

การตรวจวัดการยับยั้งการเกิดคาร์บอกซีเมทิลไลซีนโดยใช้สารสกัด  
เครื่องเทศไทย

Carboxymethyl lysine inhibition formation determination using  
Spices



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษา 2565 ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Carboxymethyl lysine inhibition formation determination using  
Spices



Mintra Yamansabeedeen

Chanathip Tongon

A SPECIALPROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF

THE REQUIREMENT FOR

THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)

DEPATMENT OF BIOLOGY, SCHOOL OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INTITUTE

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้拿去ใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
OF TECHNOLOGY LADKRABANG ACADEMIC YEAR 2022  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# โครงการพิเศษปีการศึกษา 2565

## คณะวิทยาศาสตร์

### สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

.....

**หัวข้อโครงการพิเศษ** การตรวจการยับยั้งการเกิดคาร์บอกซีเมทิลไลซีนโดยใช้สารสกัดเครื่องเทศไทย  
Carboxymethyl lysine inhibition formation determination using Spices

**นักศึกษาผู้จัดทำ** นางสาวมินตรา ยามันสะบีตั้น รหัสนักศึกษา 62050640  
นายชนาธิป ตองอ่อน รหัสนักศึกษา 62050869


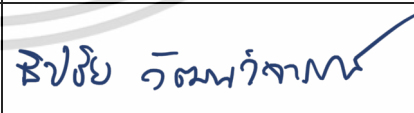

**ปริญญา** วิทยาศาสตร์บัณฑิต

**สาขาวิชา** จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

**ปีการศึกษา** 2565

**อาจารย์ที่ปรึกษา** รศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์

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

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.วิภาวี เดชดีศักดิ์ ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารย์ กรรมการ	
รศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การตรวจการยับยั้งการเกิดคาร์บอกซีเมทิลไลซีนโดยใช้สารสกัดเครื่องเทศไทย Carboxymethyl lysine inhibition formation determination using Spices		
นักศึกษาผู้จัดทำ	นางสาวมินตรา ยามันสะบีตัน	รหัสนักศึกษา	62050640
	นายชนาธิป ตองอ่อน	รหัสนักศึกษา	62050869
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต		
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม		
ปีการศึกษา	2565		
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์		

### บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้เราได้ทำการศึกษาเรื่องผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้ายจากไกลโคเซชันขั้นสูง Advanced glycation end products (AGEs) มนุษย์สัมผัสกับ AGEs หลักๆได้ 2 แหล่ง 1. AGEs จากการรับประทานอาหาร เกิดขึ้นเมื่อปรุงอาหารที่อุณหภูมิสูง เช่น การทอด ย่าง 2. AGEs จากที่รับมาและถูกสร้างขึ้นในร่างกาย AGEs มีบทบาทในการเกิดโรคในระบบอวัยวะต่างๆในร่างกาย ซึ่งมีหลักฐานจากการศึกษาทางพยาธิวิทยาและระบาดวิทยาที่ระบุว่า การได้รับ AGEs นั้นสัมพันธ์กับกลุ่มคนที่เป็นผู้สูงอายุ และมีอัตราสูงขึ้นในผู้ป่วยโรคเบาหวาน ซึ่งหนึ่งในผลิตภัณฑ์ของ AGEs คือ CML เราจึงได้นำเครื่องเทศไทย 10 ชนิดมาทำการทดลองเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้ง CML ที่ความเข้มข้น 0% ,40% และ 80% เอทานอลด้วยวิธี ELISA พบว่ามีเครื่องเทศที่มีฤทธิ์ยับยั้งได้ประมาณหนึ่งคือกานพลูที่ความเข้มข้น 80% เราได้นำตัวของกานพลูที่ความเข้มข้น 80% มาแยกเป็น 6 fraction แล้วมาดูฤทธิ์ยับยั้ง CML ของ AGEs ด้วยวิธี ELISA พบว่ากานพลูที่อยู่ใน fraction 75% เอทานอลมี ฤทธิ์ยับยั้ง CML ดีที่สุดเมื่อได้ความเข้มข้นที่ดีที่สุดแล้ว เราจะทำการศึกษา HPLC เพื่อที่จะดู polyphenol profile หลังจากทำการดูพีคหลังฉีด HPLC แล้วเราได้ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งต่อเชื้อ แบคทีเรีย

**คำสำคัญ:** Advanced glycation end-products (AGEs), CML, กานพลู , ฤทธิ์การต้านจุลชีพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<b>Title</b>	Carboxymethyl lysine inhibition formation determination using Spices		
<b>Student</b>	Miss Mintra Yamansabeeden	<b>Student ID</b>	62050640
	Mr. Chanithip Tongon	<b>Student ID</b>	62050869
<b>Degree</b>	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)		
<b>Department</b>	Biology		
<b>Faculty</b>	Science		
<b>University</b>	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMUTT)		
<b>Academic Year</b>	2022		
<b>Advisor</b>	Assoc. Prof. Dr.Cherdsak Maneeruttanarungroj		

### Abstract

In this research, we investigated the production of end-stage products from advanced glycation end products (AGEs) derived from high-level culinary processes. Humans are primarily exposed to AGEs through two main sources: 1) AGEs formed during the cooking of food at high temperatures, such as frying and grilling, and 2) AGEs acquired and synthesized within the body. AGEs play a role in the development of diseases in various organ systems, supported by evidence from pathological and epidemiological studies linking AGEs intake to the elderly population and higher rates in patients with diabetes. One of the AGEs products is CML. We selected 10 Thai spices to experimentally compare their inhibitory effects on CML at concentrations of 0%, 40%, and 80% using the ELISA method. It was found that one spice, galangal, at an 80% concentration, exhibited significant inhibition of CML. Galangal at 80% concentration was fractionated into six fractions, and the inhibitory effects on CML of each fraction were determined using ELISA. The results showed that the fraction containing 75% ethanol exhibited the strongest inhibition of CML when using the most effective concentration. Subsequently, HPLC analysis was conducted to examine the polyphenol profile after injection. Following the HPLC analysis, the inhibitory effects on bacterial strains were tested.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
**Keyword:** Advanced glycation end-products (AGEs), CML, clove, antimicrobial activity  
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความอนุเคราะห์จากบุคลากรหลายท่าน ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่กรุณาเป็นอย่างยิ่งในการให้คำปรึกษา แนะนำระหว่างการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้ รวมทั้งการสนับสนุนในด้านต่างๆ ตลอดจนตรวจทานแก้ไขปริญญานิพนธ์ให้มีความถูกต้องสมบูรณ์และความช่วยเหลือทางด้านเครื่องมือโดยบุคลากรหลายๆฝ่าย ในการชี้แนะและสนับสนุนการใช้เครื่องมือ และอุปกรณ์ทดลองต่างๆในการทำงานวิจัยครั้งนี้ผู้ทำการวิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.วิภาวี เดชดีศักดิ์ ประธานกรรมการ และผศ.ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ กรรมการ อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่กรุณาให้คำแนะนำ ตรวจทาน และสละเวลาเข้าร่วมการสอบปริญญานิพนธ์และขอขอบพระคุณ Prof.Dr.Ryoji Nagai จาก Graduate School of Agriculture, Tokai University (Kumamoto campus) ประเทศญี่ปุ่นที่ได้เอื้อเฟื้อ anti-CML antibody สำหรับในการติดตาม การวัดการยับยั้งการเกิด CML ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณรุ่นพี่มหาดินชาติและนักวิทยาศาสตร์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่กรุณาให้คำแนะนำในด้านต่างๆ เช่น สารเคมีที่จำเป็นต้องใช้ในการทดลอง เทคนิคการใช้เครื่องมือต่างๆ ตลอดจนการใช้ห้องปฏิบัติการ

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และเพื่อนๆ ที่ให้ความช่วยเหลือและสนับสนุนตลอดมา กระทั่ง คณะผู้จัดทำงานวิจัยประสบผลสำเร็จในการทำปริญญานิพนธ์ครั้งนี้ไปด้วยดี

คณะผู้จัดทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ .....	ก
Abstract .....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง .....	ฉ
สารบัญรูป.....	ช
<b>บทที่ 1 บทนำ .....</b>	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ.....	1
1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ .....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>	<b>3</b>
2.1 กระบวนการไกลเคชัน.....	3
2.2 กระบวนการเกิดไกลเคชัน (Glycation process) ภายในเซลล์.....	5
2.3 การต้านการเกิดปฏิกิริยาไกลเคชัน.....	7
2.4 การตรวจวัด AGEs ด้วย ELISA.....	8
2.5 Antimicrobial susceptibility testing.....	8
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Literature review).....	9
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....</b>	<b>12</b>
3.1 เครื่องมือ.....	12
3.2 อุปกรณ์.....	12
3.3 สารเคมี.....	12
3.4 ขั้นตอนการดำเนินงาน.....	14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<b>บทที่ 4 ผลการทดลอง</b> .....	17
4.1 การศึกษาการยับยั้งการเกิด CML ของสารสกัดจากเครื่องเทศไทย .....	17
4.2 การศึกษาสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเกิด CML ที่อยู่ในกานพลู.....	20
4.3 การตรวจสอบประเภทของสารที่อยู่ภายในสารสกัดกานพลู ด้วยวิธี HPLC .....	23
4.4 การศึกษาการทดสอบเคลียร์โซนของแบคทีเรียต่อสารต้านจุลินชีพของสารสกัดจาก กานพลู (antimicrobial susceptibility testing) .....	25
<b>บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ</b> .....	31
5.1 สรุปผลการทดลอง .....	31
5.2 ข้อเสนอแนะ .....	32
<b>เอกสารอ้างอิง</b> .....	33
<b>ภาคผนวก</b> .....	36



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 4.4.1 แสดงผลการทดสอบเชื้อยีสของแบคทีเรียต่อสารต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจาก กานพลู ใน condition ต่างๆ โดยเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> TISTR 2370.....	26
ตารางที่ 4.4.2 แสดงผลการทดสอบเชื้อยีสของแบคทีเรียต่อสารต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจาก กานพลู ใน condition ต่างๆ โดยเชื้อ <i>E. coli</i> TISTR 074.....	27
ตารางที่ 4.4.3 แสดงผลการทดสอบเชื้อยีสของแบคทีเรียต่อสารต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจาก กานพลู ใน condition ต่างๆ โดยเชื้อ <i>B. subtilis</i> TISTR 1248.....	28
ตารางที่ 4.4.4 แสดงผลการทดสอบเชื้อยีสของแบคทีเรียต่อสารต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจาก กานพลู ใน condition ต่างๆ โดยเชื้อ <i>S. aureus</i> TISTR 746.....	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
รูปที่ 2.1 แสดงกระบวนการไกลเคชั่นในสิ่งมีชีวิต.....	4
รูปที่ 2.2 การเกิด AGEs ภายในเซลล์ (AGEs formation pathway <i>in vivo</i> ).....	6
รูปที่ 4.1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของการเกิด CML ของสารสกัดเครื่องเทศไทยทั้ง 10 ชนิดที่ความยาวคลื่น 492 nm.....	18
รูปที่ 4.2 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของการเกิด CML ที่ความยาวคลื่น 492 nm.....	19
รูปที่ 4.3 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของการเกิด CML ที่ความยาวคลื่น 492 nm.....	21
รูปที่ 4.4 แสดงหน้าโปรไฟล์ HPLC ของสารสกัดกานพลู fraction เอทานอล 75% โดยตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 365 nm.....	23-24
รูปที่ 4.5 แสดงลักษณะของเคลียร์โซนของแบคทีเรียต่อสารต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากกานพลู ด้วยวิธี Disk Diffusion โดยเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> TISTR 2370 บนอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA).....	25
รูปที่ 4.6 แสดงลักษณะของเคลียร์โซนของแบคทีเรียต่อสารต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากกานพลู ด้วยวิธี Disk Diffusion โดยเชื้อ <i>E. coli</i> TISTR 074 บนอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA).....	26
รูปที่ 4.7 แสดงลักษณะของเคลียร์โซนของแบคทีเรียต่อสารต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากกานพลู ด้วยวิธี Disk Diffusion โดยเชื้อ <i>B. subtilis</i> TISTR 1248 บนอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA).....	27
รูปที่ 4.8 แสดงลักษณะของเคลียร์โซนของแบคทีเรียต่อสารต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากกานพลู ด้วยวิธี Disk Diffusion โดยเชื้อ <i>S. aureus</i> TISTR 746 บนอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA).....	28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปฏิกิริยาเมลลาร์ด เป็นหนึ่งในปฏิกิริยาที่พบบ่อยและซับซ้อนที่สุดที่เกิดขึ้นในอาหารเป็นหลัก ในปี 1912 นักเคมีชาวฝรั่งเศส Louis Camille Maillard ค้นพบปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาล (Sugar reducing) และกรดอะมิโน (Amino acid) ในระหว่างกระบวนการให้ความร้อนของอาหารทำให้เกิดสีเหลืองน้ำตาล เรียกว่า Maillard reaction หรือ Advanced glycation end product ซึ่งกระบวนการเกิดขึ้นอย่างช้าๆในร่างกาย ที่เรียกว่า ไกลเคชั่น

ผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้ายจากไกลเคชั่นขั้นสูง หรือ Advanced glycation end product (AGEs) เกิดจากกระบวนการเมื่อร่างกายได้รับน้ำตาล ซึ่งจะไปเกาะกับโครงสร้างร่างกาย คือ โปรตีน ไขมัน จึงเกิดปฏิกิริยาเคมีทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในรูปร่าง เซลล์ผิดปกติที่แข็งแรงกว่าเดิม มีความยืดหยุ่นน้อย และทำให้อวัยวะเสื่อมเร็วขึ้น ซึ่งมนุษย์สัมผัสกับ AGEs หลักๆได้ 2 แหล่ง 1. AGEs จากการรับประทานอาหาร เกิดขึ้นเมื่อปรุงอาหารที่อุณหภูมิสูง เช่น การทอด ย่าง และอาหารแปรรูปที่อุณหภูมิสูงบางชนิด เช่น ผลิตภัณฑ์นมพาสเจอร์ไรซ์ ชีส ไส้กรอก เนื้อสัตว์แปรรูป และซีเรียอาหารเข้า ทั้งนี้จะก่อให้เกิดสารที่ชื่อว่า N<sup>E</sup>-(Carboxymethyl) lysine (CML) 2. AGEs จากที่รับมาและถูกสร้างขึ้นในร่างกาย AGEs มีบทบาทในการเกิดโรคในระบบอวัยวะต่างๆในร่างกาย ซึ่งมีหลักฐานจากการศึกษาทางพยาธิวิทยาและระบาดวิทยาที่ระบุว่า การได้รับ AGEs นั้นสัมพันธ์กับกลุ่มคนที่เป็นผู้สูงอายุ และมีอัตราสูงขึ้นในผู้ป่วยโรคเบาหวาน เกิดขึ้นในระบบอวัยวะ เช่น สมอง ตา หัวใจ ไต กระดูก กล้ามเนื้อและเส้นเอ็น เม็ดเลือดแดง และตับ (Richard *et al.*, 2010) ทำให้อวัยวะต่างๆเกิดการลดประสิทธิภาพในการทำงานลง เป็นผลมาจากสารที่ชื่อว่า CML

