

อภิธานนาการ



สำนักหอสมุด

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันทางชีวภาพของสารสกัดจากผักข่าเลือด
เพื่อ ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารด้านอนุมูลอิสระ

Biological antioxidative activity of *Caesalpinia mimosoides* Lamk.
for antioxidant dietary supplement

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วันลงทะเบียน..... 5 JUL 2011.....
เลขทะเบียน.....
เลขเรียกหนังสือ.....

โดย รองศาสตราจารย์ ดร.สุพัชตรี พ่วงบางโพ
และคณะ

30 มีนาคม 2553

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันทางชีวภาพของสารสกัดจากฝักชำเลือด
เพื่อผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต้านอนุมูลอิสระ
Biological antioxidative activity of *Caesalpinia mimosoides*
Lamk. for antioxidant dietary supplement

คณะผู้วิจัย

1. รองศาสตราจารย์ ดร.สุพักตร์ พ่วงบางโพ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์
มหาวิทยาลัยนเรศวร
2. ดร.อภิวัฒน์ ลิ้มมงคล คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์
มหาวิทยาลัยนเรศวร
3. ศาสตราจารย์ ดร.ไมตรี สุทธิจิตต์ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพ
มหาวิทยาลัยนเรศวร พะเยา

สนับสนุนโดยกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร

บทคัดย่อ

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากชำเลือด (*Caesalpinia mimosoides* Lamk.) ในส่วนสกัดของใบ ยอดอ่อน ดอก และลำต้น พบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในทุก ส่วนสกัดของชำเลือด การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค ABTS (2,2'-azinobis-3-ethylbenzotiazoline-6-sulfonic acid) พบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) 1.128, 1.096, 0.786 และ 0.156 $\mu\text{mole Trolox/mg}$ สารสกัด ในส่วนของ ใบ ยอดอ่อน ดอก และลำต้น ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันและมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ ($R^2 = 0.96$) กับเทคนิค FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) ที่พบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 4.88, 4.53, 3.74 และ 1.92 $\mu\text{mole Ascorbic acid/mg}$ สารสกัด ตามลำดับ การหาปริมาณสารฟีนอลิกรวม (Total phenolic compound) โดยวิธี Folin-Ciocalteu พบว่าส่วนสกัดของใบ มีปริมาณสารฟีนอลิกรวมสูงที่สุด (1.307 mg/mg สารสกัด) รองลงมาคือ ดอก ยอดอ่อน และลำต้น ในปริมาณ 0.900, 0.773 และ 0.407 mg/mg สารสกัด ตามลำดับ และเมื่อตรวจสอบองค์ประกอบสารต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography พบองค์ประกอบหลักของ Tannic acid, Gallic acid, Myricetin และ Quercetin พบ Catechin ได้เล็กน้อยเฉพาะในส่วนลำต้นและยอดอ่อน จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียพบว่าสารสกัดจากชำเลือดใน ส่วนของใบ ยอดอ่อน ดอก และลำต้น มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli*, *P. vulgaris*, *E. faecalis* และ *B. subtilis* แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. typhi* และ *B. cereus* เมื่อเปรียบเทียบกับ Chloramphenicol และมีค่า MIC อยู่ในช่วงระหว่าง 64-256 mg/ml การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เกิดจากสารประกอบ 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) พบว่าสารสกัดจากชำเลือดสามารถยับยั้งการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงได้โดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัด ทั้งนี้สารสกัดจากส่วนของใบที่ ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้งการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ดีที่สุดถึง 6 ชั่วโมง และพบว่าสารสกัดจากชำเลือดแต่ละส่วนสามารถป้องกันการเกิดกระบวนการ lipid peroxidation ได้ถึง 6 ชั่วโมง ที่ศึกษา และเมื่อศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบโดยศึกษาจากการยับยั้งเซลล์นิวโทรฟิลส์ที่ถูกกระตุ้น พบว่าสารสกัดจากชำเลือดในส่วนของยอดอ่อน ใบ และดอก สามารถยับยั้งการเกิดอนุมูล superoxide anion ได้ ยกเว้นส่วนของลำต้น เมื่อเปรียบเทียบกับ Indomethacine

สารบัญเรื่อง

เรื่อง	หน้า
ประกาศคุณูปการ.....	I
บทคัดย่อ.....	II
สารบัญเรื่อง.....	IV
สารบัญตาราง.....	VI
สารบัญภาพ.....	VII
คำอธิบายคำย่อ.....	IX
บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการทำวิจัย.....	3
วิธีดำเนินการวิจัย	
เครื่องมือและสารเคมี.....	5
การดำเนินการวิจัย.....	7
ผลการทดลอง	
สีและน้ำหนักแห้งของสารสกัดจากข้าเลียด.....	12
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดข้าเลียดด้วยเทคนิค ABTS.....	12
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดข้าเลียดด้วยเทคนิค FRAP.....	14
ปริมาณสารฟีนอลิกรวม (total phenolic compound) ในสารสกัด.....	16
ความสัมพันธ์ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการศึกษาด้วยเทคนิค ABTS และ FRAP.....	18
ความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณสารฟีนอลิกรวม.....	18
องค์ประกอบของสารสกัดจากเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC).....	20
ฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรีย.....	22

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
ผลการทดลอง (ต่อ)	
การยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในเซลล์เม็ดเลือดแดง.....	24
ฤทธิ์ต้านการอักเสบ.....	32
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....	34
บรรณานุกรม.....	38
ภาคผนวก.....	42



สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
1 แสดงการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS (% inhibition) ของสารมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 mM	13
2 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (TEAC) ของสารสกัดจากข้าเลือดในส่วนของ ยอดอ่อน ใบ ลำต้น และดอก โดยเทคนิค ABTS	14
3 แสดงการต้านอนุมูลอิสระของสารละลาย ascorbic acid ในการรีดิวซ์ Fe^{3+} -TPTZ ได้เป็น Fe^{2+} -TPTZ ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 mM	15
4 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในส่วนยอดอ่อน ใบ ลำต้น และดอกของสารสกัด จากข้าเลือดโดยเทคนิค FRAP	15
5 แสดงกราฟมาตรฐานของ gallic acid ในปฏิกิริยาการหาสารฟีนอลิกรวม ที่ความยาวคลื่น 765 nm ความเข้มข้นระหว่าง 0.4 – 2.0 mg/ml.....	17
6 แสดงปริมาณสารฟีนอลิกรวม (Total phenolic compound) ของสารสกัดจาก ข้าเลือดในส่วนของยอดอ่อน ใบ ลำต้น และดอก	17
7 แสดงค่าความสัมพันธ์ของการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจาก ข้าเลือดด้วยเทคนิค ABTS และ FRAP	18
8 แสดงความสัมพันธ์ของฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ศึกษาโดยเทคนิค ABTS กับปริมาณสารฟีนอลิกรวมที่ได้จากสารสกัดข้าเลือด.....	19
9 แสดงความสัมพันธ์ของฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ศึกษาโดยเทคนิค FRAP กับปริมาณสารฟีนอลิกรวมที่ได้จากสารสกัดข้าเลือด.....	19
10 แสดงการตรวจสอบองค์ประกอบที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจาก ข้าเลือดในส่วนของยอดอ่อน (ย) ใบ (บ) ลำต้น (ล) และดอก (ด) โดยเทคนิค Thin Layer Chromatography ด้วยสารละลายตัวพา benzene : ethyl acetate : formic acid 40 : 10 : 5 (v/v) ; K-kaempferol, M-myricetin, Q-quercetin, C—catechin, G-gallic acid และ T-tannic acid.....	21

บัญชีภาพ (ต่อ)

ภาพ	หน้า
11 แสดงการตรวจสอบฟลาโวนอยด์ของสารสกัดจากชำเลือดในส่วนของ ยอดอ่อน (ย) ใบ (บ) ลำต้น (ล) และดอก (ด) โดยเทคนิค Thin Layer Chromatography ด้วยสารละลายตัวพา n-hexane : ethyl acetate : formic acid อัตราส่วน 31 : 14 : 5 (v/v) ; K-kaempferol, Q-quercetin, C-catechin และ M-myricetin.....	22
12 แสดงผลของสารละลาย 25 mM AAPH ต่อการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง.....	25
13 แสดงผลของสารสกัดจากส่วนของใบต่อการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง ที่มี 25 mM AAPH เป็นตัวกระตุ้น.....	26
14 ไซของสารสกัดจากส่วนของยอดอ่อนชำเลือดต่อการแตกของเซลล์ เม็ดเลือดแดงที่มี 25 mM AAPH เป็นตัวกระตุ้น.....	26
15 แสดงผลของสารสกัดจากส่วนดอกของชำเลือดต่อการแตกของเซลล์ เม็ดเลือดแดงที่มี 25 mM AAPH เป็นตัวกระตุ้น.....	27
16 แสดงผลของสารสกัดจากส่วนลำต้นของชำเลือดต่อการแตกของเซลล์ เม็ดเลือดแดงที่มี 25 mM AAPH เป็นตัวกระตุ้น.....	28
17 แสดงกราฟมาตรฐานของ 1,1,3,3-Tetraethoxypropane ในการตรวจวัด ปริมาณ MDA.....	29
18 แสดงผลของสารละลาย 25 mM AAPH ต่อการเกิดกระบวนการ lipid peroxidation ของเซลล์เม็ดเลือดแดง	29
19 แสดงผลของสารสกัดจากส่วนใบของชำเลือดต่อการป้องกันการเกิดกระบวนการ lipid peroxidation ของเซลล์เม็ดเลือดแดง.....	30
20 แสดงผลของสารสกัดจากส่วนยอดอ่อนของชำเลือดต่อการป้องกันการเกิด กระบวนการ lipid peroxidation ของเซลล์เม็ดเลือดแดง	31
21 แสดงผลของสารสกัดจากส่วนลำต้นของชำเลือดต่อการป้องกันการเกิด กระบวนการ lipid peroxidation ของเซลล์เม็ดเลือดแดง.....	31
22 แสดงผลของสารสกัดจากส่วนดอกของชำเลือดต่อการป้องกันการเกิด กระบวนการ lipid peroxidation ของเซลล์เม็ดเลือดแดง.....	32

คำอธิบายคำย่อ

%	เปอร์เซ็นต์
70% EtOH	เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์
°C	องศาเซลเซียส
g	กรัม
mg	มิลลิกรัม
µg	ไมโครกรัม
l	ลิตร
ml	มิลลิลิตร
µl	ไมโครลิตร
mm	มิลลิเมตร
nm	นาโนเมตร
M	โมลาร์
mM	มิลลิโมลาร์
µM	ไมโครโมลาร์
mmole	มิลลิโมล
µmole	ไมโครโมล
SD	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation)
v/v	ปริมาตรต่อปริมาตร (volume by volume)

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) เป็นสารประกอบที่ช่วยชะลอหรือป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันของลิพิดหรือโมเลกุลชนิดอื่นๆ ในร่างกาย มีการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับสารต้านอนุมูลอิสระกันอย่างกว้างขวาง ทั้งในด้านความสำคัญต่อสุขภาพและชีวิตของมนุษย์ ด้านสิ่งแวดล้อม ด้านอุตสาหกรรมผลิตอาหาร ตลอดจนการนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เนื่องจากคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระที่จะสามารถเสริมสร้างภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย โดยทำหน้าที่ในการกำจัดอนุมูลอิสระ (Free radical) ซึ่งมีฤทธิ์ทำลายสารชีวโมเลกุลได้ทุกประเภททั้งในเซลล์ และส่วนประกอบของเซลล์สิ่งมีชีวิต อีกทั้งเป็นตัวการสำคัญในการก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ มากมาย เช่น โรคมะเร็ง (Cancer) โรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด (Musculosclerosis) โรคผนังหลอดเลือดแดงแข็งตัว (Atherosclerosis) โรคหัวใจที่เกิดจาก LDL (Low Density Lipoprotein) โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) และจิตเภท (Schizophrenia) ซึ่งมีสาเหตุมาจากเซลล์สมองถูกทำลายโดยอนุมูลอิสระจำพวก hydroxyl และ hydrogen peroxide รวมถึงโรคข้ออักเสบ โรคต่อกระดูก โรคเบาหวาน โรคการเสื่อมสลายของกล้ามเนื้อ โรคความเสื่อมของประสาทควบคุมการเคลื่อนไหว (Gehrig's disease) และโรคชรา อนุมูลอิสระเหล่านี้อาจเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ในร่างกายซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในกระบวนการเมตาบอลิซึมของสิ่งมีชีวิต โดยมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในระบบการขนส่งอิเล็กตรอนเพื่อสร้างสารพลังงานสูง (ATP) กระบวนการดังกล่าวมักพบว่า มีการปลดปล่อยอนุมูลอิสระของออกซิเจนที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาที่เรียก Reactive Oxygen Species (ROS) ออกมา โดยเฉพาะในกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนภายในไมโทคอนเดรียของเซลล์สิ่งมีชีวิต หรือในกระบวนการทางชีวภาพของเอนไซม์ เช่น ในปฏิกิริยาของ Xantine oxidase ปฏิกิริยาของ lipoygenases และ cyclooxygenases (1-3) นอกจากนี้ ROS ยังเกิดขึ้นจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของสารแปลกปลอมภายในเซลล์เช่น สารพิษหรือยา จากการทำงานของ Cytochrome P450 และ Monooxygenases นอกจากนี้ยังอาจเกิดจากปัญหาที่มีผลมาจากความเสื่อมถอยของสภาวะแวดล้อม เช่น มลพิษจากท่อไอเสียรถยนต์ โรงงานอุตสาหกรรม หรือจากกิจกรรมต่าง ๆ ของมนุษย์ ในอาหารที่รับประทาน จากการปนเปื้อนของวัตถุพิษ จากกระบวนการประกอบอาหารหรือสารเคมีและยาบางชนิดที่ถูกเปลี่ยนแปลงให้เป็นอนุพันธ์ที่มีฤทธิ์เป็นสารตัวกลางอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ซึ่งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในกระบวนการเหล่านี้ ไม่ว่าจะเป็นกระบวนการสร้างพลังงาน

การเกิดฟาโกไซโตซิส การเจริญเติบโตของเซลล์หรือการควบคุมการส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ มักจะมีบทบาทต่อสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกันไป โดยอนุมูลอิสระเหล่านี้สามารถเข้าไปทำลายสารมหโมเลกุลชีวภาพได้แก่ ลิพิด โปรตีนและดีเอ็นเอ ส่งผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียหายและการทำงานของเอนไซม์ถูกยับยั้ง ตลอดจนการทำลายดีเอ็นเอ (4-6) อย่างไรก็ตามโดยปกติแล้วร่างกายสามารถสร้างระบบป้องกันการเกิดโรคต่าง ๆ ได้ โดยอาศัยการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งร่างกายได้รับจาก 2 ทาง ทางหนึ่งพบได้เองในร่างกาย ได้แก่ เอนไซม์ชนิดต่างๆ เช่น Superoxide dismutase (SOD) Catalase (CAT) Glutathione peroxidase (GPX) และสารประกอบโปรตีนที่ไม่จัดเป็นเอนไซม์ เช่น Glutathione Ceruloplasmin Bilirubin และ Albumin และทางที่ 2 ร่างกายได้รับจากภายนอกโดยการบริโภค การทำลายฤทธิ์อนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระจะเป็นการกำจัดอนุมูลอิสระ การยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระหรือการซ่อมแซมส่วนที่ถูกอนุมูลอิสระทำลาย ซึ่งช่วยให้เกิดการสมดุลของการทำงานของร่างกาย แต่ในบางสภาวะที่ระบบป้องกันภายในเซลล์มีประสิทธิภาพไม่เพียงพอ เช่น การได้รับภาวะทางกายภาพต่างๆ ได้แก่ การสูบบุหรี่ มลภาวะเป็นพิษ ภาวะอักเสบหรือภาวะขาดเลือด (Ischaemia/repulsion) จะทำให้มีอนุมูลอิสระมากเกินไปความสามารถในการต้านออกซิเดชันของเซลล์ ทำให้สมดุลของปฏิกิริยารีดอกซ์ภายในเซลล์เปลี่ยนแปลงเกิดภาวะเครียดที่เรียก Oxidative stress ส่งผลต่อการเสื่อมสภาพและการทำลายเซลล์หรืออวัยวะนั้น ๆ ตามที่กล่าวมาข้างต้น ดังนั้นเพื่อเป็นการป้องกันความเสียหายที่จะเกิดขึ้นแก่ร่างกาย จึงจำเป็นที่จะต้องรักษากลไกของระบบต้านอนุมูลอิสระให้สมดุล และการเพิ่มสารต้านอนุมูลอิสระให้แก่ร่างกายอยู่ตลอดเวลา เช่น การรับประทานอาหารที่ให้สารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ ผักและผลไม้ต่างๆ ซึ่งมีองค์ประกอบของสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติได้แก่ วิตามินอี วิตามินซี เบต้าแคโรทีน และสารประกอบฟลาโวนอยด์ ซึ่งน่าจะเป็นแนวทางในการป้องกันและรักษาที่ดีที่สุด การตื่นตัวและการเล็งเห็นถึงความสำคัญของการรับประทานพืชผักสมุนไพรเริ่มมีมากขึ้นในปัจจุบัน เนื่องจากการได้รับความรู้ข้อมูลข่าวสารและการตระหนักถึงการป้องกันและรักษาสุขภาพ และเห็นประโยชน์จากพืชผักสมุนไพรซึ่งเป็นแหล่งธรรมชาติที่สำคัญของวิตามินและแร่ธาตุต่างๆ รวมทั้งสารต้านอนุมูลอิสระหลากหลายชนิด ที่ช่วยป้องกันและยับยั้งการเกิดโรคได้โดยเฉพาะโรคมะเร็ง ซึ่งมีงานวิจัยมากมายที่สนับสนุนให้เห็นถึงประโยชน์ของพืชผักสมุนไพรในการป้องกันและยับยั้งการเกิดโรคต่าง ๆ ได้เป็นอย่างดี (7-9) และจากการศึกษาทางระบาดวิทยาพบว่า การบริโภคผักและผลไม้ สามารถลดอัตราเสี่ยงของการเกิดโรกระบบหลอดเลือดและหัวใจและโรคมะเร็งได้ (10-11) ซึ่งผลดังกล่าวมาจากการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ เช่น วิตามินซี วิตามินอี และเบต้า-แคโรทีน รวมถึงสารประกอบฟีนอลิกซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากธรรมชาติ สารประกอบฟีนอลิกหรือโพลีฟีนอลพบได้มากในธรรมชาติ โดยเฉพาะในพืชผักซึ่งจัดเป็น Secondary metabolites

