



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การศึกษาการเสริมฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบของสารสกัดใบโหระพาต่อสารสกัดชาเขียว

โดยใช้โมเดลของเซลล์มาโครฟาจ

Synergistic effect of Green Tea's (*Camellia sinensis* (L.) Okuntze.)

Anti-Inflammatory Effects with Extracts of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.)

in Macrophages Cell Lines

โดย

นสภ. ทิตธรา	อนันต์มานะ	รหัสனிสิต 60210116
นสภ. ปภาวรินทร์	ฟ้าใสสินันท์	รหัสனிสิต 60210125
นสภ. ณิชาดา	พินเขียว	รหัสனிสิต 60210159

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2564

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การศึกษาการเสริมฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบของสารสกัดใบโหระพาต่อสารสกัดชาเขียว

โดยใช้โมเดลของเซลล์มาโครฟาจ

Synergistic effect of Green Tea's (*Camellia sinensis* (L.) Okuntze.)

Anti-Inflammatory Effects with Extracts of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.)

in Macrophages Cell Lines

โดย

นสภ. ทิศจรา	อนันต์มานะ	รหัสสถิติ 60210116
นสภ. ปภาวรินทร์	ฟ้าใสสินันท์	รหัสสถิติ 60210125
นสภ. ณิชาดา	พินเขี้ยว	รหัสสถิติ 60210159

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2564

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของวิชา 791591 โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ 2 ชั้นปีที่ 5 เพื่อเรียนรู้กระบวนการในการทำวิจัยด้านเภสัชศาสตร์ สาขาเน้นเภสัชอุตสาหกรรม โดยมีความสนใจศึกษางานด้านฤทธิ์ของสารในระดับเซลล์และชีวโมเลกุล โดยเป็นเค้าโครงการวิจัยที่มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาการเสริมฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดใบโหระพาต่อสารสกัดชาเขียว โดยใช้โมเดลของเซลล์มาโครฟาจ

คณะผู้จัดทำหวังว่าโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้จะเป็นพื้นฐานข้อมูลที่สามารถนำไปต่อยอดทั้งทางด้านองค์ความรู้และผลิตภัณฑ์เชิงพาณิชย์ รวมทั้งก่อให้เกิดประโยชน์แก่ผู้อ่านต่อไป

ผู้คณะวิจัย

เมษายน 2565

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2564

เรื่อง การเสริมฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบของสารสกัดใบโหระพาต่อสารสกัดชาเขียว โดยใช้โมเดลของเซลล์มาโครฟาจ

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

- | | |
|--------------------------------|--------------------|
| 1. นสภ. ทิศจรา อนันต์มานะ | รหัสนิสิต 60210116 |
| 2. นสภ. ปภาวรินทร์ ฟาไสสินันท์ | รหัสนิสิต 60210125 |
| 3. นสภ. ณิชาดา พิณเขียว | รหัสนิสิต 60210159 |

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

- | |
|--|
| 1. ญญ.อ.ดร. ภัทรวดี ศรีคุณ (ที่ปรึกษาหลัก) |
| 2. ดร.สันติ โพธิ์ศรี (ที่ปรึกษาร่วม) |
-

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันการดื่มชากำลังเป็นที่นิยมและเป็นเครื่องดื่มที่มีผู้บริโภคมากที่สุดเป็นอันดับสองของโลกรองจากน้ำเปล่า เนื่องจากชามีรสชาติดี มีกลิ่นหอมเฉพาะตัว ชามีหลายชนิดขึ้นกับสายพันธุ์และกระบวนการผลิต ได้แก่ ชาเขียว ชาดำ ชาอู่หลง เป็นต้น ชาเขียวได้รับความนิยมจากสรรพคุณการต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าชาชนิดอื่นๆ และยังมีสรรพคุณอื่นอีกหลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสบางชนิด ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ในลำไส้ รวมทั้งฤทธิ์ต้านการอักเสบ นอกจากนี้ยังมีการนำสมุนไพรมารับประทานร่วมกับชาเพื่อกลิ่นและรสชาติที่ดีขึ้น รวมทั้งเพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหารและสรรพคุณทางยา ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาการเสริมฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดใบโหระพาต่อสารสกัดชาเขียวในลักษณะเครื่องดื่ม ซึ่งโหระพานั้นถูกใช้ในการปรุงอาหาร มีกลิ่นเฉพาะตัว และมีรายงานขององค์ประกอบที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยทำการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลองโดยวิธี Ferric Antioxidant Power (FRAP) วิธี DPPH และวิธี Nitric oxide radical scavenging โดยใช้สารสกัดใบโหระพาและใบชาเขียวด้วยการต้มและแช่ในน้ำเดือดที่เวลาแตกต่างกัน จากนั้นนำสารสกัดใบโหระพาและใบชาเขียวแต่ละวิธีที่ได้ ไปทำการระเหยแห้งด้วยวิธี freeze-drying แล้วทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์และฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารละลายที่ได้ในเซลล์มาโครฟาจ RAW264.7 ด้วยวิธี MTT และ การยับยั้งการสร้างและหลั่งไนตริกออกไซด์ (NO) ตามลำดับ จากการศึกษา DPPH assay และ Nitric oxide radical scavenging เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดทั้งสองชนิดพบว่า ชามีค่า inhibitory concentration at 50% (IC₅₀) น้อยกว่าโหระพา แสดงให้เห็นว่าชามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าโหระพา และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของ

วิธีการสกัด การศึกษา DPPH assay วิธีการสกัดที่ทำให้ได้สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระออกมามากที่สุดคือ วิธีการต้ม 10 นาที ในพืชทั้งสองชนิด แต่การศึกษา Nitric oxide radical scavenging วิธีการแช่ 60 นาที ได้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดในพืชทั้งสองชนิด ซึ่งผลการศึกษาวีธีวิเคราะห์ 2 วิธีนี้ไม่สอดคล้องกัน โดยจากการรายงานผลยับยั้งการสร้างและการหลั่งไนตริกออกไซด์ในเซลล์มาโครฟาจ RAW264.7 พบว่า ชาเขียวมีค่า IC_{50} น้อยกว่าโหระพา (IC_{50} ชาและโหระพา : วิธีต้ม 398.89 ± 0.003 , $2132.81 \pm 0.18 \mu\text{g/ml}$; แช่ 10 นาที 557.54 ± 0.049 , $1576.27 \pm 0.16 \mu\text{g/ml}$; แช่ 60 นาที 380.21 ± 0.029 , $2037.86 \pm 1.67 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ) และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของวิธีการสกัดของสารสกัดชาเขียวพบว่า วิธีแช่ 60 นาทีและในสารสกัดโหระพา วิธีแช่ 10 นาที สามารถยับยั้งการสร้างและการหลั่งไนตริกออกไซด์ได้มากกว่าเมื่อเทียบกับอีก 2 วิธี อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยไม่มีผลการทดสอบการเสริมฤทธิ์ของใบชาเขียวและใบโหระพา แต่หวังว่าผลเบื้องต้นที่ได้จากโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้จะเป็นพื้นฐานข้อมูลที่สามารถนำไปต่อยอดทั้งทางด้านองค์ความรู้และผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มชาเขียวเชิงพาณิชย์ได้

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก.....

Senior Project Academic Year 2020

Title Synergistic effect of Green Tea's (*Camellia sinensis* (L.) Okuntze.) Anti-Inflammatory Effects with Extracts of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.) in Macrophages Cell Lines

By

1. Ms. Tidtara Anantamana	ID 60210116
2. Ms. Papawarin Fasaisirinun	ID 60210125
3. Ms. Nichada Phinkhiao	ID 60210159

Advisory committee: 1. Dr. Pattaravadee Srikoon, R.Ph. (Advisor)
2. Dr. Santi Phosri (Co-advisor)

ABSTRACT

Tea drinks are famous nowadays with the runner up beverage in the world. Each tea types have unique tastes and odors depending on each species and preparation processes such as green tea, black tea, Oolong tea. Green tea (*Camellia sinensis* (L.) Okuntze.) is widely reported with the highest anti-oxidant level compared among other tea types. Additionally, it contains various pharmacological activities e.g. anti-viral infection, anti-GUT microbial and anti-inflammation. Moreover, many herbs have been used to mix with tea for improving its taste, odor, nutritional properties, including pharmacological properties. Therefore, we aim to study the synergistic effect of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) extract on green tea extract for anti-Inflammatory effects using macrophages cell line. Sweet basil is commonly cooked with distinguished odor in which its chemical compositions have been reported to inhibit inflammation. This study, sweet basil and green tea leaves will be extracted with boiling or soak in hot water mimic to making drinking tea with different times. Aqueous crude extracts were determined anti-oxidant capacity by FRAP, DPPH and NO scavenging assays. These aqueous extracts were freeze-dried and prepared in complete culture media. RAW264.7 murine macrophage cell line was used to tested cell viability and inhibition of NO production by MTT assay and Griess reagent respectively. Boiled and soak (both 10 and 60 min) green tea extracts were found the higher anti-oxidant capacity compared with same extraction methods of sweet basil by DPPH and NO scavenging assays. Boiled both extracts was found the higher anti-oxidant capacity compared with

other extraction methods by DPPH assay but NO scavenging assays, soak 60 min both extracts was found the higher anti-oxidant capacity. All extraction methods of green tea were found the higher inhibition of NO production in LPS-stimulated RAW264.7 cells compared with same extraction methods of sweet basil by NO inhibitory assay. (IC_{50} : boiled 398.89 ± 0.003 and 2132.81 ± 0.18 mg/ml; soak 10 min 557.54 ± 0.049 and 1576.27 ± 0.16 mg/ml; soak 60 min 380.21 ± 0.029 and 2037.86 ± 1.67 mg/ml). We aim that this study will be useful as fundamental data for both knowledge and development of drinking product in commercial field.

Major Advisor.....

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยในครั้งนี้ ได้รับทุนวิจัยสนับสนุนบางส่วนจากเงินสนับสนุนนิสิต คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีการศึกษา 2564 และทุนวิจัยส่วนตัวของอาจารย์ที่ปรึกษา ญ.ดร.ภัทรวดี ศรีคุณ และ อ.ดร.สันติ โพธิ์ศรี ในการศึกษาวิจัยขั้นต้นนี้ พร้อมคำแนะนำในการทำวิจัย และขอขอบพระคุณ Prof. Seiji Okada ที่ให้ความอนุเคราะห์เซลล์ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ รวมทั้งเพื่อนๆ ในกลุ่มวิจัยภายใต้การดูแลของ ญ.ดร.ภัทรวดี ศรีคุณ ทุกคน

ผู้คณะวิจัย

เมษายน 2565

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ณ
สารบัญรูปภาพ	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.4 กรอบแนวคิด	2
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	5
2.1 ชา	5
2.2 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ในชาแต่ละชนิด	7
2.3 อุณหภูมิและเวลาในการแช่ชาที่ส่งผลต่อคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของชา 3 ชนิด	10
2.4 กระบวนการการอักเสบ (Inflammation)	12
2.5 ฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสำคัญในพืช	15
2.6 ฤทธิ์ด้านการอักเสบของชาเขียว	16
2.7 การเสริมฤทธิ์กันของสารสำคัญที่มีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบทั้งจากธรรมชาติและจากการสังเคราะห์	17
2.8 โหระพา	18
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	23
3.1 ตัวอย่างพืชและการสกัด	23
3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	23
3.3 เซลล์และการเพาะเลี้ยงเซลล์	24
3.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์	24

3.5 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ	24
3.6 สถิติ	25
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปราย	26
4.1 การสกัดตัวอย่างพืช	26
4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	26
4.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์	31
4.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ	33
บทที่ 5 วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง	36
เอกสารอ้างอิง	37

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	แสดง antioxidant capacities และ Total phenolic contents (TPC) ของชา 30 ตัวอย่าง	8
ตารางที่ 2	แสดงสารสำคัญในพืชที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ	15
ตารางที่ 3	การเสริมฤทธิ์ของ co-treatment ระหว่าง EC และองค์ประกอบ polyphenol อื่นๆในชา เพื่อยับยั้ง TNF- α release	17
ตารางที่ 4	แสดงผลการเสริมฤทธิ์ด้านการอักเสบของ Curcumin และสารต่างๆ	18
ตารางที่ 5	แสดง % yield ของสารสกัดชาและโหระพา	26
ตารางที่ 6	แสดงค่า TEAC โดยวิธีวิเคราะห์ FRAP assay และ IC ₅₀ ของ DPPH assay ของสารสกัดชาและโหระพา	28
ตารางที่ 7	แสดงค่า IC ₅₀ โดยวิธีวิเคราะห์ Nitric oxide radical scavenging ของสารสกัดชาและโหระพา	30
ตารางที่ 8	แสดงค่า IC ₅₀ โดยวิธีวิเคราะห์ Nitric oxide inhibitory assay ของสารสกัดชาและโหระพา	34

สารบัญรูปภาพ

		หน้า
รูปภาพที่ 1	ชาเขียว	5
รูปภาพที่ 2	แสดง FRAP Values ของชา 30 ชนิด	9
รูปภาพที่ 3	แสดง TEAC values ของชา 30 ชนิด	9
รูปภาพที่ 4	แสดง TPC values ของชา 30 ชนิด	10
รูปภาพที่ 5	แสดง Total Phenolic Content (TPC) ของชา 3 ชนิด	11
รูปภาพที่ 6	แสดง Total Flavonoid Content (TFC) ของชา 3 ชนิด	11
รูปภาพที่ 7	แสดง Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) ของชา 3 ชนิด	11
รูปภาพที่ 8	แสดง Oxidative stress และการอักเสบ จากความไม่สมดุลของสารต้านอนุมูลอิสระ และ สารอนุมูลอิสระ	12
รูปภาพที่ 9	แสดงกลไกการอักเสบผ่าน NF-kB pathway	13
รูปภาพที่ 10	แสดงกลไกการอักเสบผ่าน MAPKs pathway	14
รูปภาพที่ 11	แสดงกลไกการกระตุ้นการหลั่ง NO	14
รูปภาพที่ 12	โหระพา	19
รูปภาพที่ 13	การแสดงออกของยีน Il 1b (a), and Ccl2 (b) และ Tnf (c) ใน co-culture ของเซลล์ 3T3-L1 adipocytes และ RAW264.7 macrophages	20
รูปภาพที่ 14	การแสดงออกของยีน <i>IL-6</i> (IL6) (a) และปริมาณโปรตีน IL-6 (b) ใน co-culture ของเซลล์ 3T3-L1 adipocytes และ RAW264.7 macrophages	21
รูปภาพที่ 15	การแสดงออกของยีน <i>NF-KB</i> (Nfkb1) ใน co-culture ของเซลล์ 3T3-L1 adipocytes และ RAW264.7 macrophages	21
รูปภาพที่ 16	การแสดงออกของยีน <i>TNF-RSF9</i> (Tnfrsf9) ใน co-culture ของเซลล์ 3T3-L1 adipocytes และ RAW264.7 macrophages	22
รูปภาพที่ 17	แสดงกราฟผล % inhibition ของสารสกัดชาด้วยวิธีวิเคราะห์ DPPH assay ค่าที่แสดงเป็นค่า mean $\pm$ SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ (**p<0.05)	27
รูปภาพที่ 18	แสดงกราฟผล % inhibition ของสารสกัดโหระพาด้วยวิธีวิเคราะห์ DPPH assay ค่าที่แสดงเป็นค่า mean $\pm$ SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ (**p<0.05)	27

รูปภาพที่ 19	แสดงกราฟผล % inhibition ของสารสกัดชาด้วยวิธีวิเคราะห์ Nitric oxide radical scavenging ค่าที่แสดงเป็นค่า mean $\pm$ SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ (**p<0.05)	29
รูปภาพที่ 20	แสดงกราฟผล % inhibition ของสารสกัดโหระพาด้วยวิธีวิเคราะห์ Nitric oxide radical scavenging ค่าที่แสดงเป็นค่า mean $\pm$ SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ (**p<0.05)	30
รูปภาพที่ 21	แสดงกราฟผล % viability ของสารสกัดชาด้วยวิธีวิเคราะห์ MTT assay ค่าที่แสดงเป็นค่า mean $\pm$ SD จากการทดลอง 4 ซ้ำ	32
รูปภาพที่ 22	แสดงกราฟผล % viability ของสารสกัดโหระพาด้วยวิธีวิเคราะห์ MTT assay ค่าที่แสดงเป็นค่า mean $\pm$ SD จากการทดลอง 4 ซ้ำ	32
รูปภาพที่ 23	แสดงกราฟผล % inhibition ของสารสกัดชาด้วยวิธีวิเคราะห์ Nitric oxide inhibitory assay ค่าที่แสดงเป็นค่า mean $\pm$ SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ (**p<0.05)	33
รูปภาพที่ 24	แสดงกราฟผล % inhibition ของสารสกัดชาด้วยวิธีวิเคราะห์ Nitric oxide inhibitory assay ค่าที่แสดงเป็นค่า mean $\pm$ SD	34

