การตรวจวัดการยับยั้งการเกิดคาร์บอกซีเมทิลไลซีนโดยการใช้สารสกัดสมุนไพรไทย

Carboxymethyl lysine Inhibition formation determination using thai medicinal plants

เครือวัลย์ คณิตไธสง

จักริน สองเมือง

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะวิทยาศาสตร์ สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2565

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Carboxymethyl lysine Inhibition formation determination using thai medicinal plants

Kruawan Khanitthaisong

Jakkarin Songmuang

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT

FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOLOGY, SCHOOL OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHOLOGY LADKRBANGACADEMIC

YEAR 2022

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การตรวจวัดการยับยั้งการเกิดคาร์บอกซีเมทิลไลซีนจากสารสกัดสมุนไพรไทย Carboxymethyl lysine Inhibition formation determination using Thai medicinal plants.

นักศึกษาผู้จัดทำ นางสาวเครือวัลย์ คณิตไธสง **รหัสนักศึกษา** 62050573

นายจักริน สองเมือง **รหัสนักศึกษา** 62050575

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

ปีการศึกษา 2565

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2565

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.วิภาวี เดชติศักดิ์ ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.ธิปชัย เดชติศักดิ์ กรรมการ	
รศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การตรวจวัดสารยับยั้งการเกิดคาร์บอกซีเมทิลไลซีนจากสารสกัดสมุนไพรไทย
Carboxymethyl lysine Inhibition formation determination using Thai medicinal plants.

นักศึกษาผู้จัดทำ นางสาวเครือวัลย์ คณิตไธสง **รหัสนักศึกษา** 62050573
นายจักริน สองเมือง **รหัสนักศึกษา** 62050575

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา 2565
อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์

บทคัดย่อ

ในปัจจุบัน ผู้สูงอายุส่วนใหญ่มีโรคเกี่ยวกับการเสื่อมสภาพของร่างกายเช่น โรคเบาหวาน โรคมะเร็งมีจำนวนมากขึ้น ทำให้อัตราการเสียชีวิตเพิ่มขึ้นมีสาเหตุมาจากการบริโภคอาหารที่มีโปรตีนและไขมันมากขึ้น ทำให้ร่างกายมีการเกิดปฏิกิริยาไกลเคชันมากขึ้นเนื่องจากเมื่อระดับน้ำตาลในเลือดสูงขึ้นจะมีการเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาไกลเคชันระหว่างน้ำตาลรีดิวซ์และโมเลกุลของโปรตีนทำให้ผลผลิตสุดท้ายได้เป็น advanced glycation end products (AGEs) ซึ่ง AGEs เป็นสาเหตุที่ทำให้เซลล์ต่างๆเสื่อมสภาพและทำให้อวัยวะต่างๆมีประสิทธิภาพการทำงานที่แย่ลง หนึ่งในการป้องกันไม่ให้เกิดโรคเหล่านี้ได้คือการใช้สารฟีนอลิก ที่สามารถพบได้ในพืชในการต้านสารอนุมูลอิสระ ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้จึงได้ทำการคัดเลือกสมุนไพรที่คาดว่ามีการยับยั้งการสร้าง CML มา 10 ชนิด ซึ่งสกัดในตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นที่ต่างกัน และนำสารสกัดที่ได้ไปทำกระบวนการ ELISA จากผลการทดลองพบว่าหญ้าหนวดแมวที่แช่ในเอทานอล 40%ที่นำ ไปทำการศึกษาต่อด้วยการแยกสารให้บริสุทธิ์โดยวิธี stepwise eiution chromatography พบว่า fraction ที่เอทานอล 25% ให้ผลการยับยั้งการเกิด CML ได้ดีที่สุดโดยพบการเกิด CML เพียง 12.19% .ในส่วนของการศึกษาการออกฤทธิ์ต้านจุลชีพพบว่า หญ้าหนวดแมวสามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis* แต่ไม่พบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Escherichia coli*

คำสำคัญ: ไกลเคชัน, หญ้าหนวดแมว, ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์, อนุมูลอิสระ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Carboxymethyl lysine Inhibition formation determination using Thai medicinal plants.	
Students	Miss Kruawan Khanitthaisong	**Student ID** 62050573
	Mr. Jakkarin Songmuang	**Student ID** 62050575
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)	
Department	Biology	
Faculty	Science	
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)	
Academic Year	2022	
Advisor	Assoc. Prof.Dr. Cherdsak Maneeruttanarungroj	

Abstract

At present, the elderly population predominantly suffers from diseases related to physical deterioration such as diabetes and cancer, leading to an increased mortality rate. This is largely attributed to the consumption of high-protein and high-fat diets, which results in an elevated occurrence of advanced glycation end products (AGEs). When blood sugar levels rise, a glycation reaction occurs between reducing sugars and protein molecules, leading to the formation of AGEs. AGEs contribute to cellular and organ dysfunction, deteriorating their overall functionality. One preventive measure against these diseases is the use of phenolic compounds found in plants, known for their antioxidant properties. This thesis aims to select 10 types of herbs predicted to inhibit the formation of CML (carboxymethyl lysine). These herbs were extracted with varying concentrations of ethanol, and the obtained extracts were subjected to ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) analysis. The results indicated that the extract of the cat's whiskers herb soaked in 40% ethanol showed the highest inhibition of CML formation at 12.19%. Furthermore, in the study of antimicrobial activity, cat's whiskers herb demonstrated inhibitory effects on *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* growth, but no significant inhibition was observed on *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli.*

Keywords: advanced glycation end products, Cat's whiskers, antimicrobial, antioxidants

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความอนุเคราะห์จากบุคลากรหลายท่าน ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังที่กรุณาเป็นอย่างยิ่งในการให้คำปรึกษา แนะนำระหว่างการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้ รวมทั้งการสนับสนุนในด้านต่างๆ ตลอดจนตรวจทานแก้ไขปริญญานิพนธ์ให้มีความถูกต้องสมบูรณ์และความช่วยเหลือทางด้านเครื่องมือโดยบุคลากรหลายๆฝ่าย ในการชี้แนะและสนับสนุนการใช้เครื่องมือ และอุปกรณ์ทดลองต่างๆในการทำงานวิจัยครั้งนี้ผู้ทำการขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.วิภาวี เดชติศักดิ์ ประธานกรรมการ และผศ.ดร. ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ กรรมการ อาจารย์ประจำภาควิชาและขอขอบพระคุณ Prof.Dr.Ryoji Nagai จาก Graduate School of Agriculture, Tokai University (Kumamoto campus) ประเทศญี่ปุ่นที่ได้เอื้อเฟื้อ anti-CML antibody สำหรับการติดตาม การวัดการยับยั้งการเกิด CML ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณนักวิทยาศาสตร์และรุ่นพี่มหาบัณฑิตประจำภาควิชาชีววิทยาคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ช่วยเหลือทางด้านอุปกรณ์และเทคนิคการใช้เครื่องมือต่างๆ ตลอดจนการใช้ห้องปฏิบัติการ

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณพระคุณบิดา มารดา และเพื่อนๆที่ให้การสนับสนุนในในทุกๆด้าน ทั้งกำลังกายและกำลังใจตลอดมากระทั่ง คณะผู้จัดทำงานวิจัยประสบผลสำเร็จในการทำปริญญานิพนธ์ครั้งนี้ไปได้ด้วยดี

คณะผู้จัดทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ ..... ก

กิตติกรรมประกาศ ..... ค

สารบัญ ..... ง

สารบัญรูปภาพ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ซ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงาน 2

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

2.1 กระบวนการไกลเคชัน 3

2.2 ประเภทของ AGEs 4

2.2.1 Fluorescence AGEs crosslinks 4

2.2.2 Nonfluorescen AGEs crosslink 4

2.2.3 Noncrosslinking AGEs 4

2.3 AGEs และอนุมูลอิสระ 5

2.4 Receptor of AGEs (RAGE) 5

2.5 เมตาบอลิซึมของ AGEs 5

2.6 ผลของปฏิกิริยาไกลเคชันต่อสุขภาพ 6

2.7 อนุมูลอิสระ 6

2.8การตรวจวัด AGEs ด้วย ELISA 7

2.8.1 ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) 7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9 คอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column Chromatography) 8
2.9.1 เทคนิคในการทำคิลัมน์โครมาโตรการฟี **.....8**
2.9.1.1 เตรียมคอลัมน์ 9
2.9.1.2 ใส่สารตัวอย่าง 10
2.9.1.3 ทำการอีลูท 11
2.9.1.4 เก็บสารตัวอย่างที่ออกจากคอลัมน์ 11
2.9.1.5 การวัดปริมาณสารตัวอย่างที่ถูกอีลูทออกจากคอลัมน์ (Detection) 11
2.9.2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) **.....12**
2.10 องค์ประกอบที่สำคัญของชุดตรวจ ELISA 12
2.10.1แอนติบอดี 12
2.10.2 แอนติเจน (antigen) 13
2.10.3 เอนไซม์และระบบการตรวจวัดปฏิกิริยา (Detection system) 13
2.10.4 ซับสเตรต (Substrate) 14
2.10.5 พื้นที่ผิวสำหรับการยึดตรึง (solid support) 14
2.11 สารต้านอนุมูลอิสระ 14
2.12. แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระ 15
2.12.1 สารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ 15
2.12.1.1 Trolox 15
2.12.1.2 กรดแกลลิก 15
2.12.1.3 EDTA 15
2.12.1.4 วิตามินซี (vitamin C) 15
2.12.1.5 วิตามินอี (Vitamin E) 16
2.12.2 พฤกษเคมี (phytochemicls) 16
2.12.2.1 สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic Compounds) 16
2.12.2.2 สารประกอบฟลาโวนอยด์ 17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.13 วิธีการทดสอบความว่องไวของเชื้อจุลินทรีย์ 18
2.13.1 Dilution Suscepptibility Test หรือการทดสอบ MIC 18
2.13.2 Agar diffusion Test 18
2.14 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Literature review) 19
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 22
3.1 เครื่องมือ 22
3.2 อุปกรณ์ 22
3.3 สารเคมี 23
3.4 ขั้นตอนการดำเนินงาน 24
3.4.1 การเตรียมการสกัดสมุนไพร 24
3.4.2 ขั้นตอนการเตรียมปฏิกิริยา reaction 24
3.4.3 ปฏิกิริยา (Triplicate) ในหลอดปลอดเชื้อ 1.5 มล. 25
3.4.4 การตรวจจับ AGEs ด้วยวิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay 25
3.4.5 การแยกสารสกัดโดยวิธีการ Column chromatography 26
บทที่ 4 ผลการทดลอง 28
4.1 การศึกษาผลการยับยั้งการเกิด CML ของสมุนไพรไทย 10 ชนิด 28
4.2 การศึกษาสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเกิด CML ที่มีอยู่ในหญ้าหนวดแมว 29
4.3 การทำกระบวนการ HPLC เพื่อตรวจสอบประเภทของ 31
สารในสารสกัดจากหญ้าหนวดแมว
4.4 การศึกษาการออกฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากหญ้าหนวดแมว 32
บทที่5สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 35
5.1 สรุปผลการวิจัย 35
5.2 ข้อเสนอแนะ 35
เอกสารอ้างอิง 36
ภาคผนวก 38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 2.1 กระบวนการเกิดไกเคชันภายในร่างกาย 3
รูปที่ 2.2 การตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนด้วยวิธี Indirect ELISA 7
รูปที่ 2.3 การวิเคราะห์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี 9
รูปที่ 2.4 แผนภาพเครื่องมือ HPLC 12
รูปที่ 2.5 โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกโดยทั่วไป 17
รูปที่ 4.1 แสดงผลการยับยั้งการเกิด CML ของสมุนไพรที่ทำการศึกษาทั้ง 10 ชนิด 28
รูปที่ 4.2 แสดงผลการยับยั้งการเกิด CML ของ น้ำกลั่น 30
รูปที่ 4.3 แสดงกราฟที่วัดได้จากเครื่อง HPLC โดยตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร 31
รูปที่ ก1 แสดงการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของ Staphylococcus aureus 39
รูปที่ ก.2 แสดงการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของ Pseudomonas aeruginosa 39
รูปที่ ก.3 แสดงการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของ Bacillus subtilis 40
รูปที่ ก.4 แสดงการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของ Escherichia coli 40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่2.1 ตัวดูดซับที่ใช้เป็นเฟสอยู่กับที่ในการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี เรียงตามโพลาริตี..... 10

ตารางที่2.2 สารต่างๆที่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีโดยเรียงตามลำดับโพลาริตี..... 10

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การเกิด CML ของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 10 ชนิด 41

ตารางที่ 4.4 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การเกิด CML ของน้ำกลั่นที่วันที่ 0 วันที่ 7 และ Aminoguanidine ในเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 41

ตารางที่ 4.5 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การเกิด CML ของสารสกัดจากหญ้าหนวดแมวในแต่ละ fraction ที่แยกได้จาก stepwise elution chomatography 42

ตารางที่ 4.6 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การเกิด CML ของน้ำกลั่นที่วันที่ 0 วันที่ 7 และ Aminoguadinine ในเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 42

ตารางที่ 4.5 แสดงขนาดของวงใสของการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในหน่วย มิลลิเมตร (mm) 24

ตารางที่ 4.6 แสดงขนาดของวงใสของการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ในหน่วย มิลลิเมตร (mm)..... 24

ตารางที่ 4.7 แสดงขนาดของวงใสของการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ในหน่วย มิลลิเมต (mm)..... 25

ตารางที่ 4.8 แสดงขนาดของวงใสของการยับยั้งการเจริญของเชื้อ Escherichia coli ในหน่วย มิลลิเมต (mm)..... 25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในสังคมปัจจุบัน ประชากรผู้สูงอายุที่มีโรคเกี่ยวกับอายุ เช่น โรคเบาหวาน โรคมะเร็ง มีจำนวนมากขึ้นทำให้อัตราการเสียชีวิตจากโรคเหล่านี้เพิ่มขึ้นด้วย โดยโรคที่เกี่ยวข้องกับอายุเหล่านี้มีสาเหตุมาจากการเกิดปฏิกิริยาไกลเคชันภายในร่างกาย การบริโภคอาหารของผู้คนปัจจุบันมีการบริโภคโปรตีนและไขมันที่มากขึ้น ทำให้ร่างกายมีการเกิดปฏิกิริยาไกลเคชันที่มากขึ้น โดยปฏิกิริยาไกลเคชันเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเนื่องจากเมื่อระดับน้ำตาลในเลือดสูงขึ้นจะมีการเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาไกลเคชันระหว่างน้ำตาลรีดิวซ์และโมเลกุลของโปรตีนทำให้ผลผลิตสุดท้ายได้เป็น advanced glycation end products (AGEs) ซึ่ง AGEs เป็นสาเหตุที่ทำให้เซลล์ต่างๆเสื่อมสภาพและทำให้อวัยวะต่าง ๆ มีประสิทธิภาพการทำงานที่แย่ลงและนำไปสู่การเสียชีวิตได้ หนึ่งในการป้องกันไม่ให้เกิดโรคเหล่านี้ได้คือการใช้สารฟีนอลิกที่สามารถพบได้ในพืชในการต้านสารอนุมูลอิสระ โดยมีงานวิจัยพบว่าสารฟีนอลิกที่สามารถสกัดได้จากสมุนไพรลูกใต้ใบ (วันประเสริฐ , 2561) สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดี และยังพบว่ามีงานวิจัยที่ศึกษาการยับยั้งการสร้าง AGEs โดยใช้สารสกัดจากมะม่วงหิมพานต์ (ธนากรณ์ , 2561)