ดังนั้นในการศึกษานี้ เราได้ทำการศึกษา CML จากเครื่องเทศไทย 10 ชนิด ได้แก่ พริกไทยดำ พริกขี้หนูป่น อบเชย กระวาน กานพลู เม็ดเทียนข้าวเปลือก โป๊ยกั๊ก เม็ดยี่หระ ลูกผักชี และขมิ้นชัน ว่าสารสกัดจากเครื่องเทศไทย 10 ชนิดนี้ มีความสามารถในการยับยั้งการเกิด CML ได้มากน้อยแค่ไหน (Chen *et al.*, 2016) เราจึงทำการทดสอบการเกิด CML ด้วยวิธี ELISA

### 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อวัดการยับยั้งการสร้าง N<sup>E</sup>-(Carboxymethyl) lysine (CML) ด้วยวิธี ELISA โดยใช้สารสกัดเครื่องเทศไทยทั้ง 10 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เพื่อวิเคราะห์โปรไฟล์ของสารฟีนอลิกโดยวิธี HPLC สำหรับความเป็นไปได้ในการแยกสารสกัดเครื่องเทศไทย
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินชีพของแบคทีเรียต่อสารสกัดจากกานพลู

### 1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

ศึกษาความสามารถในการยับยั้งการสรั้ง CML ของเครื่องเทศไทย ทำการศึกษาโดยเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการสรั้ง CML ของเครื่องเทศไทยทั้ง 10 ชนิด โดยใช้เอทานอลที่มีความเข้มข้น 0 40 และ 80 เปอร์เซ็นต์เพื่อศึกษาพารามิเตอร์ที่คาดว่าจะมีผลต่อความสามารถในการสกัดสารสกัดที่สามารถยับยั้ง CML

### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงความสามารถในการยับยั้ง CML ของเครื่องเทศไทยทั้ง 10 ชนิด
2. ทราบถึงประสิทธิภาพของเอทานอลในการสกัดสารสกัดเครื่องเทศไทยที่ความเข้มข้นของเอทานอลที่ต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

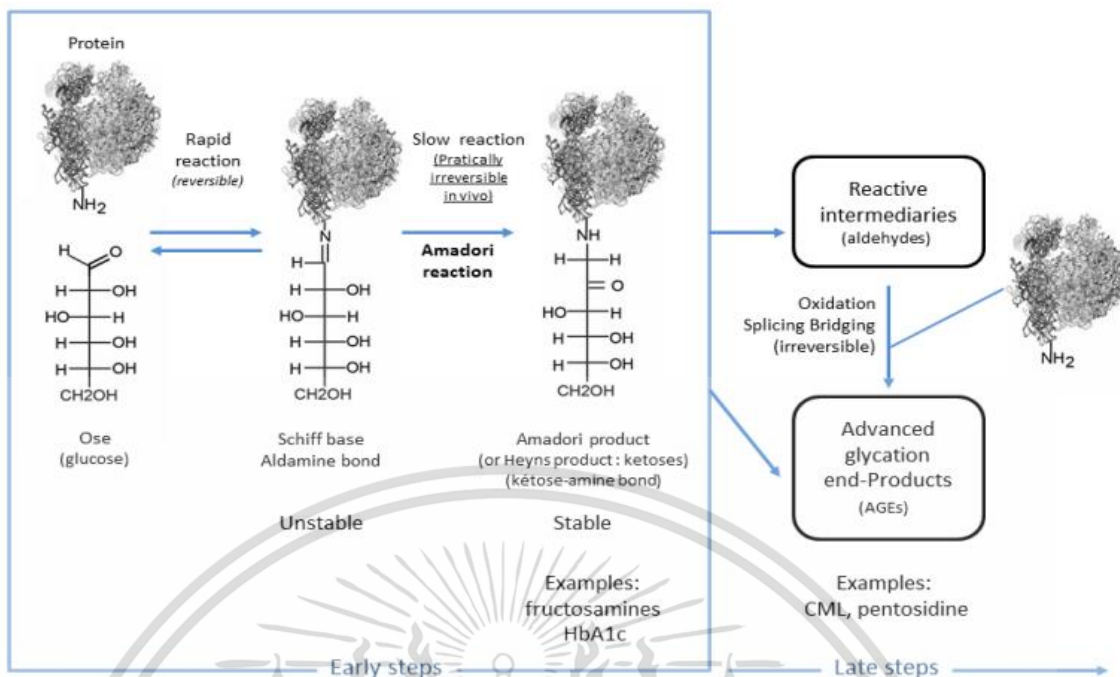
### ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 กระบวนการไกลเคชัน

ไกลเคชัน (Glycation) เป็นปฏิกิริยาเมลลาร์ด ซึ่งเป็นกระบวนการเกิดสารสีน้ำตาลที่ไม่ต้องใช้เอนไซม์ (non-enzymatic browning reaction) เกิดจากการทำปฏิกิริยาของสารตั้งต้น 2 ชนิด คือ amino group ของโปรตีน (ที่สำคัญคือ  $\epsilon$ -amino group ของ lysine และ guanidine group ของ arginine) กับ carbonyl group ของน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่ง (reducing sugar) หรือสารประกอบคาร์บอนิล (carbonyl compounds) อื่นๆ สารสีน้ำตาลที่เกิดขึ้นในระยะสุดท้ายของปฏิกิริยาจะเรียกว่า Advanced glycation end products (AGEs) ซึ่งเป็นสารประกอบที่เกิดขึ้นได้ในสิ่งมีชีวิตและจากกระบวนการปรุงอาหาร AGEs ยังเป็นสารประกอบที่สามารถจับได้กับโปรตีนภายในและภายนอกเซลล์ เป็นสารที่ถือว่าเป็นตัวชี้วัดการเกิดการแก่ของเซลล์ (วารสารพิษวิทยาไทย, 2559)

ไกลเคชัน (Glycation) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโดยการเชื่อมข้ามสายโมเลกุล (cross-linking) เป็น Schiff base Amadori product และ 3-deoxyglucosone ตามลำดับ จนให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่เกิดจากการทำปฏิกิริยานี้ในรูปของสาร AGEs ซึ่งถือว่าเป็นสารพิษที่เรียกว่า ไกลโคท็อกซิน (glycotoxins) ทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของเซลล์ ส่งผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของอวัยวะนั้นให้ทำงานน้อยลง (Baynes *et al.*, 1989) ความหลากหลายของ AGEs ดังแสดงในรูปที่ 2.1 ขึ้นกับ glycating agent ยกตัวอย่างเช่น AGEs ที่ได้จาก glyoxal ได้แก่ Carboxymethyl lysine (CML), glyoxal lysine dimer (GOLD) AGEs ที่ได้จาก methylglyoxal ได้แก่ Carboxyethyl lysine (CEL), argpyrimidine, methylglyoxal lysine dimers (MOLD) และอื่นๆ และ AGEs ที่ได้จาก 3-deoxyglucosone (3DG) ได้แก่ pyralline and deoxyglucosone-derived lysine dimer (DOLD) (Maxime *et al.*, 2018)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 แสดงกระบวนการไกลเคชันในสิ่งมีชีวิต (Fournet *et al.*, 2018)

AGEs สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดความเสียหายแก่ Extracellular matrix หรือ ECM และเซลล์ผ่าน 3 กลไกหลักดังนี้

1. สะสมอยู่ใน ECM เช่น collagen และ elastic fiber และเกิดการ cross-linking ระหว่าง AGEs กับ ECM ทำให้เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) สูญเสียความยืดหยุ่น โดยเฉพาะการ cross-linking ระหว่าง AGEs และคอลลาเจน จะทำให้คุณสมบัติเชิงกลของคอลลาเจนเปลี่ยนแปลงไป ส่งผลให้เกิดริ้วรอยได้
2. AGEs ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงโปรตีนภายในเซลล์ผ่านกระบวนการไกลเคชันจะทำให้เซลล์สูญเสียการทำงานเดิม โดยถ้าหากมีการเปลี่ยนแปลงโปรตีนที่เป็นตัวส่งสัญญาณ จะทำให้การทำงานของเซลล์ และการแสดงออกของยีนแยะลง เช่น จะไปลดการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant enzyme) รวมทั้ง ตัวเร่งปฏิกิริยา (catalase), กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) และกลูตาไธโอนรีดักเตส (glutathione reductase) ซึ่งการไปลดการทำงานของเอนไซม์เหล่านี้จะทำให้ภาวะเครียดออกซิเดชันในเซลล์เพิ่มขึ้น ยิ่งไปกว่านั้น โปรตีนที่ผ่านกระบวนการไกลเคชันจะถูกกำจัดผ่าน ubiquitin-dependent 20S proteasome-mediated

proteolysis ซึ่ง AGEs สามารถไปรบกวนกระบวนการนี้ได้ ทำให้โปรตีนที่ผ่านกระบวนการไกลเคชันในเซลล์เพิ่มขึ้น อัจฉริยะถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. จับกับ Receptor (RAGE) โดย RAGE เป็นโมเลกุลที่อยู่บริเวณผิวเซลล์ที่โดดเด่นในการจดจำ AGEs การจับกันระหว่าง RAGE และ AGEs จะเปลี่ยนแปลงการทำงานของเซลล์ ซึ่งส่วนใหญ่จะเกิดผ่านโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ โดยกระตุ้นให้เกิดการอักเสบผ่าน inflammatory signaling pathway นำไปสู่การแก่ชรา นอกจากนี้ RAGE ยังมีหน้าที่ควบคุมกระบวนการทำงานที่สำคัญของเซลล์อีกหลายอย่าง เช่น การตาย (apoptosis) การส่งสัญญาณ ROS การเพิ่มจำนวนเซลล์ และการกลืนกินตัวเอง (autophagy) (Kim *et al.*, 2017)

## 2.2 กระบวนการเกิดไกลเคชัน (Glycation process) ภายในเซลล์

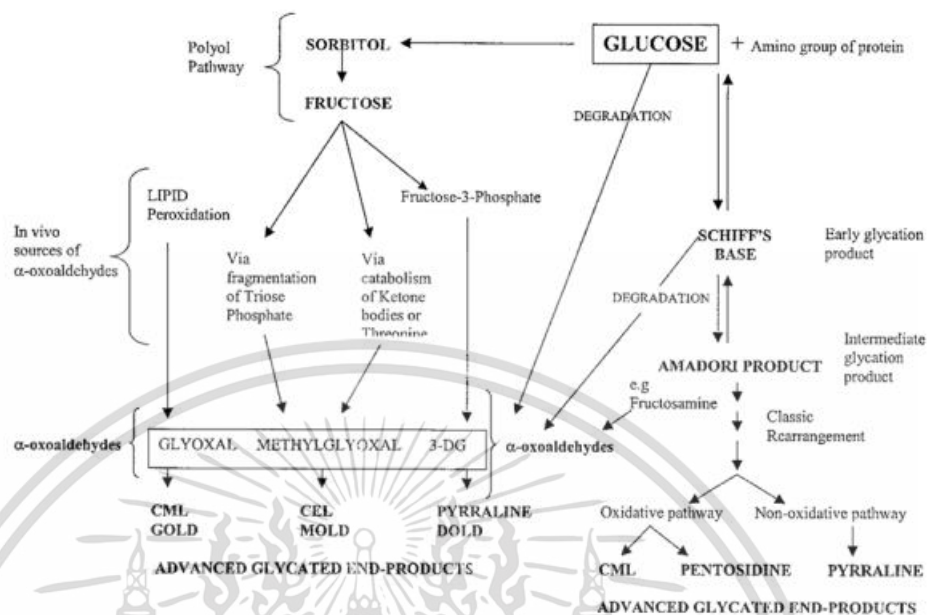
กระบวนการเกิดไกลเคชันเกิดผ่านปฏิกิริยา 3 ขั้นตอน ได้แก่ early, intermediate และ late stage ดังแสดงในรูปที่ 2.2

1. Early stage น้ำตาลกลูโคส หรือ น้ำตาลรีดิวซ์อื่นๆ เช่น น้ำตาลฟรุกโตสหรือการเกิดผ่านปฏิกิริยา polyol pathway ที่น้ำตาลกลูโคสถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลซอร์บิทอล (sorbitol) ด้วยเอนไซม์ aldose reductase โดยมี NADPH เป็นโคแฟกเตอร์และน้ำตาลซอร์บิทอลถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลฟรุกโตสโดยเอนไซม์ sorbitol dehydrogenase เมื่อน้ำตาลทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนอิสระของเอมีน (amine) จะเกิดสารประกอบที่ไม่คงตัวของ aldimine และเปลี่ยนปลงเป็น Schiff base ต่อไป สารที่ไม่มีความคงตัวเหล่านี้จะจัดเรียงตัวใหม่เป็น stable early glycation product ที่เรียกว่า Amadori product
2. Intermediate stage ในขั้นตอนนี้จะเกิดผ่านหลายปฏิกิริยาเช่น dehydration oxidation ทำให้ Amadori product เกิดการสลายเป็นกลุ่มสารประกอบ reactive dicarbonyl เช่น glyoxal, methylglyoxal และ deoxyglucosones ที่มีความไวในการเกิดปฏิกิริยามากกว่าน้ำตาลที่เป็นสารตั้งต้นจึงเป็นตัว propagator ที่จะทำปฏิกิริยาอีกครั้งกับ free amino groups ของ biomolecules
3. Late stage ในขั้นสุดท้ายของกระบวนการ glycation จะเกิดผ่านปฏิกิริยา oxidation, dehydration และ cyclization ทำให้เกิดสารที่เป็น irreversible compounds ที่เราเรียกว่า Advanced glycation end products (AGEs)

การจัดเรียงตัวใหม่ของ Amadori ทำให้เกิด reactive intermediate products คือ สารประกอบ  $\alpha$ -dicarbonyl หรือ oxoaldehydes ที่ประกอบด้วย glyoxal, methylglyoxal และ 3-DG ซึ่ง reactive intermediate products เหล่านี้สามารถที่จะเกิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ผ่านการตรวจสอบและแก้ไขเรียบร้อยแล้ว จึงถือได้ว่าเป็น “focus point” ของเนื้อหา  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ก็ริ้วบั้นการเกิด AGEs นั้นคือ ผ่านทั้งจาก Maillard reaction, polyol pathway,

catabolism ของ ketone body หรือ threonine และ lipid peroxidation (วารสาร  
 พิษวิทยาไทย, 2559)