ปัจจุบันพบสารประกอบฟีนอลิกมากกว่า 8,000 ชนิด ที่มีโครงสร้างโมเลกุลอย่างง่าย เช่น กรดฟีนอลิก ฟีนอลโพรพานอยด์และฟลาโวนอยด์ ไปจนถึงโครงสร้างโพลีเมอร์ที่ซับซ้อน เช่น ลิกนิน เมลานิน และแทนนิน เป็นต้น สารฟีนอลิกเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญเนื่องจากมีฤทธิ์ด้านแบคทีเรีย ด้านการอักเสบ ด้านการแพ้ ด้านไวรัสและมีคุณสมบัติในการสลายลิ่มเลือด รวมไปถึงเป็นสารด้านการก่อกัมเริงและสามารถลดความดันโลหิตได้ จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่า การศึกษาฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระในส่วนสกัดต่างๆ ของพืชที่มีความสำคัญในการบ่งชี้ถึงประสิทธิภาพของสารสกัดในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระรวมถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาทั่วไป เช่น ฤทธิ์ต้านจุลชีพและฤทธิ์ด้านการอักเสบ จากการศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดจากส่วน Rhizome ของ *Iris germanica* พบว่าสาร Isoflavonoid ที่แยกได้นี้สามารถยับยั้งการสร้าง Superoxide anion ของเซลล์นิวโทรฟิลล์ที่ถูกกระตุ้นได้ นอกจากนี้ยังพบว่า สารฟลาโวนอยด์หลายชนิดสามารถยับยั้งการเกิด hemolysis และกระบวนการ lipid peroxidation บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดงได้ด้วย (12-15)

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม และเป็นประเทศในเขตรอบร้อน ที่มีผลผลิตทางการเกษตรตลอดปีที่หลากหลายและจำนวนมาก โดยเฉพาะพืชผักพื้นบ้านที่ขึ้นได้เองตามธรรมชาติ ที่ถูกนำมาบริโภคเป็นอาหาร มากกว่า 100 ชนิด ซึ่งนอกจากจะรู้จักในส่วนของ การนำมาประกอบอาหารแล้ว น่าจะได้ทำการศึกษาถึงคุณสมบัติและประโยชน์อื่นๆ เช่น การเสริมสร้าง ป้องกันหรือคุณสมบัติของการเป็นยารักษาโรคได้ จากการศึกษาฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระจากพืชผักพื้นบ้านกว่า 50 ชนิด ที่ผ่านมา (7-9) เช่น ข้าเลือด มะม่วงพันธุ์เขียวเสวย กระโดนน้ำ ผักบุ้งนา ขี้เหล็ก ผักแว่น สะเดา กะเพรา ผักแพงพวย มะขาม ผักชีล้อม และขุน พบว่าผักพื้นบ้านเหล่านี้มีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระมากน้อยแตกต่างกันไป พืชผักพื้นบ้านที่พบว่า มีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระในปริมาณที่สูง ได้แก่ ข้าเลือด (*Caesalpinia mimosoides* Lamk.) มะม่วงพันธุ์เขียวเสวย (*Mangifera indica* Linn.) และ กระโดนน้ำ (*Barringtonia acutangula* (L.) Gaertn.) ในการศึกษาครั้งนี้จึงให้ความสำคัญกับการศึกษาฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระของพืชผักพื้นบ้านดังกล่าว โดยเฉพาะข้าเลือด ที่พบว่า มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด และยังพบคุณสมบัติทางเคมีเบื้องต้นในการกำจัดอนุมูลอิสระ ตลอดจนความคงตัวต่ออนุมูลอิสระและค่าความเป็นกรดต่าง ทำให้คณะผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาต่อเนื่องโดยทำการศึกษาระียบเทียบวิธีการตรวจวัดฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระในข้าเลือด 2 วิธี คือ วิธี ABTS ซึ่งอาศัยหลักการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ ABTS (ABTS^{•+}) และวิธี Ferric-reducing antioxidant power (FRAP) ที่แสดงความสามารถในการรีดิวซ์ของสารสกัด ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารที่มีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระต่างๆ เพื่อให้ทราบถึงองค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระดังกล่าว และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านแบคทีเรีย, ด้านการอักเสบรวมทั้งผลต่อการป้องกันการเกิด lipid peroxidation ของสารสกัดจากข้าเลือดเพื่อได้ข้อมูลที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ทางด้านชีวเคมี

ด้านการแพทย์และเภสัชกรรม ตลอดจนแนวทางการให้ความรู้และคุณค่าทางโภชนาการ การส่งเสริมและสนับสนุนการปลูก ให้ความสำคัญวิถีแนวภูมิปัญญาไทยและให้เป็นที่รู้จัก และการเพิ่มมูลค่าให้กับผลผลิตทางการเกษตร เพื่อเป็นพืชผักเชิงพาณิชย์ของประเทศไทยต่อไป

วัตถุประสงค์ของการทำวิจัย

1. ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดชำเลือด ในส่วนของใบ ยอดอ่อน ดอก และลำต้น โดยเทคนิค ABTS และ FRAP
2. ศึกษาองค์ประกอบของสารสกัดชำเลือดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม
3. ศึกษาฤทธิ์ในการต้านการเจริญของแบคทีเรียของสารสกัดจากชำเลือด
4. ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากชำเลือด
5. ศึกษาการป้องกันการเกิดกระบวนการ lipid peroxidation ของสารสกัดที่ได้จากชำเลือด

วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือและสารเคมี

1. เครื่องมือ

1. Warling blender
2. pH meter (Metter Toledo 320)
3. Vacuum rotating evaporator (Buchi B-480)
4. Freeze-dryer (FTS Systems, Flexi-Dry™)
5. UV/VIS Scanning spectrophotometer (Milton Roy, Spectronic Genesis 5)
6. Incubator shaker (Innova 4080)
7. Oven (Contherm)
8. Centrifuge (Heraeus, Labofuge 400)
9. Water bath (Julabo, SW 20)
10. Microplate reader (Perkin elmer, Spectracount)
11. Inverted Microscope (Nikon, TS100)
12. Centrifuge (MPW, 6W15)

2. สารเคมี

1. AAPH (2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride)) (Aldrich)
2. ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) (Fluka)
3. Acetic acid (Lac-Scan)
4. L(±)-ascorbic acid (Riedel-de Haën)
5. Apigenin (Sigma)
6. Benzene (C₆H₆) (Merck)
7. (±)-Catechin (Sigma)
8. Cell proliferation reagent WST-1 (Roche)
9. Cyanmethemoglobin standard solution (Biotech)
10. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Riedel-de Haën)
11. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma)
12. Drabkin's reagent (Sigma)

13. Ethanol absolute (Merck)
14. Ethyl acetate ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$) (Lab-Scan)
15. Ferric chloride (FeCl_3) (Fluka)
16. Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Fluka)
17. Formic acid (HCOOH) (Merck)
18. Gallic acid (Sigma)
19. Histopaque-1077 (Sigma)
20. Histopaque-1119 (Sigma)
21. Hydrochloric acid (conc. HCl) (Merck)
22. 30% Hydrogen peroxide (H_2O_2) (Merck)
23. Indomethacine (Sigma)
24. Kaempferol (Sigma)
25. Myricetin (Sigma)
26. Potassium chloride (KCl) (Merck)
27. Potassium dihydrogenphosphate (KH_2PO_4) (Merck)
28. Potassium persulfate ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) (Merck)
29. Quercetin (Sigma)
30. Silica gel plate (Silica gel 60 F254) (Merck)
31. Sodium carbonate (Na_2CO_3) (Riedel-de Haën)
32. Sodium chloride (NaCl) (Merck)
33. di-Sodium hydrogenphosphate (Na_2HPO_4) (Merck)
34. Tannic acid (Sigma)
35. 1,1,3,3-Tetraethoxypropane (Sigma)
36. 2-Thiobarbituric acid (TBA) (Sigma)
37. TPTZ (2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine) (Fluka)
38. Trichloroacetic acid (TCA) (Merck)
39. Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchlorman-2-carboxylic acid) (Fluka)
40. Vanillin (Sigma)
41. Zymosan A (Sigma)

การดำเนินการวิจัย

1. การเก็บและการสกัดสารสกัดจากชำเลียด

เก็บตัวอย่างชำเลียด (*Caesalpinia mimosoides* Lamk.) จากอำเภอพรหมพิราม จังหวัดพิษณุโลก (ระหว่างเดือนมิถุนายน 2551 ถึง เดือนพฤศจิกายน 2552) ซึ่งสุ่มเก็บจากหลายต้นรวมกันโดยเลือกเก็บตัวอย่างจากส่วนต่าง ๆ ได้แก่ ยอดอ่อน (ส่วนของใบอ่อนที่แตกออกมาใหม่และสามารถนำมารับประทานได้) ใบ (ส่วนใบที่โตเต็มที่) ลำต้น (นำยอดอ่อนและใบออก) และ ดอก (ช่อดอกส่วนยอดของลำต้น) โดยเลือกเก็บตัวอย่างตามฤดูกาล ที่ส่วนนั้น ๆ ออกผลผลิต เช่น ยอดอ่อน เก็บฤดูฝน (เดือนมิถุนายน-กรกฎาคม) ดอกเก็บช่วงฤดูหนาว (เดือนพฤศจิกายน) ส่วนใบและลำต้น เก็บช่วงเดือนมิถุนายนถึงสิงหาคม

ล้างตัวอย่างพืชแต่ละส่วนของชำเลียดให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น 3-4 ครั้งและผึ่งให้แห้ง สุ่มเลือกแต่ละส่วนแล้วนำมาซังให้ได้น้ำหนักส่วนละ 30 g แล้วบดด้วยเครื่องบดด้วยตัวทำละลาย 70% ethanol ปริมาตร 300 ml จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 สองครั้ง และแยกส่วนสกัดออกจากตัวทำละลาย ด้วยเครื่อง vacuum evaporator (Buchi B-480) ที่อุณหภูมิ 40 °C นำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง freeze dryer (FTS system, Flexi-Dry) บันทึกสีและน้ำหนักของสารสกัดที่ได้ และเก็บส่วนสกัดที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -50 °C เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

2. การตรวจหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัด

2.1 การตรวจฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดด้วยเทคนิค ABTS

เตรียมสารละลาย 2.45 mM Potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) ใน 7 mM ABTS ตั้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 12-16 ชั่วโมง จะได้สารละลาย ABTS radical แล้วนำมาทำให้เจือจางด้วย 5 mM Phosphate buffer (PBS) pH 7.4 ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm เป็น 0.70 ± 0.02 จากนั้นละลายส่วนสกัดชำเลียดแต่ละส่วนใน 70% ethanol ให้ได้ความเข้มข้น 1 mg/ml เติม 1 ml ของสารละลาย ABTS radical ลงไปในสารละลายของชำเลียด 10 μ l แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ที่เวลา 6 นาที โดยคำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ซึ่งแสดงค่าเป็น TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) มีหน่วยเป็น μ M Trolox ต่อ 1 mg สารสกัด (16)

2.2 การตรวจฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดด้วยเทคนิค FRAP

นำสารสกัดเข้าเลือดแต่ละส่วน 1 mg มาละลายใน 70% ethanol 1 ml จากนั้นเติมสารละลายของสารสกัดที่ได้ 0.1 ml ลงใน 3.0 ml FRAP reagent (25 ml ของ 300 mmol/l acetate buffer pH 3.6, 2.5 ml ของ 10 mmol/l TPTZ 40 mmol/l HCl และ 2.5 ml ของ 20 mmol/l $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) ตั้งทิ้งไว้ 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm โดยใช้ตัวทำละลายเป็น blank คำนวณค่า activity จากกราฟมาตรฐานของ L-ascorbic acid (0.1-1 mmol/l) ผลที่ได้แสดงค่าเป็น ascorbic acid equivalents มีหน่วยเป็น AAE/mg สารสกัด (17-18)

3. การตรวจปริมาณสารฟีนอลิกรวม (Total phenolic compound)

นำสารสกัดที่ละลายด้วยเอทานอลตามข้อ 2.2 ปริมาตร 50 μl ผสมกับ 2 N Folin reagent (FC) ปริมาตร 250 μl และสารละลาย sodium carbonate (20% w/v Na_2CO_3) ปริมาตร 250 μl แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรครบ 5 ml ผสมให้เข้ากัน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบ phenolics จากกราฟมาตรฐานของ gallic acid แสดงในหน่วย gallic acid equivalents (GAE) มีหน่วยเป็น mg/g สารสกัด (19)

4. การตรวจสอบองค์ประกอบของสารสกัดโดยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC)

นำสารสกัดเข้าเลือดแต่ละส่วนมาละลายใน 70% ethanol ปริมาตร 1.0 ml จากนั้นนำไปจุด (spot) ลงบนแผ่นซิลิกา (silica gel 60 F254 plate) และ spot สารมาตรฐานที่ใช้ในการเปรียบเทียบ คือ kaempferol, myricetin, quercetin, tannic acid, catechin และ gallic acid ลงบนแผ่นเดียวกัน ปล่อยให้แห้งให้สารละลายที่ spot ลงบนแผ่นซิลิกาแห้ง นำไปใส่ถัง TLC ที่มีสารละลายตัวพา (mobile phase) ของ benzene : ethyl acetate : formic acid อัตราส่วน 40 : 10 : 5 (v/v) (20) และ n-hexane : ethyl acetate : formic acid อัตราส่วน 31 : 14 : 5 (v/v) ตั้งทิ้งไว้จนตัวพาเคลื่อนที่ไปได้ระยะทาง 8.5-12.5 เซนติเมตร นำแผ่นซิลิกาออกจากถัง TLC ปล่อยให้แห้งและฉีดพ่น (spray) ด้วยสารละลายที่ใช้ตรวจสอบ 3 ชนิด ได้แก่ DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ใน methanol เพื่อใช้ตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (21-22) และสารละลายวานิลลิน (vanillin; 100 g/l) ในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (conc. HCl) เพื่อตรวจสอบสารฟลาโวนอยด์ (20)

5. การทดสอบฤทธิ์ด้านการเจริญแบคทีเรีย

ศึกษาฤทธิ์ด้านแบคทีเรีย 6 ชนิด ได้แก่ *Salmonella typhi* (DMST16113), *Escherichia coli* (DMST4212), *Proteus vulgaris* (DMST15685), *Bacillus cereus* (DMST5040), *Enterococcus faecalis* (DMST4736) และ *Bacillus subtilis* (DMST5871) โดยเทคนิคการศึกษา 2 วิธี

5.1 Disc-diffusion

เตรียมแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิดให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 McFarland standard และนำแบคทีเรียดังกล่าวปริมาตร 100 μ l ไป spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar จากนั้นวางแผ่น disc ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ หยดสารสกัดฆ่าเลือดจากตัวอย่างที่ความเข้มข้น 250 mg/ml ปริมาตร 20 μ l ลงไปบน disc โดยใช้ตัวทำลายคือ เอทานอล เป็น negative control และยาปฏิชีวนะ (antibiotic) มาตรฐาน ได้แก่ chloramphenicol เป็น positive control แล้วนำไปบ่มเพาะ (incubate) ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการวัดฤทธิ์ในการด้านการเจริญของแบคทีเรียของสารสกัดโดยวัด inhibition zone ที่เกิดขึ้นเป็นวงใสรอบ disc (23)

