การศึกษาฤทธิ์การยับยั้ง N^{ε} – (carboxymethyl) lysine (CML) และ N^{ω} - (carboxymethyl) arginine (CMA) โดยใช้สารสกัดจากพืชสวนครัวไทย

INHIBITION Nε – (CARBOXYMETHYL) LYSINE (CML) AND Nω - (CARBOXYMETHYL) ARGININE (CMA) FORMATION BY USING THAI GARDEN PLANTS

ณัฐกานต์ กล่อมจอหอ

อภิสรา ประเคน

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2565

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

INHIBITION Nε – (CARBOXYMETHYL) LYSINE (CML) AND Nω - (CARBOXYMETHYL) ARGININE (CMA) FORMATION BY USING THAI GARDEN PLANTS

NATTHAKAN KLOMCHOHO

APISARA PRAKEN

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOLOGY, SCHOOL OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2022

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษาฤทธิ์การยับยั้ง N^{ε} –(carboxymethyl) lysine (CML) และ N^{ω} -(carboxymethyl) arginine (CMA) โดยใช้สารสกัดจากพืชสวนครัวไทย

Inhibition N^{ε} – (carboxymethyl) lysine (CML) and N^{ω} -(carboxymethyl) arginine (CMA) Formation by using Thai garden plants

ชื่อนักศึกษา นางสาวณัฐกานต์ กล่อมจอหอ รหัสนักศึกษา 62050487

นางสาวอภิสรา ประเคน รหัสนักศึกษา 62050559

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2565

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.วิภาวี เดชติศักดิ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2565

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

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาฤทธิ์การยับยั้ง N^{ε} – (carboxymethyl) lysine (CML) และ N^{ω} -(carboxymethyl) arginine (CMA) โดยใช้สารสกัดจากพืชสวนครัวไทย Inhibition N^{ε} – (carboxymethyl) lysine (CML) and N^{ω} -(carboxymethyl) arginine (CMA) Formation by using Thai garden plants
ชื่อนักศึกษา	นางสาวณัฐกานต์ กล่อมจอหอ รหัสนักศึกษา 62050487 นางสาวอภิสรา ประเคน รหัสนักศึกษา 62050559
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2565
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.วิภาวี เดชติศักดิ์

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันผู้คนนิยมบริโภคอาหารแปรรูป อาหารใช้ความร้อนสูง หรืออาหารที่มีโปรตีน ไขมัน และน้ำตาลในปริมาณมาก ทำให้เกิดสาร AGEs เมื่อมีการสะสมมากขึ้นในร่างกายจะตามมาด้วยโรคต่าง ๆ เช่น โรคริ้วรอย และโรคไต เป็นต้น มีงานวิจัยกล่าวถึงสารสกัดจากพืชหลายชนิดสามารถยับยั้งการเกิด AGEs ได้เนื่องจากมีสารสำคัญในการต้านกระบวนการไกลเคชั่น โครงงานพิเศษนี้จึงได้ศึกษาฤทธิ์การยับยั้ง AGEs 2 ชนิด ได้แก่ N^{ε} – (carboxymethyl) lysine (CML) และ N^{ω} -(carboxymethyl) arginine (CMA) ด้วยสารสกัดจากพืชสวนครัวของไทย ได้แก่ พริกชี้ฟ้า กระเทียม ต้นหอม สะระแหน่ ขึ้นฉ่าย หอมแดง ผักชี ผักชีลาว กะเพรา และโหระพา สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ด้วยวิธี ELISA ผลจากการทดลองพบว่า สารสกัดที่ได้จากกะเพราในตัวทำละลายเอทานอล 60% มีฤทธิ์ยับยั้งการก่อตัวของ CML ได้ดีที่สุด จากนั้นจึงนำไปแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ผลการทดลองพบว่าที่ ส่วนของสารสกัด (Fraction) ที่ตัวทำละลายด้วยเอทานอล 25% แสดงค่าการยับยั้ง CML และ CMA ได้ดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งการเกิด CML และ CMA ได้ 27% และ 1% งานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดจากกะเพราอาจจะมีฤทธิ์ยับยั้งการก่อตัวของ AGEs และสามารถนำผลในเบื้องต้นไปต่อยอดด้วยการนำสารสกัดไปตรวจหาสารสำคัญที่มีฤทธิ์ยับยั้ง AGEs ด้วยเครื่อง HPLC เพื่อพัฒนาเป็นอาหารเสริมเพื่อสุขภาพต่อไป

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำสำคัญ : สารสกัดจากพืชสวนครัว, ไกลเคชั่น, การยับยั้งสารCML, การยับยั้งสารCMA, อีไลซ่า

Title	Inhibition N^{ε} –(carboxymethyl) lysine (CML) and N^{ω} –(carboxymethyl) arginine (CMA) Formation by using Thai garden plants
Students	Miss Natthakan Klomchoho Student ID 62050487
	Miss Apisara Praken Student ID 62050559
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)
Department	Biology
School	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2022
Advisor	Asst.Prof.Dr.Wipawee Dejtisakdi

Abstract

People nowadays has a lifestyle with having processed foods, high-heated foods or high-fat and high-sugar foods, these foods can cause advanced glycation endproducts (AGEs) accumulation that leads to metabolic syndromes including aging and kidney diseases. Several researches revealed that many plant extracts can inhibit the formation of AGEs because they contain important substances to fight the glycation process. In this study, we aimed to investigate the inhibitory activity of two AGEs, namely N^{ε} – (carboxymethyl) lysine (CML) and N^{ω} - (carboxymethyl) arginine (CMA) formation by using extracts from ten thai garden plants such as thai chilli, garlic, spring onion, kitchen mint, celery, shallots, coriander, dill, holy basil and sweet basil. We first made 30% and 60% ethanolic crude extraxts of these ten plants and then tested them by using ELISA. The result showed that 60% ethanolic crude extract of Holy basil showed the best inhibitory effect on CML formation. We then did column chromotrography to separate that crude extract. The result showed that fraction with 25% ethanol was the best inhibition of CML and CMA formation with the value of the inhibition formation at 27% and 1%, respectively. This study suggested that Holy basil may have an inhibitory effect on the formation of CML and CMA. We proposed to analyze several significant compounds by using HPLC and LCMS-MS and to finally develop a dietary supplement for health in the future study.

Keywords: crude extract, thai garden plants, glycation, AGEs, CML inhibition, CMA inhibition

เอกสารนี้ [illegible] ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น [illegible] ให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีเนื่องมาจากความกรุณาและความการช่วยเหลือสนับสนุนของทุก ๆ ท่าน ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.วิภาวี เดชติศักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่ได้ให้คำปรึกษา ชี้แนะแนวทาง ให้ความช่วยเหลือในการปฏิบัติการในห้องปฏิบัติการและนอกห้องปฏิบัติการ แก้ไขปรับปรุงข้อบกพร่องตลอดจนให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำโครงงานพิเศษ ทำให้โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงสมบูรณ์ไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณท่านอาจารย์ประธานกรรมการสอบโครงงานพิเศษ รศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ และ ท่านอาจารย์กรรมการสอบโครงงานพิเศษ ผศ.ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ ที่กรุณาเป็นกรรมการในการสอบโครงงานพิเศษ นอกจากนี้ยังคอยให้คำแนะนำ อนุเคราะห์อุปกรณ์และสารเคมีที่ต้องใช้ คอยช่วยเหลือในการทำโครงงานพิเศษให้สำเร็จลุล่วงเรียบร้อยสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา เจ้าหน้าที่ห้องธุรการภาควิชาชีววิทยา และเจ้าหน้าที่ฝ่ายอาคารคณะวิทยาศาสตร์ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำโครงงานพิเศษให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณบิดามารดาที่คอยอบรมสั่งสอนและเป็นกำลังใจและแรงผลักดันในการทำโครงงานพิเศษให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีรวมถึงเพื่อน ๆ พี่ป.โท พี่นักวิทย์ และบุคคลอื่น ๆ ผู้จัดทำโครงงานพิเศษ ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ณัฐกานต์ กล่อมจอหอ

อภิสรา ประเคน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ช
สารบัญรูป ..... ซ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1
1.2 วัตถุประสงค์ 2
1.3 ขอบเขต 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 พืชสวนครัวที่ใช้ในการศึกษา 3
2.1.1 กะเพรา (Holy basil) 3
2.1.2 กระเทียม (Garlic) 4
2.1.3 ขึ้นฉ่าย (Celery) 5
2.1.4 ต้นหอม (Spring onion) 5
2.1.5 ผักชี (Conriader) 6
2.1.6 ผักชีลาว (Dill) 6
2.1.7 พริกขี้ฟ้า (Chili spur pepper) 7
2.1.8 สะระแหน่ (Kitchen Mite) 8
2.1.9 หอมแดง (Shallot) 8
2.1.10 โหระพา (Sweet basil) 9
2.2 สารสกัดจากพืช 9
2.2.1 การเลือกวิธีการสกัด 10
2.2.2 วิธีที่ใช้ในการสกัด 11
2.2.2.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent Extraction) 11
2.2.2.2 ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด 11
2.2.2.3 การทำให้สารสกัดเข้มข้น 11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

2.2.2.4 การทำให้สารสกัดบริสุทธิ์ ... 11
2.3 ไกลเคชั่น ... 12
2.3.1 กระบวนการเกิดไกลเคชั่น ... 13
2.3.1.1 Early stage ... 13
2.3.1.2 Intermediate stage ... 13
2.3.1.3 Late stage ... 13
2.3.2 ผลของปฏิกิริยาไกลเคชั่นต่อสุขภาพ ... 14
2.3.3 ประเภทของ AGEs ... 15
2.3.3.1 Fluorescence AGEs crosslinks ... 15
2.3.3.2 Nonfluorescence AGEs crosslinks ... 15
2.3.3.3 Noncrosslinks AGEs ... 16
2.3.4 N^{ε} – (carboxymethyl) lysine (CML) ... 17
2.3.5 N^{ω} - (carboxymethyl)arginine (CMA) ... 18
2.4 การหาปริมาณ CML ... 19
2.5 หลักการทดสอบด้วยวิธี ELISA ... 19
2.5.1 รูปแบบการทดสอบของงาน ELISA ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ... 20
2.5.1.1 Indirect ELISA ... 20
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ... 21
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย ... 27
3.1 ผักสวนครัว ... 27
3.2 สารเคมี ... 27
3.3 อุปกรณ์ ... 28
3.4 การเตรียมสารสกัด ... 29
3.5 ปฏิกิริยาการก่อตัวของ AGEs ... 29
3.6 การตรวจหา AGEs โดย ELISA ... 30
3.7 การแยกคอลัมน์ ... 30
3.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ ... 31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 32
4.1 ผลของการยับยั้งอัตราการก่อตัวของ N^{ε}-(carboxymethyl) lysine (CML)..... 32
4.2 ผลการทดสอบการยับยั้ง CML ด้วยสารสกัดเอทานอล 60% จากกะเพราที่นำมาแยกคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ 34
4.4 ผลการทดสอบการยับยั้ง CMA ด้วยสารสกัดเอทานอล 60% จากกะเพราที่นำมาแยกคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ 36
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 38
5.1 สรุปผลการวิจัย 38
5.2 ข้อเสนอแนะ 38
เอกสารอ้างอิง 39
ภาคผนวก 43
ภาคผนวก ก การเตรียมสารสกัด 44
ภาคผนวก ข ขั้นตอนการทดสอบการยับยั้งสาร CML และ CMA 45
ภาคผนวก ค ตารางแสดงค่าการดูดกลืนแสง และเปอร์เซ็นต์การก่อตัวตัวของ CML และ CMA 49
ภาคผนวก ง รูปการทดลอง 52
ภาคผนวก จ การทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOWA 57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

ก.1 การเตรียมสารตัวทำละลายเทานอล 30% และ 60%..... 44
ค.1 แสดงผลการก่อตัวของ CML ในตัวควบคุมเชิงบวกและตัวควบคุมเชิงลบ
โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร..... 49
ค.2 แสดงผลของการก่อตัวของ CML ในสารสกัดจากผักสวนครัวทั้ง 10 ชนิดในตัวทำละลาย
เอทานอล 30% และเอทานอล 60% โดยวิธี ELISA และวัดค่าการดูดกลืนแสง
ที่ 492 นาโนเมตร..... 49
ค.3 แสดงผลการก่อตัว CML ของตัวควบคุมเชิงบวกและตัวควบคุมเชิงลบเพื่อเป็นตัวเปรียบ
เทียบฤทธิ์การยับยั้ง CML ของกะเพราในตัวทำละลายเอทานอล 60% ที่คัดเลือก..... 50
ค.4 แสดงผลการยับยั้งการก่อตัวของ CML ของกะเพราในตัวทำละลายเอทานอล 60%
หลังการแยกคอลัมน์ให้เป็นสารบริสุทธิ์แล้ว..... 50
ค.5 แสดงผลการก่อตัว CMA ของตัวควบคุมเชิงบวกและตัวควบคุมเชิงลบเพื่อเป็นตัวเปรียบ
เทียบฤทธิ์การยับยั้ง CMA ของกะเพราในตัวทำละลายเอทานอล 60% ที่คัดเลือก..... 50
ค.6 แสดงผลการยับยั้งการก่อตัวของ CMA ของกะเพราในตัวทำละลายเอทานอล 60%
หลังการแยกคอลัมน์ให้เป็นสารบริสุทธิ์แล้ว..... 50
จ.1 การทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์
การยับยั้ง CML โดยสารสกัดจากพืชสวนครัว ที่ตัวทำละลายเอทานอล 30% และ
เอทานอล 60% โดยการทดสอบ ELISA..... 58
จ.2 การทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการทดสอบ CML โดย
ใช้สารสกัดจากกะเพรา 60% ที่แยกคอลัมน์และนำไปทดสอบ ELISA..... 59
จ.3 การทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการทดสอบ CMA โดย
ใช้สารสกัดจากกะเพรา 60% ที่แยกคอลัมน์และนำไปทดสอบ ELISA..... 60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 ปฏิกิริยาไกลเคชั่นระหว่างอัลดีไฮด์กับแอมมัน และการเกิดสาร advanced glycation endproducts (AGEs) 13

2.2 การเกิด AGEs ในภายในเซล์ (AGEs formation pathway in vivo) 3DG, 3-deoxyglucosone; MGO, methylglyoxal; CML, N-**ε**-(carboxymethyl) lysine; CEL, N-**ε**- (carboxyethyl) lysine; DOLD, deoxyglucosone-lysine dimer; MOLD, methyl glyoxal-lysine dimer; GOLD, glyoxal-lysine dimer 14

2.3 แสดง AGEs ชนิด crosslinks และมีคุณสมบัติการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ 15

2.4 AGEs ชนิด crosslink แต่ไม่มีคุณสมบัติเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ 16

2.5 AGEs ชนิดโปรตีนเดี่ยวที่เปลี่ยนแปลงโครงสร้าง 16

2.6 โครงสร้างของ N^{ε} – (carboxymethyl) lysine (CML) 18

2.7 โครงสร้างของ N^{ω} - (carboxymethyl)arginine (CMA) 19

2.8 ภาพประกอบของ Indirect ELISA 20

2.9 ผลของ CFE ต่อระบบ BSA/กลูโคส ไกลเคชั่น 23

2.10 ผลกระทบของ CFE ต่อไกลเคชั่นที่ได้จากอัลดีไฮด์ 24

4.1 ELISA Plate แสดงผลการเกิดสีของกลุ่มควบคุมและสารสกัดของพืชทั้ง 10 ชนิด ต่อการยับยั้ง CML 32

4.2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของกลุ่มควบคุมและสารสกัดของพืชทั้ง 10 ชนิด 33

4.3 แสดงอัตราการก่อตัวของ CML ในกลุ่มควบคุมและสารสกัดจากพืชทั้ง 10 ชนิด 33

4.4 ELISA Plate แสดงผลการเกิดสีของกลุ่มควบคุมและสารสกัดจากกระเพราในตัวทำละลาย 60% ที่ Fraction ตัวทำละลายต่างๆ 34

4.5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ของกลุ่มควบคุมและกระเพรา 60% ที่แยกคอลัมน์ ด้วยน้ำกลั่น เอทานอล 25% 50% 75% 100% และ อะซิโตน 33

4.6 แสดงอัตราการยับยั้ง CML ของกลุ่มควบคุมและกระเพรา 60% ที่แยกคอลัมน์ ด้วยน้ำกลั่น เอทานอล 25% 50% 75% 100% และ อะซิโตน 35

4.7 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร CMA ของกลุ่มควบคุมและสารสกัดจากกะเพรา ที่แยกคอลัมน์ด้วย น้ำกลั่น เอทานอล 25% 50% 75% 100% และ อะซิโตน 36

4.8 แสดงอัตราการยับยั้ง CMA ของกลุ่มควบคุมและสารสกัดจากกะเพราที่แยกคอลัมน์ ด้วย น้ำกลั่น เอทานอล 25% 50% 75% 100% และ อะซิโตน 37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

ง.1 การเตรียมตัวอย่างพืช 52
ง.2 การปั่นตัวตัวอย่างพืชด้วยเครื่องปั่น 52
ง.3 การกรองสารสกัดด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ 53
ง.4 สารสกัดจากพืช 53
ง.5 ทำปฏิกิริยาการก่อตัวของ AGEs ในสารสกัด 54
ง.6 นำสารสกัดมาปั่นตกด้วยเครื่อง Spin down 54
ง.7 ทดสอบการยับยั้ง CML ด้วยวิธี ELISA 55
ง.8 การระเหยแห้งด้วยเครื่อง Rotary Evaporator 55
ง.9 การแยกคอลัมน์ของสารสกัดด้วยน้ำกลั่น, เอทานอล 25% 50% 75% 100%
และ อะซิโตน 56
ง.10 ELISA plate แสดงผลการเกิดสีของกลุ่มควบคุมและสารสกัดของพืชทั้ง 10 ชนิด
ต่อผลการยับยั้ง CML 56
ง.11 ELISA plate แสดงผลการเกิดสีของกลุ่มควบคุมและสารสกัดจากกะเพราใน
ตัวทำละลาย 60% ที่ Fraction ตัวทำละลายต่าง ๆ 57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันผู้คนนิยมบริโภคอาหารหลายชนิดที่มีกระบวนการประกอบอาหารที่หลากหลาย ได้แก่ อาหารที่ผ่านการใช้ความร้อนสูง อาหารแปรรูป หรืออาหารที่มีปริมาณโปรตีน ไขมัน และน้ำตาลสูง ซึ่งกระบวนการปรุงอาหารเหล่านี้ช่วยให้อาหารมีรสชาติดีขึ้นหรือมีกลิ่นที่น่าบริโภคมากขึ้น เช่น หมูกระทะ ไก่ทอด ขนมปังเบเกอรี่ น้ำอัดลม และชานมไข่มุก แต่อาหารเหล่านี้เมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้วทำให้เกิดปฏิกิริยาที่ก่อผลเสียต่อร่างกาย คือ Advanced glycation end products (AGEs) หรือสารเร่งความชรา เป็นสารสีน้ำตาลที่เกิดขึ้นในระยะสุดท้ายของปฏิกริยาไม่ใช้เอนไซม์ของกระบวนการไกลเคชั่น เกิดจากการทำปฏิกิริยาของสารตั้งต้น 2 ชนิด คือ กลุ่มอะมิโนของโปรตีนกับกลุ่มคาร์บอนิลของน้ำตาลรีดิวซิ่งหรือสารประกอบคาร์บอนิลอื่น ๆ (Bry, 2001) AGEs เป็นสารประกอบที่เกิดได้เองทั้งในสิ่งมีชีวิตและจากกระบวนการปรุงอาหารไม่ว่าจะเป็นอาหารแปรรูปหรือกลุ่มอาหารที่ผ่านความร้อนสูง AGEs เป็นสารประกอบที่สามารถจับได้กับโปรตีนภายในและภายนอกเซลล์ เป็นสารที่ถือว่าเป็นตัวชี้วัดการเกิดการแก่ของเซลล์ หากมี AGEs มากเกินไป สามารถขัดขวางการทำงานของเซลล์เหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระ เกิดการกระตุ้นการอักเสบผ่าน NF-KB inflammatory pathway ระบบภูมิคุ้มกันแปรปรวน และยังทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนกับโรคเรื้อรังหลายโรค เช่น ต้อกระจกตาเสื่อม ไตวาย ภาวะหลอดเลือดแข็งตัว อัลไซเมอร์ ผิวพรรณแก่ชรา ปลายประสาทเสื่อมหรืออักเสบ และโรคเบาหวาน (Bulgaria: INTECH, Inc., 2012) N^{ε} – (carboxymethyl) lysine (CML) คือสารประกอบ AGEs ที่พบมากที่สุดและเป็น marker ที่นิยมใช้มากที่สุด นอกจากนี้ยังมีสารประกอบ AGEs ได้แก่ N^{ε}-(carboxyethyl)lysine (CEL), pentosidine and pyrraline ที่พบได้มากเช่นกัน (Contreras and Novakofski, 2010) มีงานวิจัยรายงานว่าสารสังเคราะห์และผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติสามารถยับยั้งปฏิกิริยาไกลเคชั่นหรือยับยั้งการเกิด AGEs ได้ โดยแสดงถึงความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของความสามารถในการต้านไกลเคชั่นจากสารในกลุ่ม phenolic ในพืชผักที่บริโภค (Meng et al., 2011) และมีรายงานว่าสาร isoquercetin ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม flavonoids สาร Kaempferol และสาร rutin ในใบตู้จ้งซึ่งเป็นพืชสมุนไพร ให้ผลแสดงการยับยั้งสารประกอบ AGEs, CML และ CMA ได้ดี แสดงถึงความสามารถต้านไกลเคชั่น เพราะฉะนั้นการบริโภคอาหารจากพืชที่เป็นแหล่งของสารต้านออกซิเดชั่นและต้านอนุมูลอิสระจะสามารถยับยั้งการเกิดไกลเคชั่นซึ่งจะเป็นประโยชน์กับการช่วยแก้ไขโรคเรื้อรัง (Sugawa et al., 2016) หลายบทความกล่าวถึงการยับยั้ง AGEs ได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยใช้สารสกัดจากพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษนี้จึงมีการทดสอบสารสกัดจากพืชสวนครัว 10 ชนิด ได้แก่ พริกชี้ฟ้า กระเทียม ต้นหอม สะระแหน่ ขึ้นฉ่าย หอมแดง ผักชี ผักชีลาว กะเพรา และโหระพา ที่มีสรรพคุณช่วยต้านโรคต่าง ๆ และมีสารสำคัญ เช่น สารฟลาโวนอยด์ ฟีนอลิค เบต้าแคโรทีน และโรสมาลินิค เป็นต้น มาทดสอบการยับยั้งการสร้าง CML และ CMA ในตัวทำลายความเข้มข้นต่างกัน ตรวจหาระดับ CML และ CMA ด้วย วิธีการทดสอบ Enzyme-linked immunosorbent assay ที่ใช้หลักการทางภูมิคุ้มกันวิทยาในการวิจัยทางคลีนิคและการวิจัยพื้นฐาน (Panisara, 2020) ผลที่ได้จะนำไปวิเคราะห์ต่อด้วยการแยกคอลัมน์โครมาโตรกราฟีเพื่อดูฤทธิ์การยับยั้งของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1) เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชสวนครัวในตัวทำละลายเอทานอล 30% และ 60% ต่อการยับยั้ง CML และ CMA

2) เพื่อศึกษา Fraction ที่มีผลต่อความสามารถในการยับยั้ง CML และ CMA โดยใช้ น้ำกลั่น, เอทานอล 25%, 50%, 75%, 100% และ อะซิโตน เป็นตัวทำละลาย

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาความสามารถในการยับยั้งการสร้าง CML และ CMA ของสกัดสารจากพืชสวนครัวทั้ง 10 ชนิด ได้แก่ พริกชี้ฟ้า กระเทียม ต้นหอม สะระแหน่ ขึ้นฉ่าย หอมแดง ผักชี ผักชีลาว กะเพรา และโหระพา ด้วยตัวทำละลายเอทานอล 30% และเอทานอล 60% สร้างสาร CML และ CMA ด้วยน้ำตาลไรโบสและอะมิโนที่ได้จากเจลาตินของสัตว์ ทดสอบด้วยวิธี ELISA เพื่อดูว่า CML และ CMA เพิ่มขึ้นหรือลดลงจากการวัดผลของสีที่เกิดขึ้นโดยอ่านค่าการดูดกลืนแสง คัดเลือกสารสกัดที่ดีที่สุดมาระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน และแยกส่วนสารสกัดด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีที่ Fraction น้ำกลั่น, เอาทานอล 25% , 50%, 75%, 100% และอะซิโตน เพื่อดูผลการยับยั้ง CML และ CMA ของสารสกัดจากพืชที่คัดเลือก

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ได้รู้ฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชสวนครัวในตัวทำละลายเอทานอล 30% และ 60% ต่อการยับยั้ง CML และ CMA

2) ได้ทราบถึงผลของสารสกัดในการยับยั้ง CML และ CMA จากการแยกคอลัมน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เนื่องจากปัจจุบันมีการบริโภคผักและผลไม้มากขึ้น และในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาการค้นพบความเชื่อมโยงระหว่างพืชกับสิ่งแวดล้อมผ่านไฟโตเคมิคอล ได้ก่อให้เกิดการบำบัดทางพฤกษศาสตร์ สารสกัดจากพืชได้รับการประเมินอย่างกว้างขวางสำหรับความสามารถในการป้องกันการก่อตัวของ AGEs ในหลอดทดลอง (Luc, 2013) ดังนั้น โครงงานพิเศษนี้มีจุดประสงค์เพื่อทดสอบการยับยั้งการสร้าง N^{ε} – (carboxymethyl) lysine (CML) และ N^{ω} -(carboxymethyl) arginine (CMA) ด้วยสารสกัดจากผักสวนครัว 10 ชนิด ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาค้นคว้าหาข้อมูลและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ดังนี้

2.1 พืชสวนครัวที่ใช้ในการศึกษา

2.1.1 กะเพรา (Holy basil)