รูปที่ 2.2 การเกิด AGEs ภายในเซลล์ (AGEs formation pathway *in vivo*)

3DG, 3-deoxyglucosone; MGO, methylglyoxal; CML, N- $\epsilon$ -  
 (carboxymethyl) lysine; CEL, N- $\epsilon$ - (carboxyethyl) lysine; DOLD,  
 deoxyglucosone-lysine dimer; MOLD, methyl glyoxal-lysine dimer;  
 GOLD, glyoxal-lysine dimer (Singh *et al.*, 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.3 การต้านการเกิดปฏิกิริยาไกลเคชั่น

การศึกษาเกี่ยวกับการต้านปฏิกิริยาไกลเคชั่นหรือการต้านการเกิด AGEs นั้น ได้ทำการศึกษา ทั้งในสารสังเคราะห์ (synthetic compounds) และผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ (natural products) โดย synthetic AGEs inhibitors ที่มีการค้นพบจนถึงขณะนี้ สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

1. Carbonyl trapping agents ช่วยลดการเกิด AGEs
2. Metal ion chelators ช่วยลดการเกิดออกซิเดชัน
3. Cross-link breakers ที่ช่วยสลาย AGE cross-link

อย่างไรก็ตาม synthetic AGEs inhibitors แม้จะมีความสามารถในการยับยั้งการเกิด AGEs แต่หลายๆตัวได้ถูกถอนออกจาก clinical trials เพราะมีประสิทธิภาพต่ำ (low efficacies) มีเภสัชจลศาสตร์ที่ไม่ดี (poor pharmacokinetics) และไม่แน่ใจว่าปลอดภัยเกี่ยวกับความปลอดภัย (unsatisfactory safety) ตัวอย่างเช่น Aminoguanidine ซึ่งเป็นยายับยั้งปฏิกิริยาเมลลาร์ดชนิดแรก และเป็นยาที่ทำให้ภาวะแทรกซ้อนจากเบาหวานดีขึ้นในสัตว์ทดลอง แต่การนำไปใช้ยังจำกัดเพราะยานี้ก่อให้เกิดความเป็นพิษและมีผลข้างเคียงใน clinical trials มีข้อมูลจากการวิจัยแสดงถึงความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของความสามารถในการต้านไกลเคชั่นจากสารในกลุ่มฟีนอลิก (phenolic) ในพืชผักที่บริโภค รวมถึงมีรายงานว่าสาร oligo และ polysaccharides, carotenoids และ unsaturated fatty acids สามารถต้านไกลเคชั่นได้เช่นกันเพราะฉะนั้นการบริโภคอาหารจากพืชที่เป็นแหล่งของสารต้านออกซิเดชันจะสามารถยับยั้งการเกิดไกลเคชั่นได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์กับการต้านการเกิดโรคเรื้อรัง เช่น โรคเบาหวาน (Diabetes mellitus) และการเกิดภาวะแทรกซ้อนจากโรคเบาหวาน

การค้นหา AGEs inhibitor จากแหล่งอาหารธรรมชาติในต่างประเทศมีการศึกษาค่อนข้างมาก โดยทำการศึกษาในพืชหลากหลายชนิด อาทิเช่น สารสกัดจากใบฝรั่ง herbal infusion ชนิดต่างๆของประเทศไต้หวันเทียบกับชาเขียว และสารสกัดจาก Lemon balm และ tropical medicinal herb ของสหราชอาณาจักร พบความสัมพันธ์แบบ strong correlation ระหว่าง Total phenolic กับ Anti-glycation สำหรับประเทศไทยพบว่ามีการศึกษาแบบ *In vitro* anti-glycation โดยมีการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการต้านไกลเคชั่นระหว่าง Thai herbal teas กับ conventional teas (วารสารพิษวิทยาไทย, 2559)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.4 การตรวจวัด AGEs ด้วย ELISA

ก่อนหน้านี้นี้เราพบว่าผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้ายไกลเคชั่นขั้นสูงที่ได้มาจากกลีเซอรอลดีไฮด์ (glycer-AGEs) ทำให้เกิดความเครียดจากออกซิเดชันและทำให้เกิดการอักเสบและการเกิดลิ่มเลือดอุดตันผ่านความสัมพันธ์ที่สูงขึ้นกับ RAGE (ตัวรับAGEs) ซึ่งมีบทบาทในภาวะแทรกซ้อนของหลอดเลือดในผู้ป่วยเบาหวานนอกจากนี้ระดับเซรัมของไตรกลีเซอไรด์ยังเพิ่มขึ้นภายใต้สภาวะความเครียดจากการเกิดออกซิเดชันการอักเสบ หรือโรคเบาหวานและเกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ของอนุมูลอิสระ ความผิดปกติของบุผนังหลอดเลือดการอักเสบของหลอดเลือดและการอักเสบของหลอดเลือดลดจำนวนและกิจกรรมการอพยพของเซลล์ต้นกำเนิดบุผนังหลอดเลือดในมนุษย์ อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการพัฒนาระบบ monoclonal antibody (mAb) ที่ใช้แอนติบอดีที่เชื่อมโยงกับ (ELISA) สำหรับ glycer-AGEs ในซีรัมของมนุษย์ที่ง่ายและเชื่อถือได้ ในการศึกษาครั้งนี้ เราพัฒนาและจำแนก mAb ที่เลี้ยงเทียบกับ glycer-AGEs (AGE-mAb) และตรวจสอบประโยชน์ทางคลินิกของ mAb สำหรับประเมินระดับ glycer-AGE ในเนื้อเยื่อและซีรัมหรือพลาสมาของมนุษย์ (Matsui *et al.*, 2015)

## 2.5 Antimicrobial susceptibility testing

การระบุแบคทีเรียที่มีนัยสำคัญทางคลินิกในห้องปฏิบัติการและประสิทธิภาพของความไวต่อยาต้านจุลชีพการทดสอบ (AST) ให้ข้อมูลที่จำเป็นสำหรับการจัดการที่ถูกต้องของผู้ป่วยที่ติดเชื้อแบคทีเรีย อย่างไรก็ตาม ผลลัพธ์จะพร้อมใช้งานเมื่อเกิดความล่าช้า 48–72 ชั่วโมงหลังการสุ่มตัวอย่างเนื่องจากแบคทีเรียจำเป็นต้องเพาะเลี้ยงก่อนจึงจะสามารถดำเนินการ AST ได้ ผู้ป่วยต้องได้รับยาปฏิชีวนะเชิงประจักษ์ ความไวต่อยาปฏิชีวนะที่ลดลงและคาดเดาไม่ได้อาจนำไปสู่การรักษาที่ไม่เพียงพอและกระตุ้นให้เกิดการใช้ยาปฏิชีวนะในวงกว้างเชิงประจักษ์ การปรับลดระดับการรักษาจะใช้ได้เฉพาะเมื่อผลการตรวจ AST ใช้ได้เท่านั้น โดยมีผลที่ตามมาในทันทีและระยะยาว เช่น การเกิดขึ้นของจุลินทรีย์ที่ดื้อต่อยาหลายชนิด และความเสี่ยงที่เพิ่มขึ้นของการติดเชื้อขั้นรุนแรง การเจ็บป่วย การตาย และค่าใช้จ่าย

วิธีที่ใช้บ่อยที่สุดสำหรับ AST คือ วิธีฟิโนไทป์แบบดั้งเดิม ซึ่งอาศัยการเพาะเลี้ยงบนวุ้น (เช่น การทดสอบ disk diffusion) หรือบนแผ่นไมโครไทเทรต (เช่น การทดสอบ broth dilution) disk diffusion มีข้อดีหลายอย่าง เนื่องจากมีราคาถูก ยึดหยุ่นได้ และช่วยให้มองเห็นการเจริญเติบโต เชื้อที่ต้องการ เชื้อผสม และความผิดปกติอื่นๆ ประโยชน์อีกประการหนึ่งคือความเป็นไปได้ในการดำเนินการทดสอบความไวต่อแสงโดยตรง (DST) โดยมีเป้าหมายที่เวลาตอบสนองที่สั้นลง DST ได้รับการฝึกฝนในห้องปฏิบัติการบางแห่งและรายงานในเอกสารหลายฉบับ (Coorevits *et al.*, 2015)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Literature review)

จากงานวิจัยของ Fournet *et al.*, (2018) ได้ศึกษาเกี่ยวกับ ความเสียหายจากไกลโคเซชัน: ศูนย์กลางที่เป็นไปได้สำหรับความผิดปกติทางพยาธิสรีรวิทยาที่สำคัญและรื้อรอย ไกลโคเซชันเป็นทั้งกระบวนการทางสรีรวิทยาและทางพยาธิวิทยา ซึ่งส่งผลต่อโปรตีนกรดนิวคลีอิก และลิพิด เป็นส่วนใหญ่ ไกลโคเซชันจากภายนอกและภายในก่อให้เกิดปฏิกิริยาที่เป็นอันตรายที่เกิดขึ้นโดยเฉพะอย่างยิ่ง ในสภาพแวดล้อมเมทริกซ์นอกเซลล์หรือภายในเซลล์ไซโตซอลและออร์แกเนลล์ การก่อตัวของผลิตภัณฑ์ ขั้นสุดท้ายไกลโคเซชันขั้นสูง(AGE) เริ่มต้นโดยไกลโคเซชันที่ไม่ใช่เอนไซม์ของหมู่อะมิโนอิสระ โดยน้ำตาลและอัลดีไฮด์ ซึ่งนำไปสู่การจัดเรียงใหม่ของ สารประกอบชั้นกลางอย่างต่อเนื่อง ปัจจัยด้านอีพิเจเนติกส์ ความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน รังสียูวี และโภชนาการ เป็นสาเหตุสำคัญของการสะสม AGEs ทางเคมีและโครงสร้างที่แตกต่างกันด้วยปฏิกิริยาทางชีวภาพต่างๆ เชื่อมโยงข้ามโปรตีนที่ได้จากกระบวนการไกลโคเซชันนำเสนอทั้งโครงสร้างและหน้าที่ที่เปลี่ยนแปลงไป นิวคลีโอไทด์และลิพิดเป็นเป้าหมายที่เปราะบางเป็นพิเศษ ซึ่งสามารถสนับสนุนการกลายพันธุ์ของ DNA หรือความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ที่ลดลงและวิถีทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องตามลำดับ ไนโมโตคอนเดรีย ผลของไกลโคเซชันสามารถเปลี่ยนแปลงการผลิตพลังงานชีวภาพได้ ภายใต้สภาวะทางสรีรวิทยา การป้องกันไกลโคเซชันก็เพียงพอแล้ว โดยโปรตีนไอโซมจะป้องกันการสะสมของโปรตีนไกลโคเซต ในขณะที่การหมุนเวียนของไขมันจะล้างผลิตภัณฑ์ไกลโคเซชันและการซ่อมแซมนิวคลีโอไทด์ที่ตัดออกจะกำจัดนิวคลีโอไทด์ไกลโคเซชัน หากไม่เกิดขึ้น ความเสียหายจากไกลโคเซชันจะสะสมและอาจเกิดโรคได้ เป็นที่ทราบกันดีว่าผลิตภัณฑ์ชีวภาพที่เหนียวทำให้เกิดไกลโคเซชันส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับอายุที่มากขึ้น, ความผิดปกติของการเชื่อมต่อของระบบประสาท, เบาหวานและภาวะแทรกซ้อน, หลอดเลือด, ไตวาย, การเปลี่ยนแปลงทางภูมิคุ้มกัน, จอประสาทตา, ผิวหนังอักเสบจากแสง, โรคกระดูกพรุน, และการลุกลามของเนื้องอกบางชนิด

จากงานวิจัยของ Ersoy *et al.*, (2017) ได้ศึกษาการเกิดขึ้นและการแพร่ระบาดของแบบคทีเรียที่ทนต่อยาปฏิชีวนะเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตที่เพิ่มขึ้นทั่วโลกซึ่งนำไปสู่"การเรียกร้องการดำเนินการ "ทั่วโลกเพื่อหลีกเลี่ยงการกลับไปสู่ยุคที่ไม่มียาปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพ แม้จะมีสถานการณ์เร่งด่วนแต่อุตสาหกรรมการดูแลสุขภาพยังคงพึ่งพาการทดสอบทางชีวภาพในหลอดทดลองอย่างเดียว เพื่อกำหนดประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะ การวิเคราะห์นี้ล้มเหลวในการรวมปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมที่มีอยู่ในระหว่างการปฏิสัมพันธ์ระหว่างโฮสต์กับเชื้อโรคในร่างกายซึ่งส่งผลต่อประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะอย่างมีนัยสำคัญ ที่นี้เรารายงานว่าการทดสอบความไวของยาด้านเชื้อ

แบบคทีเรียมาตรฐาน (AST) ล้มเหลวในการตรวจหายาปฏิชีวนะที่ใช้งานได้จริงในร่างกาย และรูปแบบเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าของหนูที่ติดเชื่อ ได้รับการยืนยันเพิ่มเติมว่ายาปฏิชีวนะเหล่านี้ไม่ได้ผล เป็นที่น่าสังเกตว่า AST ที่ไม่ผ่านการใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดำเนินการในสื่อที่จำลองสภาพแวดล้อมของโฮสต์ ประสบความสำเร็จในการระบุยาปฏิชีวนะที่เฉพาะเจาะจง ซึ่งมีประสิทธิภาพในการกำจัดแบคทีเรียและการอยู่รอดของโฮสต์ แม้ว่ายาปฏิชีวนะเดียวกันเหล่านี้ล้มเหลวในผลลัพธ์ของการใช้สื่อทดสอบมาตรฐาน ในทำนองเดียวกันเราได้ปรับปรุงสื่อเพื่อระบุยาปฏิชีวนะที่ไม่ได้ผลในร่างกาย แม้ว่าจะผ่านมาตรฐานทางคลินิกของ AST โซเดียมไบคาร์บอเนตเป็นโมเลกุลที่อุดมสมบูรณ์ในร่างกายที่กระตุ้นการเปลี่ยนแปลงโดยรวมของโครงสร้างแบคทีเรียและการแสดงออกของยีน การเพิ่มโซเดียมไบคาร์บอเนตในสื่อ AST พบว่าเป็นปัจจัยสำคัญในการปรับปรุงค่าที่คาดการณ์ไว้ของ AST ในการรักษาที่เหมาะสม การค้นพบเหล่านี้มีศักยภาพในการปรับปรุงการพัฒนา การทดสอบและการกำหนดยาปฏิชีวนะ