5.2 Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

การศึกษาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (minimal inhibitory concentration, MIC) โดยการเตรียมสารสกัดฆ่าเลือดใน 10% dimethylsulfoxide (DMSO) ให้ได้ความเข้มข้น 256 mg/ml แล้วจึงเจือจางสารสกัดแบบ serial two fold dilution นำ 30 μ l ของแต่ละ dilution มาเติมลงใน Mueller-Hinton broth จากนั้นนำแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ 30 μ l เติมลงใน Mueller-Hinton broth ที่เตรียมไว้ นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หาค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) โดยสังเกตจากหลอดทดลองที่ความเข้มข้นของสารสกัดต่ำสุดที่ไม่มีการเจริญของแบคทีเรีย (23)

6. การทดสอบการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในเซลล์เม็ดเลือดแดง

6.1 การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดงและการชักนำให้เกิดอนุมูลอิสระ

นำเลือด (whole blood) จากคนปกติ 10 ml ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1500 g เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเอาส่วนเม็ดเลือดแดงอัดแน่น นำเม็ดเลือดแดงที่ได้ไปล้างด้วยสารละลาย PBS pH 7.4 (154 mM NaCl และ 10 mM phosphate buffer) 4 ครั้งก่อนนำไปปรับให้ได้ปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (hematocrit) ตามที่ต้องการ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ C เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป ทั้งนี้ควรนำไปใช้ภายในเวลา 6 ชั่วโมง การชักนำให้เกิดอนุมูลอิสระ peroxy radicals ในเม็ดเลือดแดงกระทำโดยปฏิกิริยาของสารประกอบ 2,2'-azobis (2-amidinopropane)

dihydrochloride (AAPH) โดยนำเม็ดเลือดแดงไป preincubate กับสารละลาย PBS (control) หรือกับสารสกัดจากข้าวเล็ดที่ความเข้มข้น 5% ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไป incubate กับ 25 mM AAPH (azo compound) ใน PBS pH 7.4 ที่ความเข้มข้นตามกำหนดเป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยเขย่าเบาๆ ตลอดเวลา

6.2 การศึกษาผลของสารสกัดต่อการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง (hemolysis)

นำส่วนผสมของเม็ดเลือดแดงในข้อ 6.1 ปริมาตร 200 μ l ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 g เป็นเวลา 2 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงของส่วน supernatant ที่ความยาวคลื่น 540 nm เปรียบเทียบกับค่า reference ที่ 100% hemolysis (เม็ดเลือดแดงปริมาตรเท่ากันละลายใน hypotonic buffer, 5 mM phosphate buffer pH 7.4) และคำนวณหาค่าการแตกตัว (% hemolysis) ของเม็ดเลือดแดงจากสมการ

$$\% \text{ hemolysis} = \frac{\text{absorbance of sample supernatant} \times 100}{\text{absorbance ที่ 100\% hemolysis}}$$

6.3 การศึกษาผลของสารสกัดต่อการยับยั้งกระบวนการ lipid peroxidation ของเม็ดเลือดแดง

เตรียมสารละลาย Thiobarbituric acid (TBA) โดยเตรียม 0.44 M H_3PO_4 100 μ l และ 0.67% thiobarbituric acid 250 μ l แล้วนำ 1 ml TBA เติมลงในส่วนผสมเม็ดเลือดแดงในข้อ 6.1 นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยนำหลอดทดลองไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที ก่อนเติม 20% trichloroacetic acid 150 μ l แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที และวัดปริมาณของ peroxide จากค่าของ malondialdehyde (MDA) ที่เกิดขึ้นในส่วนของ supernatant ที่ความยาวคลื่น 532 nm เทียบกับสารมาตรฐาน tetraethoxypropane (24) มีหน่วยเป็น $\mu\text{mol/g Hb}$ (วัดปริมาณของ hemoglobin โดยเติมเลือด 8 μ l ลงในสารละลาย Drabkin's solution 2 ml ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm มีหน่วยเป็น g/ml)

7. การศึกษาฤทธิ์การต้านการอักเสบ

กระบวนการอักเสบ (inflammation) เป็นการตอบสนองต่อการติดเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้จำนวน neutrophils ในเลือดเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดปริมาณของ reactive oxygen species ออกมาเป็นจำนวนมาก (oxidative burst) ในการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบจึงกระทำโดยกระตุ้นเซลล์นิวโทร

ฟิลล์ด้วย Zymosan-activated serum (ZAS) แล้วให้ทำปฏิกิริยากับ WST-1 reagent ได้ผลิตภัณฑ์ formazan ที่มีสีแดง ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm แล้วคำนวณหา ค่า % inhibition เปรียบเทียบกับ positive control คือ Indomethacine และหาค่าการต้านการอักเสบซ้ำเลือดโดยการหาค่าการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงเทียบกับ Indomethacine

7.1 การแยกเซลล์ neutrophils (25)

นำสารละลาย Histopaque-1119 (ความหนาแน่น 1.119 g/ml) ปริมาตร 3 ml มาเติมลงในหลอด centrifuge ขนาด 15 ml แล้วเติมสารละลาย Histopaque-1077 (ความหนาแน่น 1.077 g/ml) ปริมาตร 3 ml ลงบนสารละลาย Histopaque-1119 จากนั้นจึงเติมเลือด 6 ml ลงไปอย่างช้าๆ ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 700 g ที่อุณหภูมิ 20 °C เป็นเวลา 30 นาที จะได้เซลล์นิวโทรฟิลล์แยกชั้นเห็นเป็นสีขาวบนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่อยู่ชั้นล่างสุดของหลอดทดลอง ใช้ปิเปตดูดแยกเซลล์สีขาวที่ได้ไปล้างด้วยสารละลาย PBS จำนวน 3 ครั้งและนำมา resuspend ในสารละลาย PBS นับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี Trypan Blue method บน Neubaur chamber (เซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่มีรูปร่างกลมใส ส่วนเซลล์ที่ตายแล้วมีสีน้ำเงิน) แล้วคำนวณหาร้อยละของเซลล์ที่อยูรอด ซึ่งควรมีค่าสูงกว่า 95%

7.2 การศึกษาฤทธิ์การต้านการอักเสบ

การศึกษา Anti-inflammation ใช้วิธีที่พัฒนามาจากวิธีของ Tan and Berridge (26) โดยเตรียมปฏิกิริยาในสารละลาย PBS pH 7.4 ปริมาตร 250 μ l ซึ่งประกอบด้วย 0.5-1.0 $\times 10^4$ neutrophils/ml, cell proliferation reagent WST-1 (1,2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium monosodium salt) และสารสกัดซ้ำเลือดที่ความเข้มข้นต่างๆ กันบน microplate และนำไปป่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 10 นาที เริ่มปฏิกิริยาด้วย Zymosan-activated serum (ZAS) 20 μ l จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm ที่เวลา 30 นาที โดยใช้ microplate reader และมี Indomethacine เป็น positive control แสดงค่าเป็น %inhibition โดยคำนวณจากสมการ

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(\text{OD}_{(\text{control})} - \text{OD}_{(\text{sample})})}{\text{OD}_{(\text{control})}} \times 100$$

ผลการทดลอง

1. สีและน้ำหนักแห้งของสารสกัดจากชำเลือด

สารสกัดชำเลือดส่วนต่างๆ ได้แก่ ยอดอ่อน ใบ ลำต้น และดอก ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 70% ethanol ให้สีของสารสกัดแตกต่างกัน โดยส่วนของยอดอ่อนมีสีเขียวอ่อน ใบมีสีเหลืองปนเขียว ลำต้นมีสีน้ำตาล และดอกมีสีส้มปนน้ำตาล ส่วนน้ำหนักแห้งของสารสกัดที่ได้จากน้ำหนักสด 30 g มีค่าตั้งแต่ 1.32 g ถึง 2.76 g โดยได้น้ำหนักจากส่วนของยอดอ่อน 1.67 g ส่วนของใบ 2.76 g ส่วนของลำต้น 1.32 g และส่วนของดอก 1.89 g (ตาราง 1)

ตาราง 1 แสดงสีและน้ำหนักของสารสกัดจากชำเลือดในส่วนของยอดอ่อน ใบ ลำต้น และดอก

ส่วนของผักชำเลือด	สีของสารสกัด	น้ำหนัก (g) / 30 g น้ำหนักสด
ยอดอ่อน	สีเขียวอ่อน	1.67
ใบ	สีเหลืองปนเขียว	2.76
ลำต้น	สีน้ำตาล	1.32
ดอก	สีส้มปนน้ำตาล	1.89

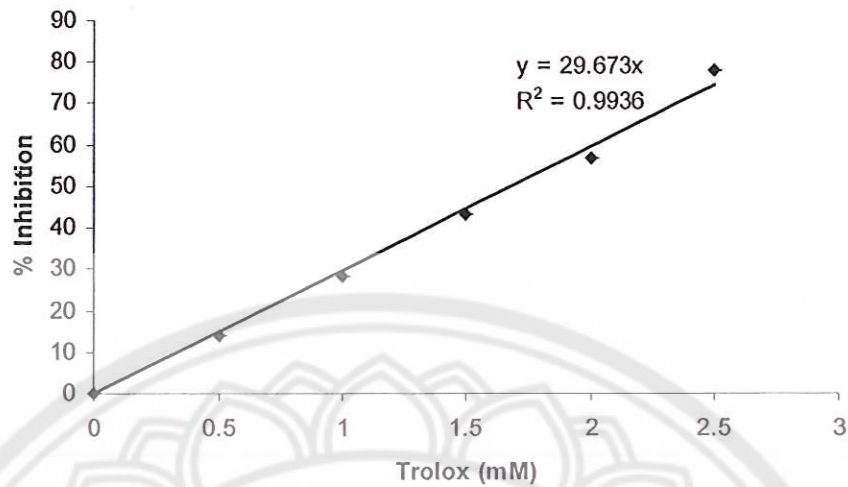
2. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดชำเลือดด้วยเทคนิค ABTS

ภาพ 1 แสดงความสัมพันธ์การยับยั้งอนุมูล ABTS (% inhibition) กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 mM จากการคำนวณตามสมการ (1)

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(\text{OD}_{\text{blank}} - \text{OD}_{\text{Trolox}})}{\text{OD}_{\text{blank}}} \times 100 \quad (1)$$

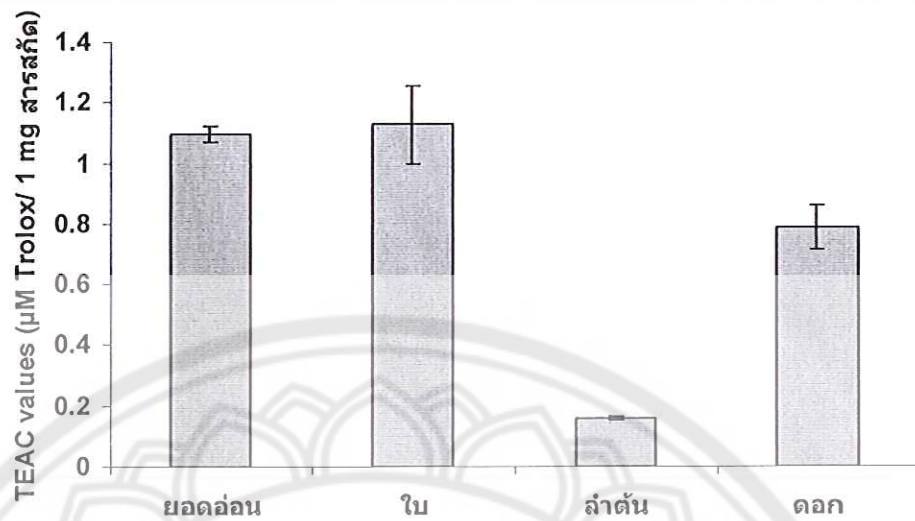
$\text{OD}_{(\text{blank})}$ = ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อไม่มี Trolox

$\text{OD}_{(\text{Trolox})}$ = ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อมี Trolox



ภาพ 1 แสดงการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS (% inhibition) ของสารมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 mM (mean \pm SD, n = 3)

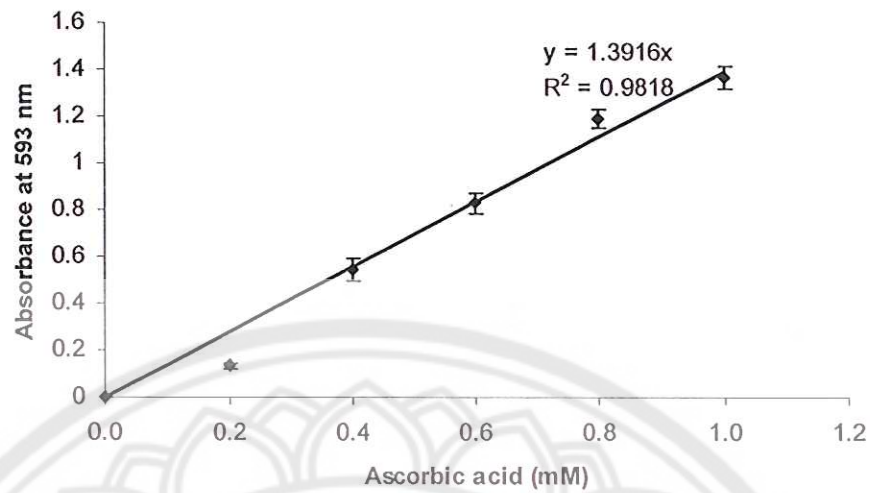
การศึกษาด้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากข้าวเลียดเป็นการหาค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ที่เกิดขึ้น โดยหาค่า % inhibition ของสารสกัดแล้วนำไปคำนวณหาฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox แสดงค่าเป็น TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) มีหน่วยเป็น $\mu\text{mole Trolox/mg}$ สารสกัด (ภาคผนวก) จากการศึกษาฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระของสารสกัดข้าวเลียด พบว่าสารสกัดจากส่วนของใบมีค่า TEAC สูงที่สุดคือ $1.128 \mu\text{mole Trolox/mg}$ สารสกัด รองลงมาคือส่วนของยอดอ่อนมีค่า TEAC เท่ากับ $1.096 \mu\text{mole Trolox/mg}$ สารสกัด ส่วนของดอกมีค่า TEAC เท่ากับ $0.786 \mu\text{mole Trolox/mg}$ สารสกัด และส่วนของลำต้นมีค่า TEAC ต่ำที่สุดคือ $0.156 \mu\text{mole Trolox/mg}$ สารสกัด (ภาพ 2) และเมื่อทดสอบความแตกต่างของค่า TEAC ของสารสกัดจากข้าวเลียดแต่ละส่วนโดยวิธีของ Duncan พบว่า สารสกัดจากส่วนของใบและยอดอ่อนมีค่า TEAC ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.01$) ส่วนสารสกัดจากดอกมีค่า TEAC แตกต่างจากส่วนของใบและยอดอ่อนอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.01$) และสารสกัดจากลำต้นมีค่า TEAC แตกต่างจากส่วนอื่นอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.01$)



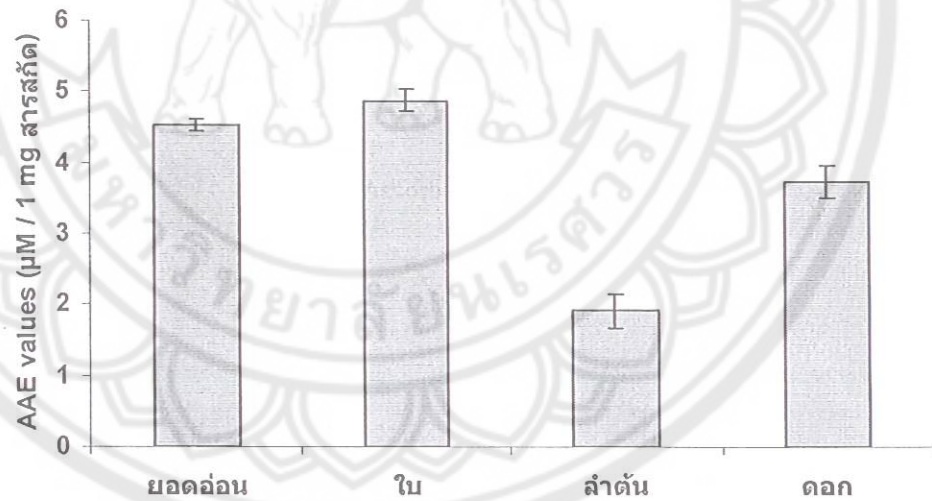
ภาพ 2 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (TEAC) ของสารสกัดจากชำเลือดในส่วนของ ยอดอ่อน ใบ ลำต้น และดอก โดยเทคนิค ABTS (mean \pm SD, n = 3)

3. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดชำเลือดด้วยเทคนิค FRAP

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยเทคนิค FRAP เป็นการวัดความสามารถในการรีดิวซ์สารประกอบเชิงซ้อน ferric tripyridyl triazine (Fe^{3+} -TPTZ); FRAP reagent (acetate buffer : TPTZ : $FeCl_3$) ให้เป็น Fe^{2+} -TPTZ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 mM (ภาพ 3) ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดดังกล่าวแสดงค่าเป็น Ascorbic Acid Equivalents (AAE)/mg สารสกัด (ภาคผนวก) จากการศึกษาพบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดส่วนของใบมีค่า AAE สูงที่สุดคือ 4.88 μ mole ascorbic acid/mg สารสกัด รองลงมาคือส่วนของยอดอ่อนมีค่า AAE เท่ากับ 4.53 μ mole ascorbic acid/mg สารสกัด ส่วนของดอกมีค่า AAE เท่ากับ 3.74 μ mole ascorbic acid/mg สารสกัด และส่วนของลำต้นมีค่า AAE ต่ำที่สุดคือ 1.92 μ mole ascorbic acid/mg สารสกัด (ภาพ 4) จากการทดสอบความแตกต่างของค่า AAE ของสารสกัดจากชำเลือดแต่ละส่วนโดยวิธีของ Duncan พบว่า สารสกัดจากส่วนของใบและยอดอ่อนมีค่า AAE ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.01$) ส่วนสารสกัดจากส่วนของดอกมีค่า TEAC แตกต่างจากส่วนของใบและยอดอ่อนอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.01$) และสารสกัดจากส่วนของลำต้นมีค่า TEAC แตกต่างจากส่วนอื่นอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.01$)



ภาพ 3 แสดงการต้านอนุมูลอิสระของสารละลาย ascorbic acid ในการวัดด้วย Fe^{3+} -TPTZ ได้เป็น Fe^{2+} -TPTZ ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 mM (mean \pm SD, n = 3)



ภาพ 4 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในส่วนยอดอ่อน ใบ ลำต้น และดอกของสารสกัดจากข้าวเลียดโดยเทคนิค FRAP (mean \pm SD, n = 3)

อย่างไรก็ตามเมื่อคำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของข้าวเลียดจากน้ำหนักสด 1 กรัม พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทำการศึกษาด้วยเทคนิค TEAC และด้วยเทคนิค FRAP จากส่วนของใบมีค่าสูงที่สุด คือ 103.78 และ 448.96 ตามลำดับ รองลงมาคือ ยอดอ่อน ซึ่งมีค่าเป็น 61.01 และ

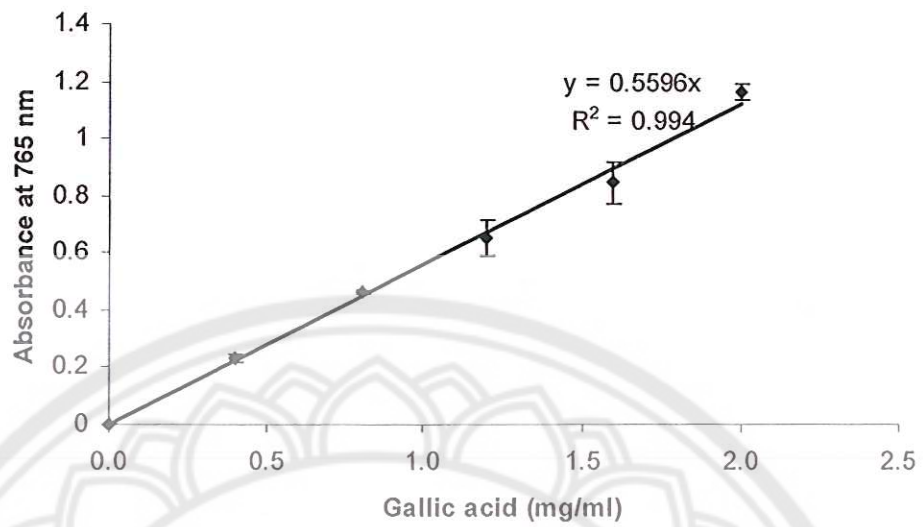
252.17 ตามลำดับ ในส่วนของดอกพบ 49.52 และ 235.62 ตามลำดับ ขณะที่ส่วนของลำต้นมีฤทธิ์ด้านออกซิเดชันต่ำที่สุดคือ 6.86 และ 84.48 ตามลำดับ (ตาราง 2)

ตาราง 2 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดชำเลือดที่ได้จากน้ำหนักสด 1 กรัม จากเทคนิค ABTS (TEAC) และ FRAP (AAE)

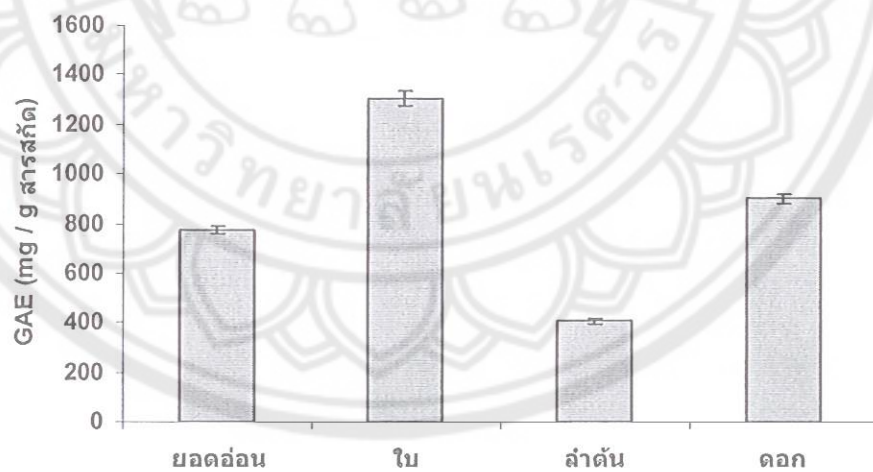
ส่วนของสารสกัด	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ TEAC ต่อน้ำหนักสด 1 กรัม	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ AAE ต่อน้ำหนักสด 1 กรัม
ยอดอ่อน	61.01	252.17
ใบ	103.78	448.96
ลำต้น	6.86	84.48
ดอก	49.52	235.62

4. ปริมาณสารฟีนอลิกรวม (Total phenolic compound)

ภาพ 5 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ของสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดจากสารมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้น ระหว่าง 0.4 – 2.0 mg/ml และเมื่อตรวจหาปริมาณสารฟีนอลิกรวมในสารสกัดจากชำเลือดส่วนต่างๆ จากการเกิดปฏิกิริยาที่ได้สารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงินแล้วนำผลที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณสารฟีนอลิก เทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid แสดงค่าเป็น gallic acid equivalents (GAE) mg/g ของสารสกัด พบว่า สารสกัดแต่ละส่วนมีปริมาณสารฟีนอลิกแตกต่างกัน โดยส่วนของยอดอ่อนมีค่า GAE เท่ากับ 773.33 mg/g ของสารสกัด ส่วนของใบมีค่า GAE เท่ากับ 1,306.67 mg/g ของสารสกัด ส่วนของลำต้นมีค่า GAE เท่ากับ 406.67 mg/g ของสารสกัด และส่วนของดอกมีค่า GAE เท่ากับ 900.00 mg/g ของสารสกัด (ภาพ 6) จากการทดสอบความแตกต่างของค่า GAE ของสารสกัดจากชำเลือดแต่ละส่วนโดยวิธี Duncan พบว่า สารสกัดจากส่วนสกัดที่แตกต่างกันมีค่า GAE แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.01$) โดยค่า GAE ของสารสกัดจากใบมีค่าสูงที่สุด รองลงมาคือ ดอก ยอดอ่อน และลำต้นมีค่า GAE ต่ำที่สุด



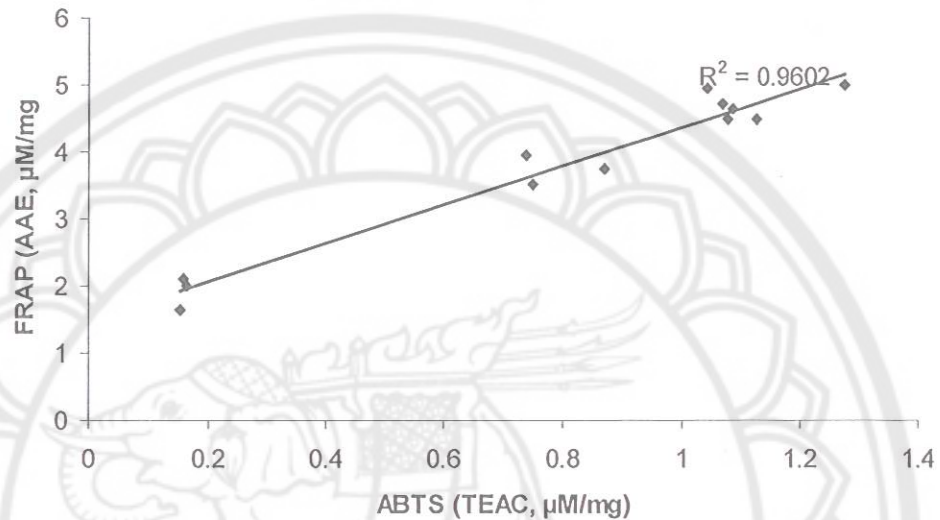
ภาพ 5 แสดงกราฟมาตรฐานของ gallic acid ในปฏิบัติการหาสารฟีนอลิกรวมที่ความยาวคลื่น 765 nm ความเข้มข้นระหว่าง 0.4 – 2.0 mg/ml (mean \pm SD, n = 3)



ภาพ 6 แสดงปริมาณสารฟีนอลิกรวม (Total phenolic compound) ของสารสกัดจากชำเลื้อยในส่วนต่างๆของยอดอ่อน ใบ ลำต้น และดอก (mean \pm SD, n = 3)

5. ความสัมพันธ์ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการศึกษาด้วยเทคนิค ABTS และ FRAP

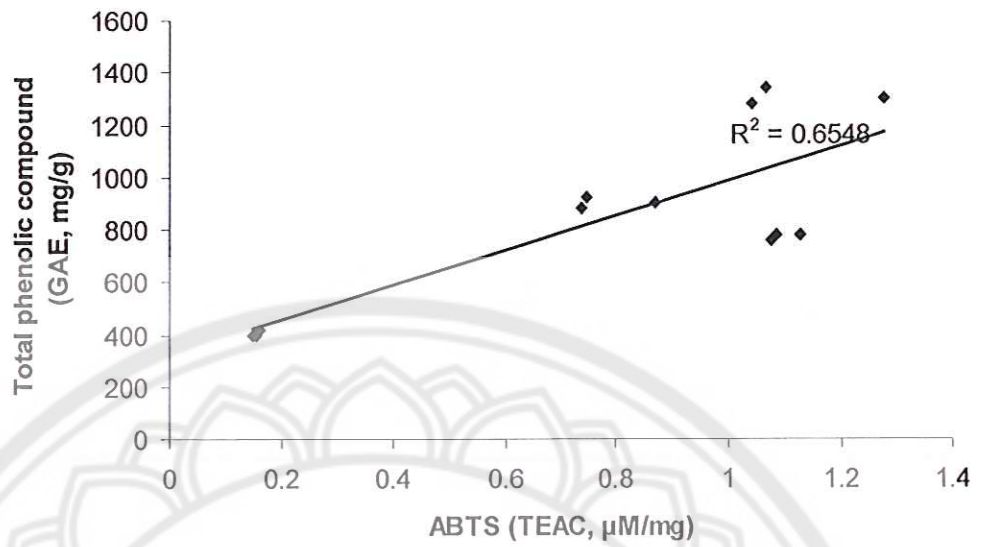
ภาพ 7 แสดงค่าความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดขี้เหล็กจากการทดสอบด้วยเทคนิค ABTS และ FRAP ซึ่งพบว่าค่าที่ได้มีความสัมพันธ์กันโดยมีค่า correlation coefficient; R^2 เท่ากับ 0.96



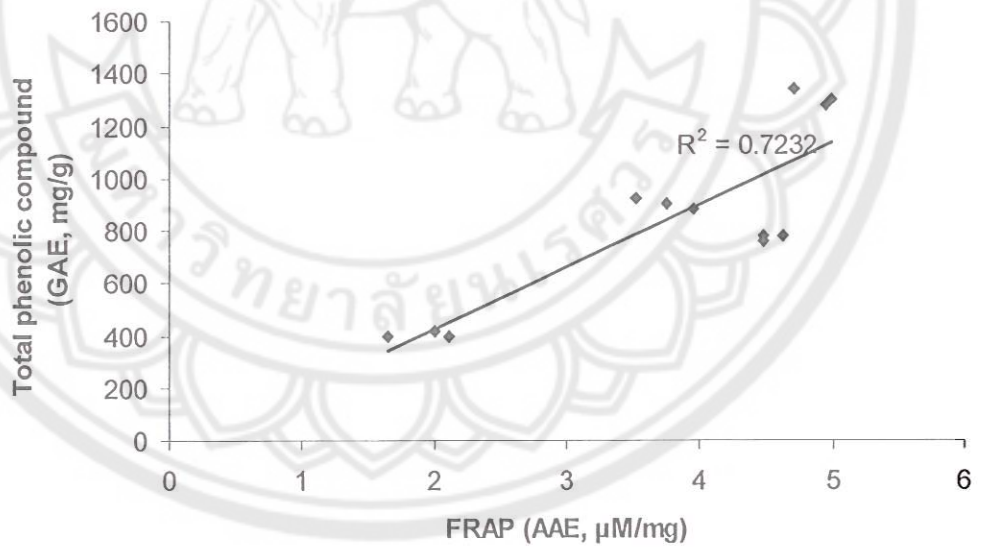
ภาพ 7 แสดงค่าความสัมพันธ์ของการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากขี้เหล็กด้วยเทคนิค ABTS และ FRAP

6. ความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณสารฟีนอลิกรวม

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณสารฟีนอลิกที่พบในสารสกัดขี้เหล็ก พบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธี ABTS กับปริมาณสารฟีนอลิกมีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกัน (ภาพ 8) โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 0.65 เช่นเดียวกับกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธี FRAP กับปริมาณสารฟีนอลิกที่พบว่ามีผลสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกันเช่นกัน โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 0.72 (ภาพ 9)



ภาพ 8 แสดงความสัมพันธ์ของฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ศึกษาโดยเทคนิค ABTS กับ ปริมาณสารฟีนอลิกรวมที่ได้จากสารสกัดข่าเลือด



ภาพ 9 แสดงความสัมพันธ์ของฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ศึกษาโดยเทคนิค FRAP กับ ปริมาณสารฟีนอลิกรวมที่ได้จากสารสกัดข่าเลือด

7. องค์ประกอบของสารสกัดจากเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC)

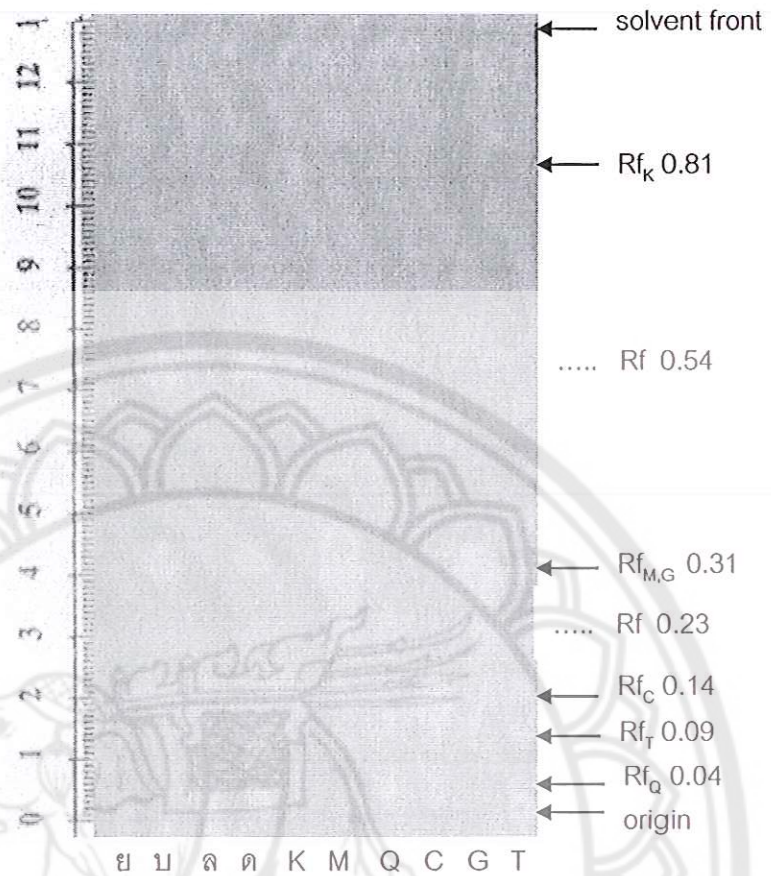
จากการศึกษาองค์ประกอบของสารสกัดจากข้าเลื้อดแต่ละส่วนโดยเทคนิค Thin Layer Chromatography ด้วยสารมาตรฐานเปรียบเทียบในกลุ่ม flavonol (kaempferol, myricetin, quercetin), flavones (apigenin), tannic acid, catechin และ gallic acid ในสารละลายตัวพา (mobile phase) ที่ประกอบด้วย benzene : ethyl acetate : formic acid อัตราส่วนปริมาตร 40 : 10 : 5 ได้ผลดังนี้