บทที่ 1

บทนำ

ในปัจจุบันการดื่มชากำลังเป็นที่นิยมและมีแนวโน้มการบริโภคที่เพิ่มขึ้น โดยเหตุผลของการดื่มชามีความหลากหลาย เช่น มีรสชาติที่ดี มีกลิ่นหอมเฉพาะตัว หรือแม้กระทั่งการดื่มจากการทราบถึงสรรพคุณของชา เช่น ช่วยลดระดับไขมันในเลือด ลดความอ้วน ป้องกันโรคมะเร็ง อีกทั้งยังมีสารต้านอนุมูลอิสระและสารยับยั้งการอักเสบ อีกด้วย

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ชา เป็นผลผลิตทางเกษตรกรรมจากใบ ยอดอ่อน และก้านของต้นชา (*Camellia sinensis*) นำมาผ่านกรรมวิธีแปรรูปหลากหลาย โดยรวมถึงเครื่องดื่มที่มีกลิ่นหอมทำจากพืชตากแห้งชนิดต่าง ๆ นำมาชงหรือต้มกับน้ำร้อน อีกทั้งชายังเป็นเครื่องดื่มที่มีผู้บริโภคมากที่สุดเป็นอันดับสองของโลก รองจากน้ำเปล่า โดยประเทศไทยมีอัตราการบริโภคชาเฉลี่ย 0.93 กิโลกรัมต่อคนต่อปี และมีอัตราการเติบโตของตลาดการส่งออกของชาเพิ่มมากขึ้นตั้งแต่ปี พ.ศ. 2558 ซึ่งชาแบ่งได้หลายประเภท ได้แก่ ชาขาว, ชาเหลือง, ชาเขียว, ชาอู่หลง, ชาดำ, ชาอโรมาและชาสมุนไพรรวม ชาทุกชนิดสามารถทำได้จากต้นชาต้นเดียวกัน แต่ผ่านกรรมวิธีแตกต่างกันออกไป โดยชาที่มีสรรพคุณหลากหลาย ไม่ว่าจะเป็นฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ ลดระดับน้ำตาลในเลือด ลดระดับความดันโลหิต กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง ลดระดับคอเลสเตอรอล ป้องกันฟันผุ เป็นต้น⁽¹⁾

จากการศึกษางานวิจัยการเปรียบเทียบปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ในชาแต่ละชนิด พบว่าชาเขียวมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดเมื่อเทียบกับชาชนิดอื่นๆ โดยสารสำคัญในการออกฤทธิ์คือ Phenolic compounds ซึ่งฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ด้านการอักเสบของร่างกาย โดยในภาวะปกติของร่างกายจะมีความสมดุลกันของกลไกต้านอนุมูลอิสระ (endogenous antioxidant defense mechanisms) และสารอนุมูลอิสระ (free radical) ซึ่งหากเกิดการเสียสมดุลของสองสิ่งจะนำไปสู่ภาวะ oxidative stress โดยภาวะนี้สามารถก่อให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์ ไม่ว่าจะเป็นระดับ DNA, โปรตีนภายในเซลล์, เยื่อหุ้มเซลล์ และอาจส่งผลทำให้เซลล์ตายได้ (cell necrosis) ซึ่งการบาดเจ็บของเซลล์เหล่านี้มีความสัมพันธ์กับพยาธิสภาพของโรค ได้แก่ โรคเบาหวาน, โรคหัวใจและหลอดเลือด, โรคมะเร็ง ซึ่งสัมพันธ์กับการเกิดการอักเสบเรื้อรัง⁽²⁾

สารสำคัญซึ่งมีฤทธิ์ด้านการอักเสบพบได้ทั้งสารจากธรรมชาติและสารสังเคราะห์ โดยพบในพืชหลายชนิดรวมทั้งพืชที่สามารถพบได้ทั่วไปในประเทศไทย เช่น Ursolic acid พบได้ในเปลือกแอปเปิ้ล, Luteolin พบได้ในใบโหระพา, Piperine พบได้ในพริกไทย เป็นต้น⁽⁸⁾ โดยพบว่าใบโหระพา ซึ่งถูกใช้ในการปรุงอาหาร และมีลักษณะของ

กลั่นเฉพาะตัว มีฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ จากสารสำคัญกลุ่ม Phenolic compound เช่น Rosmarinic, Caffeic และ Chicoric acid นอกจากนี้ ยังมีฤทธิ์ด้านการอักเสบอีกด้วย⁽³⁾

ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาการเสริมฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบของสารสกัดใบโหระพาต่อสารสกัดใบชาเขียวโดยใช้โมเดลของเซลล์มาโครฟาจ เพื่อเป็นข้อมูลในการต่อยอดในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางจากชาเขียวต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการเสริมฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบของสารสกัดใบโหระพาต่อสารสกัดชาเขียว
2. เพื่อศึกษาผลของวิธีการสกัดต่อฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ได้ผลการศึกษาเบื้องต้นของการเสริมฤทธิ์ของสารสำคัญที่มีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบจากธรรมชาติ
- 2) นำผลการศึกษาไปพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางชาเขียว เพื่อเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์
- 3) เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางชนิดอื่นๆ

1.4 กรอบแนวคิด

การศึกษานี้ เป็นการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในเซลล์ของสารสกัดชาเขียวและใบโหระพา ซึ่งเลียนแบบจากวิธีการชงชาที่ใช้ในการบริโภคปกติและทำให้เข้มข้นด้วยการระเหยแห้ง โดยทำการวิจัย ณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ดังรายละเอียดต่อไปนี้

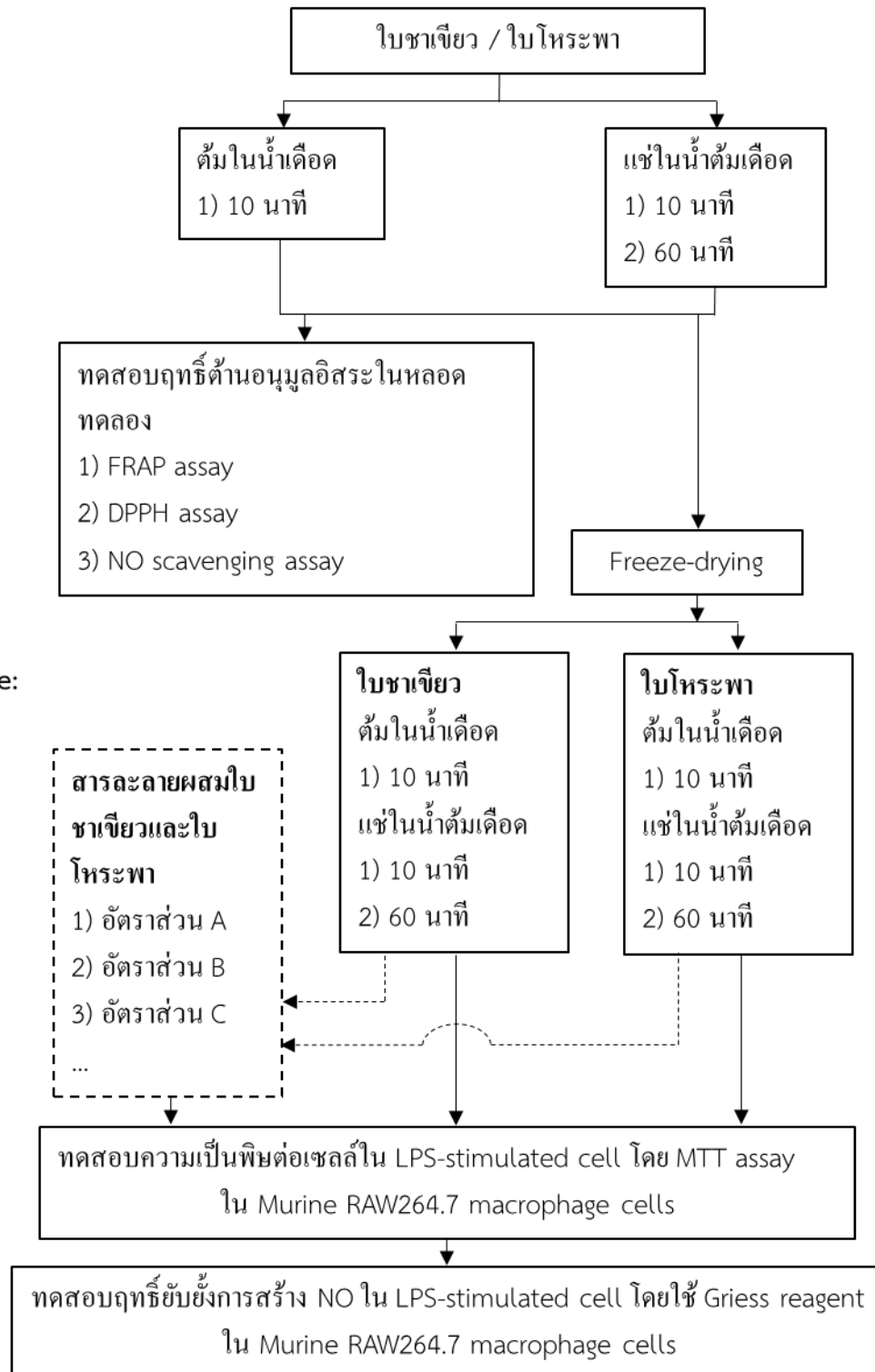
1. การสกัดสารจากใบชาเขียว และใบโหระพา
2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง
3. การเพาะเลี้ยงเซลล์ murine RAW 264.7 macrophage
4. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์
5. การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบในเซลล์

ตัวอย่าง:

การสกัด:

In vitro:

Cell culture:



1.5 แผนการปฏิบัติงาน

รายละเอียด	2564						2565			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.
1. ทบทวนวรรณกรรม	✓	✓	✓							
2. จัดทำเค้าโครงงานวิจัย		✓	✓	✓						
3. สอบเค้าโครงงานวิจัย					✓					
4. ฝึกทักษะการเลี้ยงเซลล์					✓	✓				
5. MTT assay						✓	✓			
6. Inhibition of NO production							✓	✓		
7. วิเคราะห์และแปลผล					✓	✓	✓	✓	✓	
8. จัดทำรูปเล่มรายงานฉบับสมบูรณ์									✓	
9. สอบป้องกันโครงงานวิจัย										✓

1.6 งบประมาณค่าใช้จ่าย

หมวด	งบประมาณ
1. งบดำเนินการ: ค่าวัสดุอุปกรณ์ - ค่าสารเคมีและวัสดุการทดลอง : ค่าสารเคมีและอุปกรณ์สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ ได้แก่ อาหารเลี้ยงเซลล์, fetal bovine serum, penicillin/streptomycin, trypsin-EDTA, sterile water for injection, PBS buffer, 70% alcohol, trypan blue, round bottom 96-well plate, culture dish (60 mm, 100 mm), micro centrifuge tubes, culture 24-, 48-well plates, pipette tips, falcon tubes (25, 50 ml), : ค่าสารเคมีสำหรับทดสอบฤทธิ์โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ ได้แก่ MTT solution, isopropanol, lipopoly saccharide (LPS)	8,500
2. งบดำเนินการ: ค่าใช้สอย - ค่าใช้จ่ายในการเผยแพร่ผลงาน ได้แก่ จัดทำโปสเตอร์ - ค่าจ้างเหมาจัดทำรายงานฉบับสมบูรณ์	500
รวม	9,000 (เก้าพันบาทถ้วน)

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

ในการศึกษานี้ ต้องการศึกษาศรีมฤทธิด้านการอักเสบของสารสกัดใบโหระพา กับสารสกัดใบชาเขียว ซึ่งมีข้อมูลการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องค่อนข้างมาก ผู้วิจัย จึงทำการทบทวนวรรณกรรม เพื่อให้ทราบถึงพืชที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ, การเสริมฤทธิ์กันของสารด้านการอักเสบ และชนิดของชาที่มีฤทธิ์ด้านสารอนุมูลอิสระ ดังรายละเอียดต่อไปนี้

2.1 ชา

2.1.1 ข้อมูลทั่วไป

ชา (tea) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Camellia sinensis* (L) Okuntze. เป็นพืชที่ใช้อยอดอ่อน หรือใบ มาแปรรูปด้วยการทำแห้ง (dehydration) นำมาชงด้วยน้ำร้อนเป็นเครื่องดื่ม ที่นิยมดื่มอย่างกว้างขวางทั่วโลก มีหลากหลายรูปแบบ เช่น ชาเขียวชาขาวชาอู่หลงชาดำ ซึ่งมีสีและกลิ่นรส และคุณค่าแตกต่างกัน ชาอุดมไปด้วยสารฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) เช่น แคททีซิน (Catechins) ซึ่งเป็น Polyphenol ที่มีสมบัติเป็นโภชนเภสัช (nutraceutical) ออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ของร่างกาย

2.1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

เป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็ก ทรงต้นรูปกรวย สูงประมาณ 30 ฟุต ใบเดี่ยวเรียงตัวแบบสลับ มี 1 ใบ ใน 1 ข้อ ขอบใบหยักแบบฟันเลื่อย ปลายใบ แหลม แผ่นใบหนา ด้านบนใบมัน ใต้ใบมีขนอ่อนปกคลุมใบยาว 7-30 ซม. ดอก มีทั้งดอกเดี่ยว และดอกช่อเป็นดอกสมบูรณ์เพศ เกสรตัวผู้มีจำนวนมาก ยอด เกสรตัวเมียมี 3-5 ช่อ กลีบดอกประดับสีขาว 5-8 กลีบ กลีบเลี้ยง สีเขียว 5-6 กลีบ ดอกมีกลิ่นหอมเล็กน้อย⁽⁴⁾



รูปที่ 1 ชาเขียว⁽⁵⁾

2.1.3 ชนิดของชา

ซึ่งเมื่อนำชาเข้าสู่กรรมวิธีการผลิต จะทำให้ได้ชาที่มีรสชาติแตกต่างกันหลายชนิด โดยชาสามารถแบ่งตามกระบวนการผลิตออกเป็น 8 ประเภท ดังนี้

- 1) ชาขาว (white Tea) เป็นชาชนิดหนึ่ง ผลิตจากตูมและยอดอ่อนของต้นชา กรรมวิธีผลิตชาขาวเริ่มจากการเลือกเก็บยอดอ่อนชาในช่วงฤดูใบไม้ผลิ จากนั้นนำยอดชาที่เก็บได้มาผ่านกระบวนการทำแห้งในระยะเวลาที่รวดเร็ว ด้วยวิธีธรรมชาติโดยอาศัย ลม แสงแดด หรือความร้อนซึ่งจะแตกต่างจากกรรมวิธีผลิตชาประเภทอื่น ๆ กลิ่นและรสชาติคงความสดชื่นและนุ่มนวล
- 2) ชาเหลือง (yellow Tea) ในขั้นตอนแรกของการเก็บเกี่ยว คือการนำใบชามาผึ่ง จากนั้นนำความร้อนเข้าสู่ใบชาเพื่อลดกระบวนการออกซิเดชัน และจะม้วนใบชาเป็นกลุ่ม ๆ ใส่ในถุง และปล่อยให้แห้ง เพื่อให้ได้ชาคุณภาพดี โดยกระบวนการผลิตเหล่านี้ จะใช้ระยะเวลาอย่างน้อย 3 วัน
- 3) ชาเขียว (green Tea) เก็บมาจากยอดอ่อนของชา โดยการนำไปอบแห้งทันที ไม่ผ่านการหมัก เพื่อไม่ให้ใบชาเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับออกซิเจน ทำให้ได้ใบชาที่ยังมีสีเขียว มีรสชาติ สี และกลิ่นใกล้เคียงกับธรรมชาติ สรรพคุณชาเขียวมีคุณสมบัติต้านทานโรคได้หลายชนิด
- 4) ชาอู่หลง (oolong Tea) เป็นชาประเภทกึ่งหมักหรือชาที่ผ่านการหมักเพียงบางส่วน โดยชาอู่หลงผ่าน กระบวนการผลิตที่เป็นเอกลักษณ์ ด้วยการผึ่งแห้งใบชาด้วยแสงอาทิตย์เพื่อให้ใบชาคายน้ำ หลังจากนั้น ทำไปผึ่งในที่ร่มภายใต้การควบคุมอุณหภูมิและความชื้น ซึ่งเป็นการหมักใบชาเพียงบางส่วน จากนั้นนำมาวนอัดเป็นเม็ด
- 5) ชาดำ (black Tea) เป็นชาที่ผ่านกระบวนการหมักอย่างสมบูรณ์ด้วยวิธีการบ่มเพาะอาศัยแบคทีเรียเป็นตัวทำปฏิกิริยา ซึ่งเป็นกรรมวิธีที่ทำให้ใบชาหมักตัวได้อย่างเต็มที่ หากยังบ่มนานยิ่งได้รสชาติมากขึ้น
- 6) ชาผูเออร์ (pu-erh tea, dark tea) เป็นชาที่ทำขึ้นมาหลังการหมักใบชา โดยผ่านการหมักทั้งสองครั้งและถูกนำไปเก็บในสภาพแวดล้อมที่มีความชื้นสูง ชาผูเออร์ที่ผ่านการกักเก็บเป็นเวลานาน ๆ จะยังมีรสชาติที่ดีมากขึ้น ชาผูเออร์ส่วนมากถูกผลิตขึ้นจากยูนนานในประเทศจีน
- 7) ชาอโรมา, ชาแต่งกลิ่น (aromatic tea, flavored tea) ชาที่นำผลิตภัณฑ์ที่ให้กลิ่นหอม เช่น ลาเวนเดอร์ อบเชย(ซินนามอน) เปลือกส้ม มาผสมกับใบชาต่างๆ หรือนำมาผสมผลไม้บาง
- 8) ชาสมุนไพร (herbal tea) ชาสมุนไพรนั้นทำจากผลไม้ ดอกไม้ และสมุนไพรตากแห้ง ไม่ได้มีส่วนผสมที่เป็นใบชา^{(4) (6)}