จากงานวิจัยของ Aljarba *et al.*, (2021) ได้ศึกษาโรคเบาหวานเป็นหนึ่งในโรคที่รักษาไม่หายซึ่งส่งผลกระทบต่อผู้คนจำนวนมากทั่วโลก โรคไตจากเบาหวาน (DN) สาเหตุหลักของโรคไตอาจเป็นเพราะขาดการรักษา DN ที่เหมาะสม การศึกษาในปัจจุบัน คือการประเมิน บทบาทของสารสกัด Lagerstroemia speciosa (LSE) ในการบรรเทา DN ในแบบจำลอง streptozotocin rat ของไขมันในเลือดสูง และน้ำตาลในเลือดสูง แบบจำลอง animal ของ DN ถูกเหนี่ยวนำในหนู Sprague Dawley โดยการบริหารสเตรปโตโซโตซิน และเลี้ยงด้วยอาหารแบบตะวันตกเป็นเวลาหกสัปดาห์การให้ยา LSE ในขนาด 400 มก./กก. เป็นเวลา 6 สัปดาห์ LSE แสดงการลดลงอย่าง มีนัยสำคัญในพารามิเตอร์ทางชีวเคมีที่เพิ่มขึ้นเช่น ระดับกลูโคส ตรีเอตินิน และโปรไฟล์ไขมัน การรักษาด้วย LSE ช่วยลดระดับอัลบูมินที่ปรับปรุงแล้ว ระดับผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้ายไกลเคชั่นขั้นสูง ในไตลดลงอย่าง มีนัยสำคัญพร้อมกับการเพิ่มระดับกลูตาไธโอนและการลดลงของลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน เครื่องหมายการอักเสบก็ลดลงเช่นกัน ดังนั้นการรักษาด้วย LSE จึงสามารถป้องกันความเป็นพิษ ต่อไตที่เกิดจากสเตรปโตโซโตซินในหนูได้อย่างมีประสิทธิภาพ LSE อาจทำหน้าที่เป็นตัวเสริมที่เป็นไปได้ สำหรับการบำบัดด้วย DN และจำเป็นต้องตรวจสอบเพิ่มเติม

จากงานวิจัยของ Perez และ Velazquez, (2020) ได้ศึกษาการก่อตัวและการสะสมของผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้ายไกลเคชั่นขั้นสูง (AGEs) และเลนส์อัลโดสรีดักเตสของหนู (RLAR) ที่สร้างขึ้นในกระบวนการ ไกลเคชั่นมีบทบาทที่โดดเด่นในภาวะแทรกซ้อนของโรคเบาหวาน เนื่องจากผลข้างเคียงของ AGEs ในผู้ป่วยเบาหวาน การค้นหาสารต่อต้านวัยใหม่จากพืชที่ไม่มีผลข้างเคียงได้รับความสนใจอย่างมาก จากนักวิจัยในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา มาสำหรับการพัฒนาทางเลือกของการรักษาที่ปรับปรุงภาวะแทรกซ้อนของโรคเบาหวาน ผักโขมสามารถ ย้อนกลับการก่อตัวของ AGEs และ RLAR การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถของกลูโค ปรานไฮโดรฟลาโวนอยด์ที่รู้จัก 10 ชนิดที่

แยกได้จาก *Spinacia oleracea* ต่อการก่อตัวของ AGEs และ RLAR ในการทดลองในหลอดทดลอง และในร่างกาย โดยวัสดุและวิธีการ: สารสกัดเมทานอลจากใบผัก โขมถูก นำไปแยกส่วนโดยใช้วิธีการ

ทางชีวภาพโดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟแบบซิลิกาเจลตามด้วยการกรองเจลโดย Sephadex LH-20 ระบบกลูโคส BSA และชุดวิเคราะห์ทางชีวภาพในหลอดทดลองโดยใช้เลนส์อัลตราสปีดเทสของหนู (RLAR) ถูกนำมาใช้ในการประเมินกิจกรรมการยับยั้งการก่อตัวของ AGEs การเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเบาหวานในปลาเซเบราฟิชโดยการแช่ในสารละลายน้ำตาลกลูโคส 111 มิลลิโมลาร์เป็นเวลา 14 วัน เผยให้เห็นไกลเคชั่นที่เพิ่มขึ้นของโปรตีนในดวงตา การวัดค่าฮีโมโกลบินไกลเคตและฟรุกโตซามีน ถูกนำมาใช้เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านวัยของฟลาโวนอยด์ที่แยกได้ ด้วยการแยกส่วนของสารสกัดเมทานอลจากใบผักโขมด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางชีวภาพ ทำให้สามารถแยกกลูโคโพรานโซไซด์ฟลาโวนอยด์ (1-10) ที่รู้จักได้ 10 ชนิด และการศึกษาทางสเปกโทรสโกปีได้สร้างโครงสร้างของพวกมัน ในบรรดาสารประกอบที่แยกได้ ได้แก่: patuletin-3-O-(2"-coumaroyl-glucosyl)-(1→6)-[apiosyl-(1→2)]-  $\beta$ -D-glucopyranoside (7), patuletin 3-O-(2"-feruloyl glucosyl)-(1→6)-[apiosyl-(1→2)]-  $\beta$ -D-glucopyranoside พวกมันแสดงการยับยั้งที่มีศักยภาพในการก่อตัว AGEs ซึ่งรุนแรงกว่ากลุ่มควบคุมเชิงบวกที่ใช้ในการทดลองแบบต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 เครื่องมือ

- 3.1.1 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow)
- 3.1.2 เครื่องกรองสุญญากาศ (Vacuum Filter)
- 3.1.3 เครื่องแยกสารประกอบ (High Performance Liquid Chromatography : HPLC)
- 3.1.4 เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (Microplate reader)
- 3.1.5 เครื่องชั่ง สี่ตำแหน่ง
- 3.1.6 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Z206A

#### 3.2 อุปกรณ์

- 3.2.1 ขวดรูปชมพู่ขนาด 200 ml (Erlenmeyer flask)
- 3.2.2 ขวดดูแรน (Duran) ขนาด 500 มิลลิลิตร และ 1,000 มิลลิลิตร
- 3.2.3 ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask)
- 3.2.4 ปีกอร์ (Beaker)
- 3.2.5 หลอดเซนติฟิวก์ (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)

#### 3.3 สารเคมี

- 3.3.1 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
- 3.3.2 โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)
- 3.3.3 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )
- 3.3.4 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
- 3.3.5 กรดซิตริก (Citric acid)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้ง 3.3.6 โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตโคเดคกไฮเดรต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) ครั้งที่มีการนำไปใช้

- 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 ( $K-PO_4$ )
- 3.3.12 0.4% BSA (Bovine serum albumin)
- 3.3.13 60 mM Ribose
- 3.3.14 0.5% hydrolyzed casein
- 3.3.15 Aminoguanidine
- 3.3.16 น้ำกลั่น
- 3.3.17 Ethanol 95% ,80%, 40%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.4 ขั้นตอนการดำเนินงาน

#### 3.4.1 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดหยาบเครื่องเทศไทย

ขั้นตอนการเตรียมการสกัดหยาบเครื่องเทศไทยนั้นทำได้โดยนำตัวอย่างเครื่องเทศไทยทั้ง 10 ชนิด ได้แก่ พริกไทยดำ พริกขี้หนูป่น อบเชย ลูกกระวาน กานพลู เม็ดเทียนข้าวเปลือก โป๊ยกั๊ก เม็ดยี่หระ ลูกผักชี และขมิ้นชัน มาบั่นให้ละเอียดจากนั้นใส่ตัวอย่างที่บั่นแล้ว 10 g ในขวด flask ขนาด 200 ml และเติมเอทานอลที่มีความเข้มข้นต่างกัน ดังนี้ 0% 40% 80% ปิดขวด flask ด้วยฟรอยด์ แข็งทั้งไว้เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 ด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ เก็บส่วนใสในหลอด centrifuge แช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

#### 3.4.2 การเตรียมปฏิกิริยา reaction

##### 3.4.2.1 การเตรียมสารละลาย AGEs

ขั้นตอนการเตรียมสารละลาย A เพื่อใช้ในการทดสอบ เตรียม 60 mM Ribose ใน 200 mM โพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ( $K-PO_4$ ) ที่ pH 7.2 และ 0.4% BSA (Bovine serum albumin) ปริมาตร 10 ml นำไปกรองด้วย Syringe filter (sterile) ในตู้ปลอดเชื้อ ผสมสารละลาย A 495  $\mu$ l และสารสกัดจากสมุนไพร 5  $\mu$ l 30 หลอดแรกใส่สารสกัด หลอดที่ 31 ถึง 36 ใส่น้ำเคลฟ 5  $\mu$ l และ หลอดที่ 37 ถึง 43 ใส่อามิโนกวานิดีน 5  $\mu$ l และนำหลอดที่ 31 ถึง 33 (Day 0) นำไปแช่ที่ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นที่เหลือนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

##### 3.4.2.2 วัดปริมาณฤทธิ์ยับยั้ง CML ด้วยวิธี ELISA

###### 3.4.2.2.1 เจือจาง BSA

ทำการเจือจาง BSA ที่มีความเข้มข้น 2,000  $\mu$ g/ml ให้มีความเข้มข้น 10  $\mu$ g/ml จากนั้นนำมาลงใน ELISA plate

###### 3.4.2.2.2 Coat protein

ด้วยการปิเปต BSA ที่มีความเข้มข้น 10  $\mu$ g/ml ปริมาตร 100  $\mu$ l บ่มเป็นเวลา 1 ชม.

###### 3.4.2.2.3 Blocking

ทำการ Blocking ด้วย 200  $\mu$ l ของ 0.5% hydrolyzed casein ใน 1X PBS จากนั้นบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และล้างสารด้วย 1X PBS กับ 0.05% Tween 20 (500  $\mu$ l/ PBS 1 L) หลุมละ 200  $\mu$ l 3 ครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 3.4.2.2.4 Hybridize

Hybridize ด้วย 100  $\mu$ l ของ 0.1  $\mu$ g/ml 1<sup>st</sup> anti-CML ใน washing buffer บ่ม 30 นาที

## 3.4.2.2.5 Hybridize

Hybridize ด้วย 100  $\mu$ l ของ 2<sup>nd</sup> anti-IgG ใน washing buffer จากนั้นล้างด้วย 1X PBS กับ 0.05% Tween 20 (500  $\mu$ l/ PBS 1 L) 3 ครั้ง

## 3.4.2.2.6 เริ่มปฏิกิริยา

เริ่มจากชั่ง *o*-Phenylenediamine Dihydrochloride 5 mg ต่อ 10 ml substrate buffer + 6  $\mu$ l ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) โดยใส่ 100  $\mu$ l/หลุม จากนั้นบ่ม 3-5 นาที จนเป็นสีเหลือง

## 3.4.2.2.7 หยุดปฏิกิริยา

ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย 1M กรดซัลฟิวริก ( $H_2SO_4$ ) 100  $\mu$ l

## 3.4.2.2.8 Microplate reader

อ่านค่าด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ 492 nm

3.4.3 การแยกสารสกัดโดยวิธี Column Chromatography (Nandam *et al.*, 2012)

1. ระเหยตัวอย่างให้แห้งโดยใช้เครื่อง Rotary evaporator
2. นำสารสกัดที่ได้ลงคอลัมน์
3. นำความเข้มข้นของแต่ละตัวอย่างมาทำการแยกแต่ละ fraction (น้ำกลั่น เอทานอล 25% 50% 75% 99.99% และ Acetone)

## 3.4.4 การปรับความเข้มข้นของสารในแต่ละ fraction

1. นำแต่ละ fraction ไประเหยด้วยเครื่อง Rotary evaporator
2. หาน้ำหนักของสารสกัด
3. ปรับให้ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 1 mg/ml ด้วยสารละลายเดียวกันกับ fraction นั้นๆ
4. นำแต่ละ fraction ไปวัดปริมาณฤทธิ์ยับยั้ง CML ด้วยวิธี ELISA ต่อไป

## 3.4.5 การตรวจสอบประเภทของสารที่อยู่ภายในสารสกัดกานพลู ด้วยวิธี HPLC

1. นำ fraction ที่ให้ผลยับยั้งดีที่สุดมาทำการเจือจาง 10 เท่าด้วย 80% เอทานอล เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. กรองด้วยที่กรอง 0.22  $\mu\text{m}$  เก็บไว้ในขวด 2 ml ที่อุณหภูมิ 4  $^{\circ}\text{C}$  ใช้สำหรับ HPLC
3. ทำการเตรียมสารละลาย A (0.1% trifluoroacetic acid 600 ml) และ B (0.1% TFA ใน 60% Acetonitrile (ACN) 600 ml) เพื่อนำไปเป็น mobile phase ในขั้นตอนฉีด HPLC

### 3.4.6 การศึกษาการทดสอบเคลียร์โซนของแบคทีเรียต่อสารต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจาก กานพลู (antimicrobial susceptibility testing)

1. เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด (*Bacillus subtilis* TISTR 1248, *Staphylococcus aureus* TISTR 746, *Escherichia coli* TISTR 074 และ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 2370)
2. นำเชื้อทั้ง 4 ชนิด ไปผสมกับ NaCl 0.85% และนำไปเทียบกับ 0.5 McFarland
3. นำเชื้อไป swap ลงในอาหารแข็ง Mueller Hinton Agar (MHA)
4. จากนั้นนำไปทดสอบด้วยวิธี Disk diffusion โดยมียาปฏิชีวนะ Streptomycin 20  $\mu\text{g/ml}$  เป็น positive control
5. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37  $^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 16 - 20 ชั่วโมง
6. ทำการตรวจวัดเคลียร์โซนด้วยเวอร์เนียร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

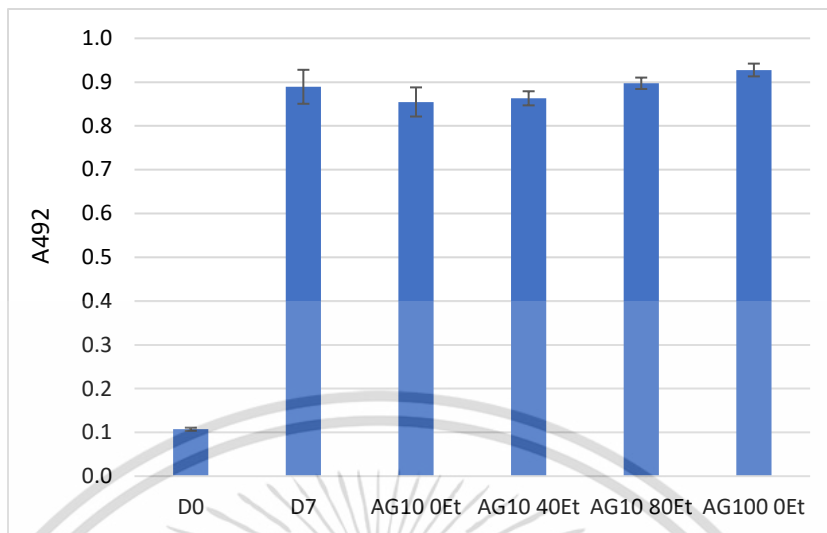
จากงานวิจัย *Drosera tokaiensis* extract containing multiple phenolic compounds inhibits the formation of advanced glycation end-products (Tominaga *et al.*, 2020) เราได้นำมาเป็นตัวอย่างในการศึกษาผลการยับยั้งการเกิด CML โดยใช้เครื่องเทศไทย 10 ชนิด ได้แก่ พริกไทยดำ พริกชี้หนูปล่น อบเชย ลูกกระวาน กานพลู เม็ดเทียนข้าวเปลือก โป๊ยกั๊ก เม็ดยี่หระ ลูกผักชี และขมิ้นชัน มาทำการวัดปริมาณฤทธิ์ยับยั้ง CML ด้วยวิธี ELISA จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปติดตามหาความเป็นไปได้ในการหาสารออกฤทธิ์ด้วยการนำไปลงคอลัมน์โดย การชะแบบลำดับส่วน (stepwise elution) และนำสารที่ได้ไประเหยด้วยเครื่อง Rotary evaporator จนแห้ง เพื่อนำไปแยกดูสารภายในสารสกัดด้วยวิธี HPLC

