



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การประเมินฤทธิ์ด้านการอักเสบในสมุนไพรที่อยู่ในภาคตะวันออกของประเทศไทย

Evaluation of anti-inflammatory effects of the selected herbs

from Eastern part of Thailand

โดย

นสภ. สรลพร	สุนทรโชติ	56210030
นสภ. ขวัญชนก	ทับปะระ	56210155
นสภ. นิชนันท์	ถิ่นทวี	56210179
นสภ. ศจิรัตน์	แก้วประสม	56210184

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
บัณฑิต

ปีการศึกษา 2560

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การประเมินฤทธิ์ด้านการอักเสบในสมุนไพรที่อยู่ในภาคตะวันออกของประเทศไทย

Evaluation of anti-inflammatory effects of the selected herbs

from Eastern part of Thailand

โดย

นสภ. สรลพร	สุนทรโชติ	56210030
นสภ. ขวัญชนก	ทับประระ	56210155
นสภ. นิชนันท์	ถิ่นทวี	56210179
นสภ. ศจิรัตน์	แก้วประสม	56210184

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

บัณฑิต

ปีการศึกษา 2560

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

รายงานฉบับนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินฤทธิ์ด้านการอักเสบในสมุนไพรที่อยู่ในภาคตะวันออกของประเทศไทย ประกอบด้วยพืช 5 ชนิด ได้แก่ กระเทียม ขมิ้นชัน ขมิ้นชัน ขมิ้นชัน ขมิ้นชัน และขมิ้นชัน ซึ่งเหตุผลที่ทางคณะผู้จัดทำได้เลือกหัวข้อนี้เนื่องจากเห็นว่าสมุนไพรเป็นเรื่องใกล้ตัว ได้มีการนำสมุนไพรมาใช้ในการรักษาโรคเพิ่มมากขึ้น และในปัจจุบันก็มีเทคโนโลยีที่จะสามารถนำมาใช้ในการทดสอบสมรรถภาพทางเภสัชวิทยา เพื่อที่จะยืนยันว่ามีฤทธิ์ดังที่ได้รับการกล่าวอ้างจริง ทางคณะผู้จัดทำหวังว่าโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้จะให้ความรู้ และก่อให้เกิดประโยชน์แก่ผู้ที่ได้อ่านต่อไป

คณะผู้จัดทำ

31 ตุลาคม 2560

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2560

เรื่อง การประเมินฤทธิ์ด้านการอักเสบในสมุนไพรมะเขือเทศในภาคตะวันออกของประเทศไทย

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. นสภ. สรลพร	สุนทรโชติ	รหัส	56210030
2. นสภ. ขวัญชนก	ทับปะระ	รหัส	56210155
3. นสภ. นิชนันท์	ถิ่นทวี	รหัส	56210179
4. นสภ. ศจีรัตน์	แก้วประสม	รหัส	56210184

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. ญญ.ดร. ภทรวดี ศรีคุณ
2. อ.ณิชากรณต์ ภิระคำ
3. อ.ภีรดา บุญเพื่อน

บทคัดย่อ

ภาคตะวันออกของประเทศไทยเป็นภาคที่อุดมไปด้วยทรัพยากรธรรมชาติและระบบนิเวศทางป่าไม้ที่มีความหลากหลาย มีการใช้พืชพรรณสำหรับเป็นสมุนไพรมะเขือเทศเป็นจำนวนมาก แต่อย่างไรก็ตามยังพบว่าการรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรมะเขือเทศยังคงมีจำกัดโดยเฉพาะฤทธิ์การด้านการอักเสบซึ่งยังพบไม่มากนัก ดังนั้นการศึกษานี้จึงได้ทำการประเมินฤทธิ์ด้านการอักเสบของสมุนไพรมะเขือเทศที่มีอยู่ในภาคตะวันออกของประเทศไทยจำนวนสมุนไพรมะเขือเทศทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ กระเทียม ขมิ้นดำ ขันทองพยาบาท ฝ้ายแดง และหญ้า น้ำคั้นโดยการสกัดด้วย Ethanol ทั้งแบบใช้ความร้อน (Soxhlet extraction) และไม่ใช้ความร้อน (Maceration) จากนั้นทำการทดสอบฤทธิ์การด้านการอักเสบทางตรง ด้วยวิธี Proteinase inhibitory assay และฤทธิ์การด้านการอักเสบทางอ้อมด้วยวิธี Anti-AGEs activity, FRAP และ DPPH พบว่าพืชที่ให้ฤทธิ์การด้านการอักเสบทางตรงที่ดีที่สุด คือ ฝ้ายแดง ที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet extraction ได้ค่า IC_{50} 14.97 μ g/ml สำหรับฤทธิ์การด้านการอักเสบทางอ้อมด้วยวิธี FRAP สารสกัดกระเทียมที่สกัดด้วยวิธี Soxhlet extraction และสารสกัดขันทองพยาบาทที่สกัดด้วยวิธี Maceration ให้ฤทธิ์ดีที่สุดซึ่งมีค่า Trolox equivalent เท่ากับ 33.0 ± 1.85 และ 36.7 ± 3.93 ตามลำดับ โดยในส่วนของการทดสอบด้วยวิธี DPPH และ Anti-AGEs activity ได้ผลการทดสอบเป็นไปในทิศทางเดียวกัน ซึ่งคาดว่าข้อมูลเหล่านี้จะนำไปประยุกต์ใช้ในทางเภสัชวิทยาต่อไปได้

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก.....

Senior Project Academic Year 2017

: Evaluation of anti-inflammatory effects of the selected herbs

from Eastern part of Thailand

By

- | | | | | |
|----|------------------|-------------|----|----------|
| 1. | Miss.Saralporn | Soontonchot | ID | 56210030 |
| 2. | Miss.Khwanshanok | Thabpara | ID | 56210155 |
| 3. | Miss.Nichanant | Tintavee | ID | 56210179 |
| 4. | Miss.Sageerat | Kaewprasom | ID | 56210184 |

Advisor:

- | | | | |
|----|-----------------|----------|--------------|
| 1. | Dr.Pattaravadee | Srikoon | (Advisor) |
| 2. | Dr.Nichakan | Peerakam | (Co-Advisor) |
| 3. | Miss.Peerada | Boonpuan | (Co-Advisor) |

ABSTRACT

Eastern parts of Thailand is the region which have plenty of natural source and varieties of forest ecology. A lot of plants have been developed to be local Thai herb. However, only few herbs can be treated against inflammation. So this research is aim to evaluate the anti-inflammatory effect of herbs from Ethanol extract in the East of Thailand both Soxhlet extraction and Maceration from 5 herbs eg. *Calophyllum inophyllum*, *Clerodendrum disparifolium*, *Gelonium multiflorum* A., *Gossypium arboreum* L., *Drosera Indica* L. The direct anti-inflammatory action will be studied by Proteinase inhibitory assay method while the indirect anti-inflammatory action will be studied by Anti-AGEs activity, FRAP and DPPH. The Red Herbs have the best direct anti-inflammatory action with Soxhlet extraction: IC₅₀ 14.97 µg/ml. For the indirect anti-inflammatory action with FRAP method, Bison Herbs from Soxhlet extraction and Herb from Maceration are the plants with best results. Besides, DPPH and Anti-AGEs activity have the same direction which these information have possibility to adapt and use for pharmacology.

Major Advisor.....

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องมาจากความช่วยเหลือของ
 ภญ.ดร. ภัทรวดี ศรีคุณ, อ.ณิชากรนต์ ภีระคำ และอ.ภีรดา บุญเฟื่อน อาจารย์ที่ปรึกษา ที่ได้ให้คำปรึกษา
 คอยช่วยชี้แนะแนวทางในการค้นคว้าหาความรู้ ช่วยดูแลการทำงานวิจัยให้เป็นไปอย่างราบรื่น และช่วย
 ตรวจสอบความถูกต้องให้แก่ניתิต จึงทำให้โครงการวิจัยฉบับนี้บรรลุตามวัตถุประสงค์

ขอขอบพระคุณพี่ผู้ช่วยวิจัย ตลอดจนพี่น้องวิทยาศาสตร์ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ ช่วยจัดหา
 เครื่องมืออุปกรณ์ในการทำแลปของงานวิจัยนี้ รวมไปถึงผู้ให้การสนับสนุนท่านๆอื่นที่ได้ให้การช่วยเหลือมา
 ณ โอกาสนี้

คณะผู้จัดทำ

31 ตุลาคม 2560

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ฌ
 บทที่	
1. บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 กรอบแนวคิดการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
2. วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 พืชที่จะนำมาทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ	4
2.2 นิยามของการอักเสบ (Inflammation)	8
2.3 สาเหตุที่ทำให้เกิดการอักเสบ	9
2.4 ประเภทของการอักเสบ	9
2.5 กลไกที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ	11
2.6 Mediators	13
2.7 กลไกการอักเสบผ่าน Cytokine	15
2.8 กลไกการอักเสบผ่าน Oxidative Stress	17
2.9 กลไกการอักเสบผ่าน Advanced Glycation End Products (AGEs)	17
2.10 วิธีการตรวจวัดการอักเสบ	18
2.11 วิธีการเตรียมสมุนไพร	31
2.12 ขั้นตอนการสกัดแยกสาร	32
2.13 หลักในการเลือกใช้ตัวทำละลาย	34

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3. วิธีดำเนินการวิจัย	35
3.1 วัสดุและอุปกรณ์	35
3.2 วิธีดำเนินการทดลอง	36
4. ผลการวิจัย	43
4.1 ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างพืชสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด	43
4.2 ฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยการยับยั้งเอนไซม์กลุ่มโปรตีเนส (Proteinase inhibitory assay)	43
4.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH assay	51
4.4 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) โดยการ reduce Ferric III ion ให้เปลี่ยนไปเป็น Ferric II ion (Ferric reducing antioxidant power (FRAP) Assay)	59
4.5 Anti- AGEs	65
5. สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	69
เอกสารอ้างอิง	72

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. สรุปการศึกษารายงานฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพืชสมุนไพรที่สนใจทั้ง 5 ชนิด	8
2. หลักการในการเก็บสมุนไพรที่มีคุณลักษณะแตกต่างกัน	32
3. การทำสมุนไพรให้แห้งรูปแบบต่างๆ	32
4. ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างพืชสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด	43
5-1 แสดงค่าความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดกระเทียมด้วยวิธี maceration และ soxhlet	44
5-2 แสดงค่าความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดข่อยดำด้วยวิธี maceration และ soxhlet	45
5-3 แสดงค่าความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดชันทองพญาบาทด้วยวิธี maceration และ soxhlet	46
5-4 แสดงค่าความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดฝ้ายแดงด้วยวิธี maceration และ soxhlet	48
5-5 แสดงค่าความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดเห้มน้ำค้างด้วยวิธี maceration และ soxhlet	49
6. แสดงค่า IC ₅₀ ของสารสกัดพืชจาก Proteinase inhibitory assay	50
7. แสดง %inhibition ที่ความเข้มข้นต่างๆของสารมาตรฐาน Trolox	51
8-1 แสดง %inhibition ที่ความเข้มข้นต่างๆของกระเทียม	52
8-2 แสดง %inhibition ที่ความเข้มข้นต่างๆของข่อยดำ	54
8-3 แสดง %inhibition ที่ความเข้มข้นต่างๆของชันทองพญาบาท	55
8-4 แสดง %inhibition ที่ความเข้มข้นต่างๆของฝ้ายแดง	56
8-5 แสดง %inhibition ที่ความเข้มข้นต่างๆของเห้มน้ำค้าง	58
9. แสดงการรายงานผลการยับยั้ง AGEs ของ AMG	66
10-1 แสดงการรายงานผลการยับยั้ง AGEs ของสารสกัดกระเทียม	67
10-2 แสดงการรายงานผลการยับยั้ง AGEs ของสารสกัดชันทองพญาบาท	67

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. กระทั่ง	4
2. ช่อดำ	5
3. ชันทองพยับบาท	5
4. ฝ้ายแดง	6
5. หนุ่ยน้ำค้าง	7
6. แสดงกลไกการเกิดการอักเสบ	11
7. แสดงความสัมพันธ์ของสารกลุ่ม complement, kinin, clotting และ fibrinolytic system ในกระบวนการอักเสบ	12
8. แสดงการสร้างสารต่างๆรวมถึงหน้าที่ในกระบวนการอักเสบ	15
9. แสดงผลของ TNF และ IL-1 ต่อการเกิด acute phase reaction	16
10. แสดงกลไกการอักเสบผ่าน oxidative stress	17
11. แสดงกลไกการอักเสบผ่าน AGEs	18
12. แสดงการเกิดปฏิกิริยา FRAP	27
13. แสดงโครงสร้าง 2,2'-Azino- bis (3-ethylbenzothiazoline-6- sulfonic acid) diammonium salt	27
14. แสดงปฏิกิริยา ABTS	27
15. แสดง ABTS assay	28
16. แสดง DPPH assay	30
17-1 แสดงขั้นตอนการล้างทำความสะอาดพืช	37
17-2 แสดงภาพก่อนและหลังการทำความสะอาดพืช	37
18-1 แสดงการอบพืช	38
18-2 แสดงตัวอย่างพืชหลังการอบ	38
19. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดพืชด้วยวิธี maceration และ soxhlet กับ % inhibition ด้วยวิธีวิเคราะห์ Proteinase inhibitory assay	44
20. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดที่ 20 µg/ml ด้วยวิธี maceration และ soxhlet กับ % inhibition ด้วยวิธีวิเคราะห์ Proteinase inhibitory assay	50

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
21.	กราฟแสดง %inhibition ที่ความเข้มข้นต่างๆของสารมาตรฐาน Trolox วิธีวิเคราะห์ DPPH assay	52
22.	กราฟแสดงการเปรียบเทียบ %inhibition ระหว่างสารสกัดพืชที่สกัดด้วยวิธี maceration และ soxhlet ที่ความเข้มข้นต่างๆของสารมาตรฐาน Trolox ด้วยวิธีวิเคราะห์ DPPH assay	53
23.	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดที่ 250 µg/ml ด้วยวิธี maceration และ soxhlet กับ %inhibition ด้วยวิธีวิเคราะห์ DPPH assay	59
24.	กราฟแสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ของพืชแต่ละชนิดในการ reduce Ferric III ion ให้เปลี่ยนไปเป็น Ferric II ion ด้วยวิธีทดสอบ FRAP Assay เทียบกับ สารมาตรฐาน Trolox	62
25.	แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดพืชในการ reduce Ferric III ion ให้เปลี่ยนไปเป็น Ferric II ion ด้วยวิธีทดสอบ FRAP Assay เทียบกับ สารมาตรฐาน Trolox	63
26.	กราฟแสดง % Inhibition ของ AMG ที่ความเข้มข้นต่างๆ	66
27.	กราฟแสดง % Inhibition ของสารสกัดพืชที่ความเข้มข้นต่างๆ	67

บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตร้อนใกล้เส้นศูนย์สูตร อยู่ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้(1) ป่าไม้ในประเทศไทยมีลักษณะเป็นป่าไม่ผลัดใบ (Evergreen Forest)(2) หรืออีกนัยหนึ่งก็คือ ป่าที่จะมีลักษณะเขียวชอุ่มตลอดทั้งปี ป่าไม่ผลัดใบนั้นสามารถแบ่งเป็นประเภทย่อยๆได้อีกหลายชนิดโดยแต่ละประเภทก็จะมีลักษณะเฉพาะของป่าที่แตกต่างกันไปตามในแต่ละภาค สำหรับในภาคตะวันออกของประเทศไทย ที่ประกอบด้วย 7 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดฉะเชิงเทรา ชลบุรี ระยอง จันทบุรี ปราจีนบุรี สระแก้ว และตราด จังหวัดปราจีนบุรี และสระแก้ว ไม่มีพื้นที่ติดทะเล ภาคตะวันออกนี้เป็นภาคที่อุดมไปด้วยทรัพยากรธรรมชาติและระบบนิเวศทางป่าไม้ที่มีความหลากหลาย มีดินส่วนใหญ่ที่เป็นดินปนทราย ระบายน้ำได้ดี มีแม่น้ำสายที่สำคัญๆหลายสาย ได้แก่ แม่น้ำบางปะกง แม่น้ำจันทบุรี และแม่น้ำเวฬุ เป็นต้น พื้นที่ป่าไม้ส่วนใหญ่จะเป็นป่าดงดิบ ป่าดิบเขา ป่าสนเขา ป่าชายเลน และป่าเบญจพรรณ จากลักษณะที่กล่าวมาในข้างต้นนี้จึงทำให้พืชพรรณในภาคตะวันออกมีความหลากหลายเป็นจำนวนมาก(3)

พืชหนึ่งในจำนวนนั้นได้มีการถูกนำมาใช้เป็นยาสมุนไพรพื้นบ้านของไทยไม่ว่าจะเป็นการใช้เป็นยาเดี่ยว หรือการใช้เป็นสูตรตำรับ และเมื่อไม่นานมานี้มีการพบว่าสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทย (4) เริ่มหันกลับมาเป็นที่นิยมขึ้นมาอีกครั้ง รวมถึงในครั้งนี้ได้มีการนำวิทยาศาสตร์มาทำการผสมผสานกับยาเดิมพื้นบ้านที่มีอยู่ โดยการนำสมุนไพรเหล่านั้นมาทำการตรวจสอบสารสำคัญที่ใช้ในการออกฤทธิ์ บางส่วนในจำนวนนั้นสามารถนำไปพัฒนาต่อเป็นยาแผนตะวันตกได้อย่างเต็มรูปแบบ และอีกบางส่วนก็ถูกนำมาตรวจสอบเพื่อใช้ในการยืนยันว่าสมุนไพรดังกล่าวสามารถออกฤทธิ์ได้จริง

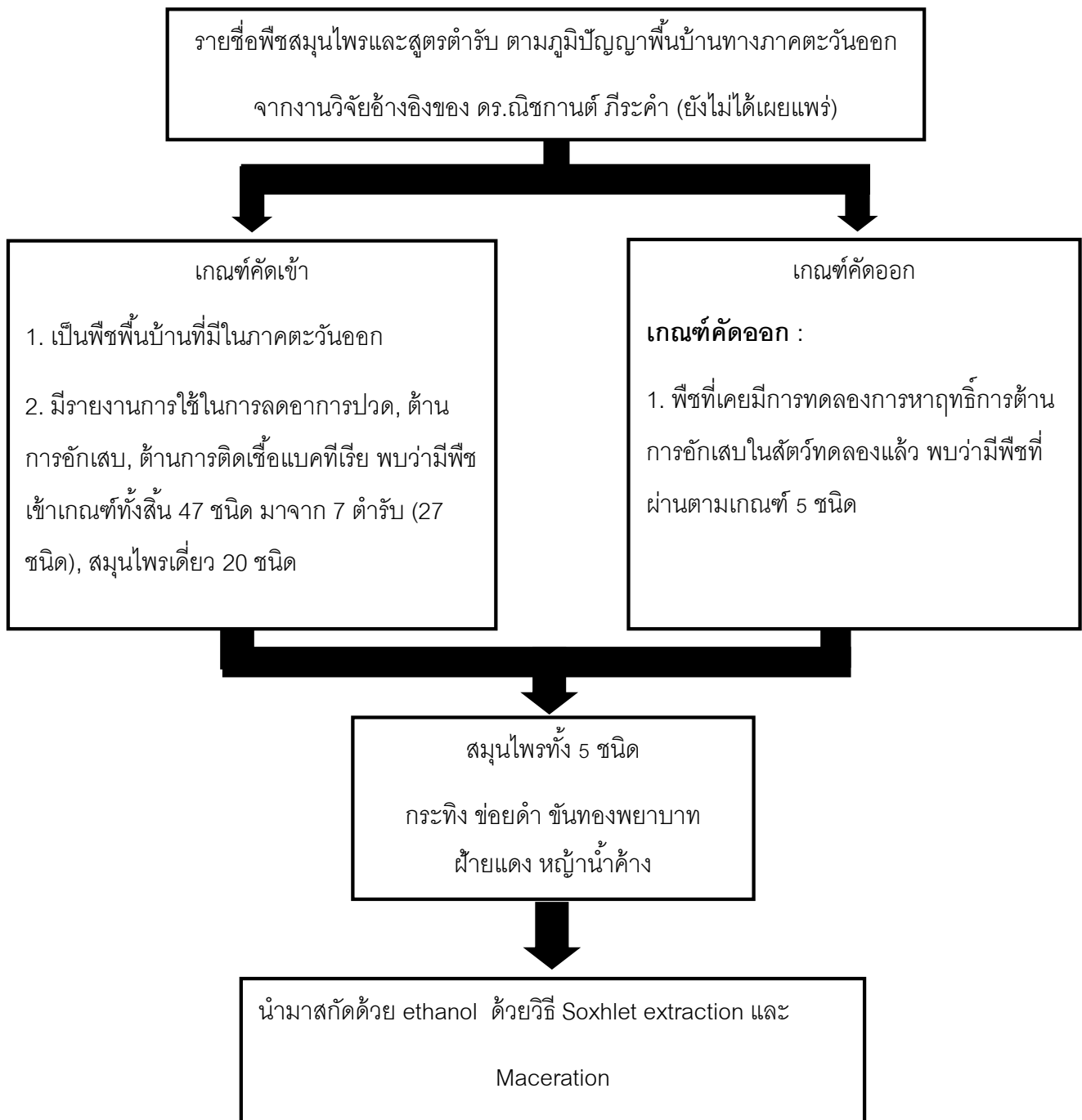
จากตำราแพทย์พื้นบ้านของไทยก็พบว่าสมุนไพรไทยจำนวนมากที่ในตำรามีการกล่าวอ้างถึงว่าสามารถออกฤทธิ์ในการต้านการอักเสบได้ การอักเสบเป็นกระบวนการที่ร่างกายตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย โดยร่างกายจะมีการหลั่ง mediator ต่างๆอย่างเป็นลำดับขั้นผ่านหลาย pathway ซึ่งจะแตกต่างกันออกไปขึ้นกับสิ่งที่มากระตุ้น(5, 6) ซึ่งก็มียาในการต้านการอักเสบที่เกิดขึ้น ทั้งยาแผนปัจจุบัน และยาสมุนไพรพื้นบ้าน สำหรับยาแผนปัจจุบันที่มีการใช้ในการต้านการอักเสบโดยทั่วไปก็จะเป็นยาในกลุ่ม Nonsteroidal anti-inflammatory drugs หรือที่เรารู้จักกันในนาม NSAIDs(7) แต่อย่างไรก็ตามกลับพบว่ายังไม่มีมีการรวบรวมฤทธิ์ในการต้านการอักเสบจากสมุนไพรที่มีในภาคตะวันออกของประเทศไทยที่ได้จากการทดลองอย่างแพร่หลายนัก ทางคณะผู้จัดทำจึงมีความสนใจที่จะทำการเลือกสมุนไพรบางชนิดที่มีอยู่ในภาคตะวันออก ที่คาดว่าจะมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบจากคำบอกเล่าจากหมอชาวบ้าน จากเอกสารอ้างอิงตำรายาสมุนไพรไทย หรือเอกสารตำรายาต่างๆ มาทำการตรวจสอบฤทธิ์โดยอาศัยกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ เพื่อค้นหาฤทธิ์ในการต้านการอักเสบดังกล่าว รวมไปถึงหาขนาดที่

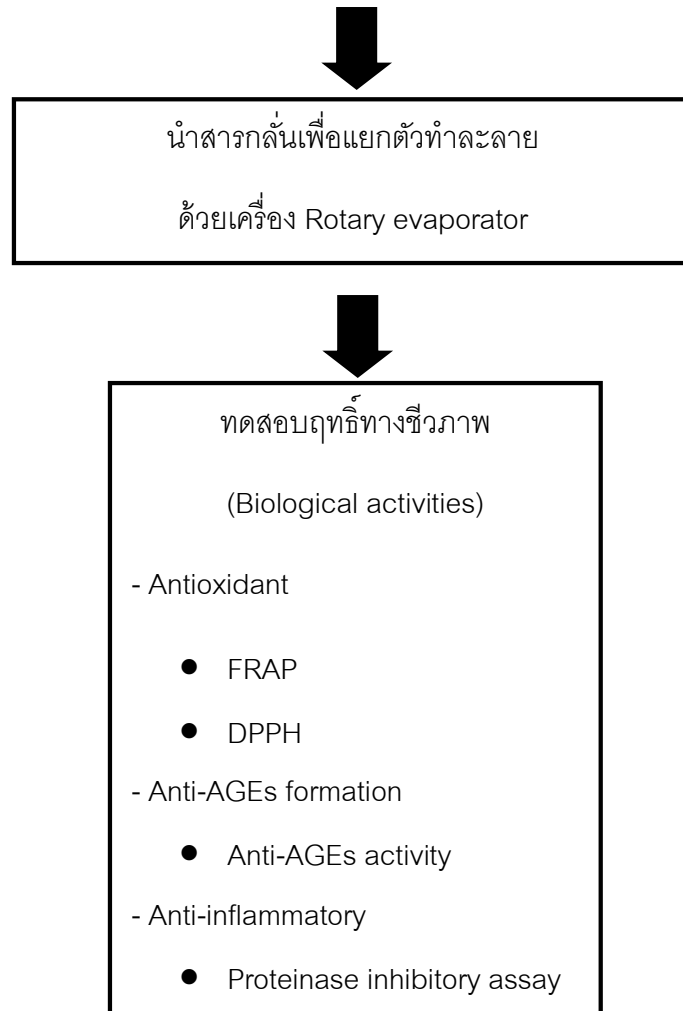
เหมาะสมในการรักษาในสมุนไพรชนิดนั้นๆด้วย และทำการคัดเลือกพืชสมุนไพร โดยกำหนดจากเกณฑ์คัด
เข้า และเกณฑ์คัดออกที่ได้ตั้งไว้ และพบว่ามียี่สิบจำนวนทั้งสิ้น 5 ชนิด ที่ผ่านเข้าเกณฑ์ในการทดสอบ ได้แก่
กระเทียม(12) ขมิ้น(9) ขันทองพยาบาท (8) ผักแว่น(10) และหญ้าหนวดแมว(11)

วัตถุประสงค์

เพื่อประเมินฤทธิ์ด้านการอักเสบของสมุนไพรที่มีอยู่ในภาคตะวันออกของประเทศไทยจากการสกัด
ด้วย Ethanol ทั้งแบบใช้ความร้อน (Soxhlet extraction) และไม่ใช้ความร้อน (Maceration)

กรอบแนวคิดการวิจัย





ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ค้นพบพืชสมุนไพรในภาคตะวันออกที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบและตรวจสอบกลไกที่เกี่ยวข้องเบื้องต้นเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ได้อย่างถูกต้องเหมาะสม

บทที่ 2

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

การประเมินฤทธิ์ด้านการอักเสบของสมุนไพรที่มีอยู่ในภาคตะวันออกของประเทศไทยจากการสกัดจะต้องมีการศึกษา ค้นคว้าข้อมูลที่เกี่ยวข้อง เพื่อนำมาใช้ประกอบเป็นข้อมูลในการดำเนินงานวิจัย ดังนี้

2.1 พืชที่จะนำมาทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ

จากการที่ทางคณะผู้จัดทำได้ทำการค้นคว้าหาข้อมูลเพื่อคัดเลือกสมุนไพรเข้ามาทำการทดลองนั้นมีสมุนไพรที่ผ่านเข้าตามเกณฑ์ที่จะนำมาทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ จำนวนทั้งสิ้น 5 ชนิดด้วยกัน ดังนี้

2.1.1 กระติง



ภาพที่ 1 กระติง (13)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Calophyllum inophyllum* L.