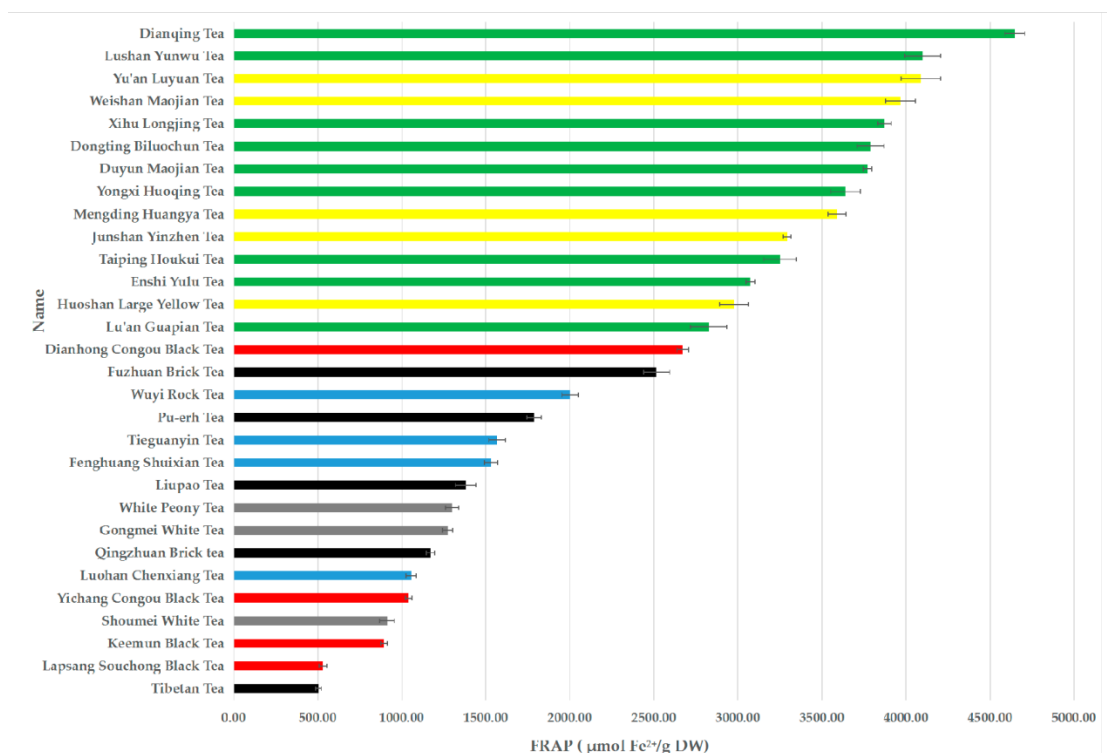
2.2 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ในชาแต่ละชนิด

Cai-Ning Zhao และคณะ (2019) ทำการศึกษาการนำชาชนิดต่างๆ 30 ตัวอย่างมาศึกษา Phenolic profiles และ antioxidant activities ได้แก่ green tea, black tea, dark tea, oolong tea, white tea และ yellow tea พบค่า Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Values, Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) values, Total Phenolic Contents (TPC) values สัมพันธ์กับฤทธิ์ antioxidant โดยแถบสีเขียวแสดงถึงปริมาณค่าต่างๆของชาเขียวซึ่งมีมากที่สุดเมื่อเทียบกับชาชนิดอื่นๆ⁽⁷⁾ ดังแสดงในตารางที่ 1 และรูปที่ 2-4 ตามลำดับ

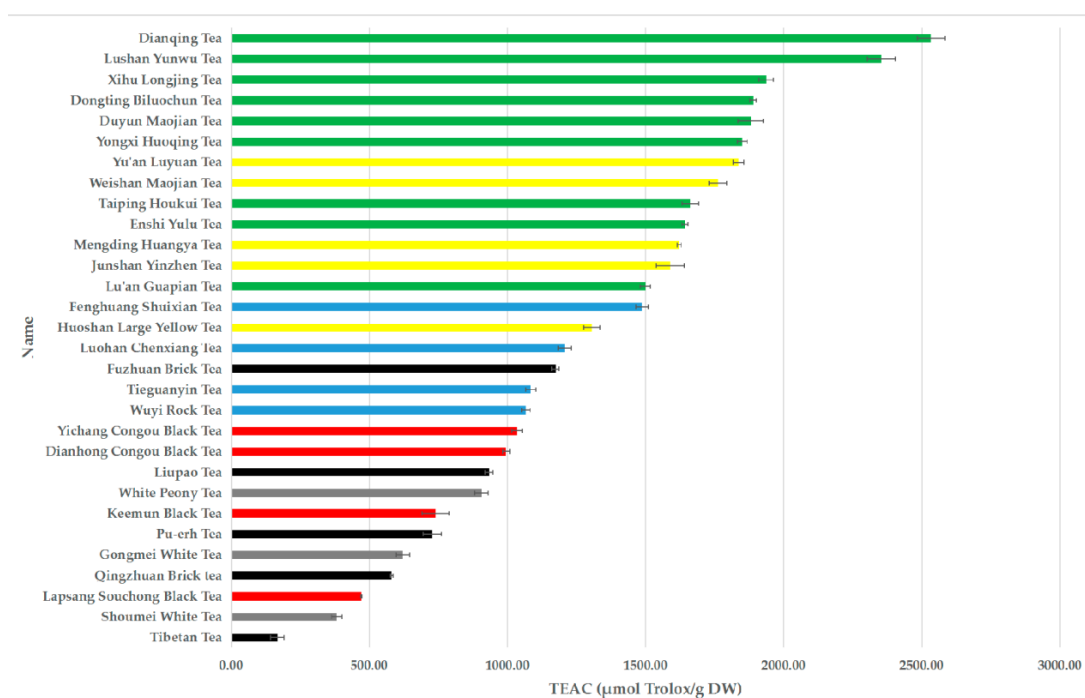
ตารางที่ 1 แสดง antioxidant capacities และ Total Phenolic Contents (TPC) ของชา 30 ตัวอย่าง⁽⁷⁾

No.	Name	Category	Place of Production	FRAP ($\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g DW}$)	TEAC ($\mu\text{mol Trolox/g DW}$)	TPC (mg GAE/g DW)
1	Dianhong Congou Black Tea	Black Tea	Kunming, Yunnan	2670.13 $\pm$ 34.02	994.56 $\pm$ 12.64	101.29 $\pm$ 1.58
2	Keemun Black Tea	Black Tea	Qimen, Anhui	894.13 $\pm$ 20.13	739.88 $\pm$ 49.11	62.16 $\pm$ 0.99
3	Lapsang Souchong Black Tea	Black Tea	Wuyishan, Fujian	530.13 $\pm$ 23.44	471.17 $\pm$ 2.02	37.23 $\pm$ 0.28
4	Yichang Congou Black Tea	Black Tea	Yichang, Hubei	1039.47 $\pm$ 19.73	1034.29 $\pm$ 17.99	101.94 $\pm$ 4.14
5	Fuzhuan Brick Tea	Dark Tea	Anhua, Hubei	2516.80 $\pm$ 76.32	1173.49 $\pm$ 12.85	147.11 $\pm$ 2.59
6	Liupao Tea	Dark Tea	Wuzhou, Guangxi	1382.13 $\pm$ 62.01	932.64 $\pm$ 13.27	90.55 $\pm$ 2.46
7	Pu-erh Tea	Dark Tea	Pu'er, Yunnan	1787.47 $\pm$ 42.39	727.02 $\pm$ 33.68	76.08 $\pm$ 2.06
8	Qingzhuan Brick tea	Dark Tea	Chibi, Hubei	1170.13 $\pm$ 25.72	580.49 $\pm$ 5.88	68.65 $\pm$ 0.98
9	Tibetan Tea	Dark Tea	Ya'an, Sichuan	504.80 $\pm$ 17.44	166.29 $\pm$ 24.48	24.77 $\pm$ 2.02
10	Dianqing Tea	Green Tea	Kunming, Yunnan	4647.47 $\pm$ 57.87	2532.41 $\pm$ 50.18	252.65 $\pm$ 4.74
11	Dongting Biluochun Tea	Green Tea	Suzhou, Jiangsu	3788.80 $\pm$ 80.30	1889.22 $\pm$ 12.33	218.38 $\pm$ 4.00
12	Duyun Maojian Tea	Green Tea	Duyun, Guizhou	3771.47 $\pm$ 25.40	1880.54 $\pm$ 45.15	218.55 $\pm$ 3.90
13	Enshi Yulu Tea	Green Tea	Enshi, Hubei	3074.13 $\pm$ 26.03	1641.77 $\pm$ 10.47	174.10 $\pm$ 1.88
14	Lu'an Guapian Tea	Green Tea	Lu'an, Anhui	2824.80 $\pm$ 107.63	1498.51 $\pm$ 17.93	148.16 $\pm$ 2.72
15	Lushan Yunwu Tea	Green Tea	Jiujiang, Jiangxi	4099.47 $\pm$ 105.10	2353.21 $\pm$ 50.68	235.27 $\pm$ 7.28
16	Taiping Houkui Tea	Green Tea	Huangshan, Anhui	3250.13 $\pm$ 96.03	1662.39 $\pm$ 29.54	176.53 $\pm$ 4.97
17	Xihu Longjing Tea	Green Tea	Hangzhou, Zhejiang	3872.80 $\pm$ 38.16	1935.89 $\pm$ 26.32	218.46 $\pm$ 8.82
18	Yongxi Huoqing Tea	Green Tea	Jingxian, Anhui	3640.80 $\pm$ 89.08	1850.15 $\pm$ 17.93	204.32 $\pm$ 3.94
19	Fenghuang Shuixian Tea	Oolong Tea	Chao'an, Guangdong	1531.47 $\pm$ 38.85	1487.58 $\pm$ 21.42	150.10 $\pm$ 0.56
20	Luohan Chenxiang Tea	Oolong Tea	Mengdingshan, Sichuan	1055.47 $\pm$ 30.02	1207.19 $\pm$ 23.34	102.83 $\pm$ 2.76
21	Tieguanyin Tea	Oolong Tea	Anxi, Fujian	1567.47 $\pm$ 50.01	1084.52 $\pm$ 17.64	86.83 $\pm$ 0.61
22	Wuyi Rock Tea	Oolong Tea	Wuyishan, Fujian	2002.13 $\pm$ 47.72	1065.83 $\pm$ 15.80	95.88 $\pm$ 2.31
23	Gongmei White Tea	White Tea	Nanping, Fujian	1271.47 $\pm$ 29.48	620.10 $\pm$ 24.56	75.92 $\pm$ 1.46
24	Shoumei White Tea	White Tea	Nanping, Fujian	911.47 $\pm$ 44.06	381.3 $\pm$ 18.701	51.92 $\pm$ 0.56
25	White Peony Tea	White Tea	Nanping, Fujian	1299.47 $\pm$ 40.07	904.85 $\pm$ 24.58	77.29 $\pm$ 2.33
26	Huoshan Large Yellow Tea	Yellow Tea	Lu'an, Anhui	2975.47 $\pm$ 85.54	1304.76 $\pm$ 29.66	150.99 $\pm$ 1.79
27	Junshan Yinzhen Tea	Yellow Tea	Yueyang, Hunan	3292.80 $\pm$ 24.33	1589.95 $\pm$ 51.41	192.69 $\pm$ 0.74
28	Mengding Huangya Tea	Yellow Tea	Mengdingshan, Sichuan	3590.13 $\pm$ 54.60	1621.63 $\pm$ 7.07	183.31 $\pm$ 2.66
29	Weishan Maojian Tea	Yellow Tea	Ningxiang, Hunan	3967.47 $\pm$ 87.76	1761.96 $\pm$ 30.56	213.05 $\pm$ 1.61
30	Yu'an Luyuan Tea	Yellow Tea	Yichang, Hubei	4088.80 $\pm$ 118.39	1835.52 $\pm$ 19.60	220.08 $\pm$ 1.75

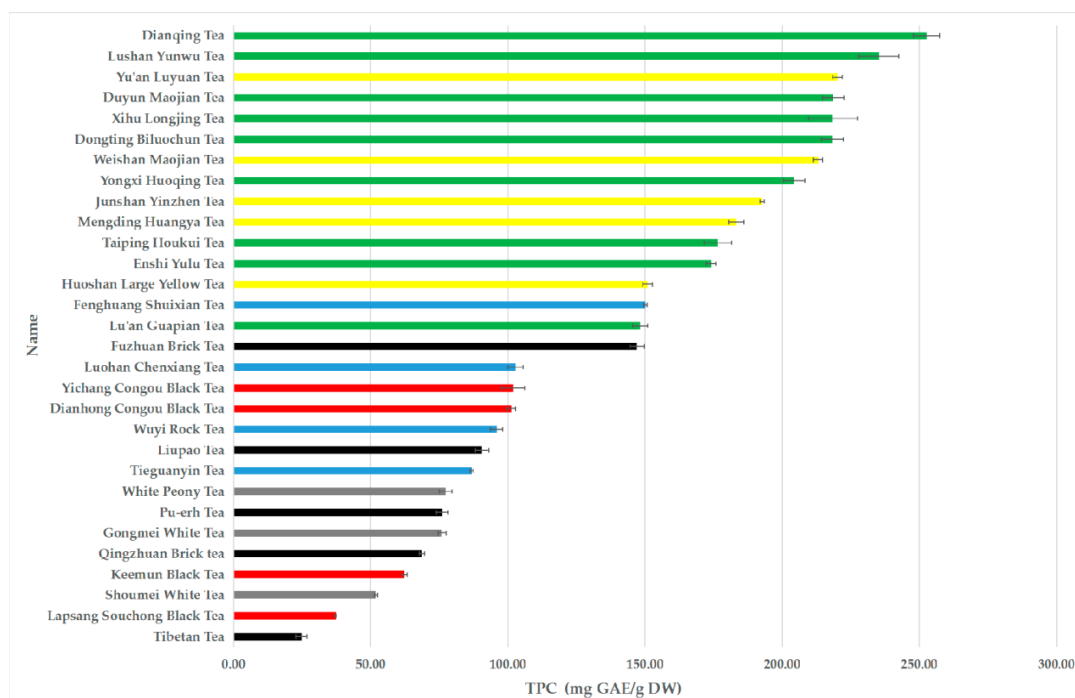
FRAP, ferric-reducing antioxidant power; TEAC, Trolox equivalent antioxidant capacity; TPC, total phenolic content.