จากการศึกษาได้ทำการบ่มเครื่องเทศไทยในความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ น้ำกลั่น สารละลายเอทานอล 40% และ 80% ในขวดรูปชมพู่ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน เพื่อนำไปทำขั้นตอนการสร้างปฏิกิริยาการเกิด CML จากนั้นนำไปทำต่อด้วยวิธี ELISA ได้ผลดังนี้

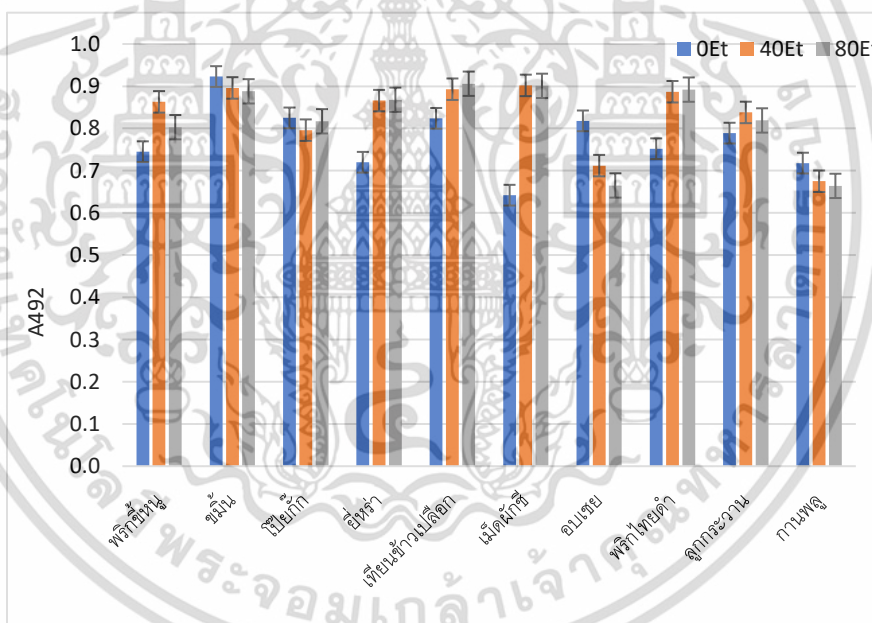
#### 4.1 การศึกษาการยับยั้งการเกิด CML ของสารสกัดจากเครื่องเทศไทย

จากการนำเครื่องเทศไทยทั้ง 10 ชนิด ได้แก่ พริกไทยดำ พริกชี้หนูปล่น อบเชย ลูกกระวาน กานพลู เม็ดเทียนข้าวเปลือก โป๊ยกั๊ก เม็ดยี่หระ ลูกผักชี และขมิ้นชัน นำไปบ่มด้วยน้ำกลั่น, สารละลายเอทานอล 40% และ 80% ในขวดรูปชมพู่ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นกรองตัวอย่าง ดูดตัวอย่าง 5  $\mu$ L ผสมกับสารละลาย 495  $\mu$ L ในหลอดแอฟเฟนดรอปขนาด 1.5 mL โดยมี Aminoguanidine เป็น positive control (Gupta *et al.*, 2017) จากนั้นนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 30  $^{\circ}$ C เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นนำมาทดสอบการยับยั้งการเกิด CML ด้วยวิธีการ ELISA เพื่อดูว่าสารสกัดตัวไหนจากทั้ง 10 ชนิด มีค่าการเกิด CML น้อยที่สุด นำไปวัดด้วยเครื่อง Microplate Reader ที่ความยาวคลื่น 492 nm ได้ผลการทดสอบการเกิด CML ดังแสดงในตารางที่ 4.1.1 (ดูได้ที่ภาคผนวก ค.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)



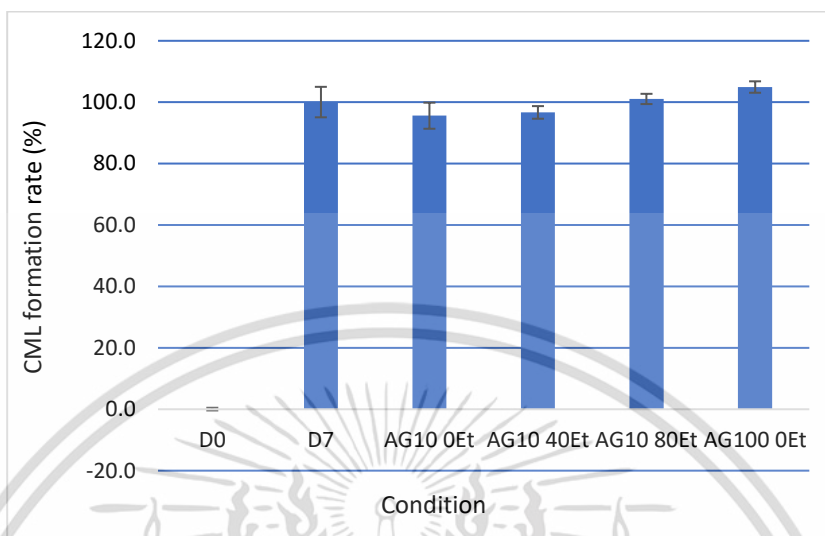
(ข)

รูปที่ 4.1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของการเกิด CML ของสารสกัดเครื่องเทศไทยทั้ง 10 ชนิดที่ความยาวคลื่น 492 nm

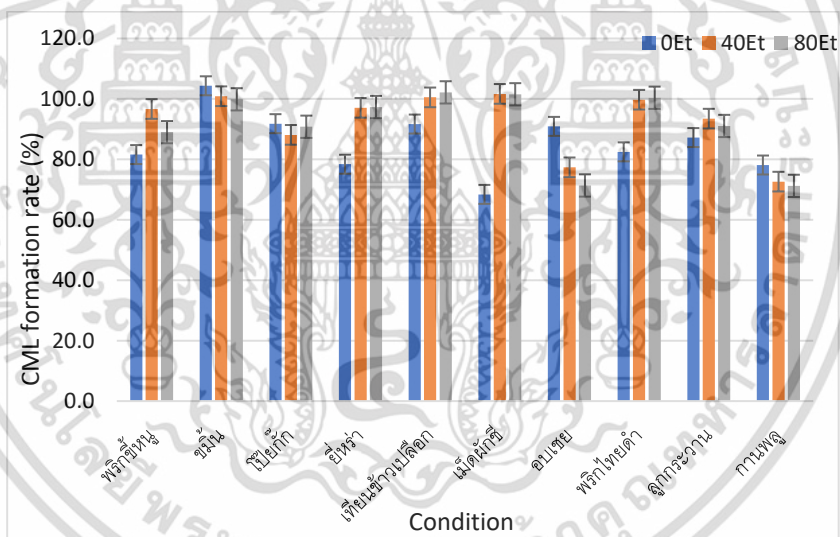
(ก) กราฟค่าการเกิด CML ของน้ำกลั่นวันที่ 0 วันที่ 7 และ Aminoguanidine ในเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ เฉลี่ยของแต่ละความเข้มข้น

(ข) กราฟค่าการเกิด CML ของสารสกัดเครื่องเทศไทยทั้ง 10 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)



(ข)

รูปที่ 4.2 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของการเกิด CML

(ก) แสดงผลการยับยั้งการเกิด CML ของน้ำกลั่นที่วันที่ 0 วันที่ 7 และ Aminoguanidine ในเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ

(ข) แสดงผลการยับยั้งการเกิด CML ของสารสกัดเครื่องเทศไทยทั้ง 10 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

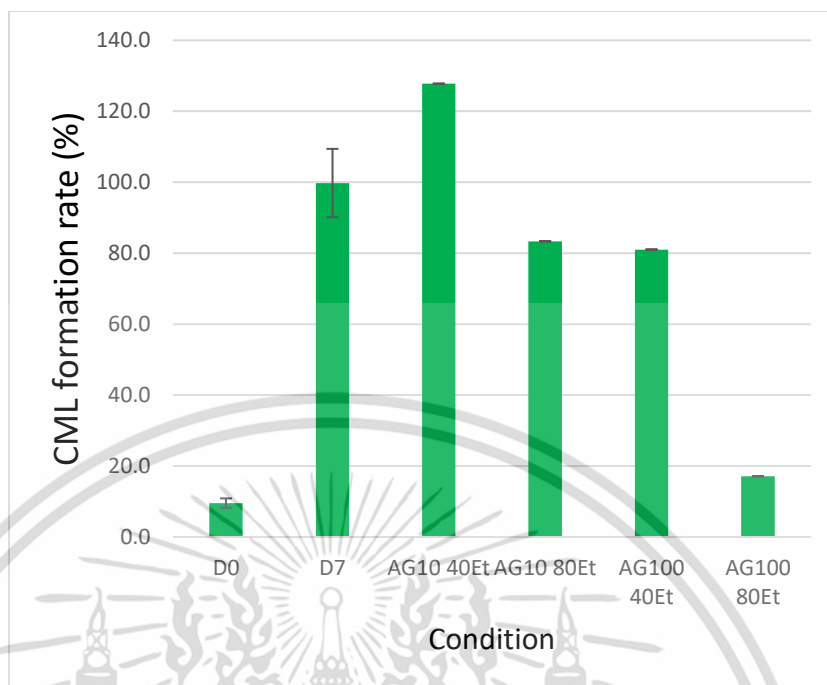
จากผลที่ได้จะพบว่า AG ที่ความเข้มข้น 100 mg/ml ที่ 0% EtOH มีค่าเปอร์เซ็นต์การเกิด CML ที่มากที่สุด คือ 104.9% รองลงมาคือ AG ที่ความเข้มข้น 10 mg/ml ที่ 80% EtOH AG ที่ความเข้มข้น 10 mg/ml ที่ 40% EtOH และ AG ที่ความเข้มข้น 10 mg/ml ที่ 0% EtOH (101.1 96.7 และ 95.6) ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1.3) และในวันที่ 0 (0.0%) ผลที่ได้คือไม่เกิดการยับยั้ง CML เลย แต่ผลในวันที่ 7 (100.1%) นั้นมีการยับยั้งการเกิด CML ได้พอกๆกับ AG 10 mg/ml ที่ 80%EtOH และ AG 100 mg/ml ที่ 0%EtOH

ผลจากสารสกัดทั้ง 10 ชนิด สารสกัดจากกานพลูให้ผลการยับยั้งการเกิด CML ดีที่สุดจากสารสกัดเครื่องเทศทั้ง 10 ชนิด โดยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารสกัดกานพลูในน้ำกลั่น เอทานอล 40% และ 80% มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิด CML อยู่ที่ 78.1% 72.6% และ 71.2% ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์การเกิด CML ในน้ำกลั่น เอทานอล 40% และเอทานอล 80% ในการบ่มสารสกัดกานพลู ที่เอทานอล 80% ให้ผลการยับยั้งการเกิด CML ได้ดีที่สุด รองลงมาเป็น เอทานอล 40% และน้ำกลั่น จึงเลือกสารสกัดกานพลูที่เอทานอล 80% ในการทำขั้นตอนต่อไป

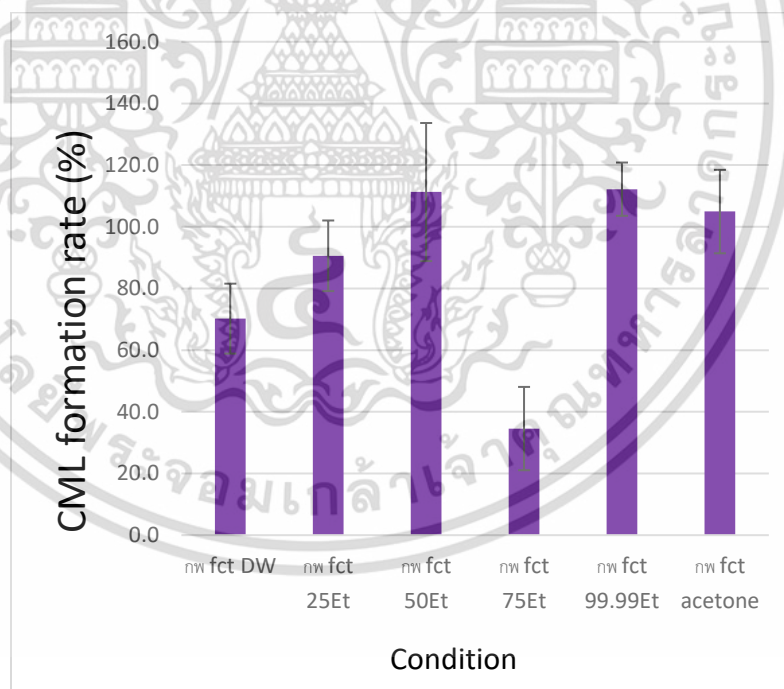
#### 4.2 การศึกษาสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเกิด CML ที่อยู่ในกานพลู

จากการศึกษาการยับยั้งการเกิด CML ของสารสกัดจากเครื่องเทศไทยทั้ง 10 ชนิด ด้วยวิธี ELISA โดยมี Aminoguanidine เป็น positive control (Gupta *et al.*, 2017) ผลที่ได้คือ สารสกัดจากเครื่องเทศไทยที่บ่มในเอทานอลความเข้มข้น 80% ให้ผลการยับยั้งการเกิด CML ได้ดีที่สุด จึงนำสารสกัดจากกานพลูที่ความเข้มข้นเอทานอลที่ 80% นี้ ไปทำการระเหยแห้งด้วยเครื่อง Rotary evaporator เพื่อให้ได้สารสกัดที่มีลักษณะแห้ง จากนั้นนำไปแยกสารที่อยู่ในสารสกัดต่อด้วยวิธีการ การชะแบบลำดับ ส่วน (stepwise elution) โดยใช้ stationary phase เป็น Diaion column (Vidoca *et al.*, 2020) และนำสารสกัดกานพลูไปละลายใน mobile phase ได้แก่ น้ำกลั่น, เอทานอล (25% 50% 75% 99.99%) และ Acetone จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างในแต่ละ fraction เพื่อนำไปหาหน้าหนักของสารที่มีอยู่ในสารสกัด พร้อมปรับความเข้มข้นของสารสกัดให้เป็น 1 mg/ml แล้วจึงนำไปทำกระบวนการ ELISA ต่อไป ผลที่ได้เป็นดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)



