



รายงานการวิจัย

คุณสมบัติสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดโหระพาไทย
(Bioactive Properties of Thai Basil Extract)



ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

คุณสมบัติสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดโหระพาไทย
(Bioactive Properties of Thai Basil Extract)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผศ.ดร.รัชฎาพร อุ่นศิริไทย์

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

1. รศ.ดร.อนามัย เทศกะทีก

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2557
ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ตุลาคม 2561

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์เครื่องมือ 3, 9 และ 10 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีทุกท่านที่เสียสละเวลา ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกแก่ผู้วิจัยด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณนักศึกษาปริญญาเอกและโท สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่อำนวยความสะดวกให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัย

ขอบคุณพ่อค้าแม่ค้าตลาดสุรนคร สำหรับวัตถุดิบโหระพาเพื่อใช้ในการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ

2557



บทคัดย่อ

โหระพาไทยสายพันธุ์ *thrysiflorum* และ Jumbo 4320 ได้ถูกนำมาสกัดด้วยน้ำ เอทานอล และเอทิลอะซิเตท จากการตรวจสอบสารพฤกษเคมีของสารสกัดโหระพาไทยทั้งสองสายพันธุ์ พบว่า สารสกัดโหระพาไทยมีสารพฤกษเคมีคือ คลอโรฟิลล์ แครโทีนอยด์ และสารประกอบฟีนอลิก ผลการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC พบว่า สารสกัดเอทานอลและสารสกัดเอทิลอะซิเตท มีส่วนประกอบหลักคือ คลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี ฟิโอฟิตินเอ ฟิโอฟิตินบี และลูทีน สารสกัดเอทานอล สายพันธุ์ *thrysiflorum* มีปริมาณคลอโรฟิลล์และลูทีนสูงสุด กรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่พบคือ กรดกาแลคคาเทชิน อะพิจินิน กรดคาเฟอิก กรดคูมาริก และกรดซินแนปิก จากการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-Ciocalteu พบว่า สารสกัดน้ำสายพันธุ์ Jumbo 4320 มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุดที่ $4,596.19 \pm 3.07$ ไมโครกรัมกาแลค/กรัมวัตถุดิบ ตามด้วยสารสกัดเอทานอลและสารสกัดเอทิลอะซิเตท ตามลำดับ จากการศึกษาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด พบว่า สารสกัดเอทานอลสายพันธุ์ Jumbo 4320 มีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุดที่ $5,571.16 \pm 14.27$ ไมโครกรัมคาเทชิน/กรัมวัตถุดิบ ตามด้วยสารสกัดเอทิลอะซิเตทและสารสกัดน้ำ ตามลำดับ

ในส่วนของคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโหระพาไทย ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH, FRAP และ DCFH-DA พบว่า สารสกัดน้ำสายพันธุ์ Jumbo 4320 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH สูงสุดที่ค่า IC_{50} 48.52 ± 1.15 มิลลิกรัมวัตถุดิบ/มิลลิลิตร ตามด้วยสารสกัดเอทานอลและสารสกัดเอทิลอะซิเตท โดยสารต้านอนุมูลอิสระอ้างอิงมาตรฐาน BHT และกรดแอสคอร์บิก มีค่า IC_{50} 0.18 และ 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม สารสกัดเอทานอลสายพันธุ์ *thrysiflorum* แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP สูงสุดที่ค่า 18.64 ± 0.13 ไมโครโมล Fe^{2+} /กรัมวัตถุดิบ ตามด้วยสารสกัดน้ำและสารสกัดเอทิลอะซิเตท สารสกัดน้ำสายพันธุ์ Jumbo 4320 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดด้วยวิธี DCFH-DA ที่ความเข้มสัมพัทธ์ของสารเรืองแสง (relative fluorescence intensity) $80.62 \pm 0.00\%$ การวิเคราะห์คุณสมบัติต้านจุลินทรีย์ โดยวิธี Agar disk diffusion พบว่าสารสกัดโหระพาเกือบทั้งหมดไม่มีผลต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค มีเพียงเชื้อ *Bacillus cereus* ที่ถูกยับยั้งโดยสารสกัดเอทิลอะซิเตทสายพันธุ์ *thrysiflorum* และสารสกัดน้ำสายพันธุ์ Jumbo 4320 การวิเคราะห์คุณสมบัติต้านลิ่มเลือดของสารสกัดโหระพาไทย โดยวิธี Prothrombin time พบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทสายพันธุ์ *thrysiflorum* แสดงการยืดระยะเวลาการแข็งตัวของเลือดสูงสุดที่ 78.3 ± 17.56 วินาที การวิเคราะห์ความคงตัวต่อการย่อยของสารสกัดโหระพาไทย พบว่าสารสกัดน้ำสายพันธุ์ *thrysiflorum* แสดงค่า digestive stability% สูงสุดที่ $45.48 \pm 2.09\%$ กล่าวโดยสรุป สารสกัดโหระพาทั้งสองสายพันธุ์มีศักยภาพในการพัฒนาให้เป็นส่วนประกอบของอาหารเพื่อสุขภาพได้

Abstract

Thai basil *Ocimum basilicum* var. *thyrsoiflorum* and *Ocimum basilicum* cv. Jumbo 4320 were extracted by 3 solvents, namely water, ethanol and ethyl acetate. Phytochemical analyses of both species of Thai basil extracts revealed the presence of chlorophylls, carotenoids and phenolic compounds. HPLC analysis showed that ethanol and ethyl acetate extracts contained primarily chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, pheophytin *a*, pheophytin *b*, and lutein. *Ocimum basilicum* var. *thyrsoiflorum* ethanol extract showed the highest chlorophylls and lutein contents. The contents of the phenolic acids and flavonoids were found to be gallic acid, catechin, apigenin, caffeic acid, coumaric acid and sinapic acid. Results of total phenolic contents, evaluated by Folin-Ciocalteu method, revealed that *Ocimum basilicum* cv. Jumbo 4320 water extract showed the highest total phenolic contents at $4,596.19 \pm 3.07$ μg gallic acid equivalent/g of raw material (RM) followed by ethanol and ethyl acetate extracts. The study of total flavonoid contents revealed that *Ocimum basilicum* cv. Jumbo 4320 ethanol extract showed the highest total flavonoid content at $5,571.16 \pm 14.27$ μg catechin equivalent/g of RM followed by ethyl acetate and water extracts.

Antioxidant activities of Thai basil extracts were evaluated by DPPH, FRAP and DCFH-DA assays. *Ocimum basilicum* cv. Jumbo 4320 water extract showed the highest antioxidant activity by DPPH assay at IC_{50} 48.52 ± 1.15 mg of RM/ml followed by ethanol and ethyl acetate extracts, whereas the antioxidant controls, BHT and ascorbic acid, showed IC_{50} at 0.18 and 0.06 mg/ml, respectively. However, *Ocimum basilicum* var. *thyrsoiflorum* ethanol extract showed the highest antioxidant activity by FRAP assay at 18.64 ± 0.13 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ RM followed by water and ethyl acetate extracts. *Ocimum basilicum* cv. Jumbo 4320 water extract showed the highest cellular antioxidant activity by DCFH-DA assay at relative fluorescence intensity $80.62 \pm 0.00\%$. The antimicrobial activity was evaluated by the agar disk diffusion method. Almost all extracts had no effect on tested pathogenic strains. Only *Bacillus cereus* were inhibited by *Ocimum basilicum* var. *thyrsoiflorum* ethyl acetate extract and *Ocimum basilicum* cv. Jumbo 4320 water extract. Antithrombotic activity of Thai basil extracts was evaluated by prothrombin time assay. *Ocimum basilicum* var. *thyrsoiflorum* ethyl acetate extract showed the highest prolonged prothrombin time at 78.3 ± 17.56 seconds. Digestive stability of Thai basil extracts, it was found that *Ocimum basilicum* var. *thyrsoiflorum* water extract showed the highest digestive stability% at $45.48 \pm 2.09\%$. In conclusion, both species of Thai basil extracts showed the potential for healthy food ingredients.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	3
วิธีดำเนินการวิจัยและสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
การเตรียมวัตถุดิบ	11
การเตรียมสารสกัดโหระพาไทย	11
การศึกษาสารพฤษเคมีในสารสกัดโหระพาไทย	11
การศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโหระพาไทย	12
การศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดโหระพาไทย	14
การศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านลิ้มเลือด <i>in vitro</i> ของสารสกัดโหระพาไทย	14
การศึกษาชีวประสิทธิผลและความคงตัวของสารสกัดโหระพาไทย เมื่อผ่านแบบ	14
จำลองของระบบการย่อยอาหารในหลอดทดลอง	14
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	16
บทที่ 5 บทสรุป	36
บรรณานุกรม	38
ประวัติคณะผู้วิจัย	42

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1.1 แสดงปริมาณ phenolic compound ในส่วนของใบและลำต้นของโหระพา (sweet basil) และโหระพาไทย (Thai basil)	5
ตารางที่ 4.1 Phytochemical profile ของสารสกัดโหระพาไทย	19
ตารางที่ 4.2 Phenolics profile ของสารสกัดโหระพาไทย	20
ตารางที่ 4.3 DPPH radical scavenging activity ของสารสกัดโหระพาไทย	23
ตารางที่ 4.4 Ferric reducing antioxidant power ของสารสกัดโหระพาไทย	24
ตารางที่ 4.5 Cytotoxicity ของสารสกัดโหระพาไทย	25
ตารางที่ 4.6 Antimicrobial activity ของสารสกัดโหระพาไทย	30
ตารางที่ 4.7 Prothrombin time ของสารสกัดโหระพาไทยต่อพลาสมากระต่าย	33
ตารางที่ 4.8 ความคงตัวต่อกระบวนการย่อย (Digestive Stability) ของสารสกัดโหระพาไทย .	35



สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 4.1 Total phenolic contents ของสารสกัดโหระพาไทย	21
รูปที่ 4.2 Total flavonoid contents ของสารสกัดโหระพาไทย	22
รูปที่ 4.3 Cellular antioxidant activity (CAA) โดยใช้ DCFH-DA assay ของสารสกัด โหระพาไทย	27



บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

โรคหลอดเลือดสมองเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญและพบบ่อยของประเทศไทย เป็นสาเหตุที่สำคัญอันดับ 1 ของการเสียชีวิตในเพศหญิงและอันดับ 2 ในเพศชาย ร้อยละ 70 ของผู้ป่วยจะมีปัญหาด้านการพูด การสื่อสาร และร้อยละ 30 ของผู้ป่วยจะมีความพิการ ซึ่งต้องอาศัยการดูแลช่วยเหลือจากผู้อื่นตลอดชีวิต โรคหลอดเลือดสมองคือการสูญเสียการทำงานของสมองอันเนื่องมาจากการขัดขวางเลือดที่มาเลี้ยงสมองทั้งหมดหรือบางส่วน โรคหลอดเลือดสมองทำให้เกิดอัมพฤกษ์อัมพาต (แขนและขาอ่อนแรงครึ่งซีก) มีปัญหาทางด้านความคิด สูญเสียความจำ มีปัญหาทางด้านารพูด อารมณ์แปรปรวน การเกิดภาวะสมองขาดเลือดเป็นประสบการณ์ที่ร้ายแรงมาก ภาวะสมองขาดเลือดที่มีเนื้อสมองตายมักเกิดจากการขาดเลือดและออกซิเจนไปเลี้ยง โดยทั่วไปเกิดจากการอุดตันของหลอดเลือดแดงในสมองหรือหลอดเลือดแดงคาโรติดซึ่งเป็นหลอดเลือดแดงบริเวณคอที่นำเลือดไปเลี้ยงบริเวณสมอง ภาวะสมองขาดเลือดนี้มักเกิดจากหลอดเลือดสมองตีบ (Ischemic stroke) หรือภาวะหลอดเลือดสมองแตก (Hemorrhagic stroke) ซึ่งมักเกิดจากการที่ผนังหลอดเลือดแตกทำให้มีเลือดคั่งในเนื้อสมอง ประมาณ 1 ใน 3 ของผู้ป่วย มักมีอาการของภาวะสมองขาดเลือดชั่วคราวนำมาก่อน ลักษณะดังกล่าวมักเป็นเวลาสั้นๆ เกิดขึ้นเมื่อเลือดและออกซิเจนไหลเวียนลดลงชั่วคราว ภาวะสมองขาดเลือดชั่วคราวหรือเรียกว่า มินิ-สโตรก มีอาการเกิดขึ้นตั้งแต่ 2-3 นาที ถึงเป็นชั่วโมง เป็นสัญญาณเตือนบอกถึงความเสี่ยงในการเกิดภาวะสมองขาดเลือดเพิ่มขึ้นในอนาคต

ปัจจัยเสี่ยงต่อไปนี้จะมีผลต่อการเกิดภาวะสมองขาดเลือด คือ ความดันโลหิตสูง เป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญที่สุด หัวใจเต้นผิดจังหวะชนิด atrial fibrillation หรือ AF เป็นสาเหตุการเต้นของหัวใจที่พบบ่อยที่สุดทำให้เกิดลิ่มเลือดขึ้นไปในช่องหัวใจ เมื่อหัวใจบีบตัวลิ่มเลือดจะหลุดไปอุดตันเส้นเลือดในสมองได้, ระดับไขมันในเลือดสูงทำให้หลอดเลือดแข็งตัวมีการตีบแคบลงในที่สุด ทำให้เกิดการอุดตันได้, เบาหวาน ผู้ที่เป็นโรคเบาหวานมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดสมองสูงกว่าคนปกติ 2-4 เท่า, มีประวัติเคยเป็นโรคหลอดเลือดสมอง หรือ TIA (Transient Ischemic Attack หรือ mini stroke) จะเพิ่มความเสี่ยงมากขึ้น โดย 1 ใน 3 ของคนที่เป็นโรคหลอดเลือดสมองหรือ TIA มีโอกาสเกิดอัมพฤกษ์อัมพาตได้ภายในเวลา 5 ปี, การสูบบุหรี่ คนที่สูบบุหรี่จะมีปัจจัยเสี่ยงเพิ่มมากกว่าคนที่ไม่สูบบุหรี่ถึง 5-6 เท่า, ขาดการออกกำลังกายจะเพิ่มความเสี่ยงของการเกิดโรคหลอดเลือดสมองอุดตัน, ผู้ที่ดื่มแอลกอฮอล์มากกว่า 1-2 แก้วต่อวันจะเพิ่มความเสี่ยงของการเกิดโรคหลอดเลือดสมองแตก, อายุโรคหลอดเลือดสมองมักพบในคนอายุมากกว่า 65 ปี แต่คนที่อายุน้อยกว่านี้ก็มีโอกาสเป็นโรคนี้อีกได้, ประวัติในครอบครัว ถ้าบุคคลในครอบครัวของคุณเป็นโรคหลอดเลือดสมองมาก่อนจะเพิ่มความเสี่ยงให้คุณมากขึ้น

สมองถูกทำลายได้ง่ายอย่างยิ่งต่อภาวะที่มีอนุมูลอิสระมากเกินไป แต่ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระไม่เพียงพอ เนื่องจากการใช้ออกซิเจนสูง กรดไขมันไม่อิ่มตัวจำนวนมาก และสารต้านอนุมูลอิสระภายในร่างกายอยู่ในระดับต่ำ ระดับของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระลดลงในระหว่างการขาดเลือด ในขณะที่การผลิตอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นในช่วงภาวะการไหลย้อนกลับของเลือดหลังการขาดเลือด ดังนั้นการรักษาด้วยสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอกอาจลดความเสียหายของระบบประสาทในกรณีเป็นโรคหลอดเลือดสมอง การ

รักษาโรคหลอดเลือดสมองขึ้นอยู่กับชนิด ความรุนแรง และระยะเวลาที่ผู้ป่วยมีอาการ โดยเฉพาะถ้าผู้ป่วยมาเข้ารับการรักษาเร็วเท่าใดความพิการและอัตราการตายจะลดลงมากเท่านั้น ซึ่งมีวิธีการรักษาหลักคือการรักษาทางยา เช่น ยาละลายลิ่มเลือด ยาต้านการแข็งตัวของเลือดหรือยาต้านเกล็ดเลือดในโรคหลอดเลือดสมองตีบตัน ยารักษาความดันโลหิตสูง ยาและสารน้ำรักษาสมองบวม เป็นต้น, การผ่าตัดในรายที่อาการซึม หมอสติ และมีก้อนเลือดขนาดใหญ่ในสมอง เป็นต้น การรักษาและควบคุมปัจจัยเสี่ยงและโรคแทรกซ้อน และการรักษาทางกายภาพบำบัดเพื่อฟื้นฟูสภาพทางร่างกายผู้ป่วย ป้องกันโรคแทรกซ้อน โรคหลอดเลือดสมองมีโอกาสกลับเป็นซ้ำภายหลัง การรักษาผู้ป่วยและผู้ดูแลต้องให้ความสำคัญต่อการป้องกันปัจจัยเสี่ยง (Bora et al., 2011)

ปัจจุบันสมุนไพรเป็นทางเลือกหนึ่งของการรักษาโรคต่างๆ ซึ่งโหระพาจัดเป็นพืชสมุนไพรที่สามารถลดการเกิดโรคหลอดเลือดสมองได้ มีการศึกษาโหระพาสายพันธุ์ต่างๆ อย่างกว้างขวางในหลายประเทศ แต่การศึกษาโหระพาสายพันธุ์ไทยยังมีน้อยมาก และโหระพาสายพันธุ์ไทยมีอยู่อย่างแพร่หลายเป็นสมุนไพรที่ราคาไม่แพง หาได้ง่าย มีอยู่ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศ โดยปัจจุบันสายพันธุ์ของโหระพาไทยในตลาดส่วนใหญ่จะนิยมปลูกและขายกันเป็นพันธุ์ดั้งเดิมกับพันธุ์ที่ได้คัดเลือกลักษณะพิเศษมาแล้วงานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายที่จะศึกษากรรมวิธีการเตรียมสารสกัด ฤทธิ์ทางชีวภาพ คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของสารสกัด พร้อมทั้งการเตรียมสารสกัดผักผงเพื่อเป็นองค์ความรู้ประกอบการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร เพื่อสุขภาพที่ถูกต้องและเหมาะสม

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาสารพฤกษเคมี (phytochemical) ในสารสกัดโหระพาไทย 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ *thysiflorum* (*Ocimum basilicum* var. *thysiflorum*) และ สายพันธุ์จัมโบ้ 4320 (*Ocimum basilicum* cv. Jumbo 4320)
2. ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดโหระพาไทย
 - 2.1 ศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity)
 - 2.2 ศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial activity)
 - 2.3 ศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านลิ่มเลือด (Antithrombotic activity) *in vitro*
3. ศึกษาชีวประสิทธิผล (bioaccessibility) และความคงตัวของสารสกัดโหระพาที่เตรียมได้เมื่อผ่านแบบจำลองของระบบการย่อยอาหาร
4. เพื่อถ่ายทอดวิทยาการความรู้สู่ภาคเอกชนหรือผู้ที่สนใจทั่วไป

3. ขอบเขตของการวิจัย

- 3.1 การเตรียมสารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ *thysiflorum* (*Ocimum basilicum* var. *thysiflorum*) และสายพันธุ์จัมโบ้ 4320 (*Ocimum basilicum* cv. Jumbo 4320) โดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ น้ำ, เอทานอล และเอทิล อะซิเตท
- 3.2 ศึกษาสารพฤกษเคมี (phytochemical) ในสารสกัดโหระพาไทยทั้ง 2 สายพันธุ์
- 3.3 ศึกษาคุณสมบัติสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดโหระพา
 - 3.3.1 ศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (Antioxidant activity)
 - 3.3.2 ศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial activity)
 - 3.3.3 ศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านลิ่มเลือด (Antithrombotic activity) *in vitro*

3.4 ศึกษาชีวประสิทธิผล (bioaccessibility) และความคงตัวของสารสกัดโหระพาที่เตรียมได้
เมื่อผ่านแบบจำลองของระบบการย่อยอาหาร

4. ทฤษฎี สมมติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย (Conceptual Framework)

Ocimum basilicum Linn. เป็นที่รู้จักกันทั่วไปว่า โหระพาอยู่ในแฟมิลี Lamiaceae เป็นพืชสมุนไพรยืนต้น สูงประมาณ 50-70 เซนติเมตร ใบเป็นรูปไข่และฟันเล็กน้อย ดอกมีสีขาวถึงชมพูอ่อน โหระพาเป็นพืชพื้นเมืองที่พบในเอเชีย, แอฟริกา, อเมริกาใต้ และเมดิเตอร์เรเนียน แต่มีการปลูกกันอย่างแพร่หลายในหลายประเทศ โหระพาเป็นพืชสมุนไพรที่สำคัญและใช้ในการทำอาหาร ในอดีตโหระพาถูกใช้สำหรับการรักษาโรควิตกกังวล (anxiety), โรคเบาหวาน, โรคหลอดเลือดหัวใจ, อาการปวดหัว, ต้านอาการชักกระตุกและต้านการอักเสบ, ไอ, ความผิดปกติของการย่อยอาหาร, ไข้, ไมเกรน, แผลงัด, ปวดประจำเดือน, ปวดเส้นประสาท, โรคไซนัสอักเสบ และความผิดปกติของระบบประสาทต่างๆ นอกจากนี้ใบและดอกบริเวณยอดของพืชยังถือว่าเป็นยาขับลมในท้อง, ยาขับน้ำนม, บำรุงธาตุ เจริญอาหาร และต้านการกระตุกของกล้ามเนื้อ ในการแพทย์แผนโบราณ (Bora et al., 2011; Jeba et al., 2011)

โหระพาเป็นที่รู้จักกันดีสำหรับน้ำมันหอมระเหย ซึ่งมีหน้าที่ในเรื่องของกลิ่นหอมของโหระพา และรสชาติของเครื่องปรุงรส โหระพายังประกอบด้วย เอซิลเลตเตต แอนโทไซยานิน และ โกลโคซิเลตเตต แอนโทไซยานิน; กรดฟีนอลิก เช่น กรดโรสมารินิก (rosamarinic acid), กรดลิโทสเปอเมิก บี (lithospermic acid B), กรดวานิลลิลิก (vanillic acid), กรดพิกูมาริก (p-coumaric acid), กรดไฮดรอกซีเบนโซอิก (hydroxybenzoic acid), กรดไซริงจิก (syringic acid), กรดเฟรูลิก (ferulic acid), กรดโปรโตคาเทคชูอิก (protocatechuic acid), กรดคาร์เฟอิก (caffeic acid) และ gentisic acid, chicoric acid; ฟลาโวนอยด์ และแทนนิน; เอสเทอร์ของกรดซินนามิก (cinnamic acid ester); ไตรเทอร์ปีนอยด์กลัยโคไซด์ (triterpenoids glycosides) และสเตอรอยด์กลัยโคไซด์ (steroidal glycosides) (Bora et al., 2011)

สารสกัดต่างๆ จากโหระพามีคุณสมบัติต้านแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา ต้านไวรัส ต้านอนุมูลอิสระ ลดไขมัน ต้านการอักเสบ ต้านการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือด ป้องกันเส้นเลือดอุดตันจากลิ้มเลือด ขยายหลอดลม สามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส และเชื้อราได้ด้วยพร้อมลดการอักเสบ และต้านสารก่อมะเร็ง (Bora et al., 2011)

5. วิธีดำเนินการวิจัยและสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

1. เตรียมสารสกัดโหระพาดัดแปลงจากวิธีของ Bora และคณะ (2011)
2. ศึกษาสารพฤกษเคมี (phytochemical) ในสารสกัดโหระพาไทยทั้ง 2 สายพันธุ์
 - 2.1 ศึกษาหาปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Oonsivilai et al., 2007)
 - 2.2 ศึกษาหา phenolic profiling โดยวิธี HPLC (Oonsivilai et al., 2007)
 - 2.3 ศึกษาหาปริมาณ total phenolic โดยวิธี Folin-Ciocalteu method (Oonsivilai et al., 2007)
 - 2.4 ศึกษาหาปริมาณ total flavonoid โดยวิธีของ Juan และคณะ (2010)
3. ศึกษาคุณสมบัติสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดโหระพา
 - 3.1 ศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay, FRAP assay (Oonsivilai et al., 2008), และ DCFH-DA assay (cellular antioxidant activity) (ดัดแปลงจาก Wolfe et al., 2007)

- 3.2 ศึกษาหาคุณสมบัติการเป็นสารต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial activity) โดยวิธี agar disc diffusion (ดัดแปลงจาก Lorian V., 1996)
- 3.3 ศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านลิ่มเลือด (Antithrombotic activity) *in vitro* โดยวิธี prothrombin time (PT) (ดัดแปลงจาก Rizzo et al., 2008)
4. ศึกษาชีวประสิทธิผล (bioaccessibility) และความคงตัวของสารสกัดโหระพาที่เตรียมได้ เมื่อผ่านแบบจำลองของระบบการย่อยอาหารในหลอดทดลอง (*In vitro* digestion models) โดยวิธีของ ferruzzi และคณะ (2001)