วงศ์ : Labiatae ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Ocimum tenuiflorum* L. ชื่อสามัญ : Holy basil, Thai basil, Sacred basil. ชื่อพื้นเมือง : เชียงใหม่ - กอมก้อ, กอมก้อดง , แม่ฮ่องสอน - ห่อกวอซู, ห่อตูปลู, อิ่มคิมหลำ กะเหรี่ยง - ห่อกวอซู, ห่อตูปลู , ภาคกลาง – กะเพรา, กะเพราขน, กะเพราขาว, กะเพราแดงภาคอีสาน – อีตู่ไทย ลักษณะทางพฤษศาสตร์ : ไม้พุ่ม ขนาดเล็ก สูงประมาณ 0.3 - 1.0 เมตร ลำต้นตั้งตรง ลักษณะเป็นรูปสี่เหลี่ยม โคนต้นแข็ง มีขนคลุมทั่ว แตกกิ่งก้านสาขามาก และมีกลิ่นหอมแรง กะเพรามี 3 พันธุ์ คือ กะเพราแดง กะเพราขาว และกะเพราลูกผสมระหว่างกะเพราแดงและกะเพราขาว มีลักษณะทั่วไปคล้ายโหระพา ต่างกันที่กลิ่นและกิ่งก้านซึ่งมีขนปกคลุมมากกว่า กะเพราขาว มีใบและลำต้นสีเขียว และกะเพราะแดง มีใบและลำต้นสีแดงอมเขียว ใบ เป็นใบเดี่ยว แตกใบออกตรงข้ามในแต่ละข้อของลำต้นและกิ่ง ลักษณะใบรูปรีหรือรูปไข่ค่อนข้างยาว ปลายใบแหลม โคนใบรูปลิ่มหรือมน ขอบใบจักฟันเลื่อยและเป็นคลื่น แผ่นใบบางสีเขียวหรือสีแดง และมีขนปกคลุมทั้งสองด้าน ก้านใบสีเขียวหรือสีแดงแล้วแต่พันธุ์ ดอก ออกดอกเป็นช่อแบบช่อฉัตร ออกช่อที่ยอดหรือปลายกิ่ง ริ้วประดับรูปไข่หรือรูปหัวใจ ปลายแหลม ขอบมีขน ดอกย่อยแบบสมมาตรด้านข้าง ก้านดอกโค้งยาวมีขน มีกลีบเลี้ยงเชื่อมติดกันเป็นหลอดปลายแยกเป็นปาก กลีบดอกสีขาวอมม่วงหรือสีม่วงเชื่อมติดกันเป็นรูประฆังปลายแยกเป็นปาก ปากบนมีแฉกมนๆ 4 แฉก ปากล่างโค้งลง แบน ขอบเรียบ ดอกกะเพราแดงสีเข้มกว่ากะเพราขาว เมล็ด มีขนาดเล็ก รูปไข่ สีน้ำตาลมีจุดสีเข้ม หุ้มด้วยกลีบเลี้ยงของเมล็ด สรรพคุณ : ใบหรือทั้งต้น ใช้เป็นยาขับลมแก้ปวดท้อง ท้องเสีย และคลื่นไส้อาเจียน นิยมใช้กะเพราแดงมากกว่ากะเพราขาว รสเผ็ดร้อน ต้มเอาน้ำดื่มเป็นยาขับลม แก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ แก้ปวดท้อง บำรุงธาตุ แก้จุกเสียด แก้ลมตานซาง แก้คลื่นเหียนอาเจียน น้ำคั้นจากใบใช้เป็นยาขับเสมหะ ขับเหงื่อ ขับน้ำดี ช่วยย่อยไขมัน น้ำคั้นจากใบใช้ทาภายนอกแก้โรคผิวหนัง กลากเกลื้อน รักษาหูด

เอกสารนี้ ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ไม่ว่าการคัดลอกทั้งหมดหรือส่วนใดส่วนหนึ่ง

หยอดหูแก้อาการปวดหู ใบแห้งใช้ชงดื่มกับน้ำแก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ และน้ำมันจากใบใช้เป็นยาฆ่ายุงได้ ซึ่งมีฤทธิ์ได้นาน 2 ชั่วโมง หรือไล่แมลงวันทอง บดเป็นยานัตถุ์ แก้คัดจมูก ยาชงหรือน้ำต้มใบใช้แก้ตับอักเสบและบำรุงธาตุสำหรับเด็ก ดอก รสเผ็ดร้อน ผสมกับน้ำผึ้งรับประทานแก้หลอดลมอักเสบ เมล็ด รสเผ็ดร้อน เป็นยาขับลม แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ แก้โรคทางเดินปัสสาวะ และไตอักเสบ เมื่อนำเมล็ดไปแช่น้ำจะพองตัวเป็นเมือกขาวใช้พอกบริเวณตาเมื่อฝุ่นละอองเข้าตาหรือตามีผง และจะไม่ทำให้ตาช้ำ ราก รสเผ็ดร้อน ต้มน้ำดื่มเป็นยาขับเหงื่อในคนไข้โรคมาลาเรีย แก้ธาตุพิการ (โชติอนันต์, 2551) การขยายพันธ์ : วิธีเพาะเมล็ด และวิธีชำกิ่ง

2.1.2 กระเทียม (Garlic)

วงศ์ : Liliaceae (Alliaceae) ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Allium sativum* L. ชื่อสามัญ : Garlic, Common Garlic ชื่อพื้นเมือง : อุดร - กระเทียมขาว, หอมขาว , ภาคกลาง - กระเทียม, กระเทียมจีน , ภาคเหนือ – หอมเทียม , ภาคใต้ – เทียม, หัวเทียม ลักษณะทางพฤษศาสตร์ ไม้ล้มลุก ลำต้นสูงประมาณ 30 – 50 เซนติเมตร มีหัวอยู่ใต้ดิน แต่ละหัวประกอบด้วยกลีบหลายกลีบเรียงซ้อนกันเป็นชั้นๆ แต่ละกลีบจะมีเปลือกหรือกาบสีขาวหรือม่วงอมชมพูหุ้มอยู่ 2 - 4 ชั้นโดยรอบ ลอกออกได้และสามารถแยกออกจากหัวเป็นอิสระได้ บางพันธุ์แต่ละหัวมีเพียงกลีบเดียว เรียกว่า กระเทียมโทน ใบเป็นใบเดี่ยว ลักษณะใบรูปขอบขนาน แบนและแคบยาว ปลายใบแหลม โคนของใบแผ่เป็นแผ่นและเชื่อมติดกันหุ้มรอบใบอ่อนกว่าด้านใน ลักษณะคล้ายลำต้นเทียม ขอบใบเรียบ ท้องใบมีรอยพับเป็นสันตลอดความยาว ใบมีสีเขียวแก่ ดอก ออกดอกเป็นช่อ ก้านช่อดอกยาว เล็ก ติดกันเป็นกระจุกที่ปลายก้านช่อ มีลักษณะกลม ประกอบด้วยดอกหลายดอก มีกาบหุ้มเป็นจะงอยยาว กลีบดอกมี 6 กลีบ รูปร่างยาวแหลม สีขาวแต้มสีม่วงหรือขาวอมชมพู ผลขนาดเล็กเป็นกระเปาะสั้นๆ รูปไข่หรือค่อนข้างกลม มี 3 พู เมล็ด เมล็ดเล็ก สีดำ สามารถขยายพันธุ์ได้เช่นเดียวกับกลีบกระเทียม ซึ่งการปลูกกระเทียมในประเทศไม่ค่อยออกดอกหรือติดผลหรือเมล็ด (โชติอนันต์, 2551) สรรพคุณ แก้ปัญหาผมหลุดร่วง เพียงแค่ฝานกระเทียมเป็นชิ้นบาง ๆ แล้วนำมานวดศีรษะ หรือจะผสมลงในออยล์แล้วนำมานวดศีรษะก็ได้เช่นกัน เพราะในกระเทียมมีอัลซิลิน (allicin) และซัลเฟอร์ (sulfur) สูง ซึ่งมีประสิทธิภาพในการลดปัญหาผมหลุดร่วงนั่นเอง ป้องกันและรักษาโรคหวัด หั่นกระเทียมเป็นแว่นแช่ในน้ำร้อนประมาณ 2-3 นาที แล้วกรองเอากากออก จิบเป็นชากระเทียมอุ่นๆ บรรเทาอาการอักเสบจากโรคสะเก็ดเงิน กระเทียมมีฤทธิ์ต้านอาการอักเสบ ดังนั้นจึงช่วยบรรเทาอาการอักเสบจากผื่นแดงได้ดี โดยเฉพาะผื่นแดงที่เกิดจากโรคสะเก็ดเงิน ให้ทาน้ำมันกระเทียมบริเวณที่เป็นแผล เพื่อให้สะเก็ดหลุดไป และลดผื่นแดงบนผิวหนังก็ได้ รักษาสิว กระเทียมถือเป็นยารักษาสิวจากธรรมชาติ ที่มีประสิทธิภาพเป็นอย่างมาก เพราะมีแอนตี้ออกซิแดนท์ ซึ่งมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ โดยฝานกระเทียมสดบาง ๆ แล้วนำมาประคบลงบนสิวเบา ๆ ทิ้งไว้สักพัก แล้วล้างออกด้วยน้ำสะอาด (คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี, 2566) การขยายพันธ์ : กระเทียมปลูกโดยใช้กลีบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 ขึ้นฉ่าย (Celery)

วงศ์ : Apiaceae ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Apium graveolens* L. ชื่อสามัญ : celery ชื่อพื้นเมือง : ภาษาจีน - ขึ้นฉ่าย , คนไทย - ผักข้าวปีน, ผักปืน, ผักปิ๋ม ลักษณะทางพฤษศาสตร์ : ต้นขึ้นฉ่ายเป็นพืชล้มลุก (ขึ้นฉ่ายจีน) มีความสูงประมาณ 30 เซนติเมตร ส่วนต้นขึ้นฉ่ายฝรั่งจะมีความสูงประมาณ 40-60 เซนติเมตร ส่วนลำต้นมีลักษณะกลวง มีกลิ่นหอมทั้งต้น มีอายุประมาณ 1-2 ปี และมีอยู่ด้วยกัน 3 ชนิด คือ ต้นสีขาว ต้นสีเขียว และต้นสีน้ำตาล ใบขึ้นฉ่าย ลักษณะของใบเป็นใบประกอบแบบขนนก ออกตรงข้ามกัน ใบสีเขียวอมเหลือง ใบย่อยมีลักษณะเป็นรูปลิ่มหยัก ขอบใบหยักเป็นแฉกลึก แต่ละแฉกอาจจะเป็นรูปสามเหลี่ยมหรือรูปห้าเหลี่ยม ก้านใบยาวแผ่ออกเป็นกาบ ดอกขึ้นฉ่าย ดอกมีขนาดเล็กสีขาว เป็นดอกสมบูรณ์เพศ ออกเป็นช่อแบบซี่ร่ม ตรงยอดดอกนั้นแผ่เป็นรัศมี ผลขึ้นฉ่าย ผลมีลักษณะกลมรี สีน้ำตาล มีขนาดเล็กมาก และมีกลิ่นหอม จะให้ผลเพียงครั้งเดียว สรรพคุณ : ช่วยทำให้เจริญอาหาร กระตุ้นให้เกิดความอยากอาหาร ขึ้นฉ่ายเป็นผักที่มีโพแทสเซียมสูง ซึ่งช่วยในการขยายตัวของหลอดเลือดป้องกันโรคหัวใจขาดเลือด มีโซเดียมอินทรีย์ที่ช่วยในการปรับสมดุลของกรดและด่างในเลือด เป็นหนึ่งในผักที่มีสารโพลีฟีนอล ซึ่งเป็นตัวช่วยป้องกัน DNA ถูกทำลาย ช่วยลดอาการอักเสบ และป้องกันมะเร็งด้วยการไปยับยั้งการกลายพันธุ์และสารก่อมะเร็งในร่างกาย น้ำคั้นจากขึ้นฉ่ายมีสรรพคุณใช้เป็นยากล่อมประสาท ช่วยในการนอนหลับ ทำให้รู้สึกสบายขึ้น ช่วยรักษาโรคอัลไซเมอร์ ช่วยบำรุงหัวใจและรักษาโรคหัวใจ ช่วยในการทำงานของระบบหมุนเวียนต่าง ๆ ในร่างกาย ช่วยลดอาการของโรคหอบหืด การขยายพันธุ์ : ขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ด (กาญจนา, 2563)

2.1.4 ต้นหอม (Spring Onion)

วงศ์ : Alliaceae ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Alliumcepa* var. *aggregatum* ชื่อสามัญ : Spring Onion, Green Shallot ชื่อพื้นเมือง : ภาคอีสาน – ผักบั่ว , ภาคกลาง – หอมไท, หอมเล็ก, หอมหัว , ภาคใต้ – หอมแกง ลักษณะทางพฤษศาสตร์ : ลำต้น มีลักษณะกลมๆ จะถูกห่อหุ้ม ไปด้วยกาบใบโดยรอบๆ มีสีเขียว ใบ มีลักษณะเป็นท่อยาว ปลายแหลม ภายในกลวง ใบของต้นหอม มีสีเขียว มีกลิ่นฉุนแรง รสชาติเผ็ดร้อน ดอก ออกเป็นช่อ ก้านช่อดอกยาว ช่อดอกเมื่อบานมีลักษณะคล้ายร่ม มีดอกย่อยๆ เป็นจำนวนมาก มีดอกสีขาวก้านช่อดอกยาวกลมข้างในกลวง รองรับช่อดอกไว้ หัว มีหัวใต้ดิน หัวมีลักษณะทรงกลม หรือทรงกลมรี มีสีขาวหรือสีม่วง ตามสายพันธุ์ มีรสชาติเผ็ดร้อน มีกลิ่นฉุนแรง ใช้ประกอบปรุงอาหารต่างๆ ราก ระบบรากฝอยเล็กๆ สีน้ำตาล ออกด้านล่างของหัว หัวมีลักษณะทรงกลม หรือทรงกลมรี หัวอ่อนมีสีขาวหรือสีม่วง ตามสายพันธุ์ มีกลิ่นฉุนแรง รสชาติเผ็ดร้อน สรรพคุณ : มีฟอสฟอรัส มีเบตาแคโรทีน มีวิตามินเอ มีวิตามินซี มีวิตามินบี1 มีวิตามินบี2 มีวิตามินบี3 มีวิตามินบี5 มีวิตามินบี6 มีวิตามินบี9 มีคาร์โบไฮเดรต มีพลังงาน มีเส้นใย มีไขมัน มีเหล็ก มีสังกะสี มีฟลูออไรด์ มีแคลเซียม มีน้ำตาล มีโปรตีน มีแมกนีเซียม มีแมงกานีส มีโพแทสเซียมวยขับเหงื่อ ช่วยบำรุงหัวใจ ช่วยป้องกันโรคหัวใจ แก้แมลงสัตว์กัดต่อย ช่วยลดไข้ แก้หวัด แก้คัดจมูก แก้น้ำมูกไหล ช่วยป้องกันโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โลหิตจาง ช่วยบำรุงสายตา ช่วยบำรุงผิวพรรณ ช่วยลดกระดูกพรุน ช่วยป้องกันโรคมะเร็ง มีเส้นใยอาหาร ช่วยป้องกันอาการท้องผูก ช่วยบำรุงระบบย่อยอาหาร ช่วยลดคอเลสเตอรอลในกระแสเลือด มีอนุมูลอิสระ มีภูมิคุ้มกันเชื้อโรค การขยายพันธ์ : ขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ด หรือแยกหัวออกมาปลูก (สำนักงานเกษตรและสหกรณ์ จังหวัดสุรินทร์, 2563)

2.1.5 ผักชี (Conriander)

วงศ์ : Umbelliferae ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Coriandrum sativum* L. ชื่อสามัญ : Coriander ชื่อพื้นเมือง : นครพนม – ผักหอม , ภาคอีสาน – ผักหอมน้อย , ภาคเหนือ - ผักหอมป้อม ผักหอมผอม ลักษณะทางพฤษศาสตร์ : เป็นพืชล้มลุก มีความสูงประมาณ 30 ซม. มีลำต้นกลมๆ มีสีเขียว ลำต้นจะถูกห่อหุ้มไปด้วย ก้านใบโดยรอบๆ มีใบกลมเล็กๆ และมีก้านใบรองรับ ใบจะมีรอยหยักรอบนอก มีสีเขียวสด ดอกจะมีสีขาวออกเป็นช่อ ผลอ่อนจะมีสีเขียว เมื่อผลแก่สีน้ำตาล มีกลิ่นหอม ต้นผักชี มีลักษณะกลมๆ จะถูกห่อหุ้ม ไปด้วยก้านใบโดยรอบๆ ต้นของผักชีจะมีสีเขียวและมีกลิ่นหอม ใบผักชี มีลักษณะมีใบกลมเล็กๆ มีรอยหยักรอบนอก มีสีเขียวสด มีเส้นขนานกับก้านใบ รากผักชี ระบบรากแก้ว รากมีลักษณะยาวกลมๆ จะมีสีน้ำตาล มีกลิ่นหอมมีกลิ่นเฉพาะตัว สรรพคุณ : ช่วยบำรุงและรักษาสายตา ช่วยให้เจริญอาหารมากยิ่งขึ้น ด้วยการใช้ผลแห้งนำมาบดเป็นผงรับประทานหรือนำมาต้มกับน้ำดื่ม (ผล, ใบ) ช่วยบำรุงธาตุในร่างกาย (ใบ) ช่วยแก้อาการกระหายน้ำ (ใบ) ช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือด (ใบ) ช่วยกระตุ้นการทำงานของเลือดพลาสมาและกล้ามเนื้อ (ใบ) ช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็ง (ใบ) ช่วยขับเหงื่อ ด้วยการใช้ต้นสดประมาณ 60 กรัมนำไปต้มกับน้ำดื่ม หรือจะคั้นเอาเฉพาะน้ำมาดื่มก็ได้ (ทั้งต้น) ใช้เป็นน้ำกระสายยาช่วยกระทุ้งพิษไข้หัว ไข้อีดำอีแดง (ราก) การขยายพันธ์ : ขยายพันธุ์ด้วยการใช้เมล็ด (กาญจนา, 2563)

2.1.6 ผักชีลาว (Dill)

วงศ์ Apiaceae (Umbelliferae) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Anethum graveolens* L. พืชล้มลุก อายุ 1-2 ปี ลำต้นเรียบและตั้งตรง สีเขียวอ่อน แตกกิ่ง ทั้งต้นมีกลิ่นหอม สูง 40-170 เซนติเมตร มีข้อปล้องเห็นได้ชัดเจน มีกาบใบหุ้มลำต้นเล็กน้อย ใบเป็นใบเดี่ยว ออกตรงกันข้าม ใบรูปขอบขนานถึงรูปไข่กลับ สีเขียวสด เมื่อดูแนวรูปใบโดยรวม มีขนาดกว้าง 11-20 เซนติเมตร ยาว 10-35 เซนติเมตร ขอบใบหยักลึกเป็นแฉกแบบขนนกหลายชั้น แฉกย่อยที่สุดมีลักษณะแคบยาวเป็นริ้ว กว้างน้อยกว่า 0.5 มิลลิเมตร ยาว 4-20 มิลลิเมตร ก้านใบยาว 5-6 เซนติเมตร แผ่เป็นกาบ ดอก สีเหลือง ออกเป็นช่อ ก้านช่อดอกซี่ร่มหลายชั้นหลวมๆ ก้านช่อดอกยาว 7-16 เซนติเมตร ดอกย่อยมีขนาดเล็ก กลีบเลี้ยงมีขนาดเล็กมาก หรือไม่มี กลีบดอกมี 5 กลีบ สีเหลือง เกสรเพศผู้มี 5 อัน ติดบนฐานดอก เรียงสลับกับกลีบดอก รังไข่อยู่ใต้วงกลีบ มี 2 ช่อง ผลแก่แห้งไม่แตก รูปรี สีน้ำตาลอมเหลือง คล้ายตาตั๊กแตน ขนาดกว้างราว 2 มิลลิเมตร ยาวราว 4 มิลลิเมตร ผิวเรียบ ผลแก่แห้งเรียกตามตำรายาไทยว่า “เทียนตาตั๊กแตน” เป็นตัวยาหนึ่งในพิกัดเทียนทั้งเจ็ด ใช้ปรุงยา และเป็นเครื่องเทศ ต้นและใบสด ใช้ปรุงอาหาร หรือเป็นผักจิ้ม จะเก็บต้นและใบสดก่อนออกดอก ในประเทศไทย นิยม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รับประทานเป็นผักมากกว่าการใช้ผลทำเครื่องเทศ เพราะมีคุณภาพด้อยกว่าประเทศอินเดีย โดยทั่วไปมักกินต้นและใบในรูปของผักสด สำหรับจิ้มน้ำพริก หรือใส่แกง ส่วนน้ำมันหอมระเหยใช้แต่งกลิ่นผักดอง น้ำซอส สตู ขนมหวาน เครื่องดื่ม และเหล้า นอกจากนี้ ยังมีสรรพคุณอื่นๆ เช่น ลดไขมันในเลือด ลดแก๊สในระบบทางเดินอาหาร แก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ ลดอาการเสียดท้อง (Bahramikia et al., 2009) น้ำมันหอมระเหยจากเมล็ดของผักชีลาวประกอบด้วย สารดิลลาโนไซด์ (dillanoside) กรดฟีนอลิก โปรตีน และไขมัน เป็นต้น สำหรับสารสำคัญที่พบในน้ำมันผักชีลาว (dil sced oil) คือ คารีโวน ดี-ไลโมนีน (caryone D-limonene) และอัลฟา-เฟลเลนดรีน (alpha-phellandrene) รองลงมา คือ ไดไฮโดรคาร์โวน (dihydrocarvone) ยูจีนอล (eugenol) ไพนีน (pinene) และอะนีโทล (anethon) เป็นต้น นอกจากนี้สารฟีนอลิกที่สำคัญในสารสกัดดอกผักชีลาว ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ (Ilavonoid) และโปรแอนโธไซยานิดิน (proanthocyanidin) ซึ่งแสดงสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน (Shyu et al., 2009) ส่วนใบและลำต้นก็พบสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ที่สำคัญเช่นกัน ได้แก่ กรดโปรโตคาเทชูอิก (protocatechuic acid) และ คาทิชิน (catechin) (Shan et al., 2005)

2.1.7 พริกชี้ฟ้า (Chili spur pepper)

เป็นพืชในวงศ์ Solanaceae ชื่อวิทยาศาสตร์ *Capsicum annuum* ต้นพริกชี้ฟ้า เป็นไม้พุ้มขนาดเล็ก มีอายุประมาณ 1-3 ปี มีความสูงได้ประมาณ 0.3-1.2 เมตรมีถิ่นกำเนิดในอเมริกาใต้ ถูกนำเข้ามาปลูกและขยายพันธุ์เพื่อเก็บผลขายในประเทศไทยแต่โบราณ โดยจัดเป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก มีอายุประมาณ 1-3 ปี มีความสูงได้ประมาณ 0.3-1.2 เมตร ลำต้นเปราะหักง่าย แตกกิ่งก้านหนาแน่นเป็นพุ่ม เปลือกลำต้นเรียบเป็นสีน้ำตาล กิ่งอ่อนเป็นเหลี่ยม ขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด ปลูกกลางแจ้งจะดีเพราะน้ำไม่ท่วม เจริญเติบโตได้ดีในดินร่วน ระบายน้ำดี หรือปลูกบนดินรังปลวกก็จะมีอายุอยู่ได้นาน พบได้ทุกภาคในประเทศไทย แต่พบได้มากทางภาคเหนือและกรุงเทพฯ (นิจศิริ, 2558) สารสำคัญที่พบในบริเวณไส้ของผลพริก คือ “แคปไซซิน” (Capsaicin) ซึ่งเป็นสารที่ทำให้พริกมีรสเผ็ดร้อนและมีกลิ่นฉุน โดยสารชนิดนี้สามารถยับยั้งการขนส่งน้ำตาลกลูโคสผ่านลำไส้ได้ จึงมีผลทำให้ระดับน้ำตาลในร่างกายลดลง ส่วนสารสำคัญที่ทำให้พริกมีสีส้มหรือสีแดง คือ แคโรทีนอยด์ (Carotenoid) ซึ่งประกอบไปด้วยสารแคโรทีน (Carotene), แคปซันทิน (Capsanthin), แคปซารูบิน (Capsarubin), ลูทีโอลิน (Luteolin) ส่วนในเมล็ดพริกมีสารโซลานีน (Solanine) และโซลานิดีน (Solanidine) นอกจากนี้พริกยังมีสารอาหารอีกมากมาย เช่น ไขมัน คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ใยอาหาร วิตามินเอ วิตามินบี1 วิตามินบี2 วิตามินบี3 วิตามินซี แคลเซียม ธาตุเหล็ก ฟอสฟอรัส เป็นต้น เมื่อปี ค.ศ.1980 มีการทดลองพบว่าน้ำสกัดจากผลพริกสามารถลด fasting blood glucose แต่ขึ้นอยู่กับขนาดของยาที่ให้ และการให้สารสกัดทางปากสามารถลด intracardiac glucose tolerance curve เมื่อทำการแยกสาร Capsaicin มาทดลอง พบว่า สารนี้มีผลยับยั้งการขนส่งกลูโคสผ่านลำไส้ ซึ่งอาจเกิดจากการสลายกลูโคสเป็นกรดแลกติก หรือมีผลยับยั้งต่อ ATPase-dependent sodium pump และได้มีการทดลองใช้สาร Capsaicin ในหนูที่เกิดใหม่กับหนูอายุ 3 เดือน ผลการทดลองพบว่า หนูเกิดใหม่มีระดับน้ำตาลในเลือด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลดลง แต่ไม่ได้ผลในหนูอายุ 3 เดือน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะหนูทนต่อยาได้มากขึ้นก็เป็นได้ (จุไรรัตน์, 2552)

2.1.8 สะระแหน่ (Kitchen Mint)