(ข)

รูปที่ 4.3 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของการเกิด CML ที่อยู่ในกานพลู

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- (ก) แสดงผลการยับยั้งการเกิด CML ของน้ำกลั่นวันที่ 0 วันที่ 7 และ Aminoguanidine ในเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ
- (ข) แสดงผลการยับยั้งการเกิด CML ของสารสกัดกานพลู

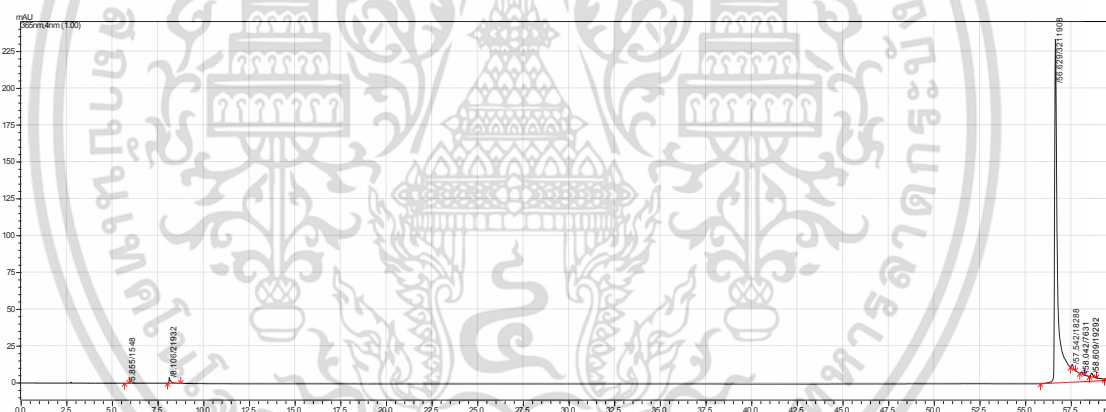
จากผลการทดลองพบว่าในตารางที่ 4.2.1 (ดูได้ที่ภาคผนวก ง.) ความเข้มข้น AG 10 µg/ml (0%EtOH) มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิด CML ได้สูงที่สุดคือ 127.8% รองลงมาคือ AG 10 µg/ml (40%EtOH) มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิด CML เท่ากับ 83.3% ในขณะที่ความเข้มข้นที่ วันที่ 0 ไม่สามารถยับยั้งการเกิด CML ได้ ซึ่งผลที่ได้พบว่าแตกต่างจากผลการทดลองของ Gupta และคณะ เพราะยิ่งความเข้มข้นของ AG เยอะยิ่งทำให้เกิดฤทธิ์ยับยั้งมากตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น (Gupta *et al.*, 2017)

ผลจากสารสกัดกานพลูตารางที่ 4.2.2 (ดูได้ที่ภาคผนวก ง.) ที่ความเข้มข้น 80%EtOH พบว่าการแยกสารสกัดจากกานพลูที่นำไปละลายใน mobile phase ได้แก่ น้ำกลั่น, เอทานอล (25% 50% 75% 99.99%) และ Acetone มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิด CML อยู่ที่ 70.2% 90.6% 111.3% 34.6% 112.2% และ 104.9% ตามลำดับ โดยในสารสกัดกานพลูที่ fraction เอทานอล 75% เป็น mobile phase พบเปอร์เซ็นต์ของสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเกิด CML ได้ดีที่สุด (Khan *et al.*, 2020) คือ 34.6% โดยจะพบว่าเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับน้ำกลั่น วันที่ 7 เอทานอลในความเข้มข้นต่างๆ และ Acetone นั้น สารสกัดกานพลู fraction เอทานอล 75% จะสามารถยับยั้งการเกิด CML ได้ดีที่สุดจึงนำสารสกัด fraction เอทานอล 75% นี้ไปทำการหาสารประกอบที่อยู่ภายในสารสกัดต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

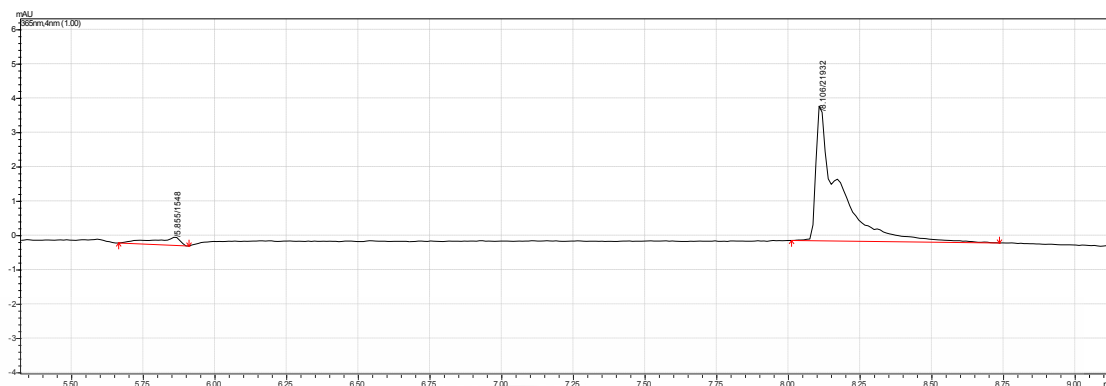
### 4.3 การตรวจสอบประเภทของสารที่อยู่ภายในสารสกัดกานพลู ด้วยวิธี HPLC

จากการศึกษาการยับยั้งการเกิด CML ของสารสกัดกานพลูที่ละลายใน mobile phase เพื่อดูโปรไฟล์ของ Polyphenols ว่ามีประเภทของสารอะไรบ้างที่อยู่ภายในสารสกัด (Zhang *et al.*, 2023) ผลที่ได้คือ สารสกัดกานพลู fraction เอทานอล 75% ที่เป็น mobile phase นั้นพบสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเกิด CML ได้ดีที่สุด จากนั้นนำสารสกัดกานพลู fraction เอทานอล 75% ไปทำการระเหยแห้งด้วยเครื่อง Rotary evaporator เพื่อให้ได้สารสกัดกานพลูที่มีลักษณะแห้ง และนำไปปรับความเข้มข้นให้ได้ 1 mg/ml แล้วจึงนำไปตรวจสอบประเภทของสารที่อยู่ภายในสารสกัดกานพลู ด้วยวิธี HPLC โดยใช้คอลัมน์ Inertsil ODS-3 HPLC Column, 5  $\mu$ m, 250 x 4.6 mm (analytical) ส่วน mobile phase ที่ใช้คือ สาร A (0.1% trifluoroacetic acid) และสาร B (0.1% trifluoroacetic acid ใน 60% acetonitrile) ซึ่งสาร B จะตั้ง value ที่ 17%B-30%B ที่เวลา 0-50 นาที 100%B ที่ 50-60 นาที และที่ 17%B ที่ 60-70 นาที วัดโดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 365 nm ได้ผลดังนี้



(ก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ข)

รูปที่ 4.4 แสดงหน้าโปรไฟล์ HPLC ของสารสกัดกานพลู fraction เอทานอล 75% โดยตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 365 nm

(ก) แสดงหน้าโปรไฟล์ HPLC ของสารสกัดกานพลู fraction เอทานอล 75% ณ เวลาที่ 0-60 นาที

(ข) แสดงหน้าโปรไฟล์ HPLC ของประเภทสารสกัดกานพลู fraction เอทานอล 75% ณ เวลาที่ 8.1 นาที

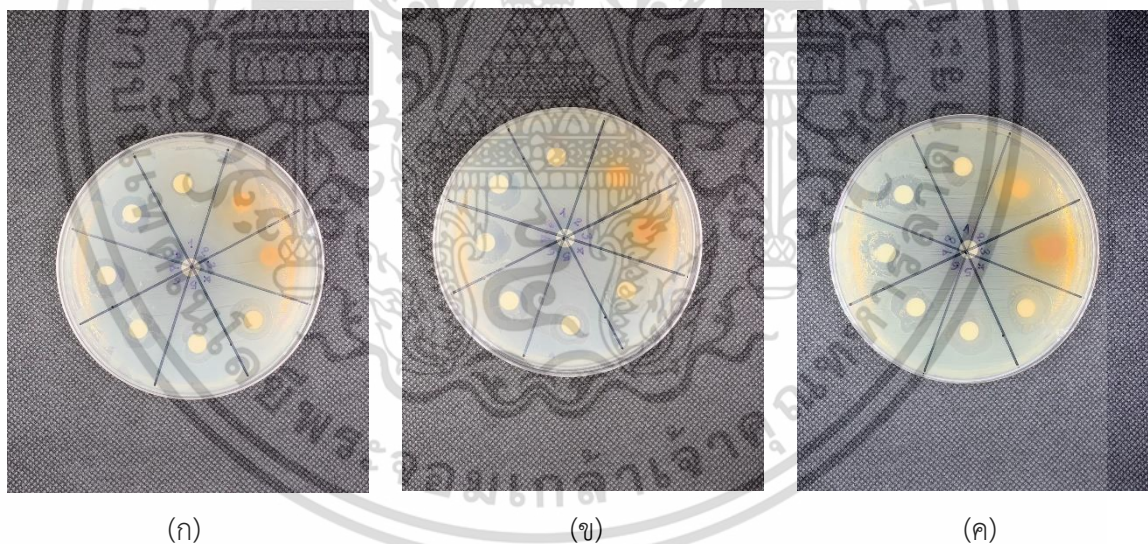
รายละเอียดหน้าโปรไฟล์ HPLC ของสารสกัดกานพลู fraction เอทานอล 75% ในรูป ก. พบว่ามี 2 peak ที่ออกมา ณ เวลาที่ 0-60 นาที ซึ่งพบว่าโปรไฟล์ของ peak ที่ออกมานั้นเป็นประเภทสาร Polyphenols ที่อยู่ภายในสารสกัดกานพลู fraction เอทานอล 75% โดยวัดที่ความยาวคลื่น 365 nm ซึ่งสาร peak ที่ 2 ที่ได้ออกมาในช่วงเวลาที่ 8.1 นาที จากนั้นเราได้ส่ง fraction เอทานอล 75% นี้ไปทำ LC/MS แต่ยังไม่บรรลุผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.4 การศึกษาการทดสอบเคลียร์โซนของแบคทีเรียต่อสารต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจาก กานพลู (antimicrobial susceptibility testing)

ในการศึกษานี้จะทำการทดสอบเคลียร์โซนของแบคทีเรียต่อสารต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจาก กานพลู ด้วยวิธี Disk Diffusion บนอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) ทำการศึกษาโดยใช้เชื้อ 4 ชนิด ได้แก่ *P. aeruginosa* TISTR 2370 *E. coli* TISTR 074 *B. subtilis* TISTR 1248 และ *S. aureus* TISTR 746 การทดสอบจะใช้สารสกัดจากกานพลูที่ได้จากขั้นตอน การชะแบบลำดับส่วน (stepwise elution) ได้แก่ น้ำกลั่น เอทานอล (25% 50% 75% 99.99%) Acetone AG10 µg/ml 80% EtOH AG100 µg/ml 80% EtOH และ Streptomycin 20 µl/ml ซึ่งนำมาเป็น positive control โดยทำการตรวจวัดผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางกึ่งยับยั้ง (Inhibition zone) การทดลองแต่ละตัวอย่างทำซ้ำ 3 ครั้ง และอ่านผลด้วยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางในส่วนที่กว้างที่สุดของส่วนที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรีย (clear zone) บันทึกผลเป็นหน่วยมิลลิเมตร (mm) ได้ผลการทดลองดังนี้

##### 1. *P. aeruginosa* TISTR 2370



รูปที่ 4.5 แสดงลักษณะของเคลียร์โซนของแบคทีเรียต่อสารต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากกานพลู ด้วยวิธี Disk Diffusion โดยเชื้อ *P. aeruginosa* TISTR 2370 บนอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA)

(ก) เชื้อ *P. aeruginosa* TISTR 2370 บนอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) ซ้ำที่ 1

(ข) เชื้อ *P. aeruginosa* TISTR 2370 บนอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) ซ้ำที่ 2

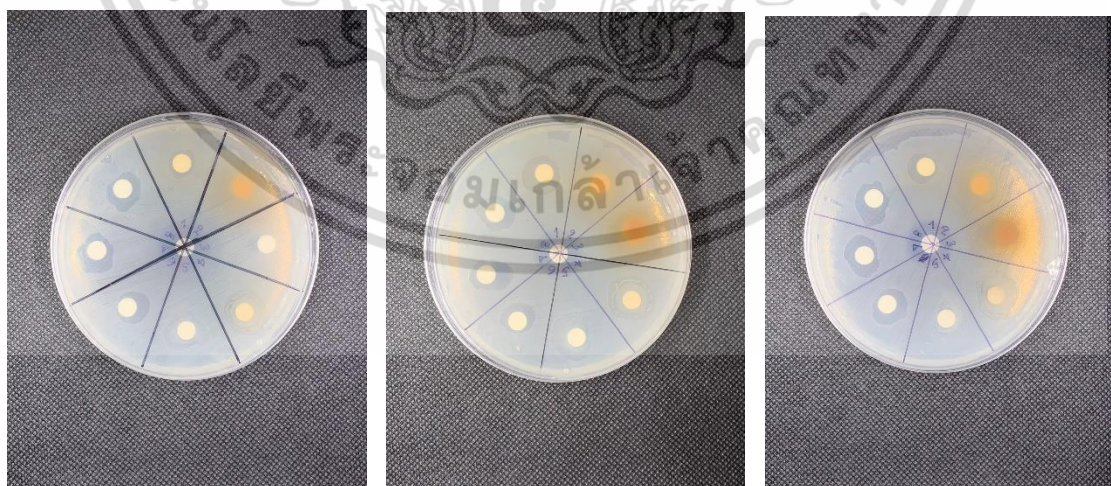
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ค) เชื้อ *P. aeruginosa* TISTR 2370 บนอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) ซ้ำที่ 3

ตารางที่ 4.4.1 แสดงผลการทดสอบเคลียร์โซนของแบคทีเรียต่อสารต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากกานพลู ใน condition ต่างๆ โดยเชื้อ *P. aeruginosa* TISTR 2370