ชื่อพื้นเมือง กระติง กระติง กากะติง กากะติง (ภาคกลาง); ทิง (กระบี่); เนวกาน (น่าน); สารภีทะเล (ประจวบคีรีขันธ์); สารภีแนน (ภาคเหนือ)

วงศ์ Calophyllaceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ไม้ต้น โดยทั่วไปสูงไม่เกิน 15 เมตร ใบเรียงตรงข้าม รูปรีหรือรูปไข่กลับ ยาว 8-15 เซนติเมตร ปลายกลมหรือเว้าตื้น แผ่นใบหนา เส้นแขนงใบจำนวนมาก ก้านใบยาว 1-3 เซนติเมตร

สรรพคุณ

ใบมีรสเมาเย็น ช่วยแก้อาการตาแดง ตาฝ้า ตามัว และไข้ล้าตา โดยใช้ใบตำกับน้ำสะอาดล้างตา(14) ช่วยรักษาแผลสด ห้ามเลือด

Prasad J, et al. (2012)(35) ได้มีการทำการศึกษาพบว่าใบมีฤทธิ์ Antioxidants และฤทธิ์ Anti-dyslipidemia

Zakaria MB. et al. (2014)(12) มีการศึกษาในผล พบว่ามีฤทธิ์ Anti-inflammatory ผ่านกลไกการยับยั้ง Lipooxygenase และ Cyclooxygenase จากการทดลองพบว่าที่ขนาด 50-150 mg สารบางชนิดใน

กระทั้งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี และเมื่อสกัดด้วย CHCl_3 สารสกัดที่ได้ปริมาณ 50 $\mu\text{g/ml}$ มีฤทธิ์ยับยั้ง cyclooxygenase และ 5-lipoxygenase ได้ 77% และ 88% ตามลำดับเมื่อทดสอบแบบ in-vitro(12)

2.1.2 ข่อยดำ



ภาพที่ 2 ข่อยดำ (15)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Clerodendrum disparifolium*

ชื่อพื้นเมือง ตองชะแห้ง (กาญจนบุรี); ส้มพอ (เลย ร้อยเอ็ด); ชะโยเส (กะเหรี่ยงแม่ฮ่องสอน); กักไม้ฝอย (ภาคเหนือ)

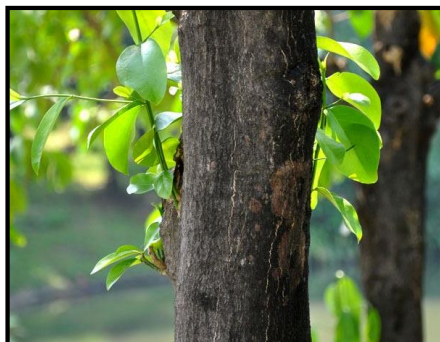
วงศ์ Labiatae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ลำต้นสีเทาอมน้ำตาล ใบประกอบ ขอบใบหยัก ดอกช่อแบบแตกแขนง ผลเดี่ยวค่อนข้างกลม ผลแก่สีแดงหรือสีดำ มี 5-6 เมล็ด (16)

สรรพคุณ แก้พิษสัตว์กัดต่อย พิษผึ้ง, ต่อ, แตน, มดคันไฟ, มดตะนอย, แมงมุม ฯลฯ วิธีใช้ ใช้ใบสดตำหรือขยี้ใส่แผล (15)

Phosrithong N. et al. (2016)(9)ได้ทำการศึกษาใบ พบว่ามีฤทธิ์ Anti-oxidant และ Anti-inflammatory โดยผ่านกลไกการยับยั้ง Lipoxygenase(9)

2.1.3 ชันทองพยาบาท



ภาพที่ 3 ชันทองพยาบาท (17)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Suregada multiflora* (A.Juss) Baill.

ชื่อพื้นเมือง สลัดน้ำ (จันทบุรี); มะดูกดง (ปราจีนบุรี); ดุดหิน (สระบุรี); ดูกไหล (นครราชสีมา)

วงศ์ Euphorbiaceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ไม้ยืนต้นขนาดกลาง สูง 7-13 เมตร ทรงพุ่มแน่นทึบ ลำต้นตรง กิ่งก้านอ่อน กิ่งห้อยลง กิ่งมีขนรูปดาว เปลือกต้นสีน้ำตาลแก่ ผิวบางเรียบ เนื้อไม้สีขาว ใบ เป็นใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปขอบขนานแกมรูปหอก กว้าง 3-8 เซนติเมตร ยาว 9-22 เซนติเมตร เนื้อใบหนาที่โคน หนียว หลังใบเรียบ ลื่นเป็นมัน ท้องใบเรียบสีอ่อนกว่า ฐานใบรูปหัวใจ

สรรพคุณ เปลือกต้น รสเมาเบื่อ แก้โรคตับพิการ แก้ปอดพิการ แก้ลมเป็นพิษ แก้โรคผิวหนัง แก้กลากเกลื้อน รักษา มะเร็ง รักษา มะเร็งคุด เป็นยาถ่าย เป็นยาระบาย เป็นยาบำรุงเหงือก แก้เหงือกอักเสบ ทำให้เหงือกแข็งแรง ทำให้ฟันทน

Tewtrakul S. et al. (2011) (8) ได้ทำการศึกษาพบว่าเปลือกต้นมีฤทธิ์ Anti-inflammatory ออกฤทธิ์โดยการต้าน Lipopolysaccharide (LPS) ที่เหนี่ยวนำการหลั่ง Nitric oxide (NO) และ Prostaglandin E2 (PGE2) โดยทดลองใน RAW264.7 cells (8)

2.1.4 ฝ้ายแดง (18)



ภาพที่ 4 ฝ้ายแดง (19)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Gossypium arboreum* L.

ชื่อพื้นเมือง -

วงศ์ Malvaceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นไม้พุ่ม ลำต้นสีน้ำตาลแดง ใบเดี่ยวเว้ามนสลับ รูปไข่ ขอบหยักลึก 3-7 แฉก ก้านใบและเส้นใบสีแดงคล้ำ

สรรพคุณ เปลือกราก บดเป็นผง ชงน้ำเดือดดื่มช่วยขับปัสสาวะ บิ่บมดลูก ช่วยขับน้ำคาวปลา ใบ ปูรงเป็นยารับประทานแก้ไข้ ขับเหงื่อ จำพวกยาเขียว

Annan K, et al. (2008)(10) ได้มีการทำการศึกษาในประเทศกานา โดยใช้ใบของฝ้ายแดง มาทำการสกัด เพื่อหาฤทธิ์ในการสมานแผล พบว่าสามารถกระตุ้นให้เกิดการซ่อมสร้างของเนื้อเยื่อของบาดแผลโดยจะมีผลต่อ fibroblast growth และมีฤทธิ์ป้องกันการต้านการเกิด Peroxide-induce oxidative damage ทำให้แผลหายเร็ว (10)

2.1.5 หญ้าน้ำค้าง



ภาพที่ 5 หญ้าน้ำค้าง (20)

ชื่อพฤกษศาสตร์ *Drosera indica* L.

ชื่อพื้นเมือง หยาดน้ำค้าง หนามเดือนห้า มะไฟเดือนห้า หญ้าของไฟ หมอกบว้าย

วงศ์ Droseraceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ พืชล้มลุก ขนาดเล็ก อายุปีเดียว เป็นพืชกินแมลง ลำต้นอ่อนทอดไปตามพื้นดิน ส่วนยอดชูตั้งขึ้น สูง 5-25 เซนติเมตร ต้นตรง ผิวลำต้นปกคลุมด้วยขนแบบมีต่อมขนาดเล็ก มีขนสีแดง มีเมือกเหนียวใส ใบ เป็นใบเดี่ยว ออกเรียงสลับ สีเขียวอ่อน เป็นเส้นยาวเรียว ค่อนข้างอวบ กว้าง 1-3 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 10-15 มิลลิเมตร มีขนยาวปกคลุมชัดเจนตลอดทั้งต้น ปลายใบแหลมรูปเส้นด้าย ใบแก่ปลายม้วนงอ ตอนปลายเป็นตุ่มใส ภายในมีน้ำเมือกเหนียวไว้ดักจับแมลง ใบรูปแถบ

สรรพคุณ ตำรายาไทยใช้ ทั้งต้น ต้มน้ำดื่ม บำรุงธาตุ ใบ ต้มน้ำดื่ม บำรุงหัวใจ ขับระดู ขับพยาธิ แก้ตับอักเสบ ใช้ภายนอกแก้กลากเกลื้อน

Asirvatham R. et al. (2013)(11) พบว่า หญ้าน้ำค้างมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีเมื่อทดสอบแบบ In-vitro โดยใช้วิธีทดสอบที่แตกต่างกัน และเมื่อทดสอบกับ cell พบว่า หญ้าน้ำค้างมีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งและยังคงมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี (11)

ตารางที่ 1 สรุปการศึกษารายงานฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพืชสมุนไพรที่สนใจทั้ง 5 ชนิด

ตัวอย่าง	ส่วนที่ใช้	ฤทธิ์/ประเภทการศึกษา		
		ด้านการอักเสบ	ต้านอนุมูลอิสระ	อื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง
กระทิง <i>Calophyllum inophyllum</i> . L.	ใบ	เซลล์เพาะเลี้ยง	เซลล์เพาะเลี้ยง	-
ช่อยดำ <i>Clerodendrum disparifolium</i>	ใบ	หลอดทดลอง	หลอดทดลอง	-
ชันทองพยับบาท <i>Suregada multiflora</i> (A.Juss) Baill.	เปลือก ต้น	เซลล์เพาะเลี้ยง	-	ต้านมะเร็ง
ฝ้ายแดง <i>Gossypium arboreum</i> L.	ใบ	-	-	ฝาดสมาน
หญ้าน้ำค้าง <i>Drosera indica</i> L.	ทั้ง ต้น , ใบ	หลอดทดลอง	เซลล์เพาะเลี้ยง	ต้านมะเร็ง

2.2 นิยามของการอักเสบ (Inflammation) (21)

การอักเสบ หมายถึง ปฏิกริยาการตอบสนองของร่างกายต่อสิ่งแปลกปลอมที่มากระตุ้นหรือทำลายเนื้อเยื่อให้เกิดความเสียหาย (Injury) หรือตายลง โดยลักษณะสำคัญที่สามารถสังเกตได้ 5 อย่างหลักๆ คือ อาการปวดบริเวณที่อักเสบ (pain), บริเวณที่อักเสบมีอุณหภูมิที่สูงขึ้น (heat), บวมบริเวณที่อักเสบ (swelling), บริเวณที่อักเสบมีลักษณะแดงขึ้น (redness) และมีการเสียหายที่การทำงานของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่เกิดการอักเสบ (loss of function)

2.3 สาเหตุที่ทำให้เกิดการอักเสบ (21)

แบ่งจากสิ่งกระตุ้นได้เป็น 2 ประเภทหลักๆ คือ

2.3.1 การอักเสบจากการติดเชื้อ (infections)

การอักเสบที่เกิดจากการติดเชื้อ เช่น เชื้อแบคทีเรีย (*S. aureus* , *E. coli* , etc.) , เชื้อราและ
ฟังไจ

2.3.2 การอักเสบที่ไม่ได้เกิดจากการติดเชื้อ (non-infections)

การอักเสบที่ไม่ได้เกิดจากการติดเชื้อ เช่น สารเคมี, สิ่งแปลกปลอมจากภายนอกร่างกาย, ปฏิกริยา
ทางภูมิคุ้มกัน, การตายของเนื้อเยื่อ, อันตรายจากการบาดเจ็บ (trauma) เป็นต้น

2.4 ประเภทของการอักเสบ

สามารถแบ่งจากระยะเวลาที่เกิดการอักเสบแบ่งได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่

2.4.1 การอักเสบแบบเฉียบพลัน (Acute inflammatory) (21)

มีอาการของการอักเสบในช่วงเวลาเป็นนาที ชั่วโมงหรือเป็นวัน สาเหตุที่ทำให้เกิดการอักเสบแบบ
เฉียบพลันมักจะมาจากสารเคมี อุบัติเหตุ หรือการติดเชื้อ เป็นต้น

ลักษณะเด่น : short duration, exudation of fluid & plasma proteins, emigration of
neutrophils, transudate, exudate, edema, หนอง (suppuration) เป็น exudate ที่มี neutrophil อยู่เป็น
จำนวนมาก (neutrophil-rich) ส่วนใหญ่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย (pyogenic bacteria) โดยการอักเสบ
แบบเฉียบพลันจะเกิดการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญ 3 อย่าง ได้แก่

- (1) การขยายตัวของหลอดเลือด ทำให้มีเลือดมาเลี้ยงเพิ่มขึ้น
- (2) การเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของหลอดเลือด ทำให้เซลล์และสารประกอบโปรตีนรั่วไหลออก
นอกหลอดเลือดได้
- (3) การเคลื่อนตัวของเม็ดเลือดขาวออกจากหลอดเลือด เข้าสู่เนื้อเยื่อที่เกิดภัยอันตราย

ผลลัพธ์ของการอักเสบเฉียบพลัน

ก. การคืนสภาพปกติอย่างสมบูรณ์ (complete resolution)

เมื่อปฏิกิริยาการอักเสบสามารถกำจัดสิ่งที่เป็นสาเหตุของภยันตรายต่อเนื้อเยื่อ โดยที่เนื้อเยื่อไม่ได้ถูกทำลายไปมากนัก เม็ดเลือดขาวมาเก็บกินเซลล์ตายและสิ่งแปลกปลอมได้หมด การสร้าง mediator ก็หยุดลง หลอดเลือดกลับคืนสู่ สภาพปกติ ของเหลวที่รั่วออกมาในเนื้อเยื่อที่บวมถูกดูดซึมกลับคืน เมื่อการอักเสบสิ้นสุดลง เนื้อเยื่อสามารถ กลับคืนสู่สภาพปกติ

ข. การสร้างพังผืด (fibrosis)

เป็นการสมาน (healing) ด้วย connective tissue หรือเนื้อเยื่อพังผืด (fibrous tissue) เกิดขึ้นเมื่อเนื้อเยื่อถูกทำลายเป็นอย่างมาก หรือเซลล์เนื้อเยื่อนั้นไม่สามารถงอกใหม่ได้ จึงเกิด fibrous tissue ขึ้นแทนที่ หรือ ในกรณีที่ exudate ที่เกิดขึ้นประกอบด้วย fibrin จำนวนมากจนร่างกายไม่สามารถทำลายหรือดูดซึมได้หมดจะเกิด fibrous tissue ขึ้นแทนที่เรียกว่า organization (คำ“organization”อาจมีการใช้ในความหมายอื่นเกี่ยวกับ fibrosis/repair ได้ด้วย)

ค. การเป็นฝี (abscess formation)

ง. การอักเสบดำเนินต่อไปเป็นการอักเสบเรื้อรัง

2.4.2 การอักเสบแบบเรื้อรัง (Chronic inflammatory) (21)

มีอาการของการอักเสบในช่วงเวลาหลายสัปดาห์ หลายเดือนหรือหลายปี โดยยังคงมีการอักเสบดำเนินอยู่ (active inflammation) ร่วมกับการทำลายเนื้อเยื่อ (tissue destruction) และการสมาน (healing) ดำเนินไปพร้อมๆกัน สาเหตุที่ทำให้เกิดการอักเสบแบบเรื้อรังมักจะมาจากการติดเชื้อที่รักษาไม่หาย, การได้รับบาดเจ็บต่อเนื้อเยื่อเป็นเวลานานและโรคทางภูมิคุ้มกันต้านทานตนเอง เป็นต้น

การเปลี่ยนแปลงที่สำคัญในการอักเสบแบบเรื้อรัง ได้แก่

- (1) การแทรก (infiltration) ของเซลล์ก่อการอักเสบชนิด mononuclear ได้แก่ macrophage lymphocyte และ plasma cell

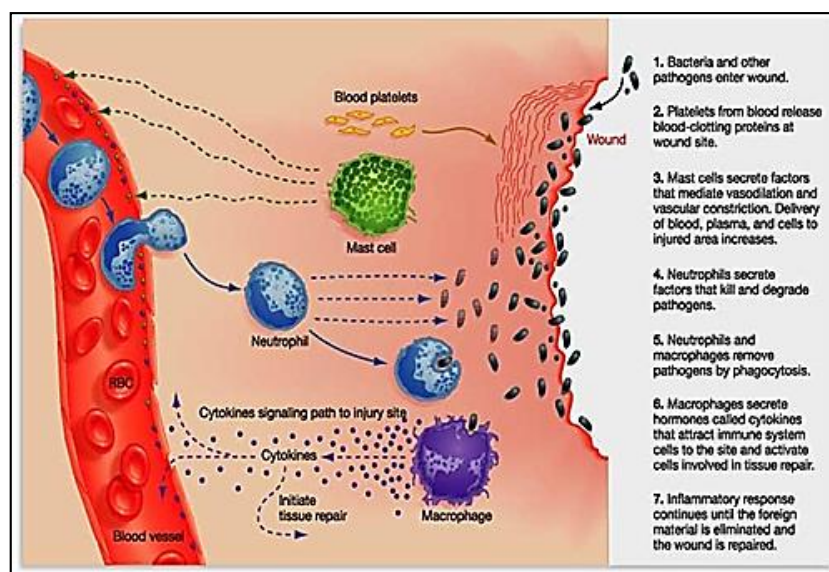
(2) การทำลายของเนื้อเยื่อ (tissue destruction)

(3) การซ่อมแซม โดยการสร้างพังผืด หรือ connective tissue (fibrosis) มาแทนที่

การอักเสบที่เกิดขึ้นทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรังจะมีอาการในหลายระบบของร่างกายหรืออวัยวะที่เกิดการอักเสบ เรียกกลุ่มอาการที่เกิดขึ้นว่า acute phase reaction โดยอาศัย mediator กลุ่ม cytokine ที่สำคัญ ได้แก่ IL-1 IL-6 และ TNF- α ในการเกิดอาการดังกล่าว นอกจากอาการที่สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่าซึ่งกล่าวไปในข้างต้นแล้ว ยังมีอาการที่สามารถตรวจวัดได้อีก อันประกอบด้วย

- อาการไข้ ซึ่งอาจพบร่วมกับอาการหนาวสั่น
- อาการง่วงนอนโดยมีการเพิ่มขึ้นของ slow-wave sleep
- อาการเบื่ออาหาร (decreased appetite)
- ความดันโลหิตลดต่ำ
- การย่อยสลายโปรตีนในร่างกายเพิ่มขึ้น
- การสร้างสาร acute phase protein จากตับ เช่น C-reactive protein serum amyloid A complement coagulation protein เป็นต้น

2.5 จากการอักเสบทั้ง 2 ประเภทที่กล่าวมาข้างต้นนั้นมีกกลไกที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบดังนี้



รูปที่ 6 แสดงกลไกการเกิดการอักเสบ (22)

2.5.1 Bacteria หรือ Pathogen อื่นๆเข้าสู่บาดแผล

2.5.2 เกิดเลือดแข็ง Blood-Clotting Proteins ที่บริเวณบาดแผล

2.5.3 Mast cell หลั่งสารที่ทำให้หลอดเลือดขยายตัวและหดตัว มีการขนส่งเลือด, เม็ดเลือด, เซลล์
ไป ยังบริเวณที่มีการอักเสบ

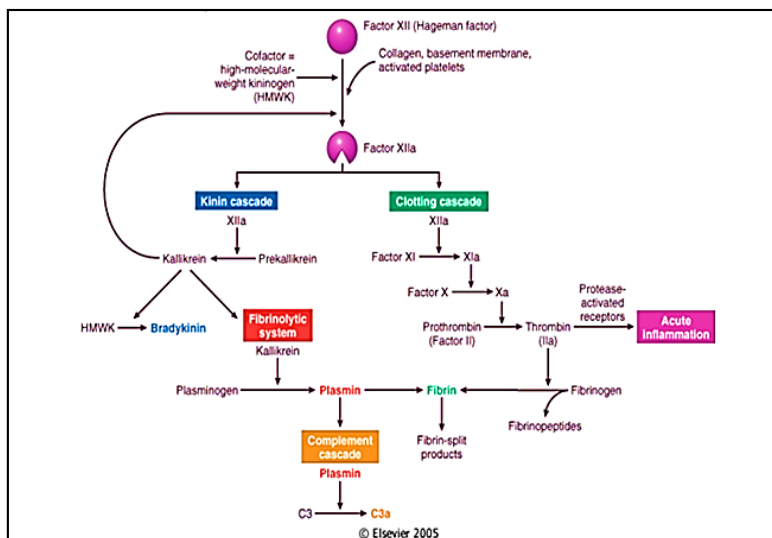
2.5.4 Neutrophils หลั่งสารที่ทำลาย Pathogen

2.5.5 Neutrophils และ Macrophages กำจัด Pathogen โดยวิธี Phagocytosis

2.5.6 Macrophage หลั่ง Cytokines ซึ่งจะไม่มีผลต่อ Immune System cell และรวมถึงไป
กระตุ้นการซ่อมแซมเนื้อเยื่อด้วย

2.5.7 การตอบสนองต่อการอักเสบจะดำเนินต่อไปจนกว่าสิ่งแปลกปลอมจะถูกกำจัดและบาดแผล
มีการ ดีขึ้น

จากกลไกที่ได้กล่าวมาในข้างต้นแล้วในกระบวนการอักเสบจะมีการหลั่งสาร cytokine ต่างๆ
ออกมาดังที่จะกล่าวต่อไปในด้านล่างนี้



รูปที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ของสารกลุ่ม complement, kinin, clotting และ fibrinolytic system

ในกระบวนการอักเสบ (23)

2.6. Mediators ตัวแรกที่หลั่งออกมาคือ : Clotting system (23)

สารที่สำคัญในกลุ่มนี้ คือ thrombin และ fibrin โดย fibrin มีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการแข็งตัวของเลือด ส่วนสารที่มีบทบาทในกระบวนการอักเสบคือ thrombin โดย thrombin จะจับกับ protease-activated receptors (PARs) ซึ่งพบในเซลล์หลายๆ ชนิด เช่น เกล็ดเลือด เซลล์เยื่อเมือกหลอดเลือด เซลล์กล้ามเนื้อ เป็นต้น การจับกันของ thrombin และ receptor ดังกล่าวทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ คือ กระตุ้นให้เกิดการสร้าง P-selectin, chemokines, integrins, PAF, nitric oxide และกระตุ้นเอนไซม์ cyclooxygenase-2 ทำให้เกิดการสร้าง prostaglandins

ในขณะที่มีกระบวนการสร้าง fibrin จะเกิดกระบวนการสลาย fibrin (fibrinolytic system) เช่นกัน เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการสร้างลิ่มเลือด (clot) มากเกินไป โดยเซลล์เยื่อเมือกหลอดเลือด หรือเซลล์เม็ดเลือดขาวจะหลั่ง plasminogen activator ทำหน้าที่สลาย plasminogen ที่พบอยู่ในลิ่มเลือดเกิดเป็น plasmin ทำหน้าที่สลายลิ่มเลือด และยังสามารถกระตุ้น complement protein C3 นอกจากนี้ยังสามารถกลับไปกระตุ้นกระบวนการสร้าง clotting factors เกิดเป็น thrombin และ fibrin ได้อีกด้วย เรียกกระบวนการนี้ว่า positive feedback ซึ่ง thrombin ที่เกิดจากกระบวนการในข้างต้นนั้นสามารถจับกับ PARs receptor ได้ส่งผลทำให้เกิดการสร้าง P-selectin, chemokines, integrins, PAF, nitric oxide และกระตุ้นเอนไซม์ cyclooxygenase-2

2.6.1 P-selectin

เป็น adhesion molecule (Adhesion คือการที่เซลล์เม็ดเลือดขาวจับกับเซลล์เยื่อเมือกหลอดเลือดแน่นขึ้น เป็นหนึ่งในกระบวนการที่ทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวเคลื่อนไปสู่บริเวณที่มีการบาดเจ็บ) ซึ่ง P-selectin พบบนผิวเซลล์เยื่อเมือกหลอดเลือดและเกล็ดเลือด

2.6.2 Chemokines

เป็นสารที่ชักนำให้เซลล์เข้ามาในบริเวณที่มีการหลั่งสารดังกล่าว (chemo attractant) แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม คือ

(1) CXC chemokines

ตัวอย่างของสารกลุ่มนี้ คือ interleukin-8 ซึ่งถูกหลั่งมาจาก macrophages เซลล์เยื่อเมือกหลอดเลือด สารหรือภาวะที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการหลั่ง IL-8 คือ TNF, IL-1 และสารที่พบในเชื้อโรค IL-8 จะมีผลทำให้เกิดกระบวนการ activation และ chemotaxis ในเซลล์ neutrophils

(2) CC chemokines

ตัวอย่างเช่น monocyte chemoattractant protein (MCP-1), eotaxin, macrophage inflammatory protein-1H (MIP-1H) และ RANTES (regulate and normal T cell expressed and

secreted) ทำหน้าที่เป็น chemoattractant ต่อเซลล์ monocytes, eosinophils, basophils และ lymphocytes

(3) C chemokines

เช่น lymphotoxin ทำหน้าที่ชักนำเซลล์ lymphocytes

(4) CX₃C chemokines

ได้แก่ fractalkine ทำหน้าที่ชักนำเซลล์ monocytes และ lymphocytes

2.6.3 Integrins

เป็น adhesion molecule พบในเซลล์หลายๆ ชนิด ทำหน้าที่จับกับ integrin ligand (ICAM-1, VCAM-1) ซึ่งอยู่บนเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือด เซลล์เม็ดเลือดขาว และ extracellular matrix

2.6.4 PAF (Platelet-activating factors)

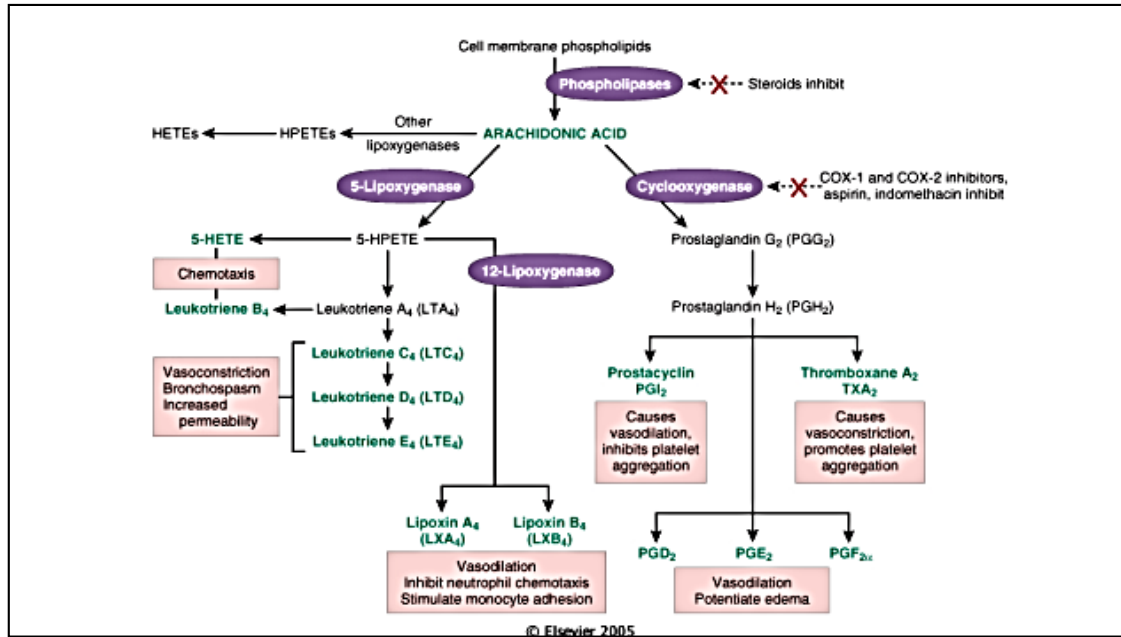
เป็นสารที่เปลี่ยนแปลงมาจาก phospholipid เช่นเดียวกับกลุ่ม arachidonic acid มีผลทำให้หลอดเลือดหดตัวและหลอดลมหดเกร็ง (bronchoconstriction) แต่หากถูกหลั่งในปริมาณที่น้อยจะทำให้หลอดเลือดขยายตัวและ permeability ของหลอดเลือดสูงขึ้น นอกจากนี้ PAF ยังกระตุ้นกระบวนการ leukocyte adhesion, chemotaxis ส่งเสริมกระบวนการ phagocytosis และส่งเสริมให้เกิดการสร้าง chemical mediators ชนิดอื่นๆ อีกด้วย PAF ถูกสร้างได้จากเซลล์หลายชนิด เช่น เกล็ดเลือด basophils, mast cells, neutrophils, macrophages และเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือด

2.6.5 Nitric Oxide

ถูกสร้างจากเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือด เซลล์ macrophages มีหน้าที่สำคัญในการทำให้หลอดเลือดขยายตัว และมีหน้าที่ในการต่อต้านกระบวนการอักเสบ เพื่อป้องกันการเกิดการอักเสบที่มากเกินไป นอกจากนี้ยังพบว่า NO มีบทบาทในการทำลายเชื้อแบคทีเรียได้ด้วย

2.6.6 Cyclooxygenase-2

เป็นเอนไซม์ที่ใช้เปลี่ยน Arachidonic acid (AA) ไปเป็น prostaglandins และ thromboxanes โดยอาจเรียกสารกลุ่มที่เปลี่ยนแปลงมาจาก arachidonic acid ทั้งหมดนี้ว่า eicosanoids สารกลุ่มนี้มีบทบาทสำคัญในเกือบทุกขั้นตอนของกระบวนการอักเสบ การเปลี่ยนแปลงของ arachidonic acid โดยเอนไซม์ cyclooxygenases จะทำให้ได้ prostaglandins(PG)หลายชนิด ตัวที่มีความสำคัญในกระบวนการอักเสบคือ PGE₂, PGD₂, PGF₂H, PGI₂ (prostacyclin) และ TXA₂ (thromboxane) สารที่มีบทบาทสำคัญที่ทำให้เกิดอาการเจ็บปวดและมีใช้ในการอักเสบ คือ PGE₂ เนื่องจากทำให้ผิวหนังตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นได้ง่ายกว่าปกติ ส่วนสารที่ทำให้เนื้อเยื่อเกิดการบวม คือ PGE₂, PGD₂ และ PGF₂H เนื่องจากสารดังกล่าวทำให้หลอดเลือดขยายตัวและ permeability ของหลอดเลือดสูงขึ้น



รูปที่ 8 แสดงการสร้างสารต่างๆ รวมถึงหน้าที่ในกระบวนการอักเสบ (24)

2.7 กลไกการอักเสบผ่าน Cytokine

2.7.1 Mast Cell

Mast Cell หลั่ง Histamine ซึ่งเป็นสารตัวแรกที่มีการหลั่งออกมาในกระบวนการอักเสบ Histamine จะจับกับ H₁ receptor บนเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด มีผลทำให้หลอดเลือด arteriole ขยายตัว และทำให้ vascular permeability ของหลอดเลือด venule เพิ่มขึ้น

2.7.2 Neutrophils

Neutrophil มี granule ที่สำคัญ 2 ชนิดได้แก่

(1) Specific (secondary) granule

สารสำคัญที่บรรจุอยู่ได้แก่ lysozyme Type IV collagenase Plasminogen activator Leukocyte adhesion molecules Phospholipase A₂ เป็นต้น

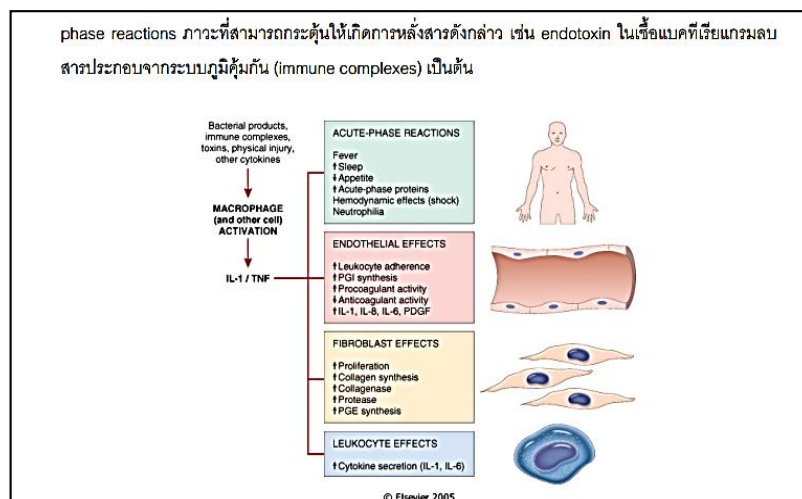
(2) large azurophil (primary) granule

สารสำคัญที่บรรจุอยู่ได้แก่ myeloperoxidase (MPO) Bactericidal factors (lysozyme) Acid hydrolase และ protease ชนิดต่างๆ เป็นต้น

สารที่บรรจุใน lysosome (lysosomal content) มีฤทธิ์มากมายในการกระตุ้นและผลขยายการเพิ่ม การซึมผ่านของหลอดเลือด และ chemotaxis เอนไซม์ในกลุ่ม protease จะทำลายแบคทีเรียและเศษเซลล์ ใน phagolysosome และหากรั่วไหลออกไปนอกเซลล์ ยังสามารถทำลายเนื้อเยื่อส่วนที่เป็น extracellular component อันได้แก่ collagen basement membrane elastic fiber กระดูกอ่อน เป็นต้น เมื่อเนื้อเยื่อที่ ตายผสมกับเม็ดเลือดขาวจึงเกิดเป็นหนอง หากเนื้อเยื่อถูกทำลายจากการอักเสบอย่างรุนแรง อาจทำให้เกิด ความพิการของอวัยวะ ร่างกายมีการสร้างสารต้านฤทธิ์เอนไซม์ ได้แก่ สารกลุ่ม antiprotease ซึ่งพบ อยู่ในซีรัม และของเหลวในเนื้อเยื่อ สารที่สำคัญในกลุ่มนี้ ได้แก่ alpha 1-antitrypsin และ alpha 2-macroglobulin เป็นต้น alpha 1-antitrypsin เป็นสารต้านฤทธิ์ที่สำคัญของ neutrophilic elastase ในผู้ป่วยที่มีภาวะขาดเอนไซม์ชนิดนี้ จะเกิดโรคเนื่องจากการทำลายเนื้อเยื่อโดยเอนไซม์ในกลุ่ม protease

2.7.3 Macrophage

Macrophage หลั่ง Hormones ที่ชื่อว่า Cytokine ซึ่งเป็นสารที่สร้างได้จากเซลล์หลายๆ ชนิด ส่วน ใหญ่จะทำหน้าที่กระตุ้น lymphocytes และ macrophages สารที่มีบทบาทในกระบวนการอักเสบ เฉียบพลัน คือ Tumor necrotic factor (TNF) และ interleukin-1 (IL-1) ซึ่งถูกสร้างมาจากเซลล์ macrophages มีบทบาทในการกระตุ้นเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด เซลล์เม็ดเลือดขาว และเซลล์ fibroblasts ทำให้เกิด acute phase reactions ภาวะที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการหลั่งสารดังกล่าว เช่น endotoxin ในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ สารประกอบจากระบบภูมิคุ้มกัน (immune complexes) เป็นต้น

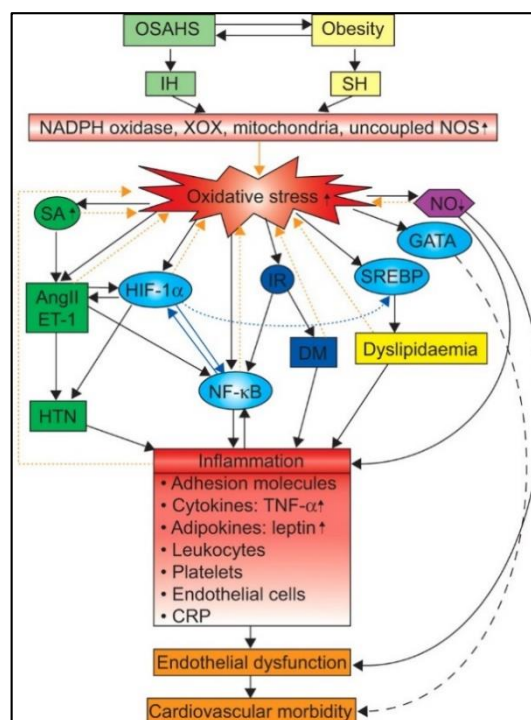


รูปที่ 9 แสดงผลของ TNF และ IL-1 ต่อการเกิด acute phase reaction (24)

2.8. กลไกการอักเสบผ่าน Oxidative Stress (25, 26)

ภาวะเครียดที่เกิดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) เกิดจากความไม่สมดุลระหว่างอนุมูลอิสระกับระบบต้านออกซิเดชันในร่างกาย ส่งผลให้ดีเอ็นเอโปรตีน ไขมัน ถูกทำลายโดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน

อนุมูลอิสระ (free radical) หมายถึง สารหรือโมเลกุลใดๆ ที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (unpaired electron) ที่ชั้นนอกสุดทำให้มีความไวต่อการทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นๆ อนุมูลอิสระแบ่งออกเป็นหลายประเภท ได้แก่ รีแอคทีฟออกซิเจนสปีชีส์ (Reactive Oxygen Species หรือ ROS) เช่น Superoxide Radical, Hydroxyl Radical, Singlet Oxygen บางครั้งอาจไม่จัดให้ Singlet Oxygen เป็นอนุมูลอิสระ แต่โดยคุณสมบัติแล้ว Singlet Oxygen ก็สามารถทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ได้ การเกิด ROS สามารถเพิ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบหลายชนิดผ่านทางกลไกการกระตุ้น nuclear factor-kappaB (NF- κ B) ซึ่งเป็น transcription factor ของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันและการอักเสบ

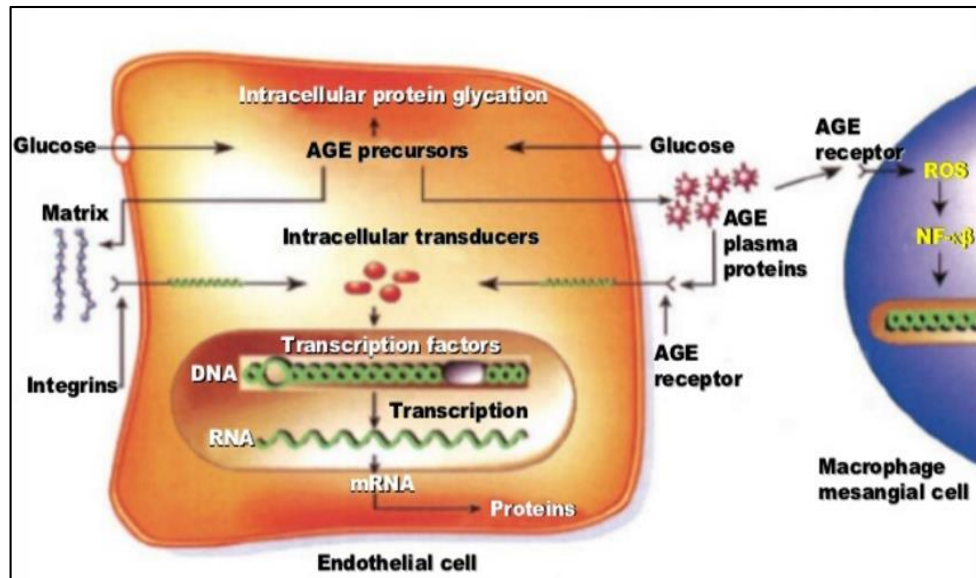


รูปที่ 10 แสดงกลไกการอักเสบผ่าน oxidative stress (27)

2.9. กลไกการอักเสบผ่าน Advanced Glycation End Products (AGEs) (28)

AGEs คือการสะสมของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาไกลเคชัน ทำให้มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้น โดย AGEs มีคุณสมบัติทางเคมีและทางชีวภาพที่เป็นอันตรายต่อเซลล์หลายชนิด ซึ่ง AGEs สามารถแพร่ออกจาก

เซลล์และเปลี่ยนแปลงโปรตีนในเลือด (circulating protein) เช่น อัลบูมิน (albumin) จนสามารถจับกับ RAGE ที่พื้นผิวของเซลล์ และกระตุ้นการสร้างสารก่อการอักเสบ (inflammatory cytokines) และสารกระตุ้นการเจริญ (growth factor) ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดพยาธิวิทยาของระบบหลอดเลือด (vascular pathology)



รูปที่ 11 แสดงกลไกการอักเสบผ่าน AGEs (29)

2.10. วิธีการตรวจวัดการอักเสบ

มีการตรวจวัดหรือทดลองในหลายระดับ ได้แก่ *In vitro* study ที่เป็นการตรวจวัดในหลอดทดลอง cell culture ที่ศึกษาการตอบสนองและสารที่หลั่งจากเซลล์ภูมิคุ้มกัน *In vivo* study ที่ศึกษาโดยใช้การกระตุ้นการอักเสบในสัตว์ทดลอง และการตรวจวัดการอักเสบที่เกิดขึ้นในร่างกายผู้ป่วย

การตรวจวัดสามารถทำได้ทั้งโดยวิธีทางตรงและทางอ้อม นอกจากการวัดการอักเสบโดยตรงแล้วยังสามารถวัดจากการตรวจฤทธิ์การต้าน Oxidative stress และฤทธิ์ในการต้าน AGEs forming ได้ เนื่องจากเป็น path way ที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบได้เช่นเดียวกัน

2.10.1 วิธีการตรวจวัดการอักเสบทางตรง ได้แก่

(1) วิธีตรวจวัดการอักเสบทางคลินิก

โดยส่วนใหญ่จะใช้ Inflammatory Marker หรือวัดจากตัวชี้วัดการอักเสบในเลือด ซึ่งมีด้วยกันหลายชนิด ตัวอย่างเช่น

ก. ESR (Erythrocyte sedimentation rate) (30)

เมื่อร่างกายเกิดการอักเสบ ตับจะสร้างโปรตีนชนิดหนึ่งออกมาในเลือด ซึ่งจะเป็นผลทำให้เม็ดเลือดแดง มีการเกาะติดกันได้ง่ายขึ้น หากเราทำการเจาะเลือดในผู้ป่วยที่ร่างกายเกิดการอักเสบ นำมาใส่ลงใน หลอดทดลองที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด และตั้งทิ้งไว้สักครู่ จะมีการแยกส่วนกันของชั้นเลือดและน้ำเหลือง เนื่องจากสารประกอบจำพวกโปรตีนที่มีการหลั่งออกมาทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะติดกัน และตกตะกอนลงไปในตอนอยู่ที่ก้นหลอด

นิยามของค่า ESR ก็คือ ระยะทางในหน่วยมิลลิเมตร ที่เม็ดเลือดแดงตกตะกอนลงมาอยู่ที่ก้นหลอดแก้ว ในเวลา 1 ชม. ยิ่งมีค่าสูง ก็เท่ากับว่ามีการอักเสบมาก จึงมีการใช้ค่านี้เพื่อวัดการเปลี่ยนแปลงในเลือด โดยเฉพาะในชั้นพลาสมา หากมีสารบางอย่าง เช่น Fibrinogen, Acute phase reactant อื่น ๆ (ซึ่งรวมไปถึง Immunoglobulin ด้วย) หากเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ก็จะทำให้เลือดตกตะกอนได้เร็วยิ่งขึ้น ซึ่งสารพวกนี้เป็นสิ่งที่เกิดขึ้นมาจากกระบวนการอักเสบ

จึงมีการใช้ค่า ESR วัดภาวะต่างๆ ที่ก่อให้เกิดการอักเสบอย่างคร่าวๆ โดยแพทย์จะนิยมใช้ค่า ESR ในการติดตามผลการรักษา ว่ามีการตอบสนองต่อการรักษาที่ดีขึ้นหรือไม่ แต่อย่างไรก็ตาม ค่า ESR จะเป็นค่าที่มีการแปรผันมาก โดยค่าจะเปลี่ยนแปลงไปตามอายุ เพศ ยาที่ใช้ และโรคประจำตัว

ข. CRP (C-Reactive Protein) (30)

เป็นโปรตีนที่ตอบสนองในระยะเฉียบพลัน (acute phase reactant protein) ชนิดหนึ่ง ถูกสร้างขึ้นมาจากเซลล์ตับ โดย CRP จะถูกสร้างขึ้นเมื่อร่างกายมีภาวะการอักเสบ หรือเกิดการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ ซึ่งจะคล้ายกับการตรวจอัตราการทำงานของเม็ดเลือดแดงหรือฮีโมโกลิน ESR โดยค่า CRP จะเพิ่มอย่างรวดเร็วภายใน 6 – 10 ชั่วโมง และจะเพิ่มขึ้นสูงสุดใน 24 – 72 ชั่วโมง และลดกลับมาสู่ระดับปกติใน 1 – 2 สัปดาห์

การตรวจ CRP มีข้อดีกว่า ESR คือ CRP จะให้ผลบวกก่อน ESR และผลกลับมาปกติขณะที่ ESR ยังสูงอยู่ และไม่เปลี่ยนแปลงในภาวะซีด (Anemia) ระดับโกลบูลินในเลือดสูง (hyperglobulinemia) การตั้งครรภ์ และไม่มี ความแตกต่างระหว่างเพศชายและหญิง ขณะที่ ESR เปลี่ยนแปลงในภาวะดังกล่าว ซึ่งวิธีเดิมที่ใช้กันโดยทั่วไปในห้อง LAB จะวัดค่า serum CRP ได้ในช่วง 10-1000mg/L แต่ในปัจจุบันมีการ

พัฒนาการวัดแบบความไวสูง หรือที่เรียกว่า hs-CRP (high sensitivity CRP) โดยมีค่า CRP ต่ำสุดที่สุดได้เท่ากับ 0.3mg/L โดยส่วนใหญ่จะใช้ติดตามโรคในกลุ่มรุมมาตอยด์และลูปัส

โดยค่า CRP ที่อยู่ในช่วงปกติ จะมีค่าน้อยกว่า 10 มิลลิกรัม/ลิตร หากมีการติดเชื้อไวรัส ค่าจะอยู่ในช่วง 10-20 มิลลิกรัม/ลิตร ส่วนการติดเชื้อแบคทีเรีย จะมีค่า 40-200 มิลลิกรัม/ลิตร และหากมีการติดเชื้อรุนแรงรวมถึงการถูกไฟไหม้ จะมีค่ามากกว่า 200 มิลลิกรัม/ลิตร ขึ้นไป และค่าจะเพิ่มขึ้นหลังจากการอักเสบเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และมีค่าสูงสุด หลังเกิดการอักเสบใน 48 ชั่วโมง

ค. สารในกลุ่ม Interleukin (30)

ตัวอย่างเช่น

(ก.) Interleukin-6 สารตัวนี้หลั่งออกมาจากเม็ดเลือดขาว เป็นการตอบสนองต่อภาวะการอักเสบเฉียบพลันของระหว่างสารตัวนี้สูงกับโรคหลายโรค เช่น เบาหวาน เส้นเลือดตีบแข็ง ซึมเศร้า อัลไซเมอร์ โรคภูมิแพ้ตัวเอง รุมมาตอยด์ โรคมะเร็ง เนื่องจากเราพบสารนี้สูงในภาวะที่มะเร็งลุกลามมากและกำลังกระจาย

(ข.) Lp-PLA2 เป็นโมเลกุลที่มีความจำเพาะมากขึ้น ต่อภาวะการอักเสบของหลอดเลือด สร้างออกมาจากเม็ดเลือดขาวที่บริเวณเส้นเลือดที่อักเสบ โดยถือเป็นตัวชี้วัดแรกสำหรับวินิจฉัยภาวะหลอดเลือดไม่เสถียร ซึ่งมีการอักเสบเกิดขึ้นตลอดเวลา ช่วยประเมินความเสี่ยงและโอกาสที่จะเกิดหัวใจขาดเลือดได้

(2) วิธีการตรวจวัดการยับยั้งการอักเสบในการทดลองทางห้องปฏิบัติการ

(ก) Anti-denaturation activity

เตรียมสารละลาย BSA 0.2% W/V จาก Tris buffer และ ปรับ PH เป็น 6.8 โดยใช้ glacial acetic acid ส่วน Stock Solution ของสารสกัดจากพืชทั้งหมดใช้ methanol เป็นตัวทำละลาย จากนั้นนำ stock solution มาทำให้มีความเข้มข้นที่แตกต่างกัน 7 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 และ 500 ug/ml จากการเตรียมโดย methanol เป็นตัวทำละลาย จากนั้นนำสารสกัดแต่ละชนิดมา 150 ul ใส่ลงหลอดทดลอง แล้วเติม 0.2% W/V BSA ปริมาณ 2,850 ul ลงไปในหลอดทดลองทุกหลอด โดยมีหลอดที่เป็น control จะประกอบด้วย 0.2% W/V BSA ปริมาณ 2,850 ul และ 150 ul methanol เตรียมสารละลายมาตรฐานโดยเติม 5 mg/ml Diclofenac Sodium ใน methanol ใน 0.2% W/V BSA ปริมาณ 2,850 ul แล้วนำหลอดทดลองทุกหลอดไป incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นให้ความร้อนที่ 72

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที สุดท้ายทำให้เย็นลงอีกเป็นเวลา 20 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงโดย UV/Vis Double beam spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 660 nm และแปลผล % การยับยั้งการตกตะกอน (โปรตีนที่เสื่อมสภาพ) จะถูกกำหนดโดย % basis relative ของตัวควบคุม

เมื่อ BSA ถูกให้ความร้อนที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทำให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพ ซึ่งหลอดทดลองจะมีลักษณะที่ขุ่นขึ้น ดังนั้นหากสารสกัดที่สนใจมีฤทธิ์ในการต้านการเสียสภาพของ โปรตีน BSA จะทำให้เกิดการขุ่นในหลอดทดลองลดลงโดยสามารถวัดผลดังกล่าวโดยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer โดยหากความขุ่นในหลอดทดลองลดลงจะทำให้ค่าดูดกลืนแสงลดลงตามไปด้วย

(ข) Anti-lipoxygenase activity

เป็น *In vitro* anti-inflammatory assay การต้านการทำงานของ lipoxygenase ศึกษาโดย กำหนดให้ linoleic acid เป็น substrate และ lipoxidase เป็นเอนไซม์ ทดลองโดยนำสารละลายตัวอย่าง มา 0.25 ml ละลายใน 2 M pH 9.0 borate buffer ปริมาณ 0.25 ml (20,000U/ml) แล้ว incubate นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเติมสารละลาย linoleic acid (0.6 mM) แล้วผสมให้เข้า กันดีจึงนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 234 nm การทดลองนี้ใช้ indomethacin เป็นสารมาตรฐาน

การคำนวณร้อยละการยับยั้ง

$$\% \text{ inhibition} = \frac{[\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}}]}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100$$

(ค) PGE2 ที่สร้างขึ้นจากเซลล์ macrophage ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร LPS วัดปริมาณโดยใช้ PGE2 assay kit หลังจากนั้นนำเซลล์ macrophage ไปสกัดเพื่อหาปริมาณ total RNA และตรวจสอบการ แสดงออกของยีน iNOS และ COX-2 ด้วยขั้นตอนดังต่อไปนี้

ข. การสกัด total RNA

ทำการสกัดด้วย TRIZOL® Reagent จำนวน 1 มิลลิลิตร นำ total RNA ที่ได้ไปวัดความเข้มข้น โดยใช้เครื่องมือ UV spectrophotometer

ค. การสร้างสาย Complementary DNA (cDNA)

นำส่วนประกอบต่างๆใส่ลงใน microcentrifuge tube ได้แก่ total RNA จำนวน 5 ไมโครกรัม, 50 ไมโครโมลาร์ oligo (dT)20 1 ไมโครลิตร, 10 มิลลิโมลาร์ dNTP Mix 1 ไมโครลิตร และ DNase free water 13 ไมโครลิตร และนำส่วนผสมที่ได้ไปผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 5 นาทีจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง (2,000×g) ที่อุณหภูมิ 2-8 °C เป็นเวลา 3 นาทีแล้วเติมส่วนประกอบต่างๆ คือ 5x First-Strand Buffer 4 ไมโครลิตร, 0.1 โมลาร์ DTT 1 ไมโครลิตร, RNaseOUT™ 1 ไมโครลิตร และ SuperScript™ III RT (200 ยูนิต/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 30-60 นาทีหลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 15 นาที

ง. การทำเทคนิค Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

นำสาย single strand cDNA ที่สร้างได้เพื่อใช้เป็น DNA ต้นแบบสำหรับการทดลอง PCR โดยเตรียม reaction mixture สำหรับปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ประกอบด้วย cDNA single strand 1 ไมโครลิตร, 10x Taq PCR buffer 3 ไมโครลิตร, 2.5 ไมโครโมลาร์ dNTPs mix 2 ไมโครลิตร, Taq polymerase 1 ไมโครลิตร, Nuclease-free distilled water 20 ไมโครลิตร. iNOS primer sequences คือ 5' - AAT GGC AAC ATC AGG TCG GCC ATC ACT-3' (sense) และ 5' -GCT GTG TGT CAC AGA AGT CTC GAA CTC-3' (anti-sense) สำหรับ COX-2 primer sequences คือ 5' -GGA GAG ACT ATC AAG ATA GT-3' (sense) และ 5' - ATG GTC AGT AGA CTT TTA CA-3' (anti-sense) และ internal control สำหรับการทดลองนี้คือ GAPDH primer sequences คือ 5' - TCC CTC AAG ATT GTC AGC AA-3' (sense) และ 5' - AGA TCC ACA ACG GAT ACA TT-3' นำหลอด PCR ใส่ลงใน thermal cycler ที่ตั้งโปรแกรมไว้ดังนี้ คือ denaturation ใช้อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที , annealing ใช้อุณหภูมิ 60 °C (iNOS และ COX-2) สำหรับ GAPDH ใช้อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 30 วินาทีและ extension ใช้อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 30 วินาทีจำนวน 40 รอบ หลังเสร็จสิ้นปฏิกิริยา PCR จึงนำสารละลาย DNA ที่ได้ไปตรวจสอบปริมาณ DNA ในขั้นตอน agarose gel electrophoresis โดย PCR product ที่ได้จากการตรวจการแสดงผลของยีน iNOS ขนาด 454 bp และนำสาย cDNA ที่สร้างได้ไปตรวจสอบการแสดงผลของยีน COX-2 และ GAPDH ขนาด 721 bp และ 325 bp ตามลำดับและหลังจากนั้นนำ PCR product ไปทำเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยดูการแสดงผลของยีน iNOS และ COX-2 และนำแผ่น gel ไปถ่ายภาพภายใต้แสง UV เพื่อดูแถบ PCR ที่เกิดขึ้น

จ. การตรวจวัดปริมาณ NO ที่สร้างขึ้นจากเซลล์ macrophage ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร LPS โดยวัดปริมาณของ ไนตริกออกไซด์ที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเซลล์ในรูปของ nitrite โดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาทำปฏิกิริยากับ Griess reagent จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Microplate reader

