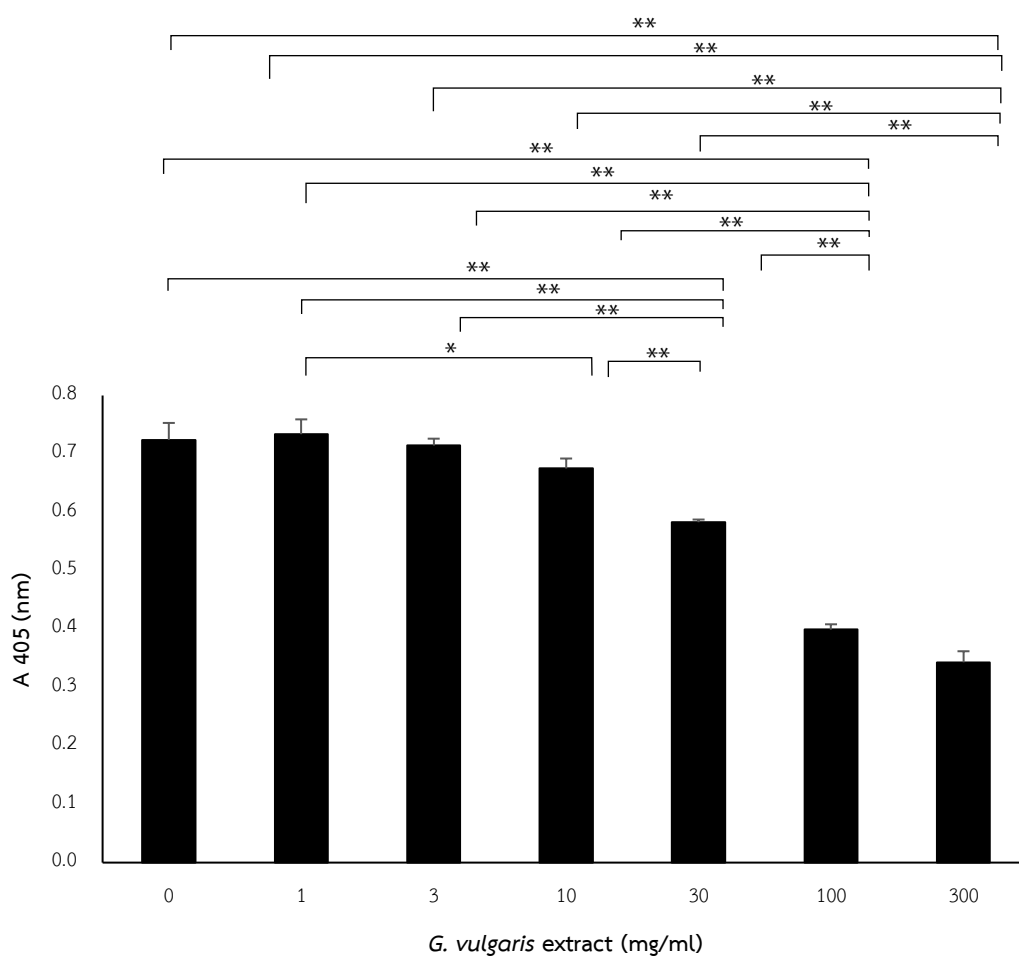


ภาพที่ 21 แสดงกราฟมาตรฐานของ EGCG ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี anti-elastase activity assay ที่ความยาวคลื่น 405 nm