สะระแหน่ เป็นพืชในวงศ์ Labiatae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Mentha cordifolia* เป็นพืชล้มลุกที่มีอายุยืนหลายปีลำต้นเลื้อยไปตามดินและแตกกิ่งก้านสาขามากมายทุกส่วนของลำต้นมีกลิ่นหอมสะระแหน่จะขึ้นเจริญงอกงามเมื่อปลูกในพื้นที่สูง ถ้าปลูกบนพื้นที่ราบจะเห็นดอกได้ยาก เดิมทีเป็นพืชที่ปลูกในทวีปยุโรป แต่ต่อมานำมาปลูกทั่วไปในทวีปเอเชีย ในประเทศไทยมักปลูกสะระแหน่ตามบ้านและสวนเพื่อใช้เป็นพืชสวนครัวเพื่อนำมาปรุงอาหารที่มีรสจัดนำมาช่วยแต่งกลิ่นอาหารให้มีความน่ารับประทานยิ่งขึ้น นอกจากนั้นยังใช้ทำยาและสกัดน้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในวงการอุตสาหกรรมเช่น สปา เป็นต้น (ยุวดี, 2545) มีสารออกฤทธิ์หลายชนิด ได้แก่ สารเมนทอล (menthol) เมนโทน (menthone) คาร์โวน (cavone) และเมทิลอะซิเตต (methyl acetate) และไพเพอริโทน (piperitone) เป็นต้น (Rajeswara, 1999) ประโยชน์ของสะระแหน่ ได้แก่ช่วยรักษาอาการปวดศีรษะไมเกรน ช่วยบรรเทาอาการและแก้หวัดน้ำมูกไหล อาการไอ ช่วยแก้อาการท้องอืดท้องเฟ้อ เป็นต้น

2.1.9 หอมแดง (Shallot)

หอมแดงเป็นพืชในวงศ์ Amaryllidaceae ชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Allium ascalonicum* มีการเพาะปลูกแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และอีกแหล่งเพาะปลูกที่สำคัญอีกที่คือแถบภาคเหนือ หอมแดงจะมีใบที่มีลักษณะงอกออกมาจากหัว ใบมีลักษณะตรง เรียว สูง ยาวประมาณ 20-40 เซนติเมตร แตกออกเป็นชั้น ๆ ในส่วนของใบของหอมแดงใช้ในการบริโภค ส่วนหัวเป็นส่วนของกาบใบที่มีลักษณะการเรียงตัวซ้อนกันเป็นชั้นๆ ซึ่งทำหน้าที่เป็นแหล่งเก็บสะสมของน้ำและอาหาร มีลักษณะเป็นกระเปาะ หัวหอมจะมีการแตกออกมาใหม่จากหัวเดิม โดยจะมีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของหัวเฉลี่ยประมาณ 3 เซนติเมตร ต้นที่มองเห็นอยู่เหนือดินเป็นส่วนที่อยู่ต่อจากหัวนั้นคือลำต้นเทียมที่เกิดจากกาบใบ หอมแดงมีรากเป็นรากฝอยจำนวนมาก งอกออกจากส่วนล่างของต้น มีลักษณะเป็นกระจุก และลึกลงไปในดินตื้นประมาณ 10 เซนติเมตร และกระจายออกรอบต้นประมาณ 10 เซนติเมตร (นันทวัน, อรนุช, & มหาวิทยาลัยมหิดล, 2539) หอมแดง มีกลิ่นจุน มีน้ำมันหอมระเหย แก้ท้องอืด ขับลม ช่วยย่อยอาหาร แก้การอักเสบต่าง ๆ ขับพยาธิ และยังทำให้ร่างกายอบอุ่น ประเทศไทยใช้หอมแดงเป็นยาโดยใช้ส่วนหัวของหอมแดงในการแก้อาการหวัดร่วมกับอาการคัดจมูก และได้นำมารับประทานเพื่อขับลมในระบบทางเดินอาหาร โดยในหอมแดงนั้นมีสารฟลาโวนอยด์และเควอซิติน โดยหอมแดงมีคุณสมบัติใช้เป็นยารักษาโรค ใช้รักษาแผลได้ และใช้เป็นตัวช่วยลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือดสามารถลดไข้ได้ด้วยการนำไปรับประทาน โดยสรรพคุณทางยาของหอมแดงสารฟลาโวนอยด์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ การที่รับประทานหอมแดงอย่างสม่ำเสมอช่วยในการไหลเวียนเลือดและลดปริมาณคอเลสเตอรอล ลดไขมันในเส้นเลือดที่ทำให้เกิดโรคหัวใจและโรคความดันโลหิตสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และยังช่วยบรรเทาอาการไข้หวัดได้ ทั้งนี้ ฟลาโวนอยด์ในปริมาณที่สูง จะช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งและโรคหัวใจอีกด้วย (นิจศิริ, 2547)

2.1.10 โหระพา (Sweet Basil)

โหระพา เป็นพืชในวงศ์ Labiatae หรือ Lamiaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Ocimum basilicum* เป็นพืชยืนต้น สูงประมาณ 50-70 เซนติเมตร ใบเป็นรูปไข่และฟันเล็กน้อย ดอกมีสีขาวถึงชมพูอ่อน โหระพาเป็นพืชพื้นเมืองที่พบในเอเชีย, แอฟริกา, อเมริกาใต้ และเมดิเตอร์เรเนียน แต่มีการปลูกกันอย่างแพร่หลายในหลายประเทศ โหระพาเป็นพืชสมุนไพรที่สำคัญและใช้ในการทำอาหารเป็นที่รู้จักกันดีสาหรับน้ำมันหอมระเหย ซึ่งมีหน้าที่ในเรื่องของกลิ่นหอมของโหระพาและรสชาติของเครื่องปรุงรส โหระพายังประกอบด้วย เอซิเลตเทต แอนโทไซยานิน และ ไกลโคซิเลตเทต แอนโทไซยานิน; กรดฟีนอลิก เช่น กรดโรสมารินิค (rosamarinic acid), กรดลิโทสเปอมิก บี (lithospermic acid B), กรดวานิลลิค (vanillic acid), กรดพีคูมาริก (p-coumaric acid), กรดไฮดรอกซีเบนโซอิก (hydroxybenzoic acid), กรดไซรินจิก (syringic acid), กรดเฟรูลิก (ferulic acid), กรดโปรโตคาเทคชูอิค (protocatechuic acid), กรดคาร์เฟอิค (caffeic acid) และ gentisic acid, chicoric acid; ฟลาโวนอยด์ และแทนนิน เอสเทอของกรดซินนามิก (cinnamic acid ester) ไตรเทอร์ปินนอยด์ไกลโคไซด์ (triter- penoids glycosides) และสเตอรอยด์ไกลโคไซด์ (steroidal glycosides) สารสกัดต่าง ๆ จากโหระพามีคุณสมบัติต้านแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา ต้านไวรัส ต้านอนุมูลอิสระ ลดไขมัน ต้านการอักเสบ ต้านการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือด ป้องกันเส้นเลือดอุดตันจากลิ่มเลือด ขยาย หลอดลม สามารถกาจัดเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส และเชื้อราได้ด้วยพร้อมลดการอักเสบ และต้านสารก่อมะเร็ง (Bora et al., 2011) ในอดีตโหระพา ถูกใช้สาหรับการรักษาโรควิตกกังวล (anxiety), โรคเบาหวาน, โรคหลอดเลือดหัวใจ, อาการปวดหัว, ต้านอาการชักกระตุกและต้านการอักเสบ, ไอ, ความผิดปกติของการย่อยอาหาร, ไข้, ไมเกรน, แมลงกัด, ปวด ประจำเดือน, ปวดเส้นประสาท, โรคไซนัสอักเสบ และความผิดปกติของระบบประสาทต่างๆ นอกจากนี้ ใบและดอกบริเวณยอดของพืชรู้กันว่าเป็นยาขับลมในท้อง, ยาขับน้ำนม, บำรุงธาตุ เจริญอาหาร และต้านการกระตุกของกล้ามเนื้อ ในการแพทย์แผนโบราณ (Jeba et al., 2011)

2.2 สารสกัดจากพืช

Plant Extract (สารสกัดจากพืช) คือ สารสำคัญ (Active Compounds) ที่สกัดได้จากส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช เช่น เปลือก ใบ ลำต้น ดอกผล ราก หัวหรือเหง้า ซึ่งเป็นสารที่ออกฤทธิ์เฉพาะทางและมีความเป็นลักษณะเฉพาะตัวของพืชในแต่ละชนิดนั้นๆ โดยใช้ตัวทำละลายหรือวิธีการที่เหมาะสมในการสกัด และต้องไม่เปลี่ยนองค์ประกอบของสารสกัดจากพืช สารสกัดจากพืชมีส่วนประกอบทางเคมีหลากหลายชนิด ถูกนำมาใช้เพื่อการรักษาได้ เช่น อัลคาลอยด์, โพลีฟีนอล, แคโรทีนอยด์, โพลีแซ็กคาไรด์, กรดอินทรีย์, แทนนิน, สารสีหรือน้ำมันระเหย ไฟโตเคมิคอล ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สามารถจำกัดหรือควบคุมความไม่สมดุลที่เกิดจาก Reactive Oxygen Species (ROS) ที่นำไปสู่การอักเสบ

เอกสารนี้ ห้ามมิให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ ไม่ว่ากรณีใดๆ

การเสื่อมสภาพของระบบประสาท ระบบหัวใจและหลอดเลือด ภูมิคุ้มกัน และการเผาผลาญอาหาร หรือแม้แต่การเกิดของเนื้องอก

Plant Extract (สารสกัดจากพืช) นิยมนำมาเป็นส่วนประกอบของด้านความงาม ด้านการรักษา และด้านการเกษตร และสารสกัดจากพืชแต่ละตัวก็มีความเหมาะสมกับการไปใช้ประโยชน์ต่างๆกัน (ทินกร, 2564)

2.2.1 การเลือกวิธีการสกัด

การเลือกวิธีสกัดสารสำคัญในพืชสมุนไพรมีหลายวิธี ซึ่ง การคัดเลือกวิธีที่เหมาะสม นับว่ามี ความสำคัญเช่นกัน และความเหมาะสมนั้นก็ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายๆ อย่าง ได้แก่

1. ธรรมชาติของพืชสมุนไพร

1.1 ลักษณะโครงสร้างของเนื้อเยื่อ สมุนไพรที่มีลักษณะอ่อนนุ่ม เช่น ดอก ใบ อาจสกัดด้วย วิธี maceration หากเป็นพืชสมุนไพรที่มีเนื้อเยื่อแข็งและเหนียว เช่น เปลือก ราก เนื้อไม้ ควรใช้วิธี continuous extraction หรือ percolation

1.2 ความสามารถในการละลายของสารสำคัญในน้ำยาสกัด ถ้าละลายได้ง่าย นิยมใช้วิธีดูดซับ แต่ถ้าละลายได้น้อยก็จำเป็นต้องใช้วิธี percolation หรือ continuous extraction

1.3 ความคงตัวของสารสำคัญในสมุนไพรต่อความร้อน ถ้าเป็นพืชที่ไม่ทนทานต่อความร้อน ควรใช้วิธี maceration หรือ percolation

2. คุณค่าของสารสกัดและค่าใช้จ่ายในการสกัด หากต้องการสารสกัดที่ไม่ใช่สารสำคัญ และมีคุณค่าทางการรักษาน้อย เช่น สารที่ใช้แต่งสี กลิ่น รส ของยาเตรียมต่างๆ ก็อาจใช้วิธีที่ง่ายไม่ยุ่งยาก นอกจากนี้ควรคำนึงถึงค่าใช้จ่ายทั้งหมดเปรียบเทียบกับราคาของสารสกัดที่ได้

3. ความต้องการที่จะให้ได้สารสกัดที่สมบูรณ์หรือเกือบสมบูรณ์ หากต้องการสารสกัดที่เจือจาง การใช้วิธี maceration ก็เพียงพอ แต่ถ้าต้องการสารสกัดเข้มข้นก็ควรใช้วิธี percolation หรือ continuous extraction การคัดเลือกตัวทำละลายในการสกัด เนื่องจากสารประกอบในพืชมีมากมายหลายชนิดและมีคุณสมบัติแตกต่างกัน การเลือกตัวทำละลายที่จะให้ได้สารทุกกลุ่มที่ต้องการ จึงทำได้ยาก การสกัดจะได้ผลดีหรือไม่นั้นขึ้นอยู่กับการคัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม โดย สารละลายและตัวทำละลายมีคุณสมบัติความมีขั้วคล้ายคลึงกันและละลายสารที่ต้องการออกมามากที่สุด ในขณะที่ละลายสารที่ไม่ต้องการออกมาน้อยที่สุดตัวทำละลายที่ดีควรมีคุณสมบัติดังนี้ คือ เป็นตัวทำละลายที่ละลายสารที่ต้องการสกัดได้ ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป ไม่ทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบสำคัญในพืชที่สกัดนอกเหนือจากที่ต้องการ ไม่เป็นพิษต่อร่างกาย และราคาพอสมควร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 วิธีที่ใช้ในการสกัด

การสกัดสารสำคัญนั้นมีหลายวิธี เช่น วิธีการหมัก (maceration) วิธีการหมักแบบต่อเนื่อง (percolation) การสกัดแบบต่อเนื่องโดยใช้ความร้อน (Soxhlet extraction) การสกัดของเหลวด้วยของเหลว (liquid-liquid extraction) เป็นต้น (ศิริวัลย์, 2566) และวิธีที่ใช้ในการสกัดพืชในการวิจัยครั้งนี้ คือ วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent Extraction)

2.2.2.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent Extraction)

การสกัดสารออกฤทธิ์ออกจากเนื้อเยื่อสมุนไพร โดยใช้ตัวทำละลายสัมผัสกับเนื้อเยื่อสมุนไพร และทิ้งไว้ตามระยะที่เหมาะสมจนกว่าจะได้สารสกัดสมุนไพรออกมา การสกัดด้วยตัวละลายสามารถทำได้หลายวิธีเช่นกัน ยกตัวอย่างเช่น วิธีมาเซอเรชัน (Maceration) เป็นการหมักสมุนไพรกับตัวทำละลาย จนกระทั่งเนื้อสมุนไพรอ่อนนุ่ม และสารทำละลายแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อสมุนไพร วิธีสกัดแบบนี้ เหมาะที่จะใช้กับสมุนไพรที่ไม่แข็งมาก

2.2.2.2 ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด

เอทานอล จัดเป็นสารกลุ่มที่มีขั้วปานกลาง จึงนิยมใช้ในการสกัดสารเบื้องต้น เพราะสามารถสกัดได้ทั้งสารที่มีขั้วและสารที่ไม่มีขั้วออกมาได้ มีความสามารถละลายสารได้กว้างขวางและค่อนข้างปลอดภัยกว่าตัวทำละลายชนิดอื่น (สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล) และจัดเป็นตัวทำละลายที่ดีมากเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำ ซึ่งมีข้อดีมากกว่า ดังนี้ 1) มีความจำเพาะ (selectivity) ในการละลายมากกว่าน้ำ 2) มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ 3) ระเหยตัวทำละลายออกได้ง่ายกว่าเมื่อต้องการสารสกัดเข้มข้น

2.2.2.3 การทำให้สารสกัดเข้มข้น

เมื่อทำการสกัดพืชจากตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้ว จะได้สารสกัดที่มีปริมาณมากและเจือจาง จึงต้องมีการนำสารดังกล่าวมาทำให้มีความเข้มข้นด้วยวิธีการ การระเหย (evaporation) เป็นวิธีการแยกตัวทำละลายออกจากสารสกัดจากพืชโดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary Evaporator) โดยตัวทำละลายจะถูกทำให้กลายเป็นไอ ด้วยระบบสุญญากาศจาก pump และให้ความร้อนแก่สารละลายตัวอย่าง เพื่อทำให้การกลายเป็นไองง่ายขึ้น (การลดความดันในระบบจะช่วยลดอุณหภูมิของจุดเดือดของตัวทำละลาย ทำให้ใช้อุณหภูมิต่ำ ลง และทำให้ตัวทำละลายระเหยได้ เพราะฉะนั้นสารสำคัญก็จะไม่ถูกทำลายด้วยความร้อนที่สูงเกินไป) จากนั้นไอสารละลายจะผ่าน condenser ที่มีระบบหล่อเย็น ทำให้ไอสารควบแน่นกลายเป็นของเหลวไหลลงสู่ receiving flask และสามารถนำตัวทำละลายที่แยกออกมาได้กลับไปใช้สกัดสารจากพืชใหม่ได้

2.2.2.4 การทำให้สารสกัดบริสุทธิ์

ทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี โครมาโตกราฟีเป็นวิธีการแยกสารโดยอาศัยคุณสมบัติในการละลาย ขนาดและประจุของโมเลกุลสารในองค์ประกอบสองส่วน ส่วนคงที่ (Stationary phase) ซึ่งอาจเป็นของแข็งหรือของเหลว ส่วนนี้อยู่กับที่โมเลกุลสารที่จะแยกจะต้องผ่าน

เอกสารนี้ ... ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ...

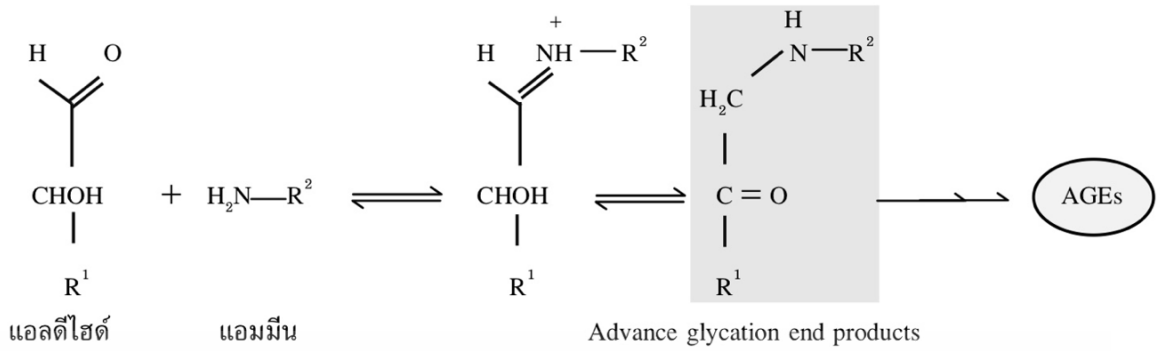
ส่วนนี้ไป อีกส่วนนึงเป็นส่วนเคลื่อนที่ (moving phase) อาจเป็นของเหลวหรือก๊าซที่จะพาโมเลกุลสารที่จะแยกออกไปจากส่วนคงที่ โครมาโตรกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุเป็นวิธีการแยกโดยอาศัยแรงดึงดูดของประจุตรงข้าม ระหว่างประจุบนโมเลกุลของสารที่จะแยกกับประจุบนอนุภาคของเรซิน (resin) ซึ่งเป็นส่วนคงที่ โมเลกุลของสารใดที่ไม่มีประจุหรือประจุชนิดเดียวกันกับอนุภาคเรซิน ก็จะผ่านไปและถูกชะออกจากคอลัมน์ก่อนด้วยบัฟเฟอร์ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นหรือเปลี่ยน pH ของบัฟเฟอร์ที่ใช้ก็จะสามารถชะสารที่เกาะอยู่กับเรซินออกได้

2.3 ไกลเคชั่น

ไกลเคชั่น คือ การจับกันด้วยพันธะโควาเลนท์ระหว่างโมเลกุลของโปรตีนหรือไขมันกับน้ำตาลรีดิวซ์ซิ่ง เช่น กลูโคสหรือฟรุคโตส ที่ปราศจากการควบคุมของเอนไซม์ ผลผลิตสุดท้ายของปฏิกริยาที่ไม่ใช้เอนไซม์นี้จะได้ advanced glycation end products (AGEs) โดยปกติ AGEs สามารถเกิดขึ้นได้ในภาวะปกติ และเกิดได้มากขึ้นเมื่อมีภาวะน้ำตาลในเลือดสูง การสะสมของ AGEs ในเซลล์ต่างๆจะมีผลต่อโครงสร้าง และหน้าที่ ทั้งภายในและภายนอกเซลล์ AGEs เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคเบาหวานและโรคที่เกี่ยวข้องกับอายุ มีหลายวิธีการที่ช่วยลด AGEs ลงได้ เช่น การใช้สารสังเคราะห์พืชอาหารที่มีสารฟีนอลิกในการยับยั้งการเกิดไกลเคชั่นอย่างมีประสิทธิภาพ การยับยั้งการก่อตัวของ AGEs ภายในร่างกายโดยการลดการบริโภค น้ำตาล นอกจากนี้การก่อตัวของ AGEs ในอาหารระหว่างกระบวนการปรุงอาหารสามารถป้องกันได้ โดย การปรุงอาหารที่ใช้ความร้อนชื้น เช่น การต้มหรือนึ่ง การใช้เวลาในการปรุงอาหารที่สั้นลงการใช้อุณหภูมิที่ต่ำในการปรุงอาหารและการใช้กรดเป็นส่วนประกอบ เช่น น้ำมะนาว หรือน้ำส้มสายชู (ปรัญรัชต์, 2559)

ไกลเคชั่นทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างการเชื่อมข้ามสายโมเลกุล (cross-linking) เป็น Schiff base, Amadori product และ 3-deoxyglucosone ตามลำดับ เกิดจากการทำปฏิกิริยาในรูปของสาร advanced glycation endproducts (AGEs) (รูปที่ 2.1) ซึ่งถือว่าเป็นสารพิษ ที่เรียกว่าไกลโคท๊อกซิน (glycotoxins) ทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของเซลล์ ส่งผลต่ออวัยวะนั้นให้ทำงานน้อยลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 ปฏิกิริยาไกลเคชั่นระหว่างอัลดีไฮด์กับแอมมัน และการเกิดสาร advanced glycation endproducts (AGEs) (ชมนาด, 2560)

2.3.1 กระบวนการเกิดไกลเคชั่น

กระบวนการเกิดไกลเคชั่นเกิดผ่าน ปฏิกิริยา 3 ขั้นตอน ได้แก่ early, intermediate และ late stage ดังแสดงในรูปที่ 2.2

2.3.1.1 Early stage

น้ำตาลกลูโคส หรือ น้ำตาล รีดิวซ์อื่นๆ เช่น น้ำตาลฟรุคโตสการเกิดผ่านปฏิกิริยา polyol pathway ที่น้ำตาลกลูโคสถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลซอบิทอล (sorbitol) ด้วยเอนไซม์ aldose reductase โดยมี NADPH เป็นโคเฟกเตอร์และน้ำตาลซอบิทอลถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลฟรุคโตส โดยเอนไซม์ sorbitol dehydrogenase เมื่อน้ำตาลทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนอิสระของเอมีน (amine) จะเกิดสารประกอบที่ไม่คงตัว ของ aldimine และเปลี่ยนแปลงเป็น Shiff base ต่อไปสารที่ไม่มีความคงตัวเหล่านี้จะจัดเรียงตัวใหม่เป็น stable early glycation product ที่เรียกว่า Amadori product

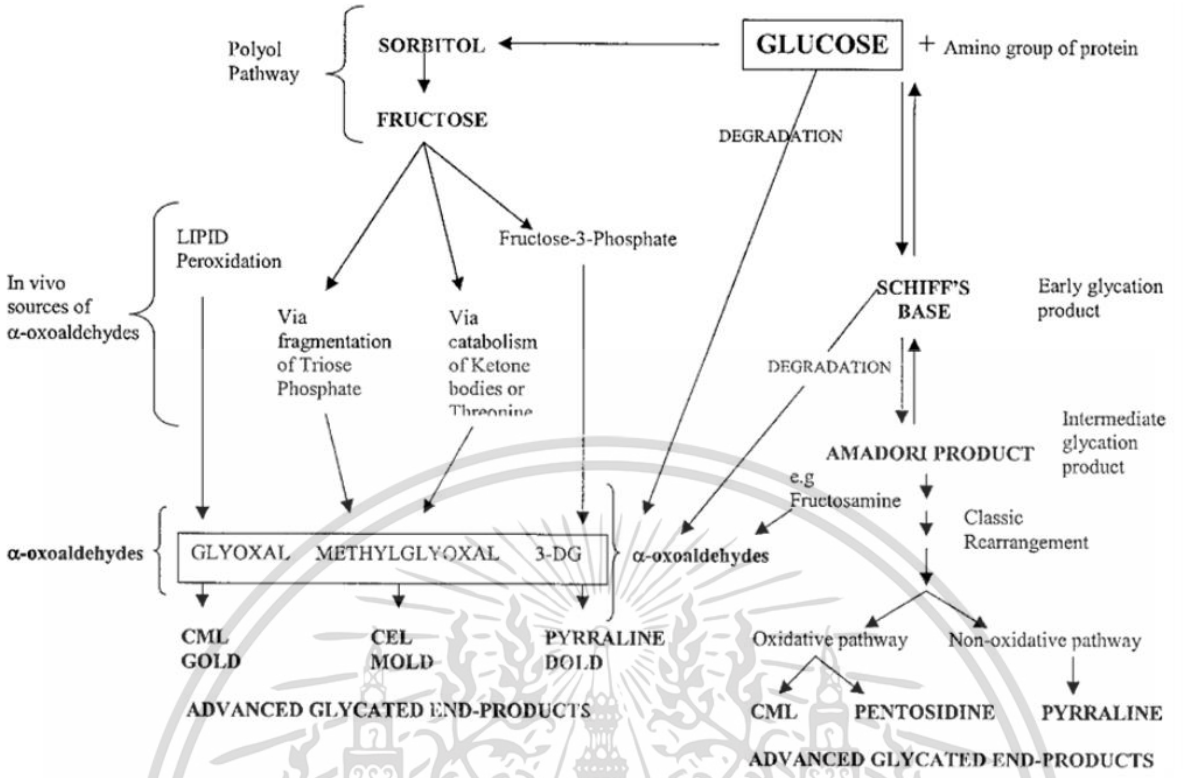
2.3.1.2 Intermediate stage

ในขั้นนี้จะเกิดผ่านหลายปฏิกิริยาเช่น dehydratation oxidation ทำให้ Amadori product เกิดการสลายเป็นกลุ่มสารประกอบ reactive dicarbonyl เช่น glyoxal, methylglyoxal และ deoxyglucosones ที่มีความไวในการ เกิดปฏิกิริยามากกว่าน้ำตาลที่เป็นสารตั้งต้นจึงเป็นตัว propagator ที่จะทำปฏิกิริยาอีกครั้งกับ free amino groups ของ biomolecules