CML หรือ carboxymethyl lysine หนึ่งในผลิตภัณฑ์ขั้นปลายของกระบวนการไกลเคชันขั้นสูง (AGE) ซึ่งCML ยังเป็นเครื่องหมายที่ถูกใช้มากที่สุดของ AGEs ในการวิเคราะห์อาหาร โดยมีการรายงานว่า microbiota ที่อยู่ในลำไส้สามารถต่อต้านการทำงานของโครงสร้างที่มีหน้าที่ป้องกันในลำไส้ได้เมื่อมีอายุมากขึ้น ทำให้ AGEs สามารถรั่วซึมเข้าสู่กระแสเลือดและทำการทำงานของเซลล์ microglial ในสมองเกิดความบกพร่องจึงสามารถบอกได้ว่าปริมาณของ CML ในเลือดสัมพันธ์กับอายุ

โดยในการศึกษานี้ได้ทำการคัดเลือกสมุนไพรที่คาดว่ามีการยับยั้งการสร้าง CML มา 10 ชนิด สกัดในตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้น 0 40 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เพื่อนำมาสกัดให้ได้สารสกัด และนำสารสกัดที่ได้ไปทำกระบวนการ ELISA มีสมุนไพรชนิดใดบ้างที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้าง CML เปรียบเทียบการยับยั้งการสร้าง CML ของการสกัดในแต่ละความเข้มข้นของเอทานอล และสมุนไพรชนิดใดที่สกัดในเอทานอลความเข้มข้นเท่าใด มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้าง CML สูงที่สุด

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงาน

1. เพื่อวัดการยับยั้งการสร้าง CML โดยใช้สารสกัดสมุนไพรทั้ง 10 ชนิด โดยทำการคัดเลือกสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้าง CML
2. เพื่อวิเคราะห์โปรไฟล์ของสารประกอบฟีนอลโดยวิธี HPLC สำหรับความเป็นไปได้ในการแยกสารสกัดสมุนไพรไทย

3.เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดสมุนไพรไทย

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ศึกษาความสามารถในการยับยั้งการสร้าง CML ของสมุนไพร ทำการศึกษาโดยเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการสร้าง CML ของสมุนไพรทั้ง 10 ชนิด โดยใช้เอทานอลที่มีความเข้มข้น 0 40 และ 80 เปอร์เซ็นต์เพื่อศึกษาพารามิเตอร์ที่คาดว่าจะมีผลต่อความสามารถในการสกัดสารสกัดที่สามารถยับยั้ง CML

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงความสามารถในการยับยั้ง CML ของสมุนไพรทั้ง 10 ชนิด
2. ทราบถึงประสิทธิภาพของเอทานอลในการสกัดสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นของเอทานอลที่ต่างกัน
3. เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาการศึกษาการยับยั้ง CML ของสมุนไพรไทย

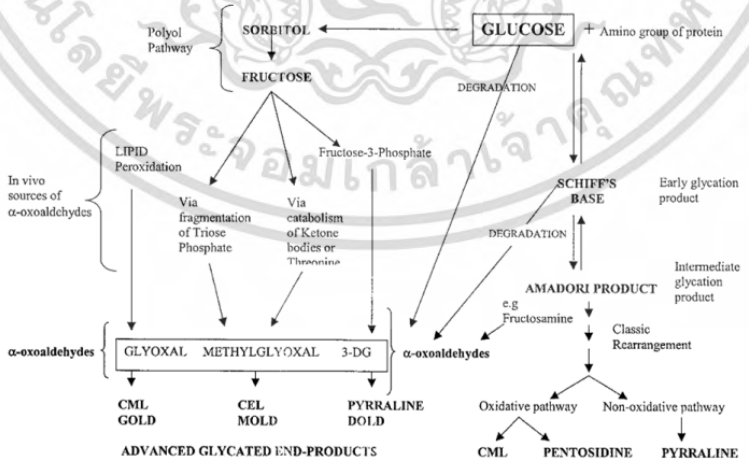
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กระบวนการไกลเคชัน

กระบวนการไกลเคชันหรือไกลโคซีเลชัน เป็นปฏิกิริยาชีวเคมีที่ไม่ใช้เอนไซม์ที่เกิดจากการยึดติดทางเคมีของโมเลกุลน้ำตาลรีดิวส์ เช่น กลูโคสและฟรุคโตส อะตอมของรีดิวส์เชิงคาร์บอน (C) ในตำแหน่งที่1 ในน้ำตาลจะจับกับ อะตอมไนโตรเจน(N) ของหมู่เปปไทด์ของโปรตีนเป็นปฏิกิริยาระหว่างหมู่คาร์บอนิลในโครงสร้างของน้ำตาลรีดิวส์ และหมู่อะมิโนของในโครงสร้างโปรตีน ซึ่งมักเกิดกับหมู่อะมิโนไลซีนและหมู่กวานิดีน ของอาร์จินีนจึงเรียกปฏิกิริยาไกลเคชันหรืออีกชื่อหนึ่งว่าเมลลาร์ด (Maillard reaction) หรือปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล (Broening reaction)

ไกลเคชัน ทำให้เกิดการเปลี่ยนทางโครงสร้างโดยการเชื่อมข้ามสายโมเลกุล เป็น schiff base โดยโครงสร้างของ schiff base มีลักษณะของการรวมกันระหว่างน้ำตาลและหมู่อะมิโนของโปรตีนซึ่งสารตัวนี้สามารถเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วในระยะเวลาสั้นๆ แต่มีความไม่เสถียรสูง โครงสร้างของหมู่อะมิโนสามารถผันกลับมาเป็นอย่างเดิมได้หากระดับน้ำตาลลดลง หากปฏิกิริยายังคงดำเนินต่อไป Schiff base จะมีการจัดเรียงโครงสร้างใหม่ กลายเป็นสารที่ชื่อว่า amdori product ซึ่งมีความคงตัวมากขึ้นแต่ยังไม่เสถียร (สุทธจิตต์, 2016) โดยมีวิธีการสร้างดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 กระบวนการเกิดไกเคชันภายในร่างกาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Amadori product อาจเกิดปฏิกิริยาต่อไป โดยการจับกับหมู่อะมิโนอื่นๆโดยโปรตีนที่ถูก amadori product ที่เกาะว่า glycated protein ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาต่อไปได้ 2 รูปแบบ ในแบบแรกคือการเชื่อมต่อกับหมู่กดอะมิโนละมีการจัดเรียงตัวใหม่เป็น AGEs ในแบบที่สอง คือ การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน มีอนุมูลอิสระและโลหะหนัก เช่น ธาตุเหล็กหรือทองแดง เข้าร่วมการทำปฏิกิริยา ทำให้เกิดสารที่มีการจัดเรียงโครงสร้างใหม่ คือสารประกอบคาร์บอนิล ซึ่งเป็นสาร reactive intermediates หรือ AGEs precursor ซึ่งสารตัวนี้สามารถทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนอื่นๆแล้วก่อให้เกิด ผลิตภัณฑ์ตัวใหม่ คือ AGEs ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความเสถียร ไม่สามารถคืนสู่สภาพเดิมได้ โดยที่ AGEs สามารถเกิด crosslink กับโปรตีนตัวอื่นๆ หรืออาจจะกับหมู่อะมิโนของโปรตีน

2.2 ประเภทของ AGEs

แบ่งตามลักษณะการจับเข้าโปรตีนและคุณสมบัติการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ ได้ 3 ประเภท

2.2.1 Fluorescence AGEs crosslinks

เกิดจากสารประกอบคาร์บอนิลที่สามารถเกิด crosslink หรือเข้าไปเป็นตัวเชื่อมระหว่างหมู่กรดอะมิโนของโปรตีนอื่นๆและมีคุณสมบัติเรืองแสง เช่น peptosidine, crossline, pentodilysine, AGEs-XI, vesperlysine A-B, FPPC และอื่นๆ

2.2.2 Nonfluorescen AGEs crosslink

เกิดจากสารประกอบคาร์บอนิลที่สามารถ crosslink หรือเข้าเป็นตัวเชื่อมกับหมู่อะมิโนของโปรตีนอื่นๆแต่ไม่มีคุณสมบัติในการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ เช่น imidazolium dilysine crosslinks, pyrraline eather crosslinks, arginine-lysine-imidazole crosslinks, amadori dione crosslinks และอื่นๆ

2.2.3 Noncrosslinking AGEs

เกิดจากสารประกอบคาร์บอนิลที่สามารถเข้ารวมกับหมู่อะมิโนของโปรตีนอื่นๆ และทำให้โปรตีนเกิดโครงสร้างใหม่ อาจกล่าวได้ว่า AGEs ชนิดนี้เกิดจากที่โปรตีนเดี่ยวเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง เช่น N^{ε}-(carboxymethyl) lysine, N^{ε}-(I-carboxymethyl

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 AGEs และอนุมูลอิสระ

กระบวนการไกเคชันเกี่ยวข้องกับอนุมูลอิสระ AGEs ทำให้ภายในเซลล์มีการสร้างสารอนุมูลอิสระผ่านทางการจับกับตัวรับของ AGEs หรือ receptor of AGEs(RAGE) แล้วเกิดการสร้างสารประเภท pro-oxidant ภายในเซลล์และหากเกิดมีสารดังกล่าวมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น เอนไซม์ glutathione dismutase สามารถจัดการได้ ก็จะเกิดภาวะ oxidative stress และก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์เนื้อเยื่อ

2.4 Receptor of AGEs (RAGE)

ในระดับเซลล์ AGEs มีตัวรับ AGEs(Receptor of AGEs:RAGE) มีบทบาทหน้าที่ต่อการทำงานภายในเซลล์ โดยที่ RAGE เป็นตัวรับแบบ multiligands จัดอยู่ในกลุ่ม superfamily ของอิมมูโนโกลบูลินจี หรือ IgG พบในบริเวณผิวของเซลล์ทั่วไป รวมทั้งเซลล์ โมโนไซต์ แมคโครเฟจ เซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ RAGE ทำงานโดยการดักจับ AGEs หรือเป็นสื่อในการส่งสัญญาณภายในเซลล์

ตัวรับ AGEs นอกจาก RAGE แล้ว ยังมีตัวรับสำหรับ AGEs ตัวอื่น ได้แก่ macrophages scavenger receptor class A โดยพบว่าในกระบวนการของการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็งตัว ตัวรับนี้จะทำหน้าที่เป็นสื่อกลางในการพา AGEs เข้าไปในเซลล์แมคโครเฟจรวมทั้งกำจัด AGEs ออกจากเซลล์ด้วย (Buccirieli et al. 2002) อีกประการหนึ่งคือ CD36 ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม family scavenger receptor class B ทำหน้าที่เป็นตัวรับที่เกี่ยวข้องกับ AGEs และการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress (Goldin et al. 2006) ในขณะเดียวกัน RAGEทำงานร่วมกับ ligand อื่นๆ นอกเหนือจาก AGEs เช่น beta amyoid หรือ amphoterin หรือ S-100-calcinulins ซึ่งเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับ proinfiammatory cytokine เป็นต้น

2.5 เมตาบอลิซึมของ AGEs

AGEs ในเนื้อเยื่อต่างๆภายในร่างกายจะถูกกำจัดด้วยเซลล์แมคโครเฟจโดยถูกย่อยให้อยู่ในรูปอนุภาคโปรตีนขนาดเล็กที่ละลายน้ำได้ แล้วขับออกทางไต นอกจากนี้พบว่า Kupffer cell และเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดของตับ มีบทบาทสำคัญในการกำจัด AGEs ในพลาสมา โดยเซลล์เหล่านี้จะมีตัวรับคอยดักจับ AGEs เข้ามากำจัดภายในเซลล์ (Smedsrod et al. 1997) ดังนั้นในกรณีที่มีความผิดปกติเกี่ยวกับตับ หรือในกรณีที่ร่างกายมีปริมาณ AGEs มากเกินกว่าที่อวัยวะดังกล่าวจะจัดการได้ไม่หมด ก็อาจส่งผลทำให้เกิดการสะสมของ AGEs ภายในร่างกาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 ผลของปฏิกิริยาไกลเคชันต่อสุขภาพ

การเกิดไกลเคชันของโปรตีนสามารถรบกวนการทำงานของร่างกายได้โดยมีการเหนี่ยวนำการเกิด reactive oxygen species ซึ่งมีผลต่อการยับยั้งการนำน้ำตาลกลูโคสเข้าเซลล์รวมทั้ง glycated abumin ยังทำให้เกิดออกซิเดชันของเซลล์ไขมัน (adipocyte cells) ได้อีกด้วย สำหรับโปรตีน fibrinogen เป็นสารประกอบตัวกลางของ AGEs ที่เรียกว่า methylglyoxal (MOG) เมื่อ MGO จับกับ fibrinogen มีผลทำให้เกิดความเสียหายกับหลอดเลือดและทำให้เกิดการแข็งตัวของหลอดเลือด (atherosclerosis) ในผู้ผ่วยโรคเบาหวาน (ธนวยุทธ์ภัคดี, 2559)

นอกจากนั้น AGEs ทำให้เนื้อเยื่อเกิดความหยาบกระด้างและเกิดการเปลี่ยนแปลงของสีผิวมีผลต่อคอลลาเจน ทำให้หลอดเลือดหนาขึ้น ข้อต่อมีความยืดหยุ่นลงและในการสะสมของ AGEs ที่ผิวหนังมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนโครงสร้างหน้าที่ของเซลล์และนำไปสู่ความผิดปกติ

2.7 อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่มีประจุอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยว อยู่วงนอกสุดของวงโคจรทำให้โมเลกุลเกิดความไม่เสถียร และเป็นสารที่มีความว่องไวในการทำปฏิกิริยากับสารอื่นๆสูง โดยอนุมูลอิสระจะมีการรับอิเล็กตรอนจากสารที่อยู่ใกล้เคียงหรือรอบๆเพื่อทำให้ตัวเองเกิดความเสถียร แต่ในขณะที่สารใกล้เคียงจะสูญเสียอิเล็กตรอนไปทำให้เกิดเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่และจะทำปฏิกิริยาต่อไปเรื่อยๆเป็นลูกโซ่ (Halliwel, 1992) ทั้งนี้ถ้ามีการเกิดปฏิกิริยาเกิดขึ้นภายในสิ่งมีชีวิตมักจะพบจากการใช้ออกซิเจนในการนำไปเผาผลาญพลังงานโดยผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชัน จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างและหน้าที่การทำการของสารชีวโมเลกุลในสิ่งมีชีวิต เช่น โปรตีน ไขมัน DNA เอนไซม์ เป็นต้น จะส่งผลทำให้เกิดอันตายต่อเซลล์และกลายเป็นพยาธิสภาพของระบบอวัยวะ เช่น โรคมะเร็ง โรคอัลไซเมอร์ ต้อกระจก เป็นต้น

จากที่กล่าวมาข้างต้นถึงแม้ว่าร่างกายจะมีการสร้างอนุมูลอิสระจากกระบวนการเผาผลาญต่างๆแล้ว ร่างกายยังมีการสร้างสารที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาเพื่อป้องกันอันตรายจากการเกิดปฏิกิริยาของอนุมูลออิสระ ซึ่งจะประกอบไปด้วยเอนไซม์ต่างๆที่แม้จะมีความเข้มข้นน้อยแต่ก็สามารถช่วยชะลอหรือป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