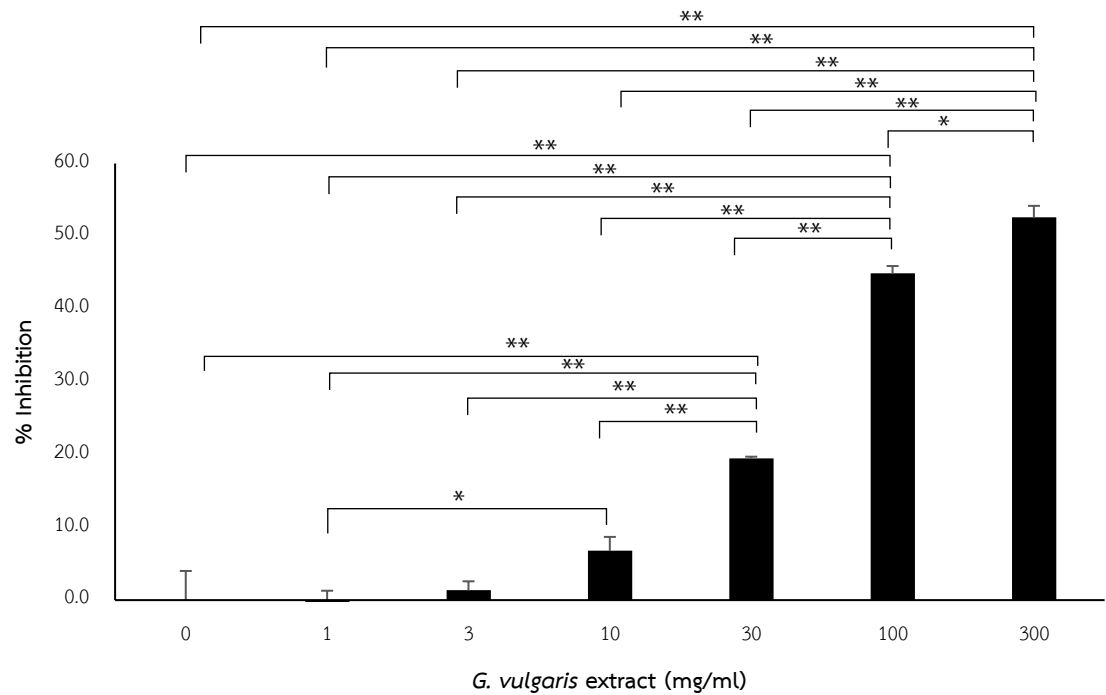


ภาพที่ 22 แสดงผลการยับยั้งการทำลาย elastin ของเอนไซม์ elastase ของสารมาตรฐาน EGCG ด้วยวิธี Anti-elastase activity assay ค่าที่แสดงเป็น mean $\pm$ SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ (*p < 0.05, ** p<0.01)

กราฟมาตรฐานของ EGCG พบความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ EGCG กับค่าการดูดกลืนแสง ที่ $y = -0.0024x + 0.7307$ เมื่อ x เท่ากับ ความเข้มข้น EGCE (μM) และ y คือค่าการดูดกลืนแสง 405 nm โดยพบว่ายิ่งความเข้มข้นสูงขึ้น ค่าการดูดกลืนแสงยิ่งมีค่าการดูดกลืนแสงต่ำลง ดังแสดงในภาพที่ 21 และพบความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารสกัดต้นกระตูดไก่ดำ คือเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดต้นกระตูดไก่ดำสูงขึ้นจะสามารถยับยั้งการทำลาย elastin ของเอนไซม์ elastase สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (*p < 0.05, ** p<0.01) ดังแสดงในภาพที่ 22



ภาพที่ 23 แสดงกราฟค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm ของสารสกัดผงต้นกระดุกไก่อดำ ด้วยวิธีวิเคราะห์ Anti-elastase activity assay ค่าที่แสดงเป็น mean $\pm$ SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)



ภาพที่ 24 แสดงผลการยับยั้งการทำลาย elastin ของเอนไซม์ elastase ของสารสกัดผงต้นกระตือกไถ่ด้วยวิธี anti-elastase activity assay ค่าที่แสดงเป็น mean ± SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ (*p < 0.05, ** p<0.01)

ตารางที่ 10 แสดงผลการยับยั้งการทำลาย elastin ของเอนไซม์ elastase ของ EGCG และสารสกัดผงต้นกระตูดไก่ดำ (ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD) และค่า IC_{50} ด้วยวิธี anti-elastase activity assay