รูปที่ 2 แสดง FRAP Values ของชา 30 ชนิด⁽⁷⁾



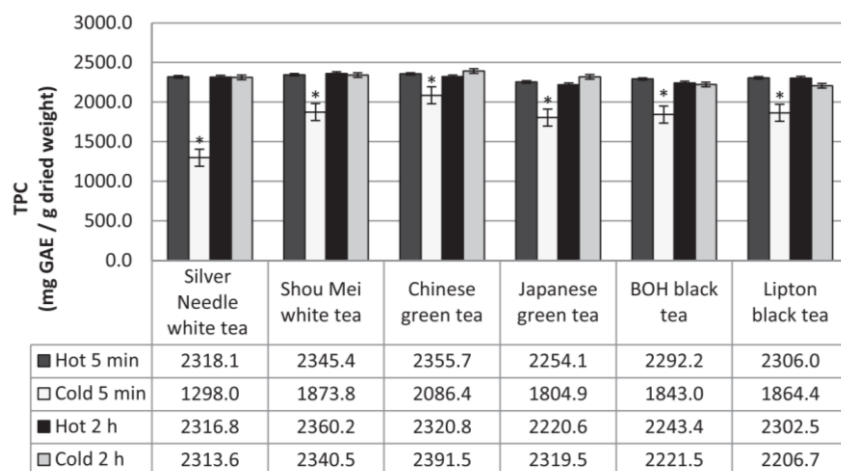
รูปที่ 3 แสดง TEAC values ของชา 30 ชนิด⁽⁷⁾



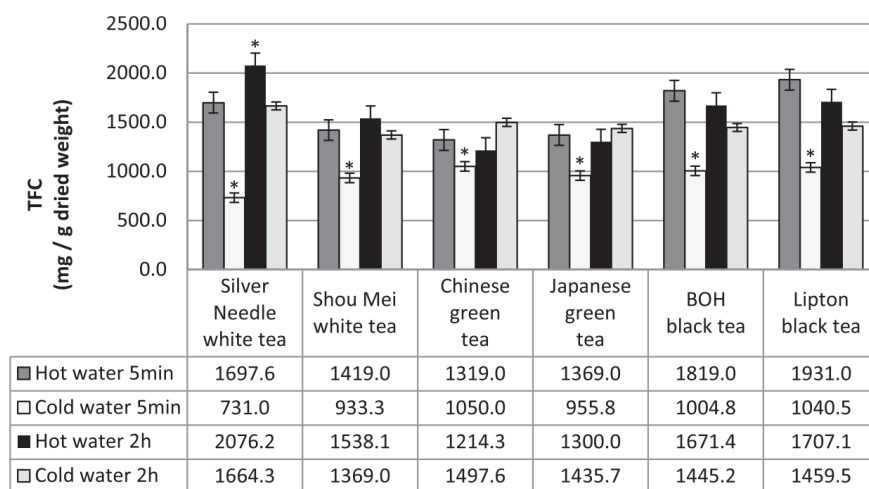
รูปที่ 4 แสดง TPC values ของชา 30 ชนิด⁽⁷⁾

2.3 อุณหภูมิและเวลาในการแช่ชาที่ส่งผลต่อคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของชา 3 ชนิด

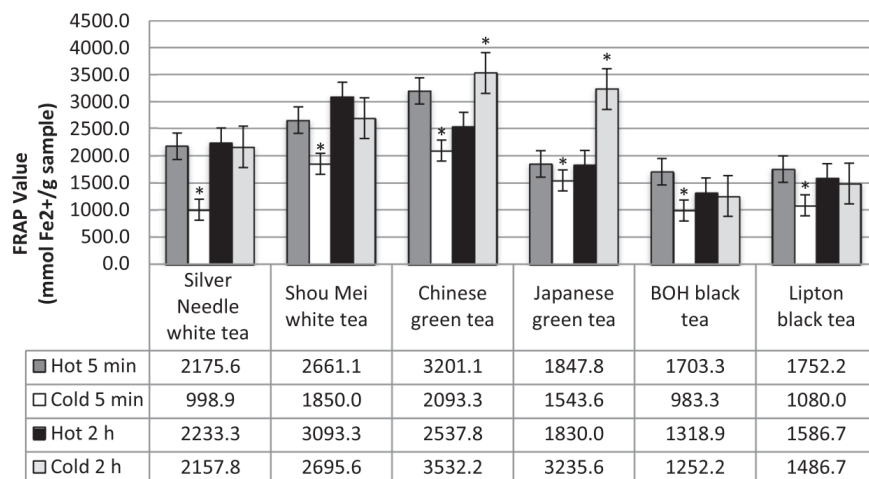
Fatemeh Hajjaghaalipour และคณะ (2016) ทำการศึกษาอุณหภูมิและเวลาในการแช่ชาที่ส่งผลต่อคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของชา 3 ชนิด คือ ชาขาว ชาเขียว และชาดำ โดยใช้วิธีวัดจากปริมาณ Total Phenolic Content (TPC) , Total Flavonoid Content (TFC) และ Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) พบว่าการแช่ชาในน้ำร้อน 5 นาที และ 2 ชั่วโมง ส่งผลต่อคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของชา 3 ชนิด ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และการแช่ชาในน้ำเย็น 5 นาที และ 2 ชั่วโมง ส่งผลต่อคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของชา 3 ชนิด แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยการแช่ชาในน้ำเย็น 2 ชั่วโมง จะมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระมากกว่าการแช่ชาในน้ำเย็น 5 นาที ในการแช่ชาขาว พบว่าปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระจะเพิ่มขึ้นเมื่อ ระยะเวลาการแช่และอุณหภูมิเพิ่มขึ้น ในการแช่ชาดำ พบว่าปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดเมื่อแช่ในน้ำร้อน และในการแช่ชาเขียว จะได้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดเมื่อแช่ในน้ำเย็น 2 ชั่วโมง รองลงมาคือ แช่ในน้ำร้อน 5 นาที, แช่ในน้ำร้อน 2 ชั่วโมง และแช่ในน้ำเย็น 5 นาที ตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญ⁽⁸⁾ ดังแสดงในรูปที่ 5-7



รูปที่ 5 แสดง Total Phenolic Content (TPC) ของชา 3 ชนิด⁽⁸⁾



รูปที่ 6 แสดง Total Flavonoid Content (TFC) ของชา 3 ชนิด⁽⁸⁾



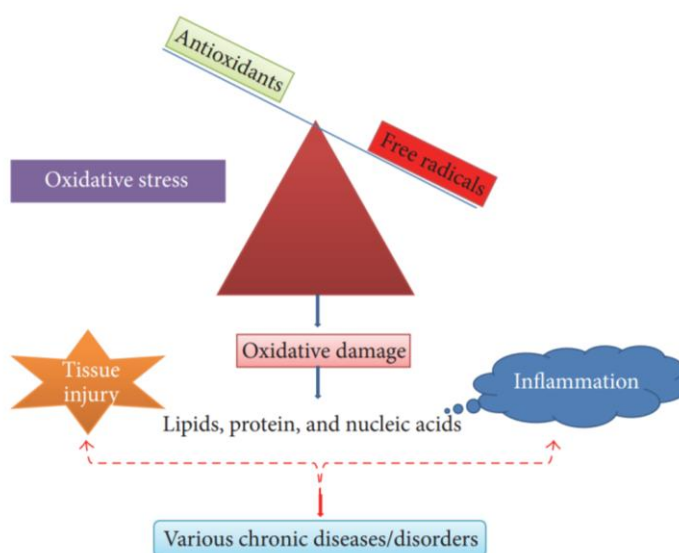
รูปที่ 7 แสดง Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) ของชา 3 ชนิด⁽⁸⁾

2.4 กระบวนการการอักเสบ (inflammation)

การอักเสบ (Inflammation) เป็นกระบวนการที่ร่างกายตอบสนองต่อสิ่งที่ทำให้เนื้อเยื่อของร่างกาย ได้รับความเจ็บ เป็นกลไกสำคัญในการป้องกันสิ่งแปลกปลอม การอักเสบอาจถูกแบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ

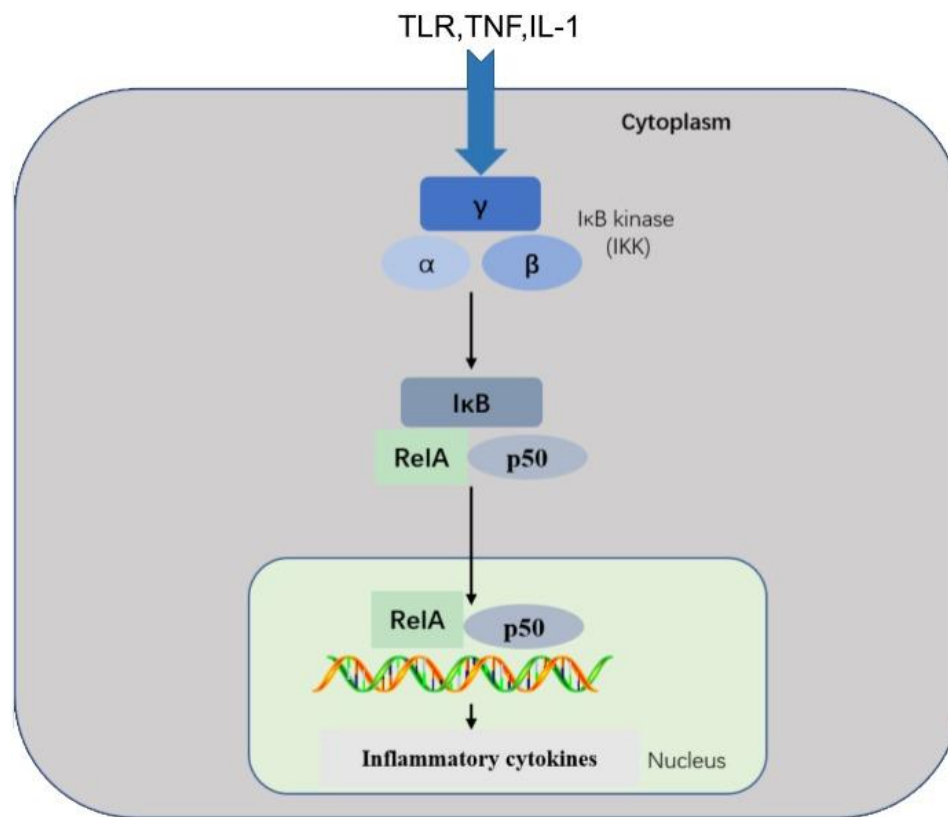
- 1) แบบเฉียบพลัน (acute inflammation) จะเกิดขึ้นรวดเร็ว ภายในระยะเวลาเป็นวินาทีหรือเป็นนาาที หลังจากได้รับสิ่งกระตุ้นและคงอยู่ประมาณ 2 ถึง 3 วัน แต่มักไม่เกิน 1 สัปดาห์ ลักษณะสำคัญของการอักเสบเฉียบพลัน คือ การบวมของเนื้อเยื่อ (edema) มีสารน้ำซึ่งมีโปรตีน (exudate) ภายในเนื้อเยื่อ และพบเซลล์อักเสบชนิด neutrophils
- 2) แบบเรื้อรัง (chronic inflammation) จะเกิดนานกว่า อาจเกิดตามหลังการอักเสบแบบเฉียบพลัน หรือเกิดจากร่างกายตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมบางชนิดก็ได้ ขึ้นกับปัจจัยหลายๆ ด้าน ลักษณะสำคัญของการอักเสบเรื้อรัง คือ มีการสร้างเนื้อเยื่อพังผืดขึ้น (fibrosis) มีการสร้างหลอดเลือดขึ้นจำนวนมาก และพบเซลล์อักเสบชนิด macrophages และ lymphocyte⁽⁹⁾

ซึ่งฤทธิ์ด้านการอักเสบของร่างกายมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ด้านสารอนุมูลอิสระ โดยในภาวะปกติของร่างกายจะมีความสมดุลกันของกลไกต้านอนุมูลอิสระ (endogenous antioxidant defense mechanisms) และสารอนุมูลอิสระ (free radical) ซึ่งหากเกิดการเสียสมดุลของสองสิ่งจะนำไปสู่ภาวะ oxidative stress โดยภาวะนี้สามารถก่อให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์ ไม่ว่าจะเป็นส่วนของ DNA, โปรตีนภายในเซลล์, เยื่อหุ้มเซลล์ และอาจทำให้เซลล์ตายได้ (cell necrosis) ซึ่งการบาดเจ็บของเซลล์เหล่านี้สัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพของโรคมามากมาย เช่น โรคเบาหวาน, โรคหัวใจและหลอดเลือด, โรคมะเร็ง และ เกิดการอักเสบได้ ดังแสดงในรูปที่ 8

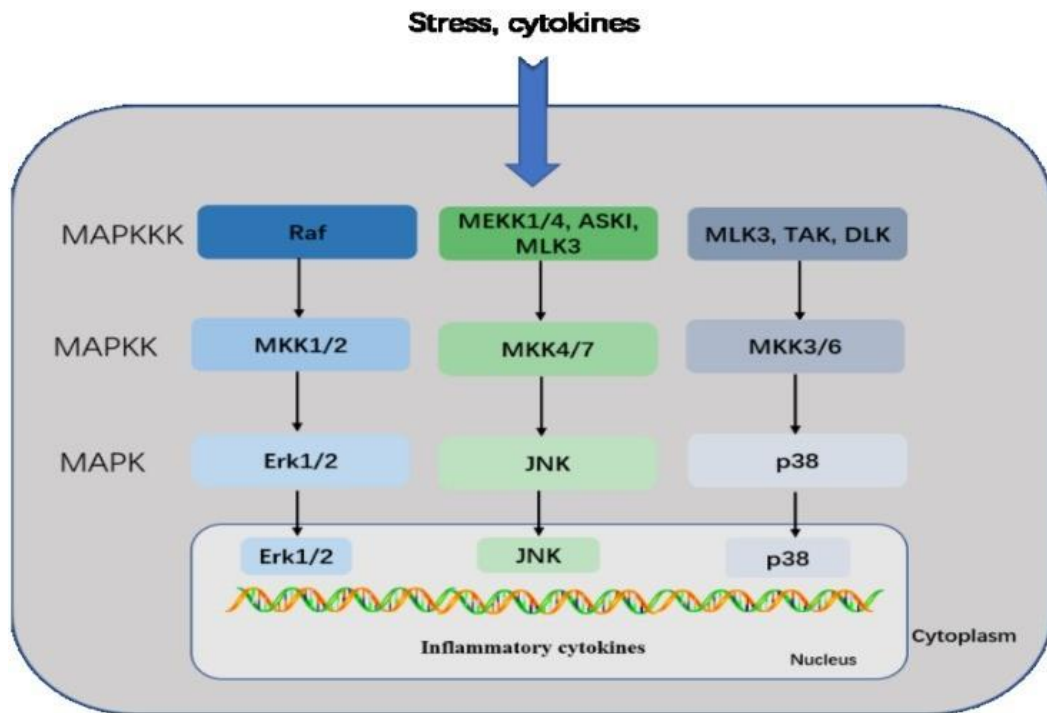


รูปที่ 8 แสดง oxidative stress และการอักเสบ จากความไม่สมดุลของสารต้านอนุมูลอิสระ และสารอนุมูลอิสระ⁽²⁾

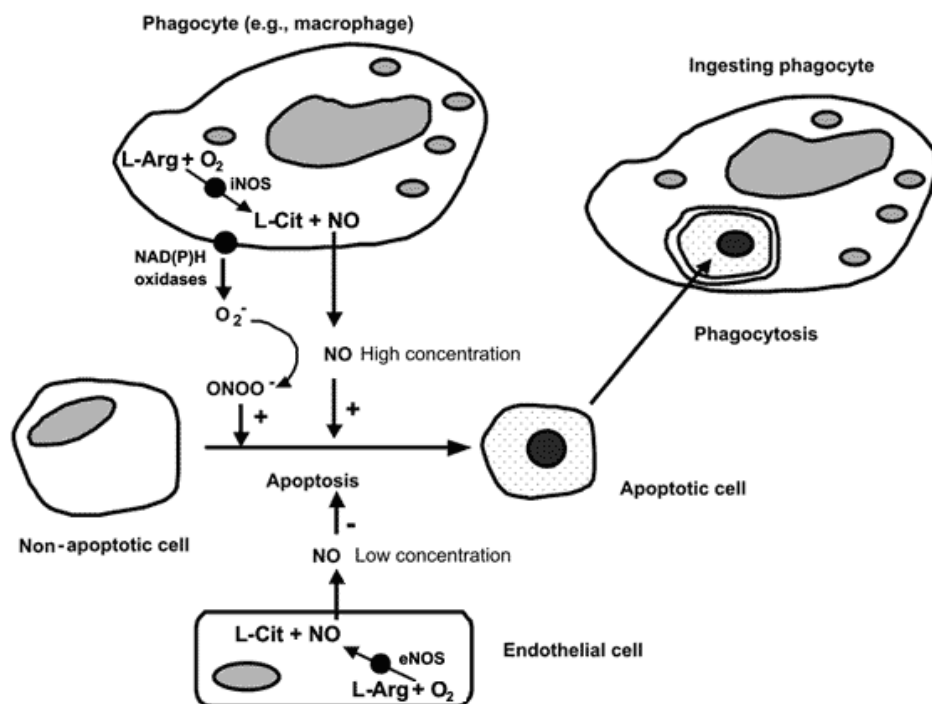
Flavonoids และ Phenolic compound เป็นสารที่พบได้ในธรรมชาติ มีรายงานอย่างแพร่หลายเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระอื่นๆ เช่น Cu, Zn, Mg, Tocopherol, Carotenoid พบว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่พบได้ในธรรมชาติ นั้น นอกจากมีราคาที่ถูกกว่าแล้ว ยังมีผลข้างเคียงต่อร่างกายน้อยกว่าอีกด้วย อีกทั้ง Flavonoids และ Phenolic compound ยังมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ซึ่งมีรายงานมากมายใน preclinical studies พบว่าสารเหล่านี้มีคุณสมบัติในการยับยั้ง 2 signal pathways หลักของกระบวนการอักเสบ คือ NF-kB และ Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs)⁽²⁾ ดังแสดงในรูปที่ 9 และ 10