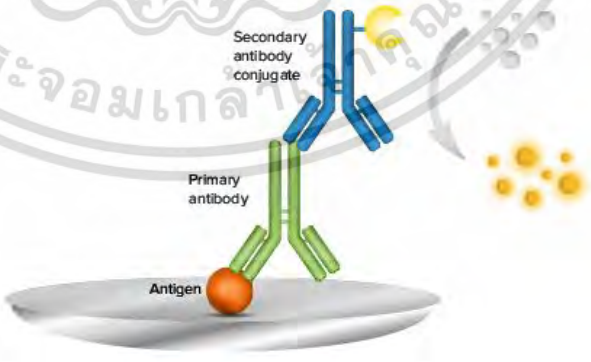
2.8การตรวจวัด AGEs ด้วย ELISA

2.8.1 ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)

เป็นวิธีการตรวจสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนได้อย่างจำเพาะเจาะจงมีความไวสูง ง่ายและรวดเร็ว โดยการทดสอบส่วนใหญ่มักใช้วัสดุ Solid phase เป็นตัวดูดซับกับแอนติเจนหรือแอนติบอดีเมื่อเกิดปฏิกิริยาแล้วจึงล้างส่วนของแอนติเจนและแอนติบอดีในส่วนของที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกจะทำให้เหลือเพียงส่วนที่ทำปฏิกิริยาติดอยู่กับพื้นผิวของวัสดุจากนั้นจึงเติมแอนติบอดีที่จำเพาะที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนซับสเตรตที่ไม่มีสีให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสี โดยเอนไซม์ต่างๆที่ใช้ใน ELISA ได้แก่ alkaline phosphatase, horseradish peroxidase, β-galactosidase ซึ่งสามารถใช้ตรวจสอบทั้งแอนติเจนและแอนติบอดีได้ทั้งแง่คุณภาพและปริมาณ มีวิธีการทดสอบทั้ง 4 แบบคือ direct ELISA , indirect ELISA , Competitive ELISA และ sandwich ELISA ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้ใช้วิธีการ ดังรูปที่2.2

1) Indirect ELISA

ใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนซึ่งเริ่มจากการเคลือบผิววัสดุด้วยแอนติเจนและเติมตัวอย่างลงไป ซึ่งจะทำให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีที่จำเพาะที่เคลือบบนผิว จากนั้นล้างเอาส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกด้วยบัพเฟอร์ และเติมแอนติบอดีที่ติดฉลากเอนไซม์ ซึ่งแอนติบอดีตัวที่สองจะจำเพาะกับแอนดีตัวแรก เมื่อทำการชะล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาด้วยบัพเฟอร์ก่อนที่เติมสเตรทของเอนไซม์จะเกิดการเปลี่ยนสีตามปริมาณแอนติบอดีในตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ



รูปที่ 2.2 การตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนด้วยวิธี Indirect ELISA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9 คอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column Chromatography)

กลไกต่างๆ ที่เกิดขึ้นในการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี สามารถใช้เป็นหลักในการอธิบายทฤษฎีและหลักการของโครมาโตกราฟีทั่วๆไปทุกชนิด สามารถแบ่งได้อีกหลายชนิดขึ้นอยู่กับสารที่ใช้บรรจุในคอลัมน์ที่ทำหน้าที่เป็นเฟสอยู่กับที่

ถ้าสารที่บรรจุคือของแข็งที่ทำหน้าที่ดูดซับจะเรียกวิธีการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี แบบนี้ว่า adsorption chromatography หรือ Liquid Solid Chromatography (LSC) ซึ่งอัตราการเคลื่อนที่ของตัวถูกละลายในคอลัมน์ขึ้นอยู่กับเวลาที่ตัวถูกละลายนั้นถูกดูดซับที่ผิวของแข็งที่ทำหน้าที่เป็นเฟสอยู่กับที่

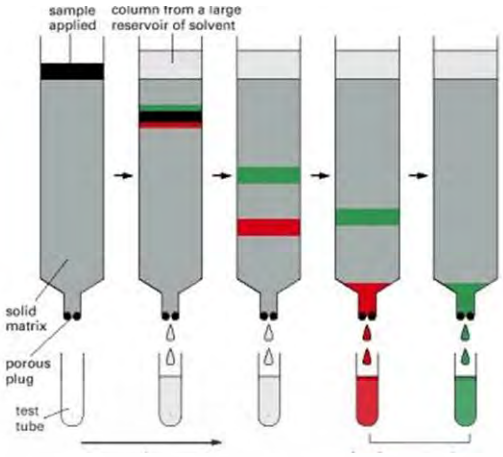
สารที่บรรจุในคอลัมน์คือของแข็งที่ฉาบด้วยของเหลวที่ทำหน้าที่เป็นเฟสอยู่กับที่หรือของเหลวฉาบที่ผิวของคอลัมน์เมื่อใช้คอลัมน์เล็กมากๆ จะเรียกว่า partition chromatography หรือ Liquid-Liquid Chromatography (LLC) ซึ่งอัตราการเคลื่อนที่ของตัวถูกละลายในคอลัมน์ขึ้นอยู่กับการละลายของตัวถูกละลายในเฟสทั้งสองที่เป็นของเหลว

ถ้าสารที่บรรจุในคอลัมน์ คือ เรซินที่สามารถแลกเปลี่ยนไอออนได้ จะเรียกวิธีการนี้ว่า ไอออนเอกซ์เชนจ์โครมาโตกราฟี (ion-exchange chromatography) ค่ารีเทนชันไทม์ของตัวถูกละลายขึ้นอยู่กับความสามารถในการแลกเปลี่ยนไอออนระหว่างไอออนของตัวถูกละลายกับตัวถูกละลายที่ถูกแยกคือไอออน ในขณะที่วิธีอื่นคือโมเลกุลที่เป็นกลาง

2.9.1 เทคนิคในการทำคอลัมน์โครมาโตรการฟี

คอลัมน์ที่ใช้ในโครมาตกราฟี มีลักษณะเป็นหลอดแก้วกลวง ปลายข้างหนึ่งทำให้เล็กลง เพื่อต่อเข้ากับตัวคอบคุม การไหลของตัวทำละลายดังรูปที่ 4.9 ขนาดของคอลัมน์มีได้หลายขนาดตั้งแต่เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 ถึง 5 เซนติเมตร และยาว 10 ถึง 50 เซนติเมตร ความสูงและขนาดของเฟสอยู่กับที่ที่บรรจุในคอลัมน์จะมีผลต่ออัตราต่ออัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ ถ้าเฟสอยู่กับที่มีขนาดเล็กและบรรจุในคอลัมน์สูงมากๆ จะทำให้การไหลของเฟสเคลื่อนที่ช้า ทำให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์นานการวิเคราะห์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟีสามารถทำได้ตามขั้นตอนดังรูปที่ 2.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 การวิเคราะห์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี

2.9.1.1 เตรียมคอลัมน์

ที่ปลายล่างของคอลัมน์ต้องถูกปิดไว้ด้วยใยแก้วหรือสำลีเพื่อป้องกันไม่ให้ของแข็งที่บรรจุในคอลัมน์ไหลออกจากคอลัมน์ได้จากนั้นนำเฟสอยู่กับที่ซึ่งเป็นของแข็งมากวนกับตัวทำละลายซึ่งใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ให้เป็นสารละลายแขวนลอย (Suspension) สำหรับของแข็งที่ใช้บรรจุคอลัมน์ต้องมีคุณสมบัติที่มีโพลาริตีมากกว่าเฟสเคลื่อนที่การเลือกใช้ของแข็งต้องให้เหมาะสมกับชนิดของสารตัวอย่างของแข็งที่ใช้บรรจุในคอลัมน์ มี 2 ชนิด คือ

ก. ของแข็งที่ทำหน้าที่เป็นตัวดูดซับ ของแข็งที่นำมาบรรจุในคอลัมน์ต้องมีขนาดสม่ำเสมอ ดังนั้นขนาดที่เลือกใช้ควรเหมาะสม ของแข็งที่นำมาใช้ต้องไม่ละลายในเฟสเคลื่อนที่เนื่องจากการดูดซับของสารตัวอย่างขึ้นอยู่กับโพลาริตีของตัวดูดซับ นั่นคือ การเพิ่มโพลาริตีของตัวดูดซับจะทำให้การดูดซับเพิ่มขึ้น ดังนั้น ผู้วิเคราะห์สามารถควบคุมการแยกได้เลือกเฟสอยู่กับที่ให้เหมาะสม ซึ่งของแข็งที่นิยมใช้เป็นเฟสอยู่กับที่ในการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีได้แสดงในตารางที่2.1โดยเรียงตามโพลาริตีของแข็งอะลูมินาและซิลิเกจ

ข. ของเหลวที่ฉาบบนของแข็งช่วยของแข็งที่ทำหน้าที่เป็นของแข็งช่วย (Solid Support) ควรเป็นของแข็งที่มีโพลาริตีสูง เพื่อให้ดึงดูดเฟสอยู่กับที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่2.1 ตัวดูดซับที่ใช้เป็นเฟสอยู่กับที่ในการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี เรียงตามโพลาริตี

High polarity	Alumina	Greatest adsorption
↓	Magnesium	↓
	Charcoal	
	Silica gel	
	Calcium oxide	
	Magnesium Carbonate	
	Calcium Carbonate	
	Potassium Carbonate	
	Sodium Carbonate	
	Starch	
Low polarity	Cellulose	Least adsorption

2.9.1.2 ใส่สารตัวอย่าง

วิธีใส่สารตัวอย่างให้ใช้ปิเปตดูดสารตัวอย่างให้ได้ปริมาตรตามต้องการ แล้วใส่ลงคอลัมน์อย่างระมัดระวัง พยายามปล่อยสารละลายตัวอย่างออกจากปิเปตสารตัวอย่างที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์มีได้หลายชนิด แต่ละชนิดมีโพลาริตีแตกต่างกันขึ้นอยู่กับฟังก์ชันนอลกรุ๊ฟ ดังตารางที่ 2.2 โดยสารตัวอย่างที่มีโพลาริตีจะอยู่ในคอลัมน์ได้นาน คือ มีคีรีเทนชันไทม์มากในการทำโครมาโตกราฟีแบบธรรมดา

ตารางที่ 2.2 สารต่างๆจัดตามฟังก์ชันนอลกรุ๊ปที่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีโดยเรียงตามลำดับโพลาริตี

High Polarity	Organic acids (RCOOH), base (NH_3, OH^-)	Long retention time
↑	Alcohols (ROH), thiol (RSH)	↑
	Amines (RNH_2), nitro groups (RNO_2)	
	Aldehydes (RCHO), Ketones ($R-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-R'$)	
	Esters ($RCOOR'$)	
	Halides (RF, RCl, RBr, RI)	
	Unsaturated hydrocarbons ($R-C=C-R'$)	
	Saturated hydrocarbons ($R-CH_2-CH_2-R'$)	
Low polarity	Perfluorocarbons (C_nF_{2n+2})	Short retention time

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารตัวอย่างที่จัดเรียงในตารางที่ 2.2 จะช่วยในการทำนายว่าสารตัวใดควรถูกอีลูทออกจากคอลัมน์ได้ก่อนหรือหลัง

2.9.1.3 ทำการอีลูท

เมื่อใส่สารตัวอย่างลงในคอลัมน์เรียบร้อยแล้วให้เติมตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่หรือตัวอีลูท ตัวอีลูทจะไหลลงสู่คอลัมน์ตามแรงดึงดูดของโลก ซึ่งสามารถปรับขนาดของอัตราการไหลได้ถ้าไหลเร็วเกินไปโดยใช้จุกปิดเปิด ที่ต่อเข้ากับปลายข้างล่างของคอลัมน์ แต่ถ้าตัวอีลูทไหลช้าเกินไปสามารถช่วยทำให้ไหลเร็วขึ้นได้โดยใช้เครื่องดูดช่วย (suction-pump) เมื่อให้เวลาในการอีลูทเพียงพอและเหมาะสม สารตัวอย่างที่เป็นสารผสมจะสามารถแยกออกจากกัน

การเลือกใช้ตัวอีลูทขึ้นอยู่กับชนิดของสารตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ ในบางครั้งตัวอีลูทเพียงตัวเดียวไม่สามารถอีลูทสารผสมทุกตัวในสารตัวอย่างออกจากคอลัมน์ได้ จึงต้องมีการเปลี่ยนตัวอีลูทให้เหมาะสมกับสารตัวอย่างแต่ละชนิด ตัวอย่างเช่น สารตัวอย่างเป็นสารผสมของสารหลายชนิดที่มีโพลาริตีต่างกัน การเลือกใช้ตัวอีลูทควรเลือกตัวที่ไม่มีโพลาร์ (non-polar) ตัวอีลูทจะสามารถอีลูทสารตัวอย่างที่ไม่มีโพลาร์หรือมีโพลาร์น้อยที่สุดออกมาก่อน จากนั้นทำการเปลี่ยนตัวอีลูทให้มีโพลาริตีสูงขึ้น จะทำให้สารถูกอีลูทออกมาตามลำดับ

2.9.1.4 เก็บสารตัวอย่างที่ออกจากคอลัมน์

สารละลายที่ถูกอีลูทออกจากคอลัมน์สามารถเก็บได้เป็นส่วนๆ (fraction) เช่น ส่วนละ 1 ถึง 10 ลบ.ซม.แล้วนำแต่ละส่วนไปวิเคราะห์หาปริมาณต่อไป

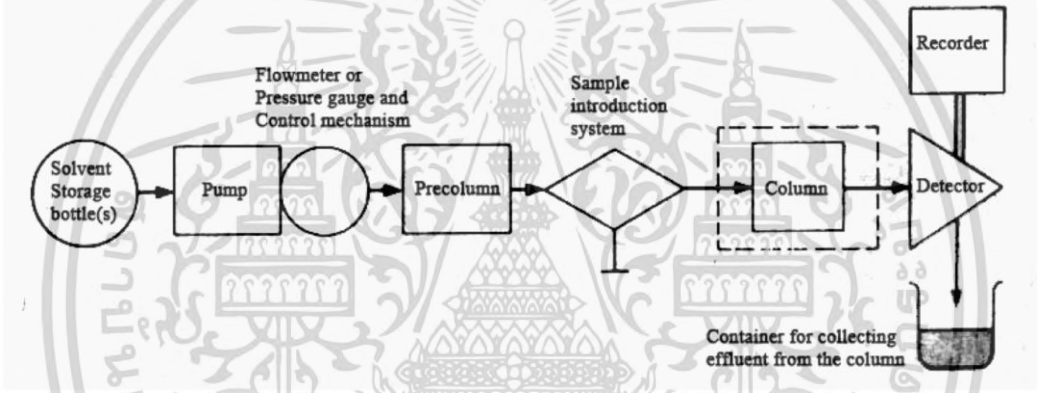
2.9.1.5 การวัดปริมาณสารตัวอย่างที่ถูกอีลูทออกจากคอลัมน์ (Detection)

สารตัวอย่างที่ถูกอีลูทออกจากคอลัมน์เป็นส่วนๆสามารถนำมาวิเคราะห์หาปริมาณได้หลายวิธี คือ ใช้การวิเคราะห์ทางแสง (optical method) หรือใช้การวิเคราะห์ทางเคมีวิเคราะห์เชิงไฟฟ้า (Electroanalytical method) เช่นการทำโวลแทมเมตรีการวัดค่าการนำไฟฟ้า และวัดค่าศักย์ไฟฟ้าเป็นต้น เทคนิคการวิเคราะห์วิธีลิควิทโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ที่กล่าวมาทั้งหมดนี้เป็นวิธีที่ใช้กันมานาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9.2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