จ. การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ (COX-2 inhibitor)

ใช้หลักการทดสอบเอนไซม์ตามวิธีของ Copel และวัดเฉพาะเอนไซม์ COX-2 โดยใช้ปฏิกิริยา oxidation ของ N,N,N,N-tetra methyl-p-phenylenediamine (TMPD) ที่ทำให้ PGG2 เปลี่ยนเป็น PGH2 วิธีการโดยผสม 100 mM tris-HCl buffer, pH 8.0, 15 μ M hematin และ 3 μ M EDTA, 100 μ g CoX-2 enzyme และสารที่ทำการทดสอบเก็บที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หลังจากนั้นเติม arachidonic acid และ TMPD วัด enzyme activity จากการเกิด TMPD oxidation ใน 25 นาทีแรก โดยวัดที่ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 603 นาโนเมตร คำนวณเปรียบเทียบกับที่ไม่เติมสารสกัด คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งและ IC50

ข. In-vitro anti-inflammatory activity

โดยดูการยับยั้งการเสียสภาพของโปรตีน (protein denaturation) โดยปฏิกิริยาจะเป็นสารผสม (0.5 ml) ประกอบด้วย bovine serum albumin 0.45 ml (5% aqueous solution) สารสกัดจากพืช 0.05 ml (100 and 250 μ g/ml ของปริมาตรของระบบที่สภาวะสุดท้าย) ที่มีการปรับค่า pH แล้วนำไปวัดเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = 100 - (\text{O.D. ของสารทดสอบ} - \text{O.D. ผลลัพท์ที่ได้จากตัวควบคุม}) \times 100 \text{ O.D. ของตัวควบคุม}$$

ข. Antiproteinase activity

เป็นการทดสอบโดยประยุกต์วิธีของ Oyedepo และคณะ และ Sakat และคณะ สารผสมในการทำปฏิกิริยา (2 ml) ประกอบด้วย 0.06 mg trypsin, 1 ml 20 mM Tris HCl buffer (pH 7.4) และ 1 ml test sample ที่มีหลากหลายความเข้มข้น (100 - 500 μ g/ml) สารผสมบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และเติม 1 ml of 0.8% (w/v) casein บ่มสารผสมอีก 20 นาที หลังจากนั้นเติม 2 ml of 70% perchloric acid เพื่อหยุดปฏิกิริยา จะได้เป็นสารแขวนตะกอนลักษณะขุ่น จากนั้นนำเอาไปปั่นเหวี่ยงและดูดส่วนของน้ำใสที่อยู่เหนือตะกอน (supernatant) นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 210 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย buffer เป็น blank ทำการทดลอง 3 ครั้ง ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง Proteinase สามารถคำนวณได้โดยใช้สูตร

$$\% \text{ inhibition} = \frac{[\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}}]}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100$$

ณ. β -glucuronidase inhibition assay

สกัดสารมาที่ความแตกต่างกันจากนั้น นำมา 0.1 mL ลงใน phosphate buffer pH 7.4 ผสมลงกับ 0.8 mL ของ 2.5 mM p-nitrophenyl- β -D-glucopyranosiduronic acid ใน 0.1 mM β -glucuronidase นำที่ผสมกันนั้นไป incubate นานเป็นเวลา 30 นาที ขั้นตอนสิ้นสุดของปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นเมื่อเติม 0.5 N NaOH ปริมาณ 2 mL การเกิดปฏิกิริยาของสารละลายจะทราบได้จากการวัดด้วยเครื่อง spectrophotometry ที่ 410 nm จะพิจารณาที่ β -glucuronidase ถูกยับยั้ง 100% และปริมาณของสารตัวอย่างที่ถูกยับยั้งได้ 50% จะถูกนำมาคำนวณ IC.sub.50 ในการทดลองนี้ใช้ Salicylic acid (1mM, 0.053 mg/ml) เป็นสารอ้างอิง

$$\% \text{ inhibition} = \frac{[\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}}]}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100$$

2.10.2 วิธีการตรวจวัดการอักเสบโดยวิธีทางอ้อม ได้แก่

(1) Anti-AGEs formation

ก. Bovine Serum Albumin (BSA)-Glucose Assay (31)

ตามวิธีของ Brownlee และคณะ ทำโดยนำ BSA (10 mg/mL) บ่มกับ glucose (500 mM) ใน phosphate buffered-saline (PBS) (5 mL ของปริมาตรทั้งหมด, pH 7.4) นำสารสกัดที่ได้ sodium azide 0.02% ที่อุณหภูมิ 37°C ที่ความเข้มข้นสุดท้ายของ BSA (2 mg/mL) glucose (40 mM), และสารละลายตัวอย่าง (0.1 to 0.5 mg/mL). สารทดสอบทั้งหมดและสารตัวอย่าง จะถูก sterilized โดยการกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 μ m โปรตีน น้ำตาล และสารที่จะมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้ง จะถูกรวมเข้าด้วยกันเป็นสารผสม Aminoguanidine จะถูกนำมาใช้เป็น positive control และทำ negative control (ที่ไม่มีตัวยับยั้ง) เพื่อเปรียบเทียบผลกันด้วย แต่ละสารที่ทดลอง จะถูกเก็บในที่มืด ในหลอดทดลองที่ปิดสนิท หลังจากการบ่มเป็นเวลา 15 วัน ความเข้มของ fluorescence โดยใช้ความยาวคลื่นขณะถูกกระตุ้นเท่ากับ 370 nm และใช้ความยาวคลื่นขณะคายพลังงานเท่ากับ 440 nm และทำการวัดสารทดสอบ

คำนวณ % การยับยั้ง จากสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = \left[1 - \frac{(A_s - A_b)}{A_c - A_b} \right] \times 100$$

โดยที่ A_s

คือ fluorescence ที่ได้จากการบ่มของสารที่ผสมกับสารตัวอย่าง

A_b , A_c คือ fluorescence ที่ได้จากการบ่มสารผสมที่ไม่มีสารตัวอย่าง เท่ากับตัวที่เป็น positive control และ fluorescence ที่ได้จากการบ่มสารผสมที่ไม่มีสารตัวอย่าง เท่ากับตัวที่เป็น blank control

ข. BSA-Methylglyoxal Assay (31)

วิธีนี้ได้รับการพัฒนามาจากวิธีที่ได้รับการตีพิมพ์ ประเมินชั้นกลางจากปฏิกิริยา glycation ของโปรตีน โดยนำ BSA และ methylglyoxal มาละลายใน phosphate buffer (100 mM, pH 7.4) ให้มีความเข้มข้นเป็น 20 mg/mL และ 60 mM ตามลำดับ สารสกัดหรือส่วนของสารที่ได้จะถูกนำมาละลายใน phosphate buffer ที่เป็นสารเดียวกัน นำสารละลาย BSA 1 ml มาผสมกับสารละลาย methylglyoxal 1 ml และสารสกัดจากพืช 1 ml จากนั้นนำสารผสมที่ได้ มาบ่มที่อุณหภูมิ 37°C และใช้ Sodium azide (0.2 g/L) เป็น aseptic agent มี blank คือ Phosphate buffer มี positive controls ได้แก่ aminoguanidine และ phloroglucinol บ่มเป็นเวลา 7 วัน และนำไปวัดค่าการเรืองแสง fluorescence ของ สารตัวอย่าง โดยใช้ความยาวคลื่นขณะถูกกระตุ้นเท่ากับ 340 nm และใช้ความยาวคลื่นขณะที่คายพลังงานเท่ากับ 420 nm

Anti-AGEs Activity (24)

วิธีการทดสอบทำได้โดยนำ BSA (10 mg/mL) ผสมกับน้ำตาล D-ribose (0.5 M) และสารที่จะใช้ทดสอบใน phosphate buffer 50 mM ที่ pH 7.4 (NaN_3 0.02 %) จากนั้นนำไป incubated ใน 96-well microtiter plates ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชม. เมื่อครบเวลาแล้วนำสารที่ได้ไปทำการวัดความเข้มแสง fluorescence ที่ λ_{exc} 370 nm และ λ_{em} 440 nm แล้วนำค่าที่วัดได้จากความเข้มแสงที่ Emission มาคำนวณร้อยละของการยับยั้งดังสูตร

$$\% \text{ การยับยั้ง} = \frac{[\text{ความเข้มแสงของตัวควบคุม} - \text{ความเข้มแสงของตัวอย่าง}]}{\text{ความเข้มแสงของตัวควบคุม}} \times 100$$

หลักการของการทดลอง

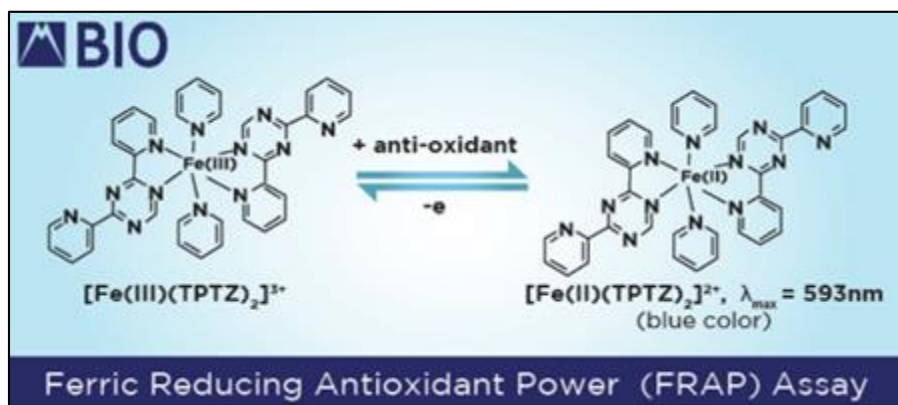
ไกลเคชัน คือ การจับกันด้วยพันธะโควาเลนต์ระหว่างโมเลกุลของโปรตีนหรือไขมัน กับน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่ง เช่น กลูโคสหรือฟรุคโตสที่ปราศจากการควบคุมของเอนไซม์ ผลผลิตสุดท้ายของปฏิกิริยาที่ไม่ใช้เอนไซม์นี้จะได้ advanced glycation end products (AGEs) ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิด reactive

oxygen species และเกิดการกระตุ้นการอักเสบผ่าน NF- κ B inflammatory pathway ในที่นี้ใช้ BSA แทนโปรตีน และ D-ribose แทนน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่ง และสารสกัดพืชแทนสารที่คาดว่าจะมีฤทธิ์ในการต้านกระบวนการ Glycation

(2) Antioxidant activity

ก. Ferric reducing antioxidant power (FRAP) (32)

เป็นวิธีการศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยใช้หลักการของการถ่ายเทอิเล็กตรอนที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง $\text{Fe(III)(TPTZ)}_2\text{Cl}_3$ (TPTZ คือ 2,4,6-tripyridyl-s-triazine) ซึ่งเป็นสารออกซิเดนต์กับสารต้านออกซิเดชัน เมื่อสารออกซิเดนต์ถ่ายเทอิเล็กตรอนให้แก่ $[\text{Fe(III)(TPTZ)}_2]^{3+}$ หรือ ferric tripyridyltriazine จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$ หรือ ferrous tripyridyltriazine ซึ่งทั้งสองมีการดูดกลืนแสงที่แตกต่างกันเมื่อวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm

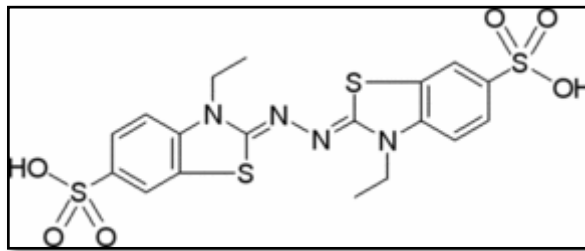


รูปที่ 12 แสดงการเกิดปฏิกิริยา FRAP (32)

การเกิด $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$ หรือ ferrous tripyridyltriazine จึงสามารถนำมาตรวจสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้ โดยแสดงผลในรูปของ FRAP value โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ FeSO_4 (ferrous sulfate) ที่ใช้ในการสร้าง $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$ ข้อดีของวิธีการนี้คือ ค่าใช้จ่ายน้อย สะดวกและรวดเร็ว ขั้นตอนในการทำการทดลองไม่ยุ่งยาก ซับซ้อนและมีความแม่นยำของวิธีการคือสามารถทำซ้ำแล้วให้ผลออกมาเหมือนเดิม

ข. ABTS assay หรือ 2,2'-Azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation radical - scavenging capacity assay (32)

เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน (antioxidant capacity) ซึ่งใช้ reagent คือ 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt เป็น stable radical ใน aqueous solution สารละลายนี้มีสีเขียวดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาว 734 nm

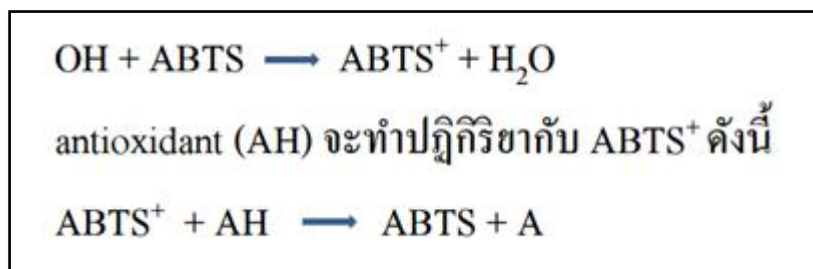


รูปที่ 13 แสดงโครงสร้าง 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (32)

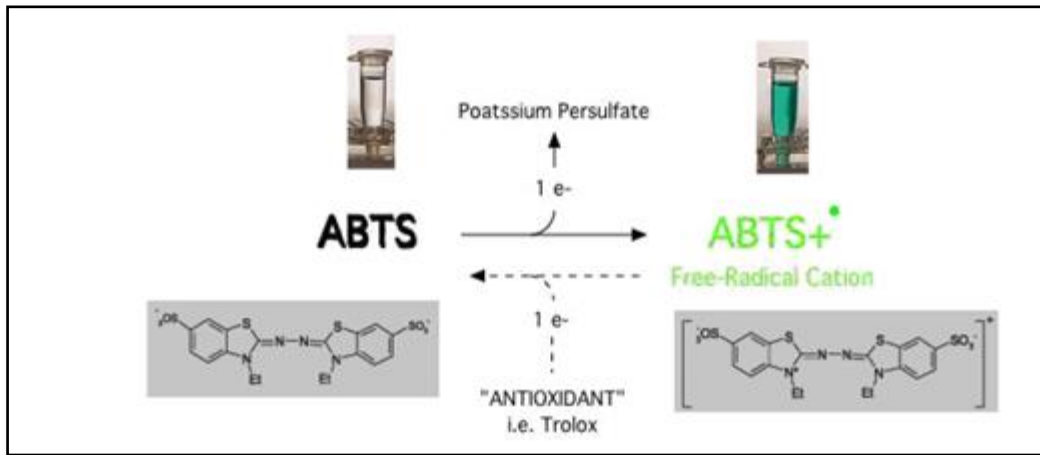
วิธีการในการทำให้เกิด ABTS cation radical มีได้หลายวิธี แต่ใช้หลักการเดียวกันคือการปลดปล่อย ABTS radical จากสารละลาย ABTS เพื่อให้เกิดการทำปฏิกิริยากับสารต้านออกซิเดชันและตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงสี

(ก) Enzyme Reaction เป็นการใช้ออนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันให้เกิดเป็น ABTS cation radical ตัวอย่างของเอนไซม์ เช่น peroxidase, myoglobin เป็นต้น

(ข) Chemical Reaction ซึ่งเป็นการใช้สารเคมี โดยสารเคมีที่ใช้ เช่น manganese dioxide, potassium persulfate, 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropane) (ABAP) เป็นต้น



รูปที่ 14 แสดงปฏิกิริยา ABTS (32)



รูปที่ 15 แสดง ABTS assay (32)

การทำปฏิกิริยาของ ABTS สามารถวัดฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยแสดงผลเป็นการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายซึ่งใช้เครื่องมือวัดเป็น Spectrophotometer ข้อดีของการใช้วิธีนี้คือ ABTS⁺ มีความคงตัวสูงทั้งในสารละลายน้ำและ ethanol, สามารถใช้ได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่กว้าง และเมื่อเปรียบเทียบกับ Trolox ซึ่งเป็นสารมาตรฐานแล้วสามารถนำไปแสดงผลในรูปของค่า Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) ได้

ค. Hydroxy radical

ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมีความสัมพันธ์โดยตรงกับฤทธิ์ Antioxidant ของสาร. โดยในการทดสอบนี้จะเป็นการทดสอบแบบ invitro ใช้ Fe^{3+} /ascorbate/ EDTA/ H_2O_2 ที่มาจากปฏิกิริยา Fenton เป็นตัวสร้างอนุมูลอิสระของ Hydroxyl. ซึ่ง hydroxyl radicals ที่เป็นอนุมูลอิสระสามารถทำปฏิกิริยาจับกับ DMSO (dimethyl sulphoxide) ได้สาร formaldehyde ออกมาและได้สารละลายสีเหลืองเข้มเมื่อนำมาทำปฏิกิริยากับ Nash reagent (2M ammonium acetate + 0.05M acetic acid + 0.02M acetyl acetone ในน้ำกลั่น), จากนั้นนำสารละลายที่ทำปฏิกิริยากับ DMSO แล้วมาวัดความเข้มข้นโดยใช้เครื่อง spectrophotometre ที่ความยาวคลื่น 412 nm เทียบกับ blank นำค่าที่ได้ของแต่ละตัวอย่างมาคำนวณเปอร์เซ็นต์ HRSA (HRSA (%))

$$HRSA \text{ (HRSA (\%))} = \frac{1 - (\text{Differences in absorbance of sample}) \times 100}{\text{Difference in absorbance of blank}}$$

ง.ฤทธิ์การยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระชนิดไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide scavenging)

เตรียม Sodium nitroprusside ความเข้มข้น 5 mM ใน phosphate buffer pH 7.4 จากนั้นนำสารละลาย Sodium nitroprusside ที่เตรียมไว้มาจำนวน 0.3 ml มาผสมกับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆกัน จำนวนความเข้มข้นละ 1 ml โดยผสมลงในหลอดทดลองแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม Griess reagent ปริมาณ 0.5 ml ลงในแต่ละหลอดทดลองแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 546 nm นำค่าที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Inhibition (%)) = $(A_0 - A_1 / A_0) \times 100$ เมื่อ A_0 คือค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุม และ A_1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

จ.ฤทธิ์การจับกับโลหะ (Metal chelating)

เติม 1 ml ของ 2mM $FeCl_2$ ลงใน EEDI และ AEDI ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยปฏิกิริยานี้จะเริ่มต้นด้วยการเติม 5 mM ferrozine จำนวน 1 ml นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 nm หลังจากทำปฏิกิริยานาน 10 นาทีจากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (Inhibition (%)) = $(A_0 - A_1 / A_0) \times 100$ โดย A_0 คือค่าการดูดกลืนแสงของ control และ A_1 คือค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

ฉ. Reducing power Assay

นำสารสกัดพืช 1 ml ผสมกับ phosphate buffer (200 mM, pH 6.6) จำนวน 2 ml และ potassium ferric cyanide (30 mM) จำนวน 2.5 ml แล้วนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นเติม trichloroacetic acid (600 mM) จำนวน 2.5 ml ลงในสารผสมแล้วนำไปทำการ centrifuged เป็นเวลา 10 นาที ที่ 3000 rpm. นำสารละลายด้านบนที่ได้หลังจากทำการ centrifuged จำนวน 2.5 ml ทำการผสมกับน้ำกลั่นปริมาณ 2.5 ml แล้วเติม $FeCl_3$ (6 mM) จำนวน 0.5 ml นำสารผสมที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 nm แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (Inhibition (%)) = $(A_0 - A_1 / A_0) \times 100$ โดย A_0 คือค่าการดูดกลืนแสงของ control และ A_1 คือค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

ช.ฤทธิ์ในการต้าน Superoxide

การทำให้เกิด superoxide anion radical โดยผสม NBT(0.3 mM) 0.5 ml , NADH(0.936 mM) 0.5 ml, 1 ml ของสารสกัด และ 0.5 ml(16 mM, pH 8.0) Tris-HCl buffer ปฏิกิริยาจะเริ่มเกิดเมื่อเติมสารละลาย PMS (Phenazine methosulphate) (0.12 mM) 0.5 ml ลงไป แล้วนำไป incubate ที่ 25°C

เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 nm เทียบกับสารละลาย blank นำค่าที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

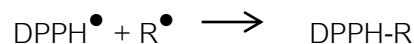
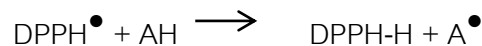
$$(\text{Inhibition (\%)} = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \times 100)$$

เมื่อ A_0 คือค่าดูดกลืนแสงของตัวควบคุม และ A_1 คือ ค่าดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

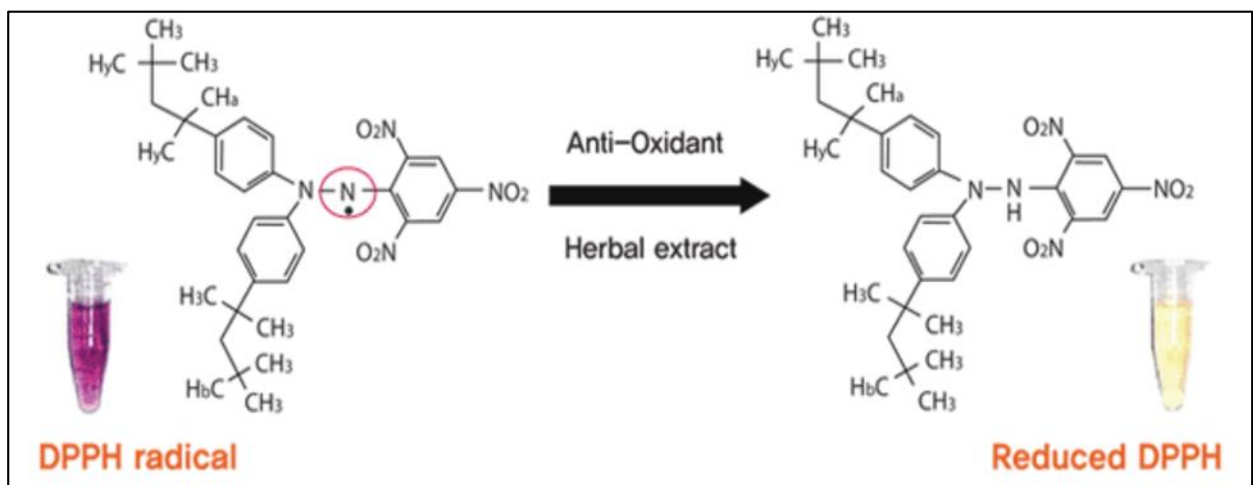
๕. DPPH

DPPH assay หรือ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ซึ่งใช้ reagent คือ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl เป็น stable radical ในตัวทำละลาย methanol ซึ่งสารละลายนี้มีสีม่วง ซึ่งดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 517 nm

โดย $\text{DPPH}^\bullet$ จะเกิดปฏิกิริยากับ antioxidant (AH) หรือกับ radical species ($\text{R}^\bullet$) ได้ดังสมการ



ถ้าตัวอย่างมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้สูงความเข้มของสารละลายสีม่วงก็จะลดลง ซึ่งจะรายงานผลการทดลองเป็นค่า 50% effective concentration (EC_{50}) ซึ่งหมายถึง ปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ $\text{DPPH}^\bullet$ เหลืออยู่ 50%



รูปที่ 16 แสดง DPPH assay (32)

2.11. วิธีการเตรียมสมุนไพร

การนำสมุนไพรมาใช้ในการรักษาโรคจะแบ่งตามการรักษา ได้เป็น 3 ประเภท

2.11.1 การใช้สมุนไพรในการรักษาแบบแผนโบราณ

สมุนไพรที่ใช้ในการรักษาจะมีทั้ง สมุนไพรที่ใช้เดี่ยวๆ และสมุนไพรที่ใช้เป็นตำรับ ซึ่งก็มีรูปแบบยาที่สามารถพบได้โดยทั่วไปเป็น ยาต้ม ยาผง ยาลูกกลอน และยาเม็ดพิมพ์มือ และจะใช้การสกัดอย่างง่ายโดยการหมัก การต้ม และการกลั่น

2.11.2 การใช้สมุนไพรในการรักษาแบบแผนสมัยใหม่

ทำได้โดยการนำสมุนไพรที่มีอยู่ตามธรรมชาติ มาทำการคัดแยกพืชที่น่าจะมีฤทธิ์ที่ต้องการ (Screening) และนำมาผ่านวิธีการทางวิทยาศาสตร์ ซึ่งประกอบด้วย

(1) การสกัด (Extraction) แบ่งเป็น

- Maceration
- Percolation
- Soxhlet extraction

(2) Isolation แบ่งเป็น

- Distillation
- Crystallization
- Chromatography
- electrophoresis

(3) Concentration แบ่งเป็น

- Free evaporation
- Rotary evaporation
- Lyophilizer

(4) Identification แบ่งเป็น

- MP
- TLC
- HPLC
- UV
- IR
- MS
- NMR

จากการผ่านวิธีการในข้างต้นนี้จะทำให้ได้มาซึ่งสารบริสุทธิ์ เพื่อที่จะนำไปตรวจสอบฤทธิ์ต่อไป

2.11.3 การใช้สมุนไพรในการรักษาแบบแผนโบราณกึ่งประยุกต์

โดยจะนำทั้งสมุนไพรแผนโบราณ ทั้งแบบเดี่ยวและตำรับ มาทำการสกัด(Extraction) แยกแบบ Semi-separation และนำมาทำการ Standardization หรือการทำมาตรฐานให้กับสารละลายมาตรฐาน เพื่อให้ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐานที่ต้องการเพื่อนำไปใช้ในการคำนวณหาความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ไม่ทราบความเข้มข้น

2.12. ขั้นตอนการสกัดแยกสาร

12.2.1 Plant material preparation

(1) หลักการในการเก็บสมุนไพร

สมุนไพรที่มีกลิ่นหอม	เก็บในเวลาเช้ามีด ที่มีอากาศเย็น
ส่วนของผลและเมล็ด	ใช้ผลที่แก่จัด
ส่วนของดอก	เก็บดอกตูมหรือดอกที่เริ่มบาน ขณะที่อยู่บนต้น
ส่วนของรากและหัว	เก็บเมื่อพืชหยุดการเจริญเติบโต (ซึ่งจะมีอายุหลังการปลูก ประมาณ 10 เดือน)
ส่วนของเปลือกรากและลำต้น	เก็บในช่วงปลายฤดูร้อน ซึ่งเป็นช่วงรอยต่อกับฤดูฝน

ตารางที่ 2 แสดงหลักการในการเก็บสมุนไพร

(2) การทำสมุนไพรให้แห้ง

การผึ่งลมในที่ร่ม	จะใช้กับสมุนไพรที่มีน้ำมันหอมระเหย
ตากแดดให้แห้ง	ใช้กับสมุนไพรทั่วไปที่ไม่ได้มีลักษณะพิเศษ
ต้มหรือึ่งจากนั้นทำให้แห้ง	จะใช้กับสมุนไพรที่มีแป้ง, ขมิ้น, ขิง
การอบในตู้อบ	ดอก ใบ และพืชล้มลุก ไม่เกิน 40 องศาเซลเซียส, ราก กิ่ง เปลือก ไม่เกิน 65 องศาเซลเซียส, แก่น ผล และเมล็ด ไม่เกิน 80 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3 แสดงการทำสมุนไพรให้แห้ง