7.1 การตรวจสอบองค์ประกอบที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

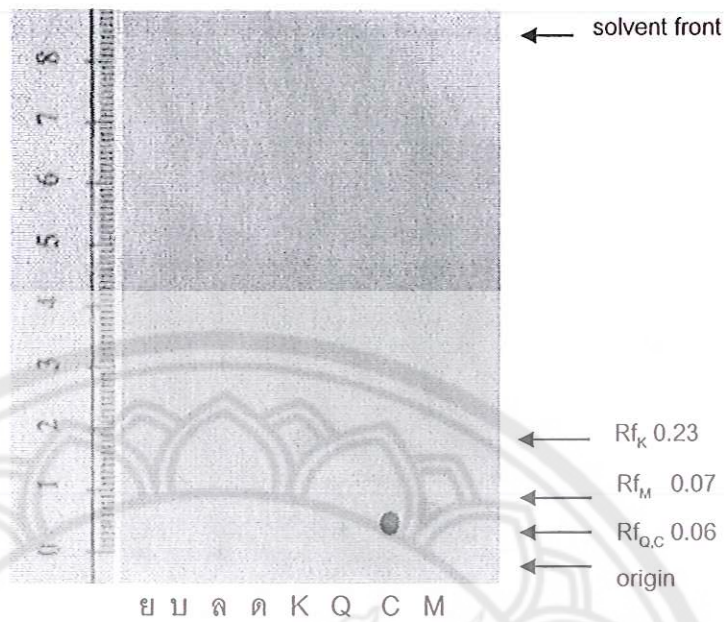
จากการตรวจสอบสารประกอบที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้สารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ใน methanol หลังจากการแยกด้วยเทคนิค TLC แล้วพบจุด (spot) ที่มีสีเหลืองบนพื้นหลัง (background) สีม่วง ดังภาพ 10 โดยสารสกัดจากส่วนของยอดอ่อนและลำต้นสามารถแยกองค์ประกอบที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้อย่างน้อย 4 จุด โดยมีค่า Rf เท่ากับ 0.04, 0.09, 0.23 และ 0.31 ส่วนสารสกัดจากใบและดอกสามารถแยกได้อย่างน้อย 5 จุด โดยมีค่า Rf เท่ากับ 0.04, 0.09, 0.23, 0.31 และ 0.54 ตามลำดับ ซึ่งจุดที่ได้ของสารสกัดจากข้าเลื้อดแต่ละส่วนนั้นมีลักษณะคล้ายคลึงกับสารมาตรฐาน 4 ชนิด ได้แก่ quercetin, tannic acid, myricetin และ gallic acid

7.2 การตรวจสอบสารประกอบฟลาโวนอยด์

จากการตรวจสอบสารประกอบฟลาโวนอยด์ด้วยการฉีดพ่นสารละลายวานิลีนในกรดไฮโดรคลอริก หลังจากแยกด้วยเทคนิค TLC แล้วจะได้จุด (spot) สีชมพูบนพื้นหลัง (background) สีเหลืองอ่อน โดยพบว่า สารสกัดจากส่วนของยอดอ่อนและลำต้นของสารสกัดข้าเลื้อดเกิดจุดที่มีสีชมพู ตำแหน่งเดียวกับสาร catechin ที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน โดยมีค่า Rf เท่ากับ 0.06 ดังภาพ 10 ดังนั้น สารสกัดจากทั้ง 2 ส่วนนี้น่าจะมีสารประกอบจำพวกฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบ ส่วนสารสกัดจากส่วนของใบและดอกนั้นไม่พบสารประกอบฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบ



ภาพ 10 แสดงการตรวจสอบองค์ประกอบที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจาก
 ข้าเล็ดในส่วนขยายของยอดอ่อน (ย) ใบ (บ) ลำต้น (ล) และดอก (ด) โดยเทคนิค
 Thin Layer Chromatography ด้วยสารละลายตัวพา benzene : ethyl acetate
 : formic acid 40 : 10 : 5 (v/v) ; K-kaempferol, M-myricetin, Q-queracetin,
 C—catechin, G-gallic acid และ T-tannic acid



ภาพ 11 แสดงการตรวจสอบฟลาโวนอยด์ของสารสกัดจากผักข้าเลือดในส่วนขยอด
อ่อน (ย) ใบ (บ) ลำต้น (ล) และดอก (ด) โดยเทคนิค Thin Layer
Chromatography ด้วยสารละลายตัวพา n-hexane : ethyl acetate : formic
acid อัตราส่วน 31 : 14 : 5 (v/v) ; K-kaempferol, Q-quercetin, C-catechin
และ M-myricetin

8. ฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรีย

8.1 Disc-diffusion

จากการตรวจสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญของแบคทีเรียของสารสกัดจากข้าเลือดส่วน
ต่างๆ คือ ขยดอ่อน ใบ ลำต้น และดอก โดยใช้ตัวทำละลายคือ 70% ethanol เป็นตัวควบคุมลบ
(negative control) และ Chloramphenicol 30 µg/disc เป็นตัวควบคุมบวก (positive control)
โดยเชื้อแบคทีเรีย 6 ชนิด ได้แก่ *S. typhi*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *B. cereus*, *E. faecalis* และ *B.*
subtilis พบว่าสารสกัดจากข้าเลือดแต่ละส่วนที่ความเข้มข้น 10 mg/disc สามารถยับยั้งการเจริญ
ของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบได้ทุกชนิดยกเว้นเชื้อ *S. typhi* และ *B. cereus* เมื่อ
เปรียบเทียบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone กับ Chloramphenicol ซึ่งมีค่าแตกต่าง
กันดังแสดงในตาราง 3 โดยสารสกัดจากส่วนของใบมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli*,
P.vulgaris, *E. faecalis* และ *B. subtilis* ได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุมบวก ส่วนสารสกัด
จากส่วนของขยดอ่อนและลำต้นนั้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P.vulgaris*, *E. faecalis* และ

B. subtilis ได้ดีกว่าตัวควบคุมบวก สารสกัดจากส่วนของดอกสามารถยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าตัวควบคุมบวก คือ เชื้อ *E. coli*, *P. vulgaris* และ *E. faecalis* แต่สารสกัดจากข้าเลือดทั้ง 4 ส่วนไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. typhi* และ *B. cereus* เมื่อเปรียบเทียบขนาดของ inhibition zone กับ Chloramphenicol

ตาราง 3 แสดงฤทธิ์ในการต้านการเจริญของแบคทีเรียของสารสกัดจากข้าเลือดในส่วนของ

ยอดอ่อน ใบ ลำต้น และดอก โดยวิธี disc-diffusion เปรียบเทียบกับ chloramphenicol

Micro-organisms	Inhibition zone (mm,n=3)				
	ยอดอ่อน (10 mg/disc)	ใบ (10 mg/disc)	ลำต้น (10 mg/disc)	ดอก (10 mg/disc)	Chloramphenicol (30 µg/disc)
<i>S. typhi</i>	12.67±0.58	10.00±1.00	12.00±1.00	12.33±0.58	30.33±0.58
<i>E. coli</i>	10.33±1.53	12.67±1.15	10.00±2.00	12.67±0.58	9.66±0.58
<i>P. vulgaris</i>	11.67±0.58	12.33±0.58	10.67±0.58	11.33±0.58	10.33±0.58
<i>B. cereus</i>	10.00±1.00	10.33±0.58	10.00±1.00	10.33±1.53	25.00±1.00
<i>E. faecalis</i>	11.33±0.58	12.67±0.58	11.67±1.53	12.00±1.00	10.00±1.00
<i>B. subtilis</i>	10.67±1.53	12.00±1.00	10.33±2.08	8.00±1.73	9.33±0.58

8.2 Minimum inhibitory concentration (MIC)

จากการตรวจหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่น้อยที่สุด (MIC) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ โดยทำการเจือจางสารสกัดจากข้าเลือดแต่ละส่วนที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 8, 16, 32, 64, 128 และ 256 mg/ml และทำการบันทึกผลโดยสังเกตจากหลอดทดลองที่มีความเข้มข้นของสารสกัดน้อยที่สุดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อ พบว่า สารสกัดจากข้าเลือดแต่ละส่วนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบได้โดยมีค่า MIC แตกต่างกันดังตาราง 4 โดยสารสกัดจากส่วนของใบสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากส่วนอื่น โดยมีค่า MIC ต่อ *E. coli* และ *P. vulgaris* เท่ากับ 64 mg/ml และต่อ *E. faecalis* และ *B. subtilis* เท่ากับ 128 mg/ml รองลงมาคือสารสกัดจากยอดอ่อนมีค่า MIC ต่อ *E. coli* *P. vulgaris* และ *B. subtilis* เท่ากับ 128 mg/ml ขณะที่ค่า MIC ต่อ *E. faecalis* เท่ากับ 256 mg/ml ขณะที่สารสกัดจากลำต้นและดอก สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทุกชนิดที่ค่า MIC เท่ากับ 256 mg/ml ยกเว้นส่วนของลำต้นที่มีค่า MIC ต่อ *E. faecalis* เท่ากับ 128 mg/ml เท่ากับ MIC ของใบ

ตาราง 4 แสดงค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ของสารสกัดจากข้าเลียดในส่วน
ของยอดอ่อน ใบ ลำต้น และดอก

Microorganisms	MIC value (mg/ml)			
	ยอดอ่อน	ใบ	ลำต้น	ดอก
<i>E. coli</i>	128	64	256	256
<i>P. vulgaris</i>	128	64	256	256
<i>E. faecalis</i>	256	128	128	256
<i>B. subtilis</i>	128	128	256	256

9. การยับยั้งปฏิกริยาออกซิเดชันในเซลล์เม็ดเลือดแดง

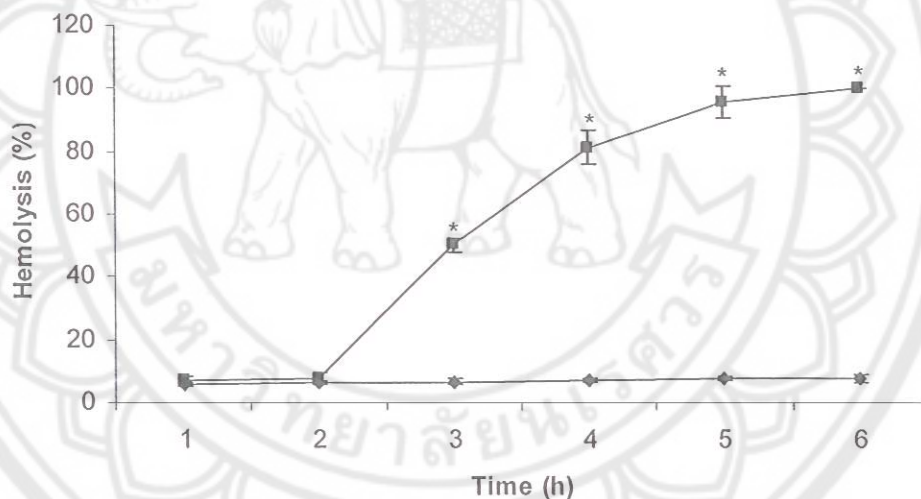
9.1 ผลของสารสกัดต่อการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง (hemolysis)

จากการศึกษาผลของสารสกัดข้าเลียดต่อการป้องกันการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง (hemolysis) พบค่าการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่สภาวะปกติ อุณหภูมิ 37 °C $7.78 \pm 1.17\%$ (ภาพ 12) ขณะที่ AAPH ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นที่ทำให้เกิดแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง พบค่าการแตกของเซลล์ถึง 50% ที่เวลา 3 ชั่วโมงและเพิ่มสูงขึ้นเกือบ 100% ในเวลา 6 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($p < 0.05$) และเมื่อนำสารสกัดข้าเลียดส่วนต่างๆ ได้แก่ ยอดอ่อน ใบ ลำต้น และดอก ที่ความเข้มข้น 10, 25 และ 50 $\mu\text{g/ml}$ มาบ่มเพาะกับเซลล์เม็ดเลือดแดงก่อนเติมสารละลาย AAPH พบว่า สารสกัดจากข้าเลียดแต่ละส่วนสามารถยับยั้งการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงได้แตกต่างกันไปอย่างมีนัยสำคัญ ดังภาพ 13-16 โดยสารสกัดจากข้าเลียดสามารถยับยั้งการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ดีขึ้นตามระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ โดยในส่วนของใบที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้งการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ดีที่สุดถึงระยะเวลา 6 ชั่วโมง (10.03 % hemolysis) (ภาพ 12) ขณะที่ที่ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้งได้น้อยกว่าโดยสามารถยับยั้งได้เฉพาะช่วงเวลา 5 ชั่วโมง (17.87 % hemolysis) ขณะที่ที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้งได้เฉพาะในช่วงเวลา 3 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม การแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงดังกล่าวที่มีสารสกัดเปรียบเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ไม่มีสารสกัด (AAPH อย่างเดียว) ค่าการแตกของเซลล์ที่พบยังมีค่าต่ำกว่าเซลล์ที่ไม่มีสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($p < 0.05$) เช่นที่เวลา 6 ชั่วโมง พบการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงเป็น 21.49 % ในเซลล์ที่มีสารสกัด 25 $\mu\text{g/ml}$ ขณะที่พบการแตกของเซลล์ 100 % ในเซลล์ที่ไม่มีสารสกัด (AAPH อย่างเดียว) เช่นเดียวกัน พบการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง 35.13 % ที่เวลา 4

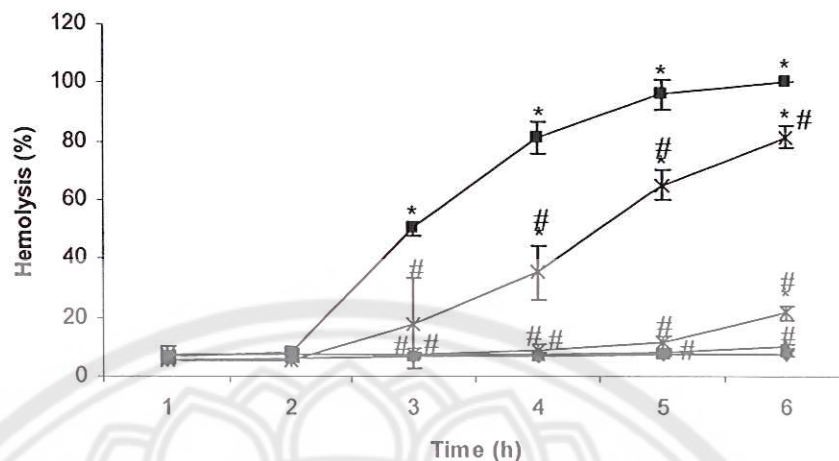


ชั่วโมง ในเม็ดเลือดแดงที่มีสารสกัดจากข้าวเล็ด 10 µg/ml ขณะที่พบการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงถึง 81.16 % เมื่อไม่มีสารสกัด (มี AAPH อย่างเดียว) ดังภาพ 13

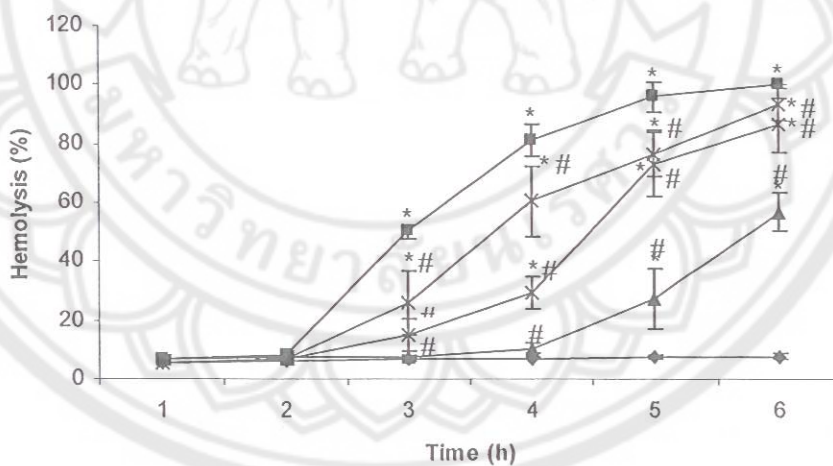
ในส่วนของสารสกัดจากยอดอ่อนที่ความเข้มข้น 10, 25 และ 50 µg/ml จะพบการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ระยะเวลา 3, 4 และ 5 ชั่วโมงตามลำดับ (ค่า % hemolysis แตกต่างจากกลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ ดังภาพ 14 ที่เวลา 3 4 และ 5 ชั่วโมง) อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงกับเซลล์ที่ไม่มีสารสกัด จะพบค่า % hemolysis ต่ำกว่าเซลล์ที่เติมเฉพาะ AAPH อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$) โดยที่พบการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงเป็น 26.04, 29.12 และ 25.13 % ที่เวลา 3, 4 และ 5 ชั่วโมง ในเม็ดเลือดแดงที่มีสารสกัดจากข้าวเล็ด 10, 25 และ 50 µg/ml ตามลำดับ ขณะที่พบการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงเป็น 50.19, 81.16 และ 95.89 % ในเซลล์ที่มี AAPH อย่างเดียวที่เวลา 3, 4 และ 5 ชั่วโมง ตามลำดับ



ภาพ 12 แสดงผลของสารละลาย 25 mM AAPH ต่อการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง (mean ± SD, n = 3) ; -♦- control และ -■- AAPH 25 mM ; * หมายถึง ค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่ม control กับกลุ่ม AAPH อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