สาร	ความเข้มข้น	% inhibition	IC_{50}
EGCG	0 μ M	0.00 ± 4.0	132.38 μ M
	31.125 μ M	6.95 ± 2.0	
	62.5 μ M	18.28 ± 2.3	
	125 μ M	43.51 ± 0.4	
	250 μ M	79.05 ± 1.3	
สารสกัดผงต้น กระตูดไก่ดำ	0 mg/ml	0.00 ± 4.0	112.86 mg/ml
	1 mg/ml	-1.34 ± 1.5	
	3 mg/ml	1.34 ± 2.6	
	10 mg/ml	6.77 ± 1.9	
	30 mg/ml	19.48 ± 0.2	
	100 mg/ml	44.89 ± 1.0	
	300 mg/ml	52.62 ± 1.6	

จากการวิเคราะห์สารสกัดต้นกระตูดไก่ดำด้วยวิธี anti-elastase activity โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm ที่ความเข้มข้น 0, 1, 3, 10, 30, 100 และ 300 mg/ml ดังแสดงในภาพที่ 23 และเมื่อนำมาหาค่าการยับยั้งการทำลาย elastin ของเอนไซม์ elastase (%inhibition) พบว่ามีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารสกัดต้นกระตูดไก่ดำ คือเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นจะสามารถยับยั้งการทำลาย elastin ของเอนไซม์ elastase สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) ดังแสดงในภาพที่ 24

จากการทดลองวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งการทำลาย elastin ของเอนไซม์ elastase ด้วยวิธี anti-elastase activity ดังแสดงในตารางที่ 10 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดผงต้นกระตูดไก่ดำสามารถยับยั้งการทำลาย elastin ของเอนไซม์ elastase ได้ พบว่าสารสกัดผงต้นกระตูดไก่ดำด้วย 30% ethanol ได้ค่า IC_{50} 112.86 mg/ml ซึ่งสอดคล้องกับในอีกสองงานวิจัยที่ใช้วิธีทดสอบที่คล้ายคลึงกับงานวิจัยในครั้งนี้ จากงานวิจัยของ Wahyu et al (2016) โดยทดสอบในพืช *Oryza Sativa* (37) และในงานวิจัยของ Krusty et al (2019) ที่ทดสอบในพืช *P. edulis* (56) และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำลาย elastin ของเอนไซม์ elastase ได้ค่า IC_{50} เท่ากับ 107.51 และ 0.63 mg/ml ตามลำดับ ซึ่ง

ในงานวิจัยข้างต้นได้กล่าวเปรียบเทียบการยับยั้งการทำลาย elastin ของเอนไซม์ elastase โดยพบว่า coumaric acid และ vanillin สามารถยับยั้งได้มากกว่าพืช *Oryza sativa* เนื่องจาก *Oryza sativa* มีปริมาณสารในกลุ่ม phenols และ flavonoids น้อย จึงกล่าวได้ว่าการยับยั้งการทำลาย elastin ของเอนไซม์ elastase ขึ้นกับปริมาณสาร phenols และ flavonoids โดยในต้นกระดุกไก่ดำพบสารในกลุ่มดังกล่าว ซึ่งทั้งสองงานวิจัยนี้ได้มีการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันร่วมด้วย อีกทั้งยังมีการวิจัยที่พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่าง total phenolic compound กับฤทธิ์ในการยับยั้งการทำลายอีลาสตินของเอนไซม์ elastase (41) ในงานวิจัยของ Sonal et al (2011) (14) ได้มีการรายงานว่ต้นกระดุกไก่ดำมีสารประกอบ phenolics ปรากฏอยู่ ดังนั้นหากพืชมีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชัน และมีสารประกอบ phenolics ร่วมด้วย ก็มีแนวโน้มว่าจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำลาย elastin ของเอนไซม์ elastase ได้เช่นกัน