6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เช่น การเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร ฯลฯ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

6.1 การเผยแพร่ผลงานในการประชุมวิชาการระดับชาติหรือนานาชาติ หรือวารสารวิชาการระดับชาติหรือนานาชาติ

6.2 การจดสิทธิบัตรกระบวนการเตรียมสารสกัดโหระพา

7. แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

การเผยแพร่องค์ความรู้เกี่ยวกับประโยชน์ของโหระพาในด้านการเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อลดความเสี่ยงในการเกิดโรคหลอดเลือดสมอง



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ตระกูล *Ocimum* (Lamiaceae) มีประวัติศาสตร์อันยาวนานของการใช้เป็นอาหารและสมุนไพรรักษาโรค มีหลายสายพันธุ์ที่ใช้สำหรับการต้านอนุมูลอิสระและการป้องกันเซลล์ประสาทในส่วนต่างๆของโลก (Bora et al., 2011)

ตารางที่ 1.1 แสดงปริมาณ phenolic compound ในส่วนของใบและลำต้นของโหระพา (sweet basil) และโหระพาไทย (Thai basil)

ส่วนประกอบ	Sweet basil		Thai basil	
	ใบ	ลำต้นและก้าน	ใบ	ลำต้นและก้าน
Total anthocyanins (mg of cyanidin-glucoside/100 g tissue)	ไม่พบ	ไม่พบ	2	13
Total phenolics (mg gallic acid/100 g tissue)	523	244	605	231
Polyphenolics (mg/100 g tissue)				
- caftaric acid	16.5	ไม่พบ	1.93	ไม่พบ
- chicoric acid	51.8	ไม่พบ	88.5	0.30
- rosmarinic acid	112	31.9	128	40.3
- other minor compounds	28.3	3.98	17.6	9.41
Total polyphenolics ยกเว้น anthocyanins (mg/100 g tissue)	208	35.9	236	50.0

ที่มา: Lee และคณะ (2009)

ใบโหระพาทางการค้าใน 100 กรัมของวัตถุดิบสดประกอบไปด้วย น้ำ 87 กรัม, โปรตีน 3 กรัม, ไขมัน 1 กรัม, คาร์โบไฮเดรต 5 กรัม, ไฟเบอร์ 2 กรัม และเถ้า 2 กรัม เมล็ดอุดมไปด้วยโปรตีนและไขมัน แต่มีคาร์โบไฮเดรตเพียงเล็กน้อย (Aguilar et al., 1999) สารสกัดจากเมล็ด ราก ดอก ลำต้น และใบโหระพาถูกนำมาประยุกต์ใช้ทางการแพทย์อย่างหลากหลาย จากการวิจัยที่ผ่านมา พบว่าสารสกัดจากโหระพามีคุณสมบัติต้านแบคทีเรีย เช่น *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* เป็นต้น ต้านเชื้อรา เช่น *Aspergillus niger* และ *Rhizopus solani* เป็นต้น และต้านไวรัสบางชนิดได้ (Nguetack et al., 2004; Opalchenova et al., 2003; Orafidiya et al., 2001; Maisuthisakul et al., 2008) สามารถต้านอนุมูลอิสระ ลดระดับไขมันชนิด LDL และเพิ่มระดับไขมันชนิด HDL ในเลือดได้ ต้านการอักเสบ ต้านสารก่อมะเร็ง ต้านการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือด ลดการเกิดลิ่มเลือดในหลอดเลือด ป้องกันเส้นเลือดอุดตันจากลิ่มเลือด ขยายหลอดเลือด ป้องกันการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบหัวใจและหลอดเลือด (Tohti et al., 2006; Harnafi et al., 2008; Wannissorn et al., 2005) คุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูล

อิสระ ด้านการก่อกลายพันธุ์ ด้านการเกิดเนื้องอก ด้านไวรัส และด้านแบคทีเรียของโหระพาอาจเกิดขึ้นจากความหลากหลายของส่วนประกอบของโหระพา รวมทั้ง linalool, 1,8-cineole, estragole และ eugenol (Muller et al., 1994; Chiang et al., 2005; Makri et al., 2007)

1. ต้านอนุมูลอิสระ/ต้านการออกซิเดชัน

จากการศึกษาของ Maisuthisakul และคณะ (2008) พบว่าใบโหระพาที่สกัดด้วยเอทานอล มีสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content) เท่ากับ 50.5 mg GAE/g และสามารถกำจัดอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH) ได้โดยมีค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระดีพีพีเอชได้ 50% (EC₅₀) เท่ากับ 1.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชในน้ำมันหอมระเหยของโหระพาในแต่ละฤดูกาล พบว่าน้ำมันหอมระเหยของโหระพาในฤดูหนาวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชได้ดีที่สุด รองลงมาคือ ฤดูใบไม้ผลิ ฤดูใบไม้ร่วง และฤดูร้อน ซึ่งมีค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระดีพีพีเอชได้ 50% (IC₅₀) เท่ากับ 4.8±0.1, 5.3±0.2, 6.0±0.2 และ 6.7±0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Slinkard et al., 1977)

โหระพามีระดับของการต้านอนุมูลอิสระสูง ซึ่งเป็นผลมาจากกลุ่มขนาดใหญ่ของโพลีฟีนอลและฟลาโวนอยด์ เช่น quercetin, kaempferol และ myricetin; แทนนิน เช่น catechin และรงควัตถุ เช่น พบแอนโทไซยานินในโหระพาสีม่วงและน้ำมันหอมระเหย เช่น eugenol และ methyl chavicol (Bora et al., 2011)

โหระพาสามารถลดความเสียหายจากออกซิเดชันในโมเดลสัตว์ โดยพบว่าให้หนูกินสารสกัดใบโหระพาที่สกัดด้วยไฮโดรแอลกอฮอล์ปริมาณ 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวเป็นกิโลกรัม เป็นเวลา 15 วัน จะเห็นการเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนของ GPx (กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส) (1.22-1.4 เท่า), glutathione (GSH) reductase (1.16-1.28 เท่า), catalase (1.56-1.58 เท่า) และ superoxide dismutase การเปลี่ยนแปลงหนึ่งกิจกรรมหรือมากกว่าหนึ่งกิจกรรมของเอนไซม์เหล่านี้อาจอธิบายการลดลงของ lipid peroxidation (ปฏิกิริยาการเกิดออกซิเดชันของไขมัน) ซึ่งเกิดจากโหระพาจากการศึกษาโดย Dasgupta และคณะ (2004) (Kaefer et al., 2011)

Dragan และคณะ (2007) ทดสอบผลของน้ำส้มสายชูบัลซามิกที่อุดมไปด้วยสารสกัดจากสมุนไพรหลายชนิด (โรสแมรี่, เซจ และโหระพา) ในซูปและสลัดต่อ oxidative stress และการวัดคุณภาพชีวิตในผู้หญิงที่ป่วยเป็นมะเร็งเต้านมขั้นที่ III B และ IV ในขณะที่มีการลดลงของ oxidative stress มีความซับซ้อนของอาหารเข้ามาเกี่ยวข้องทำให้ไม่สามารถสรุปได้ว่าองค์ประกอบใดในอาหารนำไปสู่การลดลงของ oxidative stress

2. ต้านการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือด

Bora และคณะ (2011) ได้ศึกษาผลของการสกัดใบโหระพาด้วยเอทิล อะซิเตตต่อภาวะการขาดเลือดและภาวะการไหลย้อนกลับของเลือดหลังการขาดเลือดที่เหนียวนำไปเกิดความเสียหายของสมองและความผิดปกติของมอเตอร์ในหนู โดยภาวะที่มีการขาดเลือดของสมองทั้งหมด (Global cerebral ischemia) ทำโดยการอุดหลอดเลือดสมองคาโรติดทั้งสองข้างแล้วตามด้วยการไหลย้อนกลับของเลือดหลังการขาดเลือดขนาดของสมองบริเวณที่ตายเนื่องจากเลือดอุดตัน วัดโดยใช้การย้อมสี triphenyltetra-zolium chloride ความเข้มข้นของ thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) และปริมาณที่ลดลงของ glutathione (GSH) วัดด้วย colorimetric assay การอุดหลอดเลือดสมองคาโรติดทั้งสองข้างแล้วตามด้วยการไหลย้อนกลับของเลือดหลังการขาดเลือดทำให้ขนาดของสมองบริเวณที่ตายเนื่องจากเลือดอุดตันและ lipid

peroxidation (TBARS) เพิ่มขึ้น และลดปริมาณ GSH อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งการรักษาด้วยสารสกัดจากเอทิล อะซิเตทมาตรฐานจาก โหระพา (100 และ 200 มก./กก.) ทำให้ขนาดของสมองบริเวณที่ตายเนื่องจากเลือดอุดตันและ lipid peroxidation ลดลงอย่างเห็นได้ชัด และสามารถฟื้นฟูปริมาณ GSH

Tohti และคณะ (2006) ได้ศึกษาผลของสารสกัดจากโหระพาต่อการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดและก้อนเลือดโดยการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดจะถูกเหนี่ยวนำโดย ADP และ thrombin และน้ำหนักก้อนเลือดใน arteriovenous thrombosis model พบว่า สารสกัดโหระพามีคุณสมบัติยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดที่ถูกเหนี่ยวนำโดย ADP และ thrombin ซึ่งขึ้นอยู่กับปริมาณที่ให้และมีผลในการต้านลิ่มเลือดในสัตว์ทดลอง ซึ่งมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องมากกว่า 7 วัน และหายไปหมดใน 3-7 วัน

Amrani และคณะ (2009) ได้ศึกษาผลของสารสกัดจากโหระพาต่อการขยายตัวของหลอดเลือดและการต้านการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือด พบว่าสารสกัดจากโหระพามีผลต่อการขยายหลอดเลือดอย่างมีนัยสำคัญ สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดจากการเหนี่ยวนำของ ADP และสามารถลดการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดจากการเหนี่ยวนำของ thrombin ซึ่งการใช้โหระพาเป็นพืชสมุนไพรอาจเป็นประโยชน์ต่อระบบหมุนเวียนเลือดในร่างกาย

3. ต้านสารก่อมะเร็ง

Dasgupta และคณะ (2004) ได้ศึกษาผลของปริมาณ 200 และ 400 mg/kg (น้ำหนักตัว) ของการสกัดใบสดโหระพาด้วย hydroalcoholic (เอทานอล 80% และน้ำ 20%) ต่อ xenobiotic metabolizing Phase I และ Phase II enzymes, เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ, ปริมาณกลูตาไธโอน, Lactate dehydrogenase และ lipid peroxidation ในตับของหนู 8-9 สัปดาห์และทดสอบคุณสมบัติการต้านสารก่อมะเร็งโดยใช้โมเดลของ Benzo(a)pyrene-induced forestomach และ 7,12 dimethyl benz(a)anthracene (DMBA)-initiated skin papillomagenesis พบว่าสารสกัดใบโหระพาเพิ่มกิจกรรมของ Phase II enzyme ซึ่งสัมพันธ์กับกระบวนการขับสารพิษของ xenobiotics ในขณะที่ยับยั้งกิจกรรมของ Phase I enzyme สารสกัดใบโหระพาเหนี่ยวนำระดับการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสัมพันธ์กับการลดลงอย่างมีนัยสำคัญของการสร้าง lipid peroxidation และ lactate dehydrogenase สารสกัดจากใบโหระพามีประสิทธิภาพอย่างมากในการยับยั้งการเกิดสารก่อมะเร็งที่เหนี่ยวนำให้เกิดเนื้องอกทั้งในรูปแบบของเนื้องอกในระดับ peri-initiation

ในการศึกษาด้วยหนู Sprague-Dawley ที่เลี้ยงด้วยอาหาร AIN-76 ทั้งที่มีและไม่มีไขมันเข้มข้นสูงของโหระพา (6.25% และ 12.5%) ไม่มีข้อบ่งชี้ที่ชัดเจนของการลดลงใน 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene (DMBA) ที่เหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งเต้านม ยังไม่ชัดเจนว่าปริมาณของ procarcinogen (สารก่อมะเร็งทุติยภูมิ) ถูกตรวจสอบ การเหนี่ยวนำพร้อมกันของทั้ง phase I และ II enzymes หรือปัจจัยอื่นๆ สาเหตุนี้ไม่ใช่เพราะการป้องกันจากการเพิ่มโหระพาเข้าไปในอาหารของสัตว์ อย่างไรก็ตาม มีหลักฐานที่แสดงว่าโหระพาสารสกัด DMBA ที่เหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งได้ ถ้าหากให้หนู Swiss ด้วยอาหารที่ประกอบด้วยสารสกัดโหระพา 150 หรือ 300 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวเป็นนิโคกรัมจะลด DMBA ที่เหนี่ยวนำให้เกิดเนื้องอกผิวหนัง (ลดลง 12.5% และลดลง 18.75% สำหรับปริมาณต่ำและปริมาณสูงตามลำดับ) และลดขอบเขตการแพร่กระจายของเนื้องอกต่อหนู เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนเนื้องอกต่อหนูที่ควบคุม ขอบเขตการแพร่กระจายของเนื้องอกอยู่ที่ประมาณต่ำกว่า 2.4 เท่า ($p < 0.01$) ในกลุ่มที่ให้โหระพาปริมาณต่ำ และต่ำกว่า 4.6 เท่า ($p < 0.01$) ในกลุ่มที่ให้โหระพาปริมาณสูง ยังไม่ชัดเจนว่ามีความแตกต่างในการตอบสนองระหว่างสปีชีส์ของหนู ตำแหน่งของมะเร็ง หรืออาหาร หรือการได้รับ

procarcinogen, DNA methyltransferase (MGMT) เป็นโปรตีนซ่อมแซมที่สำคัญในการป้องกันเซลล์ต่อ alkylation damage, MGMT จะแสดงออกอย่างมากในมะเร็งในมนุษย์และในการต้านทานต่อเนื้องอก ต้านมะเร็งต่างๆ รวมทั้งต้าน alkylating agents (Kaefer et al., 2011)

ทั้งสารสกัดเอทานอลและน้ำของโหระพาเพิ่มระดับโปรตีน MGMT ใน HT29 เซลล์ไลน์มะเร็ง ลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ 1.25 เท่า เปรียบเทียบกับตัวควบคุมหลังจากบ่ม 72 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับตัวควบคุม โหระพาเพิ่มกิจกรรมของโปรตีน glutathione-S-transferase (GST) 1.33 เท่า หลังจากบ่ม 12 ชั่วโมง หลังจากบ่ม 24 ชั่วโมง กิจกรรมของ GST เพิ่มขึ้นเป็น 1.68 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุม ซึ่งลดลง เป็น 1.47 เท่า หลังจากบ่ม 72 ชั่วโมง เพราะ MGMT เป็นหนึ่งในการป้องกันขั้นแรกต่อ alkylation DNA damage ของร่างกาย การเพิ่มขึ้นเล็กน้อย (สองถึงสามเท่า) ในเอนไซม์นี้อาจป้องกัน mutagenic lesions (Kaefer et al., 2011)

คุณสมบัติต้านมะเร็งของโหระพาอาจเกี่ยวข้องกับความสามารถในการมีอิทธิพลต่อการติดเชื้อไวรัส บุคคลที่เป็นไวรัสตับอักเสบบีได้รับการยอมรับว่ามีความเสี่ยงเพิ่มขึ้นในการเกิดมะเร็งเซลล์ตับ Chiang et al. (2005) ได้ตรวจสอบฤทธิ์ในการต้านไวรัสของสารสกัดโหระพาและส่วนประกอบของ โหระพาที่เลือก ในเซลล์ไลน์มะเร็งผิวหนังชนิด skin basal cell carcinoma (BCC-1/KMC) และเซลล์ไลน์ ที่ได้จาก hepatoblastoma HepG2 cells ต่อการต้านไวรัสต่างๆ รวมทั้งไวรัสตับอักเสบบี Chiang และคณะ (2005) พบว่าสารสกัดน้ำของโหระพาพร้อมกับ apigenin และ ursolic acid แสดงผลที่ดีมากในการ ต้านไวรัสตับอักเสบบีมากกว่ายาที่ใช้ตามท้องตลาด คือ glycyrrhizin และ lamivudine (3TC) โดยรวม การศึกษาเหล่านี้ทำให้เกิดคำถามที่น่าสนใจเกี่ยวกับประโยชน์ ข้อดี ของการใช้เครื่องเทศตามท้องตลาด เพื่อขัดขวางไวรัสและโรคมะเร็งที่อาจเกิดขึ้น ปฏิเสธไม่ได้ว่าข้อมูลที่มากขึ้นเป็นสิ่งจำเป็นที่จะต้องอธิบาย ปริมาณและระยะเวลาที่จำเป็นในการทำให้เกิดการตอบสนองต่อไวรัสที่ต้องการและกลไกที่เกิดการ ตอบสนอง (Kaefer et al., 2011)

4. ผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน

Jeba และคณะ (2011) ได้ศึกษาผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของโหระพาโดยควบคุมในหนูด้วยปริมาณ ต่ำและสูงของโหระพา ซึ่ง antibody titre จะถูกประเมินโดยวิธี SRBC titre และจำนวนของ red blood cell, white blood cell และ haemoglobin จะถูกบันทึก พบว่าโหระพาแสดงให้เห็นการเพิ่มขึ้นใน น้ำหนักตัวในสัตว์ที่เลี้ยงด้วยโหระพามากกว่าสัตว์กลุ่มควบคุม การเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของ antibody titre เมื่อเปรียบเทียบกับ control ขึ้นอยู่กับปริมาณของสารสกัดโหระพา พาราเมเตอร์ทางชีวเคมี ถูกประเมินในสัตว์ที่เลี้ยงและควบคุม ซึ่งช่วยเพิ่มค่า antibody titre และช่วยเพิ่มจำนวน red blood cell กับ haemoglobin ให้ผลทางชีวเคมีที่ดีเมื่อเทียบกับ control

5. ต้านการอักเสบ

Selvakkumar และคณะ (2007) ได้ศึกษาคุณสมบัติการต้านการอักเสบของสารสกัดหยาบจาก โหระพาที่สกัดโดยใช้ hexane, dichloromethane, ethyl acetate, methanol และน้ำ โดยใช้ Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) ของคนที่มีสุขภาพดี พบว่าสารสกัดหยาบโหระพาที่สกัดด้วย เมทานอล แสดงผลการยับยั้งที่ดีต่อการตอบสนองต่อการแบ่งตัวของ PBMC ใน mitogenic lymphocyte proliferation assays ในการศึกษาการแสดงออกของยีนต่อ lipopolysaccharide (LPS) เหนี่ยวนำให้เกิด การผลิตของ proinflammatory cytokines เช่น Tumor necrosis factor- α (TNF- α), Interleukin-

1 β (IL-1 β) และ IL-2 สารสกัดโหระพาหยาบ (เลือกใช้เฉพาะที่สกัดด้วยเมทานอลมาทำการทดลอง) สามารถยับยั้ง TNF- α , IL-1 β และ IL-2 ได้ ซึ่งสนับสนุนการต้านการอักเสบที่อาจเกิดขึ้นของสารสกัดโหระพาหยาบ นอกจากนี้ การผลิตไนตริกออกไซด์โดย LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages สะท้อนให้เห็นการสะสมของไนโตรที่ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 เซลล์ถูกเลี้ยงด้วยความเข้มข้นต่างๆ ของสารสกัดโหระพา เมทานอลในที่มี LPS (1 ไมโครกรัม/มล.) หลังจาก 24 ชั่วโมง การผลิตไนโตรที่ใน culture supernatants จะถูกวิเคราะห์โดย Griess reaction โดยการวัดปริมาณไนตริกออกไซด์อนินทรีย์ ซึ่งไนตริกออกไซด์เป็น proinflammatory mediator มีบทบาทสำคัญในการเป็นสื่อกลางของการอักเสบเฉียบพลัน ไนตริกออกไซด์เป็นสารพิษอนุมูลอิสระที่ผลิตโดย macrophages ตามการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อและการผลิตที่มากเกินไปของไนตริกออกไซด์มักจะส่งผลให้เกิดความเสียหายในดีเอ็นเอและทำให้เกิดการทำลายของเนื้อเยื่อโฮสต์ จากผลการศึกษาพบว่า การผลิตไนตริกออกไซด์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในการเลี้ยงด้วยสารสกัดโหระพาหยาบที่สกัดด้วยเมทานอล

Gomez-Flores และคณะ (2008) ได้ศึกษาผลของสารสกัดโหระพาซึ่งสกัดด้วยเมทานอลและน้ำต่อการแบ่งตัวของเม็ดเลือดขาวหนูในหลอดทดลองด้วย T cell proliferation assay พบว่าเม็ดเลือดขาวมีการแบ่งตัวเป็น 80 และ 83% ของการสกัดด้วยเมทานอลและน้ำ ตามลำดับ และไม่มีความแตกต่างระหว่างผลของการสกัดด้วยเมทานอลและการสกัดด้วยน้ำ

6. ด้านจุลินทรีย์

น้ำมันหอมระเหยของใบโหระพามีคุณสมบัติต้านจุลชีพ (Kaefer et al., 2011)

Moghaddam และคณะ (2009) ตรวจสอบผลของโหระพาต่อ *Helicobacter pylori* และพบว่า ส่วนของ methanol, butanol และ n-hexane fractions ของโหระพาแสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ในการต่อต้านแบคทีเรีย (MIC = 39-117 ไมโครกรัม/disk) ในขณะที่ไม่มียา amoxicillin โหระพามีประสิทธิภาพเพียงพอในการใช้แต่ละสปีชีส์หรือหลายสปีชีส์เป็นยาต้านจุลชีพที่มีศักยภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพื้นที่ที่ยาปฏิชีวนะในเชิงพาณิชย์อยู่ในจำนวนจำกัด

7. ด้านการก่อกลายพันธุ์

มีหลายการศึกษาที่แสดงหลักฐานว่าโหระพาเป็นสารต้านการก่อกลายพันธุ์ Stajkovic และคณะ (2007) ได้ศึกษาผลการต้านการก่อกลายพันธุ์ของโหระพาต่อการก่อกลายพันธุ์ในเซลล์ *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 และ TA102 ในสถานะที่มีและไม่มีกรกระตุ้นไมโครโซมอลของตับ น้ำมันหอมระเหยของโหระพาที่ความเข้มข้นในช่วง 0.5 ไมโครลิตร/plate ถึง 2.0 ไมโครลิตร/plate ยับยั้งการก่อกลายพันธุ์จากการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต (dose = 6 J/m²) 22-76%, ยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ที่เกิดจาก 4-nitroquinoline-N-oxide (0.15 ไมโครกรัม/plate) ลดลง 23-52% และยับยั้งการก่อกลายพันธุ์จาก 2-nitro-propane (14.9 mg/plate) 8-30% การค้นพบนี้มีความสอดคล้องกับการศึกษาโดย Jeurissen และคณะ (2008) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโหระพา 50 ไมโครกรัม/ml ชัดขวางการสร้าง DNA adduct ที่เกิดจาก 1'-hydroxyestragole ในเซลล์ไลน์มะเร็งตับ (HepG2) แบบปฏิกิริยาในมนุษย์ บางที่อาจส่งเสริม phase II enzymes และการคอนจูเกตและการกำจัดสารก่อมะเร็งนี้ การค้นพบเหล่านี้ อาจอธิบายความสามารถของโหระพาในการลดการก่อกลายพันธุ์ของ aflatoxin B1 (AFB1) และ benzo(a)pyrene (B(a)P) การก่อกลายพันธุ์ของ AFB1 ถูกยับยั้ง >30% ในสถานะที่มี 1-2 mg/plate ของสารสกัดโหระพาที่สกัดด้วยเฮกเซนและ 0.5-1 mg/plate ของสารสกัดโหระพาที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มและเมทานอล เพราะการก่อกลายพันธุ์ของ

B(a)P ถูกยับยั้งเพียงแค่จากสารสกัดโหระพาที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มและเมทานอลที่โดส 2-5 มิลลิกรัม/plate ส่วนประกอบหลายอย่างอาจมีผลต่อฤทธิ์ในการต้านการก่อกลายพันธุ์ของโหระพา (Kaefer et al., 2011)

8. การได้รับมากเกินไป

ควรจะสังเกตว่ามีปัญหาเกี่ยวกับการได้รับโหระพามากเกินไป สาร estragole คาดว่าเป็น procarcinogen/mutagenic ที่พบในโหระพา ทำให้เกิดคำถามที่เกี่ยวข้องกับความสมดุลระหว่างประโยชน์และความเสี่ยงต่อการใช้เครื่องเทศชนิดนี้และชนิดอื่นๆ ตอนนี้ หลักฐานส่วนใหญ่ชี้ให้เห็นผลของการต้านการก่อกลายพันธุ์ของโหระพาที่มากเกินไปสัมพันธ์กับผลร้ายที่อาจเกิดขึ้นจากการเหนี่ยวนำให้เกิดความเสียหายของเซลล์โดย estragole (Kaefer et al., 2011)