2.12.2 Extraction

การสกัดพืชทำได้หลายวิธี ซึ่งจะพิจารณาจากชนิดของสารที่สกัด คุณสมบัติของสารในการทนต่อความร้อน และชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ แบ่งการสกัดแบบต่างๆได้เป็น

(1) การฝน (Sanding)

คือ การนำสมุนไพรมาฝนด้วยหินบดยา จากนั้นทำการชะด้วยน้ำธรรมดา แล้วจึงกรองเพื่อนำน้ำไปรับประทาน

(2) การชง (Infusion)

คือ การสกัดโดยใช้สมุนไพรด้วยน้ำร้อนหรือน้ำเย็นในช่วงระยะเวลาสั้นๆ สารสกัดที่ได้จะเป็นสารที่ละลายน้ำได้ดีในอุณหภูมิที่ไม่สูงมาก

(3) การต้ม (Decoction)

คือ การสกัดสารที่ละลายได้ดีในน้ำและสามารถทนต่อความร้อนได้ดี โดยการต้มสมุนไพรในน้ำจนเดือดแล้วต้มต่อไปอีกประมาณ 15 นาที

(4) การตุ๋น (Digestion)

เป็นวิธีการสกัดโดยใช้ความร้อนอ่อนๆ ที่อุณหภูมิประมาณ 40 – 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานมากกว่าการต้ม

(5) การหมัก (Maceration)

เป็นวิธีการสกัดโดยการนำสมุนไพรมาหมักกับตัวทำละลายในภาชนะที่ปิด และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 3-7 วัน เขย่าหรือคนบ่อยๆ แล้วกรองเพื่อนำเอาสารสกัดไปใช้ หากต้องการให้หมดจดอาจต้องอาศัยการสกัดหลายครั้ง ซึ่งวิธีนี้มีข้อดีคือสารไม่ถูกความร้อน แต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก และมักไม่ใช่น้ำเป็นตัวทำละลายเนื่องจากสามารถทำให้สารสกัดบูดได้

(6) การหมักแบบต่อเนื่อง (Percolation)

เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง โดยการนำเอาสมุนไพรมาหมักกับตัวทำละลายให้พอชื้น ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเพื่อให้พอตัวเต็มที่ จากนั้นจึงค่อยๆ ทำการบรรจุลงในที่ละน้อย และเติมตัวทำละลายลงไปในระดับที่สูงเหนือสมุนไพร (Solvent head) ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชม. จึงเริ่มไซสารออกโดยค่อยๆ เติมตัวทำละลายลงไปอย่าให้แห้ง

(7) การสกัดด้วย Soxhlet Extractor

เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่องโดยใช้ตัวทำละลายซึ่งมีจุดเดือดต่ำ ใช้ความร้อนทำให้ตัวทำละลายใน flask ระเหยขึ้นไปแล้วกลั่นตัวลงมา จนถึงจุดหนึ่งก็จะเกิดการไหลกลับลงไปใน flask ใหม่อีกครั้งโดยใช้วิธีการกลั่นน้ำ แล้วเกิดการกลั่นตัวขึ้นไปใหม่จนสกัดได้หมดจดในที่สุด

(8) Liquid – liquid extraction

เป็นการสกัดสารจากสารละลายซึ่งเป็นของเหลว ด้วยตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งตัวทำละลายชนิดนี้จะไม่ผสมกับตัวทำละลายชนิดแรก

2.13 หลักในการเลือกใช้ตัวทำละลาย

ตัวทำละลายที่ดี จะต้องสามารถละลายสารที่ต้องการสกัดได้ดี ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการสกัด และไม่เป็นพิษ

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

เกณฑ์คัดเข้า :

1. เป็นพืชพื้นบ้านที่มีในภาคตะวันออก
2. มีรายงานการใช้ในการลดอาการปวด, ด้านการอักเสบ, ด้านการติดเชื้อแบคทีเรีย

พบว่าพืชเข้าเกณฑ์ทั้งสิ้น 47 ชนิด มาจาก 7 ตำรับ (27 ชนิด), สมุนไพรเดี่ยว 20 ชนิด

เกณฑ์คัดออก :

1. พืชที่เคยมีการทดลองการหาฤทธิ์การต้านการอักเสบในสัตว์ทดลองแล้ว

พบว่าพืชที่ผ่านตามเกณฑ์ 5 ชนิด ได้แก่ ฝ้ายแดง, กระดังง์, หญ้าน้ำค้าง, ชันทองพยับบาท, ช่อยดำ

3.1. วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 พืชที่ทำการวิจัย

- กระดังง์ (*Calophyllum inophyllum*. L.)
- ช่อยดำ (*Clerodendrum disparifolium*)
- ชันทองพยับบาท (*Suregada multiflora* (A.Juss) Baill.)
- ฝ้ายแดง (*Gossypium arboreum* L.)
- หญ้าน้ำค้าง (*Drosera indica* L.)

3.1.2 วัสดุอุปกรณ์

- | | |
|------------------|------------------|
| - เครื่อง vortex | - ฟ้าขาวบาง |
| - ปีกเกอร์ | - ขวดปรับปริมาตร |
| - กระบอกตวง | - หลอดทดลอง |

- กระจกนาฬิกา
- หลอด centrifuge 15 ml
- auto pipette
- ขี้นดักสาร
- pH meter
- UV-Vis spectrophotometer
- micloplate reader
- Hot air oven
- microcentrifuge tube
- water bath
- เครื่องชั่งสาร 4 ตำแหน่ง
- 96-well microtiter plates
- ชุด Soxhlet extraction
- เครื่อง centrifuge
- Sonicator

3.1.3 สารเคมี

- ethanol 95%
- Ferric chloride
- Dragendorff's reagent
- trypsin
- casein
- Diclofenac Sodium
- DPPH Reagent
- hydrochloric acid
- Sulfuric acid
- trichloromethane
- tris-HCl buffer 25 mM pH7.4
- 70% perchloric acid
- FRAP reagent
- BSA

3.2 วิธีดำเนินการทดลอง

3.2.1 แหล่งที่มาของตัวอย่าง

- กระเทียม และขมิ้นดำ จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก ตำบลบางพระ อำเภอ ศรีราชา จังหวัดชลบุรี

- ชันทองพยับบาท จากร้านสามัคคีโฮสเทล (หมอวาสน์) ซอยวัดกลาง ตำบลมะขามหย่ง อำเภอเมือง
ชลบุรี ชลบุรี

- ฝ้ายแดง จากสวนเกษตรอินทรีย์ ต. นาเว็ก อ.พนัสนิคม จ.ชลบุรี

- หญ้าน้ำค้าง จากสวนสมุนไพรแม่หม่อชำนาญ ตำบลสนามไชย อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี

3.2.2 การเตรียมสารสกัด

(1) นำพืชสดแต่ละชนิดที่ได้ มาทำการล้างน้ำทำความสะอาด



รูปที่ 17-1 แสดงขั้นตอนการล้างทำความสะอาดพืช



รูปที่ 17-2 แสดงภาพก่อนและหลังการทำความสะอาดพืช

(2) นำพืชที่ได้ไปผ่านการอบที่ 52 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 18-1 แสดงการอบพืช



รูปที่ 18-2 แสดงตัวอย่างพืชหลังการอบ

(3) นำใบของฝ้ายแดง กระติง ข่อยดำ ต้นของชันทองพญาบาท และทุกส่วนของหนุ้าน้ำค้ำงมาบดเป็นผง

(4) นำพืชแต่ละชนิดมาแยกสกัดด้วยวิธี maceration เป็นเวลา 7 วัน และ soxhlet extraction เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยมี ethanol เป็นตัวทำละลาย จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปทำให้มีความเข้มข้นโดยใช้เครื่อง rotary flask evaporator

3.3 Proteinase inhibitory assay (28)

3.3.1 นำ trypsin 0.06 mg ใน 1 ml ของ tris-HCl buffer 25 mM pH7.4 และสารสกัด 1 ml

3.3.2 นำไป incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 5 นาที

3.3.3 เติม casein ความเข้มข้น 0.8 %w/v ปริมาตร 1 ml

3.3.4 นำไป incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

3.3.5 เติม 70% perchloric acid 2 ml เพื่อให้สารแขวนตะกอนขึ้น

3.3.6 นำไป centrifuge แล้วดูส่วนของ supernatant มาทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 280 nm โดยใช้ Blank เป็น buffer

$$\% \text{ inhibition} = \frac{[Abs_{\text{control}} - Abs_{\text{sample}}]}{Abs_{\text{control}}} \times 100$$

การทดสอบฤทธิ์

1. Anti-oxidants

1.1 Ferric reducing antioxidant power (FRAP) (27)

1.1.1 เตรียม FRAP reagent โดย ผสม 300 mM acetate buffer (pH 3.6) กับ 20 mM Ferric chloride solution และ 10 mM TPTZ (2,4,6-Tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine)) solution ให้เข้ากัน

1.1.2 เก็บ FRAP reagent โดยปราศจากแสง

1.1.3 เตรียมสารสกัดตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้น 1 mg/ml ด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิด (ใช้ 20% DMSO ช่วยในการละลาย)

1.1.4 นำสารสกัดตัวอย่างผสมกับ FRAP reagent และน้ำกลั่น โดยให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 2,040 μ l ผสมให้เข้ากัน

1.1.5 วัดค่าการดูดกลืนแสงในนาที่ที่ 4 ที่ความยาวคลื่น 600 nm

1.1.6 ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน Ferrous sulfate

1.1.7 คำนวณร้อยละการยับยั้ง

$$\% \text{ inhibition} = \frac{[Abs_{\text{control}} - Abs_{\text{sample}}]}{Abs_{\text{control}}} \times 100$$

1.2 DPPH หรือ diphenyl- picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay

1.2.1 เตรียมสารสกัดละลายในเอทานอลให้ได้ความเข้มข้น 500 µg/ml พร้อมกับเตรียมสารละลายมาตรฐาน (Trolox)

1.2.2 ดูดสารที่เตรียมไว้มาปริมาตร 20 µl แล้วเติมสาร DPPH Reagent ปริมาตร 180 µl ลงใน 96-well microtiter plates

1.2.3 บ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที

1.2.4 นำสารที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm

1.2.5 คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

$$\% \text{ inhibition} = \frac{[Abs_{\text{control}} - Abs_{\text{sample}}]}{Abs_{\text{control}}} \times 100$$

2. Anti-AGEs formation (31)

2.1 Anti-AGEs Activity

2.1.1 วิธีเตรียมสารละลาย

1. เตรียมสารละลาย BSA ความเข้มข้น 100 mg/ml

1.1 ชั่งผง BSA 1 g ใส่กระดาดชั่ง

1.2 ตวง distilled water ปริมาตร 10 mL ใส่ flask

1.3 ค่อยๆ เปรยผง BSA ลงในปิกเกอร์ Distilled water (เพื่อป้องกันการจับเป็นก้อน)

1.4 ปิดปาก flask ด้วยพาราฟิน swirl จนผง BSA ละลายหมด (ห้ามใช้อุปกรณ์คน)

1.5 เก็บสารละลายไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

2. เตรียมสารละลาย Fructose ความเข้มข้น 5,000 mM

2.1 ชั่ง fructose 22.52 g

2.2 ละลายใน 10X PBS-azide และปรับปริมาตรจนครบ 25 ml

3. เตรียมสารละลาย Phosphate buffered-saline (PBS) 10X Sodium azide

3.1 ชั่ง NaCl 8 g, Na₂HPO₄ 1.25 g, KCl 0.2 g และ KH₂PO₄ 0.2 g

3.2 ละลายในน้ำปริมาตร 3 ใน 4 ของปริมาตรทั้งหมด (ประมาณ 75 ml)

3.3 ปรับ pH ให้ได้ 7.4 โดย NaCl และ HCl ปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 100 ml

3.4 นำสารละลาย 10X PBS ที่ได้มา 50 ml

3.5 ใส่ Sodium azide 0.1 g

3.6 ปรับปริมาตรด้วย DI water 500 ml

วิธีทำการทดสอบ

1. Optimization

1.1 ปิเปต 10 mg/ml BSA ปริมาตร 100 ul ผสมกับ 1,000 mM fructose ปริมาตร 200 ul ลงในหลอดทดลอง

1.2 ปิดด้วยฝาหลอดอย่างหลวมๆ เตรียมทั้งหมด 3 ชุด นำมาบ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

1.3 นำไปวัดผลการยับยั้งด้วย Spectrofluorometer ที่ wavelength excitation 340 nm emission 440 nm slit 5 nm

2. Negative control

2.1 ปิเปต 100 mg/ml BSA ปริมาตร 300 ul ผสมกับ 5,000 mM fructose ปริมาตร 300 ul และ PBS azide 2,400 ul ลงในหลอดทดลอง

2.2 ปิดหลอดทดลองด้วยฝา คลายฝาออกให้หลวม เตรียมทั้งหมด 3 ชุด

2.3 นำไปบ่มที่ 50 °C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

2.4 นำไปวัดผลการยับยั้งด้วย Spectrofluorometer ที่ wavelength excitation 340 nm emission 440 nm slit 5 nm

3. Sample (Plant extracts)

3.1 ปิเปต 100 mg/ml BSA ปริมาตร 300 ul ผสมกับ 5000 mM fructose ปริมาตร 300 ul

3.2 เติมสารสกัดพืชลงในหลอดทดลองจนความเข้มข้นของสารละลายสุดท้ายเป็น 125, 250, 500 และ 1,000 ul จากสารสกัดความเข้มข้นเริ่มต้น 1250, 2500, 5,000 และ 10,000 ul โดยปิเปตแต่ละความเข้มข้นมา 300 ul

3.3 ปิเปต PBS azide 2,400 ul

3.4 ปิดหลอดทดลองด้วยฝา คลายฝาออกให้หลวม เตรียมทั้งหมด 3 ชุด

3.5 นำไปบ่มที่ 50 °C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

3.6 นำไปวัดผลการยับยั้งด้วย Spectrofluorometer ที่ wavelength excitation 340 nm emission 440 nm slit 5 nm

4. Positive control

4.1 ปิเปต 100 mg/ml BSA ปริมาตร 300 ul ผสมกับ 5,000 mM fructose ปริมาตร 300 ul

4.2 เติม Aminoguanidine ลงในหลอดทดลองจนความเข้มข้นของสารละลายสุดท้ายเป็น 1.00 mg/ml

4.3 ปิเปต PBS azide ปริมาตร 2,400 ul

4.4 ปิดหลอดทดลองด้วยฝา คลายฝาดอกให้หลวม เตรียมทั้งหมด 3 ชุด

4.5 นำไปบ่มที่ 50 °C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

4.6 นำไปวัดผลการยับยั้งด้วย Spectrofluorometer ที่ wavelength excitation 340 nm emission 440 nm slit 5 nm

บทที่ 4

ผลการวิจัย

ในการศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบและกลไกที่เกี่ยวข้องของพืชสมุนไพร ที่สนใจทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ กระเทียม ขมิ้นชัน ขมิ้นชัน ขมิ้นชัน ขมิ้นชัน โดยทำการศึกษาในขอบเขตของฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างสารเอ็ดวานซ์ไกลเคชันเอนโดพโรดัคส์ ซึ่งสัมพันธ์กับกระบวนการเกิดการอักเสบตามที่ได้กล่าวมาในบทที่ 2 ข้างต้น ได้ผลดังต่อไปนี้

4.1 ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างพืชสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด

พืชสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด มีแหล่งที่มา และส่วนที่นำมาสกัดแตกต่างกัน โดยข้อมูลเบื้องต้นของสารสกัดได้แสดงไว้ในตารางที่ 4 ต่อไปนี้

ตารางที่ 4 ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างพืชสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด

ตัวอย่าง	น้ำหนักแห้ง (g)	% yield	
		Maceration	Soxhlet
กระเทียม	490.65	1.9	5.83
ขมิ้นชัน	68.15	9.31	11.81
ขมิ้นชัน	2,000	2.42	1.24
ขมิ้นชัน	366.98	1.65	5.08
ขมิ้นชัน	128.25	3.68	11.13

จากตารางข้างต้น พบว่าร้อยละของสารสกัดขมิ้นชันที่ทำการสกัดด้วยวิธี soxhlet ให้ปริมาณสูงสุด คือ 11.811% ส่วนการสกัดขมิ้นชันที่สกัดด้วยวิธี soxhlet มีปริมาณต่ำสุด คือ 1.242% ตามลำดับ

4.2 ฤทธิ์ด้านการอักเสบ โดยการยับยั้งเอนไซม์กลุ่มโปรตีเนส (Proteinase inhibitory assay)

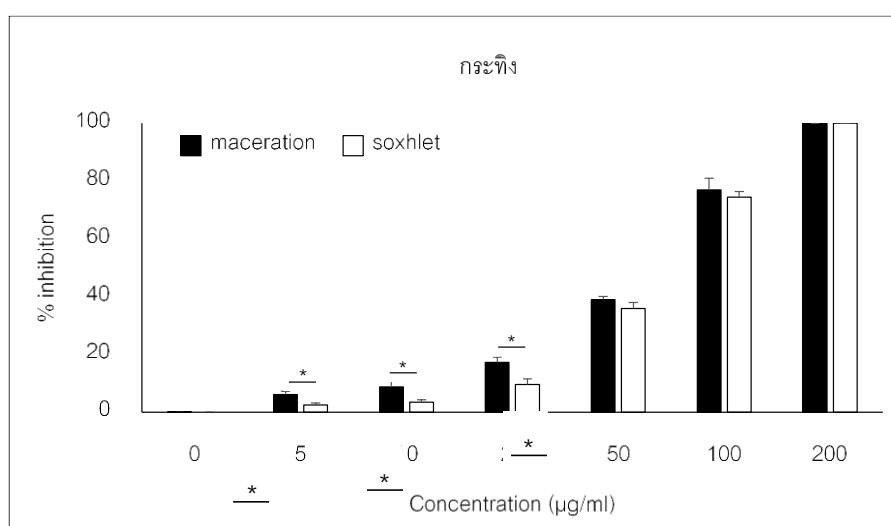
ในการตรวจสอบฤทธิ์ในการต้านการอักเสบนี้ ใช้หลักการทำงานของสารที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินในการเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายตั้งต้น คือ โปรตีนเคซีน ให้เป็นกรดอะมิโนอิสระ หรือโปรตีนสายสั้นและตรวจวัดกรดอะมิโนที่ถูกย่อยด้วยเทคนิคสเปกโตรสโคปี โดยการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรหลังตกตะกอนโปรตีนที่เหลือในปฏิกิริยาดังกล่าว โดยสารที่สามารถยับยั้ง

การทำงานของเอนไซม์ทริปซินได้ จะทำให้มีกรดอะมิโนอิสระลดลง และคำนวณเพื่อหาความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน เทียบกับหลอดควบคุมสารสกัดด้วยเอทานอล ได้ผลดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 5-1 แสดงค่าความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดกระถังด้วยวิธี maceration และ soxhlet

กระถัง	%inhibition	
	Maceration	Soxhlet
0 µg/ml	0.00±0.00	0.00±0.03
5 µg/ml	6.20±1.02	2.47±0.68
10 µg/ml	8.83±3.15	3.49±0.83
20 µg/ml	17.21±1.89	9.66±1.88
50 µg/ml	38.91±1.10	35.94±2.08
100 µg/ml	76.95±3.99	74.46±1.91
200 µg/ml	100.00±0.00	100.00±0.00

หมายเหตุ ข้อมูล % inhibition เป็นค่าเฉลี่ย (mean) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)



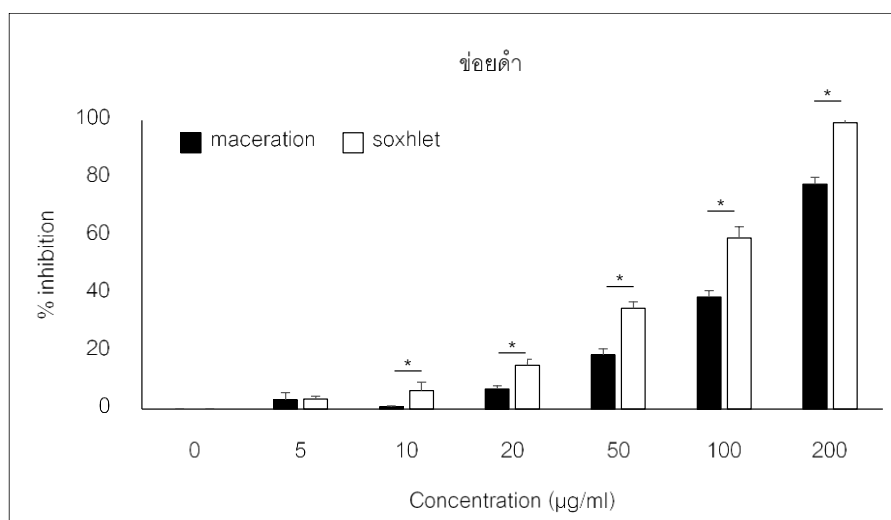
ภาพที่ 19-1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดกระถังด้วยวิธี maceration (ที่บ) และ soxhlet (ที่ป) กับ % inhibition ด้วยวิธีวิเคราะห์ Proteinase inhibitory assay แสดงค่าเป็น mean ± S.D. และ * $p\text{-value} < 0.05$

จากกราฟแท่งแสดงการเปรียบเทียบ %inhibition ด้วยวิธีวิเคราะห์ Proteinase inhibitory assay ระหว่างกระตังที่สกัดด้วยวิธี maceration และ soxhlet ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0, 5, 10, 20, 50, 100 และ 200 µg/ml เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างการสกัดด้วยวิธี maceration และ soxhlet พบว่าสารสกัดโดยวิธีการสกัดแบบ maceration ให้ผล %inhibition ที่ดีกว่าการสกัดด้วยวิธี soxhlet อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 µg/ml

ตารางที่ 5-2 แสดงค่าความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดขอยดำด้วยวิธี maceration และ soxhlet

ขอยดำ	%inhibition	
	Maceration	Soxhlet
0 µg/ml	0.00±0.06	0.00±0.01
5 µg/ml	3.22±2.55	3.43±1.02
10 µg/ml	0.83±0.27	6.46±2.83
20 µg/ml	7.03±1.00	15.17±2.09
50 µg/ml	18.84±2.07	34.87±2.36
100 µg/ml	38.77±2.30	59.23±3.95
200 µg/ml	77.97±2.24	99.23±2.52

หมายเหตุ ข้อมูล % inhibition เป็นค่าเฉลี่ย (mean) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)



ภาพที่ 19-2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดข่อยดำด้วยวิธี maceration (ที่บ) และ soxhlet (ใบ/รง) กับ % inhibition ด้วยวิธีวิเคราะห์ Proteinase inhibitory assay แสดงค่าเป็น mean $\pm$ S.D. และ * p -value < 0.05

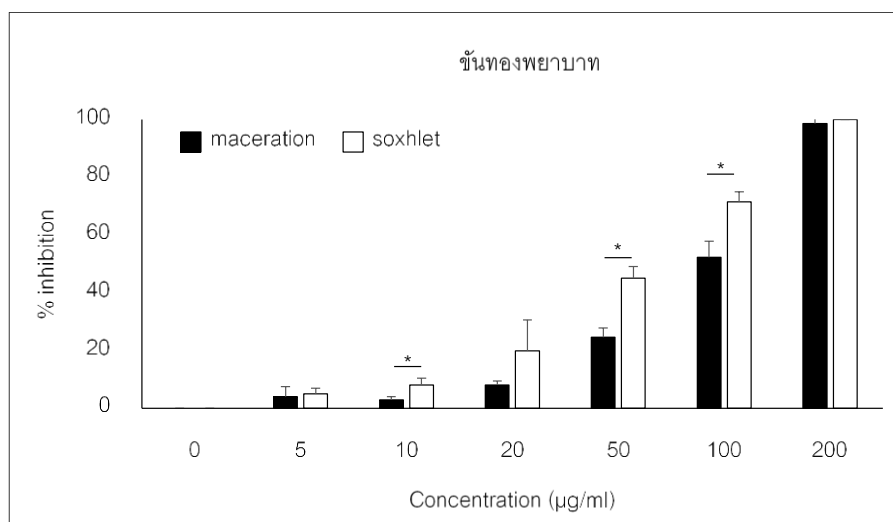
จากกราฟแท่งแสดงการเปรียบเทียบ %inhibition ด้วยวิธีวิเคราะห์ Proteinase inhibitory assay ระหว่างข่อยดำที่สกัดด้วยวิธี maceration และ soxhlet ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0, 5, 10, 20, 50, 100 และ 200 µg/ml เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างการสกัดด้วยวิธี maceration และ soxhlet พบว่าสารสกัดโดยวิธีการสกัดแบบ soxhlet ให้ผล %inhibition ที่ดีกว่าการสกัดด้วยวิธี maceration อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ทุกความเข้มข้น ยกเว้นความเข้มข้นที่ 5 µg/ml

ตารางที่ 5-3 แสดงค่าความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดชั้นของพยาบาทด้วยวิธี maceration และ soxhlet

ชั้นของพยาบาท	%inhibition	
	Maceration	Soxhlet
0 µg/ml	0.00±0.01	0.00±0.02
5 µg/ml	4.06±3.43	4.97±1.94
10 µg/ml	2.88±1.17	8.06±2.32
20 µg/ml	8.11±1.29	19.90±10.78
50 µg/ml	24.69±3.17	45.13±3.98
100 µg/ml	52.29±5.52	71.57±3.38

200 µg/ml	98.65±2.34	100.00±0.00
-----------	------------	-------------

หมายเหตุ ข้อมูล % inhibition เป็นค่าเฉลี่ย (mean) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)



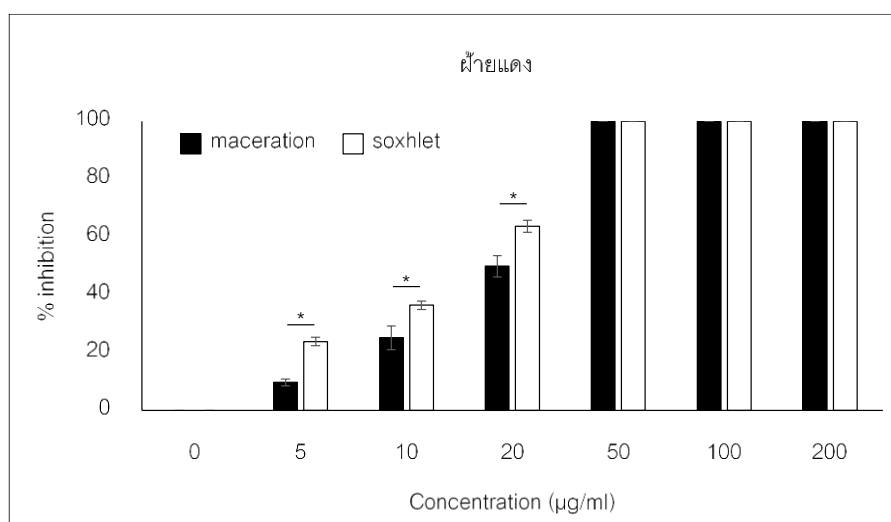
ภาพที่ 19-3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดขันทองพญาบาทด้วยวิธี maceration (ที่บ) และ soxhlet (โป/รง) กับ % inhibition ด้วยวิธีวิเคราะห์ Proteinase inhibitory assay แสดงค่าเป็น mean ± S.D. และ * $p\text{-value} < 0.05$