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

การทดสอบเพื่อหาประสิทธิภาพในการต้านการเกิดริ้วรอยของสารสกัดจากผงต้นกระดุกไ่ดำในงานวิจัยนี้ ประกอบไปด้วยการทดสอบฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับกลไกในการเกิดริ้วรอยทั้งหมด 4 ฤทธิ์ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไกลเคชันเอนด์โปรตีน และฤทธิ์ต้านการทำงานของเอนไซม์ elastase สำหรับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ทำการทดลองทั้งหมด 2 วิธี ได้แก่ DPPH assay และ FRAP assay พบว่าผลการทดลองสอดคล้องกันทั้งสองวิธี โดยสารสกัดผงต้นกระดุกไ่ดำมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี เมื่อเทียบกับงานวิจัยที่รายงานมาก่อนหน้า ส่วนของฤทธิ์ต้านการอักเสบ ได้ทำการทดลองทั้งหมด 2 วิธีเช่นกัน ได้แก่ proteinase inhibitory assay และ protein denaturation assay ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดผงต้นกระดุกไ่ดำมีฤทธิ์ในการต้านการทำงานของเอนไซม์ trypsin ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มของเอนไซม์ proteinase และต้านการเสื่อมสภาพของโปรตีนได้ โดยใช้สารละลาย diclofenac sodium เป็น known inhibitor และในส่วนของการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไกลเคชันเอนด์โปรตีน (AGEs) โดยจำลองการสร้าง AGEs ในหลอดทดลอง พบว่า สารสกัดผงต้นกระดุกไ่ดำมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง AGEs ที่ 24 ชั่วโมง ได้อย่างมีนัยสำคัญ จากฤทธิ์ทั้ง 3 ฤทธิ์ จึงทำการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำลาย elastin ของเอนไซม์ elastase ของสารสกัดต้นกระดุกไ่ดำ ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการกระบวนการเกิดริ้วรอยก่อนวัย พบว่า สารสกัดผงต้นกระดุกไ่ดำมีฤทธิ์ยับยั้งการทำลาย elastin ของเอนไซม์ elastase สัมพันธ์กับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น

ข้อเสนอแนะ

1. ควรได้รับการศึกษาผลและประสิทธิภาพในระดับคลินิกต่อไป

บรรณานุกรม

1. รุ่งสรวง ฐ. ความแก่ของผิวหนัง: กลไกการเกิดระดับโมเลกุล การป้องกัน/การรักษา และสารธรรมชาติที่ใช้ในการต่อต้านความแก่ของผิวหนัง. 2559.
2. Katta R, Sanchez A, Tantry E. An Anti-Wrinkle Diet: Nutritional Strategies to Combat Oxidation, Inflammation and Glycation. Skin therapy letter. 2020;25:3-7.
3. international E. Beauty and Personal Care in Thailand. 2562.
4. ศูนย์วิจัยกสิกรไทย. ถึงเวลาโกยเงิน SME รุกตลาดสมุนไพร 2562.
5. Saleem TKM, Azeem AK, Dilip C, Sankar C, Prasanth NV, Duraisami R. Anti-inflammatory activity of the leaf extracts of *Gendarussa vulgaris* Nees. Asian Pac J Trop Biomed. 2011;1(2):147-9.
6. S N. Studies on Phytochemical Screening and in vitro Antioxidant Activity of Ethyl Acetate Leaf Extract of *Justicia gendarussa* Burm. F. RESEARCH JOURNAL OF BOTANY. 2015;10:30-6.
7. S N, Mani R, M M, Boobalan B, Kantharaj P. Antibacterial and Anti-inflammatory Activity of *Justicia gendarussa* Burm. F. Leaves. Journal of Plant Sciences. 2015;10.
8. Kashyap D, Sharma A, Tuli HS, Sak K, Punia S, Mukherjee TK. Kaempferol - A dietary anticancer molecule with multiple mechanisms of action: Recent trends and advancements. J Funct Foods. 2017;30:203-19.
9. Mondal M, Hossain MM, Rahman MA, Saha S, Uddin N, Hasan MR, et al. Hepatoprotective and Antioxidant Activities of *Justicia gendarussa* Leaf Extract in Carbofuran-Induced Hepatic Damage in Rats. (1520-5010).
10. K P, B U, L S, M P, M I. Evaluation of Antiangiogenic Effect of the Leaves of *Justicia gendarussa* (Burm. f) (Acanthaceae) by Chorio Allontoic Membrane Method. American Journal of Infectious Diseases. 2009;5.
11. Rajani Katta AS, Evelyne Tantry. An Anti-Wrinkle Diet: Nutritional Strategies to Combat Oxidation, Inflammation and Glycation. Skin therapy letter.
12. Aye MM, Aung HT, Sein MM, Armijos C. A Review on the Phytochemistry, Medicinal Properties and Pharmacological Activities of 15 Selected Myanmar Medicinal Plants. Molecules. 2019;24(2):293.