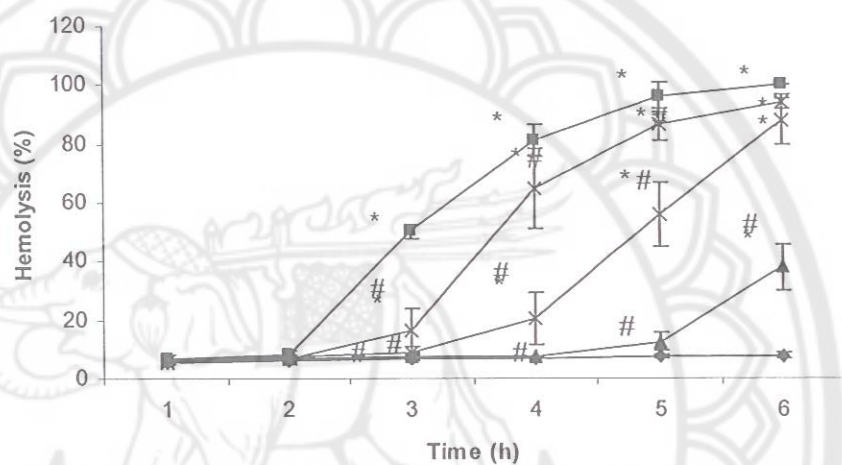


ภาพ 13 แสดงผลของสารสกัดจากส่วนของใบต่อการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มี 25 mM AAPH (mean \pm SD, n = 3); -♦- control, -■- AAPH, -▲- + 50 μ g/ml extracts, -×- + 25 μ g/ml extracts และ -×- + 10 μ g/ml extracts; * หมายถึง ค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่ม control กับกลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$), # หมายถึง ค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่ม AAPH กับกลุ่ม extracts อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



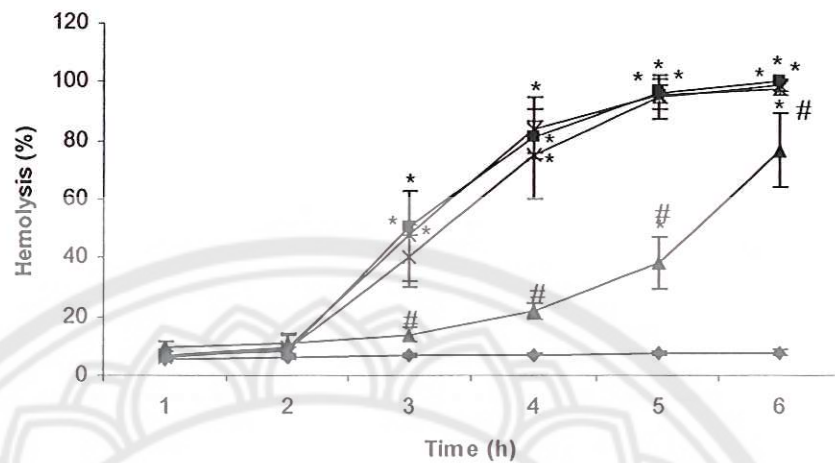
ภาพ 14 แสดงผลของสารสกัดจากส่วนของยอดอ่อนข้า้เลือดต่อการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มี 25 mM AAPH (mean \pm SD, n = 3); -♦- control, -■- AAPH, -▲- + 50 μ g/ml extracts, -×- + 25 μ g/ml extracts และ -×- + 10 μ g/ml extracts; * หมายถึง ค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่ม control กับกลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$), # หมายถึง ค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่ม AAPH กับกลุ่ม extracts อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

สารสกัดจากส่วนของดอกพบการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ความเข้มข้น 10, 25 และ 50 µg/ml ที่ระยะเวลา 3, 4 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพ 15) อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีสารสกัด (AAPH อย่างเดียว) ยังคงพบว่า % hemolysis ต่ำกว่าเซลล์ที่ไม่มีสารสกัด อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$) โดยพบการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงเป็น 16.35, 20.85 และ 37.90 % ที่เวลา 3, 4 และ 6 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 10, 25 และ 50 µg/ml ตามลำดับ ขณะที่พบ 50.19, 81.89 และ 100 % ของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มี AAPH อย่างเดียวที่เวลา 3, 4 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ



ภาพ 15 แสดงผลของสารสกัดจากส่วนของดอกของข้าเลือดต่อการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง ที่มี 25 mM AAPH (mean \pm SD, n = 3); -♦- control, -■- AAPH, -▲- + 50 µg/ml extracts, -×- + 25 µg/ml extracts และ -*- + 10 µg/ml extracts; * หมายถึง ค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่ม control กับกลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$), # หมายถึง ค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่ม AAPH กับกลุ่ม extracts อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

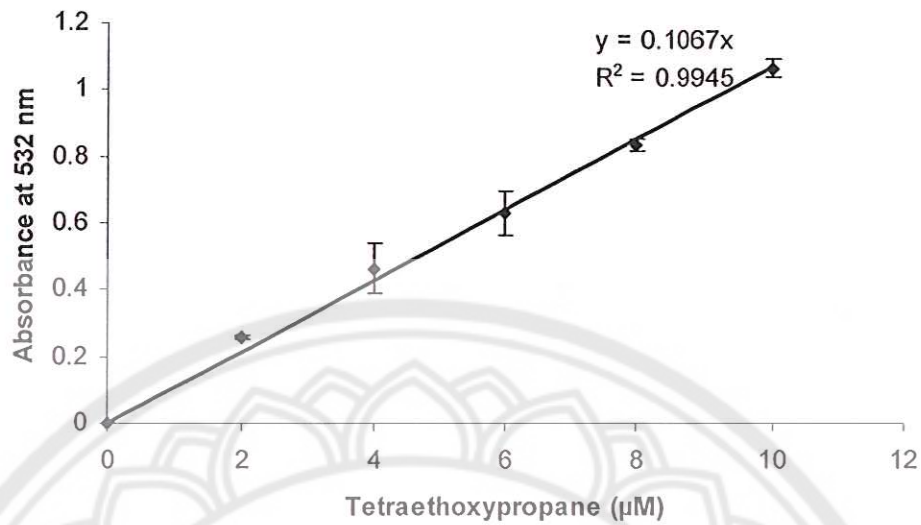
ขณะที่สารสกัดจากลำต้นนั้นสามารถยับยั้งการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงได้น้อยกว่าสารสกัดจากส่วนอื่น (ภาพ 16) โดยพบว่าสารสกัดจากลำต้นที่ความเข้มข้น 10 และ 25 µg/ml ไม่สามารถยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดงได้ตลอดระยะเวลาทดสอบ (1-6 ชั่วโมง) พบเพียงที่ความเข้มข้น 50 µg/ml ที่สามารถยับยั้งได้จนถึงระยะเวลา 4 ชั่วโมง ที่ความเชื่อมั่น 95 % ($p < 0.05$) โดยพบการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เวลา 5 ชั่วโมง เป็น 38.07 % อย่างไรก็ตามค่าการแตกตัวที่เวลาดังกล่าวยังคงมีค่าต่ำกว่าเซลล์ที่เติมเฉพาะ AAPH (95.89%) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



ภาพ 16 แสดงผลของสารสกัดจากส่วนลำต้นของข้าเลือดต่อการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มี 25 mM AAPH (mean \pm SD, n = 3); -♦- control, -■- AAPH, -▲- + 50 μ g/ml extracts, -x- + 25 μ g/ml extracts และ -•- + 10 μ g/ml extracts; * หมายถึง ค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่ม control กับกลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$), # หมายถึง ค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่ม AAPH กับกลุ่ม extracts อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

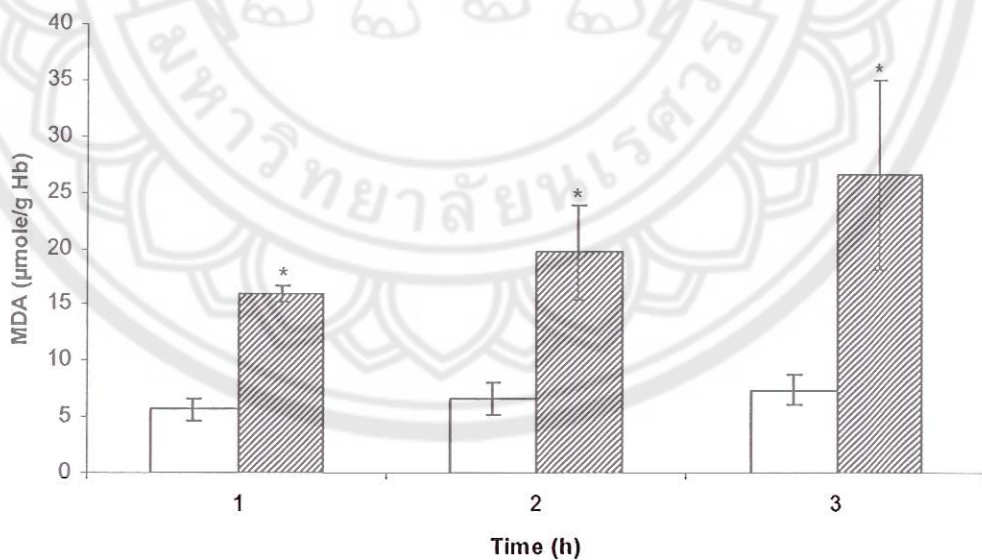
9.2 การศึกษาผลของสารสกัดต่อการยับยั้งกระบวนการ lipid peroxidation ของเซลล์เม็ดเลือดแดง

การศึกษามูลของข้าเลือดต่อการยับยั้งกระบวนการ lipid peroxidation ของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีสารละลาย AAPH เป็นตัวชักนำให้เกิดปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระ โดยวิธี Thiobarbituric Acid Reactive Substance (TBARS) อาศัยหลักการที่ Thiobarbituric acid (TBA) ทำปฏิกิริยากับ malondialdehyde (MDA) ที่เกิดขึ้นในกระบวนการ lipid peroxidation ได้เป็นสารประกอบซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 nm และคำนวณหาปริมาณ MDA ที่เกิดขึ้นจากกราฟมาตรฐานของ 1,1,3,3-Tetraethoxypropane (ภาพ 17)



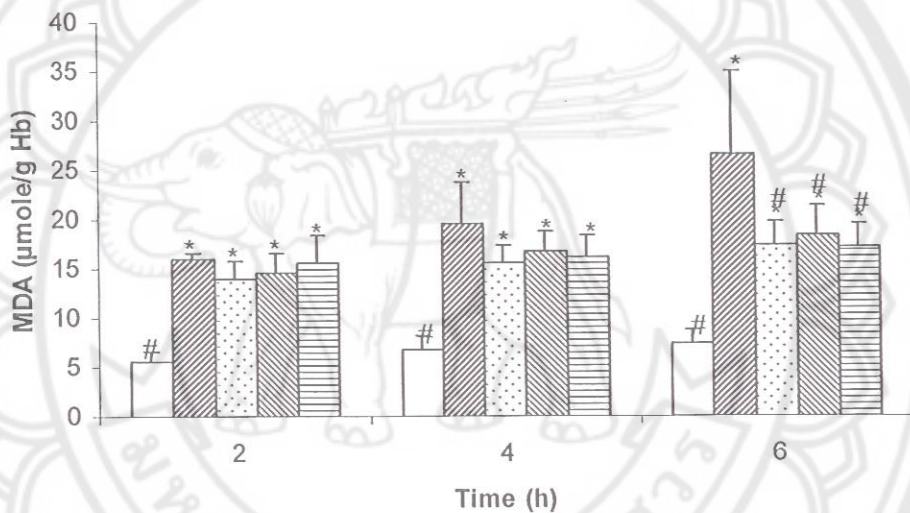
ภาพ 17 แสดงกราฟมาตรฐานของ 1,1,3,3-Tetraethoxypropane ในการตรวจวัดปริมาณ MDA

ภาพ 18 แสดงปริมาณของ MDA ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการ lipid peroxidation ของเซลล์เม็ดเลือดแดง เมื่อถูกกระตุ้นด้วย AAPH ที่ระยะเวลา 2, 4 และ 6 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ไม่ได้รับการกระตุ้น โดยมีค่าเป็น 16.01, 19.68 และ 26.51 µmol/g Hb ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($p < 0.05$)

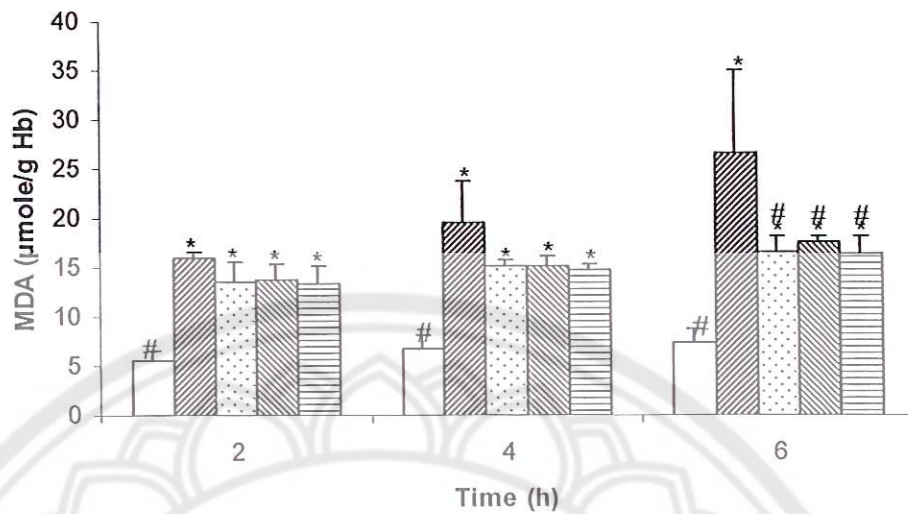


ภาพ 18 แสดงผลของสารละลาย 25 mM AAPH ต่อการเกิดกระบวนการ lipid peroxidation ของเซลล์เม็ดเลือดแดง (mean \pm SD, n = 3); □ control และ ▨ 25 mM AAPH; * หมายถึง ค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่ม control กับกลุ่ม AAPH อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

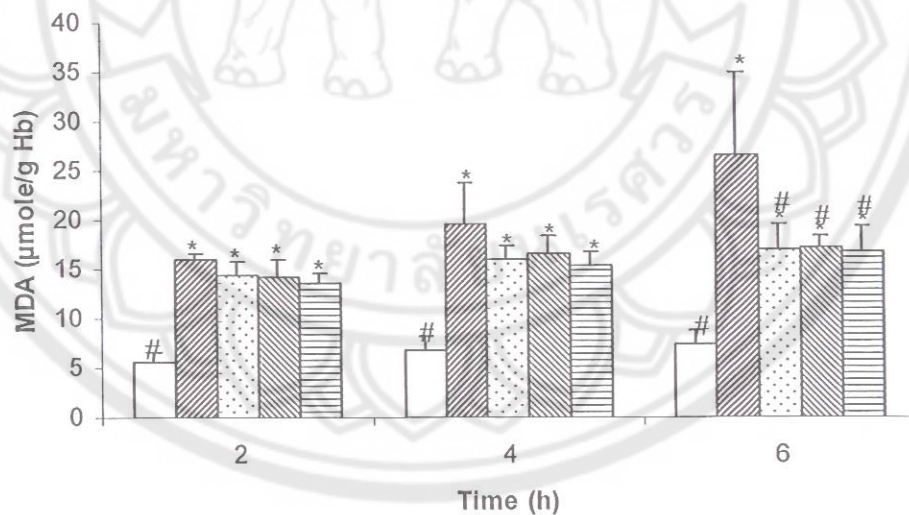
เมื่อนำสารสกัดจากข้าวเล็ดส่วนต่างๆ ได้แก่ ใบ ยอดอ่อน ดอก และลำต้น ที่ความเข้มข้นต่างๆ มาปมเพาะกับเซลล์เม็ดเลือดแดงก่อนเติมสารละลาย AAPH พบว่า สารสกัดข้าวเล็ดทั้ง 4 ส่วนสามารถยับยั้งการเกิด MDA ได้ที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง ดังภาพ 19-22 โดยพบว่า สารสกัดจากใบ ยอดอ่อน และดอก ที่ความเข้มข้น 10, 25 และ 50 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ได้อย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% (ภาพ 19-21) ขณะที่สารสกัดจากส่วนของลำต้นพบการยับยั้งของสารสกัดเฉพาะที่ความเข้มข้น 25 และ 50 $\mu\text{g/ml}$ แต่ไม่พบที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ (ภาพ 22) ส่วนระยะเวลา 2 และ 4 ชั่วโมงไม่มีผลต่อการป้องกันที่ทุกความเข้มข้น (ภาพ 19-22)