เป็นเทคนิคหนึ่งของลิควิดโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ที่สามารถแยกได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ เพราะใช้ความดันช่วย และของแข็งที่บรรจุในคอลัมน์มีขนาดเล็กเมื่อใช้ของแข็งที่มีขนาดเล็กจะทำให้มีค่า HETP ต่ำ และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ไม่มีผลต่อค่า HETP ดังนั้น ความดันช่วยทำให้เฟสเคลื่อนที่ไหลได้เร็วขึ้น ดังนั้นหลังจากที่สารตัวอย่างถูกอีลูทออกมาจากคอลัมน์ต้องมีเครื่องมอที่เรียกว่าดีเทคเตอร์ (detector) วัดสารปริมาณน้อยๆ ที่ถูกอีลูทออกมาได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยส่วนประกอบของเครื่องมือที่ช่วยในการวิเคราะห์จะรวมกันเข้าเป็นเครื่องมือ1 ชุด ของ HPLC ซึ่งจะสรุปเป็นแผนภาพได้ดังรูปที่ 4.13



รูปที่ 2.4 แผนภาพเครื่องมือ HPLC ส่วนของเส้นประหมายถึง เตาที่สามารถควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์

2.10 องค์ประกอบที่สำคัญของชุดตรวจ ELISA

2.10.1 แอนติบอดี

แอนติบอดีพบได้ในเลือดหรือของเหลวในร่างกาย ซึ่งเมื่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดบี-ลิมโฟไซต์ได้รับการกระตุ้นจากแอนติเจนจะทำการแบ่งเซลล์ได้เซลล์ที่มีขนาดใหญ่ เรียกว่า เซลล์พลาสมา ซึ่งมีหน้าที่หลักในการสร้างแอนติบอดีเพื่อทำลายแอนติเจนที่เข้าสู่ร่างกาย โดยแอนติเจนมีการจดจำลักษณะจำเพาะของมัน และจับกันที่บริเวณ อิพิโทป (epitope) การทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี ทำให้มการรวมกันของโปรตีนหลายตัวในเซรุ่ม ซึ่งจะช่วยให้แอนติเจนถูกจำกัดออกจากร่างกายได้ โครงสร้างโมเลกุลของแอนติบอดีมีลักษณะคล้ายรูปตัววาย (Y shape) สายพอลีเปปไทด์ 4 เส้น เส้นหนัก (heavy chain , H) และเส้นเบา (light chain , L) 2 สาย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (Disulfide bond) ส่วนปลายของแขนตัว Y ทั้ง 2 ข้างประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีความแปรปรวนสูง (variable domains) ซึ่งมีความแตกต่างกันในแอนติบอดีแต่ละชนิด เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช

บริเวณที่จับกับแอนติเจน (antigen binding site) บริเวณที่เรียกว่า hinge region อยู่ตรงกลางของ H-chain

2.10.2 แอนติเจน (antigen)

เนื่องจากชุดตรวจสอบที่ใช้เทคนิค ELISA อาศัยหลักการทางวิทยาภูมิคุ้มกันวิทยาในการปฏิกิริยาจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี เพื่อใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนนั้น หรือตรวจหาแอนติเจนที่ต้องการเมื่อมีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนนั้น ปกติแล้วแอนติเจนที่เป็นสารเคมี จะมีขนาดโมเลกุลเล็กที่เรียกว่า เฮปเทน (heptane) จะไม่สามารถยึดเกาะกับพื้นผิวของจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมซึ่งผลิตจาก polystyrene ได้ จึงทำการเชื่อมต่อโมเลกุลของแอนติเจนเข้ากับโปรตีนก่อน เมื่อทำการเคลือบพื้นผิวของจานทดสอบ ELISA ส่วนที่เป็นโมเลกุลโปรตีนจะยึดเกาะกับพื้นผิวของจานทดสอบ ELISA ด้วย noncovalent blinding ทำให้โมเลกุลของแอนติเจนที่เชื่อมกับโปรตีนสามารถยึดติดกับพื้นผิวของจานทดสอบ ELISA ได้

2.10.3 เอนไซม์และระบบการตรวจวัดปฏิกิริยา (Detection system)

เอนไซม์เป็นสารสำคัญที่ใช้ในชุดตรวจซึ่งอาศัยหลักการทำปฏิกิริยาจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ซึ่งจะตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนสีที่เกิดขึ้นจะใช้เครื่องมือที่วัดความยาวคลื่นจำเพาะของสีที่เกิดขึ้น โดยอ่านค่าเป็นค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance หรือ Optical density , OD) เอนไซม์ถือว่าเป็นส่วนส่วนสำคัญอีกอย่างหนึ่งของระบบการตรวจวัดปฏิกิริยา สามารถทำได้โดยการเชื่อมหรือติดฉลากเอนไซม์เข้ากับแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ใช้เป็นตัวตรวจวัด เอนไซม์ที่นิยมใช้กันมากในชุดตรวจสอบมี 2 ชนิด คือ Horseradish peroxidase (HRP) และ Alkaline phosphatase (AP)

Horseradish peroxidase เป็นไกลโคโปรตีน ที่มีน้ำหนักเมเลกุลเท่ากับ 44 กิโลตาลตัน ในการเชื่อมติดเอนไซม์กับโมเลกุลของสารจะเกิดที่ตำแหน่ง กรดอะมิโน lysin 6 โมเลกุลบนโมเลกุลของเอนไซม์เกิดปฏิกิริยากับซับสเตรตเอนไซม์จะถูกออกซิไดส์ซับสเตรตที่เหมาะสมทำให้มีสีที่เปลี่ยนแปลงไป

Alkaline phosphatase เป็นไกลโคโปรตีน ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 8 กิโลตาลตัน เป็นเซมไซม์ที่ได้จากลำไส้ของวัว หรือสามารถและเตรียมจาก E. coli เอนไซม์ทำหน้าที่คะตะไลซ์ (catalyze) และเกิดไฮโดรไลลิส (hydrolysis) ของ phosphate ester บนซับเสตรต ทำให้มีสีเกิดขึ้น บนโมเลกุลของ AP มีหมู่อะมิโนจำนวนมากสำหรับการเชื่อมต่อกับแอนติเจนหรือแอนติบอดี.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.10.4 ซับสเตรต (Substrate)

เนื่องจากการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับซับสเตรตเป็นหัวใจหลักของการทดสอบด้วยเทคนิคELISAไม่ว่าจะเป็นการเชื่อมต่อแอนติเจนหรือแอนติบอดีกับเอนไซม์จะต้องเลือกใช้เอนไซม์ที่เหมาะสมและการเลือกใช้ซับสเตรตที่เหมาะสมกับเอนไซม์นั้นก็มีความสำคัญเช่นกันเพราะเมื่อเอนไซม์และซับสเตรตทำปฏิกิริยาจะปฏิกิริยาจะเกิดผลิตภัณฑ์ที่มีสีขึ้นและจะต้องวัดความเข้มสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องมือที่อ่านค่าความดูดกลืนแสง (spectrophotometer หรือ ELISA reader) การวัดการเปลี่ยนแปลงสีของซับสเตรตที่เกิดจากเอนไซม์ จะเรียกวิธีนี้ว่า colorimetry เมื่อเอนไซม์แต่ละตัวทำปฏิกิริยากับซับสเตรตและก็เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีสีต่างกัน และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างกันด้วย การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ถ้าใช้ OPD (*o*-phenylenediamine) เป็นซับสเตรต จะเปลี่ยนจากสารละลายไม่มีสีเป็นส้มหรือน้ำตาล อ่านค่าผลที่ค่าการดูดกลืนแสง 492 นาโนเมตร หรือถ้าใช้ TMB (3,3,5,5,-tetramethylbenzidine) เปลี่ยนจากสารละลายไม่มีสี้เป็นสีฟ้าเมื่อหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง อ่านผลที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ปัจจุบันใช้ horseradish peroxidase โดยใช้ OPD เป็นซับสเตรต แต่เนื่องจาก OPD มีคุณสมบัติเป็นสารก่อมะเร็ง ซึ่งเป็นพิษต่อผู้ที่ใช้จึงได้เปลี่ยนมาใช้ TMB แทนซึ่งมีความเป็นพิษน้อยกว่า

2.10.5 พื้นที่ผิวสำหรับการยึดตรึง (solid support)

สำหรับชุดตรวจสอบ ELISA ในขั้นตอนแรกของการเตรียมชุดตรวจสอบจะต้องทำการยึดตรึงหรือเคลือบแอนติเจนเคลือบแอนติบอดีบนพื้นผิวที่อยู่ในรูปแบบของsolid phaseก่อน เรียกว่า immobilization หรือ coating แล้วทำปฏิกิริยาตามขั้นตอนของชุดตรวจ ซึ่งแต่ละรูปแบบการใช้ผิวสำหรับยึดตรึงในชุด ELISA ที่เป็นมาตรฐานและนิยมใช้ในปัจจุบัน คือ จานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม หรือ Microtitre plate หรือ 96 well-plate สามารถจับกับแอนติเจนและแอนติบอดีได้ดีด้วย noncovalent binding ทำให้การเคลือบแอนติเจนหรือแอนติบอดีบนพื้นผิวเป็นเนื้อเดียวตลอดพื้นที่ในระหว่างขั้นตอนการทำปฏิกิริยาทำให้การวัดค่าการดูดกลืนแสง

2.11 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารที่ทำหน้าที่ในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและป้องกันไม่ให้เกิดการดึงของอิเล็กตรอน โดยจะเข้าไปจับกับอนุมูลอิสระเพื่อไม่ให้เกิดปฏิกิริยาที่สร้างความเสียหายได้ โดยทั่วไปร่างกายมีสารด้านออกซิเดชันหลายชนิด เช่น เอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส (superoxide dimutase) เอนไซม์มักลูด้าไธโอน เพอร์ออกซอเดส (gluathione peroxidase) เอนไซม์แค่ทาเลส (catalase) หรือไม่ใช่รูปแบบเอนไซม์ เช่น ทองแดง สังกะสี วิตามินอี เบต้า-แคโรทีน วิตามินซี กรดยูริกและชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระแบ่งตามกลไกการยับยั้งได้เป็น 3 ชนิด ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1) การป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ 2) ดักจับอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น และ 3) ทำลายปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระ (สุรีวัลย์, 2561)

2.12. แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระ

2.12.1 สารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์

มักถูกออกแบบโดยใช้โครงสร้างของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีในธรรมชาติมาดัดแปลงให้มีการออกฤทธิ์ที่ดีขึ้น เช่น สารต้านออกซิเดชันที่พัฒนามาจากโครงสร้างของวิตามินอี หรือโครงสร้างสารประกอบฟีนอลิก ตัวอย่างของสารสังเคราะห์ ได้แก่

2.12.1.1 Trolox

Trolox หรือ 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid มีสูตรโมเลกุลทางเคมี คือ $C_{14}H_{18}O_4$ เป็นอนุพันธ์ของวิตามินอีที่มีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้าง ทำให้มีความสามารถละลายในน้ำได้ดีจากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้ trolox สามารถออกฤทธิ์เร็วกว่าวิตามินอี กล่าวคือการออกฤทธิ์ของวิตามินอีต้องใช้เวลานานกว่า trolox โดยการออกฤทธิ์จะใช้เวลาถึง 1 ชั่วโมงหรือ 1 วัน แต่ในขณะที่ trolox สามารถออกฤทธิ์ได้ทันที (วัชระคุปต์และคณะ, 2549)

2.12.1.2 กรดแกลลิก

กรดแกลลิก (Gallic acid) หรือชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า 3,4,5-hydroxybenzoic acid เป็นสารประกอบของแทนนิน มีสูตรโมเลกุลทางเคมีคือ $C_7H_6O_5$ พบมากในองุ่น ใบชา เปลือกไม้โอ๊ค เป็นต้น ซึ่งคุณสมบัติของกรดแกลลิกคือสามารถยับยั้งเชื้อรา เชื้อไวรัส และมีคุณสมบัติที่เป็นสารต้านออกซิเดชัน (โอภาและคณะ,2549) โดยทั่วไปจะใช้เกี่ยวกับอุตสาหกรรมทางยา

2.12.1.3 EDTA

EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) มีสูตรโมเลกุลทางเคมีคือ C.H.NO มีคุณสมบัติเป็นสารคีเลต คือ สามารถจับกับธาตุโลหะที่มีประจุ เช่น ตะกั่ว เหล็ก สังกะสี แคดเมียม แมงกานีส และทองแดง ซึ่งมีประโยชน์ทางการแพทย์โดยนำมาใช้กำจัดไอออนของโลหะต่างๆได้

2.12.1.4 วิตามินซี (vitamin C)

วิตามินซี (vitamin C) หรือกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) เป็นวิตามินที่มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ มีฤทธิ์เป็นกรด สลายตัวอย่างรวดเร็วและมีความไวต่อออกซิเจนสูง โดยวิตามินซีนั้นมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งจะทำหน้าที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นตัวรีดิวซ์เข้าทำปฏิกิริยาลูกโซ่ (Tolbert and ward,1982) นอกจากนี้ยังเป็นตัวเสริมประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของวิตามินอีด้วย (Traber and Atkinson,2007)

2.12.1.5 วิตามินอี (Vitamin E)

วิตามินอี (Vitamin E หรือ tocopherol เป็นวิตามินที่มีคุณสมบัติละลายในไขมันและเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยวิตามินอีเป็นสารที่ไวต่อการถูกออกซิไดซ์มากจึงเป็นตัวถูกออกซิไดซ์แทนสารอื่นที่มีความไวน้อยกว่า นอกจากนี้ยังสามารถทำงานร่วมกับสารต้านอนุมูลอิสระตัวอื่นๆ เช่น วิตามินซีหรือ ซิลิเนียม เป็นต้น (Traber and Atkinson) ในธรรมชาติมีวิตามินอีอยู่หลายชนิด โดยสามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ tocopherols และ tocotrienols และในแต่ละกลุ่มจะแยกเป็นวิตามินย่อยอีก 4 ชนิด ได้แก่ alpha, beta, gamma และ delta ซึ่ง alpha tocopherds จัดเป็นกลุ่มที่มีบทบาทสำคัญในต้านการปกป้องเมมเบรนจากการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ลิปิดเพอร์ออกซิเดชัน (lipid peruxidtion chain reaction) ของอนุมูลอิสระ (Mukai et al,2007)

2.12.2 พฤกษเคมี (phytochemicls)

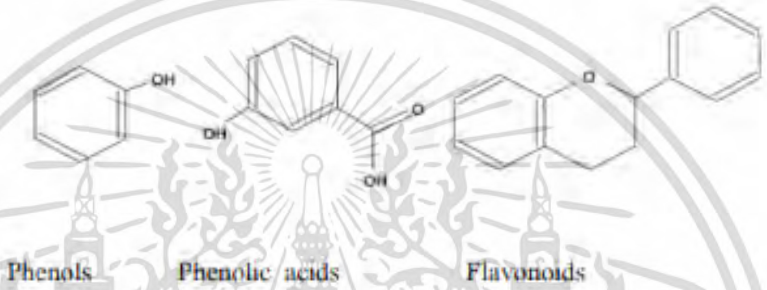
พฤกษเคมี (phytochemicls) หมายถึง สารเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพมักพบในพืช สารกลุ่มนี้อาจจะเป็นสารที่ทำให้พืชผักชนิดๆนั้นๆ มีสี กลิ่นหรือรสชาติเฉพาะ สารพฤกษเคมีเหล่านี้มีประโยชน์ต่อการต้านอนุมูลอิสระ ตัวอย่างสารพฤกษเคมี ได้แก่

2.12.2.1 สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic Compounds)

สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic Compounds) เป็นสารที่พบได้ในพืชทั่วไป มีสูตรโครงสร้างทางเคมีวงแหวนอะโรมาติกที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อยหนึ่งหมู่หรือมากกว่านั้น มีคุณสมบัติละลายน้ำและมีฤทธิ์เป็นกรด สารประกอบฟีนอลิกที่พบในพืชนั้นมักจะรวมอยู่กับโมเลกุลของน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซค์ นอกจากนี้ยังพบว่าอาจมีการรวมตัวกันระหว่างสารประกอบฟินอลิกด้วยกันเองหรือสารประกอบอื่นๆเช่น กรดคาร์บอกซิลิก กรดอินทรีย์ หมู่เอมีน และไขมันอีกด้วย (Sato et al, 1996) สารประกอบฟีนอลิกในธรรมชาติมีอยู่หลายชนิด เช่น สารประกอบฟลาโนนอยด์ กรดฟีนอลิก กรดไฮโดรอกซินามิกและอนุพันธุ์ หรือสารลิกนิน เป็นต้น (Rice-Evans et al, 1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารประกอบฟีนอลิกจะทำหน้าที่ในการดักจับอนุมูลอิสระและโลหะหนักที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในไขมันและโมเลกุลอื่นๆ ด้วยการให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระอย่างรวดเร็ว ทำให้อนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกเกิดความเสถียรภาพจึงไม่ทำให้เกิดปฏิกิริยาอื่นต่อ นอกจากนี้อนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกบางชนิดยังคงสามารถรวมตัวกับอนุมูลอิสระอื่นต่อได้ จึงทำให้สามารถลดจำนวนอนุมูลอิสระลงได้มาก (Rice-Evans et al., 1997; Wiliamson,2000) โดยมีโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกดังรูปที่2.5



รูป 2.5 โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกโดยทั่วไป

2.12.2.2 สารประกอบฟลาโวนอยด์

สารประกอบฟลาโวนอยด์ (flavonoids) อยู่ในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกชนิดหนึ่ง พบมากในพืช ผักและผลไม้ ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยความสามารถของการต้านออกซิเดชันจะมากหรือน้อยจะขึ้นอยู่กับโครงสร้างเป็นหลัก ฟลาโวนอยด์มีหลายชนิด เช่น แอนโธไซยานิดิน (anthocyanidins) ฟลาโวโนนส์ (flavonones) ฟลาวาน-3-ออลส์ (flavan-3-ols) ฟลาโวนส์ (flavones) และฟลาโวนอลส์ (flavonols) แทนนิน (tannin) หรือโปรแอนโธไซยานิดิน (proanthocyanidins)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.13 วิธีการทดสอบความว่องไวของเชื้อจุลินทรีย์

ฤทธิ์ต้านจุลชีพ คือ ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพ (microbiostatic) หรือความสามารถในการฆ่าเชื้อจุลชีพ (microbicidal) วิธีการทดสอบความไวของเชื้อต่อยามีหลายวิธี หากเชื้อทดสอบเป็นแบคทีเรียและราสามารถทำได้ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (broth medium) และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (agar medium) โดยมีวิธีอยู่ 2 รูปแบบ 1. Dilution susceptibilitytest 2. Agar diffusion test ดังนี้

2.13.1 Dilution Suscepptibility Test หรือการทดสอบ MIC

ในการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี dilution test เป็นการทดสอบในเชิงปริมาณ เพราะสามารถทราบค่าความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรที่ทำลายเชื้อได้ นิยมใช้ทดสอบเชื้อที่เจริญได้ช้า ใช้ทดสอบยืนยัน diffusion ที่ให้ความไวปานกลางถึงดื้อยา เพื่อให้สามารถใช้สารสกัดสมุนไพรในปริมาณที่มาก ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ดื้อยา และใช้ทดสอบความไวของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้อากาศในการดำรงชีวิต(anaerobe) โดยหลักการทั่วไปของวิธีการทดสอบแบบ broth และ agar dilution susceptibility test จะมีความคล้ายคลึงกัน โดยการเจือจางสารสกัดสมุนไพรใน medium ในความเข้มข้นที่ต่างกัน และทำการใส่เชื้อลงใน medium ที่มีสารสกัดสมุนไพร และนำไปบ่ม ภายหลังการบ่มนั้น ให้สังเกตค่า MIC โดยสังเกตการเกิดความขุ่นใสของ Broth และมีเชื้อเจริญหรือไม่เจริญบน agar

2.13.2 Agar diffusion Test

การใช้ Agar diffusion Test ที่นิยมมากที่สุดคือ Disc diffusion method (Kirby-Bauer)เนื่องจากเป็นวิธีการที่ประหยัด และใช้เวลาน้อย วิธีการนี้เป็นการทดสอบในเชิงคุณภาพและสามารถบ่งบอกผลได้ว่าเชื้อมีความไวต่อการทดสอบหรือไม่ แต่ไม่เหมาะสมกับเชื้อที่เจริญได้ช้า และเชื้อที่ไม่ใช้อากาศในการเจริญ อีกทั้งไม่สามารถทราบถึงค่า MIC หรือ MLC ได้ โดยในหลักการทั่วไปคือ การนำสารสกัดสมุนไพรที่มีในแผ่นกระดาษกรอง (paper disc) นำไปวางในอาหารแข็งที่มีการ spread เชื้อ จากนั้นทำการนำไปบ่มตามระยะเวลาที่กำหนด อ่านผลการทดสอบได้ด้วยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ซึ่งจะเห็นเป็นวงใสไม่มีโคโลนีเชื้อรอบๆแผ่น dish ซึ่งความสามารถในการยับยั้งเชื้อจะแปรตามขนาดของ inhibition zone ในวิธีการนี้มักใช้ทำการทดสอบสมุนไพรเพียงความเข้มข้นเดียว (ประสาทพร, 2551)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.14 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Literature review)

จากงานวิจัยของ มานิสา จักรมา และคณะ(2563) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งกลไกลการเกิดริ้วรอยก่อนวัยจากสารสกัดต้นกระดูกไก่ดำ ซึ่งมีรายงานว่ามีฤทธิ์ต้านการออกซิเดชันฤทธิ์การต้านอักเสบและการสร้าง AGEs ของคณะผู้วิจัย ซึ่งผู้วิจัยมีการศึกษาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ elastase ในการทำลายelastin ที่เป็นส่วนประกอบของชั้นผิวหนัง โดยสกัดต้นกระดูกด้วย 30% ethanol ได้สารสกัดหยาบและวิเคราะห์ด้วย FRAP, DPPH, proteinase inhibitory, protein denaturation assay และ in vitro AGEs formation จากนั้นวิเคราะห์การยับยั้ง elastase ที่ IC_{50} ที่ 0.71 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอักเสบ พบค่า IC_{50} ที่ 53.54 mg/mlและยืนยันฤทธิ์ต้านการสร้าง AGEs ที่ IC_{50} 10.97 mg/ml จากผลการทดลองทั้งหมดนี้ สารสกัดต้นกระดูกไก่ดำจึงมีความเป็นไปได้ที่จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดริ้วร้อยก่อนวัย

จากงานวิจัยของ ชมนาด สิงห์หันต์ และไมตรี สุทธจิตต์ (2016) มีการศึกษาพืชสมุนไพรทั้ง 17 ชนิดที่ป้องกันการสะสมของ AGEs ในห้องปฏิบัติการ พบว่ามีพืชสมุนไพรทั้ง 5 ชนิดที่ให้ผลในการยับยั้งการเปลี่ยนรูปและลดการสะสม AGEs ได้แก่ ขิง ยี่หร่า อบเชย พริกไทยดำและชาเขียว นอกจากนี้ยังพบสารสำคัญที่ต้านการเกิดกระบวนการไกลเคชัน เช่น สารประกอบแทนนิน (tannin) ในเครื่องดื่มชาเขียวสามารถต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเกิด AGEs ในกระบวนการไกลเคชัน และจากการศึกษาในห้องปฏิบัติการ พบว่ามีสาระสำคัญ คือ S-Allylcystiene สามารถยับยั้งการเกิด AGEs และต้านการเกิดอนุมูลอิสระในกระบวนการไกลเคชันได้หรือสารปิเปอรีน(piperine)ในพริกไทยที่มีฤทธิ์ต้านการเกิดไกลเคชันและป้องกันการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงจากภาวะน้ำตาลในเลือดสูงได้เช่นเดียวกัน นอกจากนี้มีบทบาทต้านความเสื่อมของเซลล์ โรคแทรกซ้อนเบาหวานและภาวะเครียดที่มีความสัมพันธ์กับโรคเบาหวานได้ และจากการศึกษาศักยภาพในการต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผักพื้นบ้านจำนวน 84 ชนิด มีสารต้านอนุมูลอิสระ วิตามินซี วิตามินอี แคโรทีนอยด์ และสารประกอบฟีนอลิก พบว่าร้อยละ 55.9 ของผักพื้นบ้านไทย จัดอยู่ในกลุ่มที่มีศักยภาพในการต้านสารอนุมูลอิสระสูง และผักบ้านที่เหลือ จัดอยู่ในกลุ่มที่มีศักยภาพปานกลางและต่ำ ร้อยละ 10.7 และ 3.6 ตามลำดับ จากผลการวิจัยดังกล่าวทำให้เห็นว่าผักพื้นบ้านไทยมีฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระได้ดี และยังสามารถต้านการเกิดกระบวนการไกลเคชันในร่างกายและป้องกันการเสื่อมสภาพเซลล์โรคแทรกเบาหวานได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากงานวิจัยของ วรยุทธ และคณะ(2555) สารสกัดจากสมุนไพร 4 ชนิด ได้แก่ กานพลูมะรุม ทับทิม และ สมอไทย ที่สกัดจากตัวทำละลายได้แก่ เฮกเซน อะซีโตน เมทานอล เอทานอล และน้ำมันหอมระเหยจากกานพลู จะถูกทดสอบกับแบคทีเรียทดสอบ 13 สายพันธุ์โดยจากการทดสอบพบว่าสารสกัดเฮกเซนของกานพลูและน้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด มีวงยับยั้งขนาด 8.67-15.00 มิลลิเมตร ค่า MIC 2.23 –148.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดเมทานอลและเอทานอลของกานพลูสามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus*, *Escherichia coli O157:H7, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Enterobacter aerogenas , Edwardsiella tarda , Shigella flexneri* และ *Citrobacter freudii* มีวงยับยั้งขนาด 6.50-15.5 มิลลิเมตร MIC 2.32 – 74.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดสมอไทยด้วยเมทานอลและเอทานอลสามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Escherichia coli O157:H7, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenas, Shigella flexneri* และ *Citrobacter freudii* โดยมีวงยับยั้ง 8.83 - 21.5 มิลลิเมตร MIC 2.32-37.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดเปลือกทับทิมด้วยเมทานอลและเอทานอล สามารถยับยั้งเชื้อ Staphylococcus aureus และ Bacillus cereus มีวงยับยั้งขนาด 12.50 - 15.50 มิลลิเมตร MIC อยู่ในช่วง 2.32-4.64 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดเมล็ดมะรุมด้วยเอทานอล สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* วงยับยั้งขนาด 7.50 มิลลิเมตร MIC 4.64 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากงานวิจัยของ ร้อยเอกหญิง ดร.ปวีณา และคณะ (2559) มีการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรที่พบบริเวณโรงเรียนนายร้อยพระจอมเกล้า 20 ชนิด ที่มีผลต่อเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis, Staphylococus oureus* เชื้อแบคทีเรียรหัส F1, F2 ที่ได้จากเท้าของผู้ที่มีกลิ่นเท้า โดยสารสกัดหยาบสกัดด้วยน้ำ 70% เอทานอล และ 70% ไอโซโพรพานอล เมื่อนำไปทดลองด้วยวิธี Agar Well Diffusion ผลการทดลองพบว่ามีสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *B.subtilis*, *S. aureus*, F1 และ F2 จำนวน 22 11 17 และ 16 ชนิด ตามลำดับนอกจากนี้ยังพบว่า มีสารสกัดหยาบจำนวน 11 ชนิด สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดได้ เมื่อนำสารสกัดทั้ง 11 ชนิด มาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง (MIC) และฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) ต่อเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 1.56 – 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ยกเว้นสารสกัดด้วย 70% ไอโซโพรพานอล จากใบพลูและต้นลูกใต้ใบที่ไม่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย B.subtilis และสารสกัด 70% ไอโซโพรพานอล จากต้นลูกใต้ใบ และสารสกัดด้วย 70% เอทานอล จากใบพลู ใบทับทิม ต้นน้ำนมราชสีห์ และสารสกัดด้วย 70% ไอโซโพรพานอล จากต้นลูกใต้ใบไม่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด มีค่าอยู่ในช่วง 3.75-7.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และค่า MIC และ MBC ของยาปฏิชีวะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ampicillin ต่อเชื้อแบคทีเรีย B.subtilis, F1 และ F2 มีค่าอยู่นช่วง 12.5-25.0 ไมโครกรัม/มิลลิกรัม ส่วนเชื้อแบคทีเรีย *S.aureus* พบว่า ยาปฏิชีวนะ Ampicillin ไม่สามารถยับยั้งได้ ผลการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปต่อยอดความรู้สร้างผลิตภัณฑ์ที่ใช้แก้ปัญหากลิ่นเท้าโดยใช้สารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรได้อีกด้วย

จากงานวิจัยของ อรอนงค์ และคณะ (2563) มีการศึกษาสมุนไพรไทย 3 ชนิด ได้แก่ หญ้าวงช้าง ผักคราดหัวแหวน และตำลึงทอง โดยวิเคราะห์สารประกอบ ฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี High performance liquid chromatography (HPLC) และมีการศึกษากิจกรรมต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging และ ferric reducing/antioxidant power (FERAP) พบว่า สารสกัดจากพืชสมุนไพรหญ้าวงช้างมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงสุดเท่ากับ1467.11 RTE/g ปริมาณฟีนอลิกรวมพบมากที่สุดในสารสกัดจากตำลึงทองมีค่าเท่ากับ 540.48 µg GAE/g และจากการวิเคราะห์ปริมาณกรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) พบว่ามีสารประกอบโฟวานอยด์ที่พบมาก ได้แก่ apigenin , quercetin , kaempferol , myricetin และ rutin สารประกอบฟีนอลิกที่พบมาก ได้แก่ ferulic acid , cafferic acid และ sinapicnic acid ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH อยู่ในระหว่าง 9.16-9.32 mg Trolox/g (p>0.05) และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระวิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP พบว่า หญ้าวงช้าง มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 106.63 mmol $FeSO_4$/g จากการศึกษาครั้งนี้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ของสมุนไพรท้องถิ่นที่เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

จากงานวิจัยของ ณชกนก และคณะ (2019) มีการศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากตัวอย่างใบม่อนที่ต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ ใบหม่อนสด และใบหม่อนลวกก่อนอบแห้ง โดยการสกัดตัวอย่างด้วยตัวทำลายที่ต่างกัน ได้แก่ น้ำ น้ำต่อเอทานอล (หนึ่งต่อหนึ่งโดยปริมาตร) และเอทานอล โดยวิธีรีฟลักซ์ เป็นเวลา 90 นาที และมีการศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดโดยทำปฏิกิริยากับโฟลิน-ซีโอแคลทูรีเอเจนต์ ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระซึ่งทำปฏิกิริยากับดีพีพีเอช และมีการติดตามกรดคลอโรจีนิกซึ่งเป็นกรดที่แสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในชาใบหม่อนด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมถนะสูง พบว่าใบหม่อนสดสกัดด้วยน้ำให้ปริมาณฟีนอลิก (21.89 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่างแห้ง) และยังพบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (45.80 เปอร์เซ็นต์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือ

3.1.1 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow)

3.1.2 เครื่องกรองสุญญากาศ (Vacuum Fiilter)

3.1.3 เครื่องแยกสารประกอบ (High Performance Liquid Chromatography : HPLC)

3.1.4 เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (Microplate reader)

3.1.5 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

3.1.6 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่นZ206A

3.2 อุปกรณ์

3.2.1 ขวดรูปชมพูขนาด 200 มล. (Erlenmeyer flask)

3.2.2 ขวดดูแรน (Duran) ขนาด 500 มล. และ 1,000 มล.