จากกราฟแท่งแสดงการเปรียบเทียบ %inhibition ด้วยวิธีวิเคราะห์ Proteinase inhibitory assay ระหว่างขันทองพญาบาทที่สกัดด้วยวิธี maceration และ soxhlet ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0, 5, 10, 20, 50, 100 และ 200 µg/ml เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างการสกัดด้วยวิธี maceration และ soxhlet พบว่า สารสกัดโดยวิธีการสกัดแบบ soxhlet ให้ผล %inhibition ที่ดีกว่าการสกัดด้วยวิธี maceration อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเข้มข้น 10, 50 และ 100 µg/ml

ตารางที่ 5-4 แสดงค่าความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดฝ้ายแดงด้วยวิธี maceration และ soxhlet

ฝ้ายแดง	%inhibition	
	Maceration	Soxhlet
0 µg/ml	0.00±0.01	0.00±0.00
5 µg/ml	9.73±1.17	23.85±1.51
10 µg/ml	25.16±4.09	36.40±1.45
20 µg/ml	49.94±3.68	63.74±2.06
50 µg/ml	100.00±0.00	100.00±0.00
100 µg/ml	100.00±0.00	100.00±0.00
200 µg/ml	100.00±0.00	100.00±0.00

หมายเหตุ ข้อมูล % inhibition เป็นค่าเฉลี่ย (mean) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)



ภาพที่ 19-4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดฝ้ายแดงด้วยวิธี maceration (ทึบ) และ soxhlet (โปร่ง) กับ % inhibition ด้วยวิธีวิเคราะห์ Proteinase inhibitory assay แสดงค่าเป็น mean ± S.D. และ * p -value < 0.05

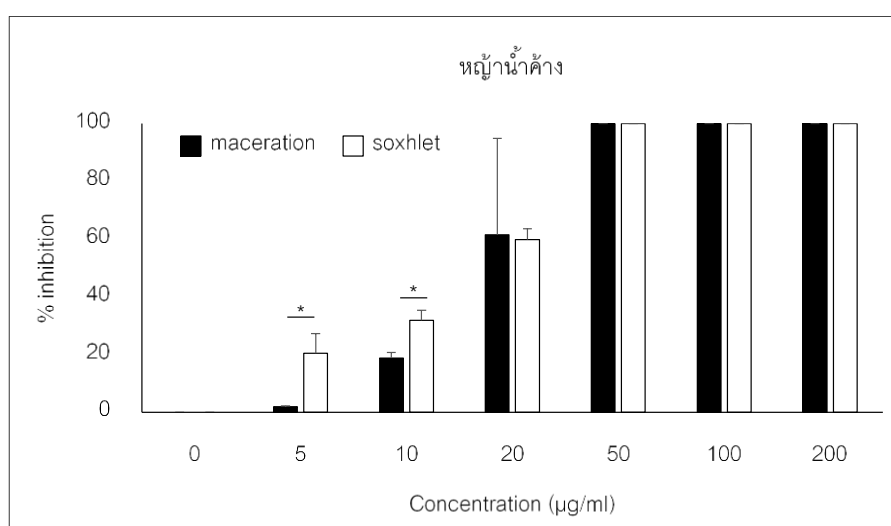
จากกราฟแท่งแสดงการเปรียบเทียบ %inhibition ด้วยวิธีวิเคราะห์ Proteinase inhibitory assay ระหว่างฝ้ายแดงที่สกัดด้วยวิธี maceration และ soxhlet ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0, 5, 10, 20, 50, 100 และ 200 µg/ml เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างการสกัดด้วยวิธี maceration และ soxhlet พบว่าสารสกัด

โดยวิธีการสกัดแบบ soxhlet ให้ผล %inhibition ที่ดีกว่าการสกัดด้วยวิธี maceration อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ทุกความเข้มข้น และมี %inhibition 100 % ตั้งแต่ความเข้มข้นที่ 50 $\mu\text{g/ml}$

ตารางที่ 5-5 แสดงค่าความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดเห็ดน้ำค่างด้วยวิธี maceration และ soxhlet

เห็ดน้ำค่าง	%inhibition	
	Maceration	Soxhlet
0 $\mu\text{g/ml}$	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
5 $\mu\text{g/ml}$	2.02 $\pm$ 0.21	20.42 $\pm$ 6.86
10 $\mu\text{g/ml}$	18.81 $\pm$ 1.97	31.81 $\pm$ 3.49
20 $\mu\text{g/ml}$	61.43 $\pm$ 33.41	59.86 $\pm$ 3.78
50 $\mu\text{g/ml}$	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00
100 $\mu\text{g/ml}$	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00
200 $\mu\text{g/ml}$	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00

หมายเหตุ ข้อมูล % inhibition เป็นค่าเฉลี่ย (mean) $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)



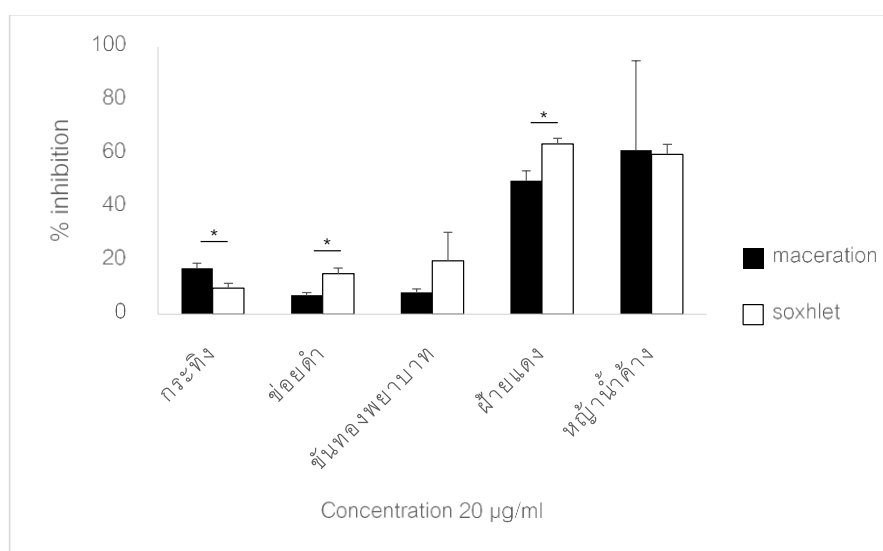
ภาพที่ 19-5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดเห็ดน้ำค่างด้วยวิธี maceration (ที่บ) และ soxhlet (ที่ป) กับ % inhibition ด้วยวิธีวิเคราะห์ Proteinase inhibitory assay แสดงค่าเป็น mean $\pm$ S.D. และ * $p\text{-value} < 0.05$

จากกราฟแท่งแสดงการเปรียบเทียบ %inhibition ด้วยวิธีวิเคราะห์ Proteinase inhibitory assay ระหว่างหนุ่ำน้าค้ำงที่สกัดด้วยวิธี maceration และ soxhlet ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0, 5, 10, 20, 50, 100 และ 200 µg/ml เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างการสกัดด้วยวิธี maceration และ soxhlet พบว่าสารสกัดโดยวิธีการสกัดแบบ soxhlet ให้ผล %inhibition ที่ดีกว่าการสกัดด้วยวิธี maceration อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ทุกความเข้มข้น และมี %inhibition 100 % ตั้งแต่ความเข้มข้นที่ 50 µg/ml

จากตารางข้างต้นสามารถนำค่า IC_{50} มาเปรียบเทียบกันได้ดังนี้

ตารางที่ 6 แสดงค่า IC_{50} ของพืชจาก Proteinase inhibitory assay

ตัวอย่าง	IC_{50} (µg/ml)	
	Maceration	Soxhlet
กระเทียม	64.58	68.25
ข่อยดำ	128.65	81.04
ชันทองพญาบาท	95.84	59.21
ฝ้ายแดง	20.03	14.97
หนุ่ำน้าค้ำง	17.32	16.48



ภาพที่ 20 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดที่ 20 µg/ml ด้วยวิธี maceration (ทึบ) และ soxhlet (โปร่ง) กับ % inhibition ด้วยวิธีวิเคราะห์ Proteinase inhibitory assay แสดงค่าเป็น mean ± S.D. และ * p -value < 0.05

จากผลข้างต้นแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินสัมพันธ์กับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของสารสกัดทั้งจากวิธี maceration และ soxhlet ดังแสดงในตารางที่ 5 และภาพที่ 19 โดยพบว่าสารสกัดทั้งจากวิธี soxhlet สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินได้ดีกว่าการสกัดด้วยวิธี maceration ในพืชทุกชนิดยกเว้นกระเทียม ที่ความเข้มข้น 5 – 20 $\mu\text{g/ml}$ โดยรวม และเมื่อพิจารณาจากค่า IC_{50} ดังตารางที่ 6 ร่วมกับการเปรียบเทียบระหว่างพืชที่ความเข้มข้น 20 $\mu\text{g/ml}$ ในภาพที่ 20 พบว่าสารสกัดเอธานอลทั้งวิธี maceration และ soxhlet นั้น ให้ผลไปในทิศทางเดียวกัน คือ สารสกัดฝ้ายแดงและสารสกัดหญ้าน้ำค้าง มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินสูงสุด เมื่อเทียบกับสารสกัดจากพืชสมุนไพรชนิดอื่น

4.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH assay

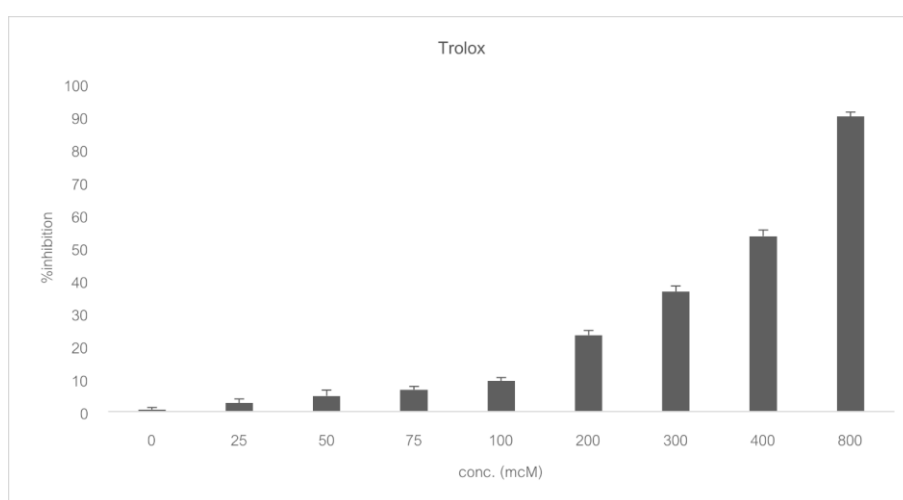
ในการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนี้ เป็นการทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยให้สารสกัดที่คาดว่ามีความต้านอนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับ DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่เสถียรมีสีม่วง โดยเมื่อ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระแล้วจะได้รับอิเล็กตรอนหรืออนุมูลอิสระไฮโดรเจนจากสารสกัด ทำให้ได้สารละลาย DPPH ที่เสถียรขึ้นและมีสีจางลง เป็นสีเหลือง ตรวจวัด $\text{DPPH}^{\bullet}$ ที่ลดลง โดยการวัดการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร และคำนวณหาความสามารถการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเทียบกับ Trolox เป็นสารละลายมาตรฐาน

จากการสกัดพืชทั้ง 5 ชนิดได้แก่ กระเทียม ข่อยดำ ชันทองพญาบาท ฝ้ายแดง และ หญ้าน้ำค้าง จากการสกัดโดยเอธานอล 95% ได้ผลในการยับยั้งดังนี้

ตารางที่ 7 แสดง %inhibition ที่ความเข้มข้นต่างๆของสารมาตรฐาน Trolox

Trolox conc. (μM)	%inhibition
0	0.624 $\pm$ 0.589
25	2.573 $\pm$ 1.232
50	4.756 $\pm$ 1.790
75	6.667 $\pm$ 0.999

100	9.318±1.087
200	23.275±1.465
300	36.608±1.699
400	53.45±1.954
800	90.019±1.395



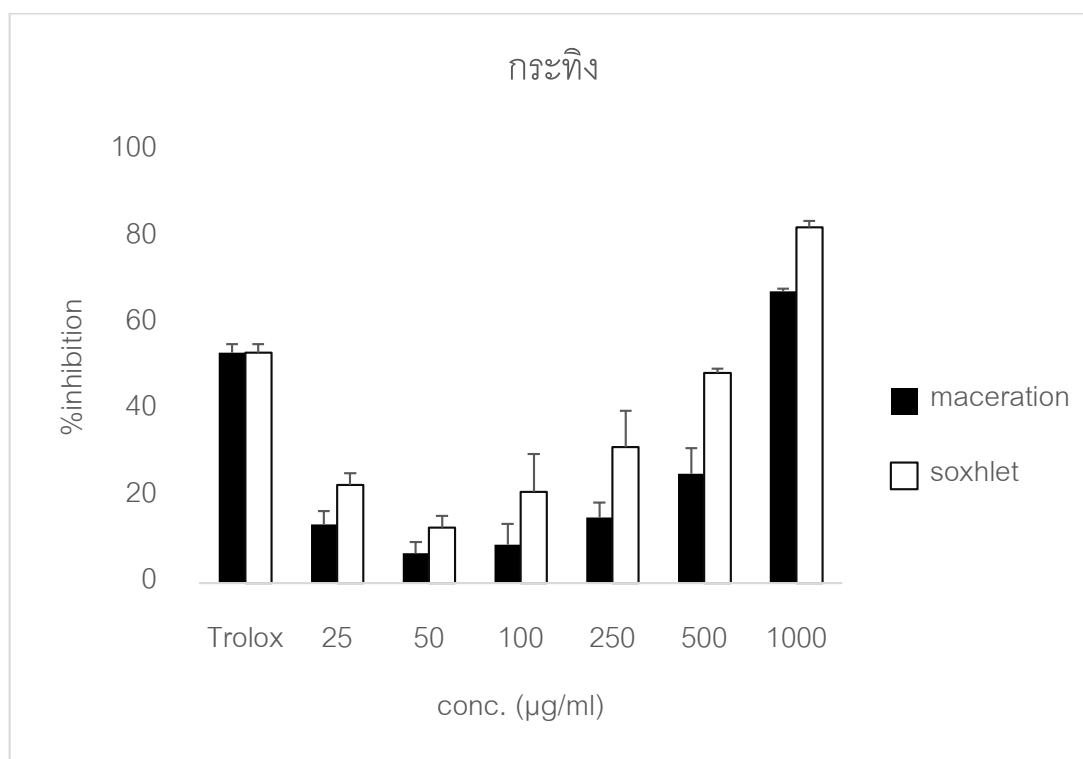
ภาพที่ 21 กราฟแสดง %inhibition ที่ความเข้มข้นต่างๆของสารมาตรฐาน Trolox วิเคราะห์ด้วย DPPH assay แสดงค่าเป็น mean $\pm$ S.D.

จากกราฟแสดง %inhibition ของสารมาตรฐาน Trolox พบว่าที่ความเข้มข้น 400 μ M สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ 50%

ตารางที่ 8-1 แสดง %inhibition ที่ความเข้มข้นต่างๆของกระเทียม

กระเทียม	%inhibition	
	Maceration	Soxhlet
25	13.567±3.114	22.768±2.693
50	6.979±2.590	12.904±2.590
100	8.928±4.779	21.092±8.778

250	15.243±3.415	31.540±8.366
500	25.38±5.833	48.733±1.009
1000	67.563±0.705	82.456±1.423

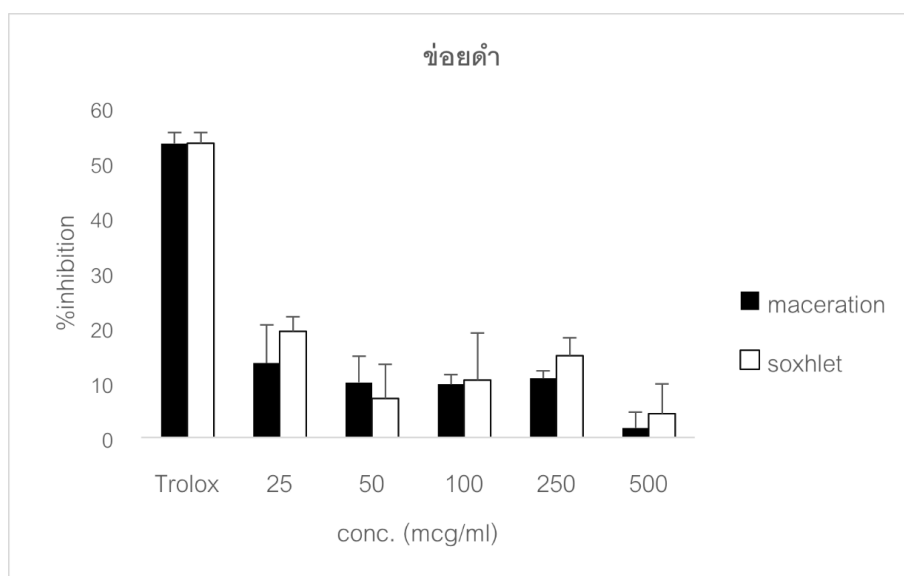


ภาพที่ 22-1 กราฟแสดงการเปรียบเทียบ %inhibition ระหว่างกระทิงที่สกัดด้วยวิธี maceration และ soxhlet ที่ความเข้มข้นต่างๆของสารมาตรฐาน Trolox ด้วยวิธีวิเคราะห์ DPPH assay แสดงค่าเป็น mean $\pm$ S.D.

จากกราฟแท่งแสดงการเปรียบเทียบ %inhibition โดยการทดสอบ DPPH ระหว่างกระทิงที่สกัดด้วยวิธี maceration และ soxhlet พบว่าที่ความเข้มข้นต่างๆของกระทิง ได้แก่ 25, 50, 100, 250, 500 และ 1000 µg/ml เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการสกัดโดย maceration และ soxhlet พบว่าสารสกัดโดยวิธีการสกัดแบบ soxhlet มีผล anti-oxidant ได้ดีกว่าการสกัดโดยวิธี maceration อย่างมีนัยสำคัญทุกความเข้มข้น และกระทิงที่สกัดโดย maceration และ soxhlet ที่ความเข้มข้น 25 -1,000 µg/ml ให้ผล anti-oxidant ดีกว่าสารมาตรฐาน Trolox 400 µM

ตารางที่ 8-2 แสดง %inhibition ที่ความเข้มข้นต่างๆของข่อยดำ

ข่อยดำ	%inhibition	
	Maceration	Soxhlet
25	13.49±7.010	1.559±2.701
50	9.981±4.740	7.095±6.138
100	9.668±1.692	10.448±1.692
250	10.721±1.415	14.854±1.415
500	1.715±2.870	4.366±2.870



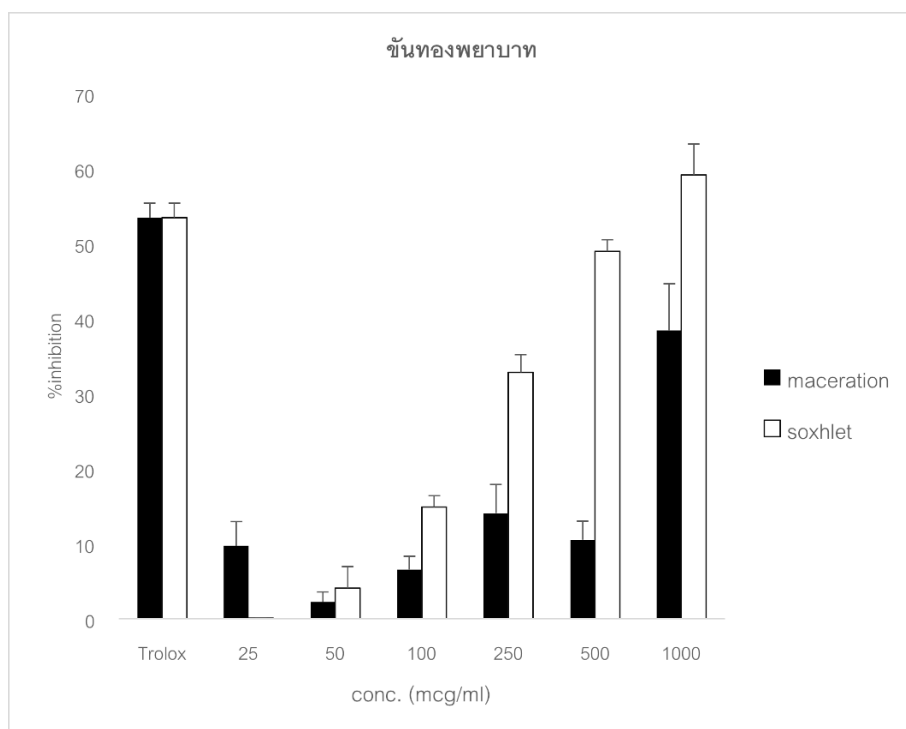
ภาพที่ 22-2 กราฟแสดงการเปรียบเทียบ %inhibition ระหว่างข่อยดำสกัดด้วยวิธี maceration และ soxhlet ที่ความเข้มข้นต่างๆของสารมาตรฐาน Trolox ด้วยวิธีวิเคราะห์ DPPH assay แสดงค่าเป็น mean $\pm$ S.D.

จากกราฟแท่งแสดงการเปรียบเทียบ %inhibition โดยการทดสอบ DPPH ระหว่างข่อยดำที่สกัดด้วยวิธี maceration และ soxhlet พบว่าที่ความเข้มข้นต่างๆของข่อยดำ ได้แก่ 25, 50, 100, 250 และ 500 μ g/ml เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการสกัดโดย maceration และ soxhlet ที่ความเข้มข้นต่างๆ ให้ผล

anti-oxidant ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และมีประสิทธิภาพในการ anti-oxidant ต่ำกว่าสารมาตรฐาน Trolox 400 μ M อย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 8-3 แสดง %inhibition ที่ความเข้มข้นต่างๆของชั้นของพยาบาท

ชั้นของพยาบาท	%inhibition	
	Maceration	Soxhlet
25	9.708 $\pm$ 3.230	0.039 $\pm$ 0.068
50	2.261 $\pm$ 1.331	4.055 $\pm$ 2.899
100	6.549 $\pm$ 1.801	14.893 $\pm$ 1.522
250	14.074 $\pm$ 3.810	32.826 $\pm$ 2.369
500	10.487 $\pm$ 2.515	48.967 $\pm$ 2.515
1000	38.441 $\pm$ 6.216	59.142 $\pm$ 6.216



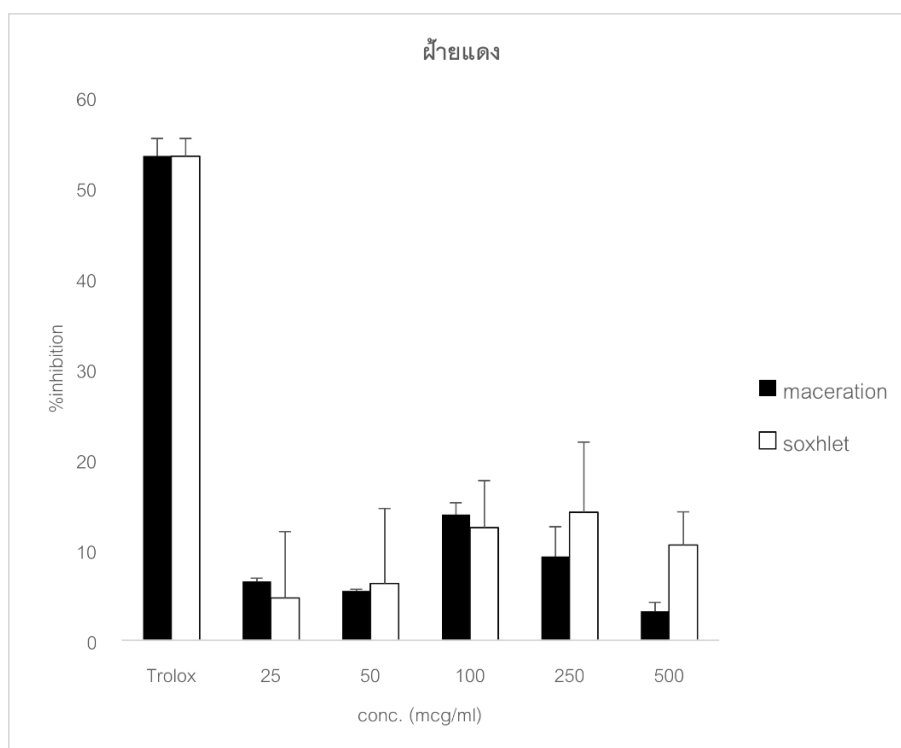
ภาพที่ 22-3 กราฟแสดงการเปรียบเทียบ %inhibition ระหว่างชั้นของพยาบาทสกัดด้วยวิธี maceration และ soxhlet ที่ความเข้มข้นต่างๆของสารมาตรฐาน Trolox ด้วยวิธีวิเคราะห์ DPPH assay แสดงค่าเป็น mean $\pm$ S.D.

จากกราฟแท่งแสดงการเปรียบเทียบ %inhibition โดยการทดสอบ DPPH ระหว่างชั้นของพยาบาทที่สกัดด้วยวิธี maceration และ soxhlet พบว่าที่ความเข้มข้นต่างๆของชั้นของพยาบาท ได้แก่ 25, 50, 100, 250, 500 และ 1000 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการสกัดโดย maceration และ soxhlet พบว่าสารสกัดโดยวิธีการสกัดแบบ soxhlet มีผล anti-oxidantion ได้ดีกว่าการสกัดโดยวิธี maceration อย่างมีนัยสำคัญทุกความเข้มข้นตั้งแต่ 50 $\mu\text{g/ml}$ และชั้นของพยาบาทที่สกัดโดย soxhlet ให้ผล anti-oxidant ได้กว่าสารมาตรฐาน Trolox 400 μM อย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 8-4 แสดง %inhibition ที่ความเข้มข้นต่างๆของฝ้ายแดง

ฝ้ายแดง	%inhibition	
	Maceration	Soxhlet
25	6.472 $\pm$ 0.357	4.678 $\pm$ 7.308
50	5.458 $\pm$ 0.179	6.238 $\pm$ 8.318

100	13.879±1.314	12.436±5.208
250	9.240±3.300	14.113±7.744
500	3.197±0.981	10.487±3.703

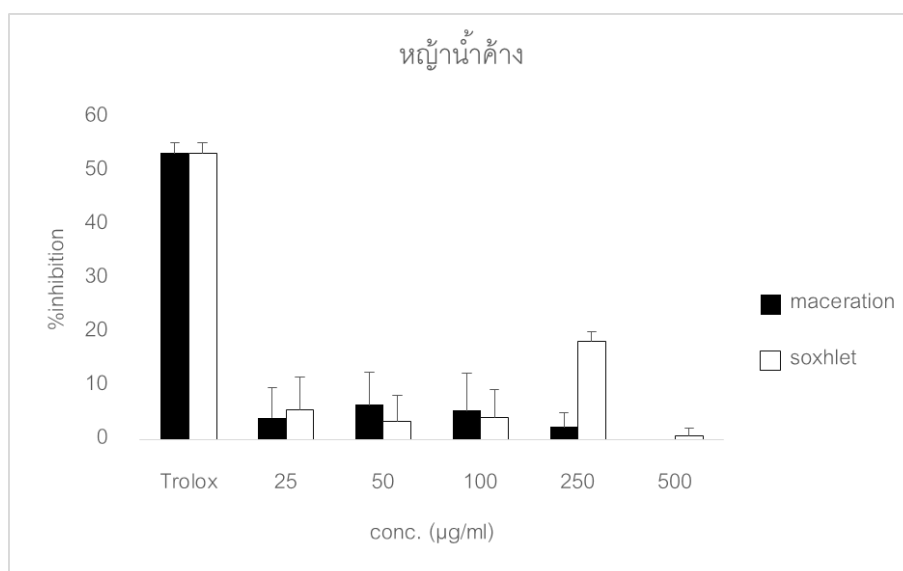


ภาพที่ 22-4 กราฟแสดงการเปรียบเทียบ %inhibition ระหว่างฝ้ายแดงสกัดด้วยวิธี maceration และ soxhlet ที่ความเข้มข้นต่างๆของสารมาตรฐาน Trolox ด้วยวิธีวิเคราะห์ DPPH assay แสดงค่าเป็น mean $\pm$ S.D.