13. Losaura C, Mollejon C. Phytochemical Screening of *Justina Gendarussa* Burm F. Panhault Leaf Extract. International Journal of Trend in Scientific Research and Development. 2019;Volume-3:337-8.
14. Patel S, Nayana K, Bakula S, Mamta S. Botanical identification and physicochemical investigation of leaf of Nili-Nirgundi (*Justicia Gendarussa*). International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. 2011;10:116-21.
15. S M. Phytochemical Evaluation, GC-MS Analysis of Bioactive Compounds and Antibacterial Activity Studies from *Justicia gendarussa* Burm.F. Leaf. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research. 2017;9(3):400-6.
16. SM Mushiur Rahman BS, Md. Habibur Rahman, Asraful Islam, Shamsun Nahar, Md. Tanjir Imam Hasan and Md. Nazmus Sakib. Phytochemical screening, acute toxicity, antinociceptive and antidiarrheal activity of *Gendarussa vulgaris* leaves extract. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 2018:577-84.
17. Nino, A AL, Reddy sk. In vitro regeneration and phytochemical analysis of *Justicia gendarussa*. 2012.
18. Shamili G, Santhi G. Identification and Characterization of Bioactive Compounds of Leaves of *Justicia Gendarussa* Burm. F. International Journal of Scientific Research in Biological Sciences. 2019;6:145-53.
19. L.Suseela. Pharmacognostic Phytochemical studies and the Effects on Angiogenesis, TNF- α Inhibition of the Leaves of *Justicia gendarussa* Burm. f. MASTER OF PHARMACY.
20. Yadav D, Reshi M, Uthra C, Shrivastava S, Srivastava N, Kn SK, et al. Botanical and Chemical Fingerprinting of Medicinal Roots of *Justicia gendarussa* Burm f. Pharmacognosy Research. 2017;9:208-14.
21. Muhameead Ramees K Hk, Nileena F, Rosemary K, Sinju P, Raju, Nobin C Joy and Suresh J. Phytochemical Screening of *Justicia Gendrusa*. International Journal of Pharmacognosy and Chinese Medicine. 2019;3(1).
22. องค์การสวนพฤกษศาสตร์. *Justicia gendarussa* Burm. f. 2015.

23. Periya S, Latha P, Suja S, Anuja G, Sukumaran S, Shine VJ, et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of *Justicia gendarussa* Burm. f. Leaves. Indian Journal of Natural Products and Resources. 2010;1.
24. Patel S, Zaveri M. Trypsin and Protein Denaturation Inhibitory Activity of Different Fractionation and Isolated Compound of Leaf and Root of *Justicia Gendarussa*. IJPSR. 2014;5:5564-71.
25. Kenganora M, V.I.Hukkeri. Antioxidant and free radical scavenging potential of *Justicia gendarussa* Burm. Leaves in- vitro. Natural Product Sciences. 2007;3:199-206.
26. Widodo A, Widiyanti P, Prajogo B. ANTIVIRAL ACTIVITY OF *Justicia gendarussa* Burm.f. LEAVES AGAINST HIV-INFECTED MT-4 CELLS [
27. Ayob ZA-O, Mohd Bohari SA-O, Abd Samad A, Jamil S. Cytotoxic Activities against Breast Cancer Cells of Local *Justicia gendarussa* Crude Extracts. (1741-427X).
28. Naylor EC, Watson REB, Sherratt MJ. Molecular aspects of skin ageing. Maturitas. 2011;69(3):249-56.
29. Yin R, Chen Q, Hamblin MR. Skin aging and photoaging. 2015.
30. Madan K, Nanda S. In-vitro evaluation of antioxidant, anti-elastase, anti-collagenase, anti-hyaluronidase activities of safranal and determination of its sun protection factor in skin photoaging. (1090-2120).
31. Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: A review. Diabetologia. 2001;44:129-46.
32. Gkogkolou P, Böhm M. Advanced glycation end products: Key players in skin aging. Dermato-endocrinology. 2012;4:259-70.
33. Fournet M, Bonté F, Desmoulière A. Glycation Damage: A Possible Hub for Major Pathophysiological Disorders and Aging. (2152-5250).
34. Kim C-S, Park S, Kim J. The role of glycation in the pathogenesis of aging and its prevention through herbal products and physical exercise. J Exerc Nutrition Biochem. 2017;21(3):55-61.
35. Thornalley PJ, Yurek-George A Fau - Argirov OK, Argirov OK. Kinetics and mechanism of the reaction of aminoguanidine with the alpha-oxoaldehydes glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone under physiological conditions. (0006-2952).