3.2.3 ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask)

3.2.4 บีกเกอร์ (Beaker)

3.2.5 หลอนเซนติฟิวก์ (Centrifuge Tube)

3.2.6 ปิเปต single chanal

3.2.7 กระดาษกรอง เบอร์ 4 (Filter papers No.4)

3.2.8 ELISA plate

3.2.9 ทิป (Tip) 3.2.10 ที่วางหลอดทดลอง (Test tube rack)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 สารเคมี

3.3.1 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

3.3.2 โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)

3.3.3 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)

3.3.4 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)

3.3.5 กรดซิตริก (Citric acid)

3.3.6 โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตโดเดคาไฮเดรต ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)

3.3.7 ไฮโดรเจนซัลเฟต (H_2SO_4)

3.3.8 O-Phenylenediamine Dihydrochloride

3.3.9 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

3.3.10 Tween 20

3.3.11 โพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (KPO_4)

3.3.12 0.4% BSA (Bovine serum albumin)

3.3.13 60 มิลลิโมล ไรโบส

3.3.14 0.5% hydrolyzed casein

3.3.15 Aminoguanidine

3.3.16 น้ำกลั่น

3.3.17 95% ,80%, และ 40% แอลกอฮอล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 ขั้นตอนการดำเนินงาน

3.4.1 การเตรียมการสกัดสมุนไพร

1. นำสมุนไพรไทย 10 ชนิด ได้แก่ เสลดพังพอน ผักติ้ว ตะไคร้ รากปลาไหลเผือก ยี่หร่า หญ้าหนวดแมว ดีปลากั้ง ทองพันชั่ง ขี้เหล็ก และรางจืด นำมาปั่นให้ละเอียด และชั่งตัวอย่าง 10 กรัม
2. เติมเอทานอล 10 มล. ที่มีความเข้มข้นต่างกัน ดังนี้ 0% 40% 80%
3. ปิดฟอยด์บ่มในความมืดเป็นเวลา 3 วัน
4. กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 ด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ และเก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.4.2 ขั้นตอนการเตรียมปฏิกิริยา reaction

1. เตรียม 500 มล. ของบัฟเฟอร์ K-PO_4 ขนาด 200 มล. pH 7.2
   1.1. ชั่ง K_2HPO_4 13.61 กรัม เพิ่มน้ำ 400 มล. ปรับค่า pH เป็น 7.2 โดยใช้ KOH 2 โมลลาร์ หรือชั่ง K_2HPO_4 17.42 กรัม เพิ่มน้ำ 400 มล. และปรับ pH ให้เป็น 7.2 โดยใช้ HCl 2 โมลลาร์
   1.2. ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่น 500 มล. และเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส
2. เตรียม 25 มล. ของเจลาติน 0.4% และ 60 มล. ในบัฟเฟอร์ K-PO_4 (สำหรับ 1 plate, 96 rxn)
   2.1 ชั่งเจลาติน 0.1 กรัม เติมบัฟเฟอร์ K-PO_4 25 มล. และกรองผ่านเยื่อหุ้ม 0.45 นาโนเมตร.
   2.2. ชั่ง ribose 0.225 กรัม เติมบัฟเฟอร์ K-PO_4 25 มล. และกรองผ่านเยื่อ 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นใส่เจลาติน 25 มล. และไรโบส 25 มล. จะได้เป็นสารละลาย A 50 มล.
3. เตรียม AG 1 มล. ความเข้มข้น 100 มก./มล. เพื่อเป็นการควบคุมเชิงบวก
   3.1. ชั่งอะมิโนกวานิดิน 100 มก. และเติมน้ำปริมาตร 1 มล.
   3.2. เจือจางอะมิโนกวานิดิน 10 และ 100 เท่าให้ได้ความเข้มข้น 10 มก./มล. และ 1 มก./มล. ตามลำดับ โดยเตรียมไว้เพียง 1 มล.ของแต่ละอัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.3 ปฏิกิริยา (Triplicate) ในหลอดปลอดเชื้อ 1.5 มล.

1. ผสมสารละลาย A 495 ไมโครลิตร + น้ำปลอดเชื้อ 5 ไมโครลิตร (การควบคุมเชิงลบ) 2 ชุด
2. ผสมสารละลาย A 495 ไมโครลิตร + AG 5 ไมโครลิตร 10 มก./มล. (การควบคุมเชิงบวก)
3. ผสมสารละลาย A 495 ไมโครลิตร + 5 ไมโครลิตร I mg/mL Ag (การควบคุมเชิงบวก)
4. ผสมสารละลาย A + สารสกัด 5 ไมโครลิตร
5. นำไปผสมด้วยเครื่อง vortex
6. นำชุดการควบคุมเชิงลบเก็บในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
7. บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน

3.4.4 การตรวจจับ AGEs ด้วยวิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

1. เจือจางตัวอย่างสารสกัดให้มีความเข้มข้นเจลาตินที่ 10 มก./มล.
2. ปิเปตสารสกัดเจือจาง 100 มล. ลงบนแผ่น ELISA และบ่มทิ้งไว้ ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างและทิ้งส่วนใสออกจากเพลท
3. ใส่ 0.5% hydrolyzed casein 200 ไมโครลิตร (ชั่งน้ำหนักเคซีน 0.1 กรัม ใน 1X PBS 20 มล.:1 เพลท) บ่ม 30 นาที ณ อุณหภูมิห้อง จากนั้นล้างและทิ้งส่วนใสออกจากเพลท
4. ล้างด้วยบัฟเฟอร์ 200 ไมโครลิตร (3 ครั้ง) และทิ้งส่วนใสออกจากเพลท
5. เติม 0.1 มก./มล. anti – CML ปริมาตร 100 มล. (anti-CML 1.27 ไมโครลิตร. ในบัฟเฟอร์ล้าง 11 มล. ต่อ 1 เพลท) บ่ม 30 นาที ณ อุณหภูมิห้อง จากนั้นล้างและทิ้งส่วนใสออกจากเพลต
6. ล้างด้วยบัฟเฟอร์ 200 ไมโครลิตรทั้งหมด 3 ครั้ง และทิ้งส่วนใสออกจากเพลท
7. เติม 100 ไมโครลิตร ของ 5,000 เท่าของการเจือจาง 2^{nd}- antibody (เติม IgG-HRP 2.2 ไมโครลิตร ในบัฟเฟอร์ 11 มล.: ต่อ 1 เพลท). บ่ม 30 นาที และทิ้งส่วนใสออกจากเพลท
8. ล้างด้วยบัฟเฟอร์ 200 ไมโครลิตรทั้งหมด 3 ครั้ง และทิ้งส่วนใสออกจากเพลท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9. เริ่มต้นการทำปฏิกิริยาโดยเติม substrate solution 100 ไมโครลิตร (เตรียม OPD·2HCl 5.5 มก. + substrate + H_20_2 6.6 ไมโครลิตร ต่อ 1 แผ่น)
10. บ่มทิ้งไว้ ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-5 นาที
11. หยุดปฏิกิริยาโดยเติม 1 M H_2SO_4 100 ไมโครลิตร ปฏิกิริยาจะกลายเป็นสีส้ม
12. อ่านค่า A_{492} ตั้งค่าการควบคุมเชิงลบวันที่ 7 เป็นรูปแบบ 100% และตั้งค่าการควบคุมเชิงลบวันเริ่มต้นเป็น 0% การเกิด AGEs

3.4.5 การแยกสารสกัดโดยวิธีการ Column chromatography

1. **การเตรียมตัวอย่าง**

1.1. ระเหยแห้งตัวอย่างให้แห้งสนิท โดยใช้เครื่อง rotary evaporator (ชั่งน้ำหนักของขวดรูปชมพู่) จดน้ำหนักแห้งของสารสกัด

1.2. ละลายสารกลับด้วยตัวทำละลายที่ต้องการ ดูสารละลายตัวอย่างและถ่ายลงในหลอดพลาสติก

1.3 ปั่นเหวี่ยงเพื่อกำจัดเศษต่างๆที่อาจจะไปขวางการทำงานของคอลัมน์

2. การชะล้างสารละลาย

2.1. เตรียมน้ำกลั่นประมาณ 10 ปริมาตรคอลัมน์ (CV) เตรียมเอทานอลความเข้มข้น 25% 50% 75% และ 99.99% โดยทุกๆความเข้มข้นเตรียมประมาณ 3 CV เตรียม 100% Acetone ประมาณ 3 CV

2.2.กำจัดแก๊สออก(การกำจัดแก๊สด้วยแรงดันต่ำนั้นดีกว่าการทำsonicat เนื่องจาก sonication จะทำให้เกิดความร้อนและทำให้ตัวทำละลายระเหย

2.3. เก็บสารละลายที่กำจัดแก๊สแล้วไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะใช้งาน

3. การบรรจุคอลัมน์และปรับสมดุล

3.1 ทำการคำนวณปริมาณคอลัมน์ที่เลือกไว้ (Diaion HP-20 matrix)

3.2 กรองน้ำด้วยที่กรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร (ไม่ต้องฆ่าเชื้อ) เพื่อให้ได้สารละลายใช้แท่งแก้วเพื่อคน การกำจัดแก๊สจะนิยมทำมากกว่า

3.3 ใช้สำลีในการอุดคอลัมน์ เติมน้ำประมาณ 0.5 CV จากนั้นเทสารละลายลงในคอลัมน์ให้เรซินไหลลงอย่างต่อเนื่องเปิดวาล์วให้สารไหลออกอย่างต่อเนื่องหยุดบรรจุเมื่อผิวหน้าของเรซินอยู่ห่างจากปากคอลัมน์ประมาณ 3 - 5 ซม. จากนั้นตรวจสอบการไหลของน้ำให้ไหลแบบหยดต่อหยด

3.4. ล้างคอลัมน์ด้วยน้ำเปล่าที่กำจัดแก๊สแล้วประมาณ 3 - 5 CV

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การเติมตัวอย่างและการเก็บ Fraction

4.1. เติมตัวอย่างอย่างระมัดระวังไปบนผิวหน้าของเรซิ่น พยายามอย่าให้พื้นผิวเกิดการไม่เท่ากัน

4.2. ล้างด้านในของคอลัมน์ด้วยน้ำเล็กน้อยเพื่อให้แน่ใจว่าสารทั้งหมดไม่ติดอยู่ที่ผิวของคอลัมน์

4.3. ล้างคอลัมน์อย่างเป็นขั้นตอนโดยเริ่มจาก น้ำ เอทานอลความเข้มข้น 25% 50% 75% 99.99% และ 100% Acetone ประมาณ 3 CV ของทุก ๆ ตัวทำละลาย และเก็บ fraction ที่แยกได้ไว้

4.4. แต่ละ fraction ที่แยกได้จะถูกนำมาทดสอบการยับยั้ง AGEs

5. การนำคอลัมน์กลับมาใช้ใหม่

5.1. ล้างคอลัมน์ที่ใช้แล้วด้วยน้ำเปล่าหรือ 20% เอทานอล ประมาณ 3 CV เพื่อนำเรซินไปเก็บให้เอทานอล 20% ไว้ใช้ในระยะยาว

3.5 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพ

1. เริ่มการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด (*Bacillus subtilis TISTR 1248*, *Staphylococcus aureus TISTR 746*, *Escherichia coli TISTR* 074 และ *Pseudomonas aeruginosa TISTR 2370)*
2. นำเชื้อทั้ง 4 ชนิด ไปผสมกับ 0.85% NaCl และนำไปเทียบกับ 0.5 McFaland
3. จากนั้นนำเชื้อไป swap ลงในอาหารแข็ง Mueller Hinton Agar (MHA) และทดสอบด้วยวิธีการ Disc diffusion โดยมียาปฏิชีวนะ Streptomycin เป็น positive control
4. นำเชื้อที่ได้ไปบ่ม ณ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 - 20 ชั่วโมง
5. ทำการตรวจวัดเคลียร์โซน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

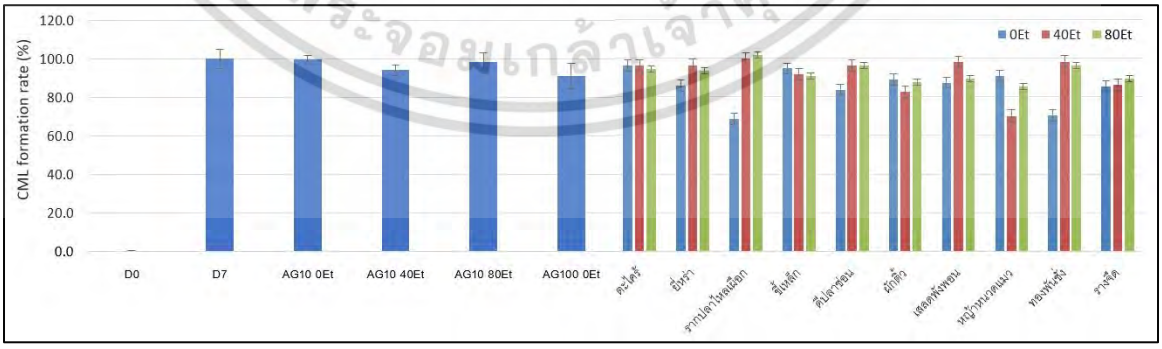
บทที่ 4

ผลการทดลอง

จากการศึกษาได้ทำการบ่มสมุนไพรไทยไว้ในน้ำกลั่น และสารละลายเอทานอลความเข้ม 40% และ 80% ในขวดรูปชมพู่ ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 และทดสอบด้วยวิธี ELISA เสร็จแล้วจึงนำสมุนไพรที่มีผลการยับยั้ง CML ดีที่สุดไปแยก fraction และทำต่อด้วยวิธี ELISA อีกครั้ง ได้ผลดังนี้

4.1 การศึกษาผลการยับยั้งการเกิด CML ของสมุนไพรไทย 10 ชนิด

จากการนำสมุนไพรไทยทั้ง 10 ชนิด ไปบ่มด้วยน้ำกลั่น สารละลายเอทานอลความเข้มข้น 40% และ 80% ในขวดรูปชมพู่ ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นกรองตัวอย่างและปิเปตตัวอย่าง 5 ไมโครลิตรผสมกับสารละลาย A 495 ไมโครลิตรและทำ positive control ด้วยน้ำกลั่น 5 ไมโครลิตรผสมกับสารละลาย A 495 ไมโครลิตร ทำการทดสอบโปรตีนในสารละลายเอทานอลต่าง ๆ ด้วย aminoguadinine 5 ไมโครลิตรผสมกับสารละลาย A 495 ไมโครลิตรในหลอดแอฟเพนดอร์ฟขนาด 1.5 มล. จากนั้นนำไปบ่ม ณ อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 7 วัน ทำ negative control ด้วยน้ำกลั่น 5 ไมโครลิตรผสมกับสารละลาย A 495 ไมโครลิตรในหลอดแอฟเพนดอร์ฟขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสหลังจากนั้นทดสอบผลยับยั้งการเกิด CML ด้วยวิธีการ ELISA แล้วนำไปวัดด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ซึ่งผลการทดสอบการเกิด CML ดังตารางที่ 4.1