ในแคลิฟอเนีย estragole ถูกระบุว่าเป็นสารก่อมะเร็ง estragole เป็นสาเหตุของมะเร็งตับและความเป็นพิษของอวัยวะในหนู ในการทดสอบระยะสั้นต่างๆ พบว่า estragole เป็นพิษต่อยีน (genotoxic) โดยทำให้เกิดการสร้าง DNA adduct ใน *in vivo* และ *in vitro* (Bristol, 2011)

เนื่องจากการศึกษาโหระพาสายพันธุ์ต่างๆ อย่างกว้างขวางในหลายประเทศ แต่การศึกษาโหระพาสายพันธุ์ไทยยังมีน้อยมากโดยเฉพาะการศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ (ทดสอบในเซลล์ไลน์) และการเป็นสารต้านการเกิดลิ้มเลือด ดังนั้น ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาโหระพาสายพันธุ์ไทยที่มีอยู่อย่างแพร่หลาย โหระพาเป็นสมุนไพรที่ราคาไม่แพง หาได้ง่าย มีอยู่ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศ และเพื่อเป็นการเพิ่มความรู้อของสมุนไพรชนิดนี้ให้เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้เกิดการปรับใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดตามคุณสมบัติของพืชชนิดนี้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมวัตถุดิบ

เตรียมใบสดของโหระพาไทย สายพันธุ์ *thyrstiflorum* (*Ocimum basilicum* var. *thyrstiflorum*) และสายพันธุ์จัมโบ้ 4320 (*Ocimum basilicum* cv. Jumbo 4320) ในจังหวัดนครราชสีมา ในช่วงเดือนกันยายนถึงเดือนมกราคม นำมาล้างแล้วทำแห้งที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาบดให้ละเอียดด้วย grinder และบรรจุแบบสุญญากาศ นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C ก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

3.2 การเตรียมสารสกัดโหระพาไทย

เตรียมสารสกัดโหระพาจากตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ น้ำ เอทานอล และเอทิล อะซิเตท โดยชั่งผงโหระพา 5.0 กรัม สกัดด้วยตัวทำละลาย น้ำ หรือ เอทานอล หรือ เอทิล อะซิเตท ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปสกัดโดยเขย่า (shaking) นาน 18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,800 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำมากรองและปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยตัวทำละลายตัวเดียวกับที่ใช้สกัด สำหรับสารสกัดเอทานอลและเอทิล อะซิเตท กำจัดตัวทำละลายในสุญญากาศและทำให้แห้งโดยใช้ rotary evaporator ส่วนสารสกัดน้ำ ทำแห้งโดยใช้ freeze dryer จากนั้น จัดเก็บสารสกัดที่อุณหภูมิ -20°C ในภาชนะที่บับแสง ก่อนนำไปใช้ในการทดลอง (ดัดแปลงจาก Bora et al., 2011)

3.3 การศึกษาสารพฤกษเคมี (phytochemical) ในสารสกัดโหระพาไทย

3.3.1 การศึกษาหาปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ของสารสกัดโหระพาไทย

การศึกษาหาปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ของสารสกัดโหระพาไทย (ตามวิธีของ Oonsivilai et al., 2007) ทำโดยใช้วิธี HPLC โดยใช้ Grace-Vydac 201TP54 reversed-phase (4.6 mm×250 mm) polymeric C18 column ให้อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที binary mobile phase เป็น methanol:water:ammonium acetate (73:25:2, v/v/v) ใน reservoir A และ ethyl acetate ใน reservoir B โดยช่วงเริ่มต้นมีอัตราส่วนของสารละลาย A คือ 100% ถึง 50:50 v/v (A/B) นาน 10 นาที ทิ้งไว้อีก 10 นาทีและอีก 5 นาทีจะกลับมาเป็นอัตราส่วนเดิม (100% A) และ 5 นาทีถัดไปเข้าสู่สมดุลรวมเป็น 30 นาทีในแต่ละตัวอย่าง จะพบสารพฤกษเคมีแต่ละชนิด ดูได้จากช่วงข้อมูลต่างๆ เทียบกับข้อมูลของสารมาตรฐาน

3.3.2 การศึกษาหา phenolic profiling ของสารสกัดโหระพาไทย

การศึกษาหา phenolic profiling ของสารสกัดโหระพาไทย (ตามวิธีของ Oonsivilai et al., 2007) ทำโดยใช้วิธี HPLC โดยใช้ reverse phase column คือ Nova-Pack C18 (3.8 mm l.d.×150 mm) ส่วน guard column คือ Nova-Pack C18 ให้อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ 35°C binary mobile phase เป็นน้ำต่ออะซิติก อัตราส่วน 98:2 v/v ใน reservoir A และอะซิโตไนไตรล์ ใน reservoir B โดยช่วงเริ่มต้นมีอัตราส่วนของสารละลาย A/B คือ 99:1 v/v ถึง 70:30 v/v นาน 20 นาที ทิ้งไว้อีก 5 นาทีจะกลับมาเป็นอัตราส่วนเดิม และ 5 นาทีถัดไปเข้าสู่สมดุล รวมเป็น 30 นาทีในแต่ละตัวอย่าง จะพบสารพฤกษเคมีแต่ละชนิด ดูได้จากช่วงข้อมูลต่างๆ เทียบกับข้อมูลของสารมาตรฐาน

3.3.3 การศึกษาหาปริมาณ total phenolic

วิเคราะห์ปริมาณ total phenolic ในสารสกัดโหระพาไทยโดยวิธี Folin Ciocalteu ตามวิธีการของ Oonsivilai et al. (2007) โดยทำละลายสารสกัดแห้งด้วยตัวทำละลาย น้ำ หรือ เอทานอล หรือ เอทิล อะซิเตท แล้วปิเปตสารละลายตัวอย่างละ 20 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองแล้วเติมน้ำ DI 1.58 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex ทิ้งไว้ 5 นาที เติมโซเดียมคาร์บอเนต (20% w/v) 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง แล้วจึงเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (Biochrom, Libra S22 S/N 97765, UK) ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร และหา total phenolic compound โดยใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐาน ระดับความเข้มข้นของ gallic acid ที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานคือ 50, 100, 250, 500 และ 750 ppm ใน 95% เอทานอล ผลการวิเคราะห์รายงานในรูปแบบสมมูลของมิลลิกรัม gallic acid

3.3.4 การศึกษาหาปริมาณ total flavonoid

วิเคราะห์ปริมาณ total flavonoid ในสารสกัดโหระพาไทยโดย modified colorimetric method ตามวิธีการของ Juan et al. (2010) โดยทำละลายสารสกัดแห้งด้วยตัวทำละลาย น้ำ หรือ เอทานอล หรือ เอทิล อะซิเตท แล้วปิเปตสารละลายตัวอย่างละ 250 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองแล้วเติมน้ำ DI 1.25 มิลลิลิตร เติม 5% NaNO₂ 75 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex ทิ้งไว้ 6 นาที เติม 10% AlCl₃ 150 ไมโครลิตร ตามด้วย 1 M NaOH 0.5 มิลลิลิตร และน้ำ DI 275 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex ทิ้งไว้ 5 นาที หลังจากนั้นจึงนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (Biochrom, Libra S22 S/N 97765, UK) ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร และหา total flavonoid โดยใช้ catechin (0-350 ppm) เป็นสารมาตรฐาน ผลการวิเคราะห์รายงานในรูปแบบสมมูลของมิลลิกรัม catechin

3.4 การศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ของสารสกัดโหระพาไทย

3.4.1 วิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity

วิเคราะห์ปริมาณของอนุมูลอิสระตามวิธีการของ Oonsivilai et al. (2008) โดยการละลายสารสกัดแห้งด้วยตัวทำละลายน้ำ หรือ เอทานอล หรือ เอทิล อะซิเตท แล้วปิเปตสารละลายตัวอย่าง ตัวอย่างละ 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลาย DPPH 1.90 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex แล้วเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (Biochrom, Libra S22 S/N 97765, UK) ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร โดยใช้ BHT และ ascorbic acid เป็นสารมาตรฐาน คำนวณหา %inhibition จากสูตร

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

A_{blank} = Absorbance ของ blank

A_{sample} = Absorbance ของ sample

3.4.2 วิธี Ferric-reducing antioxidant power (FRAP)

วิเคราะห์ปริมาณของอนุมูลอิสระตามวิธีการของ Oonsivilai et al. (2008) โดยทำการเตรียมสารละลาย FRAP จากสารละลาย acetate buffer (pH 3.6), TPTZ 10 mM ใน HCl เข้มข้น 40

mM และสารละลาย ferrous chloride เข้มข้น 20 mM ในอัตราส่วน 10:1:1 (v/v) ตามลำดับ สารละลาย FRAP จะต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้งาน และนำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่ 37°C ก่อนที่จะนำมาใช้ในการทดสอบด้วยวิธีนี้ ทำโดยละลายสารสกัดแห้งด้วยตัวทำละลายน้ำ หรือ เอทานอล หรือ เอทิล อะซิเตท แล้วปิเปตสารละลายตัวอย่าง ตัวอย่างละ 50 ไมโครกรัม แล้วเติมสารละลาย FRAP ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในที่มืดเป็นระยะเวลาเวลา 4 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร โดยทำการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย ferric sulfate ที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.2-1 mM ใช้ BHT เป็นสารมาตรฐาน

3.4.3 Cellular antioxidant activity (CAA) โดยใช้ DCFH-DA assay (ตัดแปลงจากวิธีของ Wolfe et al., 2007)

3.4.3.1 การเลี้ยงเซลล์ (Cell culture)

ใช้เซลล์ HepG2 (human liver hepatocarcinoma ATCC Cat. No. HB-8065) ทำการเลี้ยงเซลล์ HepG2 ใน Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ที่ประกอบไปด้วย 10% fetal bovine serum (FBS), 1% 2mM L-glutamine และ 1% penicillin-streptomycin (Gibco, Gaithersburg, MD, USA) โดยบ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C ในตู้บ่มที่มี 5% CO₂:95% air atmosphere

3.4.3.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดโหระพาไทย (Cytotoxicity)

ปิเปตเซลล์ HepG2 จำนวน 0.5×10^4 เซลล์/หลุม ลงใน 96 well plate แล้วนำไปบ่มที่สภาวะ 5% CO₂:95% air ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมสารสกัดโหระพาในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบไปด้วย 0.1% DMSO ที่ความเข้มข้นต่างๆ (50-500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) จากนั้นเติมสารสกัดโหระพาลงในหลุมและบ่มที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจาก 24 ชั่วโมง กำจัดสารสกัดโหระพาออกและล้างเซลล์ด้วย PBS จากนั้น เติม 100 ไมโครลิตร ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร MTT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) ลงไปในแต่ละหลุมและบ่มที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี MTT ออกแล้วล้างเซลล์ด้วย PBS แล้วเติม DMSO 100 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละหลุม จะทำให้ได้ผลึก formazan ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (Bio-Rad Benchmark Plus, CA, USA) ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์และ 0.1% DMSO เป็น control ผลการวิเคราะห์รายงานเป็น lethal concentration 50% (LC₅₀) ของเซลล์เปรียบเทียบกับ control

3.4.3.3 Cellular antioxidant activity (CAA) โดย DCFH-DA assay

เลี้ยงเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ที่ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 6×10^4 /หลุม บน 96-well microplate ใน 100 ไมโครลิตร ของ growth medium/หลุม หลังจากเลี้ยงเซลล์ไปแล้ว 24 ชั่วโมง growth medium จะถูกกำจัดออกและล้างด้วย phosphate buffered saline (PBS) แต่ละหลุมจะถูกล้างด้วย PBS 100 ไมโครลิตร จากนั้น เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ด้วย 100 ไมโครลิตร ของสารสกัดโหระพาไทย (25-500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) เมื่อครบ 1 ชั่วโมง นำสารสกัดโหระพาออกแล้วล้างเซลล์ด้วย PBS จากนั้นเติม 25 μ M 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) ลงไปในแต่ละหลุม บ่มเป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างเซลล์ด้วย PBS จากนั้นเติม 600 μ M 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (ABAP) ใน 100 ไมโครลิตร ของ Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) และ 96-well microplate จะถูกนำไปวางใน Spectramax Gemini EM fluorescence microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) ที่อุณหภูมิ 37°C เพื่อวัดค่าการเรืองแสง ที่ emission 538

นาโนเมตร จะถูกวัดด้วย excitation ที่ 485 นาโนเมตร ทุกๆ 5 นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แต่ละเพลทจะมี control และ blank โดย control ประกอบไปด้วยเซลล์ที่เลี้ยงด้วย DCFH-DA และ oxidant (ABAP) ส่วน blank ประกอบไปด้วยเซลล์ที่เลี้ยงด้วย DCFH-DA และ HBSS ที่ไม่มี oxidant (ABAP) และใช้วิตามินอีเป็น positive control

3.5 การศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial activity) ของสารสกัดโหระพาไทย (ดัดแปลงจาก Lorian V., 1996)

3.5.1 สายพันธุ์จุลินทรีย์ (Microbial strains)

สายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบคือ *Bacillus cereus* (TISTR687), *Bacillus subtilis* (TISTR008), *Enterobacter aerogenes* (bcc6719), *Escherichia coli* (TISTR3436), *Pseudomonas aeruginosa* (TISTR781) and *Staphylococcus aureus* (TISTR1466) โดยทำการเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C ในอาหาร MHA (Mueller-Hinton agar)

3.5.2 วิธี agar disk diffusion

เจือจาง suspension ของเชื้อแต่ละชนิดที่ใช้ในการทดลองด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อในหลอดทดลองปลอดเชื้อ เชื้อละ 1 หลอด ให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland scale 0.5 ซึ่งจะได้ปริมาณเชื้อ 10^7 - 10^8 CFU/มิลลิลิตร โดยประมาณ จากนั้น spread 100 ไมโครลิตร suspension ของเชื้อลงบน MHA ใช้ปากคีบ (forceps) จุ่มแอลกอฮอล์แล้วผ่านไฟเพื่อฆ่าเชื้อ ทิ้งให้เย็น คีบแผ่น paper disk ปลอดเชื้อวางลงบน MHA ปิเปต 10 ไมโครลิตร ของสารสกัดหรือชุดควบคุมลงบน paper disk นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้ disk ที่ไม่มีตัวอย่างสารสกัดเป็น negative control (DMSO 75% กับตัวทำละลาย) และใช้ chloramphenicol เป็น positive control

ตรวจผลการทดลอง โดยสังเกตการเกิดบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น (เป็นมิลลิเมตร) โดยวัดคร่อม paper disk 2 ครั้ง ทั้งแนวนอนและแนวตั้ง หาค่าเฉลี่ยและบันทึกผล

3.6 การศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านลิ่มเลือด (Antithrombotic activity) *in vitro* ของสารสกัดโหระพาไทย

วิเคราะห์คุณสมบัติการเป็นสารต้านลิ่มเลือดของสารสกัดโหระพาไทยโดยวิธี prothrombin time (ดัดแปลงจาก Rizzo et al., 2008) โดยเริ่มจากสร้าง tissue thromboplastin จากกระต่าย (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) ตามคำแนะนำการใช้ อุน tissue thromboplastin-calcium chloride reagent (PT reagent) ที่ได้ที่อุณหภูมิ 37°C จากนั้น ปิเปต 100 ไมโครลิตร ของพลาสมากระต่ายที่มี citrate (3.8% sodium citrate) ที่ประกอบไปด้วยสารสกัดโหระพาไทยที่ความเข้มข้นต่างๆ (100-500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ลงในหลอดทดลองขนาด 12x75 มิลลิเมตร และทำการบ่มเป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 37°C จากนั้นเติม PT reagent 200 ไมโครลิตร ลงไปในหลอดทดลอง เริ่มจับเวลาทันที เวลาจาก plasma-reagent mixing จนถึง clot formation (visually detected) คือ prothrombin time โดยใช้ Warfarin sodium เป็น positive references

3.7 การศึกษาชีวประสิทธิผล (bioaccessibility) และความคงตัวของสารสกัดโหระพาไทยเมื่อผ่านแบบจำลองของระบบการย่อยอาหารในหลอดทดลอง (In vitro digestion models) โดยวิธีของ ferruzzi และคณะ (2001)

3.7.1 Gastric phase (ตามวิธีของ ferruzzi et al., 2001)

นำสารสกัดโหระพาไทยโดยปริมาณของโหระพาไทยสกัดเมื่อเทียบกับโหระพาแห้งบดเท่ากับ 5 กรัม โดยทำการเติม 120 mM NaCl ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ใน polypropylene tube ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วนำ homogenized แล้วปรับ pH 2.0 ± 0.1 ด้วย 1 M HCl แล้วเติม pepsin (3mg/ml) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 40 มิลลิลิตรด้วย 120 mM NaCl จากนั้นไล่ออกซิเจนด้วยก๊าซไนโตรเจน แล้วปิดฝาให้แน่นและซีลด้วยพาราฟิล์ม แล้วนำไปบ่มใน shaking waterbath ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง

3.7.2 Small intestinal phase (ตามวิธีของ ferruzzi et al., 2001)

ใช้ตัวอย่างที่ผ่านการย่อยจาก gastric phase ที่ทำการปรับ pH 6.0 ± 0.1 ด้วย 1 M sodium bicarbonate (NaHCO_3) 2 มิลลิลิตร เติม pancreatin (12 mg/ml) 2 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง จากนั้นทำการปรับ pH ของตัวอย่างให้เป็น 7.0 ± 0.1 ด้วย 1 M NaHCO_3 ไล่ออกซิเจนด้วยก๊าซไนโตรเจน แล้วปิดฝาให้แน่นและซีลด้วยพาราฟิล์ม แล้วนำไปบ่มใน shaking waterbath ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

หลังจากผ่าน small intestinal phase แล้ว ส่วนที่ได้เรียกว่า digesta ปีเปตสาร 10 มิลลิลิตร ใส่ใน polypropylene tube ปริมาตร 15 มิลลิลิตร จากนั้นไล่ออกซิเจนด้วยก๊าซไนโตรเจนแล้วปิดฝาให้แน่นและซีลด้วยพาราฟิล์ม นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์ (ไม่เกิน 2 สัปดาห์) โดยตัวอย่างที่ได้จะนำไปวิเคราะห์ total phenolic ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu แล้วคำนวณหา % ความคงตัวในกระบวนการย่อย โดยคำนวณได้จากสูตรดังนี้

$$\text{ความคงตัวในกระบวนการย่อย (\%)} = (\text{ปริมาณสารหลังการย่อย/ปริมาณของสารก่อนการย่อย}) \times 100$$

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

จากการศึกษาสารพฤกษเคมี คุณสมบัติสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ คุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ คุณสมบัติการเป็นสารต้านจุลินทรีย์ คุณสมบัติการเป็นสารต้านลิมเลือด และชีวประสิทธิผลและความคงตัวของสารสกัดโหระพาที่เตรียมได้เมื่อผ่านแบบจำลองของระบบการย่อยอาหารในหลอดทดลอง (*In vitro* digestion models) ของสารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ *Thyrsiflorum* และ Jumbo 4320 ได้ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลองได้ดังนี้

4.1 การศึกษาสารพฤกษเคมี (phytochemical) ในสารสกัดโหระพาไทย

4.1.1 การศึกษาหาปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ของสารสกัดโหระพาไทย

ผลจาก reverse phase HPLC พบว่าคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ (lutein) สามารถพบได้ในสารสกัดโหระพาไทยที่สกัดด้วยเอทานอลและเอทิล อะซิเตท แต่ไม่พบในสารสกัดโหระพาไทยที่สกัดด้วยน้ำร้อน ลูทีนและอนุพันธ์ของคลอโรฟิลล์ที่สำคัญ ได้แก่ chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, pheophytin *a* และ pheophytin *b* จะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วย UV-vis spectra และ co-chromatography โดยเทียบกับสารมาตรฐาน

คลอโรฟิลล์และลูทีนของสารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ *Thyrsiflorum* และ Jumbo 4320 แสดงดังตารางที่ 4.1 สำหรับการเปรียบเทียบระหว่างตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด พบว่า ปริมาณของ chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, pheophytin *a*, pheophytin *b*, total chlorophylls และ lutein ของสารสกัดเอทานอลและสารสกัดเอทิล อะซิเตท มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยสารสกัดเอทานอลแสดงค่าปริมาณของ chlorophyll *b*, pheophytin *a*, pheophytin *b*, total chlorophylls และ lutein สูงกว่าสารสกัดเอทิล อะซิเตท มีเพียง chlorophyll *a* ของสารสกัดเอทิล อะซิเตท เท่านั้นที่มีปริมาณสูงกว่าสารสกัดเอทานอล เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ พบว่า สารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ *Thyrsiflorum* แสดงปริมาณของ chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, total chlorophyll และ lutein สูงกว่าสารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ Jumbo 4320 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่สารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ Jumbo 4320 แสดงปริมาณของ pheophytin *a* และ pheophytin *b* สูงกว่าสารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ *Thyrsiflorum* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

สารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ *Thyrsiflorum* ที่สกัดด้วยเอทิล อะซิเตท แสดงปริมาณของ chlorophyll *a* สูงสุด ที่ $4,188.29 \pm 6.96 \mu\text{g/g RM}$ สารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ *Thyrsiflorum* ที่สกัดด้วยเอทานอล แสดงปริมาณของ chlorophyll *b*, total chlorophylls และ lutein สูงสุด ที่ค่า $1,355.73 \pm 0.86 \mu\text{g/g RM}$, $7,557.84 \pm 6.25 \mu\text{g/g RM}$ และ $405.24 \pm 0.23 \mu\text{g/g RM}$ ตามลำดับ สารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ Jumbo 4320 ที่สกัดด้วยเอทานอล แสดงปริมาณของ pheophytin *a* และ pheophytin *b* สูงสุด ที่ค่า $4,127.16 \pm 1.95 \mu\text{g/g RM}$ และ $124.58 \pm 0.37 \mu\text{g/g RM}$ ตามลำดับ

ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าอนุพันธ์ของคลอโรฟิลล์เป็นสารพฤกษเคมีที่เด่นในการชอบไขมัน (lipophilic) โดยแสดงในสารสกัดโหระพาที่สกัดด้วยเอทานอลและเอทิล อะซิเตท และสกัดได้อย่าง

มีประสิทธิภาพตามเงื่อนไขที่ใช้ในการวิเคราะห์นี้ นอกจากนี้ การพบ chlorophylls degradation ได้ผลิตภัณฑ์เป็น pheophytin *a* และ *b* น่าจะเป็นผลมาจากการจัดการหลังการเก็บเกี่ยวของใบก่อนการสกัด การอบแห้งด้วยลมร้อนและการอบใบโหระพาในระหว่างการเตรียมวัตถุดิบ คล้ายกับวิธีการที่ใช้โดยทั่วไปของคนท้องถิ่นซึ่งจะมีสภาวะที่เหมาะสมแก่การเกิด chlorophylls degradation เป็นที่รู้กันว่าคลอโรฟิลล์มีความไวมากต่อความร้อน ความร้อนจะทำให้เกิด metal free pheophytin derivative (Oonsivilai et al., 2007)

คลอโรฟิลล์ที่พบในพืชมี 2 ชนิด คือ chlorophyll *a* และ chlorophyll *b* ในอัตราส่วน 3:1 คลอโรฟิลล์ทั้งสองชนิดมีโครงสร้างเหมือนกัน แตกต่างกันที่หมู่ในบางตำแหน่งของโครงสร้างโมเลกุล โครงสร้างของคลอโรฟิลล์อาจแบ่งได้เป็นสองส่วน คือ ส่วนหัว และส่วนหาง โดยที่ส่วนหัวของคลอโรฟิลล์มีลักษณะเป็นวงแหวนไพโรล (pyrole ring) ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบอยู่ 4 วง และมีธาตุแมกนีเซียมอยู่ตรงกลางโดยทำพันธะกับไนโตรเจน ส่วนหางของคลอโรฟิลล์มีลักษณะเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ 20 อะตอม ในธรรมชาติมีคลอโรฟิลล์อยู่หลายชนิดด้วยกัน ซึ่งแต่ละชนิดมีโครงสร้างหลักที่เหมือนกันคือ วงแหวนไพโรล 4 วง แต่โซ่ข้าง (side chain) ของคลอโรฟิลล์แต่ละชนิดจะมีลักษณะที่ต่างกันไป เช่น chlorophyll *a* และ chlorophyll *b* มีโครงสร้างโมเลกุลที่ต่างกันเพียงตำแหน่งเดียวเท่านั้น นั่นคือ ที่วงแหวนไพโรล วงที่สองของ chlorophyll *a* มีโซ่ข้างเป็นหมู่เมทิล (-CH₃) ส่วนของ chlorophyll *b* เป็นหมู่อัลดีไฮด์ (-CHO) ซึ่งการที่มีโครงสร้างที่ต่างกันนี้ก็ทำให้มีคุณสมบัติแตกต่างกัน