รูปที่ 9 แสดงกลไกการอักเสบผ่าน NF-kB pathway⁽¹⁰⁾



รูปที่ 10 แสดงกลไกการอักเสบผ่าน MAPKs pathway⁽¹⁰⁾



รูปที่ 11 แสดงกลไกการกระตุ้นการหลั่ง NO⁽¹¹⁾

2.5 ฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสำคัญในพืช

จากการทบทวนวรรณกรรมของ Lijuan Zhang และคณะ (2019) เป็นการศึกษาสารสำคัญในพืชที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ พบว่าเรามีสารสำคัญหลายชนิดที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบได้⁽¹²⁾ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงสารสำคัญในพืชที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ

Category			Chemical(s)	Food/Plant resources	Anti-inflammatory Effects
Phenolic compound	Flavonoids	Flavonols	Kaempferol	apples, grapes, tomatoes, green tea, potatoes, onions, broccoli	Reduces the release of TNF- α and IL-1 β ; Down-regulation the gene and protein expressions of pro-atherogenic molecules, such as E-selectin, ICAM-1, VCAM-1 and MCP-1
			Myricetin	grape, apple, berries, nuts, tea, red wine	Prevent NF- κ B activation in a monocyte; Inhibits the secretion of IL-6, IL-8
			Quercetin	red onions, kale, apples, parsley, sage, tea	Reduce IL-6 and TNF- α levels via modulation of NF- κ B
		Flavanones	Apigenin	parsley, onions, tea, wheat sprouts	Inhibit TNF- α -induced NF- κ B transcriptional activation; inhibits TNF- α -induced JNK activation

		Flavan-3-ols	Catechin	tea, wine, cocoa	Inhibit TNF- α -induced NF- κ B activity and consequently strongly diminished the secretion of IL-8
			Epicatechin	tea, wine, beans, cocoa	Inhibit diet-induced NF- κ B activity
			Epigallocatechin gallate	tea, apple skin, plums, onions, hazelnuts, pecans, carob powder	Decrease lipid peroxidation, oxidative stress and the gallate and production of NO radicals by inhibiting the expression of iNOS; Reduces the activity of NF- κ B and AP-1

ปรับปรุงข้อมูลจาก Lijuan Zhang และคณะ (2019)⁽¹²⁾

2.6 ฤทธิ์ด้านการอักเสบของชาเขียว

ในการศึกษาในโรคมะเร็งซึ่งมีพยาธิสภาพสัมพันธ์กับการอักเสบเรื้อรัง โดยเมื่อเซลล์เกิดการบาดเจ็บหรือติดเชื้อ ทำให้เนื้อเยื่อเกิดการอักเสบและมีการซ่อมแซมตัวเองเพื่อให้เซลล์กลับสู่สภาวะปกติ โดยจะมีการซ่อมแซมอย่างเป็นลำดับ และหากกระบวนการดังกล่าวเกิดขึ้นอย่างไม่เป็นลำดับขั้น โดยเฉพาะในระหว่างการเกิดกระบวนการอักเสบเรื้อรัง ซึ่งทำให้เซลล์ไม่สามารถกลับสู่สภาวะปกติได้ พร้อมทั้งสร้างสภาพแวดล้อมรอบเซลล์มะเร็ง (tumor microenvironment) ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในที่สุด⁽¹³⁾ โดย Masami Suganuma และคณะ (1999) พบการเสริมฤทธิ์ของ Epigallocatechin Gallate กับ Epicatechin, Sulindac, Tamoxifen ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอด PC-9 จากการศึกษาการเสริมฤทธิ์ของการใช้ร่วมกัน (co-treatment) ระหว่าง EC และองค์ประกอบ Polyphenol อื่นๆ ในชาเพื่อยับยั้งการหลั่งของ TNF- α พบว่าเมื่อใช้ EC ร่วมกับ EGCG หรือ ECG จะสามารถยับยั้งการหลั่งของ TNF- α ได้มากกว่าเมื่อเทียบกับ

การใช้ EC เพียงตัวเดียว⁽¹⁴⁾ ดังแสดงในตารางที่ 3 ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าการใช้สารสกัดในชาเขียวทั้งหมดจะมีผลยับยั้งการหลั่งของ TNF- α ได้ดีกว่าการใช้องค์ประกอบ Polyphenol เดียว ซึ่งส่งผลให้ยับยั้งการอักเสบได้ดีนั่นเอง

จากการทบทวนวรรณกรรม พบว่าชาเขียวมีฤทธิ์ antioxidant มากที่สุดเมื่อเทียบกับชาชนิดอื่นๆ และยังพบว่า ฤทธิ์ antioxidant มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ anti-inflammation ทำให้ผู้วิจัยเลือกใช้ชาเขียวในการวิจัย โดยสารสำคัญที่พบในชาเขียว ได้แก่ Epigallocatechin gallate (EGCG) ที่จัดอยู่ในกลุ่ม Polyphenol compounds นอกจากนี้ยังพบ Epicatechin gallate (ECG), Epigallocatechin (EGC) และ Epicatechin (EC)

ตารางที่ 3 การเสริมฤทธิ์ของ co-treatment ระหว่าง EC และองค์ประกอบ Polyphenol อื่นๆในชา เพื่อยับยั้ง TNF- α release

	inhibition of TNF- α release IC ₅₀ (μ M)	
	without EC	with EC (100 μ M)
control		>500
EGCG (100 μ M)	60	15
ECG (50 μ M)	30	7
EGC (200 μ M)	ND	ND

ND, not determine, ปรับปรุงข้อมูลจาก Masami Suganuma และคณะ (1999)⁽¹⁴⁾

2.7 การเสริมฤทธิ์กันของสารสำคัญที่มีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบทั้งจากธรรมชาติและจากการสังเคราะห์

หลักการใช้สารผสม (combination) เพื่อเสริมฤทธิ์ (synergistic) ใดๆ นั้นได้ถูกใช้กันอย่างแพร่หลาย Putu Yudhistira Budhi Setiawan และคณะ (2021) ทำการศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของ Curcumin กับสารอื่นๆ ที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ พบว่ามีการเสริมฤทธิ์กันได้โดยออกฤทธิ์ในกลไกที่แตกต่างกัน ซึ่งสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของสารต้านอนุมูลอิสระ, bioavailability, regulation of multiple pathways และ inflammatory markers โดยแสดงผลดังตารางที่ 4 เป็นการนำสารสำคัญที่มีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบทั้งจากธรรมชาติและจากการสังเคราะห์มาเสริมฤทธิ์กับ Curcumin⁽¹⁵⁾

ตารางที่ 4 แสดงผลการเสริมฤทธิ์ด้านการอักเสบของ Curcumin และสารต่างๆ

Component	Pharmacology	Induction / treatment	Result	Reference
Berberine	Male Sprague Dawley rats	High calorie	Decreases expression of Sterol regulatory element-binding transcription factor 1, protein extracellular signal-regulated kinase, TNF- α , and protein c-Jun N-terminal kinase	(Feng et al., 2018)
Ursolic acid	Female ICR mice	Tissue plasminogen activator (TPA)	Inhibits the expression of IL-1 β , IL-6, IL-19, IL-22, chemokine ligand 2 (CXCL2), COX-2, and VEGFA	(Tremmel et al., 2019)
Luteolin	Male C57BL/6 mice	TNF- α	Reduces TNF- α vascular inflammation	(Lijuan et al., 2019)

ปรับปรุงข้อมูลจาก Putu Yudhistira Budhi Setiawan และคณะ (2021)⁽¹⁵⁾

2.8 โหระพา

จากการทบทวนวรรณกรรมเรื่องการเสริมฤทธิ์ด้านการอักเสบของพืชชนิดต่างๆ โดยพิจารณาจากความเข้ากันของรสชาติและกลิ่นที่น่าจะเข้ากันได้ จึงเลือกโหระพามาทำการวิจัย ซึ่งใช้สารสกัดจากใบโหระพาในการเสริมฤทธิ์ด้านการอักเสบกับสารสกัดชาเขียว

2.8.1 ข้อมูลลักษณะทั่วไปของโหระพา

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Ocimum basilicum* Linn.

ชื่อภาษาอังกฤษ: Sweet Basil, Thai Basil

ชื่ออื่น: ก้อมก้อ, นางพญาร้อยชู้, โหระพาไทย, โหระพาเทศ, ห่อกล้วยขวย

วงศ์ : LABIATAE หรือ LAMIACEAE

แหล่งที่พบ: นิเวศวิทยาของโหระพามีถิ่นกำเนิดในเอเชียและแอฟริกา

2.8.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

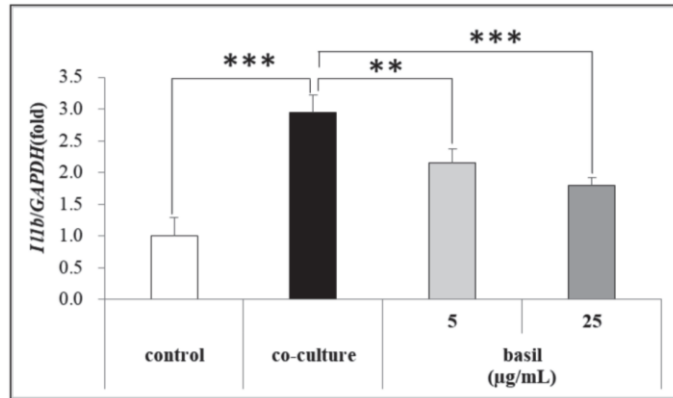
ลักษณะพืช พืชล้มลุก อายุหลายปี สูง 0.3–0.9 เมตร ลำต้นกิ่งก้านเป็นเหลี่ยม สีม่วงหรือแดงเข้ม ใบคู่ เรียงตรงข้าม รูปไข่หรือวงรี ขอบใบหยักฟันเลื่อย ดอกสีขาว ออกที่ปลายยอดลำต้น ผลแห้ง มี 4 ผล ย่อย เมล็ดเล็กเท่าเมล็ดงา สีนํ้าตาลเข้ม โหระพาเป็นพืชพื้นเมืองของอินเดีย แต่แพร่หลายทั้งในเอเชียและตะวันตก⁽¹⁶⁾



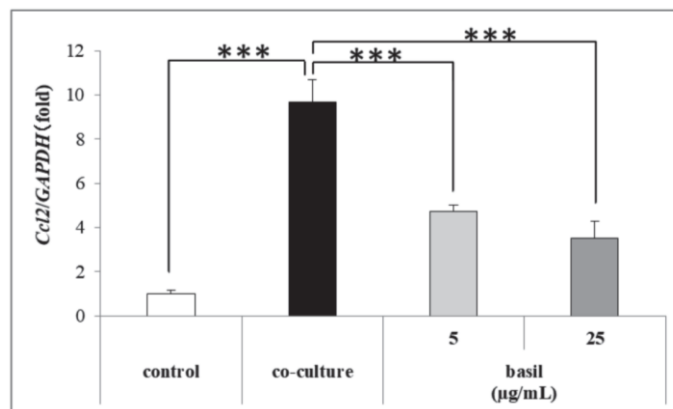
รูปที่ 12 โหระพา⁽¹⁶⁾

2.8.3ฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดจากใบโหระพา

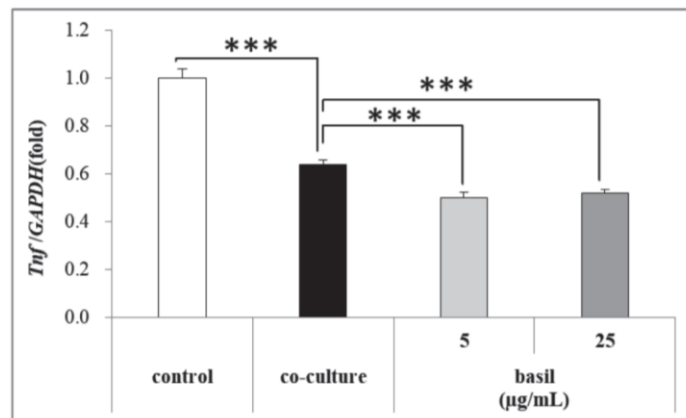
Haruka Takeuchi และคณะ (2020) ศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดใบโหระพา ในเซลล์ 3T3-L1 adipocytes และ RAW264.7 macrophages โดยดูการแสดงออกของยีน *IL-6* (*IL6*), *IL-1β* (*IL1b*), *TNF-α* (*Tnf*), และ *CCL2* (*Ccl2*) ผลการทดลองพบว่า สารสกัดจากใบโหระพาลดระดับ mRNA ของ NF-κB (*Nfκb1*) ซึ่งเป็น transcription factor ควบคุมการแสดงออกของ cytokine gene โดยตรง และสารสกัดจากใบโหระพาจะยับยั้งการแสดงออกของยีน *IL-6* (*IL6*), *IL-1β* (*IL1b*), *TNF-α* (*Tnf*), และ *CCL2* (*Ccl2*) อีกด้วย⁽³⁾ ดังแสดงในรูปที่ 13-16



(a)

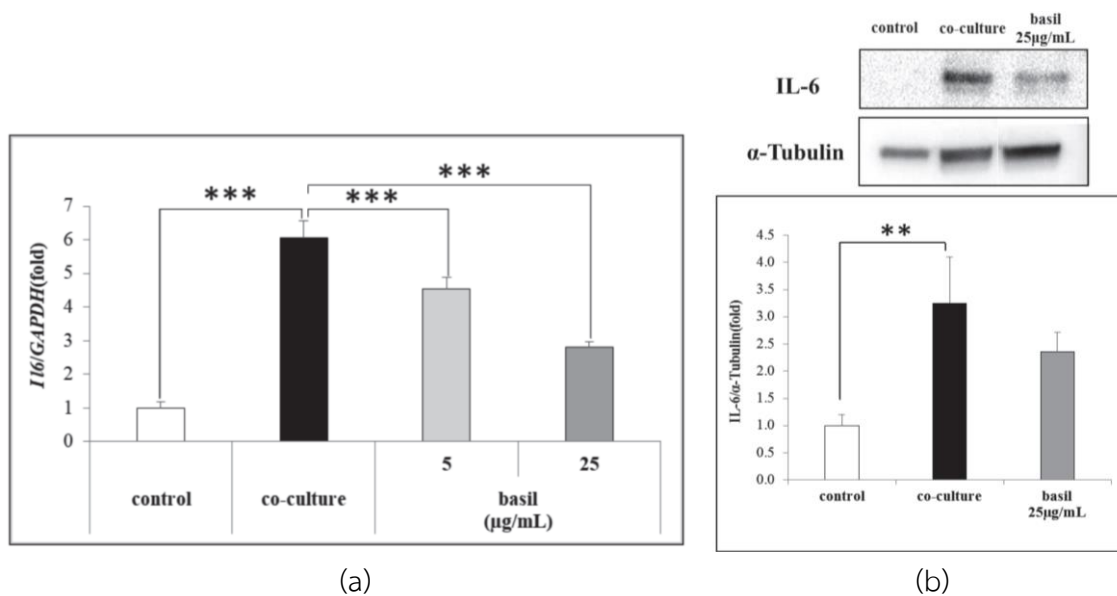


(b)

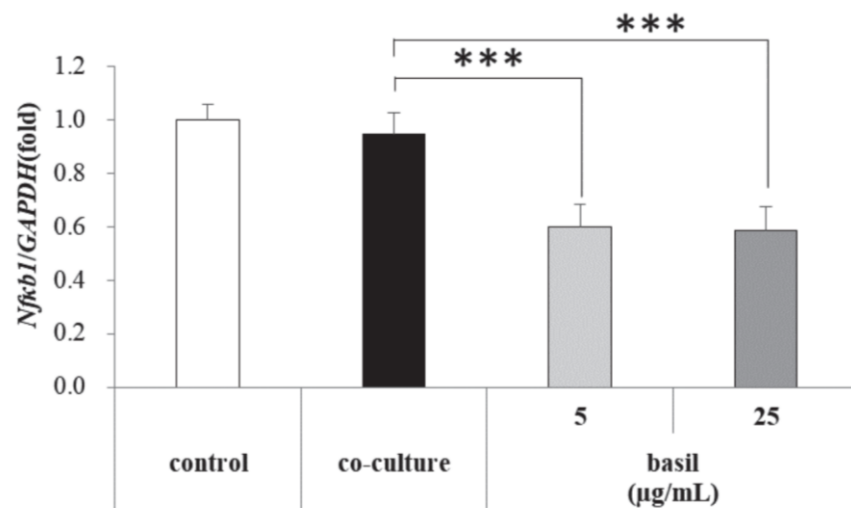


(c)