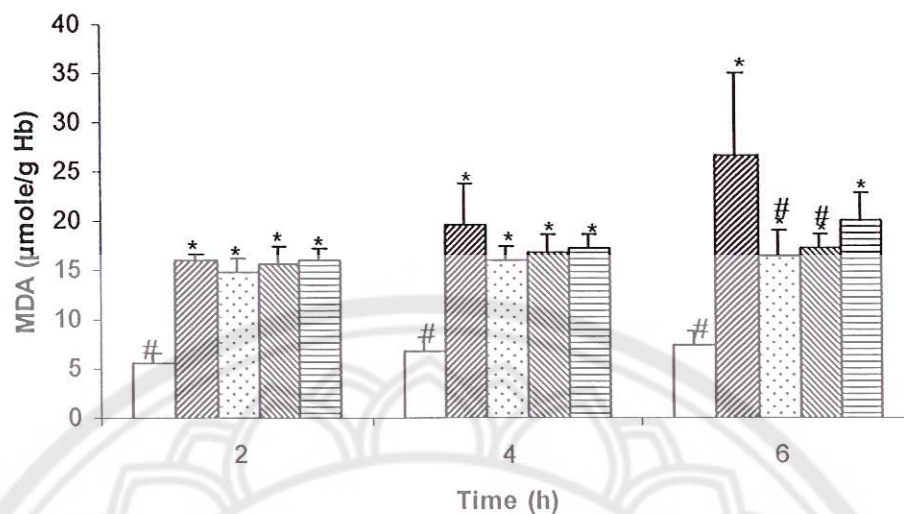
ภาพ 19 แสดงผลของสารสกัดจากส่วนใบของข้าวเล็ดต่อการป้องกันการเกิดกระบวนการ lipid peroxidation ของเซลล์เม็ดเลือดแดง (mean \pm SD, n = 3); □ control, ▨ 25 mM AAPH, ▤ 50 $\mu\text{g/ml}$, ▥ 25 $\mu\text{g/ml}$ และ ▧ 10 $\mu\text{g/ml}$; * หมายถึง ค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่ม control กับกลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$), # หมายถึง ค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่ม AAPH กับกลุ่ม extracts อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



ภาพ 20 แสดงผลของสารสกัดจากส่วนยอดอ่อนของข้าเลื้อยต่อการป้องกันการเกิดกระบวนการ lipid peroxidation ของเซลล์เม็ดเลือดแดง (mean \pm SD, n = 3); □ control, ▨ 25 mM AAPH, ▤ 50 µg/ml, ▥ 25 µg/ml และ ▦ 10 µg/ml; * หมายถึง ค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่ม control กับกลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$), # หมายถึง ค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่ม AAPH กับกลุ่ม extracts อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



ภาพ 21 แสดงผลของสารสกัดจากส่วนดอกข้าเลื้อยต่อการป้องกันการเกิดกระบวนการ lipid peroxidation ของเซลล์เม็ดเลือดแดง (mean \pm SD, n = 3); □ control, ▨ 25 mM AAPH, ▤ 50 µg/ml, ▥ 25 µg/ml และ ▦ 10 µg/ml; * หมายถึง ค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่ม control กับกลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$), # หมายถึง ค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่ม AAPH กับกลุ่ม extracts อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



ภาพ 22 แสดงผลของสารสกัดจากส่วนลำต้นของข้าเลือดต่อการป้องกันการเกิดกระบวนการ lipid peroxidation ของเซลล์เม็ดเลือดแดง (mean \pm SD, n = 3); □ control, ▨ 25 mM AAPH, ▩ 50 μ g/ml, ▪ 25 μ g/ml และ ▫ 10 μ g/ml; * หมายถึง ค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่ม control กับกลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$), # หมายถึง ค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่ม AAPH กับกลุ่ม extracts อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

10. ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

จากการศึกษาฤทธิ์การต้านการอักเสบของข้าเลือดโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของ formazan ที่ลดลงเมื่อมีการกระตุ้นเซลล์นิวโทรฟิลล์ด้วย Zymosan-activated serum (ZAS) เกิดอนุมูลอิสระ superoxide anion (O_2^-) แล้วให้ทำปฏิกิริยากับ WST-1 reagent ได้ผลิตภัณฑ์ formazan ที่มีสีแดง ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm แล้วคำนวณหาค่า % inhibition เปรียบเทียบกับ positive control คือ Indomethacine พบว่า สารสกัดจากข้าเลือดส่วนใหญ่สามารถยับยั้งการอักเสบโดยการยับยั้งการเกิดอนุมูล superoxide ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับ Indomethacine ยกเว้นในส่วนของลำต้นที่พบค่า % inhibition น้อยกว่า Indomethacine ที่ทุกความเข้มข้น (ตาราง 5)

ตาราง 5 แสดงค่าการยับยั้ง superoxide ที่เกิดขึ้นของสารสกัดชาเลือดส่วนต่างๆ

ความเข้มข้น	% inhibition (mean \pm SD, n = 3)				
	ยอดอ่อน	ใบ	ลำต้น	ดอก	Indomethacine
12.5 μ g/ml	30.84 \pm 1.68 ^a	32.10 \pm 0.45 ^a	16.38 \pm 2.48 ^{b**}	29.72 \pm 1.09 ^a	22.69 \pm 2.40 ^{c**}
25 μ g/ml	30.64 \pm 3.17 ^a	32.91 \pm 1.30 ^a	21.47 \pm 4.53 ^{b*}	30.18 \pm 4.10 ^a	28.80 \pm 1.37 ^{a*}
50 μ g/ml	32.34 \pm 1.17 ^a	34.03 \pm 1.42 ^a	24.11 \pm 3.59 ^{b*}	31.46 \pm 3.83 ^a	29.30 \pm 2.55 ^{a*}
100 μ g/ml	32.37 \pm 3.28 ^{ab}	33.23 \pm 1.34 ^a	26.47 \pm 4.34 ^{b*}	31.89 \pm 4.97 ^{ab}	35.04 \pm 1.44 ^{a***}

หมายเหตุ : - a,b,c แสดงค่า % inhibition ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างสารสกัดแต่ละส่วนและ indomethacine ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$)

- *,**,*** หมายถึง ค่า % inhibition ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของสารสกัดและ indomethacine แต่ละความเข้มข้นที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$)

- ตัวอักษรหรือสัญลักษณ์เดียวกันหมายถึงค่าที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากตาราง 5 พบว่า สารสกัดชาเลือดในส่วนของใบ ยอดอ่อนและดอก ที่ทุกความเข้มข้นคือ 12.5, 25, 50 และ 100 μ g/ml มีค่า % inhibition ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และสามารถยับยั้งการเกิด superoxide ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับ indomethacine ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ขณะที่พบว่าสารสกัดจากลำต้น ที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 μ g/ml มีค่า % inhibition ไม่แตกต่างกัน ยกเว้นที่ 12.5 μ g/ml ที่พบค่าการยับยั้งได้น้อยกว่า (16.38%) แต่ทุกความเข้มข้นไม่สามารถยับยั้งการเกิด superoxide ได้เมื่อเปรียบเทียบกับ indomethacine ที่ทุกความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ขณะที่ indomethacine ที่ใช้เป็นสารเปรียบเทียบมาตรฐาน มีค่า % inhibition ที่ความเข้มข้น 12.5 μ g/ml ที่น้อยที่สุด (22.69 %) และแตกต่างจากความเข้มข้นที่ 25, 50 และ 100 μ g/ml อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ส่วนที่ความเข้มข้น 25 และ 50 μ g/ml พบค่าการยับยั้งไม่แตกต่างกัน (28.80 และ 29.30 % ตามลำดับ) ยกเว้นที่ 100 μ g/ml ที่พบค่าการยับยั้งสูงสุด (35.04 %) สูงกว่าที่ความเข้มข้นอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผักชำเลียดโดยเทคนิค ABTS และ FRAP เป็นการวัดความสามารถรวมในการต้านออกซิเดชัน (Total antioxidant capacity) ซึ่งอาศัยกลไกในการส่งผ่านอิเล็กตรอนไปรีดิวซ์สารอื่น โดยการทดสอบด้วยเทคนิค ABTS ซึ่งเป็นการวัดความสามารถในการขจัดอนุมูล $ABTS^{\cdot+}$ (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical) ที่มีสีเขียวปนน้ำเงิน พบว่า สารสกัดจากส่วนที่ต่างกันมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน โดยพบว่า สารสกัดจากส่วนของใบและยอดอ่อนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุด รองลงมาคือ ดอก และลำต้น ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของสุชาติา โสจนานนท์ (27) ส่วนเทคนิค FRAP นั้นเป็นการวัดความสามารถรวมในการรีดิวซ์สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก Fe^{3+} -TPTZ (ferric tripyridyl triazine) ได้เป็น Fe^{2+} -TPTZ พบว่า สารสกัดจากส่วนของใบและยอดอ่อนมีฤทธิ์ที่สูงที่สุด เช่นเดียวกับผลที่ได้จากวิธี ABTS รองลงมาคือ ดอก และลำต้น ตามลำดับ ซึ่งเมื่อนำค่าที่ได้จากทั้งสองวิธีมาหาความสัมพันธ์กัน พบว่า มีความสัมพันธ์กันสูง ($R^2 = 0.99$) จึงอาจใช้เทคนิคใดเทคนิคหนึ่งในการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้ และจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า สารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากพืชส่วนใหญ่เป็นสารประกอบฟีนอลิกซึ่งทำหน้าที่เป็นสารคีเลต และยับยั้งหรือขจัดอนุมูลอิสระ (28-29) ตัวอย่างเช่น ฟลาโวนอยด์ซึ่งจัดเป็นสารสำคัญของกลุ่มโพลีฟีนอล พบทั่วไปในพืชที่มีสีเขียว และพบในทุกส่วนของพืช และมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจำพวก lipid alkoxyl และ peroxy radicals ได้ (30) ซึ่งจากการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ในสารสกัดจากชำเลียดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu โดยอาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์ระหว่างสารฟีนอลิกที่อยู่ในสารสกัดกับโซเดียมคาร์บอเนต และสารละลาย Folin reagent พบว่า สารสกัดจากส่วนของใบมีปริมาณสารฟีนอลิกที่สูงที่สุด รองลงมาคือ ดอก ยอดอ่อน และลำต้น ตามลำดับ ปริมาณสารฟีนอลิกที่พบมากในส่วนของใบ เป็นตัวบ่งชี้ว่ามีกระบวนการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เกิดขึ้นมากที่ใบ เนื่องจากใบทำหน้าที่ในกระบวนการสังเคราะห์แสงและเป็นกลไกป้องกันการถูกทำลายจากรังสี UV-B (31) เมื่อนำปริมาณสารฟีนอลิกในสารสกัดแต่ละส่วนของชำเลียดมาหาความสัมพันธ์กับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากวิธี ABTS และ FRAP พบว่า มีความสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกัน โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 0.67 และ 0.74 ตามลำดับ จึงอาจกล่าวได้ว่า สารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ในสารสกัดจากชำเลียดนั้นมีส่วนสำคัญในการทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระ

การตรวจสอบองค์ประกอบของสารสกัดที่อยู่ในชำเลียดโดยเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน พบว่า สารสกัดจากชำเลียดแต่ละส่วนมีสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด เช่น quercetin, tannic acid, catechin, myricetin

และ gallic acid ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบได้ทั่วไปในผักพื้นบ้านหลายชนิด และมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ โดยสารฟลาโวนอยด์เมื่อถูกออกซิไดซ์จะได้อนุมูลฟลาโวนอยด์ที่นอกซัลที่มีความเสถียรมากกว่า เนื่องจากโครงสร้างของฟลาโวนอยด์มีการ delocalize ของอิเล็กตรอนตลอดเวลา อย่างไรก็ตาม การตรวจสอบโดยใช้วิธี Thin Layer Chromatography (TLC) เป็นเพียงการตรวจสอบเบื้องต้น จึงควรใช้เทคนิคที่มีความละเอียดและจำเพาะมากกว่านี้ในการตรวจสอบเพื่อยืนยันผลการทดลองและระบุชนิดของสารที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดอย่างละเอียด และในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ เช่นฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากข้าเลียด พบว่า สารสกัดจากข้าเลียดแต่ละส่วนมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบได้ทั้งแบคทีเรียชนิดแกรมบวกและแกรมลบ โดยเฉพาะสารสกัดจากส่วนของใบและยอดอ่อนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* ได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อชนิดอื่นที่ใช้ในการทดสอบ นอกจากนี้สารสกัดจากส่วนของใบสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. typhi*, *E. coli* และ *P. vulgaris* ได้ดีกว่าสารสกัดจากส่วนอื่น ซึ่งความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบเหล่านี้อาจสัมพันธ์กับปริมาณสารฟีนอลิกที่อยู่ในสารสกัดของผักข้าเลียด เนื่องจากสารฟีนอลิกที่อยู่ในพืชนั้นนอกจากมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแล้วยังมีคุณสมบัติในการต้านแบคทีเรียได้ (32) โดยจากการศึกษาของ Rodriguez และคณะ (33) พบว่า สารฟลาโวนอยด์บางชนิด เช่น quercetin, rutin และ catechin มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*, *S. marcescens* และ *P. aeruginosa* ได้และจากการศึกษาของ Chanwitheesuk และคณะ (34) พบว่า องค์ประกอบที่สำคัญในสารสกัดจากผักข้าเลียดที่สกัดด้วยเอทานอลคือ gallic acid ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. typhi* และ *S. aureus*

เนื่องจากภาวะเครียดจากออกซิเดชันหรือ oxidative stress ของเซลล์เม็ดเลือดที่อยู่ในร่างกายนั้นมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาและเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคต่างๆ ได้ โดยเฉพาะเซลล์เม็ดเลือดแดง ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีปริมาณมากที่สุดในร่างกายและมีส่วนในการควบคุมลักษณะทางชีวภาพของร่างกาย (35) โดยเมื่อเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดแดงได้รับความเสียหายจากการเกิดออกซิเดชันอาจทำให้เกิดภาวะ hemolysis เกิดความผิดปกติของฮีโมโกลบิน มีโลหะทรานซิชันเกิน ส่งผลให้ระบบของสารต้านอนุมูลอิสระในเซลล์เม็ดเลือดแดงมีความผิดปกติไป (36) นอกจากนี้กระบวนการ lipid peroxidation เป็นผลสืบเนื่องที่เกิดจากความเสียหายของปฏิกิริยาออกซิเดชันและเป็นกลไกทำให้เซลล์เกิดความเสียหายและตายได้ (37) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากข้าเลียดแต่ละส่วนในการยับยั้งการเกิด hemolysis และกระบวนการ lipid peroxidation ของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เกิดจากสารละลาย AAPH ซึ่งเป็น azo compound และสามารถละลายน้ำได้ เป็นตัวชักนำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นใน

หลอดทดลอง โดยสารละลาย AAPH จะสลายตัวทำให้เกิดอนุมูลอิสระที่อุณหภูมิปกติของร่างกาย (38) จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า สารสกัดจากข้าเลือดแต่ละส่วนสามารถยับยั้งการเกิดการเกิด hemolysis และกระบวนการ lipid peroxidation ของเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ โดยสารสกัดจากส่วนของใบที่ความเข้มข้น 50 µg/ml สามารถยับยั้งการเกิด hemolysis ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดจากส่วนของใบที่ความเข้มข้น 25 µg/ml และส่วนของยอดอ่อนกับดอกที่ความเข้มข้น 50 µg/ml ขณะที่สารสกัดจากลำต้นนั้นสามารถยับยั้งการเกิด hemolysis ได้น้อยที่สุดโดยสามารถยับยั้งได้ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml เท่านั้น นอกจากนี้สารสกัดจากข้าเลือดแต่ละส่วนสามารถยับยั้งการเกิด MDA ซึ่งเป็นผลผลิตที่เกิดจากกระบวนการ lipid peroxidation ได้ที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมงยกเว้นสารสกัดจากส่วนของลำต้นที่ความเข้มข้น 10 µg/ml จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะได้ศึกษาต่อไป เพื่อนำสารสกัดจากข้าเลือดไปใช้ประโยชน์ทางยาได้

การศึกษาการทำงานของเซลล์นิวโทรฟิลซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกัน ในการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคชนิดต่างๆ ที่เข้าสู่ร่างกายโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ NADPH oxidase ที่ทำหน้าที่สร้างอนุมูลอิสระ superoxide เพื่อทำลายจุลินทรีย์ที่บุกรุกเข้ามาโดยกระบวนการที่เรียกว่า respiratory burst แต่เมื่อมีปริมาณอนุมูลอิสระมากเกินไปจะส่งผลให้เกิดภาวะก่อโรคต่างๆ เช่น heart attacks, septic shocks, rheumatoid arthritis และ ischemia reperfusion injury (39) ซึ่งถ้ามีสารที่สามารถลดการสะสมของเซลล์นิวโทรฟิลบริเวณที่เกิดการอักเสบอาจจะช่วยลดการเกิดโรคต่างๆ เหล่านี้ได้ จากการศึกษาในครั้งนี้ทำการทดสอบความสามารถในการต้านการอักเสบของสารสกัดจากฝักข้าเลือดโดย in vitro ซึ่งเป็นการวัดการทำงานของเอนไซม์ NADPH oxidase ในการเร่งปฏิกิริยารีดักชันของสารละลาย WST-1 reagent ในเซลล์นิวโทรฟิลที่แยกออกมาจากเลือดคนปกติโดยใช้ Zymosan-activated serum (ZAS) ซึ่งเป็นอนุภาคที่เกิดกระบวนการฟาโกไซโตซิสโดยเซลล์นิวโทรฟิล เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระ superoxide ขึ้นภายในเซลล์ (40) จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดจากข้าเลือดแต่ละส่วนสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ superoxide ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับ indomethacine ซึ่งเป็นยาต้านการอักเสบในกลุ่ม NSAIDs ชนิดหนึ่ง โดยสารสกัดจากส่วนของใบ ยอดอ่อน และดอก ที่ความเข้มข้น 25 µg/ml สามารถยับยั้งการเกิดอนุมูล superoxide ได้ดีโดยมีค่า %inhibition ไม่แตกต่างจาก indomethacine อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่สารสกัดจากส่วนของลำต้นสามารถยับยั้งได้ต่ำกว่า indomethacine ทุกความเข้มข้น โดย indomethacine นั้นสามารถยับยั้งได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 100 µg/ml ซึ่งผลในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ superoxide จากเซลล์นิวโทรฟิลของยาในกลุ่ม NSAIDs อาศัยกลไกในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ NADPH oxidase (41) ส่วนผลของสารสกัดจากข้าเลือดอาจมีผลต่อเอนไซม์ NADPH oxidase เช่นกันแต่กลไกที่แท้จริง