จากผลการศึกษาสารพฤกษเคมีในสารสกัดโหระพาที่สกัดด้วยเอทิล อะซิเตท จะมีปริมาณ chlorophyll *a* สูงกว่าสารสกัดเอทานอล ในขณะที่สารสกัดเอทานอลมีปริมาณ chlorophyll *b*, pheophytin *a*, pheophytin *b*, total chlorophylls และ lutein มากกว่าสารสกัดเอทิล อะซิเตท อาจเนื่องมาจากสารเหล่านี้มีโครงสร้างที่ต่างกัน ทำให้ความสามารถในการละลายของสารพฤกษเคมีในตัวทำละลายต่างกัน โดยสารพฤกษเคมีในโหระพาที่มีความเป็นขี้เกลือใกล้เคียงกับตัวทำละลายใดมากที่สุดก็就会被สกัดออกมาในตัวทำละลายนั้นได้มากที่สุด ในส่วนของปริมาณสารพฤกษเคมีในสารสกัดโหระพาไทยทั้งสองสายพันธุ์นั้นแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ฤดูกาล สิ่งแวดล้อม พันธุกรรม สารประกอบในพืชต้นกำเนิด

4.1.2 การศึกษาหา phenolic profiling ของสารสกัดโหระพาไทย

การแยก phenolic ของสารสกัดโหระพาไทยโดยวิธี HPLC ได้รับการยอมรับว่าประกอบไปด้วย phenolic acids หลายชนิด และ flavonoid รวมทั้ง gallic acid, catechin, apigenin, caffeic acid, coumaric acid, ferulic acid และ sinapic acid โดย phenolic profiling ของสารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ *Thyrsiflorum* และ Jumbo 4320 แสดงดังตารางที่ 4.2 gallic acid, catechin, apigenin, caffeic acid, coumaric acid, ferulic acid และ sinapic acid ถูกค้นพบด้วย co-chromatography ร่วมกับสารมาตรฐาน ซึ่งพบว่า gallic acid ของสารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ *Thyrsiflorum* และ Jumbo 4320 ที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล และเอทิล อะซิเตท มีปริมาณ 248.60±7.61, 186.98±0.66, 189.55±1.14 µg/g RM และ 227.70± 2.39, 195.78±0.93 และ 190.14±0.56 µg/g RM ตามลำดับ catechin ของสารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ *Thyrsiflorum* ที่สกัดด้วยน้ำ และเอทานอล มีปริมาณ 111.49±7.65 และ 131.94±5.10 µg/g RM ตามลำดับ ในส่วนของสารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ Jumbo 4320 ที่สกัดด้วยน้ำ มีปริมาณ catechin ที่ 201.05±9.18 µg/g RM catechin ของสารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ Jumbo 4320 ที่สกัดด้วยเอทานอลและสกัดด้วยเอทิล อะซิเตทของทั้งสองสายพันธุ์ไม่ถูกตรวจพบ apigenin

สามารถตรวจพบได้เฉพาะในสารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ Jumbo 4320 ที่สกัดด้วยน้ำ caffeic acid ของสารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ *Thyrsiflorum* และ Jumbo 4320 ที่สกัดด้วยน้ำ และเอทานอล มีปริมาณ 19.52 ± 0.71 , 32.83 ± 2.32 $\mu\text{g/g}$ RM และ 63.76 ± 0.79 , 32.94 ± 2.50 $\mu\text{g/g}$ RM ตามลำดับ caffeic acid ของสารสกัดโหระพาไทยที่สกัดด้วยเอทิล อะซิเตทของทั้งสองสายพันธุ์ไม่ถูกตรวจพบ coumaric acid ของสารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ *Thyrsiflorum* และ Jumbo 4320 ที่สกัดด้วยน้ำ และเอทานอล มีปริมาณ 178.81 ± 0.54 , 175.00 ± 0.55 $\mu\text{g/g}$ RM และ 178.65 ± 0.36 , 188.69 ± 2.14 $\mu\text{g/g}$ RM ตามลำดับ coumaric acid ของสารสกัดโหระพาไทยที่สกัดด้วยเอทิล อะซิเตทของทั้งสองสายพันธุ์ ไม่ถูกตรวจพบ ferulic acid ไม่ถูกตรวจพบในสารสกัดทั้งสองสายพันธุ์ ทั้ง 3 ตัวทำละลาย sinapic acid ของสารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ *Thyrsiflorum* ที่สกัดด้วยเอทานอล มีปริมาณ 107.53 ± 0.96 $\mu\text{g/g}$ RM ในส่วนของ sinapic acid ของสารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ Jumbo 4320 ที่สกัดด้วยน้ำ และเอทานอล มีปริมาณ 104.88 ± 1.08 และ 111.42 ± 1.01 $\mu\text{g/g}$ RM ตามลำดับ

จากรายงานที่ผ่านมาสอดคล้องกับผลที่ได้ มีรายงานว่าโหระพามี phenolic acids ได้แก่ p-coumaric acid, caffeic acid, sinapic acid (Bais et al., 2002; Lee et al., 2010; Javanmardi et al., 2003); flavonoids และ tannins (Grayer et al., 1996) อย่างไรก็ตาม ความแปรผันของพันธุ์พืช และสภาวะแวดล้อมในการเจริญเติบโตอาจส่งผลต่อความแตกต่างของ phenolic profiling เนื่องจากการศึกษาต้องการใช้ตัวอย่างที่มีตามท้องตลาดจึงอาจส่งผลให้เกิดความแตกต่างขององค์ประกอบทางเคมีที่เกิดจากสภาวะแวดล้อมในการเจริญเติบโตของโหระพาได้

จากผลการศึกษารสพฤกษเคมีในสารสกัดโหระพาไทยทั้ง 2 สายพันธุ์ จะเห็นได้ว่าน้ำ และเอทานอลสามารถสกัดสาร phenolic profiling ได้ดีกว่าเอทิล อะซิเตท เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่พบได้ในพืชทั่วไป มีคุณสมบัติเป็นสารอินทรีย์ที่มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนอะโรมาติก (aromatic ring) ที่มีจำนวน hydroxyl group อย่างน้อยหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งหมู่ในโมเลกุล ทำให้สามารถละลายได้ในน้ำหรือตัวทำละลายที่มีขั้วได้ดีกว่า

ตารางที่ 4.1 Phytochemical profile ของสารสกัดโหระพาไทย

Phytochemical Contents ($\mu\text{g/g}$ RM)	<i>Ocimum basilicum</i> var. <i>thrysiflorum</i>			<i>Ocimum basilicum</i> cv. Jumbo 4320		
	Solvent			Solvent		
	Water	Ethanol	Ethyl acetate	Water	Ethanol	Ethyl acetate
Chlorophyll <i>a</i>	ND	2,191.18 \pm 3.61 ^{b,e}	4,188.29 \pm 6.96 ^{d,f}	ND	1,547.30 \pm 2.69 ^{a,e}	3,369.72 \pm 6.58 ^{c,f}
Chlorophyll <i>b</i>	ND	1,355.73 \pm 0.86 ^{b,f}	1,280.29 \pm 0.79 ^{d,e}	ND	1,130.35 \pm 0.10 ^{a,f}	1,089.77 \pm 1.92 ^{c,e}
Pheophytin <i>a</i>	ND	3,916.84 \pm 1.06 ^{a,f}	1,159.26 \pm 2.75 ^{c,e}	ND	4,127.16 \pm 1.95 ^{b,f}	1,707.61 \pm 1.87 ^{d,e}
Pheophytin <i>b</i>	ND	94.09 \pm 0.72 ^{a,f}	20.34 \pm 0.61 ^{c,e}	ND	124.58 \pm 0.37 ^{b,f}	70.47 \pm 2.36 ^{d,e}
Lutein	ND	405.24 \pm 0.23 ^{b,f}	374.31 \pm 0.62 ^{d,e}	ND	360.51 \pm 0.30 ^{a,f}	306.01 \pm 0.68 ^{c,e}
Total chlorophylls	ND	7,557.84 \pm 6.25 ^{b,f}	6,648.18 \pm 11.11 ^{d,e}	ND	6,929.39 \pm 5.11 ^{a,f}	6,237.57 \pm 12.73 ^{c,e}

Note: Each value is mean \pm SD (n=3), ND Means not detected

^{a,b} Data within the same row with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$) for ethanol extraction between species.

^{c,d} Data within the same row with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$) for ethyl acetate extraction between species.

^{e,f} Data within the same row with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$) for different solvent extraction within the same species.

ตารางที่ 4.2 Phenolics profile ของสารสกัดโหระพาไทย

Phenolics Contents ($\mu\text{g/g}$ RM)	<i>Ocimum basilicum</i> var. <i>thrysiflorum</i>			<i>Ocimum basilicum</i> cv. Jumbo 4320		
	Solvent					
	Water	Ethanol	Ethyl acetate	Water	Ethanol	Ethyl acetate
Gallic acid	248.60 \pm 7.61 ^{b,f}	186.98 \pm 0.66 ^{c,e}	189.55 \pm 1.14 ^e	227.70 \pm 2.39 ^{a,g}	195.78 \pm 0.93 ^{d,f}	190.14 \pm 0.56 ^e
Catechin	111.49 \pm 7.65 ^{a,e}	131.94 \pm 5.10 ^f	ND	201.05 \pm 9.18 ^b	ND	ND
Apigenin	ND	ND	ND	29.56 \pm 0.65	ND	ND
Caffeic acid	19.52 \pm 0.71 ^{a,e}	32.83 \pm 2.32 ^f	ND	63.76 \pm 0.79 ^{b,f}	32.94 \pm 2.50 ^e	ND
Coumaric acid	178.81 \pm 0.54 ^f	175.00 \pm 0.55 ^{c,e}	ND	178.65 \pm 0.36 ^e	188.69 \pm 2.14 ^{d,f}	ND
Ferulic acid	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sinapic acid	ND	107.53 \pm 0.96 ^c	ND	104.88 \pm 1.08 ^e	111.42 \pm 1.01 ^{d,f}	ND

Note: Each value is mean \pm SD (n=3), ND Means not detected.

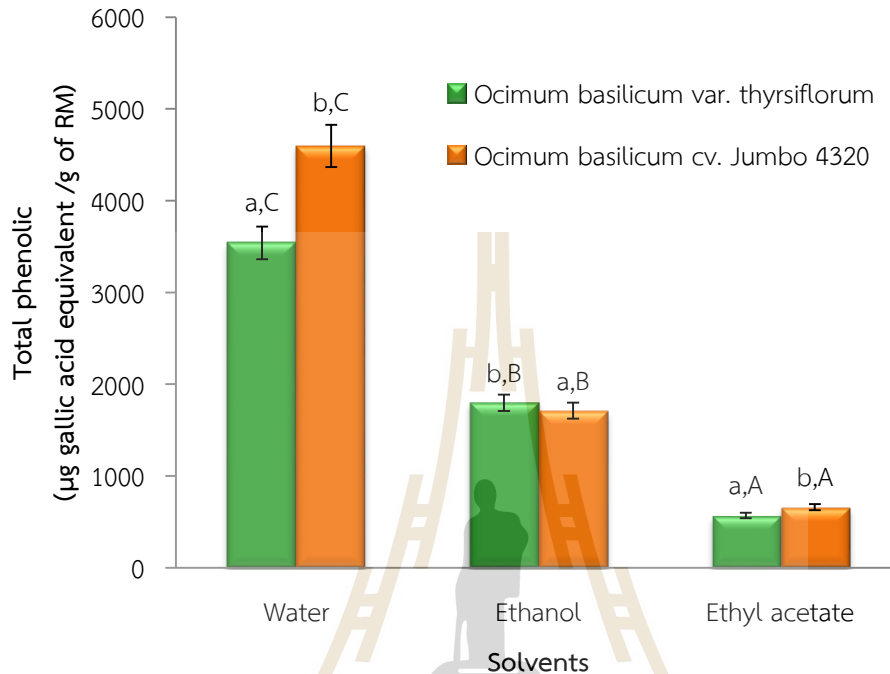
^{a,b} Data within the same row with different superscripts are significantly different (p<0.05) for water extraction between species.

^{c,d} Data within the same row with different superscripts are significantly different (p<0.05) for ethanol extraction between species.

^{e,f,g} Data within the same row with different superscripts are significantly different (p<0.05) for different solvent extraction within the same species.

4.1.3 การศึกษาหาปริมาณ total phenolic

ปริมาณ total phenolic ของสารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ *Thyrsiflorum* และ Jumbo 4320 ที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล และเอทิล อะซิเตท วิเคราะห์โดยวิธี Folin-Ciocalteu ปริมาณ total phenolic ของตัวอย่างทั้งหมด แสดงดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 Total phenolic contents ของสารสกัดโหระพาไทย

Data are mean \pm SD (n=3)

^{a,b} Different letters over the error bars denote that the means differed significantly (p<0.05) on species.

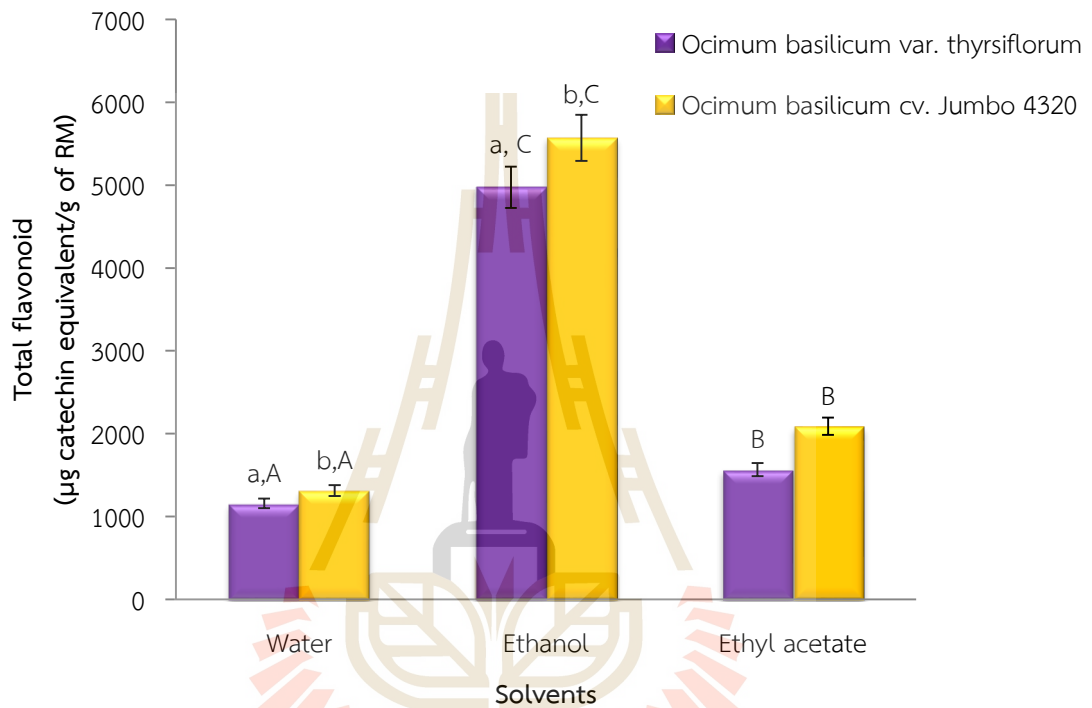
^{A,B,C} Different letters over the error bars denote that the means differed significantly (p<0.05) on solvents.

ปริมาณ total phenolic ของตัวอย่างทั้งหมดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดย total phenolic ของสารสกัดโหระพาไทยที่สกัดด้วยน้ำแสดงปริมาณสูงสุด ตามด้วยสารสกัดโหระพาไทยที่สกัดด้วยเอทานอลและเอทิล อะซิเตท ตามลำดับ นอกจากนี้ total phenolic ของสารสกัดโหระพาไทยทั้งสองสายพันธุ์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) และสารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ Jumbo 4320 ที่สกัดด้วยน้ำ แสดงปริมาณ total phenolic สูงสุดที่ค่า $4,596.19 \pm 3.07$ µg gallic acid equivalent/g of RM สารประกอบฟีนอลิกมักจะถูกสกัดออกมาได้ปริมาณที่มากกว่าในตัวทำละลายที่มีขั้วมากขึ้น เช่น ในน้ำ ในเมทานอล/เอทานอล (Quy et al., 2014)

4.1.4 การศึกษาหาปริมาณ total flavonoid

ปริมาณ total flavonoid ของตัวอย่างทั้งหมด แสดงดังรูปที่ 4.2 ปริมาณ total flavonoid ของตัวอย่างทั้งหมดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดย total flavonoid ของสาร

สกัดโหระพาไทยที่สกัดด้วยเอทานอลแสดงปริมาณสูงสุด ตามด้วยสารสกัดโหระพาไทยที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตทและน้ำ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างโหระพาไทยทั้งสองสายพันธุ์ พบว่า สารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ Jumbo 4320 แสดงปริมาณ total flavonoid ที่สูงกว่าสารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ *Thyrsiflorum* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ปริมาณ total flavonoid ของสารสกัดโหระพาไทยทั้งสองสายพันธุ์ที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตทไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยสารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ Jumbo 4320 ที่สกัดด้วยเอทานอล แสดงปริมาณ total flavonoid สูงสุดที่ค่า $5,571.16 \pm 14.27 \mu\text{g catechin equivalent/g of RM}$



รูปที่ 4.2 Total flavonoid contents ของสารสกัดโหระพาไทย

Data are mean \pm SD (n=3)

^{a,b} Different letters over the error bars denote that the means differed significantly ($p < 0.05$) on species.

^{A,B,C} Different letters over the error bars denote that the means differed significantly ($p < 0.05$) on solvents.

โดยจากผลการศึกษาพบว่า สารสกัดเอทานอล มีปริมาณ total flavonoid สูงสุด ในขณะที่สารสกัดน้ำ มีปริมาณ total phenolic สูงสุด เนื่องจากฟลาโวนอยด์เป็นสารกลุ่มหนึ่งของสารประกอบฟีนอลิก สารสกัดหนึ่งอาจมีฟีนอลิกมากแต่มีฟลาโวนอยด์น้อยเป็นเพราะอาจมีสารตัวอื่นในกลุ่มฟีนอลิกอยู่มาก ส่วนสารสกัดที่มีฟีนอลิกน้อยแต่ฟลาโวนอยด์มากอาจเป็นเพราะในสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดนี้มีฟลาโวนอยด์อยู่มาก ซึ่งฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบฟีนอลิกประเภทโพลีฟีนอล มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนอะโรมาติก (aromatic ring) ที่มีจำนวนหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) รวมอยู่ในโมเลกุล

ตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป สามารถละลายในน้ำและตัวทำละลายที่มีขี้ผึ้งได้ดี ส่วนใหญ่มักพบอยู่รวมกับน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ (glycoside) ความแตกต่างในโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกกำหนดการละลายในตัวทำละลายของขี้ผึ้งที่แตกต่างกัน ตัวทำละลายที่แตกต่างกันที่ใช้ในการสกัดส่งผลให้มีความแตกต่างในองค์ประกอบของสารสกัด สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ โมเลกุลจะประกอบด้วยส่วนที่มีขี้ผึ้งและไม่มีขี้ผึ้ง โครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยส่วนที่มีขี้ผึ้ง คือส่วนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซิลและส่วนที่ไม่มีขี้ผึ้ง คือส่วนที่เป็นหมู่อัลคิลเช่นเดียวกัน สารกลุ่มนี้จึงสามารถละลายได้ดีในแอลกอฮอล์

สารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์ เช่น cinnamic acid, caffeic acid, sinapic acid, ferulic acid และ rosmarinic acid ในโหราพาได้เคยมีการรายงานไว้ (Grayer et al., 1996) องค์ประกอบทางเคมีของโหราพามีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ฤดูกาล ปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมและพันธุกรรม chemotype และต้นกำเนิดของพืช (Sajjadi, 2006) ตัวทำละลายที่มีขี้ผึ้งถูกนำมาใช้บ่อยๆ สำหรับการ recovering polyphenols จากเมทริกซ์ของพืช ตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดคือสารผสมของน้ำที่ประกอบด้วยเอทานอล เมทานอล อะซิโตน และเอทิล อะซิเตท เอทานอลเป็นที่รู้จักว่าเป็นตัวทำละลายที่ดีในการสกัดสารโพลีฟีนอลและปลอดภัยสำหรับการบริโภคของมนุษย์ (Quy et al., 2014)

4.2 การศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ของสารสกัดโหราพาไทย

4.2.1 การศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดในการรวมตัวกับ DPPH ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่เสถียรที่อยู่ในสารละลาย โดย DPPH คืออนุมูลอิสระที่เสถียรและสามารถรับอิเล็กตรอนได้ เมื่อได้รับอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลอื่นจะทำให้เปลี่ยนเป็นโมเลกุลที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระ ในการศึกษาได้วิเคราะห์ความสามารถของสารสกัดในการทำให้ความเข้มข้นของ DPPH[•] ลดลง 50% (IC₅₀) โดยใช้ BHT และ Ascorbic acid เป็นตัวควบคุม

ตารางที่ 4.3 DPPH radical scavenging activity ของสารสกัดโหราพาไทย

Solvents	DPPH IC ₅₀ (mg RM/ml)	
	<i>Ocimum basilicum</i> var. <i>thyriflorum</i>	<i>Ocimum basilicum</i> cv. Jumbo 4320
Water	105.62 ± 3.77 ^{b,D}	48.52 ± 1.15 ^{a,B}
Ethanol	53.88 ± 0.74 ^{a,B}	60.54 ± 0.52 ^{b,C}
Ethyl acetate	72.48 ± 5.57 ^C	82.09 ± 3.18 ^D
BHT	0.18 ± 0.00 ^A	0.18 ± 0.00 ^A
Ascorbic acid	0.06 ± 0.00 ^A	0.06 ± 0.00 ^A

Note: Each value is mean ± SD (n=3)

^{a,b} Data within the same row with different superscripts are significantly different (p<0.05).

^{A,B,C,D} Data within the same column with different superscripts are significantly different (p<0.05).

DPPH radical scavenging activity ของตัวอย่างทั้งหมด แสดงดังตารางที่ 4.3 สารสกัดโหระพาไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายแตกต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในการกำจัดอนุมูล DPPH เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดโหระพาไทยทั้งสองสายพันธุ์ พบว่า ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโหระพาไทยที่สกัดด้วยน้ำและเอทานอลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่สารสกัดโหระพาไทยที่สกัดด้วยเอทิล อะซิเตท มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกัน โดยสารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ Jumbo 4320 ที่สกัดด้วยน้ำแสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดที่ค่า IC_{50} 48.52 ± 1.15 mg RM/ml ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ของสารสกัดโหระพาไทย มีค่าน้อยกว่า BHT และ ascorbic acid ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐานทางการค้า

DPPH radical scavenging activity เป็นการทดสอบที่เลือกใช้ในการศึกษาฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากความสามารถในการเป็นตัวให้อิเล็กตรอนอะตอมหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ โดยสารสกัดที่มีค่า IC_{50} ต่ำกว่า จะมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่า (ค่าจะแปรผกผัน) ยังมีค่า IC_{50} ต่ำเท่าไรจะแสดงว่าเป็นตัวให้อิเล็กตรอนอะตอมหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระที่ดีมากเท่านั้น

4.2.2 การศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric-reducing antioxidant power (FRAP)

Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assay เป็นการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดซึ่งเกิดจากการรีดิวซ์ โดยใช้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอริก Fe^{3+} กับ TPTZ (ferric tripyridyltriazine) ได้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอรัส Fe^{2+} กับ TPTZ ซึ่งมีสีน้ำเงิน และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร

ตารางที่ 4.4 Ferric reducing antioxidant power ของสารสกัดโหระพาไทย

Solvents	FRAP ($\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g RM}$)	
	<i>Ocimum basilicum</i> var. <i>thrysiflorum</i>	<i>Ocimum basilicum</i> cv. Jumbo 4320
	Water	$13.86 \pm 0.07^{b,A}$
Ethanol	$18.64 \pm 0.13^{b,A}$	$15.30 \pm 0.11^{a,A}$
Ethyl acetate	$1.16 \pm 0.02^{a,A}$	$1.61 \pm 0.04^{b,A}$
BHT	$2,615.95 \pm 0.04^B$	$2,615.95 \pm 0.04^B$

Note: Each value is mean \pm SD (n=3)

^{a,b} Data within the same row with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

^{A,B} Data within the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

FRAP ของตัวอย่างทั้งหมด แสดงดังตารางที่ 4.4 เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดโหระพาไทยทั้ง 3 ตัวทำละลาย กับสารมาตรฐานทางการค้า พบว่า ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโหระพาไทยไม่แตกต่างกันแต่แตกต่างกับสารมาตรฐานทางการค้าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดโหระพาไทยทั้งสองสายพันธุ์ พบว่า ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด

โหระพาไทยทั้งสองสายพันธุ์ทุกๆ ตัวทำละลายมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยสารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ *thysiflorum* ที่สกัดด้วยเอทานอลแสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดที่ค่า FRAP $18.64 \pm 0.13 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g RM}$ ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP ของสารสกัดโหระพาไทย มีค่าน้อยกว่า BHT ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐานทางการค้า

FRAP เป็นการทดสอบที่เลือกใช้ในการศึกษาฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากความสามารถในการรีดิวซ์เหล็ก โดยสารสกัดที่มีค่า FRAP สูงกว่าจะมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่า (ค่าจะแปรผันตรง) ยังมีค่า FRAP สูงเท่าไรจะแสดงว่ามีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กได้ดีมากเท่านั้น

Wong et al. (2006) ได้จำแนกพืชสมุนไพรโดยขึ้นอยู่กับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของพืชเหล่านั้นจากการทดสอบ FRAP ได้เป็น สูงมาก ($>500 \mu\text{mol Fe(II)}/\text{g}$, สูง ($100-500 \mu\text{mol Fe(II)}/\text{g}$, ปานกลาง ($10-100 \mu\text{mol Fe(II)}/\text{g}$), และ ต่ำ ($<10 \mu\text{mol Fe(II)}/\text{g}$) ภายใต้เกณฑ์นี้ สารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ *thysiflorum* ที่สกัดด้วยน้ำและเอทานอล และสารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ Jumbo 4320 ที่สกัดด้วยเอทานอล สามารถจำแนกได้ว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระปานกลาง ส่วนสารสกัดอื่นๆ จำแนกได้ว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำ โดยสารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ *thysiflorum* ที่สกัดด้วยเอทานอลแสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดที่ค่า FRAP $18.64 \pm 0.13 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g RM}$

4.2.3 Cellular antioxidant activity (CAA)

1. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดโหระพาไทย (Cytotoxicity)

ระบบชีวภาพมีความซับซ้อนมากกว่าการผสมสารเคมีแบบง่ายๆ และสารต้านอนุมูลอิสระอาจทำงานผ่านทางกลไกหลายอย่าง (Wolfe et al., 2007) ประสิทธิภาพที่แตกต่างกันของสารในการทดสอบต่างๆ ยืนยันถึงความแปรผันของการทำงาน การวัดผลที่ดีที่สุดคือจากการศึกษาในสัตว์ (animal models) และการศึกษาในมนุษย์ อย่างไรก็ตาม วิธีเหล่านี้มีราคาแพงและต้องใช้เวลาอันไม่เหมาะสมสำหรับการตรวจคัดกรองสารต้านอนุมูลอิสระในตอนเริ่มต้นของอาหารและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร (Liu et al., 2005) cell culture models เป็นวิธีการที่ cost-effective ค่อนข้างรวดเร็ว และสามารถที่จะรู้ได้ถึง การดูดซึม การแพร่กระจาย และเมแทบอลิซึม (Wolfe et al., 2007)

ตารางที่ 4.5 Cytotoxicity ของสารสกัดโหระพาไทย

Solvents	Cytotoxicity LC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
	<i>Ocimum basilicum</i> var. <i>thysiflorum</i>	<i>Ocimum basilicum</i> cv. Jumbo 4320
	Water	$966.50 \pm 39.07^{b,B}$
Ethanol	688.85 ± 31.37^A	632.19 ± 20.92^B
Ethyl acetate	624.36 ± 30.54^A	640.82 ± 11.96^B

Note: Each value is mean \pm SD (n=5)

^{a,b} Data within the same row with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$) on species.