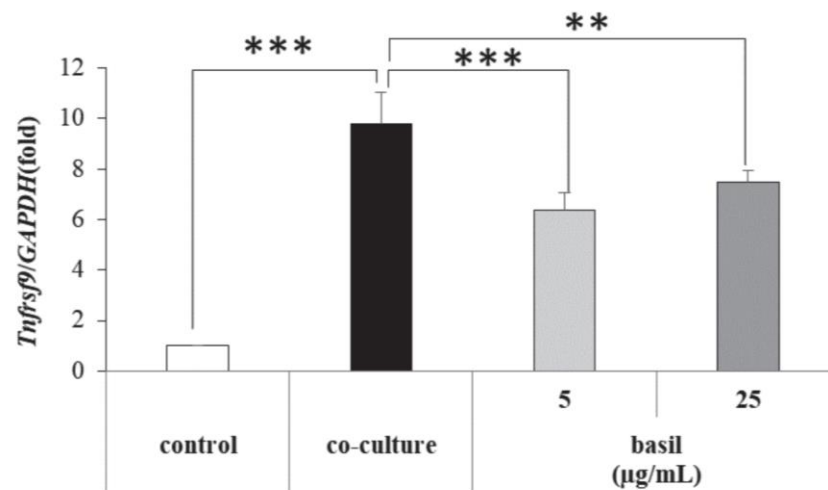
รูปที่ 13 การแสดงออกของยีน Il 1b (a), and Ccl2 (b) และ Tnf (c) ใน co-culture ของเซลล์ 3T3-L1 adipocytes และ RAW264.7 macrophages⁽³⁾



รูปที่ 14 การแสดงออกของยีน *IL-6* (IL6) (a) และปริมาณโปรตีน IL-6 (b) ใน co-culture ของเซลล์ 3T3-L1 adipocytes และ RAW264.7 macrophages⁽³⁾



รูปที่ 15 การแสดงออกของยีน *NF-κB* (Nfkb1) ใน co-culture ของเซลล์ 3T3-L1 adipocytes และ RAW264.7 macrophages⁽³⁾



รูปที่ 16 การแสดงออกของยีน *TNF-RSF9* (Tnfrsf9) ใน co-culture ของเซลล์ 3T3-L1 adipocytes และ RAW264.7 macrophages⁽³⁾

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 ตัวอย่างพืชและการสกัด

ใบชาเขียวแห้ง จัดซื้อจากแหล่งผลิตที่เชื่อถือได้และทำการส่งตัวอย่างเพื่อทำการระบุสายพันธุ์จากฐานฐานวิทยา ส่วนใบโหระพา ซื้อจากตลาดและทำการตากแห้ง จากนั้น นำตัวอย่างใบชาเขียวแห้งและใบโหระพาแห้งไปสกัดด้วยการต้มในน้ำเดือด 10 นาที หรือการแช่ในน้ำต้มเดือด เป็นเวลา 10 และ 60 นาที ตามลำดับ จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปเข้าเครื่อง freeze dryer ทำการเก็บสารสกัดหยาบ (crude extract) ที่ได้อ่อนฤทธิ์ 4 องศาเซลเซียส ตลอดการทดลอง

3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดชาเขียวและโหระพา โดยดัดแปลงจากวิธีของมานิสา จักรมาและคณะ⁽¹⁷⁾

3.2.1 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity assay โดยเติมสารสกัดชาเขียวและโหระพาที่ความเข้มข้น 0, 1, 2, 10, 20 และ 100 % ปริมาตร 20 μL และเติมสารละลาย 0.15 mM DPPH ปริมาตร 180 μL ลงใน 96-well plate ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที นำมาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader (Crocodile 5-in-one ELISA miniWorkstation; Berthold Technologies; Bad Wildbad, Germany) โดยใช้ Trolox เป็นสารละลายมาตรฐาน และรายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการคำนวณ % inhibition ของสารสกัดเทียบกับตัวควบคุม ดังสมการ

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

3.2.2 Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP assay) โดยเตรียม FRAP reagent จาก 300 mM acetate buffer pH 3.6, 10 mM 2,4,6-Tri (2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) ใน 40 mM HCl และ 20 mM ferric chloride ทำการวิเคราะห์โดยปฏิกิริยารีดอกซ์ของสารสกัดชาเขียวและโหระพาที่ความเข้มข้น 0, 1, 2, 10, 20 และ 100 % ปริมาตร 10 μL ผสมกับสารละลาย FRAP reagent ปริมาตร 190 μL ใน 96-well plate ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที นำมาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 nm ด้วยเครื่อง microplate reader โดยใช้ trolox เป็นสารมาตรฐาน และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสามารถคำนวณเป็นค่า Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) ซึ่งเทียบจากสารละลายมาตรฐาน trolox

3.2.3 Nitric oxide radical scavenging โดยดัดแปลงจากวิธีของ Linlin Jing และคณะ⁽¹⁸⁾ โดยเติม 10 mM sodium nitroprusside ใน PBS จำนวน 50 μ l ลงใน 96-well plate ที่มีสารสกัดชาเขียวและโหระพาที่ความเข้มข้น 0, 3, 10, 30 และ 100 % และบ่มไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติม griess reagent (2% sulfanilamide in 4% phosphoric acid และ 0.2% naphthylethylenediamide) จำนวน 100 μ l และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm คำนวณหา % inhibition ตามสมการ

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

3.3 เซลล์และการเพาะเลี้ยงเซลล์

เซลล์มาโครฟาจ Murine monocyte-derived macrophage RAW264.7 cell line ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Seiji Okada โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยง RPMI-1640 ที่ประกอบด้วย 3.7 mg/ml NaHCO₃, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin G, 100 μ g/ml streptomycin และ 10% fetal bovine serum เซลล์ถูกเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่สภาวะ 5% CO₂ ทำการเก็บเซลล์ด้วย 0.05% trypsin-EDTA solution

3.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

การทดสอบความเป็นพิษของเซลล์ RAW264.1 โดยดัดแปลงจากวิธีของ Pattaravadee Srikoon และคณะ⁽¹⁹⁾ ที่กระตุ้นด้วย LPS ด้วยวิธี MTT assay ทำได้โดยบ่มเซลล์ด้วยสารสกัดชาเขียวและใบโหระพาที่เตรียมใน RPMI ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย MTT ความเข้มข้นสุทธิ 0.5 mg/ml แล้วบ่ม 2 ชั่วโมงเพื่อให้เกิดตะกอน จากนั้นเติม 0.04 N HCl ใน isopropanol เพื่อละลายตะกอน และวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง ELISA plate reader ที่ 570 และ 630 nm

3.5 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ

การทดสอบการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ของเซลล์ RAW264.1 ที่กระตุ้นด้วย LPS โดยดัดแปลงจากวิธีของมานิส จักรมา และคณะ⁽¹⁷⁾ ทำได้โดยบ่มเซลล์ด้วยสารสกัดชาเขียวและใบโหระพาที่เตรียมใน RPMI ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บ supernatant เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยการผสมกับ 100 μ l griess reagent (0.5% sulfanilamide, 0.05% N-(1-naphthyl) ethylene diamine dihydrochloride in 2.5% H₃PO₄) ใน 96-well tissue culture plate บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm ด้วย เครื่อง ELISA plate reader และคำนวณหาค่า IC₅₀

3.6 สถิติ

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยสถิติ ANOVA โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS version 21 โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า $p < 0.05$

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปราย

4.1 การสกัดตัวอย่างพืช

ในการสกัดใบชาเขียวและใบโหระพาด้วยการต้มและแช่ในน้ำเดือดที่ 10 และ 60 นาที แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง ส่วนของสารสกัดที่ถูกทำให้แห้งด้วย freeze drying พบว่าได้สารสกัดแห้งคิดเป็นร้อยละ 17-27 โดยประมาณ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดง % yield ของสารสกัดชาและโหระพา

	ชาต้ม	ชาแช่ 10 นาที	ชาแช่ 60 นาที	โหระพาต้ม	โหระพาแช่ 10 นาที	โหระพาแช่ 60 นาที
Dry weight (g)	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00
Crude extract weight (g)	3.25	2.90	2.85	2.14	2.73	2.04
% yield	27.11	24.20	23.75	17.87	22.74	17.02

4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้ทำการทดสอบในหลอดทดลองด้วยวิธี DPPH วิธี FRAP และวิธี NO scavenging โดยใช้สารสกัดที่ได้จากการต้ม แช่ในน้ำเดือดที่ 10 และ 60 นาที ทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ

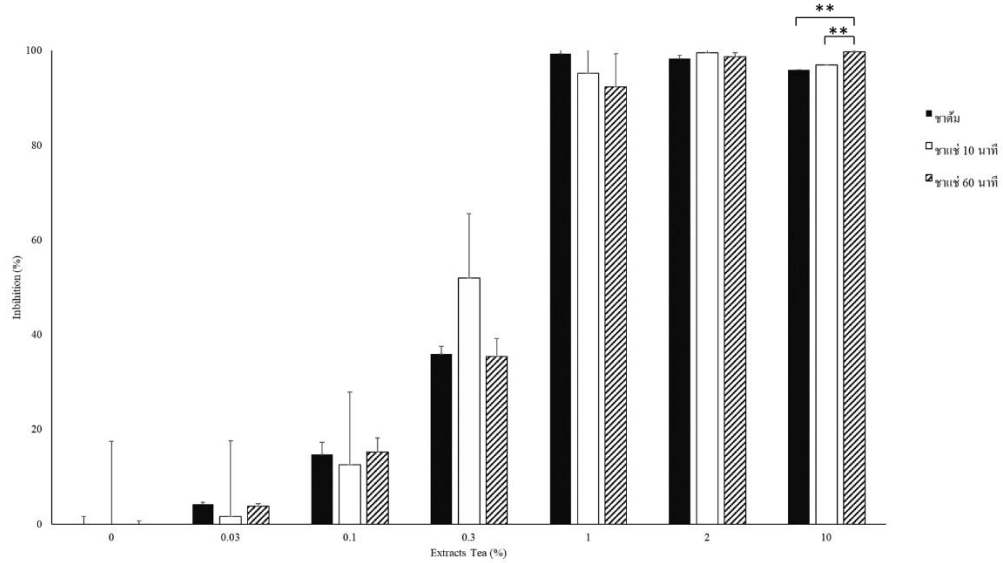
4.2.1 DPPH assay

DPPH assay เป็นวิธีที่วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl ในตัวทำละลาย methanol เป็น stable radical ซึ่งสารละลายจะมีสีม่วงและดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 520 nm โดย DPPH จะเกิดปฏิกิริยากับ antioxidant หรือ radical species ทำให้ความเข้มข้นของสารละลายลดลง สีม่วงก็จะอ่อนลงด้วยเช่นกัน ซึ่งจากการศึกษาจะรายงานผลการทดลองเป็นค่า % inhibition ซึ่งหมายถึง ความสามารถในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระของสารสกัด

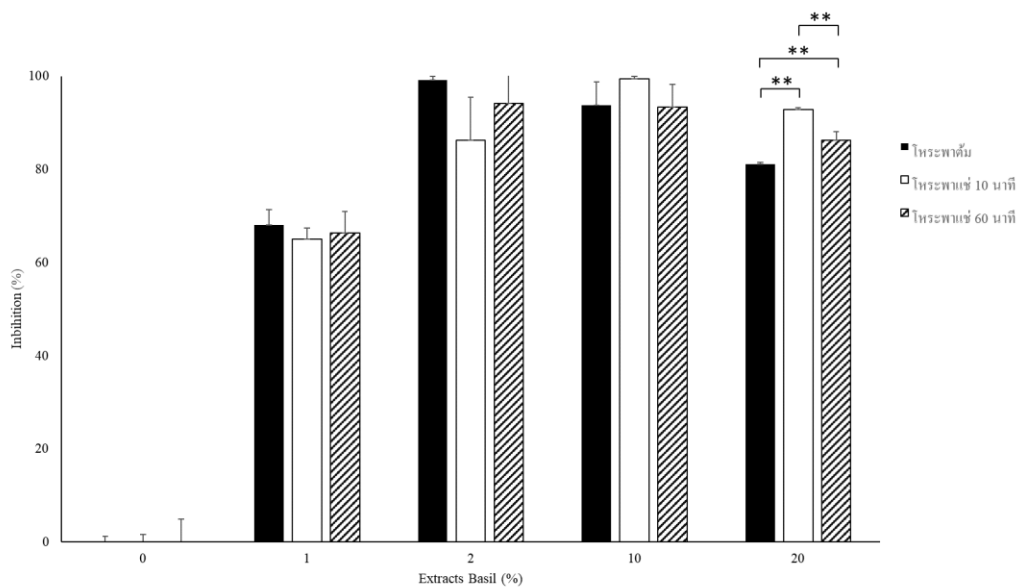
จากการวิเคราะห์สารสกัดชาด้วยวิธี DPPH assay ที่ความเข้มข้น 0, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 2 และ 10 % พบว่าความสามารถในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระของสารสกัดชาความเข้มข้น 10 % ที่สกัดด้วยวิธีการต้ม และแช่ 60 นาที, วิธีสกัดด้วยการแช่ 10 และ 60 นาที แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

จากการวิเคราะห์สารสกัดโหระพาที่ความเข้มข้น 0, 1, 2, 10 และ 20 % พบว่าความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดโหระพาความเข้มข้น 20 % ที่สกัดด้วยวิธีการต้ม และแช่ 10 นาที, วิธีการต้ม และแช่ 60 นาที, วิธีสกัดด้วยการแช่ 10 และ 60 นาที แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

โดยจากผลการศึกษาดังกล่าวความเข้มข้นของสารที่เพิ่มสูงขึ้น แสดงให้เห็นว่าวิธีการสกัดสารที่แตกต่างกันมีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสาร



รูปที่ 17 แสดงกราฟผล % inhibition ของสารสกัดชาด้วยวิธีวิเคราะห์ DPPH assay ค่าที่แสดงเป็นค่า mean $\pm$ SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ (**p<0.05)



รูปที่ 18 แสดงกราฟผล % inhibition ของสารสกัดโหระพาด้วยวิธีวิเคราะห์ DPPH assay ค่าที่แสดงเป็นค่า mean $\pm$ SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ (**p<0.05)

จากผลการทดสอบหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง ด้วยวิธี DPPH assay และ Nitric oxide radical scavenging โดยพบว่าค่า IC_{50} ที่วิเคราะห์ด้วย DPPH assay ในสารสกัดขามีแนวโน้มของค่า IC_{50} น้อยกว่าสารสกัดโหระพา และจากทั้ง 2 สารสกัด ที่สกัดด้วยวิธีการต้มได้ค่า IC_{50} น้อยที่สุดเมื่อเทียบกับการสกัดอีก 2 วิธี โดยเมื่อนำสารสกัดมาเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่เคยมีการศึกษา พบว่าค่า IC_{50} ที่แช่น้ำร้อน 60 นาที ซึ่งเป็นวิธีการสกัดที่ใกล้เคียงกัน มีค่า IC_{50} สูงกว่าที่มีรายงาน 7 เท่า ($616.75 \pm 0.028 \mu\text{g/ml}$) โดยงานวิจัยของ Fatemeh Hajiaghaalipour และคณะ (2016)⁽⁸⁾ พบว่าสารสกัดชาที่สกัดด้วยน้ำร้อนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ $79.4 \pm 2.1 \mu\text{g/ml}$

ในส่วนของสารสกัดโหระพา ค่า IC_{50} ที่วิเคราะห์ด้วยการสกัดแช่น้ำร้อน 60 นาที ซึ่งเป็นวิธีการสกัดที่ใกล้เคียงกัน มีค่า IC_{50} สูงกว่าที่มีรายงาน 4 เท่า ($1111.73 \pm 0.076 \mu\text{g/ml}$) เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Nguyen และคณะ⁽²⁰⁾ พบว่าสารสกัดใบโหระพาที่สกัดด้วยน้ำร้อน 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ $258.55 \pm 6.08 \mu\text{g/ml}$

4.2.2 FRAP assay

เป็นการวัดความสามารถในการรับอิเล็กตรอนของ Fe^{3+} -TPTZ ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีเหลือง ได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านออกซิเดชัน จากนั้นจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อน Fe^{2+} -TPTZ ที่มีสีม่วงน้ำเงิน โดยในการศึกษานี้ใช้สารมาตรฐาน trolox เป็นตัวเปรียบเทียบ ซึ่งฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสามารถคำนวณเป็นค่า Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) ที่เทียบจากสารละลายมาตรฐาน trolox โดยค่า TEAC หมายถึง ความเข้มข้นของ trolox ที่มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระเท่ากับสารที่ทดสอบ 1 g

ตารางที่ 6 แสดงค่า TEAC โดยวิธีวิเคราะห์ FRAP assay และ IC_{50} ของ DPPH assay ของสารสกัดชาและโหระพา (^{1,2,3,4,5,6} significant at P-value <0.05 (ANOVA))