2.3.1.3 Late stage

ในขั้นสุดท้ายของกระบวนการ glycation จะเกิดผ่านปฏิกิริยา oxidation, dehydratation และ cyclization ทำให้เกิดสารที่เป็น irreversible compounds ที่เราเรียกว่า Advanced glycation end products (AGEs)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 การเกิด AGEs ในภายในเซล์ (AGEs formation pathway in vivo)
3DG, 3-deoxyglucosone; MGO, methylglyoxal; CML, N^{ε} – (I-carboxyethyl) lysine ; CEL, N-ε- (carboxyethyl) lysine; DOLD, deoxyglucosone-lysine dimer; MOLD, methyl glyoxal-lysine dimer; GOLD, glyoxal-lysine dimer

2.3.2 ผลของปฏิกิริยาไกลเคชั่นต่อสุขภาพ

การเกิดไกลเคชั่นของโปรตีนสามารถรบกวนการทำงานตามปกติของร่างกายได้ ได้แก่ การขัดขวางโครงสร้างในระดับโมเลกุล เกิดการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์โดยการลด proteolytic activity มีผลต่อการลดประสิทธิภาพในการสลายโปรตีน และส่งผลต่อการลดประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการกำจัดโปรตีนที่เสื่อมสภาพ และโปรตีนที่เสียหายระหว่างขบวนการ ส่งผลทำให้เกิดการสะสมของ AGEs เกิดการจับตัวกับโครงสร้างของเซลล์และเนื้อเยื่อ ทำให้เห็นเป็นรอยสีน้ำตาล ทำให้เกิดการแข็งและขาดความยืดหยุ่นของเนื้อเยื่อ AGEs ที่เกิดขึ้นยังมีผลเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ และเกิด reactive oxygen species ที่มีผลต่อความเสียหายของ DNA และ โปรตีน (ปรัญรัชต์, 2559)

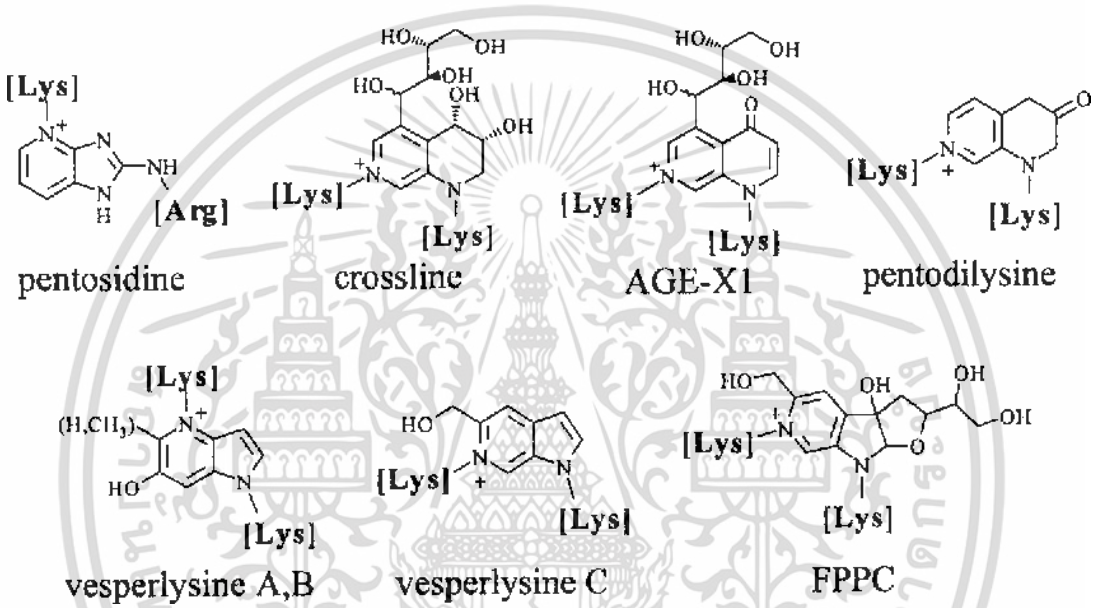
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.3 ประเภทของ AGEs

แบ่งตามลักษณะการเข้าจับกับโปรตีน และคุณสมบัติการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ ได้เป็น 3 ประเภท

2.3.3.1 Fluorescence AGEs crosslinks

เกิดจากสารประกอบคาร์บอนิลที่สามารถเกิด crosslink หรือเข้าเป็นตัวเชื่อมระหว่างหมู่อะมิโนของโปรตีนอื่นๆ และมีคุณสมบัติการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ เช่น pentosidine, crossline, pentodilysine, AGEs-XI, vesperlysine A-B, FPPC เป็นต้น (รูปที่ 2.3)

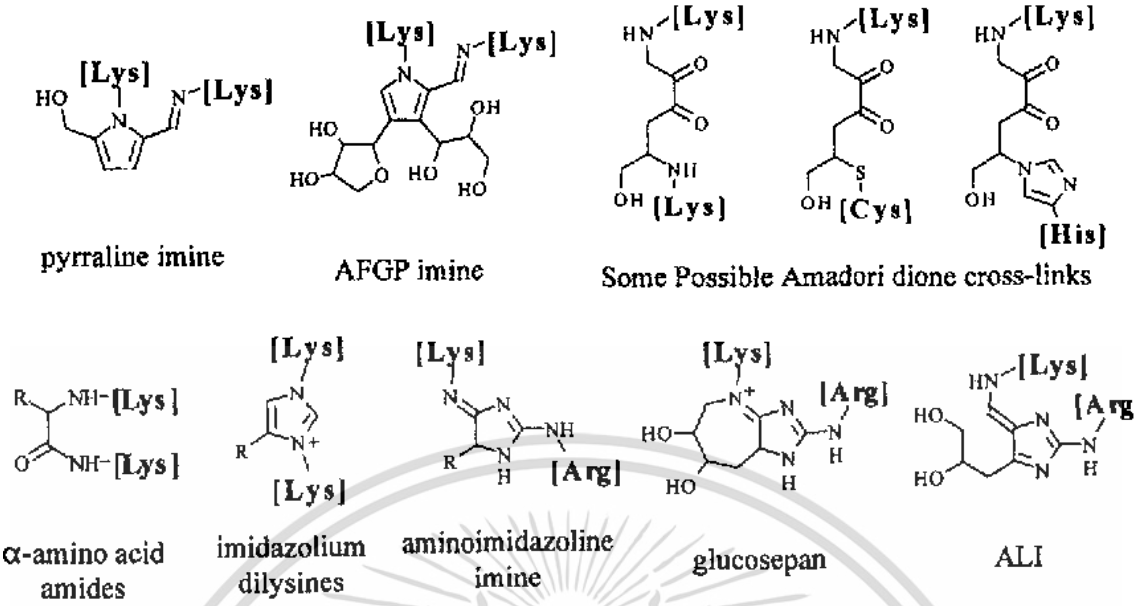


รูปที่ 2.3 แสดง AGEs ชนิด crosslinks และมีคุณสมบัติการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ (Ulrich and Cerami, 2001)

2.3.3.2 Nonfluorescence AGEs crosslink

เกิดจากสารประกอบคาร์บอนิลที่สามารถเกิด crosslink หรือเข้าเป็นตัวเชื่อมกับหมู่อะมิโนของโปรตีนอื่นๆ แต่ไม่มีคุณสมบัติการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ เช่น imidazolium dilysine crosslinks (GOLD/MOLD crosslinks), crosslinks, arginine-lysine-imidazole crosslinks (ALI crosslinks), amadori dione crosslinks เป็นต้น (รูปที่ 2.4)

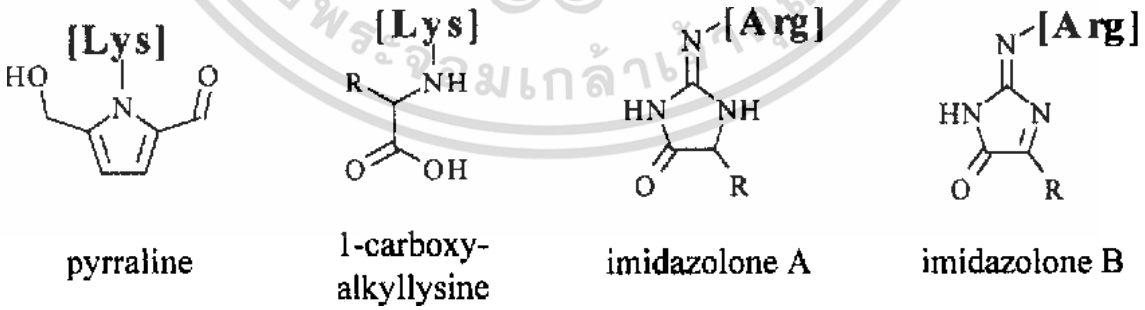
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 AGEs ชนิด crosslink แต่ไม่มีคุณสมบัติเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ (Ulrich and Cerami, 2001)

2.3.3.3 Noncrosslinking AGEs

เกิดจากสารประกอบคาร์บอนิลที่สามารถเข้าร่วมกับหมู่อะมิโนของโปรตีนอื่นๆ แล้วทำให้โปรตีนเกิดโครงสร้างใหม่ขึ้นมา หรืออาจกล่าวว่า AGEs ชนิดนี้เกิดจากโปรตีนเดี่ยวที่เปลี่ยนแปลงโครงสร้าง เช่น N^{ε} – (carboxymethyl) lysine (CML), N^{ε} – (I-carboxyethyl) lysine (CEL), Imidazolones A-B เป็นต้น (รูปที่ 2.5)



รูปที่ 2.5 AGEs ชนิดโปรตีนเดี่ยวที่เปลี่ยนแปลงโครงสร้าง (Ulrich and Cerami, 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.4 N^{ε} – (carboxymethyl) lysine (CML)

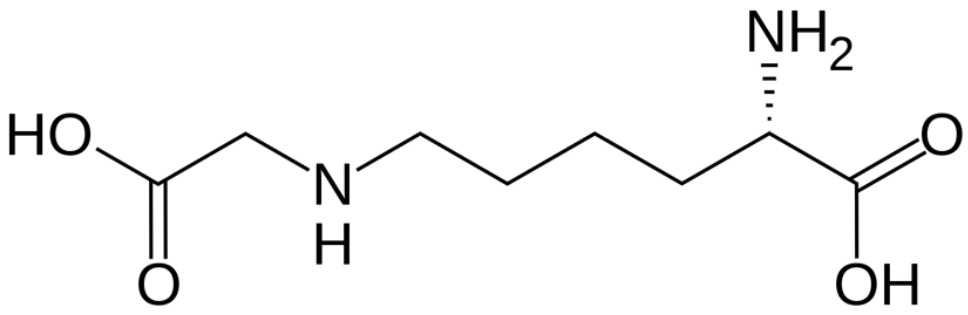
สูตรโมเลกุล C8H16N2O4 คำพ้องความหมาย 5746-04-3, N(6)-carboxymethyllysine, Ne-Carboxymethyl-L-lysine, NECML, N6-(Carboxymethyl)lysine, CML, N^{ε} – (I-carboxyethyl) lysine น้ำหนักโมเลกุล 204.22 ก./โมล

N^{ε} – (carboxymethyl) lysine (CML) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้ายไกลเคชั่นขั้นสูงที่ได้มาจากไกลซาล (AGEs) เป็นไบโอมาร์คเกอร์ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายที่สุดของความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นในโปรตีนเนื้อเยื่อที่มีอายุ และเครื่องหมายสำหรับ AGEs ในการวิเคราะห์อาหาร CML เกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์อาหารผ่านปฏิกิริยา Maillard ที่ไม่ใช้เอนไซม์ในระหว่างกระบวนการทางความร้อนและการเก็บรักษา แหล่งที่มาทั่วไปของอาหาร CML ได้แก่ เนื้อย่าง ซีเรียล มันฝรั่งทอด และชีสหลายชนิดที่ผ่านกรรมวิธีทางความร้อน CML ในอาหารอาจก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อสุขภาพของมนุษย์ เนื่องจากเพิ่มความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นและเริ่มการตอบสนองต่อการอักเสบที่เกี่ยวข้องในการเกิดโรคของโรคเบาหวานและความผิดปกติทางเมตาบอลิซึมอื่นๆ (Ho-Young, 2019) CML เป็นอนุพันธ์ของ L-lysine ที่มีหมู่แทนที่คาร์บอกซีเมทิลที่ตำแหน่ง N(6) มีหน้าที่เป็นแอนติเจน เป็นอนุพันธ์ของ L-lysine และ L-alpha-amino acid ที่ไม่สร้างโปรตีน เป็นอนุพันธ์ของไลซีนที่พบในโปรตีนซึ่งเอปไซลอนไนโตรเจนของกรดอะมิโนถูกดัดแปลงโดยหมู่คาร์บอกซีเมทิล Carboxymethyllysine เป็นสารพิษยูเรมิก สารพิษยูเรมิกสามารถแบ่งย่อยออกเป็นสามกลุ่มใหญ่ตามลักษณะทางเคมีและกายภาพ

1) สารประกอบขนาดเล็ก ละลายน้ำได้ และไม่จับกับโปรตีน เช่น ยูเรีย
2) สารประกอบขนาดเล็กที่ละลายในไขมันและ/หรือจับกับโปรตีน เช่น ฟีนอล
3) โมเลกุลกลางที่ใหญ่กว่า เช่น Beta2-microglobulin

การได้รับสารพิษจากยูเรมิกเป็นเวลานานสามารถนำไปสู่สภาวะต่าง ๆ มากมาย รวมถึงความเสียหายของไต โรคไตเรื้อรัง และโรคหัวใจและหลอดเลือด N(6)-Carboxymethyllysine (CML) หรือที่เรียกว่า N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine CML เป็นตัวบ่งชี้ที่ใช้มากที่สุดสำหรับ AGEs ในการวิเคราะห์อาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

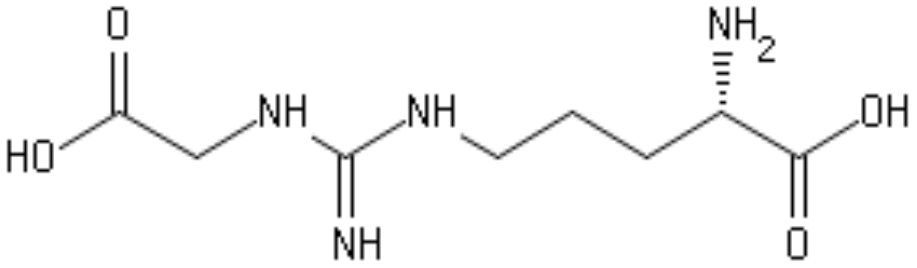


รูปที่ 2.6 โครงสร้างของ N^{ε} – (carboxymethyl) lysine (CML)
(ที่มา : https://www.alsachim.com/en/reference-standards/1456-159819-N-6-carboxymethyl-L-Lysine.html)

2.3.5 N^{ω} - (carboxymethyl)arginine (CMA)

N^{ω} - (carboxymethyl)arginine (CMA) เป็นโครงสร้าง AGE ที่ไม่มีกรดซึ่งถูกค้นพบในเอนไซม์ ไฮโดรไลเสตของไกลเคเต็ดคอลลาเจน ต่อจากนั้น ยังตรวจพบ CMA ในซีรั่มของมนุษย์ด้วยเครื่อง chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) และพบว่าระดับ CMA ในผู้ป่วยเบาหวาน สูงกว่าในคนปกติ และ CMA ในเนื้อเยื่อยังไม่ชัดเจนเนื่องจากความไม่เสถียรของกรด ดังนั้นจึงไม่ค่อยมีใครรู้ เกี่ยวกับระดับ CMA ในอวัยวะ คอลลาเจนเป็นหนึ่งในโปรตีนที่สำคัญในร่างกายมนุษย์และมีบทบาทสำคัญใน การทำงานทางชีววิทยาหลายอย่าง เช่น การก่อตัวของเมทริกซ์นอกเซลล์ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วยผิวหนัง และให้ความแข็งแรงและความยืดหยุ่น และมีส่วนทำให้คุณสมบัติเชิงกลและการเผาผลาญของกระดูก ดังนั้น การวัดระดับ CMA อาจเป็นเครื่องมือที่มีประโยชน์ในการประเมินการเสื่อมของคอลลาเจน เพื่อชี้แจง ความสำคัญทางชีวภาพของ CMA เราได้ตรวจสอบกลไกที่ CMA ถูกสร้างขึ้นในคอลลาเจนไกลเตท นอกจากนี้ เพื่อกำหนดปริมาณ CMA ในเนื้อเยื่อ ได้มีการพัฒนาวิธีการเตรียมตัวสำหรับตัวอย่างเนื้อเยื่อและทำการวัดโดย ใช้ LC-MS/MS พร้อมกับมาตรฐานภายใน (Angelika et al., 1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.7 โครงสร้างของ N^{ω} - (carboxymethyl)arginine (CMA)
(ที่มา : https://jglobal.jst.go.jp/en/detail?JGLOBAL_ID=200907092640570450)

2.4 การหาปริมาณ CML

CML ถูกหาปริมาณโดยใช้ชุด CML-ELISA เคซีน สารตั้งต้นโมโนแซ็กคาไรด์ (CMR) ที่ผสมกับโมโนคอลนอลแอนติบอดี้ต่อต้าน CML ถูกเติมลงในหลุมของเพลต ELISA จากนั้นแอนติบอดี้ต่อต้าน anti-CML-bovine ในซีรัมอัลบูมิน (BSA) ถูกตรึงและปล่อยให้ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากล้างหลุมด้วยบัฟเฟอร์ล้าง แอนติบอดี้ตรวจจับฮอร์สแรดิชเปอร์ออกซิเดส (HRP) ถูกเติมและปล่อยให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง หลังจากล้างอีกครั้งด้วยบัฟเฟอร์ล้าง เตตระเมทิลเบนซิดีนถูกเติมและบ่ม 10 นาทีเพื่อให้เกิดสี หลังจากเสร็จปฏิกิริยา ตัวอย่างถูกวิเคราะห์โดย ELISA 3 เท่า ที่ 450 นาโนเมตรโดยใช้สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ความเข้มข้นของ CML ถูกคำนวณจากค่าการดูดกลืนแสง (Ho-young, 2019)

2.5 หลักการทดสอบด้วยวิธี ELISA

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) หรือ Enzyme Immunoassay (EIA) เป็นชื่อของการทดสอบที่ใช้หลักการทางภูมิคุ้มกันวิทยา โดยอาศัยปฏิกิริยาการจับกันแบบจำเพาะระหว่างแอนติเจน (Antigen) และแอนติบอดี้ (Antibody) โดยหลักการ ELISA คือ การใช้แอนติบอดี (Antibody) หรือ แอนติเจน (Antigen) เคลือบที่พื้นผิวของ ELISA Plate จากนั้นเติมเอนไซม์ของเชื้อที่ต้องการวิเคราะห์ลงบนแอนติเจนหรือแอนติบอดี้ จากนั้นเมื่อเติมสารตั้งต้นการเกิดปฏิกิริยาลงไปเอนไซม์ก็จะทำปฏิกิริยา และเปลี่ยนสีเพื่อแสดงผลการทดสอบ การวัดผลของค่าสีที่เกิดขึ้นจะใช้วิธีอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท หรือ Microplate Reader สามารถตรวจสอบในเชิงปริมาณ และคุณภาพของสารที่ต้องการทดสอบได้อย่างแม่นยำ ซึ่งมีขั้นตอนง่ายๆดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. ให้แอนติเจนหรือแอนติบอดี้เคลือบอยู่บน solid phase เช่น บนผิวของภาชนะทดลอง, microtiter plate, bead, ซึ่งเป็นพลาสติกพวก Polypropylene, polystyrene, polyvinyl, nylon, cellulose, polyacrylamide

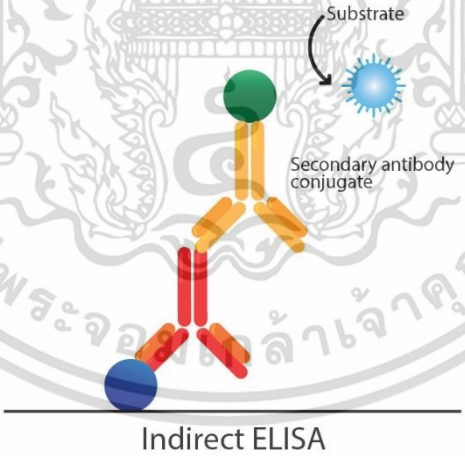
2. เติมสิ่งส่งตรวจที่ต้องการตรวจหา ลงไปทำปฏิกิริยา และล้างส่วนเกินที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาออกไป

3. เติมแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (conjugate) ลงไป เมื่อเติม substrate เอนไซม์จะย่อย substrate เปลี่ยนเป็นสีโดยความเข้มสีขึ้นกับปริมาณแอนติเจนและ แอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากัน (Panitsara.s, 2020)

2.5.1 รูปแบบการทดสอบของงาน ELISA ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

2.5.1.1 Indirect method

ให้แอนติบอดีที่ต้องการตรวจทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่ทราบชนิดแล้วซึ่ง เคลือบอยู่บนพื้นผิวของ solid phase แล้วเติม แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอ็นไซม์เพื่อสามารถติดตามโปรตีนได้ จากนั้นใส่ Substrate มาทำปฏิกิริยาอีกขั้นหนึ่งจะเกิดการเปลี่ยนสี แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader (ปริมาณความเข้มสีขึ้นกับปริมาณ แอนติบอดีที่ต้องการตรวจหา) (Panitsara.s, 2020)



รูปที่ 2.8 ภาพประกอบของ Indirect ELISA
(ที่มา : https://www.leinco.com/types-of-elisa-kits/)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Rosa et al., (2020) ได้ศึกษา Glucopyranoside flavonoids T ที่แยกได้จากใบ *Spinacia oleracea* (ผักโขม) ยับยั้งการก่อตัวของผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้ายไกลเคชั่นขั้นสูง (AGEs) และกิจกรรมของ aldose reductase (RLAR) โดยใช้ใบของ *S. oleracea* หรือผักโขม หมักกับเมทานอลที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาหนึ่งสัปดาห์ทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน สารตกค้างถูกละลายในน้ำหลังจากการกวนที่ 50 องศาเซลเซียส และปล่อยไว้เป็นเวลา 30 นาที สารสกัดที่ละลายน้ำถูกแยกออกโดยใช้ซิลิก้าเจล คอลัมน์ โครมาโตกราฟี ผลการยับยั้งของ Glucopyranoside flavonoids ที่แยกได้ทั้งหมด (1-10) ต่อการก่อตัวของผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้ายไกลเคชั่นขั้นสูง ได้รับการประเมินโดยใช้แบบจำลองการต้านไกลเคชั่น BSA/กลูโคส ผลการวิจัยพบว่าฟลาโวนอยด์ที่แยกได้ทั้งหมด (1-10) แสดงผลการต้านไกลเคชั่นที่เด่นชัดซึ่งสูงกว่า AG ที่ใช้เป็นสารมาตรฐานในการต้านไกลเคชั่นโดยมีค่า IC_{50} ที่ 967 ± 10.1 μM

JuWen et al., (2009) ได้ศึกษาความสามารถของใบฝรั่งและสารประกอบในการยับยั้งกระบวนการไกลเคชั่นในระบบแบบจำลอง อัลบูมิน/กลูโคส และเปรียบเทียบศักยภาพของสารสกัดเหล่านี้กับโพลีฟีนอล 60 ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์โพลีฟีนอลเชิงพาณิชย์ที่สกัดจากชาเขียวและกับสารต้านไกลเคชั่นมาตรฐาน อะมิโนกัวนิดีน ผลการวิจัยพบว่าผลการยับยั้งของสารสกัดจากใบฝรั่งต่อการสร้างสารประกอบ α-dicarbonyl สูงกว่า 95% ที่ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารประกอบฟีนอลที่มีอยู่ได้แก่ กรดแกลลิก คาเทชิน และเควอซิตินแสดงผลการยับยั้งมากกว่า 80% แต่กรดเฟอรูลิกไม่แสดงฤทธิ์ สารสกัดจากใบฝรั่งยังมีฤทธิ์ยับยั้งการผลิตผลิตภัณฑ์ Amadori และ AGEs จากอัลบูมินเมื่อมีกลูโคส สารประกอบฟีนอลิกยังแสดงผลการยับยั้งอย่างมากต่อไกลเคชั่นของอัลบูมิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเควอซิตินแสดงผลการยับยั้งมากกว่า 95% ที่ 100 ไมโครกรัม/มล. จากผลที่ได้รับ สารสกัดจากใบฝรั่งเป็นสารต้านไกลเคชั่นที่มีศักยภาพ ซึ่งมีประโยชน์อย่างมากในการป้องกันภาวะแทรกซ้อนที่เกี่ยวข้องกับไกลเคชั่นในโรคเบาหวาน