^{A,B} Data within the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$) on solvents.

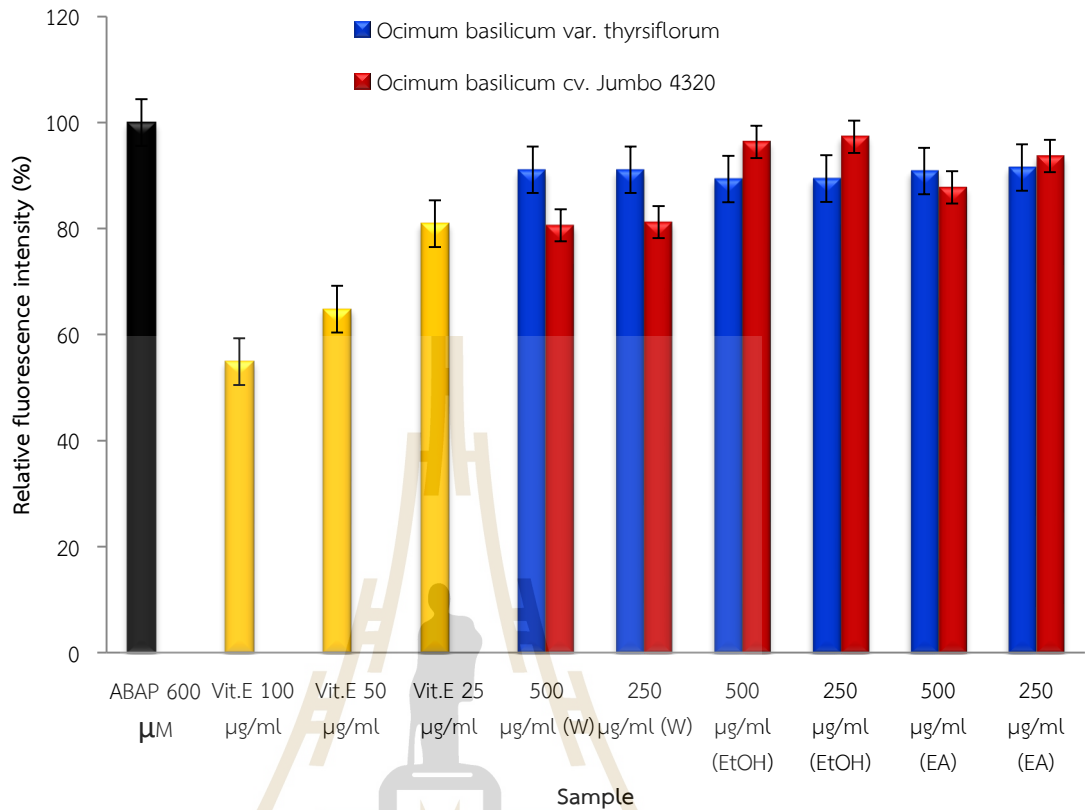
ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ *Thyrsiflorum* และ Jumbo 4320 ได้ทำการศึกษาด้วยเซลล์ไลน์ HepG2 โดยใช้ MTT assay เมื่อเลี้ยงเซลล์ด้วยสารสกัดโหระพาไทยที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 50 - 500 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การรอดชีวิตของเซลล์ลดลงอย่างต่อเนื่องสัมพันธ์กับ dose-dependent เอนไซม์ไมโทคอนเดรียในสิ่งมีชีวิต คือ succinate-dehydrogenase จะแยก tetrazolium ring ออก เปลี่ยน MTT เป็น formazan สีม่วงที่ไม่ละลายน้ำ สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ 570 nm ผลของสารพิษจะแสดงในค่า LC_{50} ของเซลล์เทียบกับตัวควบคุม ค่า LC_{50} ของสารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ *Thyrsiflorum* และ Jumbo 4320 แสดงดังตารางที่ 4.5 ผลจากการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากโหระพาไทยทั้งหมดมีค่า LC_{50} สูงมาก (>200 $\mu\text{g/ml}$) ต่อเซลล์ไลน์ ซึ่งแสดงถึงความไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (Okonogi et al., 2007)

2. Cellular antioxidant activity (CAA) โดย DCFH-DA assay

มีวิธีการทดลองเพื่อประเมินสารต้านอนุมูลอิสระทาง *in vitro* โดยใช้สารเคมีมากมาย เช่น thiobarbituric acid (TBA) colorimetric method, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) และ oxygen radical absorbing capacity (ORAC) อย่างไรก็ตาม สิ่งสำคัญคือต้องทราบผลตอบกลับอย่างไรจากวิธี *in vitro* ในการประเมินผลของ *in vivo* activity เทคโนโลยี fluorescent ทำให้สามารถประเมินสารต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ที่มีชีวิตได้โดยใช้ตัวตรวจวัดที่เฉพาะเจาะจง เช่น 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) วิธีการใช้เซลล์ร่วมกับเทคโนโลยี fluorescent เป็นประโยชน์สำหรับการตรวจสอบโดยตรงของความสามารถของผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เช่น polyphenols และ flavonoids ต่อกับยับยั้ง ROS ในเซลล์มนุษย์ที่มีชีวิต (Takamatsu et al., 2003)

ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโหระพาไทยที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล และเอทิลอะซิเตท ได้ทำการวิเคราะห์ด้วย DCFH-DA-cell-based assay โดยเลี้ยงเซลล์ HepG2 ด้วยสารสกัดโหระพาไทยที่มีความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และบ่มด้วย 600 μM 2,2'-Azobis (2-amidino propane) dihydrochloride (ABAP) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง cellular antioxidant activities ในแต่ละตัวอย่างแสดงดังรูปที่ 4.3 ผลการศึกษา พบว่า กราฟ dose-response ของโหระพาไทยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัด เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดโหระพาไทยเพิ่มขึ้นจะสามารถลดการเกิดออกซิเดชันของ DCFH ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของ ABAP ได้ ในการเปรียบเทียบระหว่างตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด พบว่า cellular antioxidant activities โดยใช้ DCFH-DA assay มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ทั้งในตัวทำละลายและสายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษา โดยสารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ Jumbo 4320 ที่สกัดด้วยน้ำ แสดงค่า cellular antioxidant activity โดยใช้ DCFH-DA assay สูงสุดที่ค่า relative fluorescence intensity $80.62 \pm 0.00\%$ ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าโหระพาไทยมีผลต่อการกำจัดอนุมูลอิสระในเซลล์ และ cellular antioxidant activity โดยใช้ DCFH-DA assay ของสารสกัดโหระพาไทยทั้งหมดมีค่าน้อยกว่าวิตามินอี ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐานทางการค้า โดยจากผลการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ของสารสกัดโหระพาไทย พบว่า สารสกัดน้ำ แสดงค่า cellular antioxidant activity โดยใช้ DCFH-DA assay มากกว่าสารสกัดเอทานอล และสารสกัดเอทิล อะซิเตท ตามลำดับ โดยฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ของสารสกัดโหระพาไทยอาจขึ้นอยู่กับความสามารถในการเจาะผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของสารออกฤทธิ์ โดย Takamatsu et al. (2003) ได้พบว่าประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระขึ้นอยู่กับขอบเขตความสามารถในการเจาะผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ วิตามินซีซึ่งเป็น hydrophilic anti-oxidant แสดงฤทธิ์ที่แข็งแกร่งที่สุดในทางตรงกันข้าม carotene ซึ่งเป็นสาร lipophilic และเป็นสารต้านอนุมูล

อิสระที่รู้จักกันดี ไม่ได้ยับยั้ง DCF-production ภายใน intercellular ซึ่งน่าจะมาจากปัญหาการผ่านเข้าสู่เซลล์ วิตามินอีเป็นสาร lipophilic และแสดงฤทธิ์ในการกำจัดที่อ่อนในเซลล์ HL-60



รูปที่ 4.3 Cellular antioxidant activity (CAA) โดยใช้ DCFH-DA assay ของสารสกัดโหระพาไทย (W = สารสกัดโหระพาไทยที่สกัดด้วยน้ำ, EtOH = สารสกัดโหระพาไทยที่สกัดด้วยเอทานอล น้ำ และ EA = สารสกัดโหระพาไทยที่สกัดด้วยเอทิล อะซิเตท)

Data are mean \pm SD (n=5), all sample are significantly different (p<0.05).

สำหรับวิธีการวิเคราะห์ผลทั้งหมด (DPPH, FRAP และ CAA) สารสกัดโหระพาไทยทุกตัวอย่างแสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ แต่ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของสารสกัดแต่ละชนิด ความแตกต่างของฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระระหว่างสารสกัดโหระพาไทย อาจเกิดจากหลายปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นของสารสกัดและคุณภาพของสารสกัด สารสกัดจากน้ำมีส่วนประกอบหลักเป็นสารประกอบฟีนอลิก ในขณะที่สารสกัดจากเอทานอลมีส่วนประกอบหลักคือ สารประกอบฟีนอลิก อนุพันธ์ของคลอโรฟิลล์และลูทีน สารสกัดจากเอทิล อะซิเตท แสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าประกอบไปด้วยคลอโรฟิลล์ อนุพันธ์ของคลอโรฟิลล์และลูทีน สิ่งนี้อาจจะอธิบายได้ว่าคลอโรฟิลล์ อนุพันธ์ของคลอโรฟิลล์ มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระต่ำ นอกจากนี้ ปริมาณของลูทีนที่แสดงในสารสกัดโหระพาไทยที่สกัดด้วยเอทิล อะซิเตท มีปริมาณต่ำมากส่งผลให้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระต่ำ รวมถึงความสามารถในการเจาะผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของสารออกฤทธิ์ด้วย

สารต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดในพืชเป็นสารประกอบฟีนอลิก โหระพาเป็นที่รู้จักกันว่ามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่แข็งแกร่งเนื่องจากใบโหระพาประกอบไปด้วยสารประกอบฟีนอลิก โดยเฉพาะ

อย่างยิ่ง rosmarinic acid, chicoric acid, caftaric acid, cinnamic acid, caffeic acid, sinapic acid, และ ferulic acid (Boggia et al., 2015) นอกจากนี้ โหระพายังประกอบไปด้วย polyphenols และ flavonoids เช่น quercetin, kaempferol และ myricetin; tannins เช่น catechin, pigment เช่น anthocyanins และ essential oil เช่น eugenol และ methyl chavicol (Bora et al., 2011) ความแตกต่างในโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกจะเป็นตัวกำหนดความสามารถในการละลายในตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกัน ดังนั้น ชนิดของตัวทำละลายในการสกัดอาจมีผลกระทบต่อผลผลิตของโพลีฟีนอลที่สกัดจากพืช (Zlotek et al., 2015) ตัวทำละลายที่แตกต่างกันที่ใช้ในการสกัดทำให้เกิดความแตกต่างในส่วนประกอบและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด สารสกัดที่มีสารประกอบฟีนอลิกที่มีกลุ่มไฮดรอกซิลสูงกว่าจะมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่า (Quy et al., 2014)

ผลจากการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระแสดงให้เห็นว่าสารสกัดโหระพาไทยทั้งหมดอาจทำหน้าที่เป็นตัวกำจัดอนุมูลอิสระได้ในระดับหนึ่ง ผลการศึกษาดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าโหระพาไทยอาจเป็นแหล่งธรรมชาติในการต้านอนุมูลอิสระในอาหารแต่ปริมาณที่ต้องการในการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระให้มีความคล้ายคลึงกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานอาจต้องใช้ในปริมาณมาก ใบของโหระพาไทยสามารถนำไปใช้ได้เนื่องจากมีราคาถูก จึงเป็นแหล่งเศรษฐกิจของสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติเพื่อใช้เป็นอาหารเสริมหรือวัตถุดิบอาหาร

4.3 การศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial activity) ของสารสกัดโหระพาไทย

4.3.1 Disk diffusion method

ฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดโหระพาไทยวิเคราะห์โดยใช้ agar disk diffusion method เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสจะเป็นตัวบ่งชี้ถึงฤทธิ์ในการยับยั้ง ฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดโหระพาไทยแต่ละตัวอย่างแสดงดังตารางที่ 4.6 พบว่า สารสกัดโหระพาไทยทั้งหมด ไม่มีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ใช้ทดสอบ ยกเว้น สารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ *thyrsliflorum* ที่สกัดด้วยเอทิล อะซิเตท และสารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ Jumbo 4320 ที่สกัดด้วยน้ำ มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค *Bacillus cereus* ฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดโหระพาไทยมีค่าน้อยกว่าคลอแรมเฟนิคอลซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐานอ้างอิง โดยฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดโหระพาไทยอาจเนื่องมาจากกลไกการออกฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหย สารฟีนอลิกและโพลีฟีนอลในโหระพาต่อเชื้อจุลินทรีย์ น้ำมันหอมระเหยสามารถผ่านผนังเซลล์และเยื่อหุ้มนิวเคลียสไปรบกวนโครงสร้างของชั้นที่แตกต่างของ polysaccharides, กรดไขมันและ phospholipids และ permeabilize ของจุลินทรีย์ได้ กล่าวคือ hydrophobic essential oils components คือการที่ไม่ชอบน้ำของส่วนประกอบน้ำมันหอมระเหยจะรบกวนไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย จึงรบกวนโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ รบกวนระบบการทำงานของเอนไซม์ น้ำมันหอมระเหยมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตพลังงานหรือสามารถทำให้เกิดการเสียหายของโปรตีน, ปรับเปลี่ยนการซึมผ่านผนังเซลล์ ก่อให้เกิดการสูญเสียของ macromolecules ขึ้น ในส่วนของสารฟีนอลิกและโพลีฟีนอล สารเหล่านี้จะไปรบกวนเมมเบรนมีความสามารถในการยับยั้งการจับกับ adhesins โดยเฉพาะการยับยั้งเอนไซม์ การยับยั้งที่เกี่ยวข้องด้วยความสามารถในการจับกับโปรตีน blocking some metabolic pathways (Sienkiewicz et al., 2013)

โหระพาไทยทั้งสองสายพันธุ์ไม่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่ใช้ในการทดสอบ ผลการทดสอบนี้สอดคล้องกับ Shafique et al. (2010) ซึ่งรายงานว่าสารสกัดโหระพาที่สกัดด้วยเอทานอล

ไม่มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis*, *Enterobacter species*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* Chaisawadi et al. (2005) รายงานว่าสารสกัดโหระพาไม่มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* Balamurugan (2013) รายงานว่าสารสกัดโหระพาที่สกัดด้วยน้ำไม่มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* และ *Escherichia coli* นอกจากนี้ Adiguzel et al. (2005) รายงานว่าสารสกัดโหระพาที่สกัดด้วยเอทานอลไม่มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter aerogenes* และ *Pseudomonas aeruginosa*



ตารางที่ 4.6 Antimicrobial activity ของสารสกัดโหระพาไทย

Type strains	Inhibition zone (mm)						Chloramphenicol (16.67 mg/ml)
	<i>Ocimum basilicum</i> var. <i>thrysiflorum</i> (800 mg RM/ml)			<i>Ocimum basilicum</i> cv. Jumbo 4320 (800 mg RM/ml)			
	Water	Ethanol	Ethyl acetate	Water	Ethanol	Ethyl acetate	
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	7.00 ± 0.00	6.5 ± 0.00	-	-	30.4 ± 1.33 ^b
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	13.3 ± 0.98 ^a
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	-	-	-	-	32.0 ± 0.99 ^c
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	12.6 ± 1.03 ^a
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	32.1 ± 1.03 ^c
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	31.5 ± 0.00 ^c

Note: Each value is mean ± SD (n=3)

- No inhibition zone

^{a,b,c} Data within the same column with different superscripts are significantly different (p<0.05).

4.4 การศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านลิ่มเลือด (Antithrombotic activity) *in vitro* ของสารสกัดโหระพาไทย

4.4.1 Prothrombin time assay

ฤทธิ์ในการต้านลิ่มเลือดของสารสกัดโหระพาไทยวิเคราะห์โดยใช้ prothrombin time assay ค่า prothrombin time (ระยะเวลาการแข็งตัวเป็นลิ่มของเลือด) ของสารสกัดแต่ละตัวอย่างแสดงดังตารางที่ 4.7 จากผลการวิเคราะห์ พบว่า prothrombin time ของโหระพาไทยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัด เมื่อความเข้มข้นของโหระพาไทยเพิ่มขึ้น ค่า prothrombin time ก็จะยืดระยะเวลาการแข็งตัวไปเรื่อยๆ สารสกัดโหระพาไทยแสดงให้เห็นถึงการยืดระยะเวลาการแข็งตัวเป็นลิ่มของเลือด ในการวิเคราะห์นี้ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างโหระพาไทยสองสายพันธุ์ พบว่า สารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ *thyrstiflorum* ที่สกัดด้วยน้ำ (100 $\mu\text{g/ml}$) แสดงการยืดระยะเวลาการแข็งตัวเป็นลิ่มของเลือดมากกว่าสารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ Jumbo4320 ที่สกัดด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ค่า prothrombin time ของสารสกัดตัวอื่นๆ ระหว่างโหระพาไทยสองสายพันธุ์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) สำหรับการเปรียบเทียบตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด พบว่า ค่า prothrombin time ของสารสกัดโหระพาไทยทุกๆ ตัวทำละลายมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ที่ความเข้มข้นของสารสกัดโหระพาไทย 100 $\mu\text{g/ml}$ ใดๆก็ตาม ในส่วนของสารสกัดโหระพาไทยที่สกัดด้วยน้ำและเอทานอลที่ความเข้มข้นอื่นๆ แสดงการยืดระยะเวลาการแข็งตัวเป็นลิ่มของเลือดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในสารสกัดโหระพาไทยที่สกัดด้วยเอทิล อะซิเตท สารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ *thyrstiflorum* และ Jumbo 4320 ที่สกัดด้วยเอทิล อะซิเตท ที่ความเข้มข้น 500 $\mu\text{g RM/ml}$ แสดงการยืดระยะเวลาการแข็งตัวเป็นลิ่มของเลือดสูงสุดที่ 78.3 ± 17.56 วินาที และ 77.3 ± 3.21 วินาที ตามลำดับ ฤทธิ์ในการต้านลิ่มเลือดของสารสกัดโหระพาไทยทุกตัวอย่างมีค่าน้อยกว่า warfarin sodium ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐานอ้างอิง

กระบวนการของการจับตัวเป็นก้อนของเลือดจะเกิดขึ้นผ่านปฏิกิริยาเรียงตามลำดับและ thrombin ซึ่งเป็นเอนไซม์สุดท้ายใน coagulation cascade จะแปลงไฟบริโนเจนที่ละลายน้ำได้ให้เป็นไฟบรินที่ไม่ละลายน้ำ การแข็งตัวของเลือดเกิดจากปฏิกิริยาที่ซับซ้อนของกลไกต่างๆ เกิดเลือดจะเริ่มแข็งตัวโดยการทำลายและเปลี่ยนรูป prothrombin ในเลือดเป็น thrombin ซึ่งเป็นหนึ่งในสารพื้นฐานในการเกิดลิ่มเลือด (Kishore, 2013)

ผลจากการศึกษานี้สอดคล้องกับ Tohti et al. (2006) ซึ่งรายงานว่าโหระพาแสดงการเกิด platelet aggregation และ thrombus ในหนูทดลอง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดโหระพาที่สกัดด้วยน้ำเมื่อให้หนูทางปากเป็นเวลา 15 วัน สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดที่ถูกเหนี่ยวนำโดย ADP และ thrombin และลดน้ำหนักของ thrombus ใน *in vivo* model ของ arterio-venous shunt thrombosis ผลที่เกิดขึ้นเหล่านี้เป็นแบบ dose-dependent Amrani et al. (2009) รายงานว่าได้ศึกษาผลของสารสกัดจากโหระพาที่สกัดด้วยน้ำต่อการขยายตัวของหลอดเลือดและการต้านการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือด พบว่าสารสกัดจากโหระพามีผลต่อการขยายหลอดเลือดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดจากการเหนี่ยวนำของ ADP และสามารถลดการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดจากการเหนี่ยวนำของ thrombin ซึ่งการใช้โหระพาเป็นพืชสมุนไพรอาจเป็นประโยชน์ต่อระบบหมุนเวียนเลือดในร่างกาย

เมื่อเร็วๆ นี้ อาหารที่อุดมไปด้วยโพลีฟีนอลได้แสดงให้เห็นว่ามีบทบาทในเชิงบวกในการทำงานของหลอดเลือดรวมทั้งการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดในมนุษย์ ในความเป็นจริง การศึกษาล่าสุดเกี่ยวกับการทำงานของเกล็ดเลือดแสดงให้เห็นว่าสารประกอบฟีนอลิกที่แยกได้จากพืชสมุนไพรมีผลต่อผลประโยชน์เหล่านี้ (Amrani et al., 2009) flavonoids บางตัวยับยั้งการรวมตัวของเกล็ดเลือดและให้การป้องกันสารต้านอนุมูลอิสระสำหรับ low density lipoprotein (Frankel et al., 1993) Tognolini et al. (2006) แสดงให้เห็นว่าสารที่มีปริมาณฟีนอลสูง เช่น thyme oil, oregano oil และน้ำมันโหระพามีฤทธิ์ต้านเกล็ดเลือดสูงต่อ arachidonic acid และปานกลางต่อ ADP โหระพาแสดงการยับยั้งปานกลางในการต่อต้านการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดที่ปริมาณ eugenol 12.3% ผลดังกล่าวเป็นไปตามรายงานก่อนหน้านี้เกี่ยวกับประสิทธิภาพของ eugenol ในน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการสร้าง Thromboxane A₂ และการเคลื่อนที่ของแคลเซียมในเกล็ดเลือด (Tognolini et al., 2006)



ตารางที่ 4.7 Prothrombin time ของสารสกัดโหระพาไทยต่อพลาสมากระต่าย

Solvents	Prothrombin Time (second)					
	<i>Ocimum basilicum</i> var. <i>thyriflorum</i>			<i>Ocimum basilicum</i> cv. Jumbo 4320		
	(µg RM/ml)			(µg RM/ml)		
	100	250	500	100	250	500
Water	34.7 ± 0.58 ^{b,A}	43.0 ± 0.00 ^B	45.3 ± 0.58 ^{AB}	31.0 ± 1.00 ^{a,B}	42.0 ± 1.00 ^B	46.0 ± 1.00 ^B
Ethanol	38.7 ± 1.15 ^B	47.7 ± 0.58 ^C	53.7 ± 3.21 ^B	37.0 ± 1.00 ^C	43.7 ± 4.93 ^B	46.3 ± 0.58 ^B
Ethyl acetate	57.3 ± 2.52 ^C	69.3 ± 4.04 ^D	78.3 ± 17.56 ^C	54.3 ± 1.15 ^D	69.7 ± 1.53 ^C	77.3 ± 3.21 ^C
Warfarin (6 mg/ml)	144.3 ± 0.58 ^D	144.3 ± 0.58 ^E	144.3 ± 0.58 ^D	144.3 ± 0.58 ^E	144.3 ± 0.58 ^D	144.3 ± 0.58 ^D
Control	33.3 ± 1.53 ^A	33.3 ± 1.53 ^A	33.3 ± 1.53 ^A	33.3 ± 1.53 ^A	33.3 ± 1.53 ^A	33.3 ± 1.53 ^A

Note: Each value is mean ± SD (n=4)

^{a,b} Data within the same row with different superscripts are significantly different (p<0.05) for different species within the same concentration of sample.