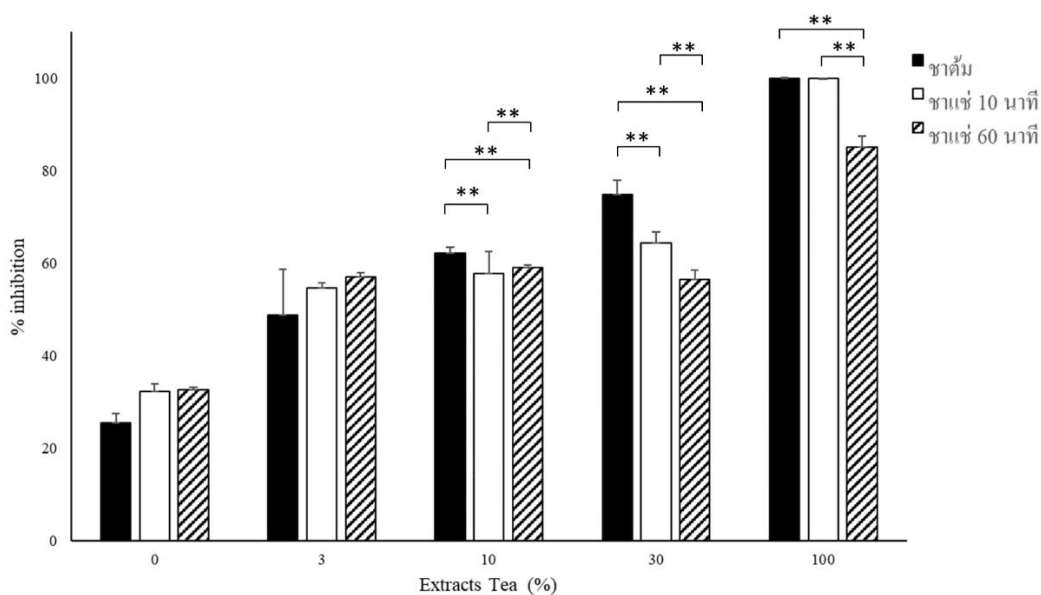
ชนิดพืช	วิธีการสกัด	TEAC ของ FRAP assay (mg Trolox / g dry plant)	IC_{50} ของ DPPH assay ($\mu\text{g/ml}$)
ชา	ต้ม	225.49 ± 10.40 ^{1,2}	578.41 ± 1.13
	แช่ 10 นาที	167.83 ± 1.34 ^{1,3}	625.57 ± 8.98
	แช่ 60 นาที	135.76 ± 5.47 ^{2,3}	616.75 ± 2.76
โหระพา	ต้ม	80.29 ± 15.06 ^{4,5}	1061.13 ± 3.41
	แช่ 10 นาที	61.09 ± 2.39 ^{5,6}	1187.48 ± 8.71
	แช่ 60 นาที	56.30 ± 0.96 ^{4,6}	1111.73 ± 7.58

ผลการวิเคราะห์สารสกัดชาและโหระพา เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay และ FRAP assay พบว่าการสกัดด้วยวิธีต้ม ทำให้ได้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดเมื่อเทียบกับการสกัดอีก 2 วิธี

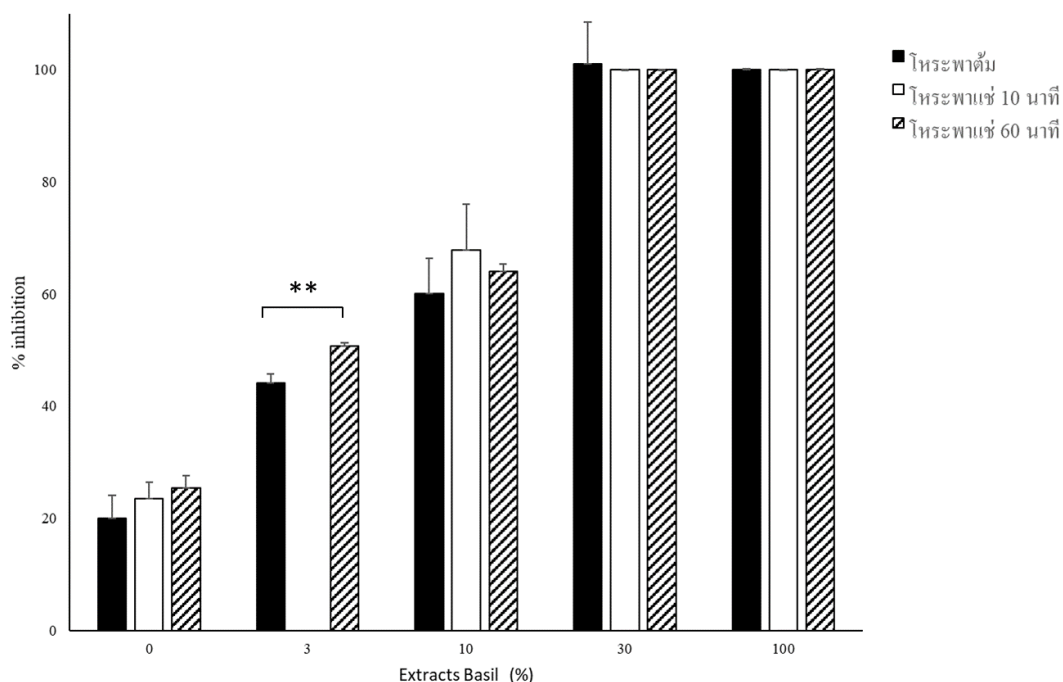
ผลการศึกษา TEAC ด้วยวิธีวิเคราะห์ FRAP assay สารสกัดโหระพา พบว่าการสกัดด้วยวิธีต้มมีค่า TEAC มากที่สุด และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ R. P. P. Fernandes และคณะ⁽²¹⁾ ซึ่งสกัดใบโหระพาด้วย สารละลายผสม (acetone: ultrapure water: glacial acetic acid, 70:28:2) 2 นาที รายงานค่า TEAC เท่ากับ 213.28 $\mu\text{mol Trolox/g dry weight}$ เมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษานี้พบว่าจะได้ค่า TEAC มากกว่าที่เคย มีรายงานเพียงเล็กน้อย คือ 320.77 $\mu\text{mol Trolox/g}$ (วิธีต้ม), 244.09 $\mu\text{mol Trolox/g}$ (วิธีแช่ 10 นาที), 224.92 $\mu\text{mol Trolox/g}$ (วิธีแช่ 60 นาที)

ในส่วนของการสกัดชา ยังไม่มีการรายงานผลการศึกษา TEAC ด้วยวิธีวิเคราะห์ FRAP assay

4.2.3 Nitric oxide radical scavenging



รูปที่ 19 แสดงกราฟผล % inhibition ของสารสกัดชาด้วยวิธีวิเคราะห์ Nitric oxide radical scavenging ค่าที่แสดงเป็นค่า mean $\pm$ SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ (**p<0.05)



รูปที่ 20 แสดงกราฟผล % inhibition ของสารสกัดโหระพาด้วยวิธีวิเคราะห์ Nitric oxide radical scavengingค่าที่แสดงเป็นค่า mean $\pm$ SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ (**p<0.05)

ตารางที่ 7 แสดงค่า IC₅₀ โดยวิธีวิเคราะห์ Nitric oxide radical scavenging ของสารสกัดชาและโหระพา

ชนิดของพืช	วิธีการสกัด	IC ₅₀ mg/ml
ชา	ต้ม	9.80 $\pm$ 6.44
	แช่ 10 นาที	8.13 $\pm$ 2.76
	แช่ 60 นาที	5.83 $\pm$ 0.32
โหระพา	ต้ม	10.14 $\pm$ 1.59
	แช่ 10 นาที	9.49 $\pm$ 2.15
	แช่ 60 นาที	7.84 $\pm$ 0.53

Nitric oxide radical scavenging เป็นการวัดปริมาณ NO ในหลอดทดลอง (in vitro) ซึ่งเป็นสารสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ โดยจะรายงานเป็นค่า % inhibition ซึ่งบ่งบอกถึงความสามารถในการยับยั้งการสร้าง NO ของสารสกัด

จากการวิเคราะห์สารสกัดชาด้วยวิธี Nitric oxide radical scavenging ที่ความเข้มข้น 0, 3, 10, 30 และ 100 % พบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดชาความเข้มข้น 30 % ทุกวิธีการสกัด และ ที่ความเข้มข้น 100 % ที่สกัดด้วยวิธีการต้ม และแช่ 60 นาที, วิธีแช่ 10 นาที และ 60 นาที แสดงให้เห็นว่าวิธีสกัดการสกัดที่แตกต่างกันมีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสาร แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

จากการวิเคราะห์สารสกัดโหระพา ที่ความเข้มข้น 0, 3, 10, 30 และ 100 % พบว่าที่ความเข้มข้น 3 % ที่สกัดด้วยวิธีการต้ม และแช่ 60 นาที แสดงให้เห็นว่าวิธีสกัดการสกัดที่แตกต่างกันมีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสาร แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยจากผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นความเข้มข้นของสารที่เพิ่มสูงขึ้นความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารนั้นเพิ่มขึ้นด้วย

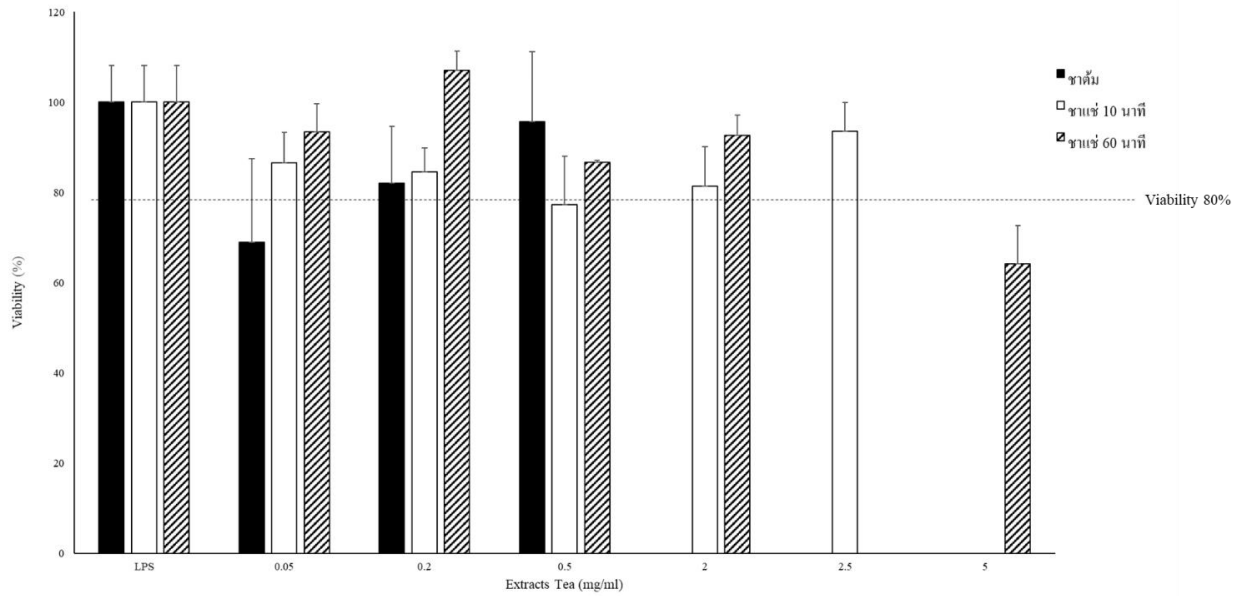
โดยเมื่อวิเคราะห์ Nitric oxide radical scavenging ซึ่งรายงานค่า IC_{50} ของชาที่สกัดด้วยวิธีการแช่ 60 นาที มีค่าน้อยที่สุด และเมื่อนำผลการศึกษาไปเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Kittipot Sirichaiwetchakoon และคณะ⁽²²⁾ ซึ่งสกัดชาด้วยต้มกับสารละลาย Phosphate buffer saline เป็นเวลา 5 นาที รายงานค่า IC_{50} เท่ากับ $178.42 \pm 15.52 \mu\text{g/ml}$ พบว่าค่า IC_{50} ที่ได้จากการศึกษามีค่าสูงกว่าที่เคยมีรายงาน 55 เท่า (วิธีต้ม $IC_{50} = 9800.50 \pm 6443.39 \mu\text{g/ml}$), 45 เท่า (วิธีแช่ 10 นาที $IC_{50} = 8126.99 \pm 2760.92 \mu\text{g/ml}$), 33 เท่า (วิธีแช่ 60 นาที $IC_{50} = 5833.08 \pm 316.85 \mu\text{g/ml}$) ทั้งนี้วิธีการสกัดที่แตกต่างกันก็อาจส่งผลให้ผลการศึกษาดังกล่าวแตกต่างกันได้

ส่วนการรายงานค่า IC_{50} ของสารสกัดโหระพา วิธีการสกัดด้วยการแช่ 60 นาที มีค่าน้อยที่สุด เมื่อศึกษาของ Biljana Kaurinovic และคณะ⁽²³⁾ งานวิจัยนี้ใช้วิธีสกัดโดยการกลั่นด้วยน้ำอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง ความดัน 95 mmHg รายงานผลออกมาเป็นค่า $IC_{50} = 6.92 \mu\text{g/ml}$ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษานี้ พบว่าได้ค่า IC_{50} สูงกว่าที่เคยมีรายงานมาอย่างมาก อาจเกิดจากวิธีการสกัดที่ต่างกันส่งผลให้ ผลการศึกษาแตกต่างกันได้

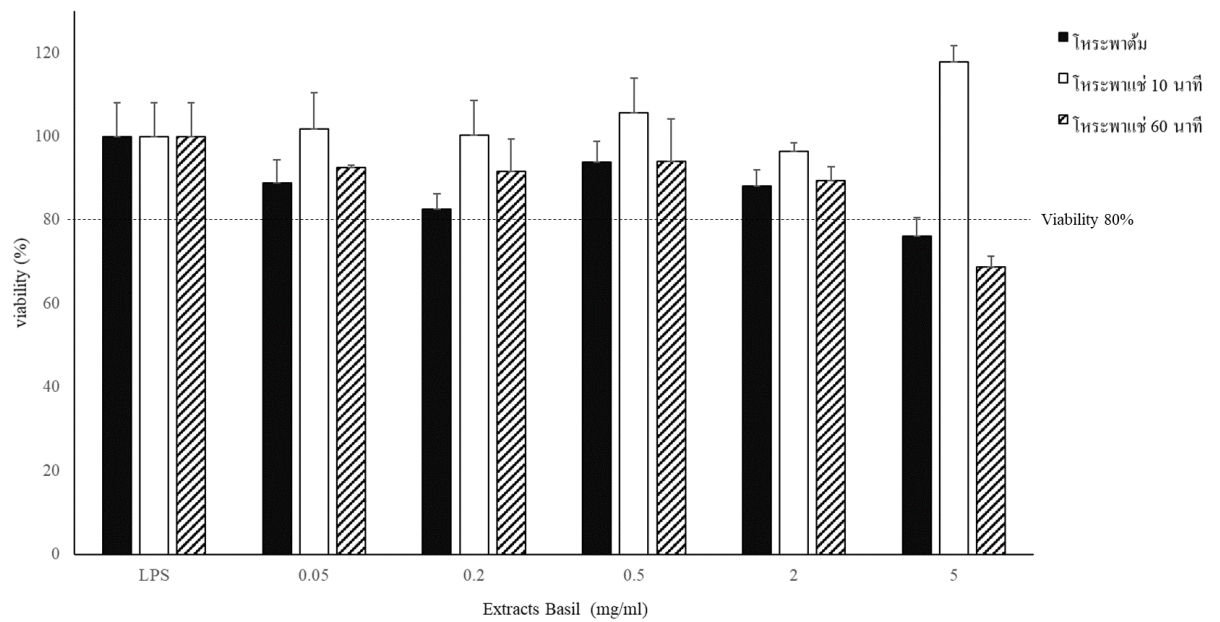
4.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

4.3.1 MTT assay

MTT assay เป็นการวัด reduction environment ของ mitochondria โดยวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ซึ่งจะมี mitochondria function เมื่อเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์จะทำให้มีการเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีม่วงของ formazan รายงานผลเป็น % cell viability



รูปที่ 21 แสดงกราฟผล % viability ของสารสกัดชาด้วยวิธีวิเคราะห์ MTT assay
ค่าที่แสดงเป็นค่า mean $\pm$ SD จากการทดลอง 4 ซ้ำ