	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
<i>P. aeruginosa</i> TISTR 2370 (mm)				
น้ำกลั่น	7.3	8.0	11.4	8.9
25% EtOH	11.2	9.9	13.4	11.5
50% EtOH	-	-	-	-
75% EtOH	13.1	15.3	15.8	14.8
99.99% EtOH	12.4	13.0	15.1	13.5
Acetone	11.5	12.9	13.8	12.7
AG10 80% EtOH	12.8	14.3	15.3	14.1
AG100 80% EtOH	12.1	12.7	15.2	13.3
Streptomycin	14.9	14.0	14.8	14.6

## 2. *E. coli* TISTR 074



(ก)

(ข)

(ค)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

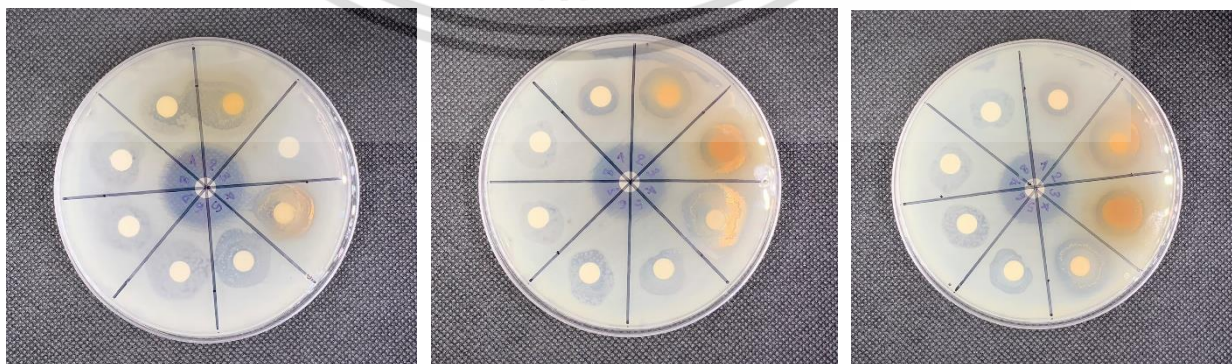
**รูปที่ 4.6** แสดงลักษณะของเคลียร์โซนของแบคทีเรียที่เรียดต่อการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากกานพลู ด้วยวิธี Disk Diffusion โดยเชื้อ *E. coli* TISTR 074 บนอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA)

- (ก) เชื้อ *E. coli* TISTR 074 บนอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) ซ้ำที่ 1
- (ข) เชื้อ *E. coli* TISTR 074 บนอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) ซ้ำที่ 2
- (ค) เชื้อ *E. coli* TISTR 074 บนอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) ซ้ำที่ 3

**ตารางที่ 4.4.2** แสดงผลการทดสอบเคลียร์โซนของแบคทีเรียที่เรียดต่อการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากกานพลู ใน condition ต่างๆ โดยเชื้อ *E. coli* TISTR 074

	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
<i>E. coli</i> TISTR 074 (mm)				
น้ำกลั่น	9.1	11.5	9.2	9.9
25% EtOH	-	10.9	11.6	11.2
50% EtOH	-	-	-	-
75% EtOH	13.4	15.2	15.5	14.7
99.99% EtOH	14.5	14.9	13.5	14.3
Acetone	10.4	10.6	11.5	10.8
AG10 80% EtOH	12.6	13.5	12.8	13.0
AG100 80% EtOH	11.6	12.0	14.7	12.8
Streptomycin	17.1	15.3	16.9	16.4

## 2. *B. subtilis* TISTR 1248



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

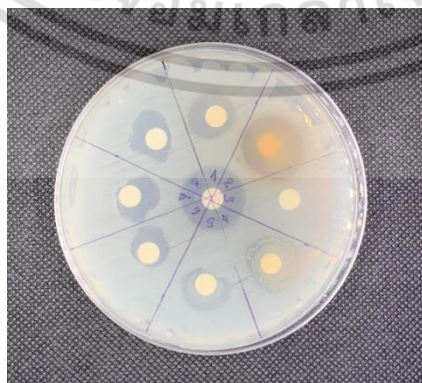
**รูปที่ 4.7** แสดงลักษณะของเคลียร์โซนของแบคทีเรียต่อสารต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากกานพลู ด้วยวิธี Disk Diffusion โดยเชื้อ *B. subtilis* TISTR 1248 บนอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA)

- (ก) เชื้อ *B. subtilis* TISTR 1248 บนอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) ซ้ำที่ 1  
 (ข) เชื้อ *B. subtilis* TISTR 1248 บนอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) ซ้ำที่ 2  
 (ค) เชื้อ *B. subtilis* TISTR 1248 บนอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) ซ้ำที่ 3

**ตารางที่ 4.4.3** แสดงผลการทดสอบเคลียร์โซนของแบคทีเรียต่อสารต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากกานพลู ใน condition ต่างๆ โดยเชื้อ *B. subtilis* TISTR 1248

	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
<i>B. subtilis</i> TISTR 1248 (mm)				
น้ำกลั่น	14.0	11.5	9.7	11.8
25% EtOH	-	14.9	14.5	14.7
50% EtOH	-	13.1	13.1	13.1
75% EtOH	16.3	18.8	16.1	17.1
99.99% EtOH	16.1	13.5	12.9	14.2
Acetone	18.5	14.1	14.1	15.6
AG10 80% EtOH	13.3	13.1	14.8	13.8
AG100 80% EtOH	15.4	13.3	12.6	13.8
Streptomycin	24.5	21.8	20.7	22.3

### 3. *S. aureus* TISTR 746



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**รูปที่ 4.8** แสดงลักษณะของเคลียร์โซนของแบคทีเรียที่เรียดต่อการต้านจุลินชีพของสารสกัดจากกานพลู ด้วยวิธี Disk Diffusion โดยเชื้อ *S. aureus* TISTR 746 บนอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA)

(ก) เชื้อ *S. aureus* TISTR 746 บนอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA)

**ตารางที่ 4.4.4** แสดงผลการทดสอบเคลียร์โซนของแบคทีเรียที่เรียดต่อการต้านจุลินชีพของสารสกัดจากกานพลู ใน condition ต่างๆ โดยเชื้อ *S. aureus* TISTR 746

	ซ้ำที่ 1
<i>S. aureus</i> TISTR 746 (mm)	
น้ำกลั่น	11.7
25% EtOH	16.2
50% EtOH	-
75% EtOH	14.7
99.99% EtOH	13.2
Acetone	9.4
AG10 80% EtOH	11.2
AG100 80% EtOH	13.9
Streptomycin	16.1

จากผลการทดสอบเคลียร์โซนของแบคทีเรียที่เรียดต่อการต้านจุลินชีพของสารสกัดจากกานพลู ตารางที่ 4.4.1 โดยวิธี Disk Diffusion ปริมาตร 20  $\mu$ l/disk ได้ผลการวัดขนาดของ clear zone ของเชื้อ *P. aeruginosa* TISTR 2370 จากผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้นที่ 75% EtOH ปริมาตร 20  $\mu$ l สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* TISTR 2370 ได้ดีที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยของขนาด clear zone กว้างที่สุดคือ 14.8 mm ตามด้วย Streptomycin AG10  $\mu$ g/ml 80% EtOH 99.99% EtOH AG100  $\mu$ g/ml 80% EtOH Acetone 25% EtOH และ น้ำกลั่น (14.6 14.1 13.5 13.3 12.7 11.5 และ 8.9) ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้นที่ 50% EtOH นั้นไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ เชื้อ *P. aeruginosa* TISTR 2370 ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4.2 แสดงผลการทดสอบเคลียร์โซนของแบคทีเรียต่อสารต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจาก กานพลู ของเชื้อ *E. coli* TISTR 074 จากผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นที่ 75% EtOH สามารถยับยั้ง การเจริญของเชื้อ *E. coli* TISTR 074 ได้ดีที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยของขนาด clear zone คือ 14.7 mm ในขณะที่ความเข้มข้นที่ 50% EtOH นั้นไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ เชื้อ *E. coli* TISTR 074 ได้

ตารางที่ 4.4.3 แสดงผลการทดสอบเคลียร์โซนของแบคทีเรียต่อสารต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจาก กานพลู ของเชื้อ *B. subtilis* TISTR 1248 จากผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นที่ 75% EtOH สามารถ ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* TISTR 1248 ได้ดีที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยของขนาด clear zone กว้าง ที่สุดคือ 17.1 mm ในขณะที่ความเข้มข้นของ AG10 80% EtOH และ AG100 80% EtOH สามารถ ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* TISTR 1248 ได้เท่ากันคือ 13.8 mm แต่ความเข้มข้นของน้ำกลั่นนั้น สามารถยับยั้งการเจริญของ เชื้อ *B. subtilis* TISTR 1248 ได้น้อยที่สุดอยู่ที่ 11.8 mm

ตารางที่ 4.4.4 แสดงผลการทดสอบเคลียร์โซนของแบคทีเรียต่อสารต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจาก กานพลู ของเชื้อ *S. aureus* TISTR 746 ในการทดลองนี้จะมีผลการทดลองแค่เพียงซ้ำเดียว เป็นผลมา จากสารสกัดกานพลูที่ได้จากกระบวนการ การชะแบบลำดับส่วน (stepwise elution) ได้มาในปริมาณที่ น้อยเกินไปจึงไม่เพียงพอสำหรับการทดลองทั้ง 3 ซ้ำ ดังนั้นจากผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้นที่ 25% EtOH ปริมาตร 20  $\mu$ l สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* TISTR 746 ได้ดีที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ย ของขนาด clear zone กว้างที่สุดคือ 16.2 mm ในขณะที่ความเข้มข้นที่ 50% EtOH นั้นไม่สามารถ ยับยั้งการเจริญของ เชื้อ *S. aureus* TISTR 746 ได้ (Susana & Rahayu, 2021)

จากงานวิจัยของ Xing และคณะ ที่ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับระดับของสารกำจัดศัตรูพืชที่ เกี่ยวข้องกับสิ่งแวดล้อมอาจส่งเสริมการเกิดสายพันธุ์ที่ทนต่อ streptomycin ได้มากขึ้น ซึ่งได้ศึกษาการ ทำงานร่วมกันในสายพันธุ์อื่นๆทั้งภายในและภายนอกสกุล *Escherichia* ได้ตรวจสอบการทำงานร่วมกัน ของยาฆ่าแมลง และ streptomycin ในสายพันธุ์แบคทีเรียที่แตกต่างกันทั้ง 3 สกุล ได้แก่ เชื้อ *Escherichia coli* ที่ก่อให้เกิดโรค O157:H7 และ O103:H2 สายพันธุ์ *Pseudomonas* และ สายพันธุ์ *Staphylococcus* streptomycin ต้านทานการกลายพันธุ์ในสองสายพันธุ์ของ *E. coli* อย่างไรก็ตาม streptomycin ไม่ได้ส่งเสริมให้สายพันธุ์ *Pseudomonas* และ สายพันธุ์ *Staphylococcus* วิวัฒนาการ ไปสู่การดื้อยา streptomycin (Xing et al., 2022)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการทดลอง

การศึกษาเพื่อหาฤทธิ์การยับยั้งการสร้าง CML ของเครื่องเทศไทย 10 ชนิด ได้แก่ พริกไทยดำ พริกขี้หนูป่น อบเชย ลูกกระวาน กานพลู เม็ดเทียนข้าวเปลือก โปยกี้ก เม็ดยี่ห่วย ลูกผักชี และขมิ้นชัน ที่สกัดในตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้น 0 40 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในงานวิจัยนี้ประกอบไปด้วยการทดสอบฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการสร้าง CML ทั้งหมด ได้แก่ การศึกษาการยับยั้งการเกิด CML ของสารสกัดจากเครื่องเทศไทย การศึกษาสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเกิด CML ที่อยู่ในกานพลู การตรวจสอบประเภทของสารที่อยู่ภายในสารสกัดกานพลู ด้วยวิธี HPLC และการศึกษาการทดสอบเคลียร์โซนของแบคทีเรียต่อสารต้านจุลินชีพของสารสกัดจากกานพลู

สำหรับการทดลองการศึกษาการยับยั้งการเกิด CML ของสารสกัดจากเครื่องเทศไทยได้ทำการทดลอง 2 อย่าง ได้แก่ การเกิด CML ของน้ำกลั่นวันที่ 0 วันที่ 7 และ Aminoguanidine ในเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ และ การเกิด CML ของสารสกัดเครื่องเทศไทยทั้ง 10 ชนิด พบว่าผลการทดลองการเกิด CML ที่ความเข้มข้น AG 10 µg/ml (0%EtOH) มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิด CML ได้มากที่สุด ในขณะที่ความเข้มข้นที่ วันที่ 0 ไม่สามารถยับยั้งการเกิด CML ได้ ส่วนผลการทดลองของสารสกัดเครื่องเทศไทย พบว่าสารสกัดจากกานพลูที่ความเข้มข้น 80% EtOH ให้ผลการยับยั้งการเกิด CML ดีที่สุดจากสารสกัดเครื่องเทศทั้ง 10 ชนิด และการศึกษาสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเกิด CML ที่อยู่ในกานพลู ได้นำสารสกัดจากกานพลูที่ความเข้มข้นเอทานอลที่ 80% ไประเหยแห้งเพื่อนำไปแยกสารที่อยู่ในสารสกัดด้วยการชะแบบลำดับส่วน (stepwise elution) โดยละลายสารสกัดด้วย น้ำกลั่น เอทานอล (25% 50% 75% 99.99%) และ Acetone จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างในแต่ละ fraction เพื่อนำไปหาการยับยั้งการเกิด CML ด้วยวิธี ELISA พบว่าสารสกัดที่ fraction 75% EtOH ให้ผลว่าสามารถยับยั้งการเกิด CML ได้ดีที่สุด และจากการศึกษาด้วยการตรวจสอบประเภทของสารที่อยู่ภายในสารสกัดกานพลู ด้วยวิธี HPLC พบว่ามี peak ที่ออกมา ณ เวลาที่ 0-60 นาที ซึ่ง peak ออกมาในช่วงเวลาที่ 8.1 นาที และได้ส่ง fraction เอทานอล 75% นี้ไปทำ LC/MS แต่ยังไม่บรรลุผล

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการต้านจุลินชีพของการพลู ด้วยวิธี Disk diffusion บนอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) พบว่ากานพลูที่อยู่ในความเข้มข้นที่ 75% EtOH สามารถยับยั้งเชื้อ *P. aerugi-*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*nosa E. coli* และ *B. subtilis* ได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับยา streptomycin แต่ในฤทธิ์ยับยั้งของเชื้อ *S. aureus* พบว่ากานพลูที่อยู่ในความเข้มข้นที่ 25% EtOH สามารถยับยั้งได้ดีที่สุด