รูปที่ 4.1 แสดงผลการยับยั้งการเกิด CML ของสมุนไพรที่ทำการศึกษาทั้ง 10 ชนิด

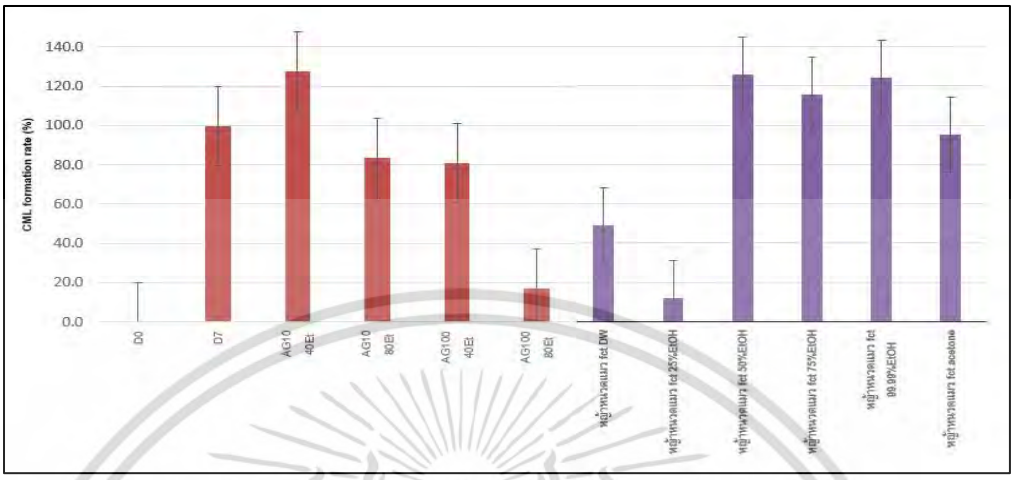
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.1 แสดงผลการยับยั้งการเกิด CML ของ น้ำกลั่นวันที่ 0 วันที่ 7 Aminoguadinine ในเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ และสมุนไพรที่ทำการศึกษาทั้ง 10 ชนิดซึ่งผลการทดลองพบว่าสารสกัดจาก หญ้าหนวดแมว ให้ผลการยับยั้งการเกิด CML ที่ดีจากการสกัดโดยใช้ น้ำกลั่น เอทานอล 40% และ 80% โดยจะมีเปอร์เซ็นต์การเกิด CML อยู่ที่ 90.5%, 70.1% และ 85.2% ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์การเกิด CML ของน้ำกลั่นในวันที่ 7 และการใช้เอทานอล 40% ในการบ่มหญ้าหนวดแมว จะให้ผลการยับยั้งการเกิด CML ได้ดีที่สุด และ aminoguanidine ในแต่ละสภาวะต่างๆ ที่ถูกใช้เป็น negative control ไม่มีความแตกต่างในการเกิด CML กับน้ำกลั่นในวันที่ 7 อย่างมีนัยสำคัญ

4.2 การศึกษาสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเกิด CML ที่มีอยู่ในหญ้าหนวดแมว

จากการศึกษาการยับยั้งการเกิด CML ของสารสกัดจากหญ้าหนวดแมว ด้วยวิธี ELISA ผลที่ได้คือสารสกัดจากหญ้าหนวดแมวที่บ่มในเอทานอลความเข้มข้น 40% ให้ผลการยับยั้งการเกิด CML ได้ดีที่สุด ดังรูปที่ 4.1 จึงได้นำสารสกัดจากหญ้าหนวดแมวนี้ ไปทำการระเหยแห้งด้วยเครื่อง Rotary evaporator จนได้สารสกัดที่มีความข้นหนืด จากนั้นนำไปทำการแยกสารในสารสกัดต่อด้วยวิธีการ Stepwise elution chromatography โดยใช้ stationary phase เป็น Diaion HP-20 column และให้สารสกัดหญ้าหนวดแมวถูกละลายใน mobile phase ได้แก่ น้ำกลั่น เอทานอล 25% 50% 75% 99.99% และ Acetone ตามลำดับ จากนั้นเก็บตัวอย่างแต่ละ fraction เพื่อนำไปหาน้ำหนักของสารที่มีอยู่ในสารสกัด ปรับความเข้มข้นของสารสกัดให้เป็น 1 mg/mL แล้วจึงนำไปทำกระบวนการ ELISA ต่อไป ผลที่ได้เป็นดังรูปที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



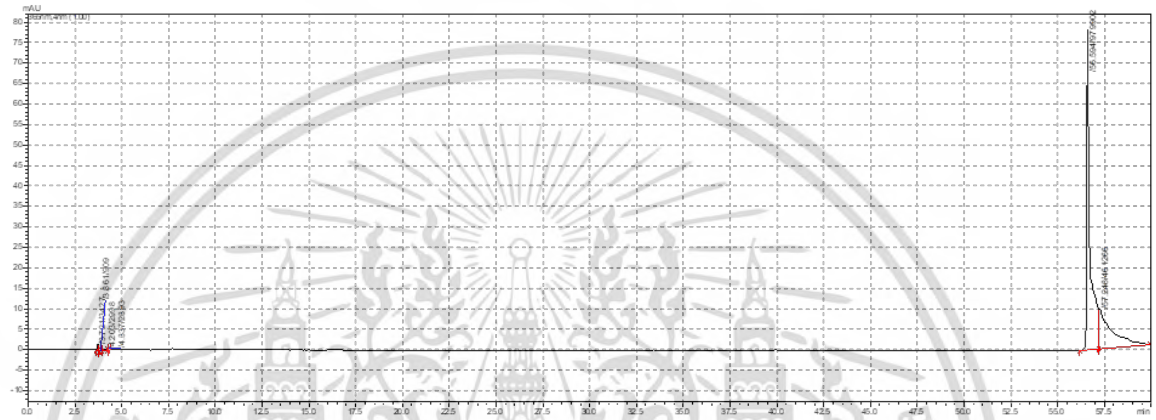
รูปที่ 4.2 แสดงผลการยับยั้งการเกิด CML ของ น้ำกลั่นที่วันที่ 0 วันที่ 7 Aminoguadinine ในเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ และ หญ้าหนวดแมวในแต่ละ fraction

จากรูปที่ 4.2 แสดงผลการยับยั้งการเกิด CML ของ น้ำกลั่นที่วันที่ 0 วันที่ 7 Aminoguadinine ในเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ และ หญ้าหนวดแมวในแต่ละ fraction พบว่าการแยกสารสกัดจากหญ้าหนวดแมวที่บ่มในเอทานอล 40% ด้วยวิธี Stepwise elution chromatography โดยใช้เอทานอล 25% เป็น mobile phase จะสามารถพบสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเกิด CML ได้ดีที่สุด โดยจะพบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำกลั่นในวันที่ 7 fraction ที่ได้จาก เอทานอล 25% จะสามารถเกิด CML ได้เพียง 12.19% และ การทดลองโดยใช้โปรตีนจาก aminoguadinine ผลที่ได้พบว่าการใช้ AG100 ในเอทานอล 80% ให้ผลการยับยั้งการเกิด CML ที่ดีที่สุด โดยพบการเกิด CML เพียง 17.13% โดยได้มีงานวิจัยของ Anchana Chanwitheesuk ,2005 ได้ทำการศึกษาการต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรในประเทศไทย พบว่าหญ้าหนวดแมวมีการต้านอนุมูลอิสระได้ดีโดยตรวจพบสารประกอบฟีนอลิกอยู่ถึง 145 mg% ซึ่งในการศึกษาเดียวกันได้มีการศึกษาจากยี่หร่าด้วยเช่นกัน ซึ่งยี่หร่ามีปริมาณสารประกอบสารประกอบฟีนอลิกอยู่ถึง 125 mg% จึงทำให้สรุปได้ว่าการที่หญ้าหนวดแมวสามารถยับยั้งการเกิด CML ได้ดีมาจากการที่มีปริมาณสารฟีนอลิกอยู่ในพืชมาก

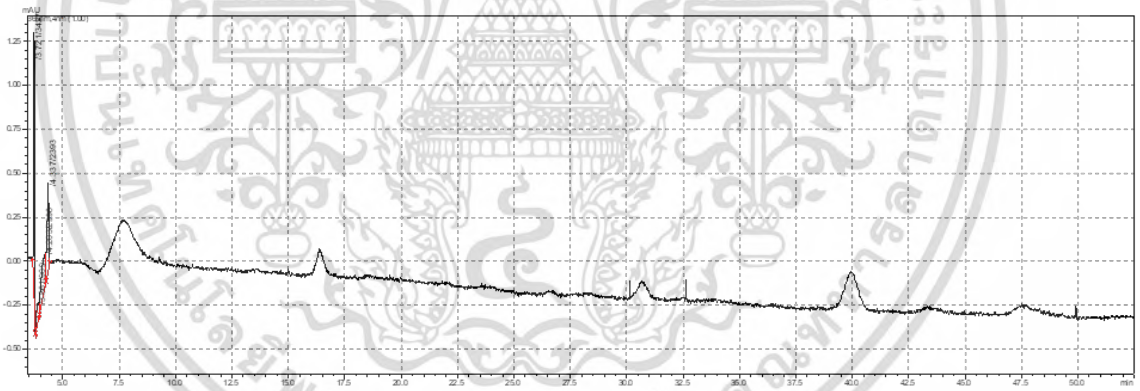
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การทำกระบวนการ HPLC เพื่อตรวจสอบประเภทของสารในสารสกัดจากหญ้าหนวดแมว

จากการนำสารสกัดจากหญ้าหนวดแมวที่ fraction เอทานอล 25% ไปทำการเจือจาง 10 เท่าและนำไปกรองเพื่อกำจัดเศษตะกอน และนำสารสกัดที่ได้ไปทำการเข้าเครื่อง HPLC โดยใช้ค่าดูดกลืนแสงที่ 365 นาโนเมตร ผลที่ได้เป็นดังรูปที่ 4.3



(ก)



(ข)

รูปที่ 4.3 แสดงกราฟที่วัดได้จากเครื่อง HPLC โดยตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตรของตัวอย่างหญ้าหนวดแมว

(ก) แสดงกราฟ HPLC ของสารสกัดจากหญ้าหนวดแมว fraction เอทานอล 25% ณ เวลาที่ 0-60 นาที

(ข) แสดงกราฟ HPLC ที่ถูกขยายสัญญาณให้ชัดขึ้น ของสารสกัดจากหญ้าหนวดแมว fraction เอทานอล 25% ณ เวลาที่ 0-60 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลที่ได้จากการทำ HPLC โดยทำการตรวจวัดความยาวคลื่นที่ 365 นาโนเมตร พบว่า สารสกัดจากหญ้าหนวดแมว fraction เอทานอล 25% มีสารที่ตรวจพบอยู่ 4 ชนิด โดยมีการตรวจพบที่นาทีที่ 8 16.5 31 และ 40 ซึ่งคาดว่าสารที่ตรวจพบเป็นสารในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิก เนื่องจากในงานวิจัยของ Yuki Tominaga ,2020 ได้ทำการศึกษา การตรวจหาสารประกอบฟีนอลิกในการยับยั้งการเกิด AGEs โดยได้มีการ ทำ HPLC โดยทำการตรวจวัดความยาวคลื่นที่ 365 nm ซึ่งเป็นสภาวะที่สามารถตรวจหาสารในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกได้ ผลที่ได้คือ มีการตรวจพบสารในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกอยู่ 7 ชนิด และ 4 ชนิดมีผลในการยับยั้งการเกิด AGEs งานวิจัยนี้ได้ใช้งานวิจัยอ้างอิงเป็นต้นแบบทำให้ผลของ HPLC ที่ได้คาดว่าจะเป็นสารประกอบ ฟีนอลิกที่มีการยับยั้งการเกิด CML ได้เช่นเดียวกัน

4.4 การศึกษาการออกฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากหญ้าหนวดแมว

ในการศึกษาการออกฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากหญ้าหนวดแมว ได้ทำการศึกษาโดยใช้เชื้อ 4 ชนิดได้แก่ *Staphylococcus aureus* , *Pseudomonas aeruginosa* , *Bacillus subtilis* และ *Escherichia coli* โดยการทดสอบจะใช้สารสกัดจากหญ้าหนวดแมวที่ได้จากวิธีการ Stepwise elution chromatography ได้แก่ น้ำกลั่น เอทานอล 25% 50% 75% 99.99% Acetone AG10 40% เอทานอล AG100 40% เอทานอล และ ใช้ Streptomycin 20 µl/ml เป็น positive control นำเชื้อมาเลี้ยงในอาหาร mueller hinton agar และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ดังตารางที่ 4.1-4.4

ตารางที่ 4.1 แสดงขนาดของวงใสของการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในหน่วยมิลลิเมตร

Bacillus subtilis	หญ้าหนวดแมว Fct DW	หญ้าหนวดแมว Fct 25% เอทานอล	หญ้าหนวดแมว Fct 50%เอทานอล	หญ้าหนวดแมว Fct 75% เอทานอล	หญ้าหนวดแมว Fct 99.99% เอทานอล	หญ้าหนวดแมว Fct อะซิโตน	AG10 40%เอทานอล	AG100 40% เอทานอล	Streptomycin 20 µl/ml
ทำซ้ำครั้งที่ 1	-	-	-	6.68	5.86	6.7	-	-	25.4
ทำซ้ำครั้งที่ 2	-	-	-	8.44	7.86	8.44	-	-	25.0
ทำซ้ำครั้งที่ 3	-	-	-	7.0	8.9	10.1	-	-	23.1
ค่าเฉลี่ย	-	-	-	7.37	7.54	8.41	-	-	24.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงขนาดของวงใสของการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ในหน่วย มิลลิเมตร

Bacillus subtilis	หญ้าหนวดแมว Fct DW	หญ้าหนวดแมว Fct 25% เอทานอล	หญ้าหนวดแมว Fct 50%เอทานอล	หญ้าหนวดแมว Fct 75% เอทานอล	หญ้าหนวดแมว Fct 99.99% เอทานอล	หญ้าหนวดแมว Fct อะซิโตน	AG10 40% เอทานอล	AG100 40% เอทานอล	Streptomycin 20 µl/ml
ทำซ้ำครั้งที่ 1	-	-	-	6.68	5.86	6.7	-	-	25.4
ทำซ้ำครั้งที่ 2	-	-	-	8.44	7.86	8.44	-	-	25.0
ทำซ้ำครั้งที่ 3	-	-	-	7.0	8.9	10.1	-	-	23.1
ค่าเฉลี่ย	-	-	-	7.37	7.54	8.41	-	-	24.5

ตารางที่ 4.3.แสดงขนาดของวงใสของการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ในหน่วย มิลลิเมตร

Escherichia coli	หญ้าหนวดแมว Fct DW	หญ้าหนวดแมว Fct 25% เอทานอล	หญ้าหนวดแมว Fct 50% เอทานอล	หญ้าหนวดแมว Fct 75% เอทานอล	หญ้าหนวดแมว Fct 99.99% เอทานอล	หญ้าหนวดแมว Fct acetone	AG10 40% เอทานอล	AG100 40% เอทานอล	Streptomycin 20 µl/ml
ทำซ้ำครั้งที่ 1	-	-	-	-	-	-	-	-	11
ทำซ้ำครั้งที่ 2	-	-	-	-	-	-	-	-	11.15
ทำซ้ำครั้งที่ 3	-	-	-	-	-	-	-	-	9.2
ค่าเฉลี่ย	-	-	-	-	-	-	-	-	10.45

	หญ้าหนวดแมว Fct DW	หญ้าหนวดแมว Fct 25% เอทานอล	หญ้าหนวดแมว Fct 50% เอทานอล	หญ้าหนวดแมว Fct 75% เอทานอล	หญ้าหนวดแมว Fct 99.99% เอทานอล	หญ้าหนวดแมว Fct acetone	AG10 40% เอทานอล	AG100 40% เอทานอล	Streptomycin 20 µl/ml
ทำซ้ำครั้งที่ 1	-	-	-	-	-	-	-	-	11
ทำซ้ำครั้งที่ 2	-	-	-	-	-	-	-	-	11.15
ทำซ้ำครั้งที่ 3	-	-	-	-	-	-	-	-	9.2
ค่าเฉลี่ย	-	-	-	-	-	-	-	-	10.45