จากกราฟแท่งแสดงการเปรียบเทียบ %inhibition โดยการทดสอบ DPPH ระหว่างฝ้ายแดงที่สกัดด้วยวิธี maceration และ soxhlet พบว่าที่ความเข้มข้นต่างๆของฝ้ายแดง ได้แก่ 25, 50, 100, 250 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการสกัดโดย maceration และ soxhlet พบว่าที่ความเข้มข้น 25 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ มีความสามารถในการ anti-oxidant ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนความเข้มข้น 50, 250 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ การสกัดโดย soxhlet ให้ผลในการ anti-oxidant ดีกว่า maceration แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และฝ้ายแดงจากการสกัดทั้ง 2 วิธีมีประสิทธิภาพในการ anti-oxidant ต่ำกว่าสารมาตรฐาน Trolox 400 μM อย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 8-5 แสดง %inhibition ที่ความเข้มข้นต่างๆของหญ้าน้ำค้าง

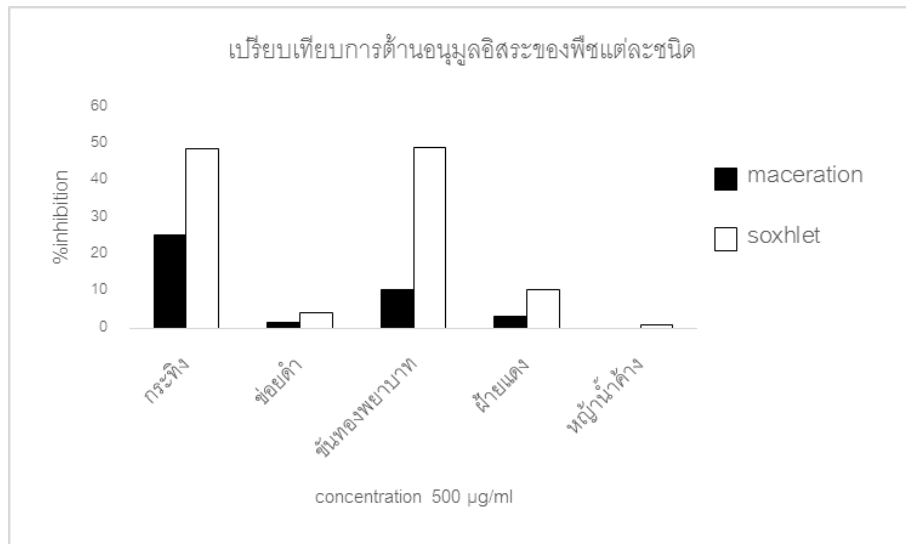
หญ้าน้ำค้าง	%inhibition	
	Maceration	Soxhlet
25	4.132±5.706	5.575±6.218
50	6.550±6.092	3.431±4.871
100	5.458±6.987	4.171±5.244
250	2.456±2.649	18.323±1.787
500	0	0.819±1.418



ภาพที่ 22-5 กราฟแสดงการเปรียบเทียบ %inhibition ระหว่างหญ้าน้ำค้างสกัดด้วยวิธี maceration และ soxhlet ที่ความเข้มข้นต่างๆของสารมาตรฐาน Trolox ด้วยวิธีวิเคราะห์ DPPH assay แสดงค่าเป็น mean $\pm$ S.D.

จากกราฟแท่งแสดงการเปรียบเทียบ %inhibition โดยการทดสอบ DPPH ระหว่างหญ้าน้ำค้างที่สกัดด้วยวิธี maceration และ soxhlet พบว่าที่ความเข้มข้นต่างๆของหญ้าน้ำค้าง ได้แก่ 25, 50 และ 100 µg/ml พบว่าความสามารถในการ anti-oxidant ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และที่ความเข้มข้น 250 และ 500 µg/ml ประสิทธิภาพในการ anti-oxidant แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ทุกความเข้มข้นของหญ้า

น้ำคั้นที่สกัดโดย maceration และ soxhlet มีประสิทธิภาพในการ anti-oxidant น้อยกว่าสารมาตรฐาน Trolox 400 μ M



ภาพที่ 23 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดที่ 500 μ g/ml ด้วยวิธี maceration และ soxhlet กับ %inhibition ด้วยวิธีวิเคราะห์ DPPH assay แสดงค่าเป็น mean $\pm$ S.D.

จากกราฟทั้งหมดพบว่ากระเทียม และขันทองพยับบาทเท่านั้นที่ผลในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดทั้งวิธี maceration และ soxhlet โดยพบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลทั้งหมดด้วยวิธี soxhlet ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าการสกัดโดย maceration และจากภาพที่ 23 พบว่าสารสกัดเอทานอลทั้งวิธี maceration และ soxhlet นั้นให้ผลไปในทิศทางเดียวกันคือ สารสกัดกระเทียมและสารสกัดขันทองพยับบาท มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด เมื่อเทียบกับสารสกัดสมุนไพรชนิดอื่นเมื่อเทียบที่ความเข้มข้นเดียวกันที่ความเข้มข้น 250 μ g/ml

4.4 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) โดยการ reduce Ferric III ion ให้เปลี่ยนไปเป็น Ferric II ion (Ferric reducing antioxidant power (FRAP) Assay)

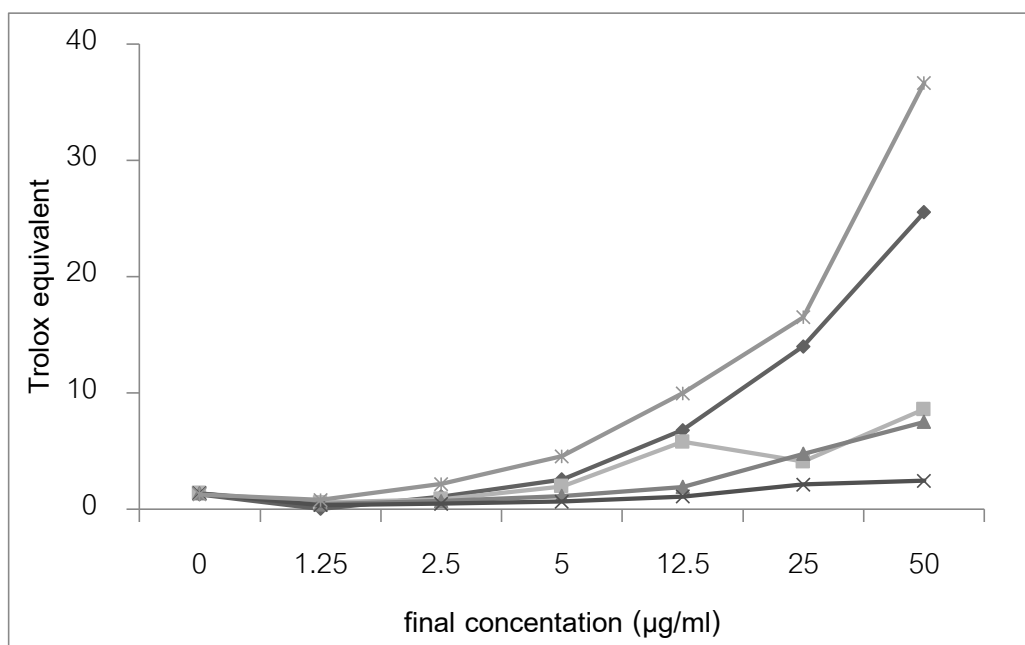
ในการตรวจสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระนี้ ใช้หลักการทำงานของสารที่สามารถถ่ายเทอิเล็กตรอนได้ โดยการถ่ายเทอิเล็กตรอนให้ Ferric III ion เปลี่ยนเป็น Ferric II ion ซึ่งมีสีฟ้าและตรวจวัด Ferric II ion ที่เพิ่มมากขึ้นด้วยเทคนิคสเปกโตรสโคปี โดยการดูดกลืนคลื่นแสงในช่วงความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรหลังจากทำการบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อรอให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ โดยสารที่สามารถถ่ายเทอิเล็กตรอนหรือมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนได้ดี จะทำให้มีการ

เพิ่มขึ้นของ Ferric II ion และทำให้สารละลายที่ได้หลังผสมจะมีสีฟ้าขึ้นตามปริมาณของ Ferric II ion หลังจากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณเพื่อหาความสามารถในการถ่ายเทอิเล็กตรอนเทียบกับหลอดควบคุมซึ่งเป็นสารมาตรฐาน Trolox แล้วรายงานค่าที่คำนวณได้เป็น Trolox Equivalent

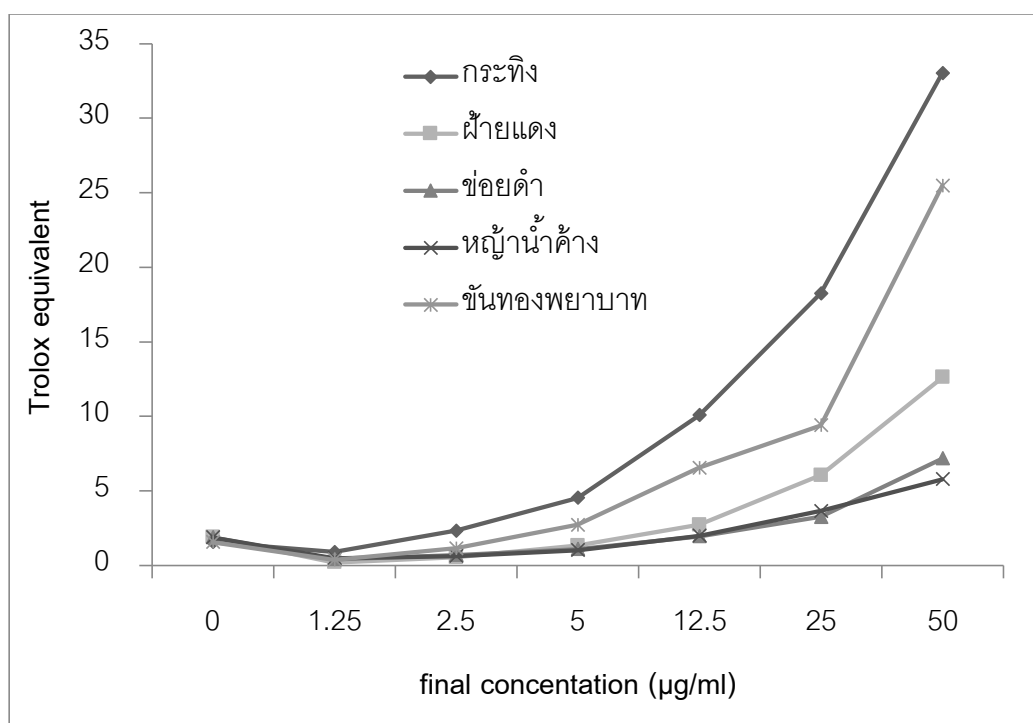
สารสกัดด้วยเอทานอลจากใบของกระทิงด้วยวิธีการสกัดแบบ Soxhlet แสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดและสัมพันธ์กับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของสารสกัด รองลงมาคือ ชันทองพยับบาท ฝ้ายแดง ข่อยดำและหญ้าน้ำค้างตามลำดับ โดยในส่วนของสารสกัดเอทานอลจากวิธี maceration พบว่าสารสกัดจากเปลือกของชันทองพยับบาทแสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดและสัมพันธ์กับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของสารสกัด รองลงมาคือ กระทิง ฝ้ายแดง ข่อยดำและหญ้าน้ำค้างตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่

24

เมื่อทำการเปรียบเทียบสารสกัดเอทานอลจากใบของกระทิงที่ความเข้มข้น 50 µg/ml จากการสกัดแบบ Soxhlet และ Maceration พบว่าสารสกัดเอทานอลด้วยวิธีการสกัดแบบ Soxhlet พบฤทธิ์ในการ reduce Ferric III ion ให้เปลี่ยนไปเป็น Ferric II ion ที่มากกว่าการสกัดแบบ Maceration มีค่า Trolox Equivalent เท่ากับ 33.0 ± 1.85 และ 25.5 ± 2.05 ตามลำดับ (ภาพที่ 25-1) เช่นเดียวกับสารสกัดเอทานอลจากใบฝ้ายแดงและหญ้าน้ำค้าง ซึ่งมีค่า Trolox Equivalent เท่ากับ 12.6 ± 1.73 และ 8.6 ± 0.6 , 5.8 ± 0.45 และ 2.4 ± 0.16 ตามลำดับ (ภาพที่ 25-4 และ 25-5) โดยในส่วนของสารสกัดเอทานอลจากเปลือกชันทองพยับบาทและใบข่อยดำ พบว่าสารสกัดเอทานอลด้วยวิธีการสกัดแบบ Maceration พบฤทธิ์ในการ reduce Ferric III ion ให้เปลี่ยนไปเป็น Ferric II ion ที่มากกว่าการสกัดแบบ Soxhlet มีค่า Trolox Equivalent เท่ากับ 36.7 ± 3.93 และ 25.5 ± 1.21 , 7.5 ± 0.70 และ 7.2 ± 0.68 ตามลำดับ (ภาพที่ 25-3 และ 25-2)

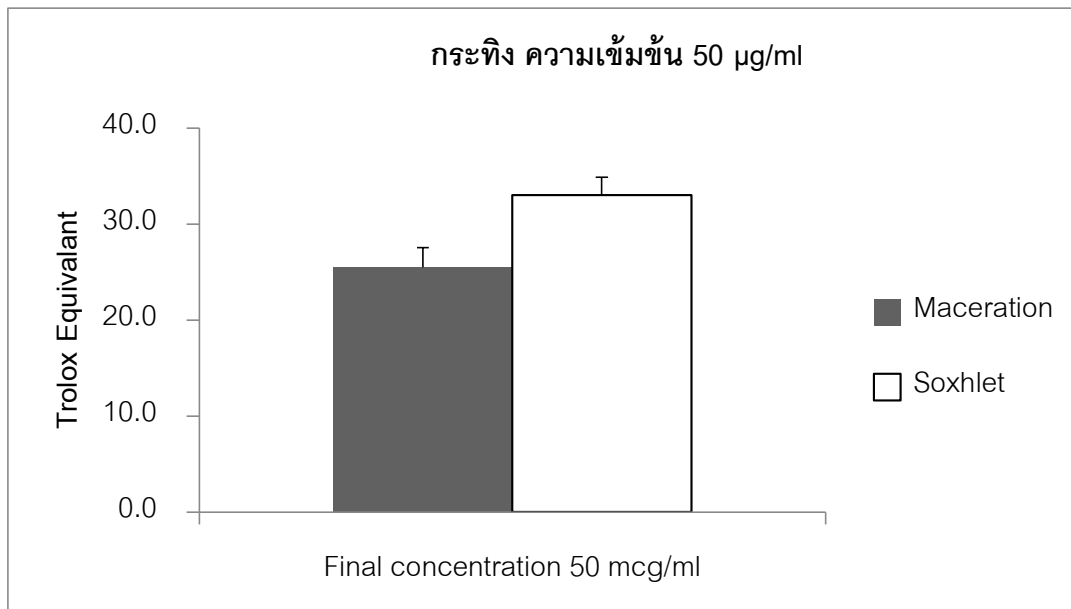


(A)

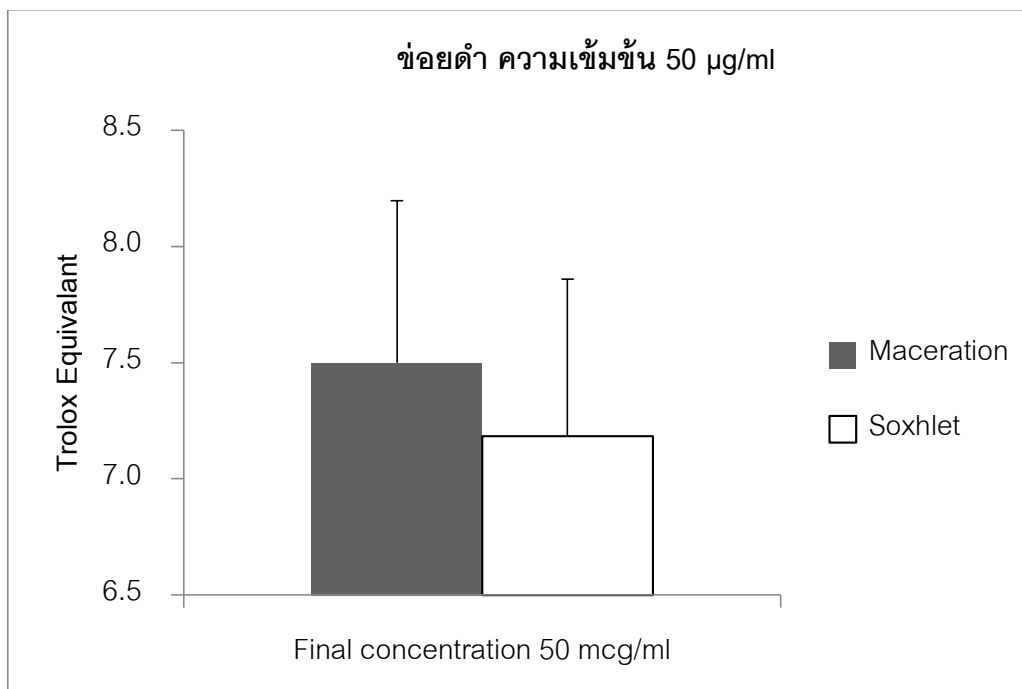


(B)

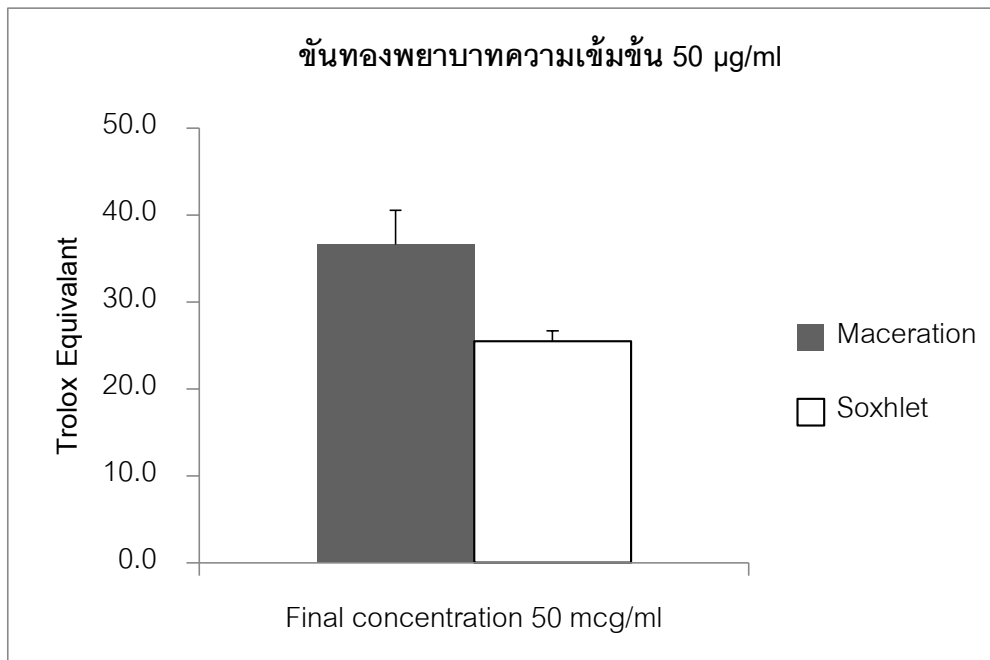
ภาพที่ 24 กราฟแสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ของพืชแต่ละชนิดในการ reduce Ferric III ion ให้เปลี่ยนไปเป็น Ferric II ion ด้วยวิธีทดสอบ FRAP Assay เทียบกับสารมาตรฐาน Trolox (A).แสดงการเปรียบเทียบพืชแต่ละชนิดที่ได้สารสกัดเอธานอลมาจากวิธีการสกัดแบบ Maceration (B).แสดงการเปรียบเทียบพืชแต่ละชนิดที่ได้สารสกัดเอธานอลมาจากวิธีการสกัดแบบ Soxhlet



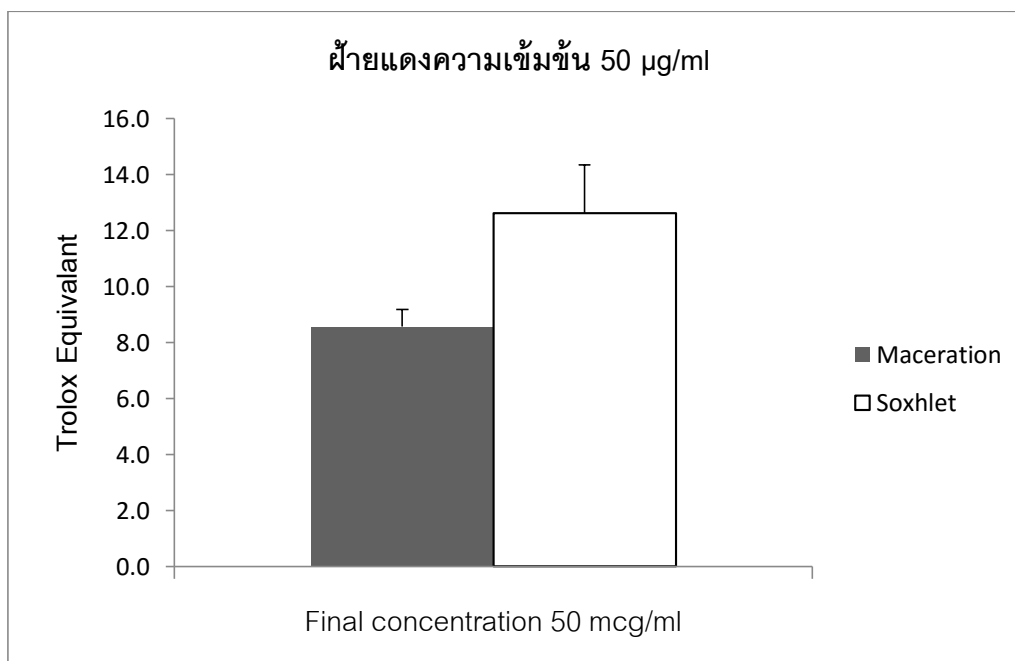
ภาพที่ 25-1 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ของใบกระเทียมในการ reduce Ferric III ion ให้เปลี่ยนไปเป็น Ferric II ion ด้วยวิธีทดสอบ FRAP Assay เทียบกับสารมาตรฐาน Trolox โดยกราฟแท่งซ้าย (ทึบ) เป็นผลจากการสกัดด้วยวิธีสกัดแบบ Maceration และกราฟแท่งขวา (โปร่ง) เป็นผลจากการสกัดด้วยวิธีสกัดแบบ Soxhlet



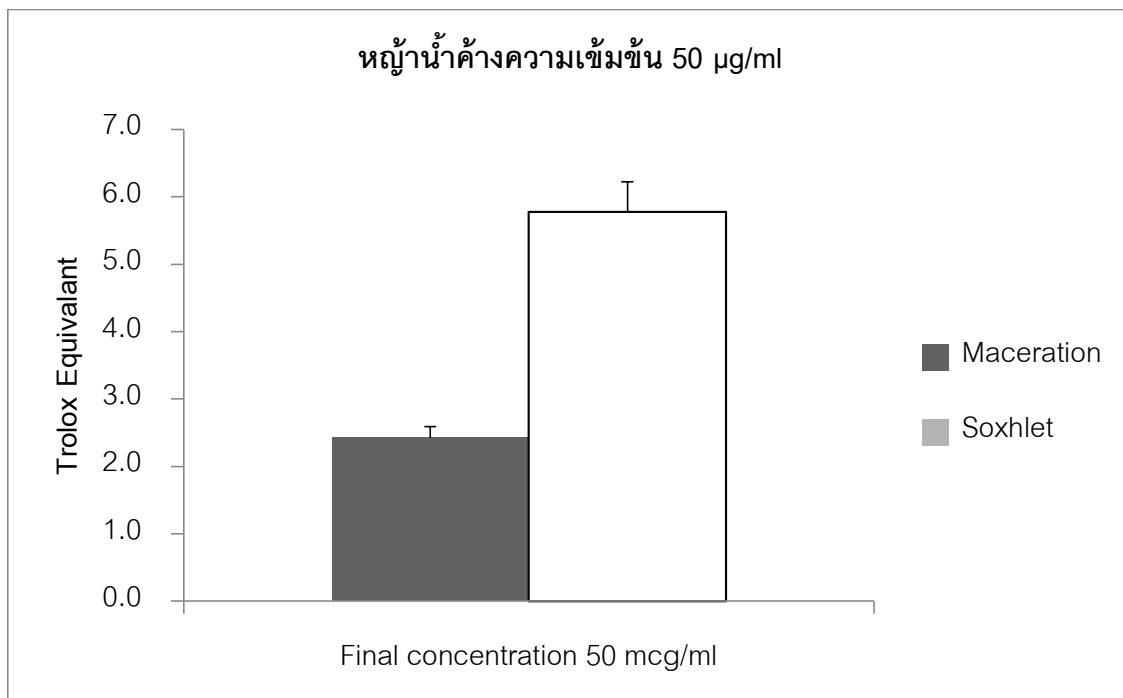
ภาพที่ 25-2 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ของใบข่อยดำในการ reduce Ferric III ion ให้เปลี่ยนไปเป็น Ferric II ion ด้วยวิธีทดสอบ FRAP Assay เทียบกับสารมาตรฐาน Trolox โดยกราฟแท่งซ้าย (ทึบ) เป็นผลจากการสกัดด้วยวิธีสกัดแบบ Maceration และกราฟแท่งขวา (โปร่ง) เป็นผลจากการสกัดด้วยวิธีสกัดแบบ Soxhlet



ภาพที่ 25-3 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ของเปลือกต้นชั้นทองพยาบาทในการ reduce Ferric III ion ให้เปลี่ยนไปเป็น Ferric II ion ด้วยวิธีทดสอบ FRAP Assay เทียบกับสารมาตรฐาน Trolox โดยกราฟแท่งซ้าย (ทึบ) เป็นผลจากการสกัดด้วยวิธีสกัดแบบ Maceration และกราฟแท่งขวา (โปร่ง) เป็นผลจากการสกัดด้วยวิธีสกัดแบบ Soxhlet



ภาพที่ 25-4 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ของใบฝ้ายแดงในการ reduce Ferric III ion ให้เปลี่ยนไปเป็น Ferric II ion ด้วยวิธีทดสอบ FRAP Assay เทียบกับสารมาตรฐาน Trolox โดยกราฟแท่งซ้าย (ทึบ) เป็นผลจากการสกัดด้วยวิธีสกัดแบบ Maceration และกราฟแท่งขวา (โปร่ง) เป็นผลจากการสกัดด้วยวิธีสกัดแบบ Soxhlet