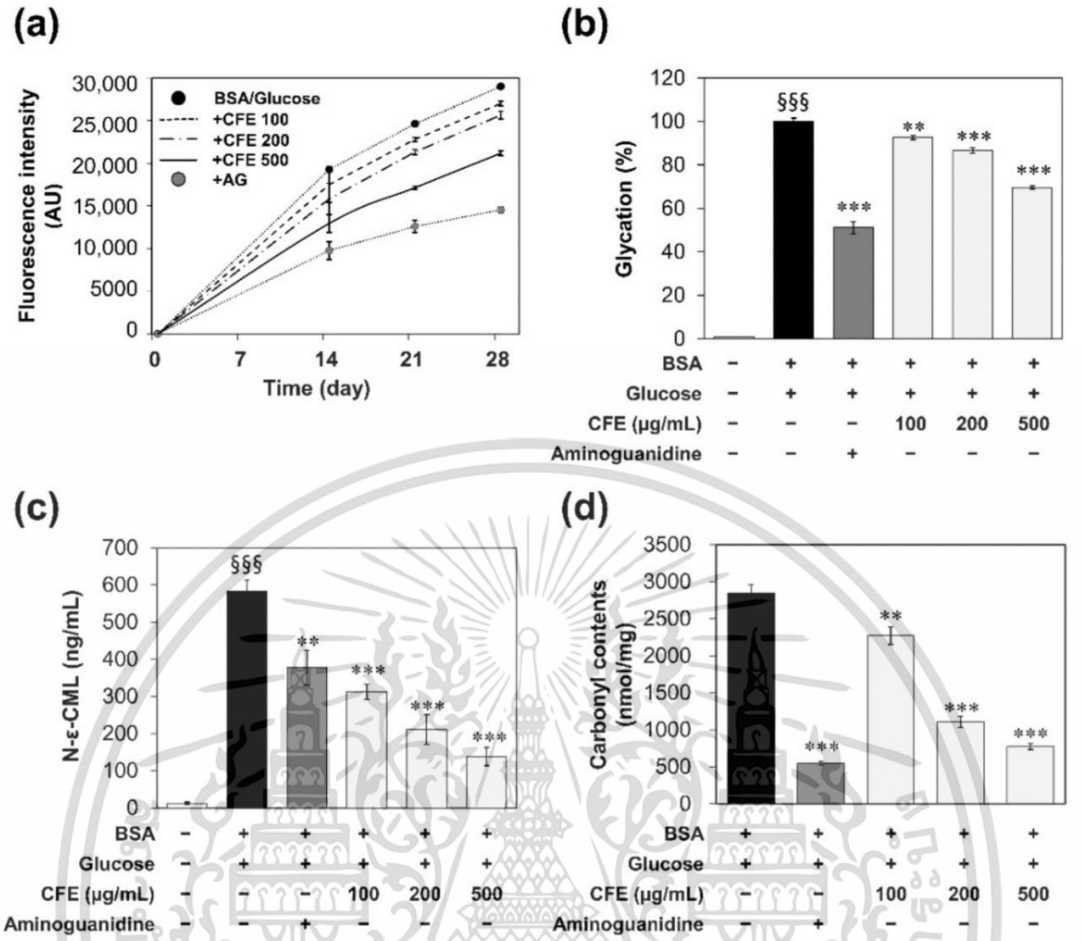
Alethia et al., (2018) ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและการต้านน้ำตาลในหลอดทดลองของผลไม้ *Spondias purpurea* โดยการนำผลของ *Spondias purpurea* มาทำให้แห้งในเตาลมจากนั้นนำมาบดด้วยเครื่องบดมือ อัตราส่วนผลไม้แห้งบดละอียด 200 กรัม สกัดด้วยเฮกเซน 1500 มิลลิลิตร โดยใช้เครื่อง Soxhlet สารสกัด CFH ถูกกรองและทำให้เข้มข้นโดยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนเพื่อกำจัดตัวทำละลาย จากนั้น N^{ε} – (carboxymethyl) lysine (CML) ซึ่งเป็นโครงสร้าง AGE ของแอนติเจนที่สำคัญ ถูกกำหนดโดยใช้ชุดตรวจวิแคราะห์อิมมูโนซอร์เบนที่เชื่อมโยงกันเอนไซม์ (ELISA) ความเข้มข้นของ CML คำนวณโดยใช้เส้นโค้ง CML-BSA มาตรฐานจากชุดทดสอบ จากคุณสมบัติการเรืองแสงของ ผลของ CFH ต่อการก่อตัวของ AGE ได้รับการประเมิน ผลลัพธ์แสดงว่า CFH ยับยั้งปฏิกิริยาไกลเคชั่นได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากการก่อตัวของผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้ายไกลเคชั่นขั้นสูงได้รับการสนับสนุนโดยปฏิกิริยาออกซิเดชั่น CFH สามารถยับยั้งการก่อตัวของมันโดยการลดชนิดออกซิเจนที่เกิดปฏิกิริยา (ROS) หรือโดยการดักจับ ROS ที่เกิดขึ้นในหลอดทดลองโดยปฏิกิริยา

เอกสารนี้ ไม่ว่ากรณี

ออกซิเดชั่นของน้ำตาลและ/หรือ การย่อยสลายออกซิเดชันของผลิตภัณฑ์ Amadori เช่น ฟรุกโตซามีน

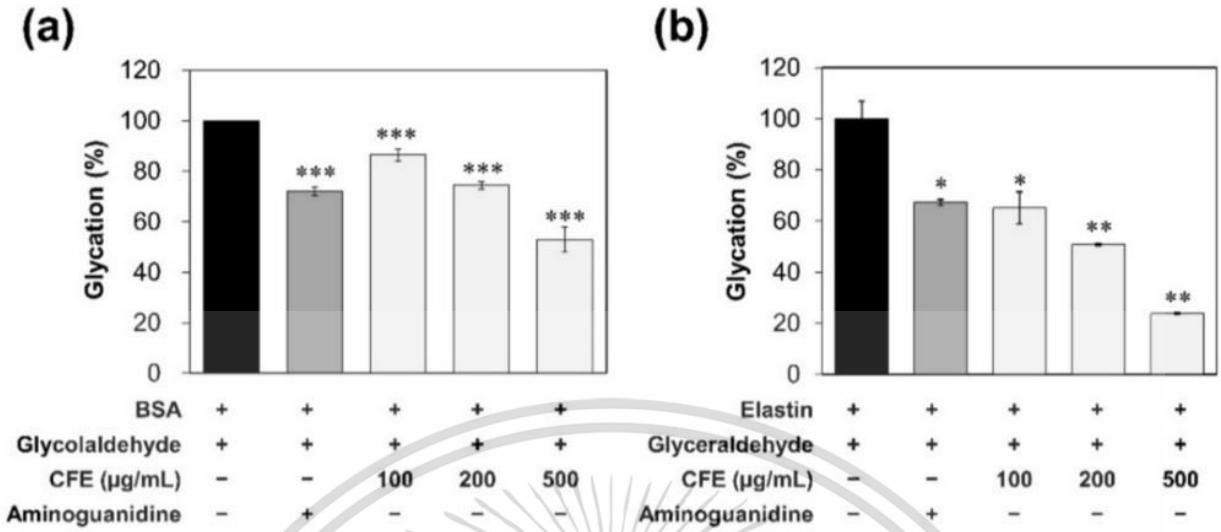
Sohyun et al., (2022) ได้ศึกษาผลของสารสกัดจากดอก *Cirium japonicum* ต่อการแก่ของผิวหนังที่เกิดจาก Glycation โดยนำดอก *C. Japonicum* มาเป่าให้แห้งในเครื่องเป่าลมร้อน 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาบดเป็นผง และนำผงดอกมาสกัดด้วยเอทานอล 70% ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปกรองและระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน เพื่อให้ได้ CFE การก่อตัวของ AGEs ใน BSA นั้น ถูกกระตุ้นโดยกลูโคส AG ถูกใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวกสำหรับการยับยั้งไกลเคชั่น ตัวอย่างที่บ่มถูกใช้พื่อตรวจหาการก่อตัวของ AGEs , CML และโปรตีนคาร์โบนิเลต หลังการบ่มตรวจพบ AGEs เรืองแสงใน BSA ที่ดัดแปลงด้วยกลูโคสด้วยความยาวคลื่นกระตุ้นที่ 340 นาโนเมตร และความยาวคลื่นที่ปล่อยออกมาที่ 430 นาโนเมตร เปอร์เซ็นต์ของไกลเคชั่นถูกคำนวณเป็นความเข้มของการเรืองแสงของตัวอย่าง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (BSA+/กลูโคส+) ในการศึกษานี้พบว่า AGEs เกิดขึ้นจากไกลเคชั่นของโปรตีนที่เหนี่ยวนำกลูโคสหรืออัลดีไฮด์ อย่างไรก็ตาม CFE ไม่เพียงแต่ป้องกันการก่อตัวของ AGEs ได้เท่านั้นแต่ยังป้องกัน CML และโปรตีนคาร์โบนิเลต ดังรูปที่ 2.9 และ 2.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.9 ผลของ CFE ต่อระบบ BSA/กลูโคส ไกลเคชั่น (a) ความเข้มของการเรืองแสงของ AGEs ใน BSA ที่ดัดแปลงด้วยกลูโคสเป็นเวลา 28 วันของการฟักตัว ข้อมูลเหล่านี้แสดงในหน่วยโดยพลการ (AU) (b) เปอร์เซ็นต์ไกลเคชั่นของ BSA ที่ดัดแปลงด้วยกลูโคสที่ 21 วันหลังการบ่ม ข้อมูลเหล่านี้คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ (%) ของความเข้มของการเรืองแสงของตัวอย่างเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (BSA+/กลูโคส+) (c) ความเข้มข้นของ CML (ng/mL) ใน BSA ที่ดัดแปลงน้ำตาลที่ 21 วันหลังการบ่ม (d) ปริมาณโปรตีนคาร์บอนิเลตใน BSA ที่ดัดแปลงด้วยกลูโคสที่ 21 วันหลังการบ่ม ข้อมูลเหล่านี้แสดงเป็นปริมาณของคาร์บอนิลต่อโปรตีนในตัวอย่าง (nmol/mg) ข้อมูลเหล่านี้แสดงเป็นปริมาณของคาร์บอนิลต่อโปรตีนในตัวอย่าง (nmol/mg) มีนัยสำคัญทางสถิติดังนี้ **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม; §§§, $p < 0.001$ เทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการรักษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.10 ผลกระทบของ CFE ต่อไกลเคชั่นที่ได้จากอัลดีไฮด์ (a) ความเข้มของการเรืองแสงของ AGEs ใน BSA ที่ดัดแปลงโดย GA เป็นเวลา 5 วันของการฟักตัว ข้อมูลเหล่านี้แสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ (%) ของความเข้มของการเรืองแสงของตัวอย่างเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (BSA+/GA+) (b) ระดับไกลเคชั่นของอีลาสตินไกลเคเต็ดโดยกลีเซอรอลดีไฮด์ มีนัยสำคัญทางสถิติดังนี้ *, p <0.05; **, หน้า < 0.01; ***, p < 0.001 เทียบกับกลุ่มควบคุม

Alethia et al., (2018) ได้ศึกษากิจกรรมการยับยั้งในหลอดทดลองของสารสกัดจากผลไม้ *Acca sellowiana* ในผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้ายของไลเคชั่นขั้นสูง ผลของ *Acca sellowiana* 100 กรัม ถูกทำให้แห้งและบดให้เป็นผงในเครื่องบดเชิงกล จากนั้นนำผงที่ได้มาสกัดด้วยเฮกเซน 500 มิลลิลิตร โดยใช้เครื่อง Soxhlet สารสกัด (FOH) ถูกนำมากรองและทำให้เข้มข้นโดยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนเพื่อกำจัดตัวทำละลาย การก่อตัวของ glycated BSA ถูกกำหนดที่ความยาวคลื่นกระตุ้น 355 นาโนเมตร และความยาวคลื่นที่ปล่อยออกมาที่ 460 นาโนเมตร Aminoguanidine (AG) ถูกใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวก CML เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่ใช้ในการระบุ AGEs ที่ไม่เรืองแสง และในการศึกษาของเราพบว่าสารสกัดเฮกเซนของผลไม้ *sellowiana* สามารถยับยั้งการก่อตัวของ AGEs FOH ลดการเกิดออกซิเดชันสร้างความเสียหาย ลดการก่อตัวของปฏิกิริยาชนิดออกซิเจน และปกป้องโปรตีนไทออลจากออกซิเดชัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดเฮกเซนของผล Acca sellowiana ลดการเกิดออกซิเดชัน ความเครียดและอาจเป็นประโยชน์ในการป้องกันการเกิดออกซิเดชัน ความเสียหายต่อโปรตีนซึ่งเป็นผลมาจาก ปฏิกิริยาไกลเคชั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Vítor et al., (2021) ได้ศึกษาการประเมินผลการยับยั้งในหลอดทดลองต่อเอนไซม์หลักเชื่อมโยงกับโรคเบาหวานประเภท 2 และโรคอ้วน และกระบวนการไกลเคชั่นของโปรตีนโดยสารประกอบฟีนอลของพืชพันธุ์ Lauraceae เฉพาะถิ่นป่าลอริซิลวา โดยนำใบของ Lauraceae 4 สายพันธุ์ที่แตกต่างกัน (*A. barbujana, L. novocanariensis, P. indica*และ *O. foetens*) มาทำให้แห้งและสกัดด้วยเมทานอล อัตราส่วน 1:25 อัลตราโซนิค เป็นเวลา 60 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และทำให้เข้มข้นจนแห้งภายใต้ความดันลดลงในเครื่องระเหยแบบหมุน ที่อุณหภูมิ 40องศาเซลเซียส สารละลาย BSA 100 ไมโครลิตร สารละลายไรโบส 100 ไมโครลิตร และสารสกัดตัวอย่าง 40 ไมโครลิตร รวมกันในเพลต 96 หลุม สารละลายทั้งหมดเตรียมในบัฟเฟอร์โพแทสเซียมฟอสเฟส (pH 7.4) หลังจากการบ่มเพลตถูกวิเคราะห์ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น 355 นาโนเมตร และความยาวคลื่นที่ปล่อยออกมาที่ 460 นาโนเมตร ใช้มาตรฐาน Aminoguanidine (AG) และ quercetin และ (+)-catechin เป็นตัวควบคุมเชิงบวก การยับยั้งของ BSA ไกลเคชั่น ในงานนี้สารสกัดจากพืช Lauraceae 4 ชนิด ยับยั้งเอนไซม์สำคัญที่เชื่อมโยงกับ T2DM และโรคอ้วน นอกจากนี้สารสกัดที่วิเคราะห์เป็นตัวยับยั้ง BSA-ไกลเคชั่น ที่แรงกว่าต่อสารประกอบอ้างอิง AG

Hikari et al., (2016) ได้ทำการศึกษาวัดผลการยับยั้งของสารสกัด *Eucommia ulmoides* หลายชนิดต่อการก่อตัวของ AGEs, N^{ε} – (I-carboxyethyl) lysine และ N^{ω}-(Carboxymethyl)arginine (CMA) พืชในวงศ์ *Eucommiaceae E. ulmoides* (Cortex Eucommiae) สารสกัดหยาบจากเปลือกไม้ (EBE) และใบ *E.ulmoides* มีการใช้กันอย่างแพร่หลายเป็นยาสมุนไพร เช่น ยาแก้ปวด ยากล่อมประสาท ยาลดความดันโลหิต ยาขับปัสสาวะ และยาต้านเบาหวานในจีนและเกาหลี และสารสกัดจากใบ *E.ulmoides* (ELE) ใช้ในเครื่องดื่มเรียกว่า Tochu-cha ในประเทศญี่ปุ่น *E. ulmoides* leaf extract (ELE) ที่มี leaf glycoside ใช้เป็นอาหารเพื่อสุขภาพ สกัดจากใบ *E. ulmoides* (ELE) ยับยั้งการก่อตัวของ CML และ CMA ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้นในระหว่างการบ่มเจลาตินด้วยไรโบส ผลการยับยั้งของสารประกอบที่มีอยู่ใน ELE ต่อการก่อตัวของ CML และ CMA เป็นผลให้ isoquercetin แสดงผลการยับยั้งที่แข็งแกร่งที่สุดของส่วนประกอบ ELE ที่ผ่านการทดสอบทั้งหมด ผลลัพธ์เหล่านี้บ่งชี้ว่าการรับประทาน ELE อาจยับยั้งการก่อตัวของ AGEs ซึ่งจะช่วยแก้ไขโรคที่เกี่ยวข้องกับอายุ มีการวัดผลของคาร์โบไฮเดรตหลายชนิดต่อการก่อตัวของ CMA และ CML คาร์โบไฮเดรต (กลูโคส แมนโนส กาแลคโตส ฟรุกโตส และไรโบส) บ่มด้วยเจลาตินนานถึงหนึ่งสัปดาห์ ตามด้วยการตรวจหาระดับ CMA และ CML ด้วยวิธี ELISA ปริมาณ CMA และ CML ในเจลาตินไกลเคตยังถูกวัดโดย LC-MS/MS โครมาโตแกรมไอออนแบบแฟรกเมนต์ทั่วไปของ CMA และ [13C6] CMA (10 pmol) โดย LC-MS/MS โครมาโตแกรมไอออนแบบแฟรกเมนต์ทั่วไปของ CML และ [2H2] CML (10 pmol) ใช้วิธีนี้วัดระดับของ CML และ CMA ในเจลาตินไกลเคต ไรโบสแสดงค่าสูงสุดของ CML และ CMA การตรวจหา AGEs โดยวิธี ELISA โดยใช้แอนติบอดีต่อต้าน AGE มีความสัมพันธ์กับผลลัพธ์ของ LC-MS/MS ดังนั้นจึงเป็นการตรวจสอบความถูกต้องของระบบการทดสอบนี้ เนื่องจากไรโบสสร้าง CMA และ CML ได้เร็วกว่าเฮกโซส จึงใช้ไรโบสเพื่อคัดกรองสารยับยั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การก่อตัวของ CMA และ CML ELE ยับยั้งการก่อตัวของ CMA อย่างสมบูรณ์ ในขณะที่ EBE หรือ ERE ยับยั้งการก่อตัวของ CMA บางส่วน นอกจากนี้ ELE ยับยั้งการก่อตัวของ CML บางส่วน ในขณะที่ EBE หรือ EBR ไม่แสดงผลการยับยั้งใด ๆ ต่อการก่อตัวของ CML ผลลัพธ์นี้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า ELE มีสารประกอบที่สามารถยับยั้งการก่อตัวของ CMA และ CML ดังนั้น ส่วนประกอบ ELE จึงถูกแยกสารประกอบที่แยกได้หลายชนิด ได้แก่ isoquercetin, 6’’-O-acetyl-astragalin, rutin และ astragalin แสดงผลการยับยั้งการสร้าง CMA และ CML ได้ดีกว่า aminoguanidine ในขณะที่ kaempferol 3-O-rutinoside แสดงผลการเสริมฤทธิ์ มากกว่าผลยับยั้งที่อ่อนแอ นอกจากนี้ สารประกอบ ELE ยังยับยั้งการก่อตัวของ CMA ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่า CML กรดไฮโดรไลซิสของ isoquercetin, astragalin, quercetin และ kaempferol ยังแสดงผลการยับยั้งการสร้าง CMA และ CML ได้ดีกว่า aminoguanidine CMA, AGE ที่ไม่มีกรด ระบุในคอลลาเจน glycated โดยใช้การย่อยด้วยเอนไซม์ วิธีที่ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อต้าน CMA แสดงให้เห็นว่า CMA ถูกสร้างขึ้นโดยเฉพาะบนคอลลาเจนไกลเต็ด ดังนั้นจึงเปลี่ยนการทำงานของไฟโบรบลาสต์ผิวหนัง เช่น การหลั่งคอลลาเจน ดังนั้น การรับประทานสารประกอบธรรมชาติที่ยับยั้งการสร้าง CMA ในแต่ละวันอาจช่วยป้องกันโรคที่เกี่ยวข้องกับไกลเคชั่นได้

กัญญาณัฐ (2563) ได้ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาไกลเคชั่น และฤทธิ์ต้านการอักเสบในสารสกัดจากพืชที่มีสรรพคุณรักษาโรคเบาหวาน ได้แก่ ใบกะเพรา ใบเตย ใบตำลึง วุ้นว่านหางจระเข้ ผลมะระขี้นก และใบชะพลู ที่เตรียม 2 วิธี คือ วิธีคั้นสดแล้วทำแห้ง แบบแช่เยือกแข็ง (freeze-drying) และวิธีสกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดน้ำคั้นสด ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกรวม สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด คือ สารสกัดเอทานอลจากใบกะเพรา (IC50 = 7.39 ± 1.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งออกฤทธิ์สูงกว่าสารมาตรฐาน butylatedhydroxytoluene (BHT) (IC50 = 78.56 ± 8.34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ส่วนฤทธิ์ต้านไกลเคชั่นพบเฉพาะในสารสกัดเอทานอล เท่านั้น โดยสารสกัดเอทานอลจากใบตำลึง (0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) มีร้อยละความสามารถต้าน ไกลเคชั่นสูงที่สุด คือ 36.86 ± 2.19 ซึ่งสูงกว่าของสารมาตรฐาน aminoguanidine (32.55 ± 1.56) สำหรับฤทธิ์ต้านการอักเสบ สารสกัดเอทานอลจากใบเตยหอมสามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้ถึงร้อยละ 88.6 ± 1.85 และมีฤทธิ์ต้านการอักเสบเทียบเท่าสารมาตรฐาน aminoguanidine (89 ± 4.36) นอกจากนี้ผลทดสอบความสามารถยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E2 พบว่าสารสกัดเอทานอลจาก ใบชะพลูมีฤทธิ์ยับยั้งได้ร้อยละ 81.7 เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน indomethacin ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งร้อยละ 85.1 ผลจากการศึกษานี้สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดการศึกษาทางยาและอาหารเสริม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ผักสวนครัว

1. กะเพรา (Holy basil)
2. กระเทียม (Garlic)
3. ขึ้นฉ่าย (Celery)
4. ต้นหอม (Spring Onion)
5. ผักชี (Coriander)
6. ผักชีลาว (Dill)
7. พริกชี้ฟ้า (Chili pepper)
8. สะระแหน่ (kitchen Mint)
9. หอมแดง (Shallots)
10. โหระพา (Sweet basil)

3.2 สารเคมี

1. Acetone
2. Aminoguanidine (AG)
3. Casein Hydrolysate
4. Citric acid
5. Disodium Hydrogenphosphate (Na_2HPO_4)
6. Ethanol Absolute
7. Gelatin
8. Hydrogen peroxide (H_2O_2)
9. Immonoglobulin (IgG)
10. o-Phenylenediamine Dihydrochloride (OPD•2HCl)
11. Protassium Chloride (KCl)
12. Potassium Dihydrogenphosphate (KH_2PO_4)
13. Potassium Hydroxide (KOH)
14. Resin
15. Ribose
16. Sodium Chloride (NaCl)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

17. Sodium Phosphate ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)
18. Sulfuric acid (H_2SO_4)
19. Tween 20

3.3 อุปกรณ์

1. กระบอกตวง (Cylinder)
2. กระดาษชั่งสาร (Weighing paper)
3. กระดาษฟรอยด์ (Aluminium Foil)
4. กระดาษกรองเบอร์ 4 (Whatman No.4)
5. กระบอกฉีดยา (Syringe)
6. ขวดแก้ว (Duran Bottle)
7. ขวดระเหยสาร ขนาด 250 ml (Evaporating Flask)
8. ขาตั้งและแคลมป์ (Stand & Clamp)
9. คอลัมน์แก้ว (Glass column chromatography)
10. เครื่องปั่นผัก
11. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
12. เครื่องปั่นตก (Spin down)
13. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Analytical Balance)
14. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดเบส (pH meter)
15. เครื่องปั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary Evaporator)
16. เครื่องไล่แก๊สความดันต่ำ (Degras Ultrasonic)
17. เครื่องเขย่าสารละลาย (Vortex Mixer)
18. ช้อนตักสาร (Dispensing Spoons)
19. ตู้เย็น (Refrigerator)
20. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)
21. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
22. ตะแกรงวางหลอดทดลอง (Microtube rack)
23. แท่งแก้วคนสาร (Glass Stirring Rod)
24. บีกเกอร์ขนาดต่างๆ
25. ปิเปตทิป (Pipette Tip)
26. ไมโครเพลต 96 หลุม (96-well plate)
27. สำลี
28. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

29. หลอดเซนตริฟิวจ์ ขนาด 50 มิลลิลิตร (Centrifuge tube)
30. หลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ ขนาด 1.5 (Eppendorf)
31. ออโต้ปิเปต (Auto-pipettes)
32. 0.22 Micro membrane filtered
33. Microplate ELISA

3.4 การเตรียมสารสกัด

นำผักสด 10 ชนิด ที่ซื้อได้จากตลาดมาชั่ง 10 กรัม เมื่อชั่งเสร็จแล้วนำไปล้างด้วยน้ำสะอาด จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นกับตัวทำละลายต่างๆ โดยจะใช้ผัก 10 กรัม ต่อตัวทำละลาย 100 มิลลิลิตร (เอทานอล 30% และ 60%) เมื่อปั่นเสร็จแล้วนำใส่ขวดปิดฝาให้สนิท และบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน เมื่อครบเวลาแล้วใช้กระดาษกรอง Whatman No. 4 กรองสารสกัดด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

3.5 ปฏิกิริยาการก่อตัวของ AGEs

เตรียม Solution A โดยการชั่ง 0.4% Gelatin และ 60mM Riboes ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ 200 mM K-PO_4 buffer pH 7.2 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้แล้ว กรองผ่าน Filtered 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นทำการผสม Gelatin และ Riboes เข้าด้วยกันจะได้เป็น Solution A 50 มิลลิลิตร สำหรับใช้ผสมกับสารควบคุมและสารสกัด ในการทดสอบใช้ Aminoguanidine (AG) 1 และ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นตัวควบคุมเชิงบวก และใช้น้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมเชิงลบ

ผสมสารละลายในหลอดทดลองปลอดเชื้อขนาด 1.5 มิลลิลิตรดังนี้ (ปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น 3 เท่า ในหลอดทดลองปลอดเชื้อ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร)

1) ผสมสารละลาย A 495 ไมโครลิตร + น้ำปราศจากเชื้อ 5 ไมโครลิตร (ควบคุมเชิงลบ) 2 ชุด
2) ผสมสารละลาย A 495 ไมโครลิตร + AG 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 5 ไมโครลิตร (ควบคุมเชิงบวก)
3) ผสมสารละลาย A 495 ไมโครลิตร + AG 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 5 ไมโครลิตร (ควบคุมเชิงบวก)
4) ผสมสารละลาย A 495 ไมโครลิตร + สารสกัด 5 ไมโครลิตร (ชุดทดสอบ)

ผสมสารละลายในหลอดทดลองให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (Votex) และนำมาปั่นตก (spindown) ที่ 12,000 rpm 5 นาที ชุดควบคุมเชิงลบ เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นการหยุดการก่อตัวของ AGEs เมื่อเริ่มการทดลอง ส่วนชุดทดสอบที่เหลือนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ไม่เขย่า เมื่อบ่มครบเวลา เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 การตรวจหา AGEs โดย ELISA