ของสารสกัดนั้นยังไม่ชัดเจน แต่อย่างไรก็ตาม กระบวนการสกัดนั้นเป็นกระบวนการที่มีความซับซ้อนมากและการศึกษาฤทธิ์ในการต้านการอักเสบมีหลายวิธี ดังนั้น การแปลความหมายนั้นขึ้นอยู่กับหลักการของแต่ละวิธีการที่ใช้ในการทดสอบ

จากการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่า สารสกัดจากชำเลียดส่วนต่างๆ ได้แก่ ยอดอ่อน ใบ ลำต้น และดอก ที่สกัดด้วย 70% ethanol มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ โดยมีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ ABTS และรีดิวซ์สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กได้ สารสกัดจากชำเลียดแต่ละส่วนนั้นมีปริมาณสารฟีนอลิกสูงโดยเฉพาะสารสกัดจากส่วนของใบ และพบว่าสารสกัดในส่วนของใบและยอดอ่อน มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงกว่าในส่วนของลำต้นและดอก อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันกับน้ำหนักสด 1 กรัมแล้ว ส่วนของใบ จะให้ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงสุด รองลงมาคือยอดอ่อน และดอก ตามลำดับ และจากการตรวจสอบองค์ประกอบของสารสกัดพบว่า มีสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด ได้แก่ quercetin, tannic acid, catechin, myricetin และ gallic acid นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านกระบวนการลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน และฤทธิ์ต้านการอักเสบ ซึ่งจากผลการศึกษาดังกล่าวสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาที่ลึกซึ้งต่อไป เช่น การทดสอบแบบ in vivo นอกจากนี้ยังสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในรูปของอาหารหรือผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพต่อไป

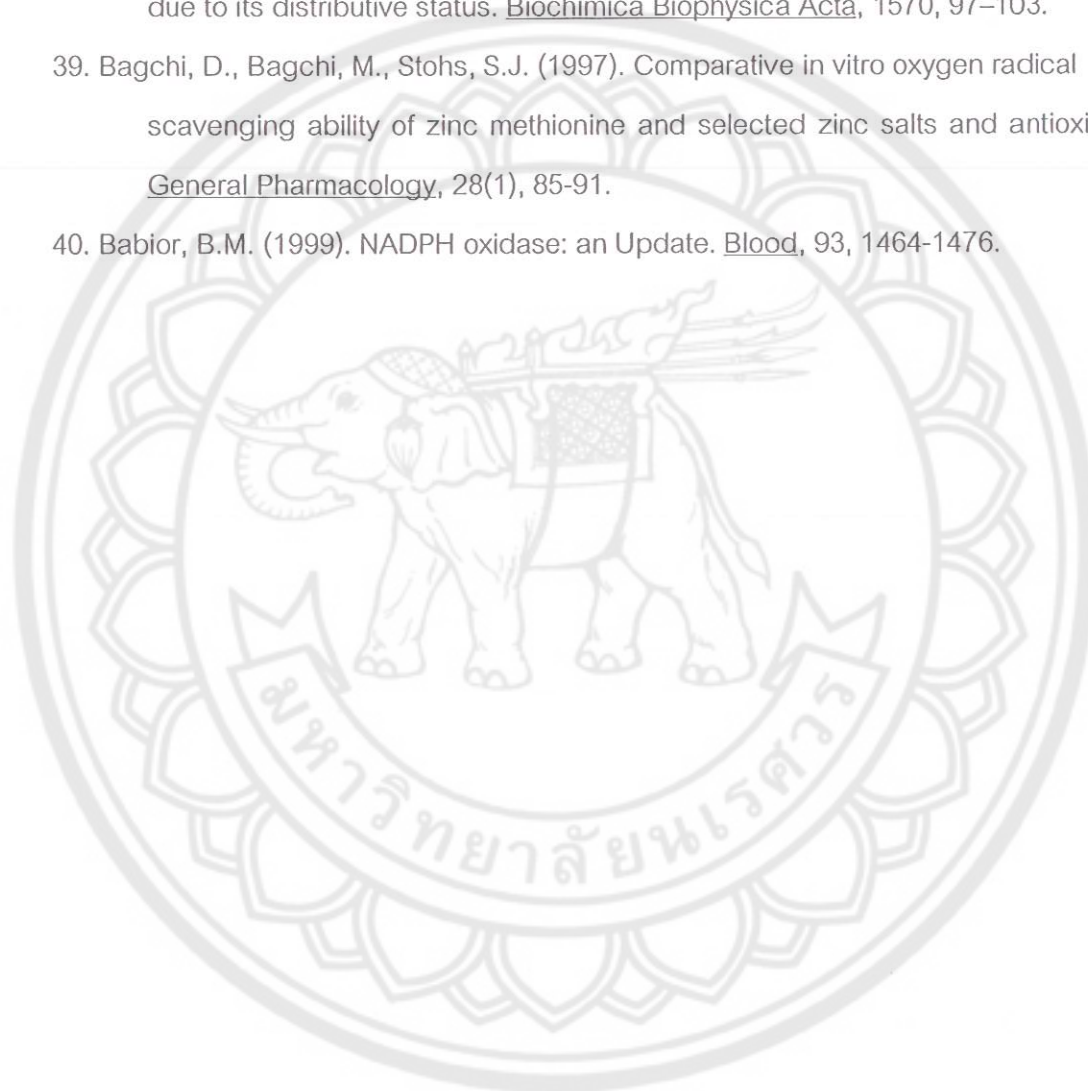
บรรณานุกรม

1. Davies, K.J. (1993). Oxidative stress: the paradox of aerobic life. Biochem Soc Symp, 6, 1– 31.
2. Nohl, H., Gille, L., Staniek, K. (2005). Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria. Biochem Pharmacol, 69, 719–23.
3. Szocs, K.(2004). Endothelial dysfunction and reactive oxygen species production on ischemia/reperfusion and nitrate tolerance. Gen Physiol Biophys, 23, 265– 95.
4. Ichihashi, M. et al. (2003). UV-induced skin damage. Toxicology, 189, 21–39.
5. Halliwell, B, Gutteridge, JMC. (1999). Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford: Clarendon Press, chapter 4.
6. Valko, M. et al. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer Incidence. Mol Cell Biochem, 266, 37– 56.
7. Janya Sang-arun. (1999). Total antioxidant capacity of some Thai indigenous vegetables found in Phitsanulok. M.S. Thesis, Naresuan University, Phitsanulok.
8. บุหรีน พันธุ์สุวรรณค์. (2545). การศึกษาฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระในผักข้าเลือด. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก.
9. กฤษณ์ บุญอริยเทพ. (2545). ฤทธิ์และสมบัติทางชีวเคมีของสารต่อต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากมะม่วงเขียวเสวย. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก.
10. Bazzano, L.A., Ogden, J. He, L.G. (2001). Legume consumption and risk of coronary heart disease in US men and women: NHANES I epidemiologic follow-up study. Arch. Int. Med., 161, 2573–2578.
11. Nakachi, K., Imai, K., Suga, K. (1996). Epidemiological evidence for prevention of cancer and cardiovascular disease by drinking green tea, in: H. Ohigashi, T. Osawa, J.Watanabe, T.Yoshikawa (Eds.), Food Factors for Cancer Prevention, Springer, Tokyo, pp. 105–108.
12. Anila, L. & Vijayalakshmi, N.R. (2002). Flavonoids from *Emblica officinalis* and *Mangifera indica*-effectiveness for dyslipidema. Journal of Ethnopharmacology, 79, 81-87.

13. Garrido, G. et al. (2004). In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. extract (Vimang[®]). *Pharmacological Research*, 50, 143-149.
14. Scartezzini, P. and Speroni, E. (2000). Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 71, 23-43.
15. Pal, B.C. et al. (1994). Saponins from *Barringtonia acutangula*. *Phytochemistry*, 35 (5), 1315-1318.
16. Re, R. et al. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 26(9/10), 1231-1237.
17. Benzie, I. F. F.; Strain, J. J. (1996). The Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.*, 239, 70-76.
18. Szöllösi, R., Varga-Szöllösi, I., (2002). Total antioxidant power in some species of Labiatae (Adaptation of FRAP method). *Acta Biologica Szegediensis*, 46 (3-4), 125-127.
19. Singleton, V.L., Rossi, J.A., (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
20. Joseph Sherma, Bernard Fried. (1996). *Handbook of Thin-Layer Chromatography* (2nd ed.). New York. p. 307-752.
21. Cuendet, M., Hostttmann, K., Potterat, O. (1997). Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helv. Chim. Acta.*, 80, 1144-1152.
22. Calis, I. et al. (1999). Phenylvaleric acid and flavonoid glycosides from *Polygonum salicifolium*. *J. Nat. Prod.*, 62(8), 1101-1105.
23. Chanwitheesuk, A. et al. (2007). Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk.. *Food chemistry*, 100, 1044-1048.
24. Yagi, K. (1984). Assay for blood plasma or serum. *Methods in Enzymology*, 105, 328-331.

25. Buerke et al. (2002). Staphylococcus aureus alpha toxin mediates polymorphonuclear leukocyte-induced vasoconstriction and endothelial dysfunction. *Shock*, 17, 30-35.
26. Tan, S. and Berridge, V.M. (2000). Superoxide produced by activated neutrophils efficiently reduced the tetrazolium salt, WST-1 to produce a soluble formazan: a simple colorimetric assay for measuring respiratory burst activation and for screening anti-inflammatory agents. *J. Immun. Meth.*, 238, 50-68.
27. สุชาติดา โฉจนาหนนท์ (2548). ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและสารประกอบโพลีฟีนอลของชำเลียด (Caesalpinia mimosoides Lamk.) มะม่วงพันธุ์เขียวเสวย (Mangifera indica Linn.) และกระโดนน้ำ (Barringtonia acutangula (L.) Gaertn.) วิทยานิพนธ์ จท.ม., มหาวิทยาลัยนเรศวร.
28. Oszmianski J. et al. (2007). Antioxidant tannins from Rosaceae plant roots. *Food chemistry*, 100, 579-583.
29. Soobrattee M.A. et al. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research*, 579, 200-213.
30. โสภา วัชรคุปต์. (2549) สารต้านอนุมูลอิสระ (Radical scavenging agents). กรุงเทพฯ: พี.เอส.พีรินท์.
31. Harborne J. B., Williams C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55, 481-504.
32. Middleton E. Jr., Kandaswami C., Theoharides T.C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer, *Pharmacol. Rev.*, 52, 673-839.
33. Rodriguez Vaquero, M.J. et al. (2007). Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food control*, 18, 93-101.
35. Hamidi, H., Tajerzadeh, H. (2003). Carrier erythrocytes: an overview. *Drug Delivery*, 10, 9-20.
36. Ko, F.N., Hsiao, G., Kuo, Y.H. (1997). Protection of oxidative hemolysis by demethyldiisoeugenol in normal and beta-thalassemic red blood cells. *Free Radical Biology and Medicine* 22, 215-222.

37. Schmidtman, S., Muller, M., Von Baehr R., and Precht K. (1991). Changes of antioxidative homeostasis in patients on chronic haemodialysis. Nephrol, Dial, Transplant, 6(Suppl. 3), 71-74.
38. Liu, Z., Han, K., Lin, Y., Luo, X. (2002). Antioxidative or prooxidative effect of 4-hydroxyquinoline derivatives on free-radical-initiated hemolysis of erythrocytes is due to its distributive status. Biochimica Biophysica Acta, 1570, 97-103.
39. Bagchi, D., Bagchi, M., Stohs, S.J. (1997). Comparative in vitro oxygen radical scavenging ability of zinc methionine and selected zinc salts and antioxidants. General Pharmacology, 28(1), 85-91.
40. Babior, B.M. (1999). NADPH oxidase: an Update. Blood, 93, 1464-1476.



ภาคผนวก

1. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

สารละลาย Trolox เตรียมโดยละลาย Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl chroman-2-carboxylic acid) ใน 70% ethanol ให้ได้ความเข้มข้น 2.5 mM แล้วเจือจางด้วย 70% ethanol ให้ได้ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 mM ตามต้องการ

2. การคำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity; TEAC)

Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) หมายถึงการต้านออกซิเดชันของสารสกัด 1 mg เทียบกับสารมาตรฐาน Trolox มีหน่วยเป็น μmole Trolox ต่อ 1 mg สารสกัด

2.1 จากการคำนวณ

2.1.1 หาค่า % Inhibition ของ Trolox และ สารสกัด

$$\% \text{ Inhibition ของ Trolox} = \frac{(A_{\text{Blank}} - A_{\text{Trolox}})}{A_{\text{Blank}}} \times 100$$

$$\% \text{ Inhibition ของสารสกัด} = \frac{(A_{\text{Blank}} - A_{\text{สารสกัด}})}{A_{\text{สารสกัด}}} \times 100$$

2.1.2 หาคความเข้มข้นของสารสกัดเปรียบเทียบกับ Trolox

จากกราฟมาตรฐานของ Trolox ได้สมการเส้นตรง คือ

$$y = 39.1x + 1.0$$

เมื่อ y เท่ากับ % Inhibition ของ Trolox และ x เท่ากับความเข้มข้นของ Trolox

หาคความเข้มข้นของสารสกัด (เทียบกับ Trolox) โดยแทนค่า % Inhibition ของสารสกัดลงในสมการสมมติ % Inhibition ของสารสกัดเท่ากับ 66.25 % จะได้ความเข้มข้นของสารสกัดเป็น 1.67 mM ของ Trolox

2.1.3 หาน้ำหนักของสารสกัดที่ใช้ในการทดลอง

$$\text{สมมติน้ำหนักของสารสกัดปริมาตร 1,000 } \mu\text{l} = 1.01 \text{ mg}$$

$$\text{เมื่อเจือจาง 6 เท่า สารสกัดที่เจือจางมีน้ำหนัก} = 1.01/6$$

$$= 0.168 \text{ mg}$$

$$\begin{aligned} \text{ดังนั้น สารสกัดที่ใช้ในการทดลองปริมาตร 25.0 \mu\text{l} \text{ มีน้ำหนัก}} &= \frac{0.168 \times 25.0 \text{ mg}}{1,000} \\ &= 4.20 \times 10^{-3} \text{ mg} \end{aligned}$$

2.1.4 หาค่าน้ำหนักสารสกัด เทียบกับน้ำหนักของ Trolox

จาก 2.1.2 และ 2.1.3 สารสกัด $4.20 \times 10^{-3} \text{ mg}$ เทียบได้กับความเข้มข้นของ Trolox = 1.67 mM

$$\begin{aligned} \text{ดังนั้น สารสกัด 1.0 mg เทียบได้กับความเข้มข้นของ Trolox} &= \frac{1.67 \text{ mM} \times 1.0 \text{ mg}}{4.20 \times 10^{-3} \text{ mg}} \\ &= 397.62 \text{ mM} \end{aligned}$$

เมื่อ Trolox ที่ใช้ในการทดลองปริมาตร 25.0 μl ($25.0 \times 10^{-3} \text{ ml}$)

$$\begin{aligned} \text{จะได้ความเข้มข้นของสารสกัดเทียบกับความเข้มข้นของ Trolox} &= \frac{397.62 \text{ mmole} \times 25.0 \times 10^{-3} \text{ ml}}{1,000 \text{ ml}} \\ &= 9940.50 \times 10^{-6} \text{ mmole} \\ &= 9.940 \text{ \mu mole} \end{aligned}$$

ดังนั้น สารสกัดตัวอย่างมีค่าต้านอนุมูลอิสระ (TEAC) เป็น 9.940 μmole Trolox / 1 mg สารสกัด

2.2 จากสูตร

$$\text{TEAC} = \frac{\% \text{Inhibition} - c}{m} \times \frac{D}{W}$$

เมื่อ c และ m คือค่าที่ได้จากสมการกราฟมาตรฐาน Trolox; $y = mx + c$

D หมายถึง จำนวนเท่าของการเจือจาง

W หมายถึง น้ำหนักสารสกัดมีหน่วยเป็น มิลลิกรัม