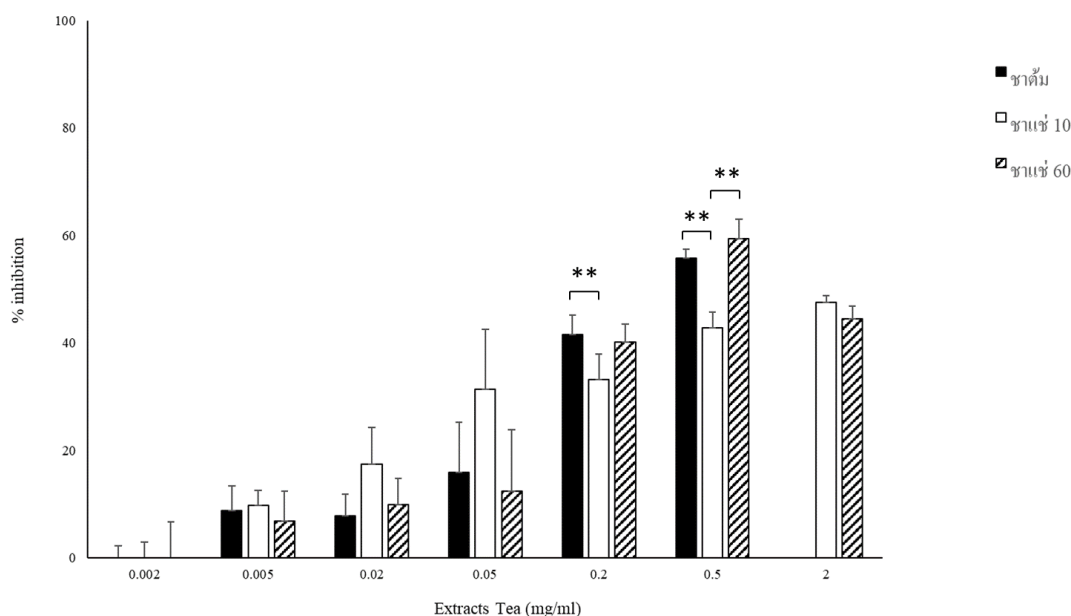
รูปที่ 22 แสดงกราฟผล % viability ของสารสกัดโหระพาดด้วยวิธีวิเคราะห์ MTT assay
ค่าที่แสดงเป็นค่า mean $\pm$ SD จากการทดลอง 4 ซ้ำ

จากการวิเคราะห์สารสกัดชาด้วยวิธี MTT assay ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.2, 0.5, 2, 2.5 และ 5 mg/ml โดยมีเซลล์มาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เป็น control พบว่าสารสกัดชาที่สกัดด้วยวิธีต้มที่ความเข้มข้น 0.05 mg/ml, วิธีแช่ 10 นาที ความเข้มข้น 0.5 mg/ml, วิธีแช่ 60 นาที ความเข้มข้น 5 mg/ml และจากการวิเคราะห์สารสกัดโหระพาที่ความเข้มข้น 0.05, 0.2, 0.5, 2 และ 5 mg/ml พบว่าสารสกัดโหระพาที่สกัดด้วยวิธีต้มและแช่ 60 นาที ที่ความเข้มข้น 5 mg/ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ โดยมีร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์น้อยกว่า 80%

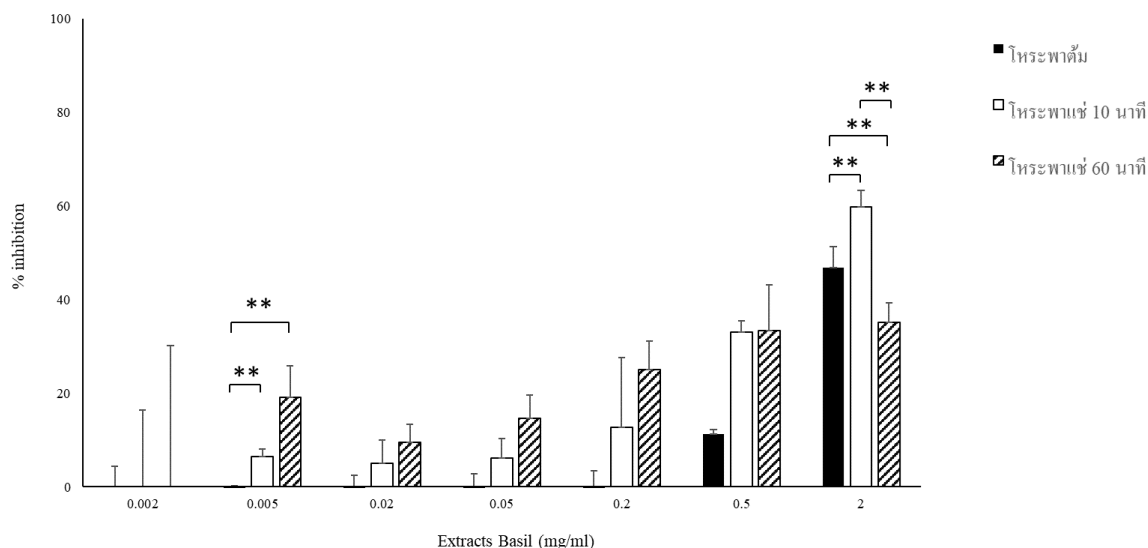
โดยจากผลการศึกษาดังกล่าว พบว่าการศึกษาในสารสกัดชา ยังไม่สามารถสรุปผลได้ ส่วนสารสกัดโหระพาที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.005-2 mg/ml มีร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์มากกว่า 80% ซึ่งเป็นร้อยละที่ยอมรับได้ว่าสารสกัดยังไม่เป็นพิษต่อเซลล์

4.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ

4.4.1 Nitric oxide inhibitory assay



รูปที่ 23 แสดงกราฟผล % inhibition ของสารสกัดชาด้วยวิธีวิเคราะห์ Nitric oxide inhibitory assay ค่าที่แสดงเป็นค่า mean $\pm$ SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ (** $p < 0.05$)



รูปที่ 24 แสดงกราฟผล % inhibition ของสารสกัดชาด้วยวิธีวิเคราะห์ Nitric oxide inhibitory assay ค่าที่แสดงเป็นค่า mean $\pm$ SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ (**p<0.05)

ตารางที่ 8 แสดงค่า IC₅₀ โดยวิธีวิเคราะห์ Nitric oxide inhibitory assay ของสารสกัดชาและโหระพา

ชนิดพืช	วิธีการสกัด	IC ₅₀ (μ g/ml)
ชา	ต้ม	398.89 $\pm$ 2.94 ^{1,2}
	แช่ 10 นาที	557.54 $\pm$ 48.56 ^{2,3}
	แช่ 60 นาที	380.21 $\pm$ 28.31 ^{1,3}
โหระพา	ต้ม	2132.81 $\pm$ 181.31
	แช่ 10 นาที	1576.27 $\pm$ 161.98
	แช่ 60 นาที	2037.86 $\pm$ 1665.39

^{1,2,3} significant at P-value <0.05 (ANOVA)

Nitric oxide inhibitory assay เป็นการวัดปริมาณ NO ซึ่งเป็นสารสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบสร้างจากเซลล์มาโครฟาจ โดยรายงานเป็นค่า % inhibition ซึ่งบ่งบอกถึงความสามารถในการยับยั้งการสร้าง NO ของสารสกัด

จากการวิเคราะห์สารสกัดชาด้วยวิธี Nitric oxide inhibitory assay ที่ความเข้มข้น 0.002, 0.005, 0.02, 0.05, 0.2, 0.5 และ 2 mg/ml พบว่า สารสกัดชาที่ความเข้มข้น 0.2 mg/ml การสกัดด้วย

วิธีต้ม และแช่ 10 นาที, ความเข้มข้น 0.5 mg/ml การสกัดด้วยวิธีต้ม และแช่ 10 นาที, แช่ 10 และ 60 นาที แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

จากการวิเคราะห์สารสกัดโหระพา ที่ความเข้มข้น 0.002, 0.005, 0.02, 0.05, 0.2, 0.5 และ 2 mg/ml พบว่า ที่ความเข้มข้น 0.005 mg/ml การสกัดด้วยวิธีต้ม และ แช่ 10 นาที, ต้มและแช่ 60 นาที และที่ความเข้มข้น 2 mg/ml การสกัดทั้ง 3 วิธี แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

โดยจากผลการศึกษาพบว่า ผลการศึกษาสารสกัดในส่วนของการสกัดยังไม่สามารถสรุปผลได้ ส่วนผลการศึกษาของสารสกัดโหระพาที่ความเข้มข้น 2 mg/ml วิธีการสกัดที่ต่างกัน ส่งผลให้ความสามารถในการยับยั้งการสร้าง NO ต่างกัน ซึ่งจากการศึกษาสารสกัดทั้ง 2 ชนิด พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น จะมีแนวโน้มยับยั้งการสร้าง NO ได้มากขึ้น

ผลการทดสอบหาฤทธิ์ด้านการอักเสบในเซลล์มาโครฟาจ ด้วยวิธี Nitric oxide inhibitory assay พบว่าในสารสกัดขมิ้นมีแนวโน้มของค่า IC_{50} น้อยกว่าสารสกัดโหระพา และจากทั้ง 2 สารสกัด มีแนวโน้มว่าวิธีการสกัดด้วยการแช่ 60 นาที มีค่า IC_{50} น้อยที่สุด โดยจากงานวิจัยของ Po-Jung Tsai และคณะ⁽²⁴⁾ ที่เคยมีการศึกษา พบว่าค่า IC_{50} ของชาที่สกัดด้วยการแช่น้ำ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที มีค่าเท่ากับ 113 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาครั้งนี้ พบว่าวิธีการสกัดที่ใกล้เคียงคือ การแช่ชาที่ 10 นาที ซึ่งมีค่า IC_{50} มากกว่าที่เคยมีรายงาน 5 เท่า ($557.54 \pm 0.049 \mu\text{g/ml}$)

ในส่วนของการสกัดโหระพา ในการศึกษาค่า IC_{50} ของทุกวิธีการสกัดได้ผลการศึกษาสอดคล้องกับงานวิจัยของ Faridah Abas และคณะ⁽²⁵⁾ ซึ่งสกัดใบโหระพาด้วยเมทานอล รายงานค่า IC_{50} ได้มากกว่า 200 $\mu\text{g/ml}$

บทที่ 5

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay, FRAP assay และ NO radical scavenging assay ให้ผลที่มีความสอดคล้องกัน คือ สารสกัดชามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารสกัดโหระพา โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะเพิ่มขึ้นแบบ dose dependent manner

วิธีการสกัดที่ทำให้ได้ สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด จากการทดสอบ DPPH assay และ FRAP assay คือ วิธีต้ม แต่การทดสอบ NO radical scavenging assay คือ วิธีแช่ 60 นาที

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบด้วยวิธี NO inhibitory assay วิธีที่ได้ฤทธิ์การยับยั้งการอักเสบมากที่สุดในการสกัดชาคือ วิธีแช่ 60 นาที แต่ สารสกัดโหระพา คือ วิธีแช่ 10 นาที

จากผลการศึกษาทั้งหมดนี้ สารสกัดชาและโหระพา จึงมีความน่าสนใจอย่างยิ่งในการนำมาศึกษาเพื่อยืนยันผลความแตกต่างของฤทธิ์สารสกัดชาและสารสกัดโหระพาในระดับเซลล์ด้วยการทำการทดสอบที่มีความจำเพาะขึ้น เช่น การศึกษาการแสดงออกของยีน, inflammatory cytokines เป็นต้น และนำไปศึกษาการเสริมฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบของสารสกัดชาและสารสกัดโหระพา เพื่อนำไปต่อยอดในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจากสมุนไพรพื้นบ้านให้มูลค่ามากขึ้น

ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากระยะเวลาในการศึกษามีค่อนข้างจำกัด จึงทำให้ไม่สามารถทำการศึกษาการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดทั้ง 2 ชนิดได้ จึงควรนำสารสกัดไปศึกษาการเสริมฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบเพิ่มเติม
2. ศึกษาผลความแตกต่างของฤทธิ์สารสกัดชาและสารสกัดโหระพาในระดับเซลล์ด้วยการทำการทดสอบที่มีความจำเพาะมากขึ้น

เอกสารอ้างอิง (References)

1. ธีธารัตน์ จันทร์ดอน. ชาเขียว (Green Tea)... ดื่มอย่างไรให้ได้ประโยชน์ [31 กรกฎาคม 2564]. Available from: <https://pharmacy.mahidol.ac.th/th/knowledge/article/185/>.
2. Arulselvan P, Fard MT, Tan WS, Gothai S, Fakurazi S, Norhaizan ME, et al. Role of antioxidants and natural products in inflammation. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2016;2016.
3. Takeuchi H, Takahashi-Muto C, Nagase M, Kassai M, Tanaka-Yachi R, Kiyose C. Anti-inflammatory Effects of Extracts of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.) on a Co-culture of 3T3-L1 Adipocytes and RAW264. 7 Macrophages. *Journal of oleo science*. 2020:ess19321.
4. ชา [31 กรกฎาคม 2564]. Available from: <https://th.wikipedia.org/wiki/>.
5. พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์. ชา (Tea) [2 สิงหาคม 2564]. Available from: <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1811/tea>.
6. TYPES OF TEA [13 November 2021]. Available from: <https://teapeople.co.uk/types-of-tea>.
7. Zhao C-N, Tang G-Y, Cao S-Y, Xu X-Y, Gan R-Y, Liu Q, et al. Phenolic profiles and antioxidant activities of 30 tea infusions from green, black, oolong, white, yellow and dark teas. *Antioxidants*. 2019;8(7):215.
8. Hajiaghaalipour F, Sanusi J, Kanthimathi M. Temperature and time of steeping affect the antioxidant properties of white, green, and black tea infusions. *Journal of food science*. 2016;81(1):H246-H54.
9. อ.นพ. พีรยุทธ สิริธิไชยากุล. ACUTE AND CHRONIC INFLAMMATION.1-19.
10. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*. 2018;9(6):7204.
11. Shaw CA, Taylor EL, Megson IL, Rossi AG. Nitric oxide and the resolution of inflammation: implications for atherosclerosis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2005;100:67-71.
12. Zhang L, Virgous C, Si H. Synergistic anti-inflammatory effects and mechanisms of combined phytochemicals. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2019;69:19-30.
13. Thanee M, Yongvanit P, Loilome W. Tumor microenvironment and its functions. *Srinagarind Medical Journal*. 2012;27(4):424-32.

14. Suganuma M, Okabe S, Kai Y, Sueoka N, Sueoka E, Fujiki H. Synergistic effects of (–)-epigallocatechin gallate with (–)-epicatechin, sulindac, or tamoxifen on cancer-preventive activity in the human lung cancer cell line PC-9. *Cancer Research*. 1999;59(1):44-7.
15. Setiawan PYB, Kertia N, Nurrochmad A, Wahyuono S. Curcumin in combination: Review of synergistic effects and mechanisms in the treatment of inflammation. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2021;11(02):001-11.
16. Cepas V, Collino M, Mayo JC, Sainz RM. Redox Signaling and Advanced Glycation Endproducts (AGEs) in Diet-Related Diseases. *Antioxidants*. 2020;9(2).
17. มานิสสา จักร์มา, สันติ โพธิ์ศรี, ขวัญชนาวีศ มาชะนา, ชฎาพร พรหมปัญญา, ศรัศุณ ฆ. In vitro Anti-Advanced Glycation End Products (AGEs) Formation, Anti-oxidant and Anti-inflammatory Activity in Macrophage Cells of *Gendarussa vulgaris* Nees Crude Extracts. 2020.
18. Jing L, Ma H, Fan P, Gao R, Jia Z. Antioxidant potential, total phenolic and total flavonoid contents of *Rhododendron anthopogonoides* and its protective effect on hypoxia-induced injury in PC12 cells. *BMC complementary and alternative medicine*. 2015;15(1):1-12.
19. Srikoon P, Kariya R, Kudo E, Goto H, Vaeteewoottacharn K, Taura M, et al. Diethyldithiocarbamate Suppresses an NF- κ B dependent metastatic pathway in cholangiocarcinoma cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2013;14(7):4441-6.
20. Nguyen V, Nguyen N, Thi N, Thi C, Truc T, Nghi P, editors. Studies on chemical, polyphenol content, flavonoid content, and antioxidant activity of sweet basil leaves (*Ocimum basilicum* L.). IOP Conference Series: Materials Science and Engineering; 2021: IOP Publishing.
21. Fernandes RdP, Trindade M, Tonin F, Lima C, Pugine S, Munekata P, et al. Evaluation of antioxidant capacity of 13 plant extracts by three different methods: cluster analyses applied for selection of the natural extracts with higher antioxidant capacity to replace synthetic antioxidant in lamb burgers. *Journal of food science and technology*. 2016;53(1):451-60.
22. Sirichaiwetchakoon K, Lowe GM, Eumkeb G. The free radical scavenging and anti-isolated human LDL oxidation activities of *Pluchea indica* (L.) Less. Tea compared to green tea (*Camellia sinensis*). *BioMed Research International*. 2020;2020.
23. Kaurinovic B, Popovic M, Vlaisavljevic S, Trivic S. Antioxidant capacity of *Ocimum basilicum* L. and *Origanum vulgare* L. extracts. *Molecules*. 2011;16(9):7401-14.

24. Tsai P-J, Tsai T-H, Yu C-H, Ho S-C. Comparison of NO-scavenging and NO-suppressing activities of different herbal teas with those of green tea. Food chemistry. 2007;103(1):181-7.
25. Abas F, Lajis NH, Israf D, Khozirah S, Kalsom YU. Antioxidant and nitric oxide inhibition activities of selected Malay traditional vegetables. Food Chemistry. 2006;95(4):566-73.