^{A,B,C,D,E} Data within the same column with different superscripts are significantly different (p<0.05).

4.5 การศึกษาชีวประสิทธิผล (bioaccessibility) และความคงตัวของสารสกัดโหระพาไทยเมื่อผ่านแบบจำลองของระบบการย่อยอาหารในหลอดทดลอง (*In vitro* digestion models)

การวิเคราะห์นี้จะใช้แบบจำลองระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลอง (*in vitro* simulated digestion models) ซึ่งเป็นการประยุกต์และเลียนแบบระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ อวัยวะที่ถูกเลียนแบบในแบบจำลองนี้คือ ปาก กระเพาะอาหาร และลำไส้เล็ก โดยจะเลียนแบบทั้งส่วนที่เป็นของเหลวต่างๆ ที่อยู่ในแต่ละอวัยวะ เช่น เอนไซม์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และระยะเวลาที่อาหารอยู่ในแต่ละอวัยวะ ซึ่งแบบจำลองนี้ได้ถูกนำไปใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารต่างๆ อย่างหลากหลาย เพื่อที่จะพิจารณาถึงความเสถียรของสารเมื่อผ่านระบบย่อยอาหาร (digestion stability)

จากการศึกษาความคงตัวของ total phenolics ในสารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ *thyrstiflorum* และ Jumbo 4320 ที่สกัดด้วยน้ำ เมื่อผ่านแบบจำลองของระบบการย่อยอาหาร ผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 4.8 พบว่า ปริมาณ total phenolics ในสารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ *thyrstiflorum* มีความคงตัวต่อการย่อยสูงกว่าสารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ Jumbo 4320 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ที่ค่า digestive stability% เท่ากับ 45.48 ± 2.09 % และ 43.96 ± 1.81 % ตามลำดับ อาจเนื่องมาจากในสารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ *thyrstiflorum* มีองค์ประกอบอื่นๆ ที่สามารถป้องกันการสลายตัวของ total phenolics ในระหว่างการย่อยมากกว่าสารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ Jumbo 4320 นอกจากนี้ ผลความไม่คงตัวของ total phenolics ระหว่างการทดสอบในแบบจำลองระบบการย่อยในสารสกัดโหระพาทั้งสองสายพันธุ์มีความสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Vallejo et al. (2004) ซึ่งพบว่าสารประกอบฟีนอลิกเกิดการสลายตัวภายใต้สภาวะของลำไส้ในปริมาณการสลายตัวที่มากกว่า 70% จากการศึกษาก่อนหน้านี้ Antonio et al. (2002) พบว่าสารประกอบฟีนอลิกในทับทิมมีอยู่ในระหว่างการย่อยในปริมาณที่ค่อนข้างสูง (29%) Bernúdez-Soto et al. (2007) ได้ศึกษาความคงตัวของสารประกอบโพลีฟีนอลใน Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) เมื่อผ่านกระบวนการ *in vitro* gastric และ pancreatic digestion โดยตรวจวัดปริมาณของ total recovered phenolics หลังจากผ่านกระบวนการ gastric digestion แล้วพบว่า ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ major phenolic compounds ซึ่งได้แก่ anthocyanins, flavan-3-ols, flavonols และ caffeic acid derivatives อย่างไรก็ตาม ส่วนประกอบเหล่านี้มีการเปลี่ยนแปลงหลังจากผ่านกระบวนการ pancreatic digestion อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะ anthocyanins ซึ่งมีการสูญเสียปริมาณ 43% ส่วน flavan-3-ols และ flavonols ลดลง 26% และ 19% ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมามีว่า dietary polyphenols มีความไวสูงต่อภาวะต่างอ่อนๆ ในลำไส้เล็กและสัดส่วนของสารประกอบเหล่านี้ สามารถเปลี่ยนไปเป็นรูปแบบโครงสร้างใหม่ที่มีผลต่อคุณสมบัติทางเคมีและผลต่อเนื่องต่อการนำไปใช้ได้ทางชีวภาพและฤทธิ์ทางชีววิทยา อย่างไรก็ตาม *in vitro* simulated digestion models จัดเป็นสภาวะที่คงที่ (static) ซึ่งในสภาวะที่เกิดขึ้นจริงในกระบวนการย่อยอาหารในมนุษย์นั้นเป็นระบบที่มีการเคลื่อนที่ (dynamic) ซึ่งไม่สามารถที่จะแสดงให้เห็นถึงผลของปัจจัยอื่นๆ ดังเช่น ในการศึกษาด้วย *in vivo* ได้ เช่น การบีบรัดของลำไส้ การผสม เป็นต้น

ตารางที่ 4.8 ความคงตัวของกระบวนการย่อย (Digestive Stability) ของสารสกัดโหระพาไทย

Phytochemical	Water					
	<i>Ocimum basilicum</i> var. <i>thrysiflorum</i>			<i>Ocimum basilicum</i> cv. Jumbo 4320		
	pre-digested	digesta	% Digestive stability	pre-digested	Digesta	% Digestive stability
Total phenolics (mg gallic acid equivalent/100 g of RM)	264.74 ± 5.72 ^{a,B}	120.32 ± 3.22 ^{a,A}	45.48 ± 2.09	296.16 ± 4.85 ^{b,B}	130.12 ± 3.22 ^{b,A}	43.96 ± 1.81

Note: Each value is mean ± SD (n=3)

^{a,b} Data within the same row with different superscripts are significantly different (p<0.05) for water extraction between species.

^{A,B} Data within the same row with different superscripts are significantly different (p<0.05) for water extraction at the same species.

บทที่ 5

บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

โหระพาไทยสายพันธุ์ *thyrselflorum* และ Jumbo 4320 ได้ถูกนำมาสกัดด้วยน้ำ เอทานอล และ เอทิล อะซิเตท สารสกัดโหระพาไทยได้ถูกนำมาวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ รวมถึง ปริมาณฟีนอลิก โดยพบว่าส่วนประกอบหลักทางเคมีของสารสกัดโหระพาไทยที่สกัดด้วยเอทานอลและ เอทิล อะซิเตท ประกอบไปด้วยอนุพันธ์ของคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ ซึ่งสารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ *thyrselflorum* ที่สกัดด้วยเอทานอล มีปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์สูงสุด ในขณะที่สารสกัดโหระพา ไทยสายพันธุ์ Jumbo 4320 ที่สกัดด้วยน้ำ มีปริมาณ total phenolic สูงสุด รวมถึง phenolic acids และ flavonoid บางตัว

การศึกษาปริมาณ total phenolic และ total flavonoid ของสารสกัดโหระพาไทย วิเคราะห์ โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu และวิธี aluminum chloride colorimetric ตามลำดับ พบว่า สารสกัด โหระพาไทยสายพันธุ์ Jumbo 4320 ที่สกัดด้วยน้ำ มีปริมาณ total phenolic สูงสุด และสารสกัดโหระพา ไทยสายพันธุ์ Jumbo 4320 ที่สกัดด้วยเอทานอล มีปริมาณ total flavonoid สูงสุด

ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโหระพาไทยวิเคราะห์โดยใช้วิธี DPPH, FRAP และ DCFH-DA พบว่า สารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ Jumbo 4320 ที่สกัดด้วยน้ำ มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูล อิสระสูงสุดจากวิธี DPPH ในขณะที่สารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ *thyrselflorum* ที่สกัดด้วยเอทานอล มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดจากวิธี FRAP และสารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ Jumbo 4320 ที่สกัด ด้วยน้ำ มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในเซลล์สูงสุดจากวิธี DCFH-DA สารสกัดโหระพาไทยที่สกัดด้วยเอทิล อะซิเตท มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด ปริมาณ total phenolic, total flavonoid และฤทธิ์ในการ ต้านอนุมูลอิสระของโหระพาไทยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ระหว่างสายพันธุ์ของ โหระพาและตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด ปริมาณ total phenolic และ total flavonoid ของสารสกัด โหระพาไทยมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยพบว่า ที่ปริมาณ total phenolic และ total flavonoid สูงๆ สารสกัดโหระพาไทยจะมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูง

สารสกัดโหระพาไทยได้ถูกวิเคราะห์เพื่อหาความเป็นพิษต่อเซลล์ในเซลล์ไลน์ HepG2 โดยพบว่า สารสกัดโหระพาไทยทุกตัวอย่างมีค่า $LC_{50} > 200 \mu\text{g/ml}$ ต่อเซลล์ไลน์ ซึ่งแสดงถึงความไม่เป็นพิษต่อเซลล์

การศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดโหระพาไทยวิเคราะห์โดยใช้ agar disk diffusion method เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ระหว่างตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดและ โหระพาไทยทั้งสองสายพันธุ์ พบว่า สารสกัดโหระพาไทยเกือบทั้งหมดไม่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ ก่อโรคที่ใช้ในการทดสอบ

การศึกษาฤทธิ์ในการต้านลิ่มเลือดของสารสกัดโหระพาไทยทำการวิเคราะห์โดยใช้วิธี prothrombin time พบว่า สารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ *thyrselflorum* ที่สกัดด้วยเอทิล อะซิเตท แสดง การยืดระยะเวลาการแข็งตัวของลิ่มเลือดสูงสุด

การศึกษาความคงตัวของสารสกัดโหระพาไทยที่เตรียมได้เมื่อผ่านแบบจำลองของระบบการย่อย อาหารในหลอดทดลอง พบว่า สารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ *thyrselflorum* ที่สกัดด้วยน้ำ มีค่า digestive

stability% สูงกว่าสารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ Jumbo 4320 ที่สกัดด้วยน้ำไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) total phenolic ไม่เสถียรเมื่อผ่านระบบจำลองการย่อยอาหารที่กระเพาะและลำไส้เล็ก

สารสกัดโหระพาไทยสายพันธุ์ Jumbo 4320 ที่สกัดด้วยน้ำอาจเหมาะสมกับการนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพเนื่องจากมีปริมาณ total phenolic และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ DCFH-DA สูงที่สุด และมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus cereus* เอทานอลเป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุดในการสกัด flavonoids จากโหระพาไทยและสารสกัดโหระพาไทยที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP สูงที่สุด สารสกัดโหระพาไทยที่สกัดด้วยเอทิล อะซิเตททั้งสองสายพันธุ์มีการยืดระยะเวลาการแข็งตัวเป็นลิ่มของเลือดที่เท่ากัน ($p>0.05$) สารสกัดโหระพาไทยที่สกัดด้วยน้ำทั้งสองสายพันธุ์มีความคงตัวเมื่อผ่านระบบการย่อยที่เท่ากัน ($p>0.05$) ดังนั้น สารสกัดโหระพาทั้งสองสายพันธุ์มีศักยภาพในการพัฒนาให้เป็นส่วนประกอบของอาหารเพื่อสุขภาพได้



บรรณานุกรม

- Adiguzel, A., Gulluce, M., Sengul, M., Ogutcu, H., Sahin, F., and Karaman, I. (2005). Antimicrobial effects of *Ocimum basilicum* (Labiatae) extract. **Turkish Journal of Biology**. 29: 155-160
- Aguilar, N.O., Pham Truong Thi Tho, and Oyen, L.P.A. (1999). *Ocimum basilicum* L. In **Plant Resources of South-East Asia** (pp. 151-156). Leiden, The Netherlands: Backhuys Publisher.
- Bais, H.P., Walker, T.S., Schweizer, H.P., and Vivanco, J.M. (2002). Root specific elicitation and antimicrobial activity of Rosamarinic acid in rainy root cultures of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). **Plant Physiology and Biological Chemistry**. 40: 983-995.
- Boggia, R., Zunin, P., Hysenaj, V., Bottino, A., and Comite, A. (2015). Chapter 78: Dehydration of basil leaves and impact of processing composition. In **Processing and Impact on Active Components in Food** (pp.645-653). Cambridge, USA: Academic Press.
- 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.
- Bristol, D. (2011). NTP 3-month toxicity studies of estragole administered by gavage to rats and mice. **National Toxicology Program Toxicity Report Series**. 82: 1-112.
- Chiang, L.C., Ng, L.T., Cheng, P.W., Chiang, W., and Lin, C.C. (2005). Antiviral activities of extracts and selected pure constituents of *Ocimum basilicum*. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. 32: 811-816.
- Dasgupta, T., Rao, A.R., and Yadava, P.K. (2004). Chemomodulatory efficacy of basil leaf (*Ocimum basilicum*) on drug metabolizing and antioxidant enzymes, and on carcinogen-induced skin and forestomach papillomagenesis. **Phytomedicine**. 11: 139-151.
- Dragan, S., Nicola, T., Ilinea, R., Ursoniu, S., Kimar, A., and Nimade, S. (2007). Role of multi-component functional foods in the complex treatment of patients with advanced breast cancer. **Revista medico-chirurgicala a Societatii de Medici si Naturalisti din Iasi**. 111: 877-884.
- Ferruzzi, M.G., and Green, R.J. (2005). Analysis of catechins from milk-tea beverages by enzyme assisted extraction followed by high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**. 99(3): 484-491.
- Frankel, E.N., Waterhouse, A.L., and Kinsella, J.E. (1993). Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. **Lancet**. 341: 1103-1104.
- Gomez-Flores, R., Verastegui-Rodriguez, L., Quintanilla-Licea, R., Tamez-Guerra, P., Tamez-Guerra, R., and Rodriguez-Padilla, C. (2008). *In vitro* rat lymphocyte proliferation

- induced by *Ocimum basilicum*, *Persea americana*, *Plantago virginica*, and *Rosa* spp. extracts. **Journal of Medicinal Plants Research**. 2(1): 005-010.
- Grayer, R.J., Bryan, S.E., Veitch, N.C., Goldstone, F.J., Paton, A., and Wollenweber, E. (1996). External flavones in sweet basil *Ocimum basilicum*, and related taxa. **Phytochemistry**. 43: 1041-1047.
- Harnafi, H., Caid, H.S., Bouanani, N.H., Aziz, M., and Amrani, S. (2008). Hypolipemic activity of polyphenol-rich extracts from *Ocimum basilicum* in Triton WR-1339-induced hyperlipidemic mice. **Food Chemistry**. 108: 205-212.
- Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke, E., and Vivanco, J.M. (2003). Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. **Food Chemistry**. 83: 547-550.
- 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.
- Jeurissen, S.M., Punt, A., Delatour, T., and Rietjens, I.M. (2008). Basil extract inhibits the sulfotransferase mediated formation of DNA adducts of the procarcinogen 1'-hydroxyestragole by rat and human liver S9 homogenates and in HepG2 human hepatoma cells. **Food and Chemical Toxicology**. 46: 2296-2302.
- Juan, M.Y., and Chou, C.C. (2010). Enhancement of antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of black soybeans by solid state fermentation with *Bacillus subtilis* BCRC14715. **Food Microbiology**. 27: 586-591.
- Kaefer, C.M., and Milner, J.A. (2011). Chapter 17 Herbs and spices in cancer prevention and treatment. In **Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects** (2nd edition). Benzie IFF, Wachtel-Galor S, editors. Boca Raton (FL): CRC Press.
- Kishore, K. (2013). *In-vitro* and *In-vivo* Screening Methods for antithrombotic agents. **American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics**. 1(5): 497-506.
- Lee, J., and Scagel, C.F. (2009). Chicoric acid found in basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves. **Food Chemistry**. 115: 650-656.
- Lee, J., and Scagel, C.F. (2010). Chicoric acid levels in commercial basil (*Ocimum basilicum*) and *Echinacea purpurea* products. **Journal of Functional Foods**. 2: 77-84.
- Lorian, V. (1996). Chapter 1: Disk susceptibility test. In **Antibiotics in Laboratory Medicine 4th edition** (pp. 14-32). New York: Maple Press.
- Liu, R.H., and Finley, J. (2005). Potential cell culture models for antioxidant research. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 53: 4311-4314.
- Maisuthisakul, P., Pasuk, S., and Ritthiruangdej, P. (2008). Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. **Journal of Food Composition and Analysis**. 21: 229-240.

- Makri, O., and Kintzios, S. (2007). *Ocimum* sp. (basil): Botany, cultivation, pharmaceutical properties, and biotechnology. **Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants**. 13: 123-150.
- Moghaddam, M.N., Karamoddin, M.-A.K., and Ramezani, M. (2009). *In vitro* anti-bacterial activity of sweet basil fractions against *Helicobacter pylori*. **Journal of Biological Sciences**. 9(3): 276-279.
- Muller, L., Kasper, P., Muller-Tegethoff, K., and Petr, T. (1994). The genotoxic potential *in vitro* and *in vivo* of the allyl benzene etheric oils estragole, basil oil and trans-anethole. **Mutation Research Letters**. 325: 129-136.
- Nguefack, J., Budde, B.B., and Jakobsen, M. (2004). Five essential oils from aromatic plants of Cameroon: their antibacterial activity and ability to permeabilize the cytoplasmic membrane of *Listeria innocua* examined by flow cytometry. **Letters in Applied Microbiology**. 39(5): 395-400.
- Okonogi, S., Duangrata, C., Anuchpreedab, S., Tachakittirungroda, S., and Chowwanapoonpohna, S. (2007). Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. **Food Chemistry**. 103(3): 839-846.
- Oonsivilai, R., Cheng, C., Bomser, J.A., Ferruzzi, M.G., and Ningsanond, S. (2007). Phytochemical profiling and phase II enzyme-inducing properties of *Thunbergia laurifolia* Lindl. (RC) extracts. **Journal of Ethnopharmacology**. 114: 300-306.
- Oonsivilai, R., Ferruzzi, M.G., and Ningsanond, S. (2008). Antioxidant activity and cytotoxicity of Rang Chute (*Thunbergia laurifolia* Linn.) extracts. **Asian Journal of Food and Agro-Industry**. 1(2): 116-128.
- Opalchenova, G., and Obreshkova, D. (2003). Comparative studies on the activity of basil an essential oil from *Ocimum basilicum* L. against multidrug resistant clinical isolates of the genera *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Pseudomonas* by using different test methods. **Journal of Microbiological Methods**. 54(1): 105-110.
- Orafidiya, L.O., Oyedele, A.O., Shittu, A.O., and Elujoba, A.A. (2001). The formulation of an effective topical antibacterial product containing *Ocimum gratissimum* leaf essential oil. **International Journal in Pharmaceutics**. 224(1-2): 177-183.
- Quy, D.D., Artik, E.A., Phuong, L.T.N., Lien, H.H., Felycia, E.S., Suryadi, I., and Yi-Hsu, J. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoids content, and antioxidant activity of *Lamnophila aromatic*. **Journal of Food and Drug Analysis**. 22(3): 296-302.
- Rizzo, F., Papasouliotis, K., Crawford, E., Dodkin, S., and Cue, S. (2008). Measurement of prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (APTT) on canine citrated plasma samples following different storage conditions. **Research in Veterinary Science**. 85: 166-170.

- Sajjadi, S.E. (2006). Analysis of the essential oils of two cultivated basil (*Ocimum basilicum* L.) from Iran. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**. 14: 128-130.
- Selvakkumar, C., Gayathri, B., Vinaykumar, K.S., Lakshmi, B.S., and Balakrishnan, A. (2007). Potential anti-inflammatory properties of crude alcoholic extract of *Ocimum basilicum* L. in human peripheral blood mononuclear cells. **Journal of Health Science**. 53: 500-505.
- Stajkovic, O., Beric-Bjedov, T., Mitic-Culafic, D., Stankovic, S., Vukovic-Gracic, B., Simic, D., and Knezevic-Vukcevic, J. (2007). Antimutagenic properties of basil (*Ocimum basilicum* L.) in *Salmonella typhimurium* TA100. **Food Technology and Biotechnology**. 45: 213-217.
- Takamatsu, S., Galal, A.M., Ross, S.A., Ferreira, D., ElSohly, M.A., Ibrahim A-R.S., and El-Ferally, F.S. (2003). Antioxidant effect of flavonoids on DCF production in HL-60 cells. **Phytotherapy Research**. 17: 963-966.
- Tognolini, M., Barocelli, E., Ballabeni, V., Bruni, R., Bianchi, A., Chiavarini, M., and Impicciatore, M. (2006). Comparative screening of plant essential oils: phenylpropanoid moiety as basic core for antiplatelet activity. **Life Sciences**. 78: 1419-1432.
- Tohti, I., Tursun, M., Umar, A., Turdi, S., Imin, H., and Moore, N. (2006). Aqueous extracts of *Ocimum basilicum* L. (sweet basil) decrease platelet aggregation induced by ADP and thrombin *in vitro* and rats arterio-venous shunt thrombosis *in vivo*. **Thrombosis Research**. 118: 733-739.
- Vallejo, F., Gil-Izquierdo, A., Perez-Vicente, A., and Garcia-Viguera, C. (2004). *In vitro* gastrointestinal digestion study of broccoli inflorescence phenolic compounds, glucosinolates, and vitamin C. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 52(1): 135-138.
- Wannissorn, B., Jarikasem, S., Siriwangchai, T., and Thubthimthed, S. (2005). Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. **Fitoterapia**. 76(2): 233-236.
- Wolfe, K.L., and Liu, R.H. (2007). Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 55: 8896-8907.
- Zlotek, U., Mikulska, S., Nagajek, M., and Swieca, M. (2015). The effect of different solvents and number of extraction steps on the polyphenol content and antioxidant capacity of basil leaves (*Ocimum basilicum* L.) extracts. **Saudi Journal of Biological Sciences**. 1-6.

ประวัติคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ ผศ. ดร. รัชฎาพร อุ่นศิริไฉย
Asst. Prof. Dr. Ratchadaporn Oonsivilai
2. ที่อยู่ สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
จังหวัดนครราชสีมา 30000
โทรศัพท์ 0-4422-4232 โทรสาร 0-4422-4387
Email address: roonsivi@sut.ac.th

3. ประวัติการศึกษา

- ปริญญาตรี สาขาวิชาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (พยาบาล)
สถาบัน คณะพยาบาลศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ปีที่สำเร็จ 2530
- ปริญญาโท สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร
สถาบัน Dalhousie University, DalTech, Canada
ปีที่สำเร็จ 2543
หัวข้อวิทยานิพนธ์: “The Effect of Beta-Glucan Polymers on the Rheological and Filtration Properties of Wort”
แหล่งทุนที่ได้รับ : ทุนผู้ช่วยวิจัย NSERC Canada
- ปริญญาเอก สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
สถาบัน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีที่สำเร็จ 2549
หัวข้อวิทยานิพนธ์ : “ Neutraceutical and Functional Properties of *Thunberga Laurifolia* Lindl (Rang Chuet) Extract”
แหล่งทุนที่ได้รับ : ทุนพัฒนาอาจารย์ทบวงมหาวิทยาลัย

4. ตำแหน่งปัจจุบัน

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

5. ประสบการณ์การทำงาน

- Oct 2017 - Current : Dean Associate, Institute of Agricultural Technology, Suranaree
university Nakhon Ratchasima, Thailand
- April 2015 - July 2017 : Assistant Rector for Planning
- Oct 2011 - Sep 2013 : Assistant Rector for Administration
- Jan 2007 - Sep 2011 : Lecturer, Department of Food Technology Institute of Agricultural
Technology, Suranaree university Nakhon Ratchasima, Thailand
- Jan 2002 - Dec 2006 : Ph. D. candidate, Suranaree University of Technology
- Oct 2000 - Dec 2001 : Lecturer Department of Food Technology Institute of Agricultural
Technology Suranaree university Nakhon Ratchasima, Thailand

Sept 1997 - Oct 2000 : Research Assistant Department of Food Science and Technology
Dalhousie University DalTech Halifax, Nova Scotia, Canada

Oct 1993 - Aug 1997 : Register Nurse, University Infirmary, Suranaree University of
Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand

May 1987 - Sept 1993 : Register Nurse, Intensive Care Unit, Srinakarin Hospital, Khonkaen
University Khonkaen, Thailand

6. งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

1. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์โครงการประยุกต์ใช้ neural network สำหรับหาค่าความเข้มข้นวิกฤตในสารละลาย beta-glucan แหล่งทุน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ทุนวิจัยอาจารย์ใหม่ 2543: หัวหน้าโครงการ
2. โครงการ IRPUS: การเตรียมสารสกัดอุดมด้วยวิตามินซีจากหัวไชเท้า ทุนวิจัย สกว. 2550: หัวหน้าโครงการ
3. โครงการ UBI: การพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเจียวกู่หลาน ทุนวิจัย SUT-UBI: หัวหน้าโครงการ
4. โครงการ iTAP: การเตรียมโรงงานเพื่อขอการรับรองระบบ GMP: หัวหน้าโครงการ
5. โครงการ iTAP: การพัฒนาผลิตภัณฑ์สำหรับสายเส้นแก้ว: หัวหน้าโครงการ
6. โครงการ UBI: การยืดอายุการเก็บผลิตภัณฑ์สำหรับสายเส้นแก้ว: หัวหน้าโครงการ
7. โครงการ iTAP: โครงการการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาล้างเครื่องซักผ้า: หัวหน้าโครงการ
8. โครงการการศึกษาการปรับแต่งกระบวนการหมักเบียร์ที่เหมาะสมโดยใช้ profile ของอุณหภูมิเป็นตัวกำหนด: หัวหน้าโครงการ
9. โครงการ UBI: การพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางค์: หัวหน้าโครงการ
10. โครงการ UBI: การพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำจิ้มสุกี้: หัวหน้าโครงการ
11. โครงการฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของสารสกัดรางจืด ย่านางและ เครือหมาน้อย: หัวหน้าโครงการ
12. โครงการการศึกษาพิษกึ่งระยะยาวของสารสกัดรางจืด: หัวหน้าโครงการ
13. โครงการชีวภาพพร้อมใช้และการนำไปใช้ทางชีวภาพของสารสกัดรางจืด: หัวหน้าโครงการ
14. โครงการ iTAP: การพัฒนาผลิตภัณฑ์ชาเห็ดกึ่งสำเร็จรูป: หัวหน้าโครงการ
15. โครงการฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของถั่วเหลืองและถั่วขาวที่ผ่านการหมัก: หัวหน้าโครงการ
16. โครงการการสกัดฤทธิ์ทางชีวภาพ และคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของไกลโคไซด์จากกระบองเพชรและ สีสาวดี: หัวหน้าโครงการ
17. โครงการเตรียมสารสกัดน้ำมันเมล็ดทับทิมด้วยวิธีสกัดเย็น: หัวหน้าโครงการ
18. โครงการ iTAP: การผลิตเครื่องดื่มเชิงหน้าที่จากสารสกัดที่ได้จากธรรมชาติ: ผู้เชี่ยวชาญ
19. โครงการชีวภาพพร้อมใช้และการนำไปใช้ทางชีวภาพของสารสกัดถั่วขาว: หัวหน้าโครงการ
20. โครงการการสกัดฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของสารสกัดจากหัวไชเท้า: หัวหน้าโครงการ
21. โครงการ iTAP: การพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากอาหารเลี้ยง Stem Cell: หัวหน้าโครงการ
22. โครงการการแยกเชื้อโพรไบโอติกจากกากมันสำปะหลัง: หัวหน้าโครงการ

23. โครงการฤทธิ์ทางชีวภาพ ชีวปริมาณออกฤทธิ์ และการเข้าถึงชีวภาพของสารสกัดกระบองเพชร: หัวหน้าโครงการ
 24. โครงการ Science Park SUT: การผลิตและศึกษาคุณสมบัติของข้าวกาบพร้อมรับประทานชนิด Synbiotics: ผู้เชี่ยวชาญร่วม
 25. โครงการ iTAP: การพัฒนาเครื่องต้มสมุนไพร: ผู้เชี่ยวชาญ
 26. โครงการ iTAP: การพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางค์สมุนไพร: ผู้เชี่ยวชาญ
 27. โครงการ iTAP: การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและทดสอบคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของน้ำหมักควาต้อง: ผู้เชี่ยวชาญ
 28. โครงการผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อการควบคุมน้ำหนักจากสารสกัดธรรมชาติ: หัวหน้าโครงการ
 29. โครงการการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารซินไบโอติกส์จากกากมันสำปะหลัง: หัวหน้าโครงการ
 30. โครงการโยอาหารโภชนาการจากกากมัน: หัวหน้าโครงการ
 31. โครงการคุณสมบัติสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดโหระพาไทย: หัวหน้าโครงการ
 32. โครงการการพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสำหรับผู้มีบุตรยาก: หัวหน้าโครงการ
 33. โครงการ iTAP: การทดสอบประสิทธิผลในระดับ Pre-clinic ของสารประกอบฟีนอลิกในเครื่องต้มลำไยสกัดที่ผลิตโดยวิธีอินทรีย์: ผู้เชี่ยวชาญร่วม
 34. โครงการยกระดับความสามารถในการแข่งขันของอุตสาหกรรมอาหารในพื้นที่เป้าหมาย TFV ภายใต้โครงการพัฒนาอุตสาหกรรมอาหารแปรรูป: กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม รายสาขา 2 “การพัฒนาผลิตภัณฑ์กระชายดำหมัก” หัวหน้าโครงการ
 35. โครงการยกระดับความสามารถในการแข่งขันของอุตสาหกรรมอาหารในพื้นที่เป้าหมาย TFV ภายใต้โครงการพัฒนาอุตสาหกรรมอาหารแปรรูป: กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม รายสาขา 2 “การพัฒนาผลิตภัณฑ์แกงหน่อไม้ในบรรจุภัณฑ์แบบเพาพาส์” หัวหน้าโครงการ
 36. โครงการยกระดับความสามารถในการแข่งขันของอุตสาหกรรมอาหารในพื้นที่เป้าหมาย TFV ภายใต้โครงการพัฒนาอุตสาหกรรมอาหารแปรรูป: กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม รายสาขา 2 “การพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำพริก” หัวหน้าโครงการ
 37. โครงการยกระดับความสามารถในการแข่งขันของอุตสาหกรรมอาหารในพื้นที่เป้าหมาย TFV ภายใต้โครงการพัฒนาอุตสาหกรรมอาหารแปรรูป: กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม รายสาขา 2 “การพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องต้มข้าวกล้องงอกผง” หัวหน้าโครงการ
 38. โครงการยกระดับความสามารถในการแข่งขันของอุตสาหกรรมอาหารในพื้นที่เป้าหมาย TFV ภายใต้โครงการพัฒนาอุตสาหกรรมอาหารแปรรูป: กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม รายสาขา 2 “การพัฒนาผลิตภัณฑ์เห็ดแปรรูป” หัวหน้าโครงการ
 39. โครงการยกระดับความสามารถในการแข่งขันของอุตสาหกรรมอาหารในพื้นที่เป้าหมาย TFV ภายใต้โครงการพัฒนาอุตสาหกรรมอาหารแปรรูป: กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม รายสาขา 2 “การพัฒนาผลิตภัณฑ์กระเทียมดำ” หัวหน้าโครงการ
- 7. งานวิจัยที่กำลังดำเนินการ**
1. โครงการการพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสำหรับนักกีฬาประเภทเทนนิส: หัวหน้าโครงการ
 2. โครงการโภชนาการพันธุกรรมและสมดุลระบบภูมิคุ้มกันของผลิตภัณฑ์อาหารซินไบโอติกส์: หัวหน้าโครงการ

3. โครงการผลของสารกลุ่มเอโอโกเจนิเสริมประสิทธิภาพนักกีฬาต่อโภชนศาสตร์พันธุกรรม: หัวหน้าโครงการ
4. โครงการ Co-Research: พัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากน้ำมันเมล็ดมะรุม: ผู้เชี่ยวชาญ
5. โครงการ iTAP: การศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีแฉมพูมะกรูด: ผู้เชี่ยวชาญ
6. โครงการพัฒนาศักยภาพผู้ประกอบการ Primary GMP ร่วมกับ องค์การอาหารและยา กลุ่มแปรรูปผลิตภัณฑ์อาหาร จังหวัดบุรีรัมย์ จังหวัดสุรินทร์

8. Peer-Reviewed Publications:

- 1) Nawong, S., Oonsivilai, R., Boonkerd, N., and Hansen, L. T. 2016. Entrapment in food-grade transglutaminase cross-linked gelatin-maltodextrin microspheres protects *Lactobacillus* spp. During exposure to simulated gastro-intestinal juices. *Food research International*. 85: 191-199.
- 2) Kachenpukdee, N., Santerre, C. R., Ferruzzi, M., and Oonsivilai, R. 2016. Modified dietary fiber from cassava pulp and assessment of mercury bioaccessibility and intestinal uptake using an in vitro digestion/Caco-2 model system. *Journal of Food Science*. 81(7): T1854-T1863.
- 3) Kachenpukdee, N., Santerre, C. R., Ferruzzi, M., and Oonsivilai, R. 2016. Enzymatic digestion optimization of dietary fiber from cassava pulp and their effect on mercury bioaccessibility and intestinal uptake from fish using an in vitro digestion/Caco-2 model. *International Food Research Journal* 23(2): 660-666.
- 4) Singthong, J., **Oonsivilai, R.**, Oonmetta-aree., and Ningsanond, S. 2014. Bioactive compounds and encapsulation of Yanang (*Tiliacora Triandra*) leaves. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. Vol. 931-932: 76-84.
- 5) Chaicharoenaudomrung, N., Oonsivilai, A., **Oonsivilai, R.** 2014. Chlorophylls contents in *Echinocactus grusonii* extract. *Advanced Materials Research*. Vol. 931-932: 1507-1511.
- 6) Samruan, W., Gasaluck, P., and **Oonsivilai, R.** 2014. Total phenolics and flavonoid contents of soybean fermentation by *Bacillus subtilis* SB-MYP-1. *Advanced Materials Research*. Vol. 931-932: 1587-1591.
- 7) Chirinang, P., **Oonsivilai, R.**, and Kulrattanak, T. 2014. Ultrasound assisted extraction for preparation dietary fiber from cassava pulp. *Advanced Materials Research*. Vol. 931-932: 1502-1506.
- 8) **Oonsivilai, R.** and Oonsivilai, A. 2010. Differential evolution application in temperature profile of fermenting. *WSEAS TRANSACTION on SYSTEMS*. Issue. ISSN: 1109-2777. Issue 6(9): 618-628.

- 9) Oonsivilai, A. and **Oonsivilai, R.** 2009. A genetic algorithm application in natural cheese products. WSEAS TRANSACTIONS on SYSTEMS. Issue 1, Vol 8, January, ISSN: 1109-2777, pp: 44-54.
- 10) Oonsivilai, A. and **Oonsivilai, R.** 2008 Parameter Estimation of Frequency Response Twin-Screw Food Extrusion Process using Genetic Algorithm. WSEAS TRANSACTIONS on SYSTEMS. Issue 7 Volume 7, July, ISSN: 1109-2777.
- 11) **Oonsivilai, R.**, Ferruzzi, M.G., and Ningsanond, S. 2007. Antioxidant activity and Cytotoxicity of Rang Chuet (*Thunbergia laurifolia* Lindl.) Extracts. As. J. Food Ag-Ind. 1(02): pp 116-128.
- 12) **Oonsivilai, R.**, Cheng, C., Bomser, J.A., Ferruzzi, M.G., and Ningsanond, S. 2007. Phytochemical profiling and detoxification properties of *Thunbergia Laurifolia* Lindl (Rang Chuet) extracts. Journal of Ethnopharmacology 114: 300-306.
- 13) **Oonsivilai, R.**, Cheng, C., Ningsanond, S., Bomser, J.A. and Ferruzzi, M.G. 2006. Induction of quinone reductase activity in murine hepatoma cells by extracts of *Thunbergia Laurifolia* Lindl. *FASEB Journal*. Vol. 20, no. 4, Part 1: A154
- 14) Speers, R. A., Patelakis, S.J.J., A. T. Paulson, and **Oonsivilai, R.** 2004. Shear rate during brewing operations. MBAA TQ vol. 41, no. 3, pp. 241-247.

Conference Oral Presentations:

1. Chirinang, P., Thaiudom, S., Oonsivilai, A., and Oonsivilai, R. Response surface method for promeganate seed oil preparation. International Conference of Pharma and Food (ICPAF 2016). Kyoto, Japan, September 19.
2. Chirinang, P., and Oonsivilai, R. 2016. Cholesterol-lowering properties of dietary fiber from cassava pulp in Wistar rats. International of Food Properties (iCFP2016). May 31th – June 2th. Anantara Riverside Bangkok Resort, Bangkok, Thailand.
3. Chaicharoenaudomrung, N., and Oonsivilai, R. Phytochemical, Antioxidant Activity, Digestive Stability and Bioaccessibility of Golden Barrel Cactus Extracts Using an In Vitro Digestion. International of Food Properties (iCFP2016). May 31th – June 2th. Anantara Riverside Bangkok Resort, Bangkok, Thailand.
4. Prasongdee, P., and Oonsivilai, R. 2016. Total phenolic, flavonoid contents and cellular antioxidant activity of Thai basil (*Ocimum basilicum* L.) International of Food Properties (iCFP2016). May 31th – June 2th. Anantara Riverside Bangkok Resort, Bangkok, Thailand.
5. Thaiudom, S., Pichayajittipong, P., and Oonsivilai, R. 2016. Value-added red colourant from red-peel of dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) and its bioactivity. International of Food Properties (iCFP2016). May 31th – June 2th. Anantara Riverside Bangkok Resort, Bangkok, Thailand.

6. Samruan, W. Oonsivilai, A., and Oonsivilai, R. 2012. Soybean and fermented soybean extract antioxidant activities. *World Academy of Science, Engineering and Technology Journal*. 72: 1169-1172
7. Oonsivilai, R., Oonsivilai, A., and Piwondee, A. 2012. Effect of Rang Chuet Extract on Rat Liver Xenobiotic-Metabolizing Enzyme. *World Academy of Science, Engineering and Technology Journal*. 72: 1142-1144.
8. Singthong, J. **Oonsivilai, R.**, Oonmetta-aree., and Ningsanond, S. 2011. Phytochemical profile, antioxidant activity and cytotoxicity of *Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels. (Yanang) extracts on Caco-2-cells. The 5th Thailand Congress of Nutrition 2011. September 5-7. Oral Presentation.
9. Posridee, K., Sripa, B. Jitsomboon, B., and **Oonsivilai, R.** 2011. Acute oral toxicity study of *Thunbergia laurifolia* Linn. Extracts. Asean Food Conference 2011. June, 16-18. Bitec Bangna, Bangkok, Thailand.
10. Manatwiyangkool, J. **Oonsivilai, R.** 2011. Modification of method for phaseolamin extraction from white kidney beans (*Phaseolus vulgaris*.). Asean Food Conference 2011. June, 16-18. Bitec Bangna, Bangkok, Thailand.
11. **Oonsivilai, R.**, Chanphuak, C., Srisutor, P., Kulrattanak, T., Sutheerawattananond, M., and Oonsivilai, A. 2011. Dietary Fiber Prepared from Cassava byproduct. *World Academy of Science, Engineering and Technology Journal*. 60: 1120-1123.
12. **Oonsivilai, R.**, Manatwiyangkool, J. and Oonsivilai, A. 2011. Extraction Condition of *Phaseolus vulgaris*. *World Academy of Science, Engineering and Technology Journal*. 60: 382-385.
13. **Oonsivilai, R.** and Oonsivilai, A. 2010. Temperature profiling during fermenting processing differential evolution. Proceeding of the 9th WSEAS International conference on energy and environment. February 23-25, Cambridge, London
14. **R. Oonsivilai,** N. Chajareonudomrourng, Y. Huantanom., and A. Oonsivilai. 2010. Extraction condition of *Echinocactus grusonii*. *World Academy of Science, Engineering and Technology Journal*. 70: 366-369.
15. Posridee, K., Sripa, B. Jitsomboon, B., and **Oonsivilai, R.** 2010. The acute oral toxicity determination (LD50) of Rang Chute extract. 3rd SUT Graduate Conference. November 21-23. Suranaree University of Technology, Thailand.
16. Oonsivilai, R and Oonsivilai, A. 2008. Apply a genetic algorithm to natural cheese product. Proceeding of the 8th WSEAS International conference on applied computer science (ACS'08). ISSN 1790-5109, pp: 269-274.

17. **Oonsivilai, R.** and Oonsivilai, A. 2007. Probabilistic neural network for β -glucan suspensions. Proceeding of the 7th WSEAS International Conference on Simulation, Modeling and Optimization, Beijing, China, September 15-17.
18. **Oonsivilai, R.** and Oonsivilai, A. 2007. Probabilistic neural network for β -glucan suspensions. Proceeding of the 7th WSEAS International Conference on Simulation, Modeling and Optimization, Beijing, China, September 15-17.
19. **Oonsivilai, R.**, Speers, R.A. and Paulson, A.T. 2000. Effects of pH, maltose and ethanol on the physical properties of model beta-glucan suspensions. Presented at IOB 2000, Institute of Brewing, Asia-Pacific Section 26th Convention, Mar. 19-24, Singapore, SGP.
20. **Oonsivilai, R.** Patelakis, S.J.J., Speers, R.A., and Paulson, A.T. 1999. Rheological and filtration properties of beta-glucan polymers in the brewing process. CIFST Annual Meeting, Presentation#OR-12, June 6-9, Kelowna, BC.

Conference Poster Presentations

1. Oonmetta-aree, J., Singthong, J., **Oonsivilai, R.** 2013. Effects of Krueo Ma Noy (Cissampelos pareira) crude extract as prebiotic on survival of encapsulated Lactobacillus acidophilus TISTR1 1338 under acidic and bile salt condition. 13th ASEAN Food Conference. Singapore. September 9-11.
2. Nawong, S., Boonkerd, N., **Oonsivilai, R.** 2013. Isolation and Selection of Probiotic Lactic Acid Bacteria from Cassava Pulp for Cholesterol Lowering Property. 13th ASEAN Food Conference. Singapore. September 9-11.
3. J. Singthong, R. Oonsivilai, J. Oonmetta-aree, S. Ningsanond. 2012. Phytochemical profiles, antioxidant activity, and cytotoxicity of Cissampelos pareira (Krueo Ma Noy) extract on Caco-2 cells. The 14th Food Innovation Asia Conference 2012. BITEC, Bangna, Bangkok, June 14-15, Poster Presentation.
4. Posridee, K., Sripa, B., Jitsomboon, B. and Oonsivilai, R. 2012. The Sub-chronic oral toxicity study of Rang Chute extracts. IFT Annual Meeting 2012, Las Vegas, USA, June 23-29, Poster Presentation.
5. Oonsivilai, R., Singthong, J. Oonmetta-aree, J., and Ningsanond, S. 2012. Bioactivity, antioxidant activity, and cytotoxicity of Yanang, Kru-Ma Noy, and Rang Chuet extracts. IFT Annual Meeting 2012, Las Vegas, USA, June 23-29, Poster Presentation.
6. Manatwiyangkool, J. **Oonsivilai, R.** 2010. Phaseolamin in white kidney beans (Phaseolus vulgaris.). 4th Thailand Congress of Nutrition. Sep, 5-7. EX-P-11(P33).
7. Seesan, T. and Oonsivilai, R. 2010. Promote health and well-being with phytochemical in Thai traditional food The 17th Tri-University International Joint

- Seminar & Symposium 2010. Role of Asia in Communities and Sustainable Development. November 10th-13th, Faculty of Engineering, Chiangmai University, Thailand.
8. **Oonsivilai, R.**, Ferruzzi, M.G., and Ningsanond, S. 2007. Antioxidant activity and Cytotoxicity of Rang Chuet (*Thunbergia laurifolia* Lindl.) Extracts. Presented at FoSTAT 2007. BITEC, June 14-15, Bangkok, Thailand.
 9. อนุสิทธิบัตร: ยื่นจดอนุสิทธิบัตรเรื่องการเตรียมสารสกัดจากหัวไชเท้า เลขที่คำขอ 0801003939
ยื่นจดสิทธิบัตรเรื่องการเตรียมน้ำมันเมล็ดทับทิม เลขที่คำขอ 1601006001
 10. ความลับทางการค้า: กรรมวิธีการผลิตสาหร่ายเส้นแก้ว วันที่ 19 ตุลาคม 2553
สูตรและส่วนผสมสาหร่ายเส้นแก้ว วันที่ 8 พฤศจิกายน 2553
 11. เอกสารประกอบการสอน Course Notes
รัฐภาพร อุ่นศิริไธย์. 2553. อาหารและโภชนาการ: เอกสารประกอบการสอนวิชาอาหารและโภชนาการ. สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร. สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 499 หน้า (3 หน่วยกิต)
 12. Training Courses:
 1. โครงการพัฒนาบุคลากรให้เป็นผู้เชี่ยวชาญ ระบบ HACCP. สถาบันอาหาร 22-24 กรกฎาคม 2544
 2. IRCA2009/Approved Food safety and Management System (ISO 22000: 2005) Lead Auditors training course. By National Food Institute of Thailand (NFI), Agro-Industry Academic Council Association., April 28-30, 2008. Amari Airport Hotel, Bangkok, Thailand.
 3. ISO2200:2005 Food safety and Management System: Document & Implementation course. by National Food Institute of Thailand (NFI), Agro-Industry Academic Council Association. June 9-11, 2008. Amari Airport Hotel, Bangkok, Thailand.
 4. หลักสูตรความรู้พื้นฐานด้านความปลอดภัยอาหารและหลักเกณฑ์ที่ดีในการผลิตอาหารแปรรูปที่บรรจุในภาชนะพร้อมจำหน่าย (Primary GMP) สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข ร่วมกับสถาบันคั้นคว่ำและผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และสมาคมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหารแห่งประเทศไทย วันที่ 4-7 มีนาคม 2557
 5. หลักสูตรความรู้เบื้องต้นการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข ร่วมกับสถาบันคั้นคว่ำและผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และสมาคมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหารแห่งประเทศไทย วันที่ 4-7 มีนาคม 2557
 6. หลักสูตรการบริหารจัดการธุรกิจและเทคนิคการตลาด (Food Business management and marketing) สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุขร่วมกับสถาบันคั้นคว่ำและผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และสมาคมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหารแห่งประเทศไทย วันที่ 4-7 มีนาคม 2557
 7. การรับรองฮาลาลในประเทศไทย สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหารร่วมกับสำนักงานคณะกรรมการกลางอิสลามแห่งประเทศไทย วันที่ 24 มีนาคม 2557

8. Good Manufacturing Practice (GMP), Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) Food Science and Technology Association of Thailand. 11 มกราคม 2561.

9. Global Standard for Foods Safety “Issue 7” (BRC Issue 7) Food Science and Technology Association of Thailand. 11 มกราคม 2561.

10. การรับรองฮาลาลในประเทศไทย สำนักงานอุทยานวิทยาศาสตร์และนวัตกรรม เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ร่วมกับสำนักงานคณะกรรมการกลางอิสลามแห่งประเทศไทย วันที่ 13 มกราคม 2561.