36. Forbes JM, Soulis T, Thallas V, Panagiotopoulos S, Long DM, Vasan S, et al. Renoprotective effects of a novel inhibitor of advanced glycation. *Diabetologia*. 2001;44(1):108-14.
37. Wahyu Widowati NF, Heddy Herdiman, Merry Afni , Ervi Afifah , Hanna Sari W. Kusuma , Hayatun Nufus , Seila Arumwardana , Dwi Davidson Rihibiha. Antioxidant and Anti Aging Assays of *Oryza Sativa* Extracts, Vanillin and Coumaric Acid. *Journal of Natural Remedies*. July 2016:88-99.
38. Csepregi K, Neugart S, Schreiner M, Hideg É. Comparative Evaluation of Total Antioxidant Capacities of Plant Polyphenols. LID - 10.3390/molecules21020208 [doi] LID - 208. (1420-3049).
39. Gunathilake KA-O, Ranaweera K, Rupasinghe HA-O. In Vitro Anti-Inflammatory Properties of Selected Green Leafy Vegetables. LID - 10.3390/biomedicines6040107 [doi] LID - 107. (2227-9059).
40. Williams LA, O'Connar A Fau - Latore L, Latore L Fau - Dennis O, Dennis O Fau - Ringer S, Ringer S Fau - Whittaker JA, Whittaker Ja Fau - Conrad J, et al. The in vitro anti-denaturation effects induced by natural products and non-steroidal compounds in heat treated (immunogenic) bovine serum albumin is proposed as a screening assay for the detection of anti-inflammatory compounds, without the use of animals, in the early stages of the drug discovery process. (0043-3144).
41. Thring T, Hili P, Naughton D. Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine - BMC COMPLEMENT ALTERN MED*. 2009;9:27-11.
42. Vijayakumar AS. PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF SILVER NANOPARTICLES, ETHANOLIC EXTRACT FROM *JUSTICIA GENDARUSSA* (BURM) F PLANT LEAVES. 2019;5:462-75.
43. Amid A, Najwa N, Jamal P, Wan W, Zain M. Observation of antioxidant activity of leaves, callus and suspension culture of *Justicia gendarusa*. *AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY*. 2011;10.
44. Mondal M, Hossain M, Rahman MA, Saha S, Uddin N, Hasan R, et al. Hepatoprotective and Antioxidant Activities of *Justicia gendarussa* Leaf Extract in Carbofuran-Induced Hepatic Damage in Rats. *Chemical Research in Toxicology*. 2019.