นำตัวอย่างในหลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตร ที่แช่แข็งไว้มาวางให้หายเย็นก่อนเริ่มเจือจาง เนื่องจากตัวอย่างปัจจุบันมีเจลาติน 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งสูงเกินไปสำหรับการตรวจหาด้วยวิธี ELISA ควรใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของโปรตีนที่ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เริ่มทำการเจือจาง 20 เท่า โดยนำตัวอย่างในหลอดมา ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และ 1XPBS 190 ไมโครลิตร หยดลงในไมโครเพลต ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเจือจางต่อจาก 20 เท่า เป็น 200 เท่าสำหรับการตรวจจับ CML โดยปิเปตจากหลุมที่เจือจาง 10 เท่า มาปริมาตร 20 ไมโครลิตร ปิเปตลงในหลุมที่ใส่ 1XPBS 180 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

ปิเปตตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 20 เท่า ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในเพลต ELISA บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง เติม 0.5% เคซีนไฮโดรไลซ์ 200 ไมโครลิตร (เคซีนไฮโดรไลซ์ 0.1 กรัม ละลายใน 1*X* PBS 20 มิลลิลิตร) บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที เมื่อครบเวลาแล้ว เทส่วนเหนือตะกอนทิ้ง ล้าง 3 ครั้ง ด้วย washing buffer หลุมละ 200 ไมโครลิตร เติม 0.1 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร anti-CMLหรือ anti-CMA 100 ไมโครลิตร (IgG 1.27 ไมโครลิตร ใน washing buffer 11 มิลลิลิตร) บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที เมื่อครบเวลาแล้ว เทส่วนเหนือตะกอนทิ้ง ล้าง 3 ครั้ง ด้วย washing buffer หลุมละ 200 ไมโครลิตร เติม IgG ตัวที่ 2 ที่เจือจาง 5000 เท่า 100 ไมโครลิตร (ผสม IgG 2.2 ไมโครลิตร ใน washing buffer 11 มิลลิลิตร) บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที เมื่อครบเวลาแล้ว เทส่วนเหนือตะกอนทิ้ง ล้าง 3 ครั้ง ด้วย washing buffer หลุมละ 200 ไมโครลิตร เริ่มปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายตั้งต้น 100 ไมโครลิตรต่อหลุม (เตรียมใหม่ OPD•2HCl 5.5 มิลลิกรัม ใน substrate solution 11 มิลลิลิตร + H_2O_2 6.6 ไมโครลิตร) บ่ม 4 นาที (จะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง) หยุดปฏิกิริยาโดยเติม 1M H_2SO_4 100 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง Microplate reader อ่านค่าที่ A492 นาโนเมตร

3.7 การแยกคอลัมน์

คัดเลือกตัวอย่างที่ดีที่สุด (กะเพราในตัวทำละลายเอทานอล 60%) มาระเหยตัวอย่างให้แห้งสนิทโดยใช้เครื่องระเหยแบบหมุน ชั่งน้ำหนักขวดคู่ก่อนและบันทึกน้ำหนักแห้งของสารสกัด ละลายตัวอย่างด้วยตัวทำละลายเดิมถ่ายโอนตัวอย่างไปที่หลอดทดลองที่เตรียมไว้ จากนั้นหมุนเหวี่ยงเพื่อกำจัดเศษที่อาจอุดตันคอลัมน์ในกระบวนการต่อไปเตรียมน้ำกลั่น ประมาณ 180 มิลลิลิตร เอทานอลความเข้มข้น 25% 50%, 75% และ 100% อย่างละ 54 มิลลิลิตร และ อะซิโตนความเข้มข้น 100% 54 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายไปทำการไล่แก๊สด้วยแรงดันต่ำ (เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะใช้งาน)

บรรจุคอลัมน์และการปรับสมดุลโดยการเติมน้ำที่กรองผ่าน filtered 0.45 ไมโครเมตร 0.5 CV (9 มิลลิลิตร) ใช้สำลีบางๆอุดที่ด้านล่างของคอลัมน์ จากนั้นเทเรซินตามลงไป จากนั้นล้างให้สะอาดโดยการเติมน้ำลงไป 3 CV (54 มิลลิลิตร) หยุดบรรจุเมื่อผิวเรซินอยู่ต่ำกว่าด้านบนของคอลัมน์ยู่ประมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3-5 เซนติเมตร ตรวจสอบให้แน่ใจว่าการไหลเป็นแบบหยดต่อหยด ล้างคอลัมน์ด้วยน้ำที่ผ่านการไล่แก๊สแล้ว 3-5 CV ตอนนี้คอมลัมน์พร้อมใช้งานแล้ว

การโหลดตัวอย่าง ค่อยๆหยดสารสกัดลงไปในคอลัมน์ ใช้ขวดสำหรับเก็บตัวอย่างรองไว้ด้านล่าง เปิดวาล์วให้ตัวอย่างค่อยๆหยดลงไปพร้อมทั้งล้างคอลัมน์ด้วย น้ำกลั่น 25%, 50%, 75%, 100% EtOH และ อะซิโตน 100% อย่างละ 54 มิลลิลิตร จากนั้นนำแต่ละ Fraction ไประเหยแห้งและทำการทดสอบ AGEs อีกครั้ง ทำการฟื้นฟูคอลัมน์โดยล้างคอลัมน์ที่ใช้แล้วด้วยน้ำ 3 CV (54 มิลลิลิตร) เรซินพร้อมสำหรับการคัดแยกในรอบถัดไปหรือล้างคอลัมน์ด้วย 20% EtOH 3 CV เพื่อเก็บเรซินในระยะยาว

3.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลลัพธ์ที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยการทดลอง 3 ซ้ำ คำนวณอัตราการตรวจจับ CML และ CMA (%) โดยใช้โปรแกรม Microsoft Exel 2010 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยออกแบบชุดทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ Complete Randomized Design (CRD) วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนด้วยวิธี one way ANOVA และวัดค่าความแตกต่างของข้อมูลด้วยวิธี Duncan โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS statistics version 29 (SPSS software, New York, USA) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

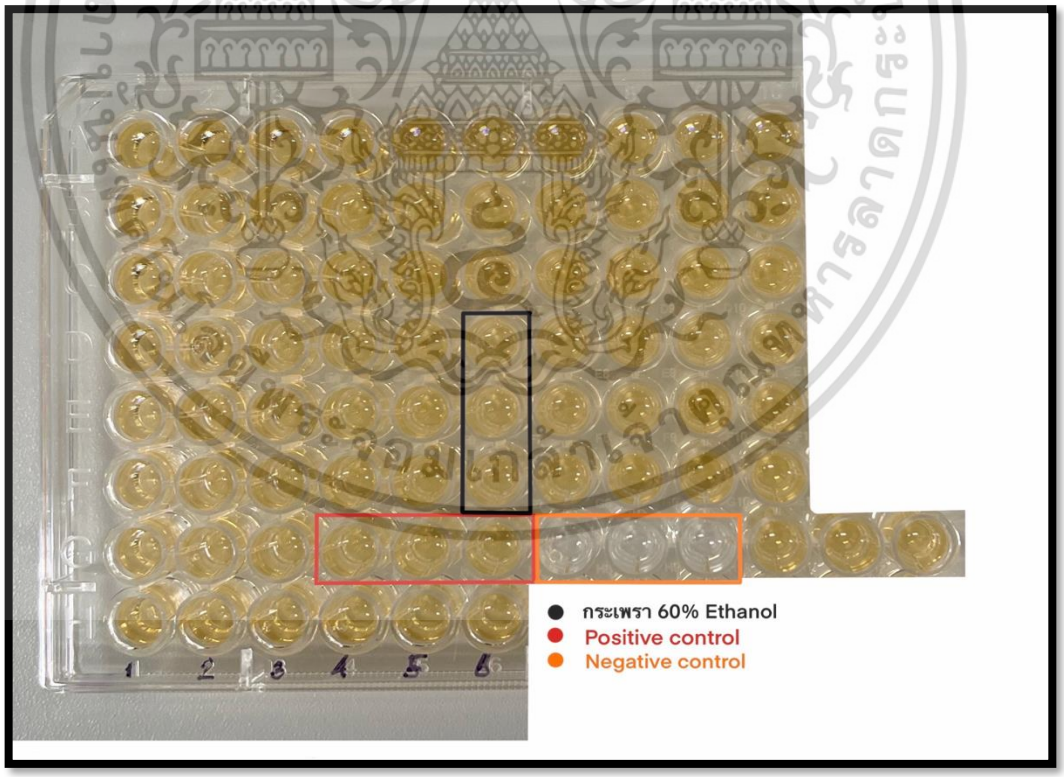
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

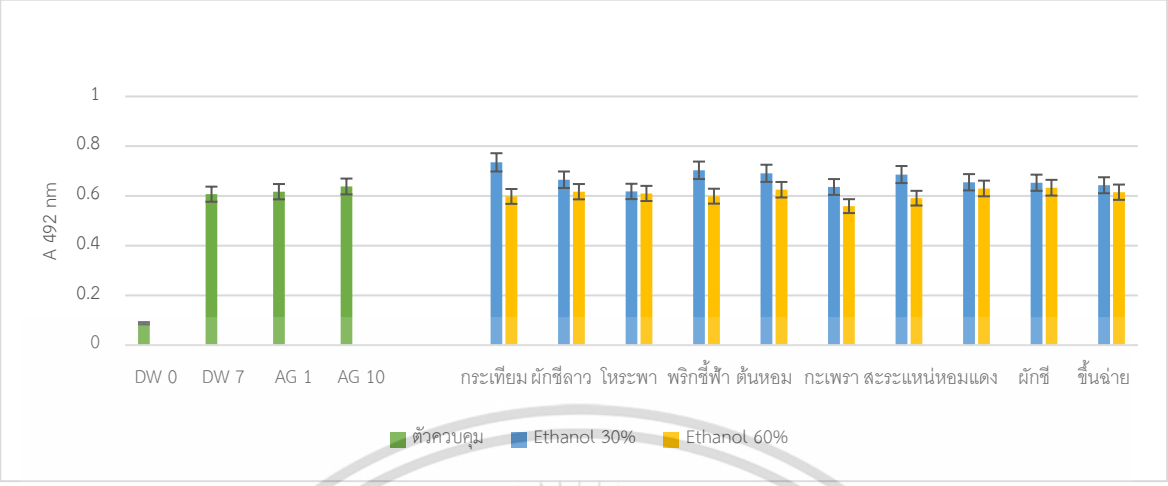
4.1 ผลของการยับยั้งอัตราการก่อตัวของ N^{ε}-(carboxymethyl) lysine (CML)

การทดลองการยับยั้งอัตราการก่อตัวของ CML และ CMA โดยการนำสารสกัดพืชสวนครัวทั้ง 10 ชนิด ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 30% และ 60% มาทำการทดสอบด้วยวิธี ELISA และวัดค่าการดูดกลืนแสง ผลการทดลองพบว่า ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ของสารสกัดในตัวทำละลายเอทานอล 30% และ 60% มีค่า ดังนี้ กระเทียม 0.735, 0.598 ผักชีลาว 0.665, 0.617 โหระพา 0.618, 0.610 พริกชี้ฟ้า 0.703, 0.599 ต้นหอม 0.691, 0.625 กะเพรา 0.636, 0.599 สะระแหน่ 0.686, 0.591 หอมแดง 0.655, 0.630 และผักชี 0.650, 0.633 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับ (รูปที่ 4.1 และ 4.2) ผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากกะเพราในตัวทำละลายเอทานอล 60% แสดงค่าการดูดกลืนแสงดีที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดจากกะพราในตัวทำละลายเอทานอล 30% และสารสกัดจากพืชชนิดอื่น ๆ



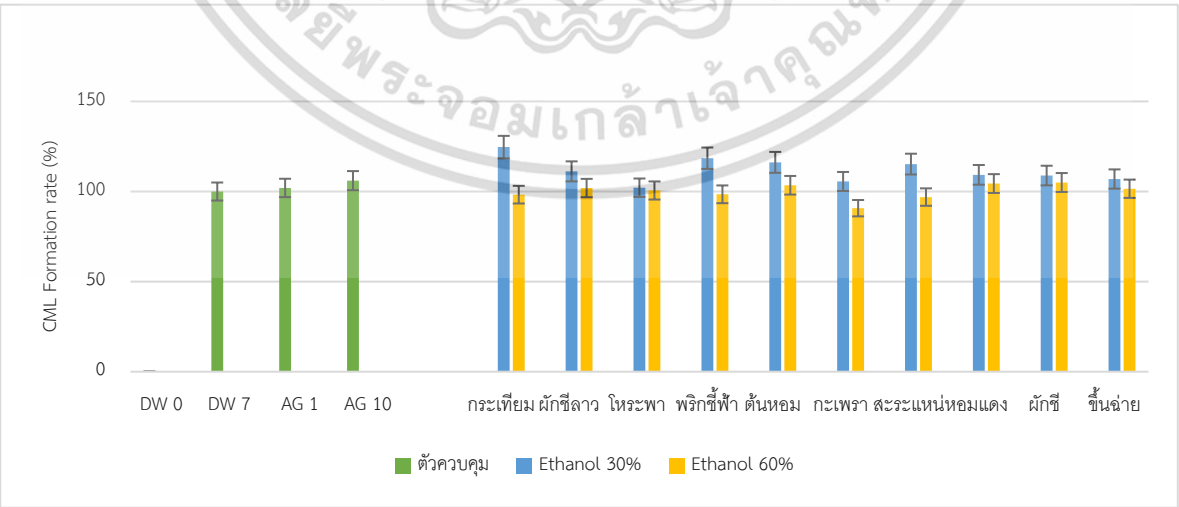
รูปที่ 4.1 ELISA Plate แสดงผลการเกิดสีของกลุ่มควบคุมและสารสกัดของพืชทั้ง 10 ชนิด ต่อผลการยับยั้ง CML

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของกลุ่มควบคุมและสารสกัดของพืชทั้ง 10 ชนิด

คำนวณหาอัตราการก่อตัวของ CML ของสารสกัดจากพืชทั้ง 10 ชนิด ในตัวทำละลายเอทานอล 30% และ 60% ให้ผลสอดคล้องกับค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย โดยสารสกัดจากใบกะเพราแสดงอัตราการก่อตัวของ CML น้อยกว่าสารสกัดจากพืชชนิดอื่น อัตราการก่อตัวของ CML แสดงผลดังรูปที่ 4.3 กระเทียม 125%, 98% ผักชีลาว 111%, 102% โหระพา 102%, 101% พริกชี้ฟ้า 118%, 98% ต้นหอม 116%, 103% กะเพรา 106%, 91% สะระแหน่ 115%, 97% หอมแดง 109%, 104% ผักชี 109%, 105% และขึ้นฉ่าย 107%, 102% ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าสารสกัดกะเพราในตัวทำละลายเอทานอล 60% ให้ค่าการยับยั้งได้ดีที่สุดในการทดลองนี้ จึงเลือกสารสกัดจากกะเพราในตัวทำละลายเอทานอล 60% ไปทำการทดลองต่อไป

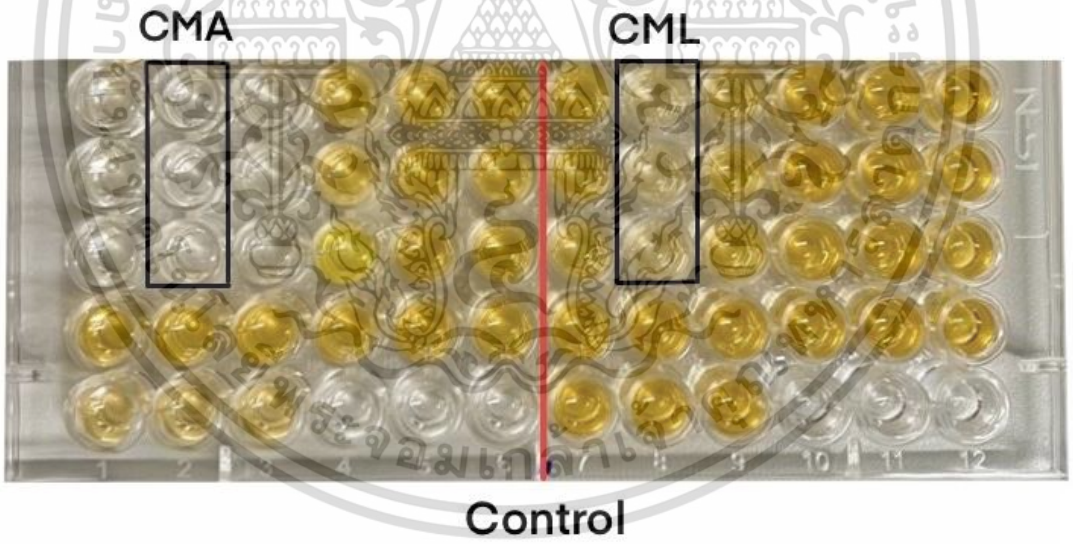


รูปที่ 4.3 แสดงอัตราการก่อตัวของ CML ในกลุ่มควบคุมและสารสกัดจากพืชทั้ง 10 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

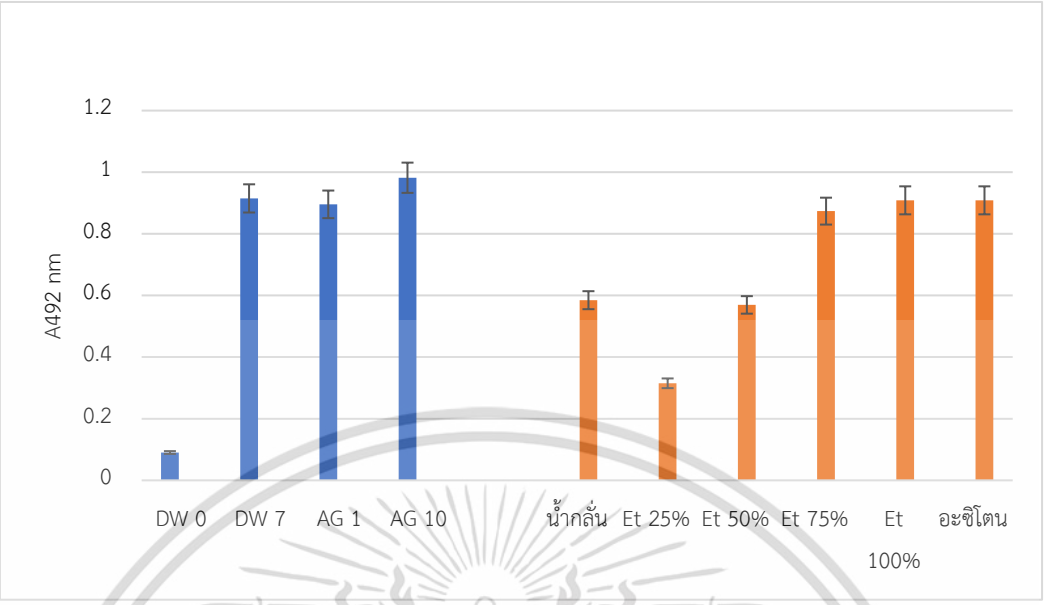
4.2 ผลการทดสอบการยับยั้ง CML ของสารสกัดที่ได้จากกะเพราที่นำมาแยกคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ

จากการทดสอบการยับยั้ง CML ของสารสกัดจากพืชทั้ง 10 ชนิด ผลพบว่าสารสกัดในตัวทำละลายเอานอล 60% จากกะเพรา มีอัตราการก่อตัวของ CML ต่ำสุดอยู่ที่ 91% จึงได้มีการนำมาทดสอบต่อ โดยนำไประเหยแห้งเพื่อให้สารสกัดเข้มข้นขึ้นด้วยเครื่อง Rotary Evaporator จากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยการแยกคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ตัวทำละลาย น้ำกลั่น เอทานอล 25%, 50%, 75%, 100% และ อะซิโตน 100% จากนั้นนำมาทดสอบการยับยั้งการสร้างสาร CML และ CMA ผลการทดลองพบว่า ค่าการดูดกลืนแสงและอัตราการก่อตัวของ CML มีค่า ดังนี้ น้ำกลั่น 0.584, 60% เอทานอล 25% 0.315, 27% เอทานอล 50% 0.569, 58% เอทานอล 75% 0.874, 95% เอทานอล 100% 0.909, 99% และอะซิโตน 0.909, 99% ตามลำดับ (รูปที่ 4.5 และ 4.6) ผลการทดลองพบว่า สารสกัดจากกะเพราในตัวทำละลายเอทานอล 60% ที่ Fraction เอทานอล 25% ให้ผลการยับยั้ง CML ได้ดีที่สุด โดยแสดงค่าอัตราการก่อตัวต่ำที่สุด และต่ำกว่าตัวควบคุมเชิงบวกเมื่อเทียบกับ Fraction ตัวทำละลายอื่น ๆ

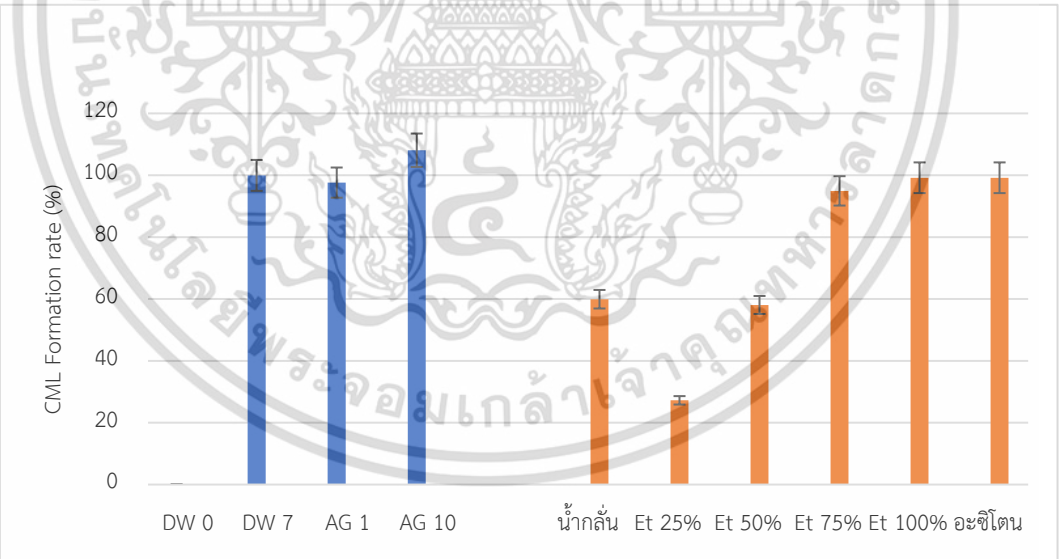


รูปที่ 4.4 ELISA plate แสดงผลการเกิดสีของตัวควบคุมและสารสกัดจากกะเพราในตัวทำละลาย 60% ที่ Fraction ตัวทำละลายต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ของกลุ่มควบคุมและกะเพรา 60% ที่แยกคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่น เอทานอล 25% 50% 75% 100% และ อะซิโตน

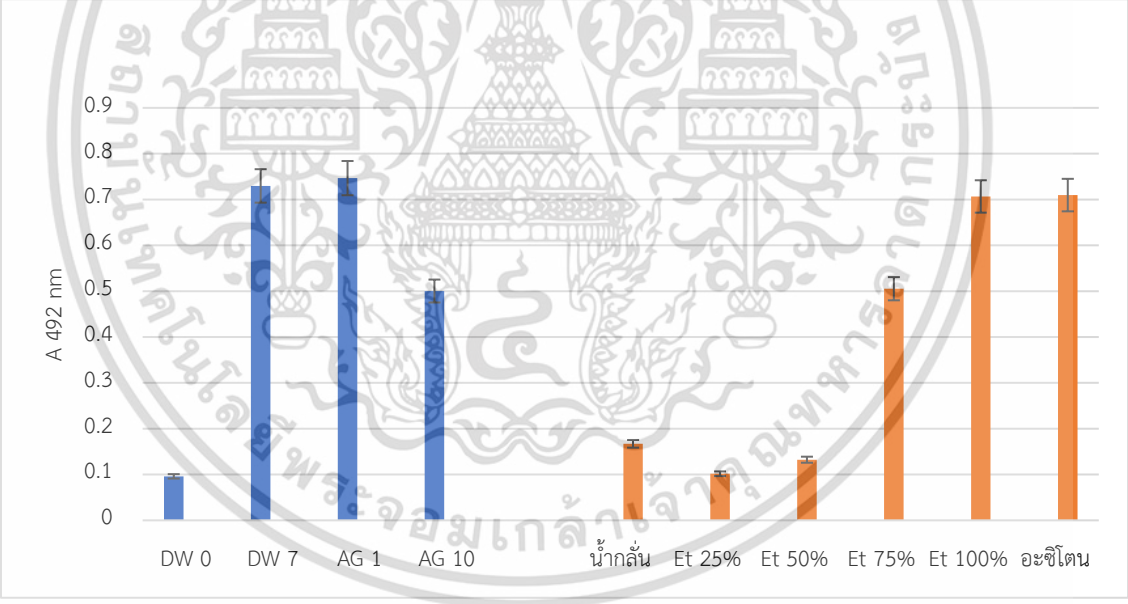


รูปที่ 4.6 แสดงอัตราการยับยั้ง CML ของกลุ่มควบคุมและกระเพรา 60% ที่แยกคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่น เอทานอล 25% 50% 75% 100% และ อะซิโตน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