ภาพที่ 25-5 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ของหญ้าน้ำค้างในการ reduce Ferric III ion ให้เปลี่ยนไปเป็น Ferric II ion ด้วยวิธีทดสอบ FRAP Assay เทียบกับสารมาตรฐาน Trolox โดยกราฟแท่งซ้าย (ทึบ) เป็นผลจากการสกัดด้วยวิธีสกัดแบบ Maceration และกราฟแท่งขวา (โปร่ง) เป็นผลจากการสกัดด้วยวิธีสกัดแบบ Soxhlet

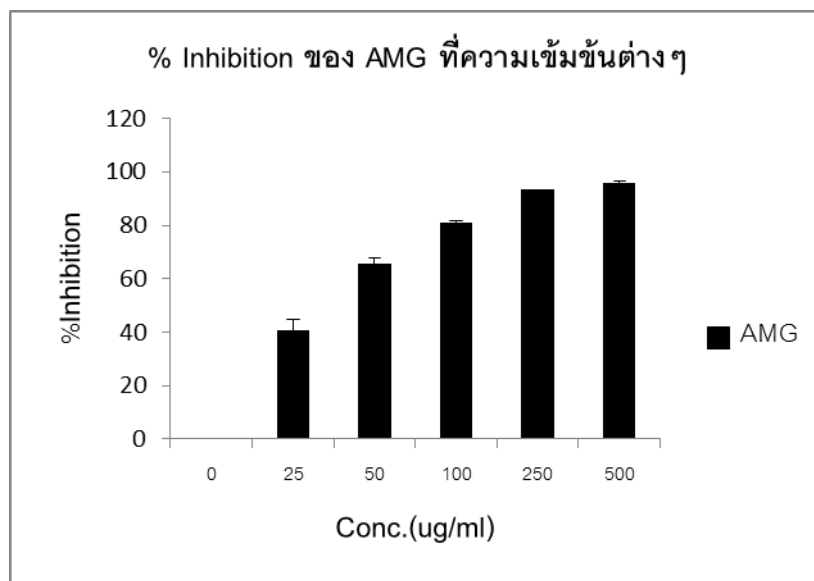
4.5 Anti- AGEs

ฤทธิ์ด้านการอักเสบโดยการยับยั้งการเกิด Advanced Glycation End Products (AGEs) ซึ่ง AGEs เกิดจากปฏิกิริยาไกลเคชัน โดยปฏิกิริยานี้เกิดจากการจับกันด้วยพันธะโควาเลนต์ระหว่างโมเลกุลของโปรตีนหรือไขมันกับ reducing sugar ซึ่งในการทดลองนี้ใช้โปรตีนคือ Bovine Serum Albumin (BSA), และใช้ reducing sugar คือ Fructose ซึ่งผลลัพธ์สุดท้ายของปฏิกิริยานี้จะได้ AGEs ออกมา จากการศึกษาค้นคว้าได้ทำการทดลองกับ Positive Control คือ Aminoguanidine (AMG) เพื่อพิสูจน์ว่าการสร้างปฏิกิริยาไกลเคชันนี้สามารถเกิด AGEs ได้จริงโดยดูจากความสามารถในการยับยั้งของ AMG ซึ่งการที่เกิด AGEs มีผลทำให้เกิดอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นและ AGEs สามารถกระตุ้นสารก่อการอักเสบได้ ทำให้เกิดการศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบผ่านกลไกนี้ขึ้นมา

จากการทดลองนำสารสกัดของกระเทียมและชันทองพญาบาทที่ทำการสกัดด้วย 95%Ethanol ด้วยวิธี Maceration และ Soxhlet ที่ความเข้มข้นต่างๆมาศึกษาการยับยั้งการเกิด AGEs โดยนำมาวัดผลการยับยั้งด้วยเครื่อง Spectrofluorometer ซึ่งใช้ค่าExcitation คือ 340 nm และค่าEmission คือ 440 nm พบว่าในสารสกัดของกระเทียมวิธี Soxhlet มี %Inhibition ที่สูงกว่าวิธี Maceration ในทุกๆความเข้มข้น ส่วนในสารสกัดของชันทองพญาบาทพบว่าทั้งวิธี Maceration และวิธี Soxhlet ในความเข้มข้นเริ่มต้นที่ทำการศึกษา (125 µg/ml) มีการยับยั้ง 98.4785% สำหรับวิธี Maceration และ 100% สำหรับวิธี Soxhlet ส่วนในความเข้มข้นอื่นๆที่สูงกว่านี้พบว่ามี %Inhibition ที่ 100% ทั้งหมด

ตารางที่ 9 แสดงการรายงานผลการยับยั้ง AGEs ของ AMG

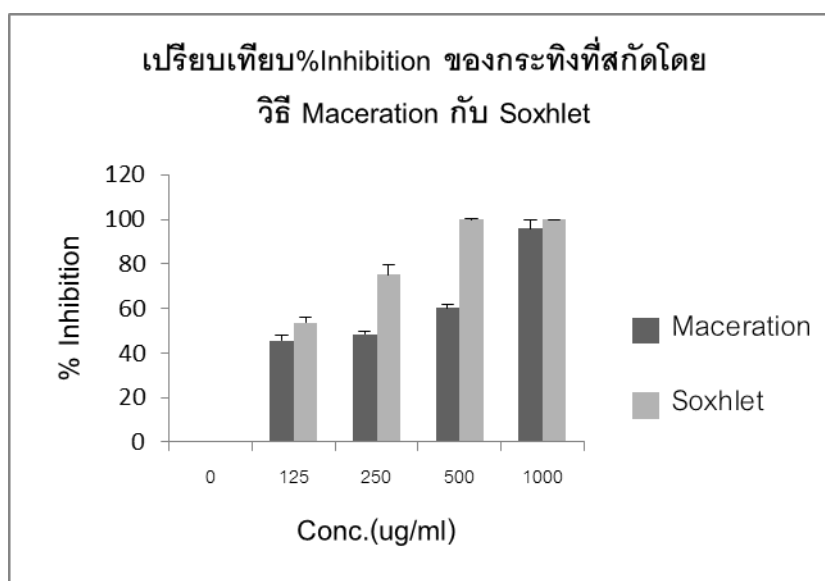
AMG conc. (µg/ml)	% Inhibition	S.D.
0	0.000	0.000
25	40.518	4.489
50	65.402	2.164
100	81.062	0.725
250	93.210	0.068
500	95.998	0.614



ภาพที่ 26 กราฟแสดง % Inhibition ของ AMG ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ตารางที่ 10-1 แสดงการรายงานผลการยับยั้ง AGEs ของสารสกัดกระเทียม

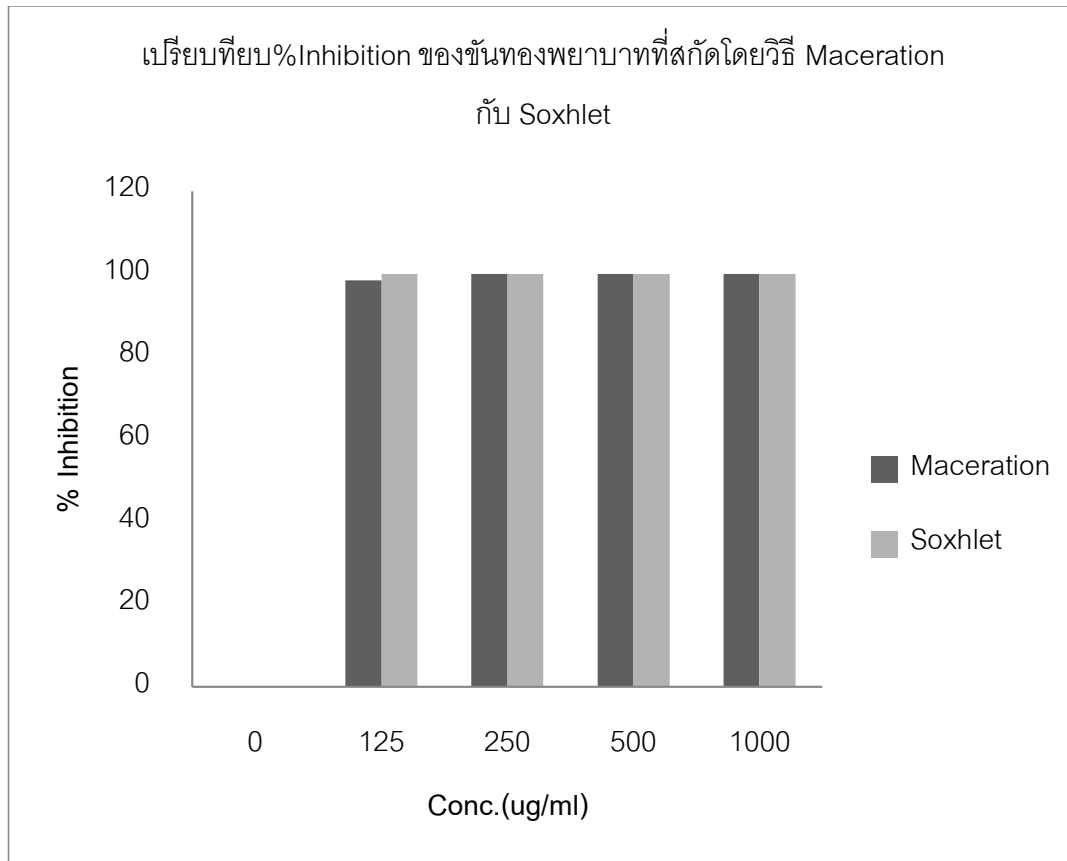
กระเทียม conc. (µg/ml)	% Inhibition	
	Maceration	Soxhlet
0	0.000	0.000
125	45.403	53.570
250	48.332	75.108
500	60.150	99.739
1000	95.798	100.000



ภาพที่ 27-1 กราฟแสดง % Inhibition ของสารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้นต่างๆ

ตารางที่ 10-2 แสดงการรายงานผลการยับยั้ง AGEs ของสารสกัดขันทองพยาบาท

ขันทองพยาบาท conc. (µg/ml)	% Inhibition	
	Maceration	Soxhlet
0	0.000	0.000
125	98.478	100.000
250	100.000	100.000
500	100.000	100.000
1000	100.000	100.000



ภาพที่ 27-2 กราฟแสดง % Inhibition ของสารสกัดชั้นของพยาบาทที่ความเข้มข้นต่างๆ

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

การศึกษาการประเมินฤทธิ์ด้านการอักเสบในสมุนไพรที่อยู่ในภาคตะวันออกของประเทศ ไทยในสารสกัดจากพืช 5 ชนิด ได้แก่ กระเทียม ขมิ้นชัน ขมิ้นชัน ขมิ้นชัน ขมิ้นชัน และขมิ้นชัน นำมาสกัด ด้วย ethanol ด้วยวิธี Soxhlet extraction และ Maceration และนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological activity) ฤทธิ์ด้านการอักเสบทั้งโดยวิธีทางตรง โดยใช้ Proteinase inhibitory assay และทางอ้อม จะทดสอบฤทธิ์ Antioxidant โดยใช้ FRAP และ DPPH รวมถึงการทดสอบ Anti-AGEs activity ในพืชที่ทำการ ตรวจสอบแล้วพบว่าที่ให้ฤทธิ์ดี

หลักการ Proteinase inhibitory assay ใช้ casein เปรียบเสมือนโปรตีนในร่างกาย ซึ่งหากใส่ trypsin เข้าไป จะไปย่อย casein เกิดการกระตุ้นสารก่อการอักเสบได้ ดังนั้นหากสารที่เราทำการทดสอบมี ฤทธิ์ในการยับยั้งการอักเสบ สารจะไปจับที่ casein ทำให้ trypsin ไปย่อย casein ไม่ได้ จึงสามารถยับยั้ง การเกิดการอักเสบได้ สำหรับ Antioxidant จะสามารถทำให้เกิด ROS ซึ่งเป็นกลไกที่สามารถกระตุ้นให้เกิด การอักเสบได้ และสำหรับ Advanced Glycation End Products หรือ AGEs เกิดจากการที่โปรตีนจับกับ reducing sugar เกิดปฏิกิริยา glycation ได้ผลลัพธ์คือ AGEs ซึ่งสามารถกระตุ้นสารก่อการอักเสบได้ ใน การทดลองเราใช้ BSA เป็นโปรตีนและใช้ D-Fructose เป็น reducing sugar เพื่อทำให้เกิดการสร้าง AGEs เพื่อนำมาใช้ทดสอบการยับยั้งการเกิด AGEs

จากการทดสอบฤทธิ์การต้านการอักเสบของพืชด้วย Proteinase inhibitory assay ผลการ ทดลองสรุปว่าขมิ้นชัน และขมิ้นชันเป็นพืชที่ให้ฤทธิ์ anti-inflammatory ดีที่สุด ขมิ้นชันมี ค่า IC_{50} เท่ากับ 20.03 และ 14.97 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อสกัดด้วย Maceration และ Soxhlet extraction ตามลำดับ ขมิ้นชันมีค่า IC_{50} เท่ากับ 17.32 และ 16.48 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อสกัดด้วย Maceration และ Soxhlet extraction ตามลำดับ และการสกัดโดยใช้ Soxhlet จะให้ฤทธิ์ที่ดีกว่าในพืชทุกชนิดยกเว้น กระเทียม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาว่าขมิ้นชันมีฤทธิ์ช่วยในการสมานแผลได้ (10) และสำหรับ ขมิ้นชันพบการรายงานผลเกี่ยวกับ anti-oxidation (11) ยังไม่เคยมีรายงานกลไกในการต้านการอักเสบ โดยตรงจึงควรทำการทดลองเพื่อศึกษาเพิ่มเติม

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH assay ผลการทดลองสรุปว่า กระเทียม และขมิ้นชันเท่ากันที่ผลในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดทั้งวิธี maceration และ soxhlet โดยพบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลทั้งหมดด้วยวิธี soxhlet ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้ดีกว่าการสกัดโดย maceration

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี FRAP assay ผลการทดลองสรุปว่า สารสกัด ด้วยเอทานอลจากใบของกระเทียมด้วยวิธีการสกัดแบบ Soxhlet แสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดและ

สัมพันธ์กับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของสารสกัดที่ความเข้มข้น 50 µg/ml มีค่า Trolox Equivalent เท่ากับ 33.0 ± 1.85 โดยในส่วนของสารสกัดเอธานอลจากวิธี maceration พบว่าสารสกัดจากเปลือกของชันทองพญาบาทแสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุดและสัมพันธ์กับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของสารสกัด มีค่า Trolox Equivalent เท่ากับ 36.7 ± 3.93 รองลงมาคือสารสกัดจากกระทิง

จากการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบโดยการยับยั้งการเกิด Advanced Glycation End Products (AGEs) ของสารสกัดกระทิงและชันทองพญาบาท พบว่าในสารสกัดของกระทิงวิธี Soxhlet มี %Inhibition ที่สูงกว่าวิธี Maceration ในทุกๆความเข้มข้น ส่วนในสารสกัดของชันทองพญาบาทพบว่าทั้งวิธี Maceration และวิธี Soxhlet ในความเข้มข้นเริ่มต้นที่ทำการศึกษา (125 µg/ml) มีการยับยั้ง 98.4785% สำหรับวิธี Maceration และ 100% สำหรับวิธี Soxhlet ส่วนในความเข้มข้นอื่นๆที่สูงกว่านี้พบว่ามี %Inhibition ที่ 100% ทั้งหมด ดังนั้นจึงไม่สามารถสรุปผลการทดลองได้เนื่องจากไม่ได้ทำการศึกษาในความเข้มข้นที่ต่ำกว่านี้ จึงควรมีการทำการการศึกษาเพิ่มเติม

จะเห็นได้ว่าจากผลการทดลองทุกความทดลองมีความสอดคล้องกัน คือการสกัดโดยใช้ Soxhlet extraction โดยรวมจะให้ฤทธิ์ที่ดีกว่าการสกัดด้วยวิธี maceration การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบโดยวิธีทางตรง พบว่า ฝ้ายแดงและหญ้าน้ำค้าง เป็นพืชที่ให้ฤทธิ์ดีที่สุด ซึ่งฝ้ายแดงได้มีการทดสอบโดย Saptarini และคณะ ในปี 2015 (33) พบว่ามีสารในกลุ่ม Flavonoids, Polyphenolics, Tannins, Alkaloids, Saponins, Quinones, Steroids /triterpenoids ซึ่งสามารถยับยั้ง PGE₂ ซึ่งเป็นสารที่ถูกสร้างโดย COX₂ ทำให้มีฤทธิ์การด้านการอักเสบได้ (33) ส่วนหญ้าน้ำค้าง Asirvatham และคณะ ได้มีการทำการทดลองในปี 2013 (11) พบสารในกลุ่ม naphthoquinones, Quercetin เมื่อทดสอบกับ cell พบว่า หญ้าน้ำค้างมีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งและยังคงมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี (11) แต่อย่างไรก็ตามในอนาคต ควรมีการทดสอบหากลไกในการด้านการอักเสบเพิ่มเติม

การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบโดยวิธีทางอ้อมจากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย FRAP และ DPPH assay ให้ผลไปในทิศทางเดียวกันคือ กระทิงและชันทองพญาบาท เป็นพืชให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด ซึ่งกระทิงได้มีการทดสอบโดย Nguyen และคณะ ในปี 2013 (34) พบว่ามีสารในกลุ่ม coumarins, xanthonenes, flavonoids, steroids, and triterpenoids, Calophyllolide (CP) และพบว่ามีกลไกคือ จะไปเพิ่มจำนวนตัวรับสัญญาณประสาทหรือ receptor ของ IL-10 มากขึ้น (up-regulation) (34) และชันทองพญาบาทได้มีการทำการทดสอบโดย Tewtrakul และคณะ ในปี 2010 (8) พบสารในกลุ่ม diterpenoids และพบว่ามีกลไกยับยั้ง lipopolysaccharide (LPS)-induced nitric oxide (NO) และ prostaglandin E₂ (PGE₂) ส่งผลให้มีฤทธิ์ในการด้านการอักเสบได้

สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างผลการศึกษาในครั้งนี้ ซึ่งรวมถึงองค์ความรู้ของภูมิปัญญาชาวบ้านที่นำพืชสมุนไพรมาใช้ในฤทธิ์ด้านการอักเสบ วิเคราะห์ได้ดังนี้ การด้านการอักเสบโดยตรง (Anti-

Inflammatory) พบว่าพืชทั้ง 5 ชนิดมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบโดยเมื่อสกัดด้วยวิธี Maceration หรือน้ำคั้นให้ฤทธิ์ดีที่สุด ($IC_{50}=17.32 \mu\text{g/ml}$) ส่วนวิธี Soxhlet ฝ้ายแดงให้ฤทธิ์ดีที่สุด ($IC_{50}=14.97 \mu\text{g/ml}$) การต้านการอักเสบโดยอนุมูลไคที่ 1 คือการต้านอนุมูลอิสระ ทดสอบด้วยวิธี DPPH assay และ FRAP assay พบว่าในวิธี DPPH assay มีแค่กระเทียมและชันทองพญาบาทที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแต่ก็มีฤทธิ์ไม่ดีเท่าสารละลายมาตรฐาน Trolox ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในวิธี FRAP assay สรุปได้ว่ากระเทียมและชันทองพญาบาทมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสัมพันธ์กับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นทั้งในการสกัดด้วยวิธี Maceration และ Soxhlet สุดท้ายการต้านการอักเสบโดยอนุมูลไคที่ 2 คือการยับยั้งการเกิด Advanced Glycation End Products (Anti-AGEs) มีการศึกษาในสารสกัดเพียง 2 ชนิดคือกระเทียมและชันทองพญาบาท สรุปได้ว่ากระเทียมมีฤทธิ์ Anti-AGEs ส่วนในชันทองพญาบาทคาดว่าน่าจะมีฤทธิ์ Anti-AGEs แต่ในการศึกษาค้างนี้ยังไม่สามารถสรุปได้ควรมีการทำการการศึกษาเพิ่มเติม

เอกสารอ้างอิง

1. สุภาพ บุญไชย. ภูมิศาสตร์ประเทศไทย. 2 ed. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์; 2549. 334 p.
2. นิวัติ เรืองพานิช. ป่าและการป่าไม้ในประเทศไทย. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ คณะวนศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยาป่าไม้; 2548. 476 p.
3. ธวัชชัย ปทุมหล่อทอง. เกร็ดน่ารู้ประเทศไทย ภาคตะวันออก. กรุงเทพฯ: น้ำฝน; 2548.
4. สุรเกียรติ อชานานุภาพ สห. คู่มือหมอชาวบ้าน. กรุงเทพฯ: หมอชาวบ้าน, บจก.สนพ.; 2554.
5. Kumar V AA, Fausto N. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 7 ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005.
6. Crofford LJ LP, Brooks P, Abramson SB, Simon LS, van de Putte LB. Basic biology and clinical application of specific cyclooxygenase-2 inhibitors. Arthritis Rheum. 2000;43:4-13.
7. นางลักษณ์ สุขวานิชย์ศิลป์. ยาบรบทการอักเสบที่ไม่ใช่สเตอรอยด์. In: 2, editor. เกษัชวิทยาเล่ม 3. กรุงเทพฯ: ไทยมิตรการพิมพ์; 2537. p. 69-90.
8. Tewtrakul S, Subhadhirasakul S, Cheenpracha S, Yodsaoue O, Ponglimanont C, Karalai C. Anti-inflammatory principles of Suregada multiflora against nitric oxide and prostaglandin E2 releases. Journal of ethnopharmacology. 2011;133(1):63-6.
9. Phosrithong N, Nuchtavorn N. Antioxidant and anti-inflammatory activities of Clerodendrum leaf extracts collected in Thailand. European Journal of Integrative Medicine. 2016;8(3):281-5.
10. Annan K, Houghton PJ. Antibacterial, antioxidant and fibroblast growth stimulation of aqueous extracts of Ficus asperifolia Miq. and Gossypium arboreum L., wound-healing plants of Ghana. Journal of ethnopharmacology. 2008;119(1):141-4.
11. Asirvatham R, Christina AJ, Murali A. In vitro antioxidant and anticancer activity studies on drosera indica L. (Droseraceae). Advanced pharmaceutical bulletin. 2013;3(1):115-20.
12. Zakaria MB, Vijayasekaran, Ilham Z, Muhamad NA. Anti-inflammatory Activity of Calophyllum Inophyllum Fruits Extracts. Procedia Chemistry. 2014;13:218-20.
13. สำนักงานหอพรรณไม้. กระทิง [อินเทอร์เน็ต]. สารานุกรมพืชในประเทศไทย (ฉบับย่อ) [เข้าถึงเมื่อ 2560 พ.ย. 2]. เข้าถึงได้จาก:
<http://www.dnp.go.th/botany/detail.aspx?wordnamesci=Calophyllum0inophyllum0L>.
14. นพพล เกตุประสาท, ไพโร มัทธวรรตน์. กระทิง [อินเทอร์เน็ต]. ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง [เข้าถึงเมื่อ 2560 พ.ย. 2]. เข้าถึงได้จาก:
<http://clgc.agri.kps.ku.ac.th/index.php/linkoldfragrant/68-calophyllum>

15. จำรัส เซ็นนิล. มหัศจรรย์ข่อยดำ [อินเทอร์เน็ต]. บ้านส่งเสริมปลูกสมุนไพรไทย [เข้าถึงเมื่อ 2560 พ.ย. 2]. เข้าถึงได้จาก: <http://www.jamrat.net/jamrathealth.aspx?blogid=1382>
16. มัณฑนา นวลเจริญ. พรรณไม้ป่าชายหาด. ปทุมธานี. สำนักพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ 2552 หน้า 53
17. สุदारัตน์ หอมหวล. ขันทองพยาบาท [อินเทอร์เน็ต].ฐานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี [เข้าถึงเมื่อ 2560 พ.ย. 2]. เข้าถึงได้จาก: <http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=206>
18. อุทยานธรรมชาติวิทยาสิริรัฐชาติ. ฝ้ายแดง [อินเทอร์เน็ต]. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล [เข้าถึงเมื่อ 2560 ต.ค. 31]. เข้าถึงได้จาก: http://www.pharmacy.mahidol.ac.th/newspdf/sirimedinfo/92_th.pdf
19. Powthongchin C. ใบฝ้ายแดง (Tree cotton) [Internet]. [cited 2017 Sep 24]. Available form: <https://www.flickr.com/photos/tik-th/3921972271>
20. สุदारัตน์ หอมหวล. ใญ่น้ำค้าง [อินเทอร์เน็ต]. ฐานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี [เข้าถึงเมื่อ 2560 พ.ย. 2]. เข้าถึงได้จาก: <http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=296>
21. สุรพันธุ์ คุณอมรพงศ์. การอักเสบและการซ่อมแซม (Inflammation and Repair) [cited 2560 ก.พ. 14]. Available from: <http://www.med.cmu.ac.th/dept/patho/Lecture/07-09-inflammation&repair-text.pdf>.
22. Health I. Inflammation 2017 [cited 2017 Mar 16]. Available from: <http://iahealth.net/inflammation/>.
23. พีรยุทธ สิทธิไชยากุล. Acute and chronic inflammation 2009 [cited 2017 Mar 16]. Available from: <http://www.meded.nu.ac.th/backoffice/attachments/ACUTE%20AND%20CHRONIC%20INFLAMMATION.pdf>.
24. Kumar V AA, Fausto N. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 7 ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005.

25. กนกวรรณ จารุกัจจ วส, ชรินญา พิมพ์สอน,. ความสัมพันธ์ของภาวะเครียดออกซิเดชันและภาวะไขมันในเลือดสูง. วารสารพิษวิทยาไทย 2557;29:57-69.
26. เพ็ญพรรณ เวชวิทยาขลัง. ฤทธิ์ด้านการอักเสบของโสม. วารสารไทยเภสัชยนิพนธ์. 2555;7:1-16.
27. Lavie L LP. Molecular mechanisms of cardiovascular disease in OSAHS: the oxidative stress link. Eur Respir. 2009;33:1467–84.
28. พัทนิล วัชรพันธ์ เถ. โรคเบาหวานกับการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อใน และเนื้อเยื่อรอบรากฟัน 2558 [cited 2560 เม.ย. 4]. Available from:
<http://www.dent.psu.ac.th/unit/djournal/images/pdf/jouanalkewalin.pdf>.
29. Lyer BK. Protein Glycation and Diabetes. Emerging therapy options [Internet]. 2011 2017 Apr 5. Available from: <https://www.slideshare.net/iyerbk/age-final>.
30. ฉัตรชัย ศรีบัณฑิต. ภาวะการอักเสบในร่างกายเกิดขึ้นได้อย่างไร 2558 [cited 2560 ก.พ. 14]. Available from: <http://www.absolute-health.org/thai/article-th-040.htm>.
31. Gutierrez RP. Inhibition of Advanced Glycation End-Product Formation by Origanum majorana L: Hindawi Publishing Corporation; 2012.
32. สมาคมเพื่อการวิจัยอนุมูลอิสระไทย (สวอ.). อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ. เองวานิช ว, editor. เชียงใหม่: สมาร์ท โคตติง แอนด์ เซอร์วิส; 2555.
33. Saptarini NM, Deswati DA. The Antipyretic Activity of Leaves Extract of Ceiba pentandra Better than Gossypium arboreum. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2015;5(07):118-20
34. Nguyen VL, Truong CT, Nguyen BQ, et al. Anti-inflammatory and wound healing activities of calophyllolide isolated from Calophyllum inophyllum Linn. peer-reviewed open access scientific journal. 2017; 12(10):1-16
35. Prasad J, Shrivastava A, Khanna AK, et al. Antidyslipidemic and antioxidant activity of the constituents isolated from the leaves of Calophyllum inophyllum. Phytomedicine. 2012;19(14):1245-9