ตารางที่ 4.4 แสดงขนาดของวงใสของการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* ในหน่วยมิลลิเมตร

***หมายเหตุ ขนาดของแผ่น Disk ที่ใช้ คือ 5 mm**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลจากการตรวจวัดการออกฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากหญ้าหนวดแมวพบว่าใน *Staphylococcus aureus* มีการยับยั้งเกิดขึ้นที่ เอทานอล 99.99% แต่ไม่พบการยับยั้งที่สภาวะอื่นเมื่อทำการวัดขนาดของวงใสของการยับยั้งเชื้อแล้วมีขนาด 9.22 มม. และเมื่อนำมาทดสอบกับ *Bacillus subtilis* พบว่ามีการยับยั้งเกิดขึ้นที่ในเอทานอล 75% เอทานอล 99.99% และ Acetone เมื่อทำการวัดขนาดของวงใสของการยับยั้งเชื้อแล้ว จะมีขนาด 7.37 7.54 8.41 มม. ตามลำดับ แต่เมื่อนำการมาทำการทดลองกับ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Escherichia coli* พบว่าไม่พบสารสกัดในสภาวะใดเลยที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ และการใช้ Streptomycin เป็น positive control พบว่ามีการยับยั้งเกิดขึ้นกับทุกเชื้อ โดยผลที่ได้นี้สอดคล้องกับผลของงานวิจัยของ Siti Pauliena Mohd Bohari ,2000 โดยงานวิจัยได้ทำการใช้สารสกัดจากหญ้าหนวดแมวในการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa* และ *Escherichia coli* ผลที่ได้จากการนำสารสกัดที่ถูกแยก fraction มาทำการทดสอบพบว่า *Pseudomonas aeruginosa* และ *Escherichia coli* ไม่พบการเกิดวงใส และ *Staphylococcus aureus* พบการเกิดของวงใส เช่นเดียวกับของงานวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการนำสมุนไพรทั้ง 10 ชนิดได้แก่ ตะไคร้ ยี่หร่า รากปลาไหลเผือก ขี้เหล็ก ดีปลาช่อน ผักติ้ว เสลดพังพอน หญ้าหนวดแมว ทองพันชั่ง และรางจืด นำมาแช่ในน้ำกลั่น เอทานอล 40%และ80% และนำไปตรวจสอบการยับยั้งการเกิด CML โดยวิธีการ ELISA ผลที่ได้คือ หญ้าหนวดแมวที่แช่ในเอทานอล 40% ให้ผลการยับยั้งการเกิด CML ที่ดีที่สุดจากสมุนไพรที่ทำการศึกษาทั้งหมด โดย พบการเกิด CML เพียง 70.077 % จึงนำสารสกัดจากหญ้าหนวดแมวที่ เอทานอล 40% ไปทำการศึกษาต่อด้วยการแยกสารให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้วิธี Stepwise elution chromatography โดยแยกสารออกเป็น 6 fraction ได้แก่ น้ำกลั่น เอทานอล 25%, 50%, 75%, 99.99% และ Acetone จากนั้นนำระเหยเพื่อหาปริมาณสารในสารสกัดแต่ละ fraction และปรับความเข้มข้นแต่ละ fraction ให้เท่ากับ 1 mg/mL และนำไปทดสอบผลการยับยั้งการเกิด CML ผลที่ได้คือที่ fraction เอทานอล 25% ให้ผลการยับยั้งการเกิด CML ที่ดีที่สุดจาก fraction ทั้งหมด โดย พบการเกิด CML เพียง 12.19% เมื่อทำการศึกษาการออกฤทธิ์ต้านจุลชีพพบว่าสารสกัดจากหญ้าหนวดแมวสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis* โดยใน *Staphylococcus aureus* จะพบการยับยั้งการเจริญที่ fraction เอทานอล 99.99% โดยวัดขนาดได้ 9.22 มม. ส่วน *Bacillus subtilis* จะพบการยับยั้งการเจริญที่ fraction เอทานอล 75% เอทานอล 99.99% และอะซิโตนโดยวงใสที่เกิดขึ้นมีขนาด 7.37 ,7.54 ,8.41 มม. ตามลำดับ แต่ไม่พบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Escherichia coli* แต่ในการวิจัยนี้ยังไม่สามารถสรุปได้อย่างแน่ชัดเนื่องจากวงใสที่เกิดขึ้นมีขนาดเล็กใกล้เคียงกับขนาดของแผ่น disk

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ในการศึกษาสารสกัดจากหญ้าหนวดแมว ควรศึกษาโดยแยกการศึกษาเป็นส่วนต่างๆของพืชเพื่อตรวจสอบปริมาณของสารและการออกฤทธิ์ยับยั้งการเกิด CML ของพืชในแต่ละส่วน

5.2.2 สารสกัดจากหญ้าหนวดแมว ควรนำไปศึกษาการยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* เพิ่มเติม เนื่องจากมีการยับยั้งที่หน้าสนใจ สามารถยับยั้งได้ในหลายสภาวะการทดลอง จึงควรศึกษาไปที่การยับยั้งโดยใช้สารในปริมาณต่างๆและแยกการศึกษาไปที่ส่วนต่างๆของพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

Aphiwat Teerawutgulrag, Nuansri Rakariyatham Anchana Chanwitheesuk. (2005). Screening of antioxidant activity and antioxidant. *Food Chemistry*.

Hikari Sugawa , Keita Hirabayashi , Tsuyoshi lkeda , Yoshikazu Hoshi , Ryoji Nagai Yuki Tominaga. (2020). Drosera tokaiensis extract containing multiple phenolic compounds inhibits . *Archives of Biochemistry and Biophysics* , 4.

Lee Suan Chua , Nadia Adrus Siti Pauliena Mohd Bohari. (2021). Biochemical Characterization of Orthosiphon Aristatus and Evaluation of Pharmacological Activities. *HERBS, SPICES & MEDICINAL PLANTS*.

Lee Suan Chua, Nadia Adrus, Zaidah Rahmat & Siti Pauliena Mohd Bohari. (2021). Biochemical Characterization of Orthosiphon. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*.

กรกนก สุวรรณราช ,พิชญ์นรี และคณะ สุรีวัลย์ ดวงจิตต์. (27 มิถุนายน 2561). บทบาทการต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติสำหรับประยุกต์ใช้ทางผิวหนัง .

ชมนาด สิงห์หันต์ และไมตรี สุทธจิตต์. (2016). การยับยั้งออกซิเดชันและไกลเคชันในโรคเบาหวานโดยผักพื้นบ้านไทย. *Science and Technology 2017*.

ณชกนก เมธาอัครเดชา และอนงค์ ศรีโสภา. (2019). ปริมาณฟีนอลิกและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในชาใบหม่อนและชาผงใบหม่อนชนิดละลายน้ำ.

ณัฐา จริยภมรกุร. (2553). *คุณสมบัติของสารสกัดจากการเปลือกองุ่นแดงในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งปฏิกิริยาไกลเคชัน.*

นุศวดี พจนานุกิจ และ สมใจ ขจรชีพพันธุ์งาม. (2010). เปรียบเทียบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกมังคุด ขมิ้นชันและใบบัวบก. *Naresuan University*.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปรัญรัชต์ ธนวยุทธ์ภัคดี. (2559). ไกลเคชั่นกับการเกิดโรคในมนุษย์. *วารสารพิษวิทยาไทย*.

พิทัย กาญบุตร และคณะ ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร. (2551). *การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ.* มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

อรอนงค์ ภูสีฤทธิ์ ธีระพันธ์ เนตรนภา และคณะ. (2020). สารประกอบฟีนอลิกและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรไทยบางชนิด. *วารสารมหาวิทยาลัยราชภัฏร้อยเอ็ด*.

โอภา วัชระคุปต์และคณะ. (2549). สารต้านอนุมูลอิสระ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

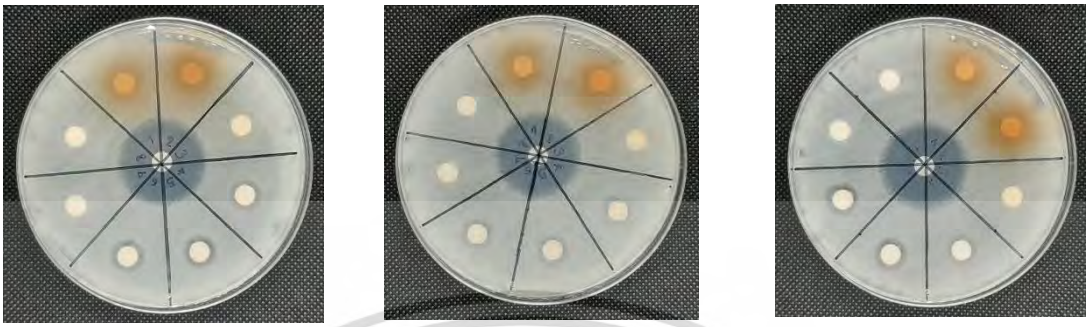
ภาคผนวก ก.

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa*

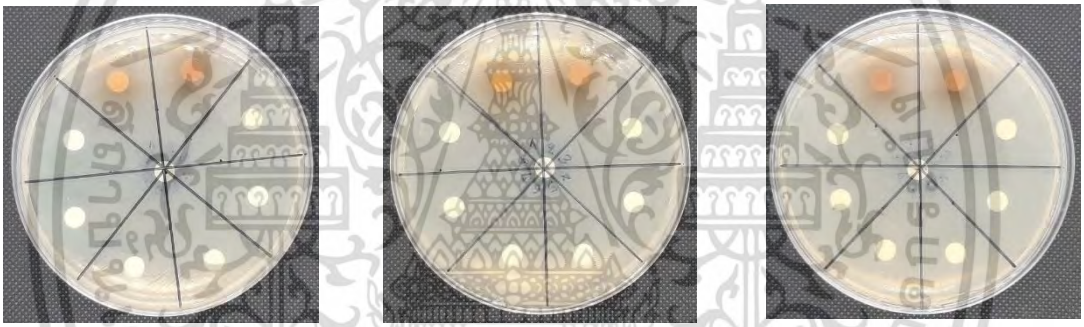
รูปที่ ก1.แสดงการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของ *Staphylococcus aureus* บนอาหารแข็ง Mueller Hinton Agar (MHA) ด้วยวิธีการ disc diffusion

รูปที่ ก.2 แสดงการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของ *Pseudomonas aeruginosa* บนอาหารแข็ง Mueller Hinton Agar (MHA) ด้วยวิธีการ disc diffusion

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ก.3 แสดงการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของ *Bacillus subtilis* บนอาหารแข็ง Mueller Hinton Agar (MHA) ด้วยวิธีการ disc diffusion



รูปที่ ก.4 แสดงการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของ *Escherichia coli* บนอาหารแข็ง Mueller Hinton Agar (MHA) ด้วยวิธีการ disc diffusion

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

ตารางการศึกษาการยับยั้งการเกิด CML ของสารสกัดสมุนไพรไทย

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การเกิด CML ของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 10 ชนิด

	ตะไคร้	ยี่หร่า	ราก ปลาไหลเผือก	ขี้เหล็ก	ดีปลา ช่อน	ผักติ้ว	เสลดพังพอน	หญ้า หนวดแมว	ทองพันชั่ง	รางจืด
0Et	96.036	85.678	68.414	94.501	83.632	88.875	87.212	90.537	70.332	85.422
40Et	96.036	96.292	99.744	91.560	96.036	82.481	97.954	70.077	98.082	86.189
80Et	94.118	93.223	101.407	90.793	96.164	87.596	89.258	85.166	96.036	89.130

ตารางที่ 4.4 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การเกิด CML ของน้ำกลั่นที่วันที่ 0 วันที่ 7 และ Aminoguanidine ในเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ

	วันที่ 0	วันที่ 7	AG10 0% เอทานอล	AG10 40% เอทานอล	AG10 80% เอทานอล	AG100 0% เอทานอล
ทำซ้ำครั้งที่ 1	0.0	94.8	98.6	93.7	102.8	83.9
ทำซ้ำครั้งที่ 2	0.4	100.8	101.9	91.4	93.1	96.7
ทำซ้ำครั้งที่ 3	0.5	104.6	98.5	96.9	98.7	92.9
ค่าเฉลี่ย	0.3	100.	99.7	94.0	98.2	91.2
ค่ามาตรฐาน	0.4	4.9	1.9	2.8	4.9	6.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การเกิด CML ของสารสกัดจากหญ้าหนวดแมวในแต่ละ fraction ที่แยกได้จาก stepwise elution chomatography

	หญ้าหนวดแมว Fct DW	หญ้าหนวดแมว Fct 25% เอทานอล	หญ้าหนวดแมว Fct 50% เอทานอล	หญ้าหนวดแมว Fct 75% เอทานอล	หญ้าหนวดแมว Fct 99.99% เอทานอล	หญ้าหนวดแมว Fct Acetone
ทำซ้ำครั้งที่ 1	53.24	12.96	119.91	108.80	93.05	86.57
ทำซ้ำครั้งที่ 2	56.94	20.83	148.15	134.72	170.83	97.68
ทำซ้ำครั้งที่ 3	37.04	2.77	108.79	103.24	108.79	101.85
ค่าเฉลี่ย	49.07	12.19	125.62	115.58	124.23	95.37
ค่ามาตรฐาน	8.64	7.39	16.56	13.72	33.58	6.45

ตารางที่ 4.6 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การเกิด CML ของน้ำกลั่นที่วันที่ 0 วันที่ 7 และ Aminoguadinine ในเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ

	วันที่ 0	วันที่ 7	AG10 0% เอทานอล	AG10 40% เอทานอล	AG10 80% เอทานอล	AG100 0% เอทานอล
ทำซ้ำครั้งที่ 1	11.11	99.77	127.78	83.33	81.02	17.13
ทำซ้ำครั้งที่ 2	-18.98	111.57	0.00	0.00	0.00	0.00
ทำซ้ำครั้งที่ 3	7.87	87.96	0.00	0.00	0.00	0.00
ค่าเฉลี่ย	0.00	99.77	127.78	83.33	81.02	17.13
ค่ามาตรฐาน	13.48	9.63	0.00	0.00	0.00	0.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
คำรับรองเล่มโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา

วันที่ 27 เดือน พฤษภาคม พ.ศ.2566

ข้าพเจ้า นางสาวเครือวัลย์ คณิตไธสง รหัสประจำตัว 62050573
นายจักริน สองเมือง รหัสประจำตัว 62050575

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาชีววิทยา ขอรับรองว่าโครงงานพิเศษเรื่อง

ชื่อภาษาไทย การตรวจการยับยั้งการเกิดคาร์บอกซีเมทิลไลซีนโดยการใช้สารสกัดสมุนไพรไทย

ชื่อภาษาอังกฤษ Carboxymethyl lysine Inhibition formation determination using thai medicinal plants

ปีการศึกษา 2565

เป็นผลงานวิจัยที่มิได้สอดคล้องหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษาฉบับสมบูรณ์แล้ว

โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 10.09%

ลงชื่อ..... ลงชื่อ.....

(นางสาวเครือวัลย์ คณิตไธสง) (นายจักริน สองเมือง)
นักศึกษา นักศึกษา

ข้าพเจ้า รศ.ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ได้ตรวจสอบโครงงานพิเศษของนักศึกษาข้างต้นแล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ.....

(รศ.ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์)
อาจารย์ที่ปรึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้