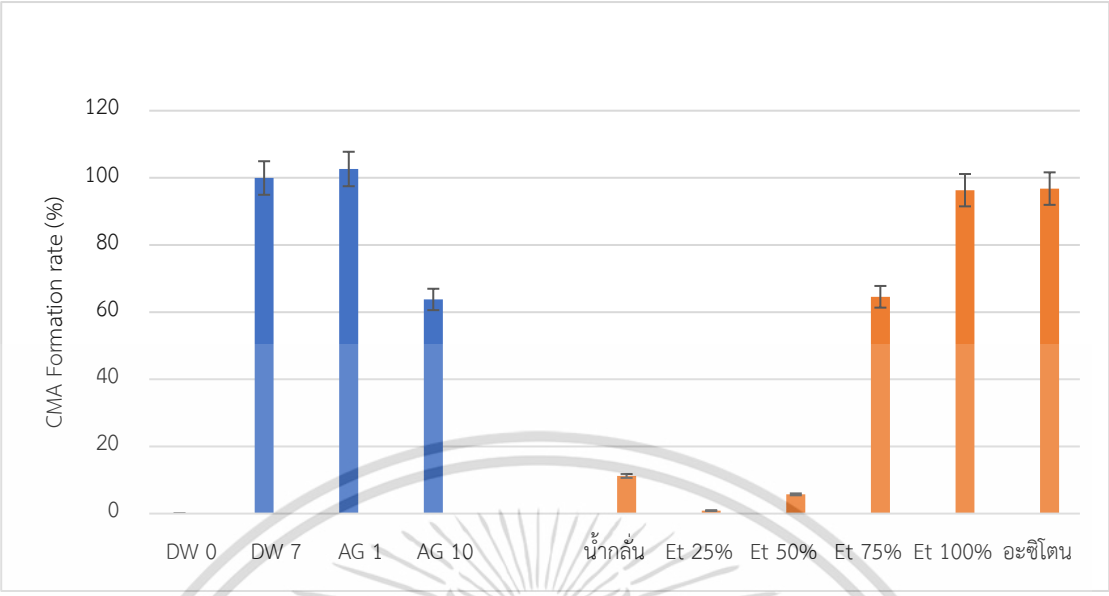
4.3 ผลการทดสอบการยับยั้ง CMA ด้วยสารสกัดเอทานอล 60% จากกะเพราที่นำมาแยกคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายต่างๆ

จากการทดสอบการยับยั้ง CML ของสารสกัดจากพืชทั้ง 10 ชนิด ผลพบว่าสารสกัดในตัวทำละลายเอานอล 60% จากกะเพรา มีอัตราการก่อตัวของ CML ต่ำที่สุด จึงได้มีการนำมาทดสอบต่อ โดยนำไประเหยแห้งเพื่อให้สารสกัดเข้มข้นขึ้นด้วยเครื่อง Rotary Evaporator จากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยการแยกคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ตัวทำละลาย น้ำกลั่น, เอทานอล 25%, 50%, 75%, 100% และ อะซิโตน 100% จากนั้นนำมาทดสอบการยับยั้งการสร้างสาร CML และ CMA รูปที่ 4.4 แสดงผลการวัดค่าการดูดกลืนแสง ผลการทดลองพบว่า ค่าการดูดกลืนแสงและอัตราการก่อตัวของ CMA มีค่า ดังนี้ น้ำกลั่น 0.167, 11% เอทานอล 25% 0.102, 1% เอทานอล 50% 0.132, 6% เอทานอล 75% 0.505, 65% เอทานอล 100% 0.707, 96% และอะซิโตน 0.710, 97% ตามลำดับ (รูปที่ 4.7 และ 4.8) ผลการทดลองพบว่า สารสกัดจากกะเพราในตัวทำละลายเอทานอล 60% ที่ Fraction เอ-ทานอล 25% ให้ผลการยับยั้ง CMA ได้ดีที่สุด โดยแสดงค่าอัตราการก่อตัวต่ำที่สุด และต่ำกว่าตัวควบคุมเชิงบวกเมื่อเทียบกับ Fraction ตัวทำละลายอื่น ๆ



รูปที่ 4.7 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร CMA ของกลุ่มควบคุมและสารสกัดจากกะเพราที่แยกคอลัมน์ด้วย น้ำกลั่น เอทานอล 25% 50% 75% 100% และอะซิโตน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 แสดงผลของอัตราการยับยั้ง CMA ของกลุ่มควบคุมและสารสกัดจากกะเพราที่แยกคอลัมน์ด้วย น้ำกลั่น เอทานอล 25% 50% 75% 100% และ อะซิโตน

จากผลการทดลองสรุปได้ว่า สารสกัดจากกะเพราสามารถยังยั้งการก่อตัวของ CMA และ CML ได้ โดยค่าที่ได้แสดงถึงการยับยั้งการก่อตัวของ CML และ CMA ได้ดีกว่าตัวควบคุมเชิงบวก เมื่อเทียบงานวิจัยของ กัญญาณัฐ (2020) ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านไกลเคชั่นของกะเพราในหลอดทดลองด้วยวิธี BSA glycation assay ในตัวทำละลายเอทานอล 70% แสดงฤทธ์ต้านไกลเคชั่นได้ดี ซึ่งมีความสามารถสูงกว่าสารมาตรฐาน AG หรือตัวควบคุมเชิงบวกเช่นกัน สารประกอบที่คาดว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการก่อตัวของ CML และ CMA จากใบกะเพราในการทดลองนี้ คือ สารฟลาโวนอยด์และฟีนอลิค เนื่องจากมีวิจัยกล่าวถึงฤทธ์การต้านไกลเคชั่นจากพืชชนิดอื่น เช่น เห็ดหลินจือ (Meng, 2011) และใบตู้จ้ง (Hikari et al., 2016) จึงอาจเป็นสารสำคัญที่ทำให้กะเพราสามารถยับยั้งการก่อตัวของ CML และ CMA ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการทดลองสกัดสารสกัดจากพืช 10 ชนิดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 30% และ 60% เพื่อทดสอบการยับยั้งการสร้าง N^{ε}-(carboxymethyl) lysine (CML) และ N^{ω} -(carboxymethyl) arginine (CMA) จากสารสกัดของพืชสวนครัว ตามวิธีการทดลองที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น ผลพบว่าจากสารสกัดทั้ง 10 ชนิด ผลของกะเพรา กระเทียม และสะระแหน่ ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 60% อัตราการก่อตัวของ CML มีค่าต่ำกว่า DW Day7 และมีค่าต่ำกว่าตัวควบคุม AG แสดงว่ามีฤทธิ์การยับยั้งการสร้าง CML ได้ โดยผลของกะเพราที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 60% สามารถยับยั้งการสร้าง CML ได้ดีที่สุดโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ 0.559 และมีอัตราการสร้าง CML อยู่ที่ 91% ซึ่งต่ำกว่าตัวควบคุมเชิงลบ Day7 อยู่ 9% เมื่อนำสารสกัดจากกะเพราที่สกัดด้วยเอทานอล 60% มาทดสอบการยับยั้ง CML และ CMA ต่อด้วยการแยกคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายต่างๆ ตามวิธีการทดลองที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น ผลพบว่า ที่ตัวทำละลายแต่ละความเข้มข้นมีอัตราการก่อตัวของ CML และ CMA ต่ำมากแสดงถึงความสามารถในการยับยั้งการสร้างสาร CML และ CMA ของสารสกัดจากใบกะเพราได้อย่างดี ซึ่งที่ Fraction ตัวทำละลายเอทานอล 25% แสดงผลการยับยั้งได้ดีที่สุด โดย CML วัดค่าการดูดกลืนแสงได้ 0.225 และมีอัตราการก่อตัวของ CML อยู่ที่ 27% ซึ่งต่ำกว่าตัวควบคุมเชิงลบ Day7 อยู่ 73% และ CMA วัดค่าการดูดกลืนแสงได้ 0.102 และมีอัตราการก่อตัวของ CMA อยู่ที่ 1% ซึ่งต่ำกว่าตัวควบคุมเชิงลบ Day7 อยู่ 99% จากผลที่ได้ในงานวิจัยนี้สามารถนำไปหาสารสำคัญของกะเพราที่มีฤทธิ์ยับยั้ง AGEs โดยวิธี HPLC เพื่อนำไปพัฒนาเป็นอาหารเสริมสุขภาพได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิด N^{ε}- (carboxymethyl) lysine (CML) และ N^{ω} -(carboxymethyl) arginine (CMA) เพิ่มเติม
2. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับสารสกัดของพืชทั้ง 10 ชนิด ด้วยตัวทำละลายชนิดอื่นๆ เนื่องจากตัวทำละลายชนิดที่แตกต่างกันอาจสกัดองค์ประกอบทางเคมีอื่นๆในพืชได้ต่างกัน
3. ควรมีการวิเคราห์ HPLC เพื่อค้นหาสารออกฤทธิ์ที่น่าสนใจอื่นๆ
4. อาจเปลี่ยนวิธีการสกัดไปใช้วิธีอื่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

Anonymous. 2551. โหระพา คุณค่าที่มากกว่าความอร่อย. [Online]. เข้าถึงได้จาก https://www.doctor.or.th/article/detail/582

PANITSARA.S. รู้จักงานด้าน ELISA. 2563. [Online]. เข้าถึงได้จาก https://www.anhsci.com/รู้จักงานด้าน-elisa/

Hongthong rich. 2560. ต้นหอม : ประโยชน์และสรรพคุณที่ได้จากต้นหอมต้านมะเร็ง. [Online]. เข้าถึงได้จาก https://www.hongthongrice.com/life/blog/healthy_article/scallion/

Pubchem. 2564. N^{ε}-(carboxymethyl) lysine. [Online]. เข้าถึงได้จาก https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/123800

PANITSARA.S. 2563. รู้จักงานด้าน ELISA. [Online]. เข้าถึงได้จาก https://www.anhsci.com/รู้จักงานด้าน-elisa/

Rspg.or.th. 2566. กลุ่มยาแก้ท้องขึ้น ท้องอืด ท้องเฟ้อ โหระพา. [Online]. เข้าถึงได้จาก http://www.rspg.or.th/plants_data/herbs/herbs_06_10.htm

THAI-THAIFOOD. พริกขี้ฟ้า. [Online]. เข้าถึงได้จาก https://www.thai-thaifood.com/th/พริกขี้ฟ้า/

นิวทริไลท์. 2566 กระเทียม สมุนไพรที่ให้ประโยชน์ทางยา. [Online]. เข้าถึงได้จาก https://nutrilite.co.th/th/article/garlic

บิวตี้ คอสเมต. 2564. วิธีสกัดสมุนไพรเข้มข้นทำได้อย่างไร. [Online]. เข้าถึงได้จาก https://www.beautycosmet.com/cream-supplements/how-to-herbal-extraction-method/

รศ.ดร.สุธาทิพ ภมรประวัติ. 2551. ประโยชน์ของกะเพรา "ราชินีสมุนไพรที่ใช้ได้ทั้งกับร่างกาย และจิตใจ". [Online]. เข้าถึงได้จาก https://www.tcc-chaokoh.com/kitchens/nutrition_center/view/17

สวนสุขภาพอรุน. 2564. AGEs (Advanced glycation end products) สารเร่งความชรา. [Online]. เข้าถึงได้จาก http://arunhealthgarden.com/ahg_ages/4964/

สำนักงานข้อมูลสมุนไพร. 2559. วิธีการสกัดสมุนไพรต่างๆโดยการ evaporation. [Online]. เข้าถึงได้จาก ถาม-ตอบ (mahidol.ac.th)

สำนักงานข้อมูลสมุนไพร. 2559. การสกัดสาร. [Online]. เข้าถึงได้จาก ถาม-ตอบ (mahidol.ac.th)

สำนักงานเกษตรและสหกรณ์ จังหวัดสุรินทร์. 2563. พืชสมุนไพรต้นหอม. [Online]. เข้าถึงได้จาก https://www.opsmoac.go.th/surin-local_wisdom-preview-422891791860

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กาญจนา จันทร์สิงห์. 2566. ขี้นฉ่าย. [Online]. เข้าถึงได้จาก https://arit.kpru.ac.th/ap2/local/?nu=pages&page_id=1580&code_db=610010&code_type=01

ศิริวัลย์ สร้อยกล่อม. 2566. หลักการสกัดสาระสำคัญจากพืชสมุนไพร. [Online]. เข้าถึงได้จาก https://www3.rdi.ku.ac.th/cl/knowledge/2563/Herbal_extract.pdf

เมดไทย. 2563. ผักชี สรรพคุณและประโยชน์ของผักชี 37 ข้อ. [Online]. เข้าถึงได้จาก https://medthai.com/ผักชี/

เมดไทย. 2563. ผักชีลาว สรรพคุณและประโยชน์ของผักชีลาว 35 ข้อ. [Online]. เข้าถึงได้จาก https://medthai.com/ผักชีลาว/

เมดไทย. 2563. พริกชี้ฟ้า สรรพคุณและประโยชน์ของพริกชี้ฟ้า 22 ข้อ. [Online]. เข้าถึงได้จาก https://medthai.com/พริกชี้ฟ้า/

เมดไทย. 2563. หอมแดง สรรพคุณและประโยชน์ของหอมแดง 50 ข้อ. [Online]. เข้าถึงได้จาก https://medthai.com/หอมแดง/

เมดไทย. 2563. สะระแหน่ สรรพคุณและประโยชน์ของสะระแหน่ 41 ข้อ. [Online]. เข้าถึงได้จาก https://medthai.com/สะระแหน่/

เมดไทย 2563. กะเพรา สรรพคุณและประโยชน์ของกะเพรา 29 ข้อ. [Online]. เข้าถึงได้จาก https://medthai.com/กะเพรา/

เมดไทย. 2563. ขึ้นฉ่าย สรรพคุณและประโยชน์ของขึ้นฉ่าย 42 ข้อ. [Online]. เข้าถึงได้จาก https://medthai.com/ขึ้นฉ่าย

ThaiHealth. 2562. สารต้านอนุมูลอิสระในผักพื้นบ้าน. [Online]. เข้าถึงได้จาก https://resourcecenter.thaihealth.or.th/article/สารต้านอนุมูลอิสระในผักพื้นบ้าน

Hongthong rich. 2560. ต้นหอม : ประโยชน์และสรรพคุณที่ได้จากต้นหอมต้านมะเร็ง. [Online]. เข้าถึงได้จาก https://www.hongthongrice.com/life/blog/healthy_ article/scallion/

ชมนาด สิงห์หันต์, ไมตรี สุทธจิตต์. 2560. การยับยั้งออกซิเดชั่นและไกลเคชั่นในโรคเบาหวานโดยผักพื้นบ้านไทย. วารสารมหาวิทยาลัยนเรศวร. (25)3: 3-4.

Pharrunrat Tanaviyutpakdee. 2016. Glycation and Human Diseases Development. วารสารพิษวิทยาไทย. 31(2): 84-96.

ดร.นิจศิริ เรืองรังสี และธวัชชัย มังคละคุปต์. 2558. หนังสือสมุนไพรไทย เล่ม 1. “พริกชี้ฟ้า (Prik Chi Fa)”. หน้า 191.

เภสัชกรหญิง จุไรรัตน์ เกิดดอนแฝก. หนังสือสมุนไพรบำบัดเบาหวาน. “พริกชี้ฟ้า”. หน้า 112-113.

ปิยรัตน์ นามเสนา. 2557. คุณสมบัติการยับยั้งเชื้อรา *Alternaria brassicicola* ของสารสกัดหยาบจากใบพืช. สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ณัฐา จริยภมรกุร. 2553. คุณสมบัติของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งปฏิกิริยาการไกลเคชั่น. วารสารวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเภสัชวิทยาทางสัตวแพทยศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สุวดี โพธิ์วิจิตร, ปิยานี รัตนชำนอง, อุดมลักษณ์ มาตย์สถิต และ วีระศักดิ์ อัศววงศ์อารยะ. 2562. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ของสาร สกัดจากสมุนไพรไทยพื้นบ้านสะค้านและมะแขว่นในเขตท้องถิ่นภาคเหนือ. Journal Rajamangala University of Technology Thanyaburi. 2651-2289: 28-29.

Alethia, M, Abraham, H, Rosa, M, Efren, V. และ Daphne, E. 2018. In Vitro Inhibitory Activity of Acca sellowiana Fruit Extract on End Products of Advanced Glycation. Journal Diabetes Ther. 9: 69–74.

Alethia, M, Efren, V, Daphne, E. and Lizette, Z. 2018. Antioxidant Activity and In Vitro Antiglycation of the Fruit of *Spondias purpurea.* Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 5613704: 3-5.

Gutierrez, M and Gutierrez, E. 2020. Glucopyranoside flavonoids isolated from leaves of *Spinacia oleracea* (spinach) inhibit the formation of advanced glycation end products (AGEs) and aldose reductase activity (RLAR). 110299: 2-3.

Hikari Sugawa, Rei-ichi Ohno, Jun-ichi Shirakawa, Akari Nakajima, Amane Kanagawa, Tetsuya Hirata, Tsuyoshi Ikeda, Narumi Moroishi, Mime Nagai and Ryoji Nagai 2016. Eucommia ulmoides extracts prevent the formation of advanced glycation end products. 001563: 1-4.

Ho-Young, P, Mi-jin, O, Yongkon, P. and Yoonsook, K. 2020 N^{ε}-(carboxymethyl)lysine formation from the Maillard reaction of casein and different reducing sugars. Journal Food Science and Technology. 29(4): 1.

Luc, S, Lionel, S, Patricia, B, Bach, D, Sylvie, M, Pascal, R, Denis, S. and Séverine, D. 2013. Tuning a 96-Well Microtiter Plate Fluorescence-Based Assay to Identify AGE Inhibitors in Crude Plant Extracts. Journal Molecules. 181114320: 2.

Sohyun, Y, Minkyung, K, Seoungwoo, S, Jieun, W, Dahee, S, Dehun, R, Jiseon, Y, Deokhoon, P. and Eunsun, J. 2022. Effect of Cirsium japonicum Flower Extract on Skin Aging Induced by Glycation. Journal Molecules. 27(7): 8-9.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Vítor, S. and Paula, C. 2021. Assessing the In Vitro Inhibitory Effects on Key Enzymes Linked to Type-2 Diabetes and Obesity and Protein Glycation by Phenolic Compounds of Lauraceae Plant Species Endemic to the Laurisilva Forest. Journal Molecules. 26072023: 7-9.

Bry L, Chen PC, Sacks DB. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin. Clin Chem 2001; 47(2): 153-63.

Odjakova M, Popova E, Sharif MA, et al. Plant-derived agents with anti-glycation activity. In: Stefana P, ed. Glycosylation. Bulgaria: INTECH, Inc., 2012: 223-56.

Contreras, CL and Novakofski, KC. 2010. Dietary Advanced Glycation End Products and Aging.Nutrients. 2: 1247-1265.

Meng G, Zhu H, Yang S, et al. Attenuating effects of Ganodermalucidum polysaccharides on myocardial collagen cross-linking relates to advanced glycation end product and antioxidant enzymes in high- fat-diet and streptozotocin-induced diabetic rats. Carbohydr Polym 2011; 84: 180-5.

Juwen Wu, Chiu Lansieh, Hsiao Yunwang and Chen Huiyin, 2009. Inhibitory effects of guava (Psidium guajava L.) leaf extracts and its active compounds on the glycation process of protein. 113(1):78-74

Kanyanath Piumngam. 2020. In vitro Study of Antioxidant, Anti-glycation and Anti-inflammatory Effects of Thai Medicinal Plants for Diabetic Patients. J Med Tech Assoc Thailand, Vol. 48

Bora, K.S., Arora, S., and Shri, R. (2011). Role of Ocimum basilicum L. in prevention of ischemia and reperfusion-induced cerebral damage, and motor dysfunctions in mice brain. Journal of Ethnopharmacology. 137: 1360-1365.

Jeba, R.C., Vaidyanathan, R., and Rameshkumar, G. (2011). Efficacy of Ocimum basilicum for immunomodulatory activity in Wistar albino rat. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 3: 199-203.

Rajeswara Rao, B. R. (1999). Biomass and essential oil yield of cornmint (Mentha arvensis L. f. piperascens Malinvaud ex Holmes) planted in different months in semi-arid tropical climate. Ind. Crop. Prod. 10: 107-113.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารสกัด

ก1. การเตรียมสารสกัดผักสวนครัวในตัวทำละลาย

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง (0.5 กรัม สำหรับตัวอย่างแห้ง หรือ 1 กรัม สำหรับตัวอย่างเปียก)
2. เติมเอทานอลลงไป 10 มล. (ความเข้มข้นอาจเปลี่ยนแปลงได้ตั้งแต่ 0-100%)

ตารางที่ ก.1 การเตรียมสารตัวทำละลายเอทานอล 30% และ 60%

ความเข้มข้นของตัวทำละลายเอทานอล (เปอร์เซ็นต์)	ตัวทำละลายเอทานอล (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
30	30	70
60	60	40

3. บ่มในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิห้องในขวดปิดฝา
4. กรองและเก็บส่วนเหนือตะกอน เก็บสารสกัดที่อุณหภูมิ -20 °C
5. (ทางเลือก) ระเหยภายใต้สุญญากาศเพื่อลดปริมาณตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ขั้นตอนการทดสอบการยับยั้งสาร CML

ข1. การเตรียมสารในขั้นตอนการก่อตัวของ AGEs

ข1.1 เตรียม 200 mM K-PO_4 buffer pH 7.2

ชั่ง KH_2PO_4 13.61 กรัม มาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 400 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH 7.2 ด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ปรับปริมาตรขั้นสุดท้ายเป็น 500 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

ข1.2 เตรียม 25 มิลลิลิตร ของ 0.4% Gelatin และ 60 mM ribose ใน K-PO4 buffer

1. ชั่งเจลาติน 0.1 กรัม ละลายในบัฟเฟอร์ K-PO_4 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร และกรองผ่าน Filtered 0.45 ไมโครเมตร
2. ชั่งไรโบส 0.225 กรัม ละลายในบัฟเฟอร์ K-PO_4 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร และกรองผ่าน Filtered 0.45 ไมโครเมตร
3. ผสม เจลาติน 25 มิลลิลิตร และไรโบส 25 มิลลิลิตร จะได้เป็น Solution A : 50 มิลลิลิตร

ข1.3 เตรียม 1 มิลลิลิตร ของ 100 มก./มล. Aminoguanidine (AG) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก

1. ชั่ง AG 100 มิลลิกรัม เติมน้ำ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
2. เจือจาง 10 และ 100 เท่า ให้เป็น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

ข.2 ปฏิกิริยา (เพิ่มขึ้น 3 เท่า) ในหลอดทดลองปลอดเชื้อ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

- ผสมสารละลาย A 495 ไมโครลิตร + น้ำปราศจากเชื้อ 5 ไมโครลิตร (ควบคุมเชิงลบ) 2 ชุด
- ผสมสารละลาย A 495 ไมโครลิตร + AG 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 5 ไมโครลิตร (ควบคุมเชิงบวก)
- ผสมสารละลาย A 495 ไมโครลิตร + AG 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 5 ไมโครลิตร (ควบคุมเชิงบวก)
- ผสมสารละลาย A 495 ไมโครลิตร + สารสกัด 5 ไมโครลิตร (ชุดทดสอบ)
- นำมาผสมด้วยเครื่องผสมสาร (Votex) และนำมาปั่นตก (spindown) ที่ 12,000 rpm 5 นาที
- นำชุดควบคุมเชิงลบ เก็บที่ -20 องศสชาเซลเซียส (เป็นการหยุดการก่อตัวของ AGEs

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเริ่มการทดลอง)

- ชุดทดสอบที่เหลือนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ไม่เขย่า)
- เมื่อบ่มครบเวลา เก็บที่ -20 องศสชาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

ข3. การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในการตรวจหา AGEs โดย ELISA

ข3.1 เตรียม 1*X* PBS (1 ลิตร) pH 7.4

ชั่ง Sodium Chloride (NaCl)	8	กรัม
Potassium Chloride (KCl)	0.2	กรัม
Disodium Hydrogenphosphate (Na_2HPO_4)	1.44	กรัม
Potassium Dihydrogenphosphate (KH_2PO_4)	0.245	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร จากนั้นเก็บไว้ที่อุณภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ข3.2 การเตรียม substrate buffer

solution 1 : กรดซิตริก 2.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

solution 2 : โซเดียมฟอสเฟส 7.16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร

ไทเทรต Solution 1 pH 5.0 โดยใช้ Solution 2 จะได้เป็น substrate buffer เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซสเซียส

ข3.3 การเตรียม washing buffer

ผสม 1*X* PBS 1 ลิตร + Tween 20 500 ไมโครลิตร จะได้เป็น washing buffer

ข4. การตรวจหา AGEs โดย ELISA

ข4.1 เจือจางตัวอย่างในไมโครเพลต

1. นำตัวอย่างในหลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตร ที่แช่แข็งไว้มาวางให้หายเย็นก่อนเริ่มทำการเจือจาง

2. เริ่มทำการเจือจาง 10 เท่า โดยนำตัวอย่างในหลอดมา ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และ PBS 190 ไมโครลิตร หยดลงในไมโครเพลต ผสมให้เข้ากันกัน

3. จากนั้นเจือจางต่อจาก 10 เท่า เป็น 20 เท่า โดยปิเปตจากหลุมที่เจือจาง 10 เท่ามา ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ PBS 180 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

ข5. ELISA Plate

1. ปิเปตตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 20 เท่า ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในเพลต ELISA บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง

2. เติม 0.5% เคซีนไฮโดรไลซ์ 200 ไมโครลิตร (ชั่ง เคซีนไฮโดรไลซ์ 0.1 กรัม ละลายใน 1*X*

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PBS 20 มิลลิลิตร) บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที เมื่อครบเวลาแล้ว เทส่วนเหนือตะกอนทิ้ง

3. ล้าง 3 ครั้ง ด้วย washing buffer หลุมละ 200 ไมโครลิตร

4. เติม 0.1 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร anti CML 100 ไมโครลิตร (ผสม IgG 1.27 ไมโครลิตร ใน washing buffer 11 มิลลิลิตร) บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที เมื่อครบเวลาแล้ว เทส่วนเหนือตะกอนทิ้ง

5. ล้าง 3 ครั้ง ด้วย washing buffer หลุมละ 200 ไมโครลิตร

6. เติม IgG ตัวที่ 2 ที่เจือจาง 5000 เท่า 100 ไมโครลิตร (ผสม IgG 2.2 ไมโครลิตร ใน washing buffer 11 มิลลิลิตร) บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที เมื่อครบเวลาแล้ว เทส่วนเหนือตะกอนทิ้ง

7. ล้าง 3 ครั้ง ด้วย washing buffer หลุมละ 200 ไมโครลิตร

8. เริ่มปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายตั้งต้น 100 ไมโครลิตรต่อหลุม (เตรียมใหม่ OPD•2HCl 5.5 มิลลิกรัม ใน substrate solution 11 มิลลิลิตร + H_2O_2 6.6 ไมโครลิตร)