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรนำสารสกัดอบเชย ไปศึกษาหาการเกิดการยับยั้ง CML เพิ่มเติม

5.2.2 ควรนำสารสกัดกานพลูที่เอทานอล fraction 75% ไปศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ เนื่องจากมีสารที่ประกอบภายในสารสกัดกานพลูนั้นมีความน่าสนใจมาก ซึ่งที่เอทานอล fraction 75% มีฤทธิ์ยับยั้ง CML ได้ค่อนข้างดี จึงควรทำการวิจัยต่อเพื่องานวิจัยที่สมบูรณ์ต่อไปในอนาคต



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง

ปรีญรัชต์ ธนวิทย์ภักดี. (2559). ไกลเคชั่นกับการเกิดโรคในมนุษย์, 31(2), 84-96

Aljarba, N. H., Hasnain, M. S., Alkahtane, A., Algamdy, H., & Alkahtani, S. (2021). Lagerstroemia speciosa extract ameliorates oxidative stress in rats with diabetic nephropathy by inhibiting ages formation. *Journal of King Saud University - Science*, 33(6), 101493. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101493>

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Nineteenth Informational Supplement. Vol. 29 No. 3; 2009

Coorevits, L., Boelens, J., & Claeys, G. (2015). Direct susceptibility testing by disk diffusion on clinical samples: A rapid and accurate tool for antibiotic stewardship. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 34(6), 1207–1212. <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2349-2>

Ersoy, S. C., Heithoff, D. M., Barnes, L., Tripp, G. K., House, J. K., Marth, J. D., Smith, J. W., & Mahan, M. J. (2017). Correcting a fundamental flaw in the paradigm for antimicrobial susceptibility testing. *EBioMedicine*, 20, 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.05.026>

Fournet, M., Bonté, F., & Desmoulière, A. (2018). Glycation damage: A possible hub for major pathophysiological disorders and aging. *Aging and Disease*, 9(5), 880. <https://doi.org/10.14336/ad.2017.1121>

Gengjun Chen, Ronald L. Madl, J. Scott Smith. 2017 Inhibition of advanced glycation end-products in cooked beef patties by cereal bran addition. *Food control*. 73, 847-853

Gupta, P., Jain, V., Pareek, A., Kumari, P., Singh, R., Agarwal, P., & Sharma, V. (2017). Evaluation of effect of alcoholic extract of heartwood of *Pterocarpus marsupium* on in vitro antioxidant, anti-glycation, sorbitol accumulation and inhibition of

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

aldose reductase activity. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 7(3), 307–314. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2016.11.001>

Kim C-S, Park S, Kim J. The role of glycation in the pathogenesis of aging and its prevention through herbal products and physical exercise. *J Exerc Nutrition Biochem*. 2017;21(3):55-61.

Khan, M., Liu, H., Wang, J., & Sun, B. (2020). Inhibitory effect of phenolic compounds and plant extracts on the formation of advance glycation end products: A comprehensive review. *Food Research International*, 130, 108933. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108933>

Matsui, T., Joo, H. D., Lee, J. M., Ju, S. M., Tao, W. H., Higashimoto, Y., Fukami, K., & Yamagishi, S. (2015). Development of a monoclonal antibody-based ELISA system for glyceraldehyde-derived advanced glycation end products. *Immunology Letters*, 167(2), 141–146. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2015.08.008>

Nandam, S. S., Surya Prakas D.V., Vangalapati M. (2012). Purification of Cinnamaldehyde from Cinnamon Species by Column Chromatography. 1(17), 49-51.

Perez Gutierrez, R. M., & Velazquez, E. G. (2020). Glucopyranoside flavonoids isolated from leaves of *spinacia oleracea* (spinach) inhibit the formation of advanced glycation end products (ages) and aldose reductase activity (RLAR). *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 128, 110299. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110299>

Richard D. Semba, Emily J. Nicklett, Luigi Ferrucci. 2010 Does Accumulation of Advanced Glycation End Products Contribute to the Aging Phenotype. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 65A : 963-975

Susana Elya Sudrajat, & Rahayu, I. (2021). Antibacterial and antifungal activity of clove extract (*syzygium aromaticum*): Review. *Eureka Herba Indonesia*, 2(2), 93–103. <https://doi.org/10.37275/ehi.v2i2.18>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Schaufler, R. L., & Slowey, N. C. (2023). Low-cost modular chromatography column rack and Vial Holders. *HardwareX*, 13. <https://doi.org/10.1016/j.ohx.2022.e00388>
- Singh, R., Barden, A., Mori, T., & Beilin, L. (2001). Advanced glycation end-products: A Review. *Diabetologia*, 44(2), 129–146. <https://doi.org/10.1007/s001250051591>
- Tominaga, Y., Sugawa, H., Hirabayashi, K., Ikeda, T., Hoshi, Y., & Nagai, R. (2020a). Drosera tokaiensis extract containing multiple phenolic compounds inhibits the formation of advanced glycation end-products. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 693, 108586. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108586>
- Vidoca, L. P., Almeida, E. S., Cardoso, M. F., Otavio, L., Valadares, L. F., & Monteiro, S. (2020a). Extraction of carotene from crude hybrid palm oil using polymeric resin. *Journal of Food Engineering*, 278, 109944. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.109944>
- Xing, Y., Herrera, D., Zhang, S., Kang, X., & Men, Y. (2022). Site-specific target-modification mutations exclusively induced by the coexposure to low levels of pesticides and streptomycin caused strong streptomycin resistance in clinically relevant *Escherichia coli*. *Journal of Hazardous Materials Advances*, 7, 100141. <https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2022.100141>
- Zhang, M., Ma, X., Xiao, Z., Sun, A., Zhao, M., Wang, Y., Huang, D., Sui, X., Huo, J., & Zhang, Y. (2023). Polyphenols in twenty cultivars of Blue Honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.): Profiling, antioxidant capacity, and  $\alpha$ -amylase inhibitory activity. *Food Chemistry*, 421, 136148. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136148>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก.

### สารสกัดเครื่องเทศไทยก่อนบ่ม

1. เครื่องเทศไทย: กานพลูในเอทานอล 0%, 40%, และ80%



2. เครื่องเทศไทย: ขมิ้นในเอทานอล 0%, 40%, และ80%



3. เครื่องเทศไทย: โป๊ยกั๊กในเอทานอล 0%, 40%, และ80%



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. เครื่องเทศไทย: พริกชี้หนูป่นในเอทานอล 0%, 40%, และ80%



5. เครื่องเทศไทย: พริกไทยดำในเอทานอล 0%, 40%, และ80%



6. เครื่องเทศไทย: เม็ดเทียนข้าวเปลือกในเอทานอล 0%, 40%, และ80%



7. เครื่องเทศไทย: เม็ดผักชีในเอทานอล 0%, 40%, และ80%



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. เครื่องเทศไทย: ยี่หระในเอทานอล 0%, 40%, และ80%



9. เครื่องเทศไทย: ลูกกระวานในเอทานอล 0%, 40%, และ80%



10. เครื่องเทศไทย: อบเชยในเอทานอล 0%, 40%, และ80%



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารสกัดเครื่องเทศไทยหลังบ่ม 3 วัน

1. เครื่องเทศไทย: กานพลูในเอทานอล 0%, 40%, และ80%



2. เครื่องเทศไทย: ขมิ้นในเอทานอล 0%, 40%, และ80%



3. เครื่องเทศไทย: โป๊ยกั๊กในเอทานอล 0%, 40%, และ80%



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. เครื่องเทศไทย: พริกชี้หนูป่นในเอทานอล 0%, 40%, และ80%



5. เครื่องเทศไทย: พริกไทยดำในเอทานอล 0%, 40%, และ80%



6. เครื่องเทศไทย: เม็ดเทียนข้าวเปลือกในเอทานอล 0%, 40%, และ80%



7. เครื่องเทศไทย: เม็ดผักชีในเอทานอล 0%, 40%, และ80%



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. เครื่องเทศไทย: ยี่หระในเอทานอล 0%, 40%, และ80%



9. เครื่องเทศไทย: ลูกกระวานในเอทานอล 0%, 40%, และ80%



10. เครื่องเทศไทย: อบเชยในเอทานอล 0%, 40%, และ80%



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข.

### ผลการยับยั้งการเกิด CML ในเพลท ELISA

1. ผลการยับยั้งการเกิด CML ของเครื่องเทศไทย 10 ชนิด



2. ผลการยับยั้งการเกิด CML ของกานพลูในเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ค.

### ตารางการศึกษาการยับยั้งการเกิด CML ของสารสกัดจากเครื่องเทศไทย

ตารางที่ 4.1.1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงการเกิด CML ของน้ำกลั่นวันที่ 0 วันที่ 7 และ Aminoguanidine ในเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ความยาวคลื่น 492 nm ด้วยเครื่อง Microplate Reader

ซ้ำที่	วันที่ 0	วันที่ 7	AG 10 µg/ml (0%EtOH)	AG 10 µg/ml (40%EtOH)	AG 10 µg/ml (80%EtOH)	AG 100 µg/ml (0%EtOH)
1	0.1	0.8	0.8	0.9	0.9	0.9
2	0.1	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
3	0.1	0.9	0.9	0.8	0.9	0.9
ค่าเฉลี่ย	0.1	0.87	0.87	0.87	0.9	0.9
SD	0.0035	0.0388	0.0332	0.0161	0.013	0.0146

ตารางที่ 4.1.2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของการเกิด CML ของสารสกัดเครื่องเทศไทยทั้ง 10 ชนิดที่ความยาวคลื่น 492 nm ด้วยเครื่อง Microplate Reader

	พริก ชี้หนู	ขมิ้น	โป๊ยก ี่ก	ยี่หระ	เม็ดเทียน ข้าวเปลือก	เม็ด ผักชี	อบเชย	พริกไทย ดำ	ลูก กระวาน	กานพลู
0% EtOH	0.7	0.9	0.8	0.7	0.8	0.6	0.8	0.8	0.8	0.7
40% EtOH	0.9	0.9	0.8	0.9	0.9	0.9	0.7	0.9	0.8	0.7
80% EtOH	0.8	0.9	0.8	0.9	0.9	0.9	0.7	0.9	0.8	0.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1.3 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การเกิด CML ของน้ำกลั่นวันที่ 0 วันที่ 7 และ Aminoguanidine ในเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ความยาวคลื่น 492 nm ด้วยเครื่อง Microplate Reader

ซ้ำที่	วันที่ 0	วันที่ 7	AG 10 µg/ml (0%EtOH)	AG 10 µg/ml (40%EtOH)	AG 10 µg/ml (80%EtOH)	AG 100 µg/ml (0%EtOH)
1	0.0	94.8	91.7	97.3	101.2	104.3
2	0.4	100.8	100.1	98.3	102.7	103.5
3	0.5	104.6	95.0	94.4	99.4	107.0
ค่าเฉลี่ย	0.3	100.1	95.6	96.7	101.1	104.9
SD	0.449	4.963	4.252	2.058	1.664	1.863

ตารางที่ 4.1.4 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การเกิด CML ของสารสกัดเครื่องเทศไทยทั้ง 10 ชนิดที่ความยาวคลื่น 492 nm ด้วยเครื่อง Microplate Reader

	พริก ชี้หนู	ขมิ้น	โปยงัก	ยี่หระ	เม็ดเทียน ข้าวเปลือก	เม็ดผักชี	อบเชย	พริกไทย ดำ	ลูก กระวาน	กานพลู
0% EtOH	81.6	104.3	91.8	78.4	91.7	68.4	90.9	82.5	87.2	78.1
40% EtOH	96.7	100.9	88.1	97.1	100.5	101.7	77.4	99.7	93.5	72.6
80% EtOH	89.0	99.9	90.8	97.3	102.2	101.5	71.4	100.4	91.0	71.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ง.

### ตารางการศึกษาสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเกิด CML ที่อยู่ในกานพลู

ตารางที่ 4.2.1 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การเกิด CML ของน้ำกลั่นวันที่ 0 วันที่ 7 และ Aminoguanidine ในเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ความยาวคลื่น 492 nm ด้วยเครื่อง Microplate Reader

ซ้ำที่	วันที่ 0	วันที่ 7	AG 10 µg/ml (40%EtOH)	AG 100 µg/ml (40%EtOH)	AG 10 µg/ml (80%EtOH)	AG 100 µg/ml (80%EtOH)
1	11.1	99.8	127.8	83.3	81.0	17.1
2	-19.0	111.6				
3	7.9	88.0				
ค่าเฉลี่ย	0.0	99.8	127.8	83.3	81.0	17.1
SD	13.487	9.639	0	0	0	0

ตารางที่ 4.2.2 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การเกิด CML ของสารสกัดกานพลูที่ความยาวคลื่น 492 nm ด้วยเครื่อง Microplate Reader

ซ้ำที่	กานพลู fraction DW	กานพลู fraction 25EtOH	กานพลู fraction 50EtOH)	กานพลู fraction 75EtOH	กานพลู fraction 99.99EtOH	กานพลู fraction Acetone
1	82.4	96.8	128.2	41.2	119.0	123.1
2	55.1	74.5	79.6	15.7	100.0	90.7
3	73.1	100.5	125.9	46.8	117.6	100.9
ค่าเฉลี่ย	70.2	90.6	111.2	34.6	112.2	104.9
SD	11.3423	11.4489	22.3898	13.5046	8.6392	13.5311

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

คำรับรองเล่มโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา

วันที่ 28 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2566

ข้าพเจ้า นางสาวมินตรา ยามันสะปิติน รหัสประจำตัว 62050640

นายชนาธิป ทองอ่อน รหัสประจำตัว 62050869

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชา ชีววิทยา

ขอรับรองว่าโครงการพิเศษเรื่อง

ชื่อภาษาไทย การตรวจการยับยั้งการเกิดคาร์บอกซีเมทิลไลซีนโดยการใช้สารสกัดเครื่องเทศไทย

ชื่อภาษาอังกฤษ CARBOXYMETHYL LYSINE INHIBITION FORMATION DETERMINATION USING SPICES

ปีการศึกษา 2565

เป็นผลงานวิจัยที่มีได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษาฉบับสมบูรณ์แล้ว

โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 6.10%

ลงชื่อ.....**มินตรา ยามันสะปิติน**.....

ลงชื่อ.....**ชนาธิป ทองอ่อน**.....

(นางสาวมินตรา ยามันสะปิติน)

(นายชนาธิป ทองอ่อน)

นักศึกษา

นักศึกษา

ข้าพเจ้า รศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ได้ตรวจสอบโครงการพิเศษของนักศึกษาข้างต้นแล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ.....**เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์**.....

(รศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่ในช่องทางอื่นใด  
อาจารย์ที่ปรึกษา  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้