ผู้ร่วมวิจัย

ผู้ร่วมวิจัยรองศาสตราจารย์ ดร. อนามัย เทศกะทีก

1. ประวัติส่วนตัว

- 1.1 วัน เดือน ปี เกิด เกิดวันที่ 12 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2507
- 1.2 อายุ 48 ปี
- 1.3 การศึกษาระดับอุดมศึกษา

คุณวุฒิ	ปี พ.ศ. ที่จบ	ชื่อสถานศึกษาและประเทศ
1.3.1 PhD (Tropical Medicine) major on Environmental Toxicology	2548	คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล
1.3.2 สาธารณสุขศาสตร์บัณฑิต (อาชีวอนามัยและความปลอดภัย)	2542	สาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ประเทศไทย
1.3.3 สาธารณสุขศาสตรมหาบัณฑิต (อนามัยสิ่งแวดล้อม)	2537	คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประเทศไทย
1.3.4 วิทยาศาสตร์บัณฑิต (พยาบาลและผดุงครรภ์)	2530	คณะพยาบาลศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประเทศไทย

2. ประวัติการรับราชการ

ได้รับการแต่งตั้งเป็นผู้ช่วยศาสตราจารย์ในสาขาวิชา อาชีวอนามัย สังกัดภาควิชาสุขศาสตร์ อุตสาหกรรมและ ความปลอดภัย คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา เมื่อวันที่ 4 สิงหาคม พ.ศ. 2543 จนถึงปัจจุบัน พ.ศ. 2553

2.1 งานวิจัย

ชื่อเรื่องงานวิจัย	สถานะ	ปีงบประมาณ	ระยะเวลาดำเนินการ (ปี)
1) การประเมินความเสี่ยงของปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่อสุขภาพอนามัยของผู้ปฏิบัติงานในโรงโม่หิน ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย	ผู้ร่วมโครงการวิจัย	2538	1
2) ปัจจัยที่สัมพันธ์กับการสูญเสียการได้ยินของผู้ประกอบอาชีพในสถานประกอบการติสโก้เทค ในเขตจังหวัดชลบุรี	หัวหน้าโครงการวิจัย	2541	1
3) การศึกษาผลกระทบต่อสุขภาพอนามัยของเกษตรกรที่มีการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช ในจังหวัดชลบุรี และจันทบุรี	ผู้ร่วมโครงการวิจัย	2541	1

ชื่อเรื่องงานวิจัย	สถานะ	ปีงบประมาณ	ระยะเวลา ดำเนินการ (ปี)
4) การศึกษาระดับเอนไซม์คลอริเนสเตอเรสในเลือด โดยเครื่องมืออิกวเอ็มเทสต์คิต ในกลุ่มเกษตรกร ในเขตอำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี	หัวหน้าโครงการวิจัย	2542	1
5) การศึกษาระดับตะกั่วในเลือดของผู้ปฏิบัติงานในบรรยากาศของโรงพิมพ์ที่ตั้งอยู่ในเขตอำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี	ผู้ร่วมโครงการวิจัย	2542	1
6) ประสิทธิภาพของโปรแกรมการอบรมทางด้านอันตรายจากสารเคมีและการป้องกันต่อการเปลี่ยนแปลงความรู้ ทักษะและพฤติกรรมในพนักงานโรงงานอุตสาหกรรมผลิตชิ้นส่วนยานยนต์ในเขตจังหวัดชลบุรี	หัวหน้าโครงการวิจัย	2549	1
7) ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อสุขภาพในระบบทางเดินหายใจในกลุ่มพนักงานโรงงานอุตสาหกรรมผลิตผลผลิตจากไม้และเฟอร์นิเจอร์ในเขตภาคตะวันออก	หัวหน้าโครงการวิจัย	2550	1

2.2 งานบริการด้านวิชาการ

เป็นวิทยากร	ระหว่างวันที่
1). อันตรายจากสารเคมีและแนวทางในการป้องกัน บริษัทสยามอิตาซี เอลลิเวเตอร์ จำกัด	10 กุมภาพันธ์ 2549
2). อันตรายจากการทำงานในโรงพยาบาลและแนวทางในการป้องกัน โรงพยาบาลศูนย์แพทย์	9 มีนาคม 2549
3). อันตรายจากการทำงานในโรงงานอุตสาหกรรมและแนวทางในการป้องกัน ที่บริษัทซีพี	15 มีนาคม 2549
4). การจัดทำแนวทางพัฒนามาตรฐานสุขภาพและดัชนีชี้วัดสุขภาพ ห้องประชุมกรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข	29 เมษายน 2551
5). โรคที่พบบ่อยจากการประกอบอาชีพและการรักษาพยาบาลเบื้องต้น คณะพยาบาลศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา	4 พฤษภาคม 2551
6). ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับสารเคมีและอันตรายต่อสุขภาพอนามัย สำหรับเจ้าหน้าที่อนามัย	26 พฤษภาคม 2551
7). การจัดการพิษจากสารเคมีแก่ครู อาจารย์ นักเรียน ในเขตโรงงานอุตสาหกรรม	1 กรกฎาคม 2551
8). การจัดการพิษจากสารเคมีแก่ครู อาจารย์ นักเรียน ในเขตเกษตรกรรม	2 กรกฎาคม 2551

9). การจัดการพิษจากสารเคมี แก่บุคลากรจากสถานอนามัยจากระยอง รุ่นที่ 1	4 กรกฎาคม 2551
10). การจัดการพิษจากสารเคมี แก่บุคลากรภาครัฐและประชาชน	13 มิถุนายน 2551
เป็นวิทยากร	ระหว่างวันที่
11). การจัดการพิษจากสารเคมี แก่บุคลากรจากสถานอนามัยจากระยอง รุ่นที่ 2	30 กรกฎาคม 2551
12). การปฏิบัติงานกับสารเคมีอันตราย บริษัทสยามอีตาชิ เอลลิเวเตอร์	22 สิงหาคม 2551
13). อบรมเจ้าหน้าที่ความปลอดภัยในการทำงาน มหาวิทยาลัยบูรพา	25 สิงหาคม 2551
14). อบรมเจ้าหน้าที่ความปลอดภัยในการทำงาน มหาวิทยาลัยบูรพา	27 สิงหาคม 2551
15). โรคสารเคมีการเกษตร คณะพยาบาลศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา	5 มีนาคม 2552
16). โรคสารเคมีการเกษตร คณะพยาบาลศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา	27 มีนาคม 2552
17). อบรมเจ้าหน้าที่ความปลอดภัยในการทำงาน สำนักบริการวิชาการ มหาวิทยาลัยบูรพา	17 มิถุนายน 2552
18). พิษวิทยาและหลักการดูแลผู้ป่วยเบื้องต้น โรงแรมสตาร์ ระยอง	16 มิถุนายน 2552
19). โรคจากการประกอบอาชีพ บริษัทสยามเอทีอุตสาหกรรม	23 กรกฎาคม 2552
20). การจัดทำตัวชี้วัดผลกระทบต่อสุขภาพจากสิ่งแวดล้อม สำนักโรคจากการประกอบอาชีพ กระทรวงสาธารณสุข	27-29 กรกฎาคม 2552
21). อันตรายจากการทำงานกับสารเคมีและการป้องกัน บริษัทไอซีกราฟิก	22 กรกฎาคม 2552
22). อันตรายจากการทำงานกับสารเคมีและการป้องกัน บริษัทไอซีกราฟิก	20 สิงหาคม 2552
23). อันตรายจากการทำงานกับสารเคมีและการป้องกัน บริษัททอโลว์ประเทศไทย จำกัด	16 กันยายน 2552
24). พิษวิทยาและหลักการดูแลผู้ป่วยเบื้องต้น โรงแรมสตาร์ ระยอง	19 พฤศจิกายน 2552
25). พิษวิทยาและหลักการดูแลผู้ป่วยเบื้องต้น โรงแรมสตาร์ ระยอง	26 พฤศจิกายน 2552
26) ระวังพิษภัย จากสารเคมีรอบตัว ศูนย์ฝึกและพัฒนาอาชีพเกษตรกรกรมวิทย์ สังกัดกรมส่งเสริมการเกษตร อำนวยเนื่องมาจากพระราชดำริ	12 กุมภาพันธ์ 2552

2.3 งานบริหาร

เลขที่ ตำแหน่ง	ตำแหน่ง	ตั้งแต่	ชั่วโมงต่อ สัปดาห์
1250/2542	ผู้ช่วยคณบดีฝ่ายวางแผนและพัฒนา คณะ	18 กันยายน 2540 - 14 กันยายน 2542	0.6
1250/2542	รองคณบดีฝ่ายบริหาร	22 กันยายน 2542 - 31 ตุลาคม 2543	1

0824/2548	ผู้ช่วยคณบดีฝ่ายวิเทศสัมพันธ์	2 พฤษภาคม 2548 - 31 พฤษภาคม 2550	1
1261/2550	รองคณบดีฝ่ายกิจการพิเศษ	11 มิถุนายน 2550 - 9 มีนาคม 2551	1
0621/2551	ผู้ช่วยคณบดีฝ่ายวิเทศสัมพันธ์	10 มีนาคม 2551 - 31 ธันวาคม 2551	1

2.4 งานอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง

2.4.1 การนำเสนอผลงานทางวิชาการ

ชื่อเรื่องการนำเสนอผลงานทางวิชาการ	การประชุม	ระหว่างวันที่	ชั่วโมงต่อสัปดาห์
1) Challenge of Migrant Workers to the Thai Medical System	The Annual Council on Thai Studies Conference. The Northern Illinois University, USA	23-27 October 2009	0.2
2) Respiratory Symptoms and Rubber Trees Wood Dust Exposure among Furniture Manufacturing Factory Workers in Thailand	ICOH 2009 ,The International CongressOn Occupational Health, Cape town ,South Africa	21-27 March 2009	0.2
3) Rubber Tree Dust and Lung Function among Thai Furniture Manufacturing Workers	The 3rd International Occupational and Environmental Health ,Vietnam	21-23 Oct 2008	0.2
4) The influence of Occupational Exposure to Chlorpyrifos and CPOase on Plasma Cholinesterase Activity among Orchard Workers in Thailand	ICOH 2009 ,The International CongressOn Occupational Health, Milan, Italy	11-16 June 2006	0.2
5) Blood Plasma Cholinesterase Level By EQM Test Kit Among Agricultural Workers in Amphur Muang Chonburi Province.	International Conference on Pesticide Exposure and Health. Natcher Center National Institutes of Health Bethesda, Maryland USA.	8- 12 July 2002	0.1

2.4.2 การศึกษาดูงาน ณ ต่างประเทศ

หลักสูตรเรื่องการอบรม/ดูงาน	สถานที่/หน่วยงานที่จัดอบรม/ ดูงาน	ระหว่างวันที่ (14)
SOUTH EAST ASIA PUBLIC HEALTH EDUCATION INSTITUTIONS NETWORK (SEAPHEIN) Moving SEAPHEIN to Influence Public Health Policy and Action	Jaipur, India	September 25-28, 2007
หลักสูตรเรื่องการอบรม/ดูงาน	สถานที่/หน่วยงานที่จัดอบรม/ ดูงาน	ระหว่างวันที่ (14)
ไปเจรจาความร่วมมือทางวิชาการ	มหาวิทยาลัยแมสเซ่ ประเทศ นิวซีแลนด์	ระหว่างวันที่ 10-19 พฤษภาคม 2549
ลงนามความร่วมมือทางวิชาการกับ มหาวิทยาลัยนอร์ทสุมาตรา อินโดนีเซีย	มหาวิทยาลัยนอร์ทสุมาตรา อินโดนีเซีย	20-23 พฤศจิกายน 2548
เรียนรายวิชา Occupational epidemiology และ toxic chemicals และ Toxicology	มหาวิทยาลัยวอชิงตัน, USA	26 มี.ค. 2547-26 มิ.ย. 2547
เรียนรายวิชา Occupational and Environmental Health	มหาวิทยาลัยวอชิงตัน, USA	2 ม.ค. 2546-28 มี.ค. 2546
อบรมและนำเสนอผลงานทาง วิชาการ เรื่อง International Conference on Pesticide Exposure and Health	Natcher center, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA	8 ก.ค. 2545-12 ก.ค. 2545
ดูงานด้านอาชีพอนามัยและความปลอดภัย	มหาวิทยาลัยวอชิงตัน, USA.	1 ม.ค. 2542-2 พ.ค. 2542
อบรมทางวิชาการ เรื่อง “Indoor Air Quality School at School and Home	Northwest Center for Occupational Health and Safety, University of Washington”, USA.	4 ก.พ. 2542
ประชุมวิชาการด้านอาชีพอนามัยและความปลอดภัย	Research Triangle Park, North Carolina, USA.	17-22 ก.พ. 2542

ดูงานด้านอาชีวอนามัยและความปลอดภัย	มหาวิทยาลัยวอชิงตัน, USA.	5 ต.ค. 2541-พ.ย. 2541
Primary and secondary prevention of silicosis	ณ National Institute for Occupational and Environmental Health, Hanoi, Vietnam.	5-10 พ.ค. 2540

2.4.3 บทความทางวิชาการ

ชื่อผู้แต่ง	ชื่อเรื่อง	ชื่อวารสาร	ปีที่ตีพิมพ์
1) อนามัย เทศกะทีก	ข่าวคราวความเคลื่อนไหวในด้านอาชีวอนามัยและสิ่งแวดล้อม	วารสารความปลอดภัยและสุขภาพ	ปีที่ 3, ฉบับที่ 92553 :86-93
2) อนามัย เทศกะทีก	ผลกระทบต่อทางเดินหายใจจากการสัมผัสฝุ่นไม้จากการทำงาน	วารสารความปลอดภัยและสุขภาพ	ปีที่ 2, ฉบับที่ 82552 : 6-18
3) อนามัย เทศกะทีก	ข่าวคราวความเคลื่อนไหวในด้านอาชีวอนามัยและสิ่งแวดล้อม	วารสารความปลอดภัยและสุขภาพ. มหาวิทยาลัยสุโขทัย ธรรมมาธิราช	ปีที่ 2 ฉบับที่ 5 2552: 105-108.
4) อนามัย เทศกะทีก	ข่าวคราวความเคลื่อนไหวในด้านอาชีวอนามัยและสิ่งแวดล้อม	วารสารความปลอดภัยและสุขภาพ. มหาวิทยาลัยสุโขทัย ธรรมมาธิราช.	ปีที่ 2 ฉบับที่ 5 สิงหาคม-ตุลาคม 2551: 96-100.
5) อนามัย เทศกะทีก	ความเสี่ยงอันตรายของการทำงานในที่อับอากาศ.	วารสารเพื่อความปลอดภัยและอนามัยในการทำงานของสังคมไทย.	29 พ.ค.-มิ.ย. 2547: 22-23.
6) อนามัย เทศกะทีก	ภัยจากเชื้อ Legionella สามารถป้องกันได้	วารสารเพื่อความปลอดภัย และอาชีวอนามัยในการทำงาน ของสังคมไทย	20 มกราคม – กุมภาพันธ์ 2545 :22-23.
7) อนามัย เทศกะทีก	อุบัติเหตุจากการทำงานเกิดได้อย่างไร.	วารสารคณะพยาบาลศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา	ปีที่ 9ฉบับที่ 3กันยายน-ธันวาคม 2544: 48-56.
8) อนามัย ธีรวีโรจน์	อันตรายจากการประกอบอาชีพจากความเย็น	อาชีวเวชศาสตร์และสิ่งแวดล้อม ปี 2000 และต้นสหัสวรรษใหม่. ในการประชุมอาชีวเวชศาสตร์และสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ครั้งที่ 9.	2543 : 121-132.
9) อนามัย ธีรวีโรจน์	การศึกษาระดับเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสในเลือด โดยใช้เครื่องมือชนิดอีควเอ็มเทสต์คิต ใน	วารสารมหาวิทยาลัยบูรพา	ปีที่ 4 ฉบับที่ 2, กรกฎาคม - ธันวาคม 2542: 11-17.

กลุ่มเกษตรกรในเขตอำเภอเมือง
จังหวัดชลบุรี

ชื่อผู้แต่ง	ชื่อเรื่อง	ชื่อวารสาร	ปีที่ตีพิมพ์
10) อนามัย ธีร วิโรจน์	ความเครียดจากการประกอบอาชีพ	วารสารมหาวิทยาลัยบูรพา	3 ปีที่ 4ฉบับที่ 2กรกฎาคม - ธันวาคม 2542 : 57-68.
11) อนามัย ธีร วิโรจน์	ปัญหาคราบน้ำมันกับแหล่งน้ำไทย.	จดหมายข่าวคณะ สาธารณสุขศาสตร์	ปีที่ 2ฉบับที่ 6, มกราคม - กุมภาพันธ์ 2541.
12) อนามัย ธีร วิโรจน์	ความดันบรรยากาศที่ผิดปกติ...มี ผลกระทบต่อสุขภาพอย่างไร	วารสารมหาวิทยาลัยบูรพา	ปีที่ 3ฉบับที่ 1, มกราคม - มิถุนายน 2541: 53-56.
13) อนามัย ธีร วิโรจน์	มารู้จัก...โรคซิลิโคสิสกันเถอะ.	วารสารมหาวิทยาลัยบูรพา	ปีที่ 3ฉบับที่ 2, กรกฎาคม - ธันวาคม 2541: 31-36.
14) อนามัย ธีร วิโรจน์	ความสิ้นสະเทือนจากการทำงาน...มี ผลกระทบต่อสุขภาพ อย่างไร	วารสารศูนย์การศึกษา ต่อเนื่อง มหาวิทยาลัยขอนแก่น	ปีที่ 1ฉบับที่ 3, กันยายน - ธันวาคม 2540.
15) อนามัย ธีร วิโรจน์	Biological control ทางเลือกหนึ่ง ของการควบคุมลูกน้ำยุงพาหะนำ โรคในประเทศไทย	วารสารมหาวิทยาลัยบูรพา	ปีที่ 2ฉบับที่ 1, เดือนมกราคม - มิถุนายน 2540.
16) อนามัย ธีร วิโรจน์	ของแถมที่ไม่ต้องการ	จดหมายข่าวคณะ สาธารณสุขศาสตร์	ฉบับที่ 5มีนาคม - เมษายน 2539.
17) อนามัย ธีร วิโรจน์	มหันตภัยจากขยะและสิ่งปฏิกูล	จดหมายข่าวคณะ สาธารณสุขศาสตร์	ที่ 1ฉบับที่ 4มกราคม - กุมภาพันธ์ 2539
18) อนามัย ธีร วิโรจน์	ดิน.เกิดมลพิษได้อย่างไร	วารสารมหาวิทยาลัยบูรพา	ที่ 1ฉบับที่ 2, มกราคม - เมษายน2539: 5-9.

2.4.4 บทความวิจัย

ผู้เขียน	ชื่อเรื่อง	วารสาร	ปีที่ตีพิมพ์	มีส่วนร่วม ในการวิจัย
1) AnamaiThetkathuek, TanongsakYingratasuk, Paul A Demers, PhayongThepaksorn , SastriSaowakhontha, Keifer M	Rubber-Tree Dust and Lung Function among Thai Furniture-Factory Workers.	The International Journal of Occupational and Environmenta l Health.	Jan-March 2010 : 69-74	70

- 2) AnamaiThetkathuek, Respiratory Journal of (Accepted July 27, 60
TanongsakYingratasuk, Symptoms Science, 2009 : In press).
PhayongThepaksorn , and Rubber Trees Technology, and
SastriSaowakhontha Wood Dust Humanities.
Exposureamong Furniture
Manufacturing
Factory Workers in
Thailand.
- 3) Chensheng Lu, Feasibility of using J. Tox. [http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t713653210~db=all~tab=issueslist~branchs=90-v9090,\(2\)2008:315-325](http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t713653210~db=all~tab=issueslist~branchs=90-v9090,(2)2008:315-325) 20
Teresa Rodriguez, salivary biomarker Environ. Chem.
AnamaiThetkathuek to assess human exposure to chlorpyrifos.
,Aura Funez, Melanie Pearson.
- 4) Effectiveness of Journal of 5 (1) 2007: 29-34. 70
AnamaiThetkathuekTan Chemical Science, Technology, and
ongsakYingratanasukPha Prevention Training Humanities.
yongThepaksorn Program for the Improvement of

ผู้เขียน	ชื่อเรื่อง	วารสาร	ปีที่ตีพิมพ์	มีส่วนร่วมในการวิจัย
	Knowledge, Attitudes, and Work Practice among Auto Parts Workers in Thailand.			
5) อนามัย เทศกะทีก.ปวีณา มีประดิษฐ์ศาสตร์ เสาวคนธ์.	การศึกษานำร่องในการดำเนินงานระบบรับรองมาตรฐานคุณภาพชีวิตการทำงานในสถานประกอบการใน	วารสาร สาธารณสุขศาสตร์	37, (1) 2550) : 26-33. 4	45

ประเทศไทย: กลุ่มผู้
ดำเนินงาน.

6) Thetkathuek A, Keifer M, Fungladda V, Kaewkungwal J, PadungtodC, Wilson BW, Mankhetkorn S	Spectrophotometric determination of Plasma and red blood cell Cholinesterase activity of 53 fruit farm workers pre- and post-exposed chlorpyrifos for one fruit corps	Chem Pharm Bull	5 53 (4). 2005: 442-4.	50
--	---	-----------------	------------------------	----

2.4.5 บทความวิทยุ

ชื่อผู้แต่ง	ชื่อเรื่อง	รายการวิทยุ	ปีที่ตีพิมพ์
1) อนามัย เทศกะทีก	การเกิดมะเร็งจากการทำงาน	วิถีสุขภาพ มหาวิทยาลัยบูรพา	สัปดาห์ที่ 1 เดือน เมษายน 2551
2) อนามัย เทศกะทีก	อันตรายจากสารเคมีในชีวิตประจำวัน	วิถีสุขภาพ มหาวิทยาลัยบูรพา	สัปดาห์ที่ 4 เดือน สิงหาคม 2551
3) อนามัย เทศกะทีก	ความปลอดภัยจากสารเคมีในชีวิตประจำวัน	วิถีสุขภาพ มหาวิทยาลัยบูรพา	สัปดาห์ที่ 1 เดือน กันยายน 2551.
4) อนามัย เทศกะทีก	สรรพคุณของกระเทียม	วิถีสุขภาพ มหาวิทยาลัยบูรพา	สัปดาห์ที่ 1 เดือน มีนาคม 2545
5) อนามัย เทศกะทีก	การป้องกันบ้านของคุณจากการเกิดอัคคีภัย..ทำได้ไม่ยาก	วิถีสุขภาพ มหาวิทยาลัยบูรพา	สัปดาห์ที่ 3 เดือน มีนาคม 2545
6) อนามัย เทศกะทีก	ทีก. สิ่งรอบตัวกับความพิการของทารก.	วิถีสุขภาพ มหาวิทยาลัยบูรพา	สัปดาห์ที่ 1 เดือน พฤษภาคม 2545
7) อนามัย เทศกะทีก	งานกะกับสุขภาพ	วิถีสุขภาพ มหาวิทยาลัยบูรพา	สัปดาห์ที่ 1 เดือน มิถุนายน 2545
8) อนามัย เทศกะทีก	คุณภาพอากาศภายในอาคารที่ควรรู้	วิถีสุขภาพ มหาวิทยาลัยบูรพา	สัปดาห์ที่ 3 เดือน มิถุนายน 2545
9) อนามัย เทศกะทีก	มารู้จักภัยจากเชื้อเลจิโอเนลล่ากันเถอะ.	วิถีสุขภาพ มหาวิทยาลัยบูรพา	สัปดาห์ที่ 3 เดือน กรกฎาคม 2545

10) อนามัย เทศกะ ทีก	แนวทางการป้องกันภัยจาก เชื้อเลจิโอเนลล่า	วิธีสุขภาพ มหาวิทยาลัยบูรพา	สัปดาห์ที่ 4 เดือน กรกฎาคม 2545
11) อนามัย เทศกะ ทีก	ภัยจากสารปราบศัตรูพืช กลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต	วิธีสุขภาพ มหาวิทยาลัยบูรพา	สัปดาห์ที่ 4 เดือน กันยายน 2545

2.4.6 หนังสือและตำรา

ชื่อผู้แต่ง	ชื่อเรื่อง	สำนักพิมพ์	ปีที่ตีพิมพ์
1) อนามัย เทศกะทีก	การประเมินผลกระทบต่อ สุขภาพ	พิมพ์ครั้งที่ 1 พิมพ์ที่ บริษัทสำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย กรุงเทพ	2553 ได้รับการแก้ไขจาก ผู้เชี่ยวชาญ และอยู่ ระหว่างการตีพิมพ์
2) อนามัย เทศกะทีก	พิษสารเคมีจากการทำงาน รู้ทันป้องกันได้	พิมพ์ครั้งที่ 1 พิมพ์ที่บริษัท สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย กรุงเทพ	2553 ได้รับการแก้ไขจาก ผู้เชี่ยวชาญ และอยู่ ระหว่างการตีพิมพ์
3) อนามัย เทศกะทีก	การประเมินความเสี่ยงทาง สุขภาพ *	พิมพ์ครั้งที่ 1 พิมพ์ที่บริษัท สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย กรุงเทพ	2552
4) อนามัย เทศกะทีก	อาชีวอนามัยและความ ปลอดภัย ฉบับปรับปรุง*	พิมพ์ ครั้งที่ 3 พิมพ์ที่บริษัท โอ เดียนส์โตร์ กรุงเทพ	2551
5) อนามัย เทศกะทีก	ความเป็นพิษในระบบนิเวศ และสุขภาพมนุษย์	พิมพ์ ครั้งที่ 1 พิมพ์ที่บริษัท โอ เดียนส์โตร์ กรุงเทพ	2550
6) อนามัย เทศกะทีก	อาชีวอนามัยและความ ปลอดภัย	พิมพ์ ครั้งที่ 1 พิมพ์ที่บริษัท โอ เดียนส์โตร์ กรุงเทพ	2549

หมายเหตุ* ใช้ในการประเมินตำแหน่งทางวิชาการ ระดับรองศาสตราจารย์

2.4.7 เว็บไซต์

- 1) อนามัย เทศกะทีก. **อันตรายของก๊าซมีเทน...ภัยใกล้ตัว.** NPC Safety and Environment Service Co., Ltd.2552. www.npc-se.co.th
- 2) อนามัย เทศกะทีก. **รถจอดทิ้งไว้ ปล่องเบนซินออกมาทำอันตรายจริงหรือ.** NPC Safety and Environment Service Co., Ltd.2552 www.npc-se.co.th
- 3) อนามัย เทศกะทีก. **ก๊าซคาร์บอนมอนนอกไซด์ ภัยเงียบที่คาดไม่ถึง.** NPC Safety and Environment Service Co., Ltd.2552 www.npc-se.co.th