9. บ่ม 4 นาที (จะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง)

10. หยุดปฏิกิริยาโดยเติม 1M H_2SO_4 100 ไมโครลิตร

11. นำเข้าเครื่อง Microplate reader อ่านค่าที่ A492

ข6. การแยกคอลัมน์

ข6.1 การเตรียมตัวอย่าง

1. ระเหยตัวอย่างให้แห้งสนิทโดยใช้เครื่องระเหยแบบหมุน (ชั่งน้ำหนักขวดคู่ก่อน) บันทึกน้ำหนักแห้งของสารสกัด

2. ละลายตัวอย่างด้วยตัวทำละลายเดิม (เอทานอล 60%) ถ่ายโอนตัวอย่างไปที่หลอดทดลองที่เตรียมไว้

3. หมุนเหวี่ยงเพื่อกำจัดเศษที่อาจอุดตันคอลัมน์ในกระบวนการต่อไป

ข6.2 เตรียมตัวทำละลาย

1. เตรียมน้ำกลั่น ประมาณ 180 มิลลิลิตร เอทานอลที่ความเข้มข้น 25% 50%, 75% และ 100% อย่างละ 54 มิลลิลิตร และ อะซิโตน 100% 54 มิลลิลิตร

2. จากนั้นนำสารละลายไปทำการไล่แก๊สด้วยแรงดันต่ำ จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะใช้งาน

ข6.3 การบรรจุคอลัมน์และการปรับสมดุล

1. เติมน้ำที่กรองผ่าน filtered 0.45 ไมโครเมตร 0.5 CV (9 มิลลิลิตร)
2. ใช้สำลีบางๆอุดที่ด้านล่างของคอลัมน์ จากนั้นเทเรซินตามลงไป
3. จากนั้นล้างให้สะอาดโดยการเติมน้ำลงไป 3 CV (54 มิลลิลิตร) หยุดบรรจุเมื่อผิวเรซินอยู่ต่ำกว่าด้านบนของคอลัมน์อยู่ประมาณ 3-5 เซนติเมตร ตรวจสอบให้แน่ใจว่าการไหลเป็นแบบหยดต่อหยด

เอกสารนี้เป็นลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ห้ามทำซ้ำ ดัดแปลง หรือนำไปใช้ในการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น ทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ล้างคอลัมน์ด้วยน้ำที่ผ่านการไล่แก๊สแล้ว 3-5 CV ตอนนี้คอมลัมน์พร้อมใช้งานแล้ว

ข6.4 การโหลดตัวอย่าง

ค่อยๆหยดสารสกัดลงไปในคอลัมน์ ใช้ขวดสำหรับเก็บตัวอย่างรองไว้ด้านล่าง เปิดวาล์วให้ตัวอย่างค่อยๆหยดลงไปพร้อมทั้งล้างคอลัมน์ด้วย 25%, 50%, 75%, 100% EtOH และ อะซิโตน 100% อย่างละ 54 มิลลิลิตร จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้แต่ละความเข้มข้น ไประเหยแห้งและทำการทดสอบ AGEs อีกครั้ง

ข6.5 การฟื้นฟูคอลัมน์

ล้างคอลัมน์ที่ใช้แล้วด้วยน้ำ 3 CV (54 มิลลิลิตร) เรซินพร้อมสำหรับการคัดแยกในรอบถัดไปหรือล้างคอลัมน์ด้วย 20% EtOH 3 CV เพื่อเก็บเรซินในระยะยาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ตารางแสดงค่าการดูดกลืนแสง และเปอร์เซ็นต์การก่อตัวของ CML

ตารางที่ ค.1 แสดงผลของการก่อตัวของ CML ในตัวควบคุมเชิงบวกและตัวควบคุมเชิงลบโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร

ตัวควบคุม	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 492 นาโนเมตร	เปอร์เซ็นต์การก่อตัวของ CML
DW 0 Day	0.088	0
DW 7 Day	0.607	100
AG 1	0.617	102
AG 10	0.638	106

ตารางที่ ค.2 แสดงผลของการก่อตัวของ CML ในสารสกัดจากผักสวนครัวทั้ง 10 ชนิดในตัวทำละลายเอทานอล 30% และเอทานอล 60% โดยวิธี ELISA และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร

สารสกัด	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 492 นาโนเมตร		เปอร์เซ็นต์การก่อตัวของ CML	
	30%	60%	30%	60%
กระเทียม	0.735	0.598	124	98
ผักชีลาว	0.665	0.617	111	102
โหระพา	0.618	0.610	102	101
พริกขี้ฟ้า	0.703	0.599	118	98
ต้นหอม	0.691	0.625	116	103
กะเพรา	0.636	0.559	106	91
สะระแหน่	0.686	0.591	115	97
หอมแดง	0.655	0.630	109	104
ผักชี	0.653	0.633	109	105

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.3 แสดงผลการก่อตัว CML ของตัวควบคุมเชิงบวกและตัวควบคุมเชิงลบเพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้ง CML ของกะเพราในตัวทำละลายเอทานอล 60% ที่ คัดเลือก

ตัวควบคุม	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 492 นาโนเมตร	เปอร์เซ็นต์การก่อตัวของ CML
DW 0 Day	0.090	0
DW 7 Day	0.915	100
AG 1	0.896	98
AG 10	0.982	108

ตารางที่ ค.4 แสดงผลการยับยั้งการก่อตัวของ CML ของกะเพราในตัวทำละลาย 60% หลังการแยกคอลัมน์ให้เป็นสารบริสุทธิ์แล้ว

Fraction สารสกัดกะเพรา 60%	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 492 นาโนเมตร	เปอร์เซ็นต์การก่อตัวของ CML
น้ำกลั่น	0.584	60
Ethanol 25%	0.315	27
Ethanol 50%	0.569	58
Ethanol 75%	0.874	95
Ethanol 100%	0.909	99
Acetone	0.909	99

ตารางที่ ค. 5 แสดงผลการก่อตัว CMA ของตัวควบคุมเชิงบวกและตัวควบคุมเชิงลบเพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้ง CMA ของกะเพราในตัวทำละลายเอทานอล 60% ที่คัดเลือก

ตัวควบคุม	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 492 นาโนเมตร	เปอร์เซ็นต์การก่อตัวของ CML
DW 0 Day	0.096	0
DW 7 Day	0.729	100
AG 1	0.746	103
AG 10	0.503	64

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.6 แสดงผลการยับยั้งการก่อตัวของ CMA ของกะเพราในตัวทำละลายเอทานอล 60% หลังการแยกคอลัมน์ให้เป็นสารบริสุทธิ์แล้ว

Fraction สารสกัดกะเพรา 60%	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 492 นาโนเมตร	เปอร์เซ็นต์การก่อตัวของ CML
น้ำกลั่น	0.167	11
Ethanol 25%	0.102	1
Ethanol 50%	0.132	6
Ethanol 75%	0.505	65
Ethanol 100%	0.707	96
Acetone	0.710	97

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

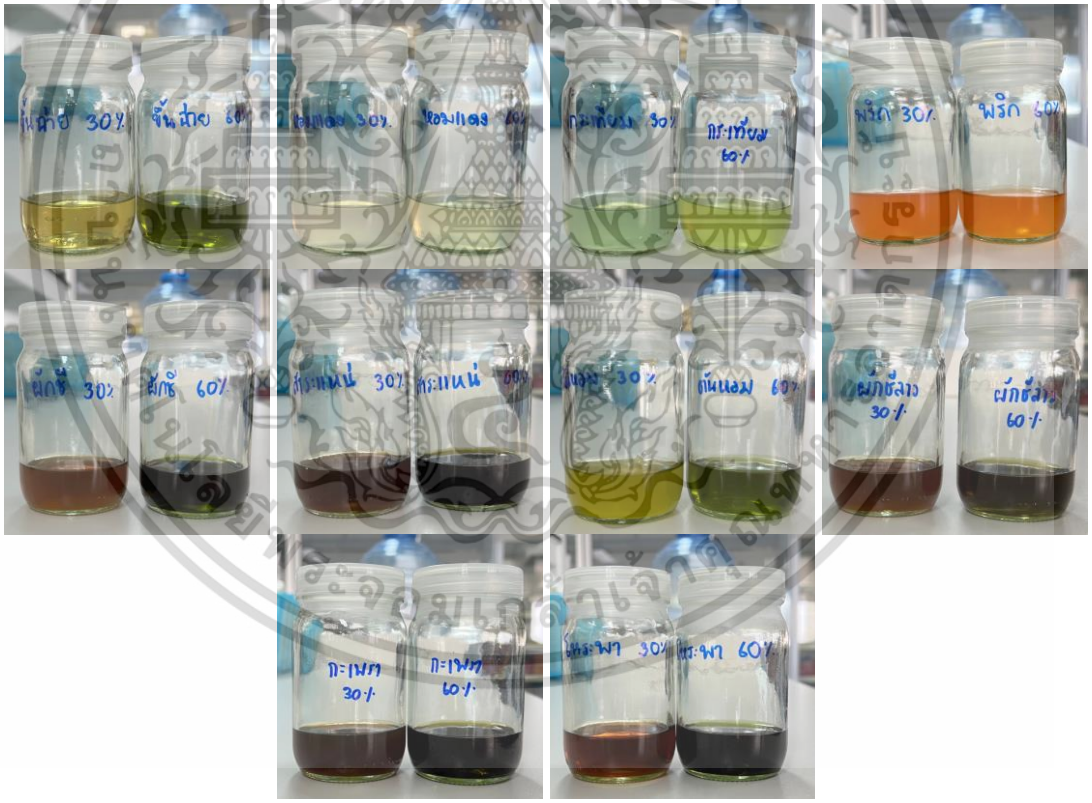
รูปการทดลอง

รูปที่ ง.1 การเตรียมตัวอย่างพืช

รูปที่ ง.2 การปั่นตัวตัวอย่างพืชด้วยเครื่องปั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ ง.3 การกรองสารสกัดด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ



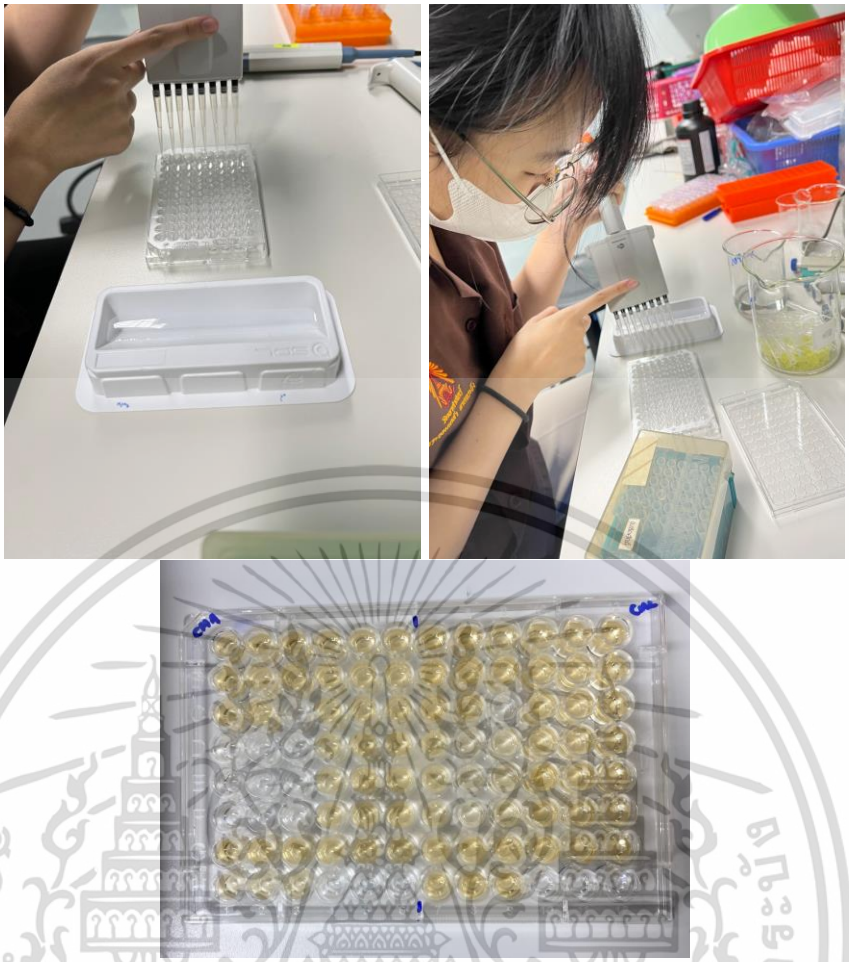
รูปที่ ง.4 สารสกัดจากพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

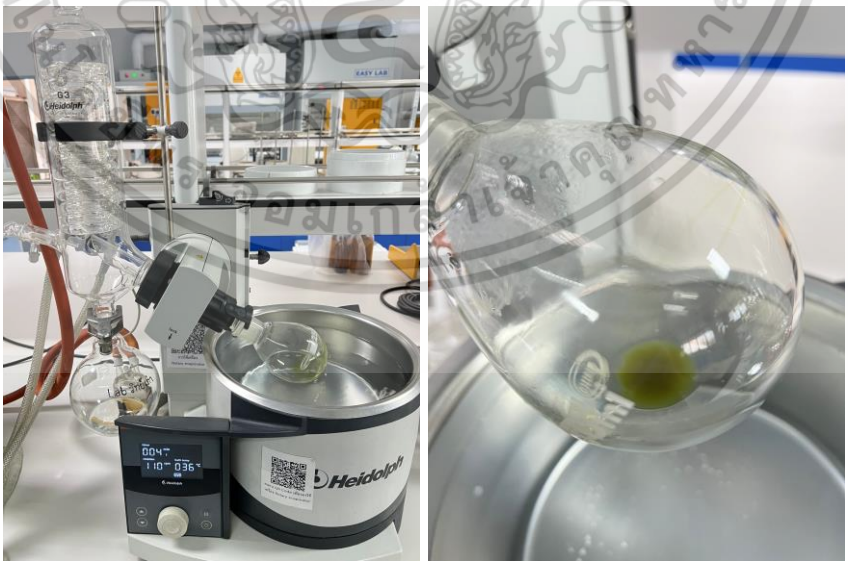
รูปที่ ง.5 ทำปฏิกิริยาการก่อตัวของ AGEs ในสารสกัด

รูปที่ ง.6 นำสารสกัดมาปั่นตกด้วยเครื่อง Spin down

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

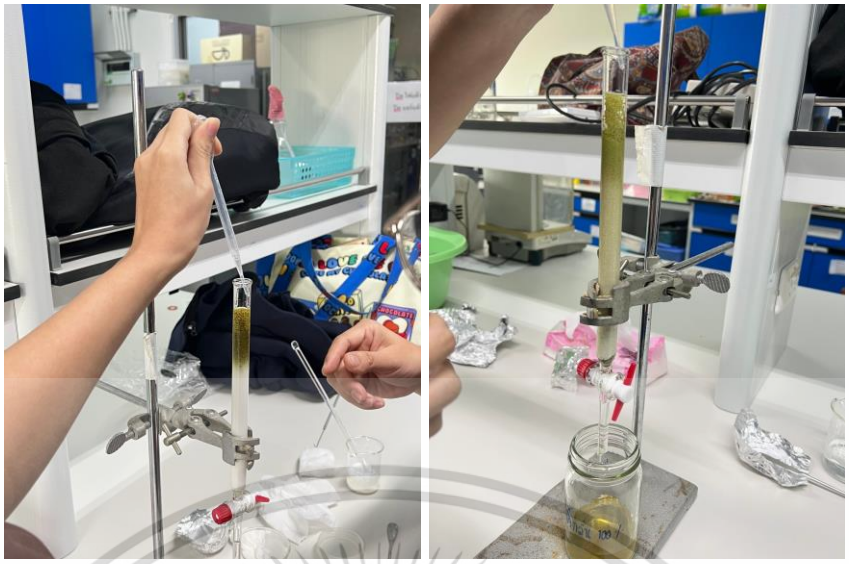


รูปที่ ง.7 ทดสอบการยับยั้ง CML ด้วยวิธี ELISA

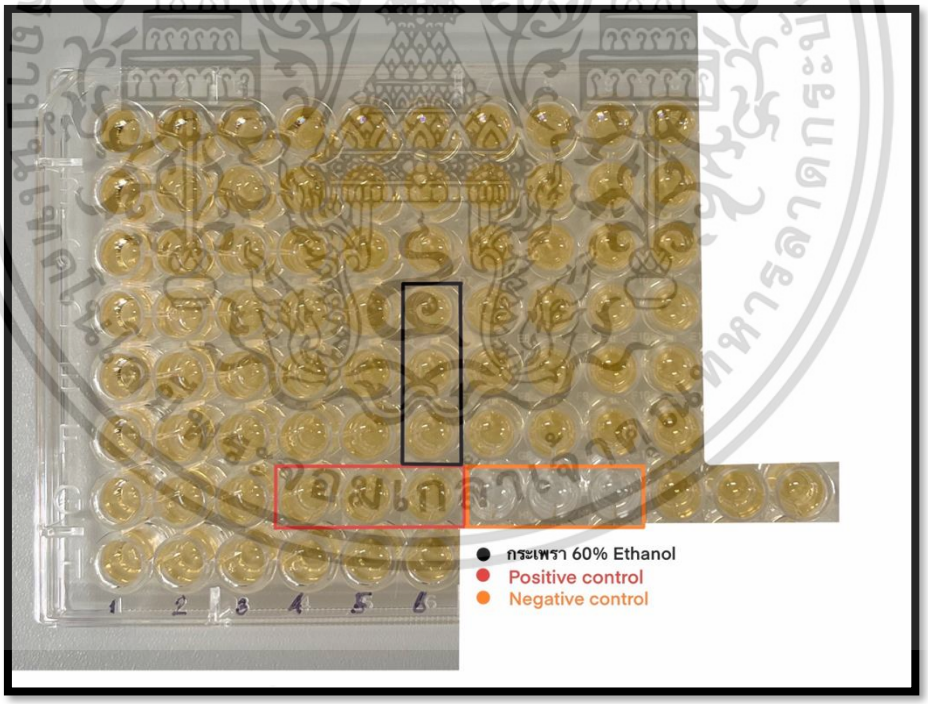


รูปที่ ง.8 การระเหยแห้งด้วยเครื่อง Rotary Evaporator

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

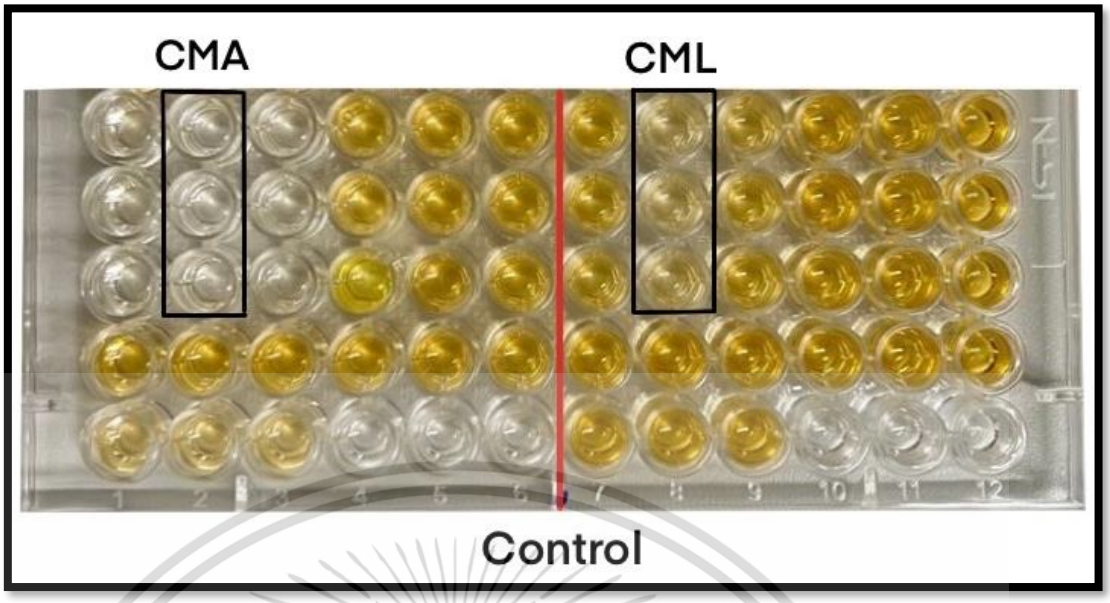


รูปที่ ง.9 การแยกคอลัมน์ของสารสกัดด้วยน้ำกลั่น, เอทานอล 25% 50% 75% 100% และ อะซิโตน 100%



รูปที่ ง.10 ELISA Plate แสดงผลการเกิดสีของกลุ่มควบคุมและสารสกัดของพืชทั้ง 10 ชนิด ต่อผลการยับยั้ง CML

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ง.11 ELISA plate แสดงผลการเกิดสีของตัวควบคุมและสารสกัดจากกะเพราในตัวทำละลาย 60% ที่ Fraction ตัวทำละลายต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

การทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOWA

การทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ IBM SPSS Statistics version 26 วิเคราะห์ผลความแปรปรวนทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง CML และ CMA โดยใช้สารสกัดจากพืชสวนครัว 10 ชนิด และตัวควบคุม ด้วย One-way ANOWA ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความแตกต่างของข้อมูลด้วยวิธี Duncan's multiple range test

ตารางจ.1 การทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง CML โดยสารสกัดจากพืชสวนครัว ที่ตัวทำละลายเอทานอล 30% และ เอทานอล 60% โดยการทดสอบ ELISA

Duncan[a]

		Subset for alpha = 0.05								
Sample	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9
DW0	3	.0880								
กะเพรา 60%	3		.5587							
สะระแหน่ 60%	3		.5910	.5910						
กระเทียม 60%	3		.5977	.5977	.5977					
พริกขี้ฟ้า 60%	3		.5987	.5987	.5987					
DW7	3		.6070	.6070	.6070	.6070				
โหรพา 60%	3		.6097	.6097	.6097	.6097				
ขิ้นฉ่าย 60%	3		.6153	.6153	.6153	.6153				
ผักชีลาว 60%	3		.6170	.6170	.6170	.6170				
AG1mg	3		.6173	.6173	.6173	.6173				
โหรพา 30%	3		.6183	.6183	.6183	.6183				
ต้นหอม 60%	3			.6250	.6250	.6250				
หอมแดง 60%	3			.6297	.6297	.6297	.6297			
ผักชี 60%	3			.6327	.6327	.6327	.6327	.6327		
กะเพรา 30%	3			.6357	.6357	.6357	.6357	.6357		
AG10mg	3			.6383	.6383	.6383	.6383	.6383		
ขิ้นฉ่าย 30%	3			.6427	.6427	.6427	.6427	.6427		
ผักชี 30%	3				.6530	.6530	.6530	.6530	.6530	
หอมแดง 30%	3				.6553	.6553	.6553	.6553	.6553	
ผักชีลาว 30 %	3					.6653	.6653	.6653	.6653	
สะระแหน่ 30%	3						.6860	.6860	.6860	.6860
ต้นหอม 30%	3							.6907	.6907	.6907
พริกขี้ฟ้า 30%	3								.7033	.7033
กระเทียม 30%	3									.7350
Sig.		1.000	.052	.100	.067	.063	.064	.057	.088	.084

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่จ.2 การทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการทดสอบ CML โดยใช้สารสกัดจากกะเพรา 60% ที่แยกคอลัมน์และนำไปทดสอบ ELISA

Duncan[a]

		Subset for alpha = 0.05				
A492	N	1	2	3	4	5
DW0	3	.0903				
25%	3		.3150			
50%	3			.5693		
น้ำกลั่น	3			.5847		
75%	3				.8737	
AG1	3				.8957	.8957
100%	3				.9087	.9087
Acetone	3				.9087	.9087
DW7	3				.9150	.9150
AG10	3					.9820
Sig.		1.000	1.000	.720	.389	.079

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่จ.3 การทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการทดสอบ CMA โดยใช้สารสกัดจากกะเพรา 60% ที่แยกคอลัมน์และนำไปทดสอบ ELISA

Duncan[a]

		Subset for alpha = 0.05		
A492	N	1	2	3
DW0	3	.0960		
25%	3	.1017		
50%	3	.1323		
น้ำกลั่น	3	.1670		
AG10	3		.5003	
75%	3		.5053	
100%	3			.7067
Acetone	3			.7097
DW7	3			.7297
AG1	3			.7467
Sig.		.268	.931	.530

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
คำรับรองเล่มโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา

วันที่.....15.....เดือน...มิถุนายน...พ.ศ..2566...

ข้าพเจ้า	นางสาวณัฐกานต์	กล่อมจอหอ	รหัสประจำตัว	62050487
	นางสาวอภิสรา	ประเคน	รหัสประจำตัว	62050559

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชา ชีววิทยา ขอรับรองว่า โครงงานพิเศษ เรื่อง

ชื่อภาษาไทย การศึกษาฤทธิ์การยับยั้ง N^{ε} – (carboxymethyl) lysine (CML) และ N^{ω} - (carboxymethyl) arginine (CMA) โดยใช้สารสกัดจากพืชสวนครัว

ชื่อภาษาอังกฤษ Inhibition N^{ε} – (carboxymethyl) lysine (CML) and N^{ω} - (carboxymethyl) arginine (CMA) Formation by using Thai garden plants

ปีการศึกษา 2565

เป็นผลงานวิจัยที่มิได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษาฉบับสมบูรณ์แล้ว

โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์.....4.43.....%

ลงชื่อ.....ณัฐกานต์ กล่อมจอหอ.....
(ณัฐกานต์ กล่อมจอหอ)
นักศึกษา

ลงชื่อ.....อภิสรา ประเคน.....
(อภิสรา ประเคน)
นักศึกษา

ข้าพเจ้า ผศ.ดร.วิภาวี เดชติศักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ได้ตรวจสอบโครงงานพิเศษของนักศึกษาข้างต้นแล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ.....

(ผศ.ดร.วิภาวี เดชติศักดิ์)
อาจารย์ที่ปรึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้