45. Sangeetha S, Kavitha K, Sujatha K, Umamaheswari S. Phytochemical and Pharmacological Profile of *Justicia gendarussa* Burm f. – Review. *Journal of Pharmacy Research*. 2014;8:990-7.
46. Huyut Z, Beydemir Ş, Gülçin I. Antioxidant and Antiradical Properties of Selected Flavonoids and Phenolic Compounds. *Biochemistry Research International*. 2017;2017:1-10.
47. Grzegorzczak-Karolak I, Gołab K, Gburek J, Wysokińska H, Matkowski A. Inhibition of Advanced Glycation End-Product Formation and Antioxidant Activity by Extracts and Polyphenols from *Scutellaria alpina* L. and *S. altissima* L. LID - 10.3390/molecules21060739 [doi] LID - 739. (1420-3049 (Electronic)).
48. Lee Y, Kim S, Lee S, Ham I, Whang W. Antioxidant activities of new flavonoids from *Cudrania tricuspidata* root bark. *Archives of pharmacal research*. 2009;32:195-200.
49. Esmaeili A, Taha R, Mohajer S, Banisalam B. Antioxidant Activity and Total Phenolic and Flavonoid Content of Various Solvent Extracts from In Vivo and In Vitro Grown *Trifolium pratense* L. (Red Clover). *BioMed Research International*. 2015;Article ID 643285:11.
50. Tchimine M, Nwaehujor C, Ezenwali M, Okoli C, Iwu M. FREE RADICAL SCAVENGING ACTIVITY OF LUPEOL FROM THE METHANOL LEAF EXTRACT OF *CRATEVA ADANSONII* OLIV. (CAPPARIDACEAE). 2016;8.
51. Kumar K, Sabu V, Ganapathy S, Rauf A, Helen A. Isolation, identification and characterization of apigenin from *Justicia gendarussa* and its anti-inflammatory activity. *International immunopharmacology*. 2018;59:157-67.
52. Ratih G, Imawati M, Rizki R, Intan D, Wongso S, Prajogo B, et al. Phytochemicals of Gandarusa (*Justicia gendarussa*) and Its Preparations. *Natural product communications*. 2019;14:1-10.
53. Raghu.M.G PA. The Isolation and Structural Determination of Flavonoids from *Justicia Gendarussa*. *Pharmacy and Biological Sciences*. 2016;11(6): 73-9.
54. Laksmiawati D, Prasanti A, Larasinta N, Syauta G, Hilda R, Ramadaniati H, et al. Anti-Inflammatory Potential of Gandarusa (*Gendarussa vulgaris* Nees) and Soursoup

(*Annona muricata* L) Extracts in LPS Stimulated-Macrophage Cell (RAW264.7). *Journal of Natural Remedies*. 2016;16:73-81.

55. Harris C, Beaulieu L-P, Fraser M-H, McIntyre K, Owen P, Martineau L, et al. Inhibition of Advanced Glycation End Product Formation by Medicinal Plant Extracts Correlates with Phenolic Metabolites and Antioxidant Activity. *Planta medica*. 2011;77:196-204.

56. Krusty Vera AR, Refi Ikhtiari. Antioxidant and Anti-elastase Activity of Seed and Peel Extract of *P.edulis*. *American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences (ASRJETS)*. 2019;53(2313-4402):43-8.

ภาคผนวก

ภาคผนวก (ก)

อัคราวิสุทธิ์

Plagiarism Checking Report*Created on Apr 9, 2021 at 02:04 AM**Submission Information*

ID	SUBMISSION DATE	SUBMITTED BY	ORGANIZATION	FILENAME	STATUS	SIMILARITY INDEX
2024094	Apr 9, 2021 at 02:04 AM	59210104@go.buu.ac.th	มหาวิทยาลัยบูรพา	รวมกระดูกไก่ดำ 8_04 14.41.docx	Completed	0.00 %

Match Overview

NO.	TITLE	AUTHOR(S)	SOURCE	SIMILARITY INDEX
No data available in table				

ภาคผนวก (ข)

แบบฟอร์มรายงานการเงิน

รายงานสรุปการเงิน

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณการเงินรายได้คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2563 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งกลไกการเกิดริ้วรอยก่อนวัยของต้นกระดุกไก่อดำ

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ญญ.ดร.อ. ภัทรวดี ศรีคุณ

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 เมษายน 2563 ถึงวันที่ 28 กุมภาพันธ์ 2564

ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี ตั้งแต่วันที่ 1 เมษายน 2563

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ (100%) 9,000 บาท เมื่อวันที่ 3 กุมภาพันธ์ 2564

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/ เกิน
1. ค่าสารเคมี	8850 บาท	8850 บาท	0 บาท
2. ค่าโปสเตอร์	150 บาท	150 บาท	0 บาท
รวม	9000 บาท	9000 บาท	0 บาท

(.....)

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัย