ผลของสารชักนำต่อผลผลิตและปริมาณไอโซฟลาโวนอยด์ของหัวกวาวเครือขาว [*Pueraria candollei* Grah. var. *mirifica* (Airy Shaw et Suvatabandhu) Niyomdham] และฤทธิ์ของสารในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรท (*Rattus norvegicus*)

นายบุญร่วม คิดค้า

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2551

THE EFFECT OF ELICITORS ON YEILD AND ISOFLAVO NOIDS IN THE TUBEROUS ROOT OF WHITE KWAO KRUA [*Pueraria candollei* Grah.var. *mirifica* (Airy Shaw et Suvatabandhu) Niyomdham] AND HYPOGLYCEMIC EFFECT ON RATS (*Rattus norvegicus*)

Bunruam Khitka

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy in Crop Production Technology

Suranaree University of Technology

Academic Year 2008

ผลของสารชักนำต่อผลผลิตและปริมาณไอโซฟลาโวนอยด์ของหัวกวาวเครือขาว [*Pueraria candollei* Grah. var. *mirifica* (Airy Shaw et Suvatabandhu) Niyomdham] และฤทธิ์ของสารในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรท (*Rattus norvegicus*)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาดุษฎีบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

_____

(อ. ดร.สุดชล วุ้นประเสริฐ)
ประธานกรรมการ

_____

(ผศ. ดร.ยุวดี มานะเกษม)
กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

_____

(ผศ. ดร.กุลวดี รังษีวัฒนานนท์)
กรรมการ

_____

(ผศ. สพ.ญ. ดร.ศจีรา คุปพิทยานันท์)
กรรมการ

_____

(รศ. ดร.พูนศุข ศรีโยธา)
กรรมการ

_____

(ศ. ดร.ไพโรจน์ สัตยธรรม)
รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

_____

(ผศ. ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)
คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

บุญร่วม คิดค้า : ผลของสารชักนำต่อผลผลิตและปริมาณไอโซฟลาโวนอยด์ของหัวกวาวเครือขาว [*Pueraria candollei* Grah. var. *mirifica* (Airy Shaw et Suvatabandhu) Niyomdham] และฤทธิ์ของสารในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรท (*Rattus norvegicus*) [THE EFFECT OF ELICITORS ON YEILD AND ISOFLAVONOIDS IN THE TUBEROUS ROOT OF WHITE KWAO KRUA [*Pueraria candollei* Grah. var. *mirifica* (Airy Shaw et. Suvatabandhu) Niyomdham] AND HYPOGLYCEMIC EFFECT ON RATS (*Rattus norvegicus*)] อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ยุวดี มานะเกษม, 122 หน้า.

พิวรารินและจีนิสทีอินเป็นสารไอโซฟลาโวนอยด์ที่พบมากในหัวกวาวเครือขาว ทำให้สารสกัดจากพืชดังกล่าวมีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีผลในการขยายหลอดเลือด และอาจลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูที่เป็นเบาหวานได้ ได้ทำการวิจัย 3 ชุดการทดลองที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในเดือนมกราคม 2549 ถึง เดือนมีนาคม 2552 เพื่อเพิ่มปริมาณพิวรารินและจีนิสทีอิน โดยใช้สารชักนำที่เหมาะสม และเพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากกวาวเครือขาวต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทที่เป็นเบาหวาน ชุดการทดลองที่ 1 ใช้สารไคโตซาน กรดซาลิไซลิก และคอปเปอร์คลอไรด์ อย่างละ 5 ความเข้มข้น เพื่อชักนำฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหัวกวาวเครือขาว ที่ปลูกใน growth chamber ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์จำนวน 4 ซ้ำ เริ่มชักนำเมื่อกวาวเครือขาวอายุ 4 เดือน จำนวน 4 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 7 วัน เก็บข้อมูลหลังสิ้นสุดการชักนำที่ 1 วัน 7 วัน 15 วันและ 30 วัน พบว่าที่เวลา 7 วันหลังการชักนำด้วยกรดซาลิไซลิกที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้หัวกวาวเครือขาวมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระสูงที่สุดเท่ากับ 49.9 เปอร์เซ็นต์และมี FRAP values เท่ากับ 6.05 ไมโครโมลของ Fe^{2+}/กรัมน้ำหนักแห้ง แตกต่างจากทุกความเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและที่ 15 วันหลังการชักนำด้วยไคโตซานที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตรและคอปเปอร์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้หัวกวาวเครือขาวมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระสูงที่สุดเท่ากับ 54.7 และ 49.9 เปอร์เซ็นต์และมี FRAP values เท่ากับ 5.72 และ 6.05 ไมโครโมลของ Fe^{2+}/กรัมน้ำหนักแห้ง แตกต่างจากทุกความเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ชุดการทดลองที่ 2 ใช้ไคโตซานที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร กรดซาลิไซลิกที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตรและคอปเปอร์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตรเป็นสารชักนำร่วมกันเพื่อชักนำปริมาณของพิวราริน จีนิสทีอินและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหัวกวาวเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber และปลูกในโรงเรือนวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์และที่ปลูกในแปลงทดลองวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ภายในบล็อก พบว่าการใช้ไคโตซานที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับคอปเปอร์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้ปริมาณของพิวรารินและจีนิสทีอินในหัวของกวาวเครือขาวที่ปลูกใน growth

chamber และที่ปลูกในโรงเรือนมีปริมาณสูงที่สุดและแตกต่างจากทรีตเมนต์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยมีพิวรารินเท่ากับ 423 และ 386 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง และมีจีนิสทีอินเท่ากับ 22.6 และ 22.4 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของพิวรารินและจีนิสทีอินเมื่อชักนำในต้นที่ปลูกในแปลงทดลอง ขณะที่การใช้ไคโตซานที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับกรดซาลิไซลิกที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร และคอปเปอร์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้กวาวเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber ปลูกในโรงเรือนและปลูกในแปลงทดลองมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2,482 1,050 และ 1,026 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และมี FRAP value เท่ากับ 4.55 4.73 และ 6.69 ไมโครโมลของ Fe^{2+}/กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ชุดการทดลองที่ 3 นำหัวกวาวเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber และชักนำด้วยไคโตซานที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับคอปเปอร์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร จากการทดลองที่สอง ที่มีพิวรารินสูงที่สุดมาสกัดด้วย เอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ แล้วใช้ป้อนหนูแรทพันธุ์วิสตาร์อายุ 10 สัปดาห์ ทั้งในหนูปกติและหนูเป็นเบาหวาน เพื่อเปรียบเทียบผลการลดระดับน้ำตาลในเลือดกับกลุ่มควบคุม พบว่าสารสกัดกวาวเครือขาวไม่มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทในภาวะที่มีระดับน้ำตาลสูงเฉียบพลันทั้งในหนูปกติและหนูเบาหวาน แต่มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดอย่างต่อเนื่อง เป็นเวลา 30 วัน โดยในวันที่ 14 ของการป้อนสารสกัดสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ 28.95 เปอร์เซ็นต์ และในวันที่ 21 ลดได้ 26.37 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยังพบว่าสารสกัดกวาวเครือขาวไม่มีผลก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่อเนื้อเยื่อตับอ่อนและเนื้อเยื่อตับของหนูเบาหวาน จากการทดลองทำให้ได้สารชักนำที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณของพิวรารินและจีนิสทีอินคือการใช้ไคโตซานความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับคอปเปอร์คลอไรด์ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร และได้ข้อมูลเบื้องต้นว่าสารสกัดจากกวาวเครือขาวขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทที่เป็นเบาหวานได้ตั้งแต่วันที่ 14 ของการป้อนอย่างต่อเนื่อง

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ปีการศึกษา 2551 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

BUNRUAM KHITKA : THE EFFECT OF ELICITORS ON YEILD AND ISOFLAVONOIDS IN THE TUBEROUS ROOT OF WHITE KWAO KRUA [*Pueraria candollei* Grah. var. *mirifica* (Airy Shaw et Suvatabandhu) Niyomdham] AND HYPOGLYCEMIC EFFECT ON RATS (*Rattus norvegicus*). THESIS ADVISOR : ASST. PROF. YUVADEE MANAKASEM, Ph.D., 122 PP.

WHITE KWAO KRUA/ ELICITORS/ ISOFLAVONOIDS/ ANTIOXIDANT/ HYPOGLYCEMIC EFFECT

Puerarin and genistein are isoflavonoids in the tuberous roots of White Kwao Krua [*Pueraria candollei* Grah. var. *mirifica* (Airy Shaw et. Suvatabandhu) Niyomdham]. Hence, White Kwao Krua (WKK) contains estrogen-like substances. It contains antioxidants and has vascular relaxation properties. It was decided to determine whether it also has a hypoglycemic effect on diabetic rats. Three sets of experiments were conducted at Suranaree University of Technology from January 2006 to March 2009. These were to study the antioxidant activities and to increase the amount of puerarin and genistein in the tuberous roots of WKK through the use of elicitors. Furthermore, whether the crude extract of WKK has a hypoglycemic effect on diabetic rats was also investigated. The first set of experiments was set up as a complete randomized design with five concentrations of each elicitor (chitosan, salicylic acid and $CuCl_2$) which were applied 4 times over one month to WKK grown in a growth chamber. The experiment had 4 replications. The data were collected at 1, 7, 15 and 30 days after the final application of the elicitors. The results showed that all concentrations of elicitors used could promote statistically significant differences in the antioxidant activities of WKK. Salicylic acid at 100 mg/L gave the highest

antioxidant activities [% inhibition by the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) method = 58.3%, ferric reducing antioxidant power (FRAP) values = 5.89 µmol Fe^{2+}/g dw] at 7 days after application. Chitosan at 1,000 mg/L and $CuCl_2$ at 200 mg/L gave the highest antioxidant activities (% inhibition = 54.7 and 49.9% by the DPPH method) and had FRAP values = 5.72 and 6.05 µmol Fe^{2+}/g dw at 15 days after application. In the second set of experiments, chitosan at 1,000 mg/L, salicylic acid at 100 mg/L, and $CuCl_2$ at 200 mg/L were used together to induce and to increase the amount of puerarin and genistein, and to increase antioxidant activity in WKK grown in the growth chamber, in the greenhouse, and in the field. The experiments in the growth chamber and in the greenhouse were set up as complete randomized designs with 8 treatments and 4 replications. The experiment in the field was set up as a randomized complete block design with 8 treatments and 3 replications. The result showed that WKK that were treated with chitosan at 1,000 mg/L plus $CuCl_2$ at 200 mg/L gave the highest amount of puerarin and genistein when grown in the growth chamber and in the greenhouse. The result for this treatment was significantly different from other treatments. The puerarin content after this treatment was 423 and 386 µg/g dw, and the genistein content was 22.6 and 22.4 µg/g dw. However, there were no statistically significant differences in the amount of puerarin and genistein for WKK that was grown in the field. The treatment of chitosan at 1,000 mg/L, plus salicylic acid at 100 mg/L, plus $CuCl_2$ at 200 mg/L, gave the highest antioxidant activities for the WKK that were grown in the growth chamber, in the greenhouse, and in the field. The IC_{50} results for these treatments were 2,482, 1,050 and 1,026 µg/ml by the DPPH method, and the FRAP values were 4.55, 4.73 and 6.69 µmol Fe^{2+}/g dw, respectively. The third set of experiments involved WKK that were grown in a growth chamber with treatment using chitosan at 1,000 mg/L plus $CuCl_2$ at 200

mg/L, which gave the highest puerarin content from the second experiment. Samples from WKK grown under these conditions were used to test the hypoglycemic effect in normal rats and in diabetic rats. Those WKK were extracted with 80% ethanol, and the crude extract was given to 10 week old rats, both normal and diabetic. The results showed that the crude extract could not reduce the blood sugar level in normal and acute diabetic rats. But, after repeated daily oral administration in chronic diabetic rats for 30 days, the crude extract statistically significantly reduced blood sugar levels compared to those of the control group by 28.92% and 26.37% on days 14 and 21. Furthermore, histopathology findings showed no evidence of lesions related to the extract toxicity. Therefore, chitosan at 1,000 mg/L plus $CuCl_2$ at 200 mg/L could increase the amount of puerarin and genistein in WKK. In addition, the WKK crude extract administered orally daily at 100 mg/kg body weight to chronic diabetic rats showed an hypoglycemic effect from day 14.

School of Crop Production Technology

Academic Year 2008

Student's Signature _____

Advisor's Signature _____

Co-advisor's Signature _____

Co-advisor's Signature _____

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบุคคลต่างๆ ที่ได้ช่วยเหลือ และสนับสนุนให้การดำเนินการวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ได้แก่

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ยุวดี มานะเกษม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่คอยให้คำแนะนำให้การช่วยเหลือ และให้โอกาสทางการศึกษา และช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ. ดร.ศจีรา คุปพิทยานันท์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กุลวดี รังษีวัฒนานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่คอยช่วยเหลือ ให้โอกาส และให้คำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์ รองศาสตราจารย์ ดร.พูนศุข ศรีโยธา คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ ดร. สุดชล วุ้นประเสริฐ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้โอกาสและให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ต่อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

Associate Professor Dr.Adrian E. Flood ที่ช่วยตรวจสอบความถูกต้องของภาษาต่างประเทศ คุณกิตติมา กฤษณสุวรรณ และคุณกรสิริ พัวเจริญเกียรติ ที่ช่วยเหลือในการตรวจสอบเอกสารและความถูกต้องของการจัดทำวิทยานิพนธ์ด้วยความเมตตาและเอาใจใส่ คุณนวลปรางค์ อุทัยดา และ คุณสมยง พิมพ์พรหม ที่ให้คำแนะนำในงานปฏิบัติการ คุณจรรจิรา วงศ์วิวัฒนา ที่ให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือวิเคราะห์สารเคมี คุณวิภาพรรณ์ พร้อมพรหม คุณวัชระ-คุณพิมพ์ผกา วงศ์วิริยะพงษ์ ที่ช่วยเหลือในการทดลองกับหนูแรทจนเป็นผลสำเร็จ และฟาร์มมหาวิทยาลัยที่อำนวยความสะดวกและช่วยเหลือการปฏิบัติงานในแปลงทดลอง

ขอขอบคุณเป็นพิเศษ คุณสุพินญา บุญมานพ คุณศิริพร ศิริชัยเวชกุล ดร.เกสร เมืองทิพย์ คุณวิโรจน์ เชาว์วิเศษ คุณจุฬาลักษณ์ ทวีบุตร คุณจารุจินันท์ หล้ากวนวัน และคุณพรทิพย์ จันทร์ราช ที่ช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน และเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาที่ให้โอกาสศึกษาต่อจนถึงระดับดุษฎีบัณฑิตแก่ผู้จัดทำวิทยานิพนธ์ด้วยทุนพัฒนาอาจารย์

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อลอง คุณแม่สอน คิดค้า ที่ให้การอบรมเลี้ยงดูและส่งเสริมการศึกษาเป็นอย่างดีตลอดมา ท้ายนี้ขอขอบคุณ คุณพรสวรรค์-น้องโบนัส-น้องมาสเตอร์ คิดค้า ที่เป็นพลังผลักดันให้ผู้วิจัยสามารถฟันฝ่าอุปสรรคจนประสพความสำเร็จ

บุญร่วม คิดค้า

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย) ..... ก

บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ) ..... ค

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ด

สารบัญภาพ ..... ฎ

บทที่

1 บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2

1.3 ขอบเขตของการวิจัย 3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4

1.5 หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ 5

1.6 รายการอ้างอิง 5

2 ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กวาวเครือขาว 6

2.1.1 นิเวศวิทยา 6

2.1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ 6

2.1.3 การเจริญเติบโต 7

2.1.4 สรรพคุณและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา 7

2.1.5 พิษวิทยาของกวาวเครือขาว 8

2.2 ไอโซฟลาโวนอยด์ 8

2.2.1 Puerarin 9

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.2.2 Genistein 10
2.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในกวาวเครือขาว 11
2.3.1 อนุมูลอิสระ 11
2.3.2 สารต้านอนุมูลอิสระ 11
2.3.3 วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 11
2.3.4 สารประกอบฟีนอล 13
2.3.5 สารประกอบฟลาโวนอยด์ 13
2.4 สารชักนำ 15
2.4.1 ไคโตซาน 16
2.4.2 กรดซาลิไซลิก 17
2.4.3 คอปเปอร์คลอไรด์ 18
2.5 โรคเบาหวาน 19
2.5.1 การทำให้สัตว์ทดลองเป็นเบาหวานด้วยสเตรปโตโซโทซิน 19
2.5.2 ยารักษาโรคเบาหวานชนิดกลัยเบนคลาไมด์ 21
2.6 รายการอ้างอิง 22
3 ชนิดและความเข้มข้นของสารชักนำต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการเจริญเติบโตของกวาวเครือขาว
บทคัดย่อ 28
3.1 บทนำ 29
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย 30
3.2.1 การทดลองที่ 1 ชักนำด้วยไคโตซาน 30
3.2.2 การทดลองที่ 2 ชักนำด้วยกรดซาลิไซลิก 33
3.2.3 การทดลองที่ 3 ชักนำด้วยคอปเปอร์คลอไรด์ 34
3.2.4 ตรวจหาการมีอยู่ของพิวรารินและจีนิสทีอิน 34
3.3 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 34
3.3.1 การทดลองที่ 1 ผลของการชักนำด้วยไคโตซาน 34

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3.2 การทดลองที่ 2 ผลของการชักนำด้วยกรดซาลิไซลิก 39
3.3.3 การทดลองที่ 3 ผลของการชักนำด้วยคอปเปอร์คลอไรด์ 43
3.3.4 ผลของสารชักนำต่อการมีอยู่ของจีนิสทีอินและพิวรารินิน 47
3.4 สรุปผลการวิจัย 48
3.5 รายการอ้างอิง 50
4 พิวรารินิ จีนิสทีอิน และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในกวาวเครือขาวที่ถูกชักนำด้วยไคโตซาน กรดซาลิไซลิก และคอปเปอร์คลอไรด์ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน
บทคัดย่อ 54
4.1 บทนำ 55
4.2 วิธีดำเนินการวิจัย 56
4.2.1 การเตรียมสารชักนำและต้นกวาวเครือขาว 56
4.2.2 การสกัดสารจากหัวกวาวเครือขาว 58
4.2.3 การตรวจหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิค 58
4.2.4 การตรวจหาฟลาโวนอยด์ 59
4.2.5 การหาปริมาณของพิวรารินและจีนิสทีอินด้วย HPLC 59
4.2.6 ฤทธิ์การยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH 60
4.2.7 การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP 60
4.2.8 การวิเคราะห์ข้อมูล 61
4.3 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 61
4.3.1 ผลของสารชักนำต่อปริมาณพิวรารินและจีนิสทีอิน 61
4.3.2 ผลต่อปริมาณสารฟีนอลิค 63
4.3.3 ผลต่อปริมาณฟลาโวนอยด์ 64
4.3.4 ผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 65
4.3.5 ผลของสารชักนำต่อการเจริญเติบโตของกวาวเครือขาว 68
4.4 สรุปผลการวิจัย 72
4.5 รายการอ้างอิง 72

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

5 สารสกัดกวาวเครือขาวกับการลดระดับน้ำตาลในเลือดและผลกระทบต่อเนื้อเยื่อตับอ่อนและตับของหนูแรทที่เป็นเบาหวาน

บทคัดย่อ 77

5.1 บทนำ 78

5.2 วิธีทดลอง 79

5.2.1 การเตรียมการทดลอง 79

5.2.2 ฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดกวาวเครือขาวในหนูแรทที่มีภาวะกลูโคสในเลือดสูงเฉียบพลันโดยการทำ oral glucose tolerance test (OGTT) 79

5.2.3 ฤทธิ์ของสารสกัดกวาวเครือขาวในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทเบาหวาน เมื่อให้สารสกัดวันละครั้งติดต่อกัน 30 วัน 80

5.2.4 ผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อเนื้อเยื่อในตับอ่อนและตับของหนูแรทเบาหวานที่ได้รับสารสกัดเป็นเวลา 30 วัน 80

5.2.5 การวิเคราะห์ข้อมูล 81

5.3 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 81

5.3.1 ฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดกวาวเครือขาวในหนูแรทที่มีภาวะกลูโคสในเลือดสูงเฉียบพลันโดยการทำ oral glucose tolerance test (OGTT) 81

5.3.2 ฤทธิ์ของสารสกัดกวาวเครือขาวในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทเบาหวาน เมื่อให้สารสกัดวันละครั้งติดต่อกัน 30 วัน 84

5.3.3 ผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อเนื้อเยื่อตับอ่อนและเนื้อเยื่อตับของหนูแรทเบาหวานที่ได้รับสารสกัดเป็นเวลา 30 วัน 87

5.4 สรุปผลการทดลอง 98

5.5 รายการอ้างอิง 98

6 บทสรุปและข้อเสนอแนะ 102

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การเตรียม citrate buffer 105

ภาคผนวก ข การเตรียม Neutral phosphate buffered formalin 105

ภาคผนวก ค เทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา 105

ประวัติผู้เขียน 122

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 กลุ่มของสารฟลาโวนอยด์และตัวอย่างสารในแต่ละกลุ่ม 9
2.2 สาเหตุของความเครียดในพืชที่เป็นสาเหตุของการเกิดอนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆ 11
3.1 การทดลองและระดับความเข้มข้นของสารชักนำในแต่ละการทดลองย่อย 31
4.1 gradient ของเฟสเคลื่อนที่ชนิด (A) และชนิด (B) 60
4.2 ผลของสารชักนำต่อพิวรารินในกวาวเครือขาวที่ปลูกในสภาพแวดล้อมต่างกัน 62
4.3 ผลของสารชักนำต่อจีนิสทีอินในกวาวเครือขาวที่ปลูกในสภาพแวดล้อมต่างกัน 63
4.4 สารฟีนอลิคในหัวกวาวเครือขาวหลังการชักนำในสภาพการปลูกที่แตกต่างกัน 64
4.5 ปริมาณฟลาโวนอยด์ในหัวกวาวเครือขาวหลังชักนำในสภาพการปลูกแตกต่างกัน 66
4.6 ค่า IC_{50} ของกวาวเครือขาวหลังการชักนำในสภาพการปลูกที่แตกต่างกัน 66
4.7 FRAP value ของกวาวเครือขาวหลังการชักนำในสภาพการปลูกที่แตกต่างกัน 67
4.8 ผลของสารชักนำต่อน้ำหนักสด/น้ำหนักแห้งของกวาวเครือขาว 69
4.9 ผลของสารชักนำต่อสารสกัดหยาบ 70
4.10 ผลของสารชักนำต่อการสังเคราะห์แสง 72
5.1 ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทปกติที่ได้รับสารกลุ่มต่าง ๆ ในภาวะการมีกูลโคสใน เลือดสูงในเลือดสูงเฉียบพลัน 83
5.2 เปอร์เซ็นต์ระดับน้ำตาลในเลือดที่ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในเวลาเดียวกันในหนูปกติที่มีภาวะกลูโคสในเลือดสูงเฉียบพลัน 83
5.3 ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทเบาหวานที่ได้รับสารกลุ่มต่าง ๆ ในภาวะที่มีระดับกลูโคสในเลือดสูงเฉียบพลัน 84
5.4 เปอร์เซ็นต์ระดับน้ำตาลในเลือดที่ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในเวลาเดียวกันในหนูเบาหวานในภาวะที่มีระดับกลูโคสในเลือดสูงเฉียบพลัน 84
5.5 ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทเบาหวานที่ได้รับสารแต่ละกลุ่มต่อเนื่อง 30 วัน 86
5.6 เปอร์เซ็นต์การลดระดับน้ำตาลในเลือดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลาเดียวกัน 87
5.7 เปอร์เซ็นต์การลดระดับน้ำตาลในเลือดของแต่ละกลุ่มทดลองเมื่อเทียบกับค่าเริ่มต้น (เทียบกับวันที่ 0) 87

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่ **หน้า**

1 การให้คะแนนเพื่อคัดเลือกความเข้มข้นและจำนวนวันที่เหมาะสม หลังชักนำด้วยไคโตซาน 107

2 ผลของไคโตซานต่อการเจริญเติบโตของกวาวเครือขาว 108

3 การให้คะแนนเพื่อคัดเลือกความเข้มข้นและจำนวนวันที่เหมาะสม หลังชักนำด้วยกรดซาลิไซลิก 109

4 ผลของกรดซาลิไซลิกต่อการเจริญเติบโตของกวาวเครือขาว 110

5 การให้คะแนนเพื่อคัดเลือกความเข้มข้นและจำนวนวันที่เหมาะสม หลังชักนำด้วยคอปเปอร์คลอไรด์ 111

6 ผลของคอปเปอร์คลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของกวาวเครือขาว 112

7 เปรียบเทียบ peak intensity ของสารอื่น ๆ ที่ตรวจพบการเปลี่ยนแปลง กับพิวรารินิ 113

8 ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูปกติตลอดการทดลอง 30 วัน 114

9 ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทปกติที่ได้รับสารกลุ่มต่าง ๆ และมีภาวะกลูโคสในเลือดสูงเฉียบพลัน 115

10 ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทเบาหวานที่ได้รับสารกลุ่มต่าง ๆ และมีภาวะกลูโคส ในเลือดสูงเฉียบพลัน 116

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกวาวเครือขาว 7
2.3 สูตรโครงสร้างของ พิวรารินี 10
2.4 สูตรโครงสร้างของ จีนิสทีอิน 10
2.5 โครงสร้างพื้นฐานของสารประกอบฟีนอล 13
2.6 แสดงสารอนุพันธ์ของสารประกอบฟีนอล 14
2.7 สารอนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์ 15
2.8 ตัวอย่างของสิ่งชักนำที่มีผลต่อการผลิตสารในวิถีการสังเคราะห์ฟีนิลโพรพานอยด์ 16
2.9 โครงสร้างของไคโตซาน 17
2.10 สูตรโครงสร้างของกรดซาลิไซลิคและวิถีการสังเคราะห์ 18
2.11 สูตรโครงสร้างของสเตรปโตโซโทซิน 20
2.12 สูตรโครงสร้างของกลัยเบนคลาไมด์ 21
3.1 สารฟีนอลิคหลังการชักนำด้วยไคโตซาน 37
3.2 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์หลังการชักนำด้วยไคโตซาน 37
3.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี DPPH หลังชักนำด้วยไคโตซาน 38
3.4 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี FRAP หลังชักนำด้วยไคโตซาน 38
3.5 สารฟีนอลิค ของกวาวเครือขาวที่ชักนำด้วยกรดซาลิไซลิก 41
3.6 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์หลังชักนำด้วยกรดซาลิไซลิก 41
3.7 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี DPPH หลังชักนำด้วยกรดซาลิไซลิก 42
3.8 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี FRAP หลังชักนำด้วยกรดซาลิไซลิก 42
3.9 สารฟีนอลิคหลังชักนำด้วยคอปเปอร์คลอไรด์ 45
3.10 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์หลังชักนำด้วยคอปเปอร์คลอไรด์ 45

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

3.11 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี DPPH หลังชักนำด้วย
คอปเปอร์คลอไรด์ 46

3.12 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี FRAP หลังชักนำด้วย
คอปเปอร์คลอไรด์ 46

3.13 TLC โครมาโตแกรมของ พิวรารินมาตรฐานและพิวราริน
ของสารสกัดจากหัวกวาวเครือขาว 49

3.14 TLC โครมาโตแกรมของจีนิสทีอินมาตรฐานและ จีนิสทีอิน
ของสารสกัดจากหัวกวาวเครือขาว 49

5.1 แสดงพยาธิสภาพของตับอ่อน แสดงไอเลตส์ออฟแลงเกอร์แฮนส์ (i)
และ acenous cells (a) หลังจากได้รับสารทดสอบติดต่อกัน 30 วัน
ของหนูปกติ 89

5.2 แสดงพยาธิสภาพของตับอ่อน แสดงไอเลตส์ออฟแลงเกอร์แฮนส์ (i)
และ acenous cells (a) หลังจากได้รับสารทดสอบติดต่อกัน 30 วัน
ของหนูเบาหวานกลุ่มควบคุม 90

5.3 แสดงพยาธิสภาพของตับอ่อน แสดงไอเลตส์ออฟแลงเกอร์แฮนส์ (i)
และ acenous cells (a) หลังจากได้รับสารทดสอบติดต่อกัน 30 วัน
ของหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับกลัยเบนคลาไมด์ 91

5.4 ตับอ่อนของหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดกวาวเครือขาว แสดงพยาธิ
สภาพของตับอ่อน แสดงไอเลตส์ออฟแลงเกอร์แฮนส์ (i) และ
acenous cells (a) หลังจากได้รับสารทดสอบติดต่อกัน 30 วัน
ของหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดกวาวเครือขาว 92

5.5 ภาพตัดขวางตับหนูแรทของหนูปกติประกอบด้วยหลอดเลือดดำ (cv)
เซลล์ตับ (h) หลอดเลือดฝอยระหว่างแถวของเซลล์ตับ (s) (H&E) 94

5.6 พยาธิสภาพของตับหนูแรทเบาหวานกลุ่มควบคุมประกอบด้วย
หลอดเลือดดำ (cv) เซลล์ตับ (h) หลอดเลือดฝอยระหว่างแถวของเซลล์ตับ (s)
(H&E) 95

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

5.7 พยาธิสภาพของตับหนูแรทหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับกลัยเบนคลาไมด์ ประกอบด้วย หลอดเลือดดำ (cv) เซลล์ตับ (h) หลอดเลือดฝอยระหว่างแถวของเซลล์ตับ (s) (H&E) 96

5.8 พยาธิสภาพของตับหนูแรทหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดกวาวเครือขาวประกอบด้วยหลอดเลือดดำ (cv) เซลล์ตับ (h) หลอดเลือดฝอยระหว่างแถวของเซลล์ตับ (s) (H&E) 97

ภาพผนวกที่

1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ $FeSO_4$ กับ ผลต่างของค่าดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร 117

2 กราฟมาตรฐานของกรดแกลิก 117

3 กราฟมาตรฐานของเคอร์ซีติน 118

4 ต้นกวาวเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber 118

5 โรงเรือนที่ใช้ปลูกกวาวเครือขาว 119

6 ต้นกวาวเครือขาวอายุ 1 ปี ที่ปลูกในแปลงทดลอง 119

7 กราฟมาตรฐานของพิวรารินี 120

8 กราฟมาตรฐานของจีนิสทีอิน 120

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กวาวเครือขาวเป็นพืชสมุนไพรและเป็นพืชสงวนลำดับที่ 8 ตามพระราชบัญญัติพันธุ์พืช พ.ศ. 2518 (ฉบับที่ 1) ตามประกาศของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ที่ประกาศในราชกิจจานุเบกษา (กรมวิชาการเกษตร, 2548) เพื่อไม่ให้จำนวนที่พบในธรรมชาติลดลงอย่างรวดเร็วและอาจสูญพันธุ์ได้ ความต้องการกวาวเครือขาวมีสูงขึ้นใน พ.ศ. 2542 เนื่องจากหัวกวาวเครือขาวมีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน (Lee *et al.*, 1893; Cherdshewasart *et al.*, 2004) และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง (antioxidant) (Cherdshewasart *et al.*, 2008) สารไอโซฟลาโวนอยด์ (isoflavonoids) ที่พบการสะสมในกวาวเครือขาวคือพิวรารินn (puerarin) และจีนิสทีอิน (genistein) (Chansakaow *et al.*, 2000) พิวรารินมีผลลดภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance) ลดการแข็งตัวของหลอดเลือด (Xu *et al.*, 2005) และเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (John *et al.*, 2004) ส่วนจีนิสทีอินเป็นฮอร์โมนเอสโตรเจนอย่างอ่อน ลดการเกิดภาวะกระดูกพรุน (Knight and Eden, 1996) การยับยั้งเซลล์มะเร็ง และเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Frank *et al.*, 1994) อนุมูลอิสระ (free radicals) เป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน สามารถทำลายเซลล์และทำให้เกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคมะเร็ง และโรคอัลไซเมอร์ การบริโภคหรือใช้สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จะป้องกันและลดโอกาสเกิดโรคเหล่านี้ได้ (เฉลิมพงษ์ แสนจุ้มและไชยวัฒน์ ไชยสุต, 2547) สารต้านอนุมูลอิสระจะจับอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวของสารอนุมูลอิสระ จึงยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (Gutteridge and Halliwell, 1994) ความก้าวหน้าของงานวิจัยด้านสรรพคุณและพิษวิทยาของกวาวเครือขาวมีมากขึ้น ทำให้ผู้บริโภคเข้าใจและยอมรับผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของกวาวเครือขาวในรูปแบบต่าง ๆ เช่น ยาแผนโบราณ อาหารเสริมสุขภาพหรือใช้ผสมในเครื่องสำอางมากขึ้น (วิชัย เชิดชีวศาสตร์, 2541; นิสากร ปานประสงค์, 2542; อรดี สหวัชรินทร์, 2542) คณะกรรมการอาหารและยาขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์ที่มีกวาวเครือขาวเป็นส่วนประกอบเป็นยาแผนโบราณแล้วกว่า 50 ตำรับ (กระทรวงสาธารณสุข, 2542) และมูลค่าการส่งออกของผลิตภัณฑ์จากกวาวเครือขาวมีประมาณ 1,500 ล้านบาท/ปี (มูลนิธิการแพทย์แผนไทย, 2548) กวาวเครือขาวยังใช้ในการเลี้ยงสัตว์ได้ พบว่าผงกวาวเครือขาวที่ผสมในอาหารเลี้ยงสุกรสามารถเพิ่มคุณภาพเนื้อของสุกรเพศผู้ได้ใกล้เคียงกับเนื้อของสุกรเพศเมีย (สมโภชน์ ทับเจริญ และคณะ, 2552) การผสมกวาวเครือขาว 1 ถึง 2 เปอร์เซ็นต์ในอาหารเลี้ยงไก่ ทำให้ไก่เจริญเติบโตดีไม่

แตกต่างจากการได้รับฮอร์โมนสังเคราะห์ แต่ทำให้สีและรสชาดของเนื้อส่วนอกดีกว่าการให้ฮอร์โมนสังเคราะห์ (อรรถวุฒิ พลายบุญ และคณะ, 2552) หัวกวาวเครือขาวมีพิวรารินที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงไม่แตกต่างจาก α-tocopherol ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน (Cherdshewasart *et al.*, 2008) และมีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูทดลองได้ (Chen *et al.*, 2004) อาจจะเป็นประโยชน์ในการรักษาโรคเบาหวานได้ เนื่องจากการใช้ประโยชน์จากกวาวเครือขาวมีความหลากหลายมากขึ้น คาดว่าความต้องการใช้หัวกวาวเครือขาวจะเพิ่มขึ้นด้วย ปัญหาที่สำคัญคือคุณภาพของหัวไม่สม่ำเสมอ Cherdshewasart *et al.* (2008) พบว่ากวาวเครือขาวที่เก็บจากป่าจำนวน 28 แห่ง มีสารไอโซฟลาโวนอยด์ชนิดหลัก ๆ เช่น พิวรารินและจีนิสทีอิน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากได้รับอิทธิพลของพันธุกรรม และอิทธิพลของสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ เพื่อลดปัญหาดังกล่าวและทำให้หัวกวาวเครือขาวที่ปลูกโดยเกษตรกรมีคุณภาพดีขึ้น จึงใช้วิธีเร่งให้กวาวเครือขาวสร้างหรือสะสมสารไอโซฟลาโวนอยด์ให้สูงขึ้น ในพืชตระกูลเดียวกันกับกวาวเครือขาว เพิ่มปริมาณจีนิสทีอินได้ด้วยการใช้สารชักนำเช่น ไคโตซาน (chitosan) และกรดซาลิไซลิก (salicylic acid) (Kneer *et al.*, 1999; Al-Tawaha *et al.*, 2005) ประสาร ฉลาดคิด (2547) พบว่าการฉีดพ่นคอปเปอร์คลอไรด์เพิ่มปริมาณจีนิสทีอินในหัวกวาวเครือขาวได้

การศึกษาครั้งนี้ จึงใช้ไคโตซาน กรดซาลิไซลิกและคอปเปอร์คลอไรด์เป็นสารชักนำ แล้วคัดเลือกความเข้มข้นและจำนวนวันหลังการชักนำ (treatment time) ของสารแต่ละชนิดที่เพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้มากที่สุดมาใช้ร่วมกัน เพื่อชักนำให้กวาวเครือขาวสร้างพิวราริน จีนิสทีอิน สารฟีนอลิคโดยรวม (total phenolic acid) สารฟลาโวนอยด์โดยรวม (total flavonoids) และศึกษาผลกระทบของสารชักนำต่อการเจริญเติบโตของกวาวเครือขาว แล้วนำกวาวเครือขาวที่มีพิวรารินสูงที่สุดที่ได้จากการชักนำ ไปป้อนหนูแรทที่เป็นเบาหวานเพื่อศึกษาฤทธิ์ของการลดระดับน้ำตาลในเลือด เปรียบเทียบกับการป้อนน้ำกลั่นและการป้อนยาควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด จึงเป็นพื้นฐานที่สำคัญต่อการใช้สารชักนำในการปลูกกวาวเครือขาว และการใช้กวาวเครือขาวในเชิงการรักษาโรคเบาหวานต่อไปได้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อคัดเลือกความเข้มข้นและจำนวนวันหลังการชักนำที่เหมาะสมของไคโตซาน กรดซาลิไซลิกและสารคอปเปอร์คลอไรด์ในการชักนำให้กวาวเครือขาวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สารฟีนอลิค และสารฟลาโวนอยด์สูงขึ้น

1.2.2 เพื่อคัดเลือกสารชักนำที่เหมาะสมจากการใช้ไคโตซาน กรดซาลิไซลิกและคอปเปอร์คลอไรด์เป็นสารชักนำร่วมกัน ในการเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พิวรารินและจีนิสทีอินในหัวกวาวเครือขาว ที่ปลูกใน growth chamber ในโรงเรือน และในแปลงทดลอง

1.2.3..เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากหัวกวาวเครือขาวต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือด และผลกระทบต่อตับอ่อนและตับ ของหนูแรทที่เป็นเบาหวาน

1.3 ขอบเขตการวิจัย

1.3.1 การทดลองที่หนึ่ง กลุ่มตัวอย่างคือกวาวเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber อายุ 4 เดือน ชักนำด้วยไคโตซาน กรดซาลิไซลิก และคอปเปอร์คลอไรด์ ชนิดละ 5 ความเข้มข้น ตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คัดเลือกความเข้มข้นของสารชักนำแต่ละชนิด ที่ทำให้หัวกวาวเครือขาวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดไปใช้ในการทดลองที่สอง

1.3.2 การทดลองที่สองนำสารจากการทดลองที่หนึ่งมาใช้ร่วมกันเพื่อชักนำ ให้กวาวเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber ในโรงเรือนและแปลงทดลอง สร้างสารพิวรารินและจีนิสทีอินและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

1.3.3 การทดลองที่สามคัดเลือกหัวกวาวเครือขาวที่มีปริมาณของพิวรารินสูงที่สุดจากการทดลองที่สอง ไปสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์แล้วป้อนหนูแรทที่เป็นเบาหวาน เปรียบเทียบฤทธิ์การลดระดับน้ำตาลในเลือดกับการป้อนน้ำกลั่นและยากลัยเบนคลาไมด์ (glibenclamide)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้สารชักนำที่เหมาะสมในการเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เพิ่มพิวรารินและจีนิสทีอินในหัวกวาวเครือขาวให้สูงขึ้นก่อนการเก็บเกี่ยว

1.4.2 ได้ทราบฤทธิ์การลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทในสภาวะที่ระดับน้ำตาลในเลือดสูงเฉียบพลันและการให้สารติดต่อกัน เป็นเวลา 30 วัน ผลต่อเนื้อเยื่อตับอ่อนและตับ ซึ่งอาจเป็นแนวทางในการใช้ประโยชน์ในผู้ป่วยโรคเบาหวานต่อไป

1.5 หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1.5.1 ผู้ปลูกกวาวเครือขาวและผู้ประกอบธุรกิจด้านสมุนไพร

1.5.2 ผู้ประกอบวิชาชีพเวชกรรม เภสัชกรรม

1.5.3 ผู้ประกอบโรคศิลปะสาขาการแพทย์แผนไทยและหมอพื้นบ้าน

1.5.4 หน่วยงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้ประโยชน์ของกวาวเครือขาว

1.5.5 สถาบันการศึกษาทั่วไป

1.6 รายการอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. (2548). **กวาวเครือขาว-พืชมหัศจรรย์**. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

กระทรวงสาธารณสุข. (2542). สธ ย้ำจุดยืนต่อการพัฒนาแพทย์แผนไทยและสมุนไพร: กรณีศึกษากวาวเครือ **เอกสารแถลงข่าวกระทรวงสาธารณสุข** 7 ตุลาคม.

นิสากร ปานประสงค์. (2542). กวาวเครือความหวังสมุนไพรไทย. **วารสาร UPDATE** กันยายน-ตุลาคม. หน้า 40-45.

ประสาร ฉลาดคิด. (2546). อิทธิพลของสภาพแวดล้อมและปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโต การออกดอก การติดฝักและเมล็ด และการสะสมสาร daidzein และ genistein ในหัวกวาวเครือขาว [*Pueraria candollei* Grah. var. *mirifica* (Airy Shaw et Suvatabandhu) Niyomdham]. **วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต**. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

มูลนิธิการแพทย์แผนไทย. (2548). กวาวเครือ...การพัฒนาและคุ้มครองอย่างยั่งยืน. ใน **เอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการ เรื่อง กวาวเครือกับการพัฒนาและคุ้มครองอย่างยั่งยืน**. 13-15 กันยายน 2548. กระทรวงสาธารณสุข. นนทบุรี.

วิชัย เชิดชีวศาสตร์. (2541). ข้อเสนอแนะ และทิศทางการวิจัยกวาวเครือขาวในอนาคต. ใน **เอกสารประกอบการสัมมนาเรื่องกวาวเครือ** (หน้า 36-38). กรุงเทพฯ: สถาบันการแพทย์แผนไทย. กรมการแพทย์.

สมโภชน์ ทับเจริญ, ยุทธนา สมิตะสิริ, สุเจตน์ ชื่นชม, หลอด แปรงกระโทก และ เสาวลักษณ์ ผ่องลำเจียก. (2552). **ผลของกวาวเครือขาวต่อสมรรถภาพการผลิตและคุณภาพซากของสุกรในระยะรุ่น-ขุน.** [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.ku.ac.th/kaset60/Theme04/theme-0408/Project03/index-04-0803.html

อรดี สหวัชรินทร์. (2542). กวาวเครือ สมุนไพรครอบจักรวาล. **ว. เคหะการเกษตร.** 23(3): 127-135.

อรรถวุฒิ พลายบุญ สมโภชน์ ทับเจริญ อรทัย ไตรวุฒานนท์ อรประพันธ์ ส่งเสริม เกรียงศักดิ์ สอาดรักษ์ มณฑาทิพย์ ยุ่นฉลาด ธีรวุท ปิ่นทอง และ วุฒิชัย นุตกุล. (2552). **การใช้อาหารผสมผงกวาวเครือขาวในการเลี้ยงไก่เนื้อตอน.** [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.rdi.ku.ac.th/Techno_ku60/res-62/index62.html

Chansakaow, S., Ishikawa, T., Seki, H., Sekine, K. Okada, M. And Chaichantipyuth, C. (2000). Identification of deoxymiroestrol as the actual rejuvenating principle of *Pueraria mirifica*. The known miroestrol may be an artifact. **J Nat Prod.** 63: 173-175.

Chen, W.C., Hayakawa, S., Yamamoto, T., Su, H.C., Liu, I.M. and Cheng, J.T. (2004). Mediation of beta-endorphin by the isoflavone puerarin to lower plasma glucose in streptozotocin-induced diabetic rats. **Plant Med.** 70(2): 113-116.

Cherdshewasart, W., Cheewasopit, W. and Picha, P. (2004). The differential anti-proliferation effect of white (*Pueraria mirifica*), red (*Butea superba*) and black (*Mucuna collettii*) Kwao Krua plants on the growth of MCF-7 cells. **J. Ethnopharmacol.** 93: 255-260.

Cherdshewasart, W. and Sutjit, W. (2008). Correlation of antioxidant activity and major isoflavonoid contents of the phytoestrogen-rich *Pueraria mirifica* and *Pueraria lobata* tubers. **Phytomedicine.** 15: 38-43.

Frank, A.A., Custer, L.J., Cerna, C.M., and Narala, K.K. (1994). Quantitation of phytoestrogens in legumes by HPLC. **J Agri Food Chem.** 42: 1905-1913.

Knight, D.C. and Eden, J.A. (1996). A Review of the clinical effect of phytoestrogen. **Obstet Gynecol.** 87: 897-904.

Lee, Y.S., Park, J.S., Cho, S.D., Son, J.K., Cherdshewasart, W. and Kang, K.S. (1983). Requirement of metabolic activation for estrogenic activity of *Pueraria mirifica*. **J Nat Prod.** 63: 173-175.

บทที่ 2
ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กวาวเครือขาว

กวาวเครือขาว [*Pueraria candollei* Grah. var. *mirifica* (Airy Shaw et. Suvatabandhu) Niyomdham] (ชวลิต นิยมธรรม, 2538) หรือ ตานจอมทอง กวาวหัว ตาลานเครือ เป็นพืชในวงศ์ Leguminosae อนุวงศ์ papilionoideae (วุฒิ วุฒิธรรมเวช, 2540) .

2.1.1 นิเวศวิทยา

ชวลิต นิยมธรรม (2538) รายงานว่าพบได้มากตามป่าเบญจพรรณในภาคเหนือที่จังหวัดเชียงใหม่และลำปาง ในพื้นที่ที่มีความสูง 300-800 เมตรจากระดับน้ำทะเล จรัญ ดิษฐ์ไชยวงศ์ และคณะ (2548) รายงานว่าพบกวาวเครือขาวในแหล่งธรรมชาติ 9 แหล่ง คือ เชียงใหม่ กำแพงเพชร เลย กาญจนบุรี และแหล่งโคราช (ลพบุรี สระบุรี นครราชสีมา) ประจวบคีรีขันธ์ เชียงราย ปราจีนบุรี และเพชรบูรณ์ (เขาค้อ)

2.1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

กรมวิชาการเกษตร (2548) รายงานว่า หัวหรือรากสะสมอาหาร (tuberous roots) ลักษณะค่อนข้างกลม ขนาดใหญ่และคอดยาวเป็นตอน ๆ ต่อเนื่องกัน เปลือกบางแต่แข็ง สีน้ำตาลอ่อนถึงสีน้ำตาลเข้ม ความหนาของเปลือกประมาณ 2-4 มิลลิเมตร เนื้อภายในมีสีขาวนวล เห็นวงปี ลำต้นเป็นเถาเลื้อยพันกับต้นไม้อื่น เถาย่อยจะแตกแขนงออกไปจากเถาหลัก เถาแก่มีสีน้ำตาลอ่อนจนถึงสีน้ำตาลเข้ม ยอดอ่อนและกิ่งอ่อน มีสีเขียว ใบเป็นใบประกอบมีใบย่อย 3 ใบ ก้านใบประกอบยาว 10-28 เซนติเมตร หูใบเป็นรูปไข่ โคนใบมนหรือเป็นติ่งยื่นลงมา ดอกเป็นช่อเดี่ยวและช่อแขนงออกตามปลายกิ่ง ยาว 20-30 เซนติเมตร ก้านช่อดอกมีขนสั้น ๆ คล้ายดอกถั่ว ยาว 4-7 เซนติเมตร กลีบรองดอกเชื่อมติดกันเป็นรูประฆัง มีกลีบดอก 5 กลีบ ดอกออกเป็นกระจุกในระยะผลัดใบ กระจุกละ 3-5 ดอก ฝักมีลักษณะแบนรูปขอบขนาน กว้างประมาณ 7 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 3 เซนติเมตร มี 3-4 เมล็ด/ฝัก เมล็ดค่อนข้างกลม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 มิลลิเมตร (ภาพที่ 2.1)

2.1.3 การเจริญเติบโต

ประสาร ฉลาดคิด (2546) พบว่าการเจริญในรอบ 1 ปี (phenological cycle) ของกวาวเครือขาวในป่าตามธรรมชาติที่ อำเภอวังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา มีระยะแตกเครือเถาและใบอ่อนเริ่มตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ถึงมีนาคม ระยะการเจริญและพัฒนาของเครือเถาและใบเริ่มตั้งแต่เดือนมีนาคมถึงกรกฎาคม ระยะผลัดใบเริ่มตั้งแต่เดือนตุลาคมถึงกุมภาพันธ์ ระยะออกดอกเริ่มตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์และ ระยะการติดฝักจนเจริญและพัฒนาเป็นเมล็ดแก่ในเดือนเมษายน ขณะที่ในแปลงทดลองที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุนารีจะออกดอกในระหว่างเดือนพฤศจิกายนถึงมกราคม เมื่อมีอายุ 6 เดือนจำนวนช่อดอกเฉลี่ย/ต้นเท่ากับ 41.90 น้ำหนักเฉลี่ย/100 เมล็ดเท่ากับ 2.52 กรัมโดยมีระยะ เวลาตั้งแต่เริ่มออกดอกในเดือนพฤศจิกายนจนกระทั่งเมล็ดแก่ในเดือนมีนาคมหรือประมาณ 4 เดือน น้ำหนักหัวเฉลี่ยเมื่ออายุ 4 เดือนเท่ากับ 38.59 กรัม และเพิ่มขึ้นเป็น 249.88 กรัม เมื่อต้นกวาว เครือขาวอายุ 16 เดือน เปอร์เซ็นต์ความชื้นเฉลี่ยของหัวที่อายุ 4 เดือนเท่ากับ 90.29 และเพิ่มขึ้นเป็น 90.69 เปอร์เซ็นต์ เมื่อกวาวเครือขาวอายุ 16 เดือน ความหนาแน่นเฉลี่ยของหัวที่อายุ 4 เดือนเท่ากับ 0.98 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร และเพิ่มขึ้นเป็น 1.03 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร เมื่อกวาวเครือขาวอายุ 16 เดือน

ภาพที่ 2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกวาวเครือขาว (วิโรจน์ เชาว์วิเศษ, 2550)

2.1.4 สรรพคุณและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

สารไอโซฟลาโวนส์ในหัวทำให้กวาวเครือขาวมีคุณสมบัติเป็นไฟโตเอสโตรเจน (phytoestrogen) คือเอสโตรเจนที่ได้จากพืชและออกฤทธิ์เช่นเดียวกับเอสโตรเจนในสัตว์ทุก

ประการ ไฟโตเอสโตรเจนมีฤทธิ์ต่อร่างกายหลายอย่าง ทั้งกระตุ้นภูมิต้านทาน ต้านอนุมูลอิสระและทำหน้าที่คล้ายฮอร์โมน (บรรจบ ชุณหสวัสดิกุล, 2543) นอกจากนี้มีรายงานผลของกวาวเครือขาวต่อระบบต่าง ๆ ในสัตว์ทดลองดังนี้

2.1.4.1 ผลต่อระบบสืบพันธุ์ มีผลคุมกำเนิดยับยั้งการฝังตัวของตัวอ่อน การสร้างอสุจิ การหลั่งน้ำนม และการออกไข่ของสัตว์ทดลอง (นันทวัน บุญยะประภัสสร และอรนุช โชคชัยเจริญพร, 2530) ทำให้หนูทดลองที่ตั้งท้องในระยะแรกแท้ง (ยุทธนา สมิตะสิริและสันติ ศักดารัตน์, 2538) การให้ผงป่นกวาวเครือขาวขนาด 100 และ 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/ครั้ง ทำให้ขนาดและน้ำหนักของอัณฑะ ต่อมลูกหมาก และ seminal vesicle ของหนูทดลองลดลงและทำให้อสุจิหยุดการเจริญ (ยุพดี ลางคลิจันทร์, 2527)

2.1.4.2 ผลต่อระบบเลือด กวาวเครือขาวมีฤทธิ์กระตุ้นให้ตับสร้างโปรตีนที่จับแคลเซียมได้ ระบบทางเดินอาหารจึงดูดซึมแคลเซียมได้มากขึ้นและทำให้ total protein และ chloresterol ในเลือดสูงขึ้น (สมบูรณ์ อนันตลาโภชัยและสุวิทย์ เจศรีชัย, 2528) การให้กวาวเครือขาวขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน ทำให้จำนวนเม็ดเลือดแดงของหนูทดลองลดลงประมาณร้อยละ 20 (บรรจบ ชุณหสวัสดิกุล, 2543)

2.1.4.3 ผลต่อต่อมหมวกไตและตับ สารสกัดกวาวเครือจะลดการหลั่ง follicle stimulating hormone (FSH) และ luteinizing hormone (LH) จากต่อมใต้สมอง การสร้างฮอร์โมนเพศจึงลดลง ทำให้ต่อมหมวกไตทำหน้าที่สร้างฮอร์โมนแทน ต่อมหมวกไตจึงมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น และการป้อนผงป่นปริมาณ 100 และ 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/ครั้ง ทำให้มีเลือดคั่งในหลอดเลือดดำใหญ่ในตับ (ยุพดี ลางคลิจันทร์, 2527) หนูขาวที่กินผงกวาวเครือขาวปริมาณ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ต่อเนื่อง 14 วัน ทำให้เซลล์ตับเกิดการอักเสบมีเลือดคั่ง (วราภรณ์ พงษ์ดำ และคณะ, 2530)

2.1.5 พิษวิทยาของกวาวเครือขาว

กวาวเครือขาวมีค่า LD_{50} มากกว่า 10 กรัม/กิโลกรัม การทดสอบพิษกึ่งเรื้อรังในหนูเพศผู้ที่ได้รับกวาวเครือขาว 100 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม พบว่าทำให้หนูมีการเติบโตลดลง มีคอเลสเตอรอลลดลงจาก 70 มิลลิกรัม เหลือ 20 มิลลิกรัม มีตับโตขึ้น และอัณฑะมีอาการบวมน้ำ (ปราณี ชวลิตธำรง และคณะ, 2542)

2.2 ไอโซฟลาโวนอยด์

ไอโซฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์กลุ่มหนึ่งที่พบทั่วไปในพืชตระกูลถั่วจึงพบได้ในกวาวเครือขาว และเป็นสารกลุ่มที่ทำให้เกิดสรรพคุณและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของกวาวเครือขาวดังรายละเอียดข้างต้น สามารถแบ่งไอโซฟลาโวนอยด์ตามโครงสร้างออกเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ chromenes, isoflavones, isoflavone glycosides, coumestans และ pterocarpans (Ingham *et al.*, 1998) ดังสรุปในตารางที่ 2.1

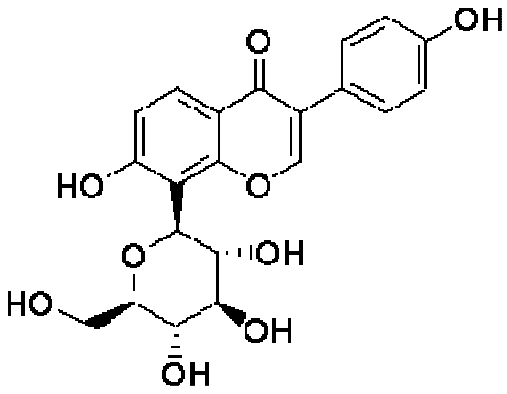
ตารางที่ 2.1 กลุ่มของสารฟลาโวนอยด์และตัวอย่างสารในแต่ละกลุ่ม (Ingham *et al.*, 1998)

กลุ่มของไอโซฟลาโวนอยด์	สารในกลุ่ม
Chromenes	-Miroestrol
	-Deoxymiroestrol
	-Isomiroestrol
Isoflavones	-Daidzein
	-Genistein
	-Kwakhurin
	-Kwakhurin hydrate
Isoflavone glycosides	-Daidzin
	-Genistin
	-Mirificin
	-Puerarin
Coumestans	-Coumestrol
	-Mirificoumestan
	-Mirificoumestan glycol
	-Mirificoumestan hydrate
Pterocarpans	-Tuberosin
	-Puemiricarpene

ตัวอย่างของสารไอโซฟลาโวนอยด์ในกลุ่มต่าง ๆ ที่มีการใช้ประโยชน์และได้รับความสนใจในปัจจุบัน มีดังนี้

2.2.1 Puerarin

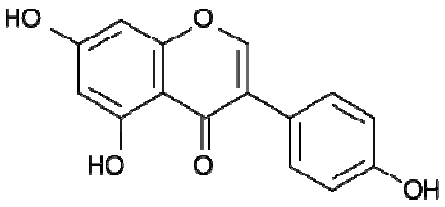
พิวรารินเป็นสารประกอบไอโซฟลาโวนอยด์ สูตรโมเลกุลคือ $C_{21}H_{20}O_9$ และสูตรโครงสร้างดังแสดงในภาพ 2.3 มีผลต่อการรักษาภาวะอ้วน (obesity) ภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance) ความดันโลหิตสูง ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติและภาวะหลอดเลือดแข็งตัว (Xu *et al.*, 2005) ลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูทดลองที่เป็นเบาหวาน (Chen *et al.*, 2004) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ต้านการเกิดโรคมะเร็ง (John *et al.*, 2004) พิวรารินแยกได้จาก *Pueraria lobota* (Guo *et al.*, 2001) มีผลให้การไหลเวียนเลือดดีขึ้น (Zhu *et al.*, 2004; Cervellati, 2002) และป้องกันการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ (Benlhabib, 2004)



ภาพที่ 2.3 สูตรโครงสร้างของ พิวราริน (Sigma-aldrich, 2009a)

2.2.2 Genistein

จีนิสทีอิน มีสูตรโครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 2.4 มีคุณสมบัติเป็นสารที่ออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน (William and Harbone, 1989) จึงมีผลต่อร่างกายหลายประการ เช่น ลดภาวะกระดูกพรุน (Knight and Eden, 1996) ลดไขมันอุดตันในเส้นเลือด (Antony *et al.*, 1996) ยับยั้งกระบวนการเกิดมะเร็งหลายประการ เช่น antimutagenic, antiproliferative, antiestrogenic และ antioxidant (Frank *et al.*, 1994)



ภาพที่ 2.4 สูตรโครงสร้างของ จีนิสทีอิน (Sigma-aldrich, 2009b)

2.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในกวาวเครือขาว

2.3.1 อนุมูลอิสระ

คืออะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนที่ไม่เข้าคู่อย่างน้อย 1 อิเล็กตรอนจึงเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียร และว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาทางเคมี (ไมตรี สุทธจิตต์ และคณะ, 2545; จรรยา แสงอรุณและคณะ, 2545) อนุมูลอิสระอาจเกิดจากการสลายตัวของโมเลกุลที่ถูกกระตุ้นโดยรังสีเอ็กซ์ รังสีอิเล็กตรอน รังสีแกรมมา และความร้อน หรืออาจเกิดจากกระบวนการย่อยสลายสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ เกิดจากการออกซิเดชั่นของลิปิดในอาหารเนื่องจากความร้อน แสง และโลหะหนัก เช่น เหล็กและแมงกานีส และเกิดจากมลภาวะ เช่น ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ไนโตรเจนไดออกไซด์ ควันบุหรี่ ในสภาวะปกติร่างกายจะสร้างอนุมูลอิสระในอัตราที่ปกติ และเป็นไปในแนวทางที่เป็นประโยชน์ แต่ในสภาวะที่มีการสร้างมากเกินไป จะเกิดภาวะความเครียดเนื่องจากออกซิเดชัน (oxidative stress) จึงเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ พิษของอนุมูลอิสระต่อพืช เมื่อพืชอยู่ในสภาวะเครียดจะสร้างอนุมูลอิสระของ reactive oxygen species (ROS) ขึ้น (Polle and Rennenberg, 1993) ดังแสดงในตารางที่ 2.2 จึงทำให้สรีรวิทยา และการแสดงออกของยีนของพืชเปลี่ยนแปลงไป (Sharma and Davis, 1997)

ตารางที่ 2.2 สาเหตุของความเครียดในพืชที่เป็นสาเหตุของการเกิดอนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆ

Stressor	ROS
Drought	$O_2^{\circ -}$
Nutrient deficiency	$O_2^{\circ -}$
Pathogens	H_2O_2

2.3.2 สารต้านอนุมูลอิสระ

คือสารที่มีโครงสร้างที่สามารถจับอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวของอนุมูลอิสระ ทำให้ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและปฏิกิริยาลูกโซ่ได้ จึงลดอัตราการเกิดโรคร้ายแรงต่าง ๆ ที่เกิดจากอนุมูลอิสระเป็นต้นเหตุ (Gutteridge and Halliwell, 1994)

2.3.3 วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

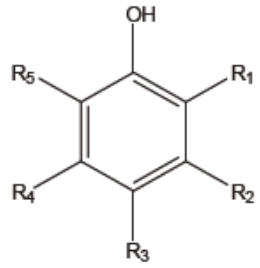
2.3.3.1 วัดความสามารถในการจับสารอนุมุลอิสระ 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH) เป็นการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่ใช้ reagent คือ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl ซึ่งเป็นอนุมูลิสระที่เสถียรในตัวทำละลายเมทานอล สารละลายนี้มีสีม่วง ดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ถ้าตัวอย่างมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้สูง ความเข้มของสารละลายสีม่วงก็จะลดลง รายงานผลเป็นค่า 50 เปอร์เซ็นต์ effective concentration (EC_{50}) ซึ่งหมายถึงปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ความเข้มข้นของ DPPH เหลืออยู่ 50 เปอร์เซ็นต์ หรือรายงานในรูปของค่า IC_{50} ด้วย ซึ่งทำโดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระกับความเข้มข้นของสารตัวอย่าง เพื่อหาค่า IC_{50} วิธี DPPH มีข้อดีคือ สะดวก รวดเร็ว ง่ายต่อการวิเคราะห์ ให้ความถูกต้อง และมี reproducibility สูง แต่มีข้อเสียคือ ไม่สามารถใช้วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเลือดได้เพราะต้องวัดในปฏิกิริยาที่เป็น alcohol ซึ่งทำให้โปรตีนตกตะกอนได้

2.3.3.2 วิธี ferric reducing/antioxidant power (FRAP) เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการตรวจสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยอาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์ และติดตามการเปลี่ยนแปลงสีของสารประกอบเชิงซ้อนคือ เมื่อสารประกอบเชิงซ้อน ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+}-TPTZ) ได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านออกซิเดชัน แล้วจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อน ferrous tripyridyltriazine (Fe^{2+}-TPTZ) ที่มีสีม่วงน้ำเงิน วิธี FRAP สามารถติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร จากนั้นศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันในสารตัวอย่าง โดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ferrous sulfate แล้วรายงานเป็นค่า FRAP value ข้อดีของวิธีนี้ก็คือ เสียค่าใช้จ่ายน้อย สะดวก รวดเร็ว มีขั้นตอนในการทดลองไม่ยุ่งยากซับซ้อนและมี reproducibility ดี

สารต้านอนุมูลอิสระในพืชที่สำคัญ ได้แก่ วิตามินอี พบมากในเมล็ดทานตะวัน ถั่วเหลือง และน้ำมันรำข้าว สารประกอบฟีนอลิค (phenolic compound) มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดสี กลิ่นและรสชาดในพืชผักและผลไม้ เช่น ฟลาโวนอยด์ (flavonoids compound) ซึ่งมีประมาณ 8,000 ชนิด (ปวีณา ช่วงทิพย์, 2546; นวลศรี รักอริยะธรรม และอัญชนา เจนวิถีสุข, 2545)

2.3.4 สารประกอบฟีนอล

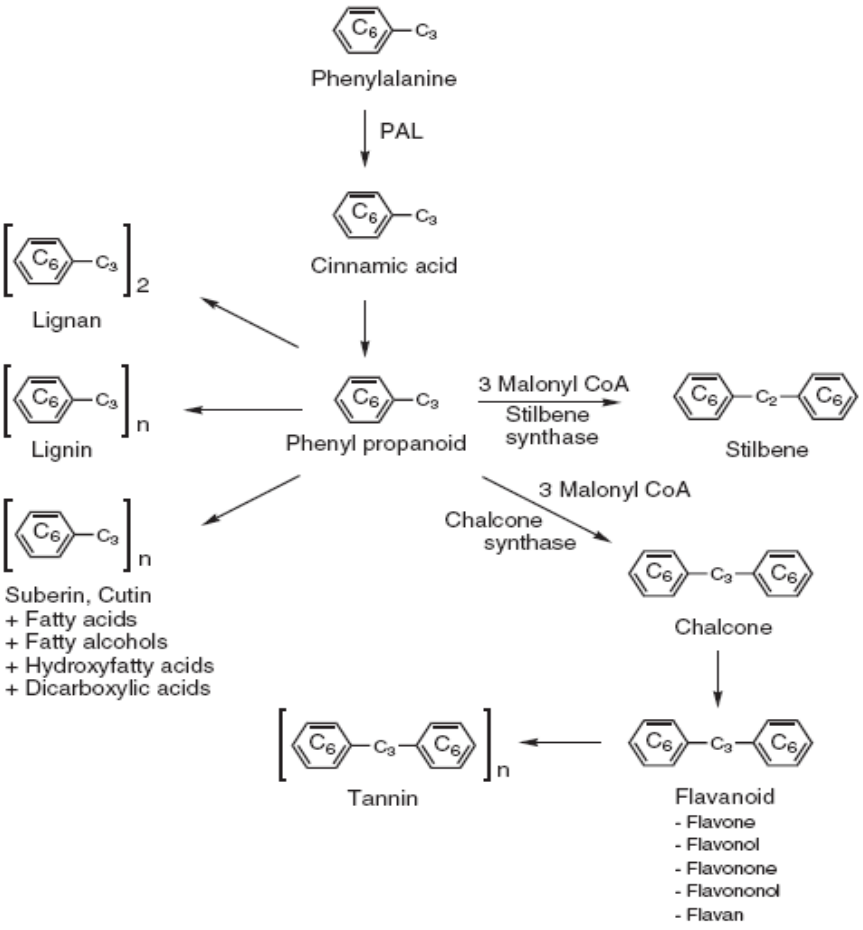
เป็นอนุพันธ์ของเบนซีนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลต่ออยู่เป็นแกนหลักและอาจมีหมู่แทนที่มาแทนที่ตำแหน่ง ortho meta หรือ para ได้อีก R1 ถึง R5 เป็นหมู่แทนที่ การแทนที่ตำแหน่งต่าง ๆ เหล่านี้ทำให้สารประกอบฟีนอลในพืชมีโครงสร้างแตกต่างกันไป ดังภาพที่ 2.5 สารประกอบฟีนอลเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่สำคัญในพืช สังเคราะห์จากกรดอะมิโน ฟีนิลอะลานิน (phenylalanine) และไทโรซีน (tyrosine) อนุพันธ์ของสารประกอบฟีนอลที่พบในพืชได้แก่ ฟลาโวนอยด์ แทนนิน ลิกนิน เป็นต้น ดังแสดงในภาพที่ 2.6



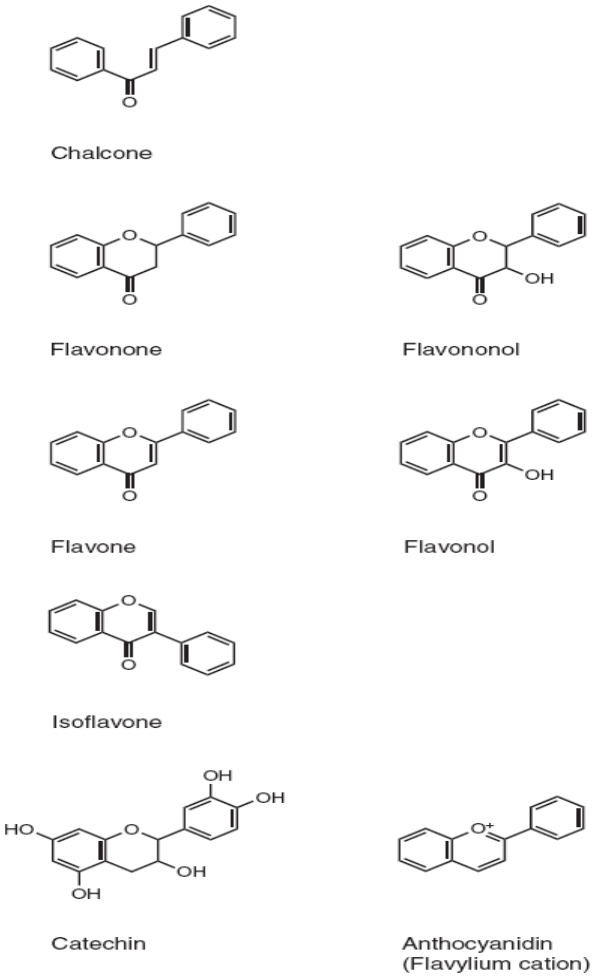
ภาพที่ 2.5 โครงสร้างพื้นฐานของสารประกอบฟีนอล

2.3.5 สารประกอบฟลาโวนอยด์

เป็นสารกลุ่มหนึ่งของสารประกอบฟีนอล เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง p-cumaryl Co A (C6-C3) กับ malonyl Co A 3 โมเลกุล ได้เป็น chalcones แล้วทำการปิดวงในสภาวะที่เป็นกรด โครงสร้างของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์จึงเป็น diphenylpropane (C6-C3-C6) ความแตกต่างของสารกลุ่มนี้จะขึ้นอยู่กับหมู่แทนที่และความไม่อิ่มตัวของสารแต่ละชนิด ตัวอย่างสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ดังแสดงในภาพที่ 2.7



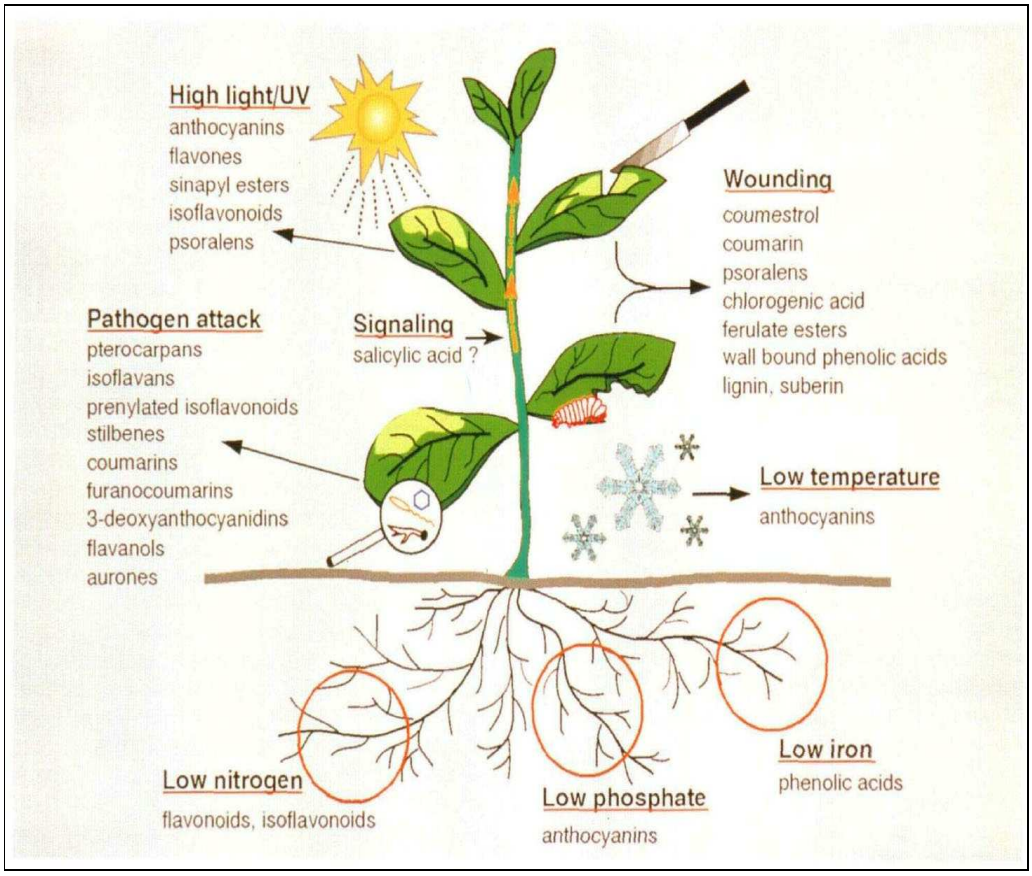
ภาพที่ 2.6 แสดงสารอนุพันธ์ของสารประกอบฟีนอล



ภาพที่ 2.7 สารอนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์

2.4 สารชักนำ

สารชักนำคือโมเลกุลที่สามารถกระตุ้นกระบวนการสร้างสารทุติยภูมิ เช่น ฟีนิลโพรพานอยด์ ที่พบว่า สิ่งที่มีผลต่อสารไอโซฟลาโวนอยด์คือ ความเข้มแสง หรือ รังษียูวี การเข้าทำลายของโรคพืช การเกิดบาดแผล และปริมาณธาตุอาหารในดิน (ภาพที่ 2.8) เป็นต้น สารชักนำอาจมาภายในหรือภายนอกเซลล์ของพืชก็ได้ การจำแนกจึงขึ้นอยู่กับที่มาของสารชักนำ ได้เป็น 2 แบบ ตามลักษณะของการกำเนิด ได้แก่ปัจจัยจากสิ่งมีชีวิต เช่น สารประกอบไกลโคโปรตีน สารอินทรีย์ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ และ สารโพลีแซคคาไรด์ ที่ได้จากพืช เช่น เปกติน หรือ เซลลูโลส และที่ได้จากจุลินทรีย์ เช่น ไคติน ไคโตซาน หรือ กลูแคน จากสิ่งไม่มีชีวิต เช่น รังสียูวี เกลือ โลหะหนัก หรือสารเคมีที่ไปรบกวนการทำงานของเนื้อเยื่อต่าง ๆ (Heike and Dietrich, 1995)

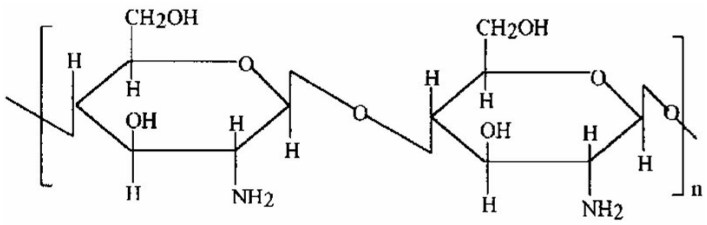


ภาพที่ 2.8 ตัวอย่างของสิ่งชักนำที่มีผลต่อการผลิตสารในวิถีการสังเคราะห์ฟีนิลโพรพานอยด์ (Dixon and Paiva, 1995)

2.4.1 ไคโตซาน (ภาพที่ 2.9)

เป็นอนุพันธ์ของไคติน หมู่แอซีติล (-CO-CH_3) ของไคทินถูกกำจัดออกเหลือเป็นหมู่อะมิโน (-NH_2) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่สอง (Simontachi, 1999) ด้วยปฏิกิริยาเคมีความร้อนกับสารละลายด่างเข้มข้น (ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์ และสุวลี จันทร์กระจ่าง, 2542) หรือด้วยปฏิกิริยาของเอนไซม์ในกลุ่ม chitindeacetylase (Hall, 1996) ถ้าหมู่แอซีติลถูกตัด หรือหลุดออกไปประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ไคทินจะถูกเรียกว่าไคโตซาน และถ้าหมู่แอซีติลถูกตัดหรือหลุดไปประมาณ 90-100 เปอร์เซ็นต์ จะเรียกว่า fully deacetylated chitosan (เยาวภา ไหวพริบ, 2534) ไคโตซานสามารถกระตุ้นการสังเคราะห์เอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase (PAL) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในวิถีการสังเคราะห์สารประกอบฟลาโวนอยด์ในพืช (Young and Kauss, 1983) การใช้เป็นสารชักนำโดยฉีดพ่นสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตรที่ใบของถั่วเหลืองเพิ่มไอโซฟลาโวนส์

ในเมล็ดถั่วเหลืองได้ถึง 16-96 เปอร์เซ็นต์ (Al-Tawaha *et al*., 2005) และเพิ่มยังดาอิดซีอินได้ถึง 150 เปอร์เซ็นต์ ไคโตซานมีคุณสมบัติเป็น linear polyelectrolyte มีความหนาแน่นทางประจุสูงจึงยึดจับกับประจุลบและโลหะได้ดี (อัษฎาวุธ แสงนภาเพ็ญ, 2542) จึงอาจช่วยเสริมการออกฤทธิ์ของสารอื่นเมื่อใช้เป็นสารชักนำในพืชได้ ไคโตซานละลายในกรดอินทรีย์อ่อน เช่น กรดแอซีติก ซิตริก เป็นต้น ไม่ละลายน้ำที่ pH เป็นกลาง ไม่สามารถละลายได้ที่ pH สูงกว่า 6.5 ไม่ละลายในสารอินทรีย์หลายชนิดแต่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ ไคโตซานมีองค์ประกอบของไนโตรเจนอยู่จึงมีบทบาทสำคัญในด้านปุ๋ยชีวภาพ และสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช (สุวลี จันทร์กระจ่าง, 2544)

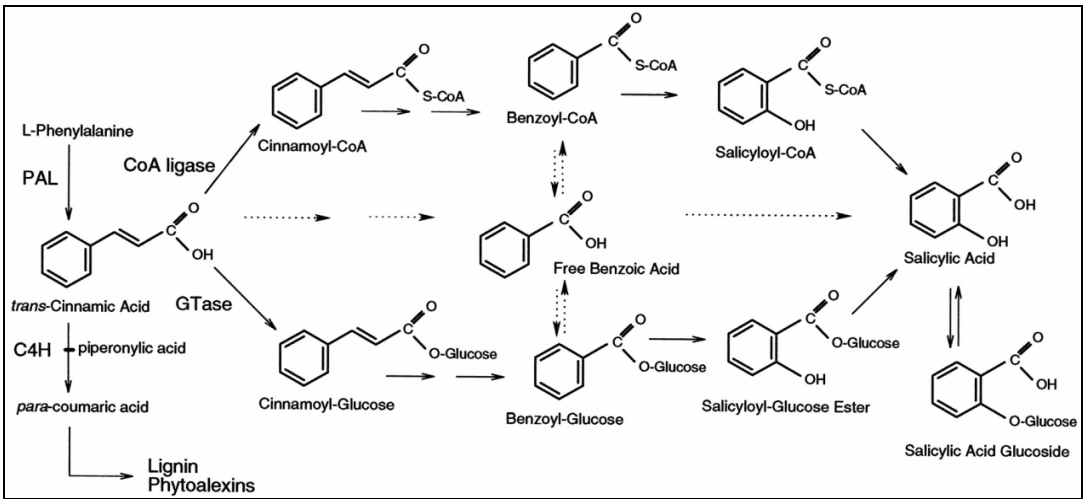


ภาพที่ 2.9 โครงสร้างของไคโตซาน จาก Muzzarelli (1973)

2.4.2 กรดซาลิไซลิก

มีสูตรโครงสร้าง และวิถีของการสังเคราะห์ แสดงในภาพที่ 2.10 กรดซาลิไซลิกสังเคราะห์มาจากกรดอมิโนฟีนิลอลานิน โดยฟีนิลอลานีนจะเปลี่ยนเป็น trancinamic acid จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็น benzoic acid และเป็น กรดซาลิไซลิกในที่สุด (Davies, 1995) กรดซาลิไซลิคเป็นผงสีขาว ไวต่อแสง มีกลิ่นฉุน (Joint FAO/WHO Expert Committe on Food Additive, 1992) ละลายน้ำได้เล็กน้อย ละลายได้ดีในแอลกอฮอล์เข้มข้นประมาณ 15.2 กรัม/100 มิลลิลิตร เมื่อถูกความร้อนสามารถระเหิดได้ กรดซาลิไซลิกเป็นสารประกอบฟีนอลอย่างง่ายที่มีผลต่อกระบวนการเจริญเติบโตของพืช เช่น การเปิด-ปิดของปากใบ การงอกของเมล็ด การดูดซับประจุ การแสดงออกของเพศและการต้านทานการเข้าทำลายของโรค นอกจากนี้ยังยับยั้งการสังเคราะห์และการทำงานของเอธิลีน ทำให้ถูกนำมาใช้เพื่อชะลอการสุกของผลไม้ (ศิริชัย กัลยาณรัตน์, 2548) การฉีดพ่นกรดนี้ในถั่วเขียวสามารถเพิ่มจำนวนฝักและผลผลิตของถั่วเขียวได้ (Singh and Kaur, 1980) มีผลต่อการเพิ่มอัตราการสังเคราะห์แสงและปริมาณของคลอโรฟิลล์ในถั่วเหลือง (Zhao *et al*., 1995) มีผลควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อโรคที่เข้าทำลายพืชให้จำกัดอยู่ในบริเวณเล็ก ๆ รอบ ๆ บริเวณที่เชื้อเริ่มเข้าไปในพืช เรียกว่า hypersensitive reaction (HR) ซึ่ง HR เป็นผลมาจาก systemic acquired resistance (SAR) ซึ่งเกิดขึ้นจากการชักนำของกรดซาลิไซลิค ระบบดังกล่าวเกี่ยวข้องกับการกระตุ้น

ให้พืชสร้างเอนไซม์ phenylalanine ammonia lyas ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์สารไอโซฟลาโวนอยด์ (Raskin, 1992) ดังนั้นการที่พืชสร้างเอนไซม์ชนิดนี้มากขึ้นอาจส่งผลทางอ้อมต่อการสังเคราะห์สารไอโซฟลาโวนอยด์เพื่อใช้ในระบบป้องกันตัวแบบ SAR ของพืชได้



ภาพที่ 2.10 สูตรโครงสร้างของกรดซาลิไซลิคและวิถีการสังเคราะห์ (Joint FAO/WHO Expert Committe on Food Additive, 1992)

2.4.3 คอปเปอร์คลอไรด์

คอปเปอร์คลอไรด์มีธาตุทองแดงที่เป็นจุลธาตุอาหารของพืช ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์เร่งปฏิกิริยารีดอกซ์ และกระบวนการถ่ายโอนอีเล็กตรอนในพืช มีผลต่อกระบวนการสร้างโปรตีน สร้างคลอฟิลล์ เพิ่มความสมบูรณ์ของการพัฒนาเมล็ดและผลอ่อน และช่วยในการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์มาใช้สังเคราะห์แสง (ยงยุทธ โอสถสภา, 2543) การฉีดพ่นสารละลายที่มีส่วนผสมของทองแดงให้กับกวาวเครือขาว ทำให้ปริมาณสารสำคัญแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสารละลายของทองแดงความเข้มข้น 300 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้ดาอิดซีอินมีค่าเฉลี่ยสูงที่สุด 44.69 มิลลิกรัม/ลิตร และทำให้จีนิสทีอินมีค่าเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 28.45 มิลลิกรัม/ลิตร (ประสารฉลาดคิด, 2547)

2.5 โรคเบาหวาน (diabetes mellitus, DM)

คือภาวะที่ร่างการมีระดับกลูโคสในเลือดหลังอดอาหาร 12-14 ชั่วโมงแล้วยังสูงกว่า 140 มิลลิกรัม/เดซิลิตร เนื่องจากการหลั่งฮอร์โมนอินซูลินจากเซลล์บีตา (beta cell) ในไอเลตส์ออฟแลง-

เกอร์แฮนส์ของตับอ่อนลดลง หรือขาดฮอร์โมนอินซูลินจากการที่เซลล์บีตาถูกทำลาย หรือการตอบสนองของเนื้อเยื่อเป้าหมายต่อการทำงานของฮอร์โมนอินซูลินลดลง ทำให้การเผาผลาญคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีนผิดปกติ องค์การอนามัยโลกแบ่งโรคเบาหวานตามสาเหตุเป็น 4 ชนิด แต่ที่เป็นปัญหาและมีผู้สนใจศึกษามากมี 2 ชนิด คือ เบาหวานชนิดที่ 1 หรือเบาหวานชนิดพึ่งฮอร์โมนอินซูลิน (type 1 diabetes mellitus หรือ insulin dependent diabetes mellitus, IDDM) เกิดจากตับอ่อนผลิตฮอร์โมนอินซูลินไม่ได้หรือผลิตได้ไม่เพียงพอ เนื่องจากเซลล์บีตาถูกทำลายจากระบบภูมิคุ้มกันที่ทำงานผิดปกติมักพบในเด็ก อาการของโรคที่มักพบได้แก่ ปัสสาวะบ่อย กระหายน้ำบ่อย น้ำหนักลด และอ่อนเพลีย โรคเบาหวานชนิดที่ 2 หรือเบาหวานชนิดไม่พึ่งฮอร์โมนอินซูลิน (type 2 diabetes mellitus หรือ non insulin dependent diabetes mellitus, NIDDM) โดยเซลล์บีตาในตับอ่อนสามารถผลิตฮอร์โมนอินซูลินได้ แต่ฮอร์โมนไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ เซลล์ไม่ตอบสนองต่อฮอร์โมน เกิดภาวะดื้อต่อฮอร์โมนอินซูลิน (insulin resistance) เป็นโรคเบา หวานชนิดที่พบได้มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 90 ของเบาหวานที่พบทั่วโลก อาการในระยะแรก ๆ ไม่เด่นชัด ผู้ป่วยทราบว่าตนเป็นโรคก็ต่อเมื่อมีอาการของภาวะแทรกซ้อนเกิดขึ้น (นัฐธัญ แสนบัวผัน, 2545; WHO, 1998)

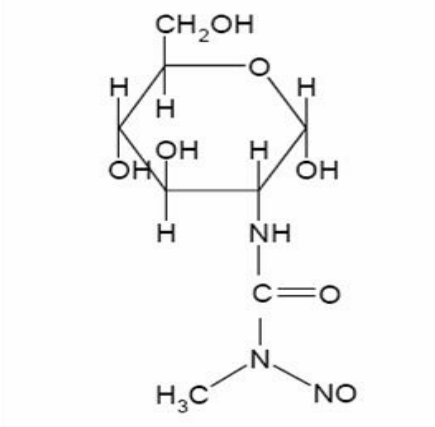
การรักษาโรคเบาหวานของแพทย์แผนปัจจุบันยังคงใช้ฮอร์โมนอินซูลินและยาสังเคราะห์ในรูปของยาเม็ดเป็นยาหลักในการรักษา เช่น ยา glibenclamides, biguanides, sulfonylureas และ thiazoledinediones เป็นต้น แต่ยาเหล่านี้มักมีผลข้างเคียง และไม่สามารถป้องกันโรคแทรกซ้อนได้ (Rang and Dale, 1991) การใช้พืชสมุนไพรในการรักษาโรคนี้จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจและมีรายงานถึงความสามารถในการใช้ลดระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์ทดลองอยู่อย่างต่อเนื่อง

2.5.1 การทำให้สัตว์ทดลองเป็นเบาหวานด้วยสเตรปโตโซโทซิน (streptozotocin)

สเตรปโตโซโทซินเป็นยาปฏิชีวนะที่สังเคราะห์ได้จาก *Streptomyces achromogenes* และสามารถสังเคราะห์ได้ในห้องปฏิบัติการ (Rerup, 1970) และมีสูตรโครงสร้างดังภาพที่ 2.11 มีลักษณะเป็นผงสีเหลืองอ่อน มีความเสถียรที่อุณหภูมิต่ำ สามารถละลายน้ำได้ ค่า pH ประมาณ 4-4.5 (Elias *et al.*, 1994) ใช้ชักนำเบาหวานโดยฉีดเข้าหลอดเลือดดำ (intravenous, i.v.) ของหนูวัยเจริญพันธุ์เพื่อชักนำเบาหวานชนิดพึ่งฮอร์โมนอินซูลินต้องใช้ในขนาดระหว่าง 40-60 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว (Ganda *et al.*, 1976) การฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal, i.p.) ต้องใช้ขนาดเท่ากันหรือสูงกว่า แต่ถ้าใช้ต่ำกว่า 40 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว และใช้ชักนำเพียงครั้งเดียงอาจจะไม่ได้ผล (Katsumata *et al.*, 1992) โดยยาจะกระจายไปยังตับอ่อน ลำไส้ ไปที่ตับ และไตมากที่สุด แต่ไม่เข้าสู่สมอง (Karunanayake *et al.*, 1974) สเตรปโตโซโทซินเป็นสารกลุ่ม methylnitrosourea จึงออกฤทธิ์โดยจับที่ glucosetransporter (GLUT2) และผ่านเข้าไปในเซลล์บีตาในตับอ่อน (Schnedl *et al.*,

1994) ทำให้เกิดการเติมหมู่ alkyl ที่สายดีเอนเอ จึงทำให้สายดีเอนเอเสียหาย (Elsner *et al.*, 2000) นอกจากนี้ยังทำให้เกิด nitric oxide (NO) ซึ่งก็มีผลทำลายเซลล์บีตา (Szkudelski, 2001) ทำให้เซลล์บีตาตาย และมีการทำงานที่ผิดปกติ จึงมีการสังเคราะห์ proinsulin ลดลง จึงหลั่งอินซูลินได้ลดลง เกิดเป็นโรคเบาหวาน (Nakatsuka *et al.*, 1990)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเบาหวานโดยสเตรปโตโซโทซินได้แก่ 1) อาหารถ้าหนูกินอาหารที่มีปริมาณโปรตีนสูง และคาร์โบไฮเดรตต่ำ (โปรตีน 63 เปอร์เซ็นต์, คาร์โบไฮเดรต 6 เปอร์เซ็นต์) ก่อนการฉีดสเตรปโตโซโทซินโอกาสเกิดโรคเบาหวานจะลดลง (Schmidt *et al.*, 1980) 2) ขนาดของสเตรปโตโซโทซินและชนิดของสัตว์ทดลอง ความรุนแรงของการเกิดโรคเบาหวานจะขึ้นอยู่กับขนาดของสารที่มากขึ้น ขนาดที่นิยมใช้จะอยู่ระหว่าง 25-200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ทดลอง ขนาดที่เหมาะสมต่อหนูแรทคือ 50-65 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (Karunanayake *et al.*, 1974) 4) อายุ เมื่อให้สเตรปโตโซโทซินในสัตว์ทดลองที่อายุน้อยโอกาสเกิดโรคเบาหวานก็จะน้อยลง Wong and Wu (1994) รายงานว่าการให้สเตรปโตโซโทซินขนาด 60 มิลลิกรัม/กิโลกรัม แบบ i.v. ในหนูอายุ 8 สัปดาห์ จะเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเบาหวานดีกว่าการให้ในหนูอายุ 4 และ 6 สัปดาห์



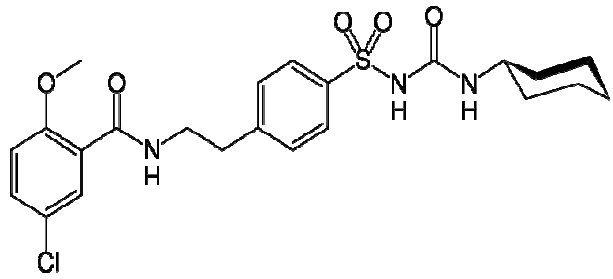
ภาพที่ 2.11 สูตรโครงสร้างของสเตรปโตโซโทซิน (Elias *et al.*, 1994)

2.5.2 ยารักษาโรคเบาหวานชนิดกลัยเบนคลาไมด์

กลัยเบนคลาไมด์เป็นยา กลุ่ม second generation sulfonylurea เป็นยาเม็ดลดน้ำตาลในเลือดชนิดหลักที่ใช้มาเกือบ 40 ปีแล้ว และยังคงใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน เพราะเทียบตามน้ำหนักยาแล้วจะมีความแรงกว่า first generaton sulfonylurea ถึง 50-100 เท่า และมีสูตรโครงสร้างคือ 1-{4-[2-(5-chloro-2-methoxybenzamido) ethyl] benzensulfonyl}-3-cyclohexylurea (Davis and

Gramer, 1996) (ภาพที่ 2.12) กลัยเบนคลาไมด์เป็นกรดอ่อน ดูดซึมในระบบทางเดินอาหารได้ประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์ (Ferner and Neil, 1988) กลัยเบนคลาไมด์กระตุ้นเซลล์บีตาให้หลั่งอินซูลิน แต่ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างอินซูลินได้ ยาออกฤทธิ์โดยจับกับรีเซพเตอร์ที่ผนังเซลล์เรียกว่า sulfonylurea receptor (SUR) และทำให้เกิดการปิดกั้น ATP sensitive potassium channels ที่ผนังของเซลล์บีตาจึงเกิด membrane depolarization ขึ้นและทำให้ calcium channels ที่ผนังเซลล์เปิดทางให้แคลเซียมเคลื่อนย้ายจากภายนอกเข้าสู่เซลล์ได้ การเพิ่มขึ้นของแคลเซียมภายในเซลล์ทำให้มีการเคลื่อนย้าย insulin granule มาที่ผนังเซลล์และหลั่งอินซูลินออกมา (Schmid-Antomarchi *et al.*, 1987; Luzi and Pozza, 1997) ปัจจุบันพบว่า SUR เป็นส่วนหนึ่งของ ATP sensitive potassium channels ซึ่งอยู่บนผนังเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่ามีอยู่ที่ผนังเซลล์ของกล้ามเนื้อหัวใจและหลอดเลือด ซึ่งทำให้ยามีผลต่อการเต้นและการบีบตัวของหัวใจได้ (Ashcroft and Gribble, 1999)

กลัยเบนคลาไมด์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ในระยะที่ยังไม่เกิดภาวะ ketoacidosis และสามารถลดระดับของ glucagon ในเลือดได้จึงมีผลช่วยลดการเกิดภาวะ ketoacidosis (อรพรรณ มาตังคสมบัติ, 2544) ฤทธิ์ที่ไม่พึงประสงค์ของยาพบในเดือนแรกที่ใช้ยา เช่น เกิดผื่นคัน คลื่นไส้ อาเจียน เบื่ออาหาร ตัวเหลือง เป็นต้น (Harrigan *et al*., 2001)



ภาพที่ 2.8 สูตรโครงสร้างของกลัยเบนคลาไมด์ (Davis and Gramer, 1996)

ความเป็นประโยชน์ของกวาวเครือขาวเกิดจากการมีสารสำคัญสะสมอยู่ในส่วนหัวที่เป็นส่วนสะสมอาหาร ในธรรมชาตินั้นสารที่สะสมอยู่มีความแปรปรวนไปตามสภาพแวดล้อมและการควบคุมโดยพันธุกรรม และการปลูกเพื่อใช้ประโยชน์นั้นยังเป็นที่ถกเถียงในวงวิชาการ และยังไม่ค่อยได้รับความเชื่อถือในด้านคุณภาพของผลผลิตเท่าที่ควร ดังนั้นการปลูกให้ได้คุณภาพดี ควรได้สารสำคัญไม่น้อยกว่าที่เก็บจากป่า และต้องมีความสม่ำเสมอของสารสำคัญ หรือสามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารสำคัญได้ การใช้สารชักนำชนิดต่าง ๆ ในพืชตะกูลเดียวกัน และถูกพัฒนาไปในเชิงอุตสาหกรรม โดยอาศัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วกระตุ้นให้พืชสร้างสารสำคัญ แต่มี

ข้อจำกัดในด้านต้นทุนสูง การชักนำในแปลงปลูกจึงเป็นแนวทางที่น่าสนใจ จากการทดลองที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี พบว่าธาตุโลหะหนักบางอย่าง เช่น เหล็ก ทองแดง และสังกะสี ทำให้กวาวเครือขาวสร้างสารสำคัญมากขึ้น ดังนั้นการใช้สารชนิดอื่น ๆ เช่น ไคโตซาน กรดซาลิไซลิก และคอปเปอร์คลอไรด์ ทั้งที่เป็นชนิดเดี่ยว ๆ หรือใช้ร่วมกันน่าจะให้ผลที่ดีขึ้น และอาจเป็นแนวทางให้เกิดการผลิตเป็นสารชักนำสำเร็จรูปขึ้นมาให้ผู้ปลูกกวาวเครือหรือสมุนไพรที่มีสารสำคัญคล้าย ๆ กัน ได้

2.6 รายการอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. (2548). **กวาวเครือขาว-พืชมหัศจรรย์.** โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ

จรัญ ดิษฐไชยวงศ์ ศุจิรัตน์ สงวนรังสิกุล ยุทธนา สมิตสิริ สุรพจน์วงศ์ใหญ่ สิริพันธุ์ ศรีจักรวาล และสุธน สุวรรณบุตร. (2548). การคัดเลือกสายพันธุ์กวาวเครือขาวโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมาย. **ว. วิทย.กษ.** 36(5-6)(พิเศษ): 919-922.

ชวลิต นิยมธรรม. (2538). **กวาวเครือ**. อนุกรมวิธาน ก. ราชบัณฑิตยสถาน. กรุงเทพฯ: เพื่อนพิมพ์

นวลศรี รักอริยะธรรม และอัญชนา เจนวิถีสุข. (2545). **แอนติออกซิแดนท์: สารต้านมะเร็งในผัก-สมุนไพรไทย.** เชียงใหม่: นพบุรี. 56 หน้า

นันทวัน บุญยประภัสสรและอรนุช โชคชัยเจริญพร. (2539). สนุนไพรพื้นบ้าน. ประชาชน. 40 หน้า

บรรจบ ชุณหสวัสดิกุล. (2543). **คิดก่อนกิน.** กรุงเทพฯ: รวมทรรศน์. 65 หน้า

ประสาร ฉลาดคิด. (2546). อิทธิพลของสภาพแวดล้อมและปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโต การออกดอก การติดฝักและเมล็ด และการสะสมสาร daidzein และ genistein ในหัวกวาวเครือขาว [*Pueraria candollei* Grah. var. *mirifica* (Airy Shaw et Suvatabandhu) Niyomdham]. **วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.**

ปราณี เชาวลิตธำรง ทรงพล ชีวพัฒน์ สดุดี รัตนจรัสโรจน์ และสมเกียรติ ปัญญามัง (2542). สรุปผลการศึกษาพิษกึ่งเรื้อรังของกวาวเครือขาวในหนูขาว. ใน **รายงานวิจัยสถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.** กระทรวงสาธารณสุข.

ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์และสุวลี จันทร์กระจ่าง. (2542). การพัฒนาแผ่นบางไคโตซานเพื่อการกรองแยกชีวสาร. หน้า 28-59 ใน **การสัมมนาทางวิชาการเรื่อง ความร่วมมือของภาครัฐและเอกชนในการพัฒนาการผลิตและการใช้สารไคตินไคโตซานแบบครบวงจร.** 2-3 เมษายน 2542. ระนอง.

ปวีณา ข่วงทิพย์. (2546). ฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของพืชผักพื้นบ้าน. **วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.**

ไมตรี สุทธจิตต์ ปกฤษฎางค์ แก้วสุริยะ ศิริวรรณ สุทธจิตต์ และอุดมภัณฑ์ ขาลสุวรรณ. (2545). แอนติออกซิแดนท์และสารสำคัญในพืชสมุนไพรไทย. **วารสารเภสัชศาสตร์และวิทยาศาสตร์สุขภาพ.** 3: 254-260.

ยงยุทธ โอสถสภา. (2543). **ธาตุอาหารพืช.** กรุงเทพฯ: ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ยุทธนา สมิตะสิริ และสันติ ศักดารัตน์. (2538). รูปแบบของสมุนไพรกวาวเครือขาวที่เหมาะสมสำหรับใช้คุมกำเนิดนกพิราบ. **ว. เทคโนโลยีสุรนารี**. 2(2): 89-96.

ยุพดี ลางคลิจันทร์. (2527). การศึกษาผลของกวาวเครือขาว (*Pueraria mirifica*) ที่มีต่ออวัยวะสืบพันธุ์และการสืบพันธุ์ในหนูเพศผู้. **วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.**

เยาวภา ไหวพริบ. (2534). การผลิตไคตินและไคโตแซนจากเปลือกกุ้ง. **วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.**

วิโรจน์ เชาว์วิเศษ. (2550). ผลของสังกะสีต่อการสะสม puerarin ในรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาว [*Pueraria candollei* grah.var.*mirifica* (Airy shaw et.suvatabandhu) niyomdham] และผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อการคลายตัวของหลอดเลือดหนูขาว (*Rattus norvegicus*). **วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.**

วุฒิ วุฒิธรรมเวช. (2540). **สารานุกรมสมุนไพรไทย.** กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

ศิริชัย กัลยาณรัตน์. (2548). ผลของกรดซาลิไซลิคต่อคุณภาพหลังการเก็บเกี่ยวของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้. **ว. เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว.** 4(2): 2-5.

สมบูรณ์ อนันตลาโภชัย และสุวิทย์ เจศรีชัย. (2528). ผลของกวาวเครือขาวต่อนกกระทาพันธุ์ญี่ปุ่น. ใน **การประชุมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ครั้งที่ 11**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุวลี จันทร์กระจ่าง. (2544). การประยุกต์ใช้สาร. ใน **เรื่องน่ารู้ไคติน-ไคโตซาน.** ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ. กรุงเทพฯ.

อรพรรณ มาตังคสมบัติ. (2544). **ยาที่ใช้ในโรคเบาหวาน.** พิมพ์ครั้งที่1. กรุงเทพมหานคร: แสงเทียน.

อัษฎาวุธ แสงนภาเพ็ญ. (2542). การสกัดไคโตซานจากกากเซลล์จุลินทรีย์ในอุตสาหกรรม (กรดซิตริก). **วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.**

Al-Tawaha, A., Seguin, P., Smith, D.L. and Beaulieu, C. (2005). Biotic elicitors as a mean of increasing isoflavone concentration of soybean seeds. **Annu Appl Biol** 146: 303-310.

Anthony, M.S., Clarkson, T.B., Hughes, C.L., Morgan, T.M. and Burke, G.L. (1996). Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of *peripubertal rhesus* monkeys. **J Nutr.** 126(1): 43-50.

Ashcroft, F.M. and Gribble, F.M. (1999). ATP-sensitivity K^+ channeis and insulin secretion: their role in health and disease. **Diabetologia.** 42: 903-919.

Benlhabib, E., Baker, J.I., Keyler, D.E. and Singh, A.K. (2004). Effects of Purified puerarin on voluntary alcohol intake and alcohol withdrawal symptoms in P rats receiving free access to water and alcohol. **J Med Food.** 7(2): 180-186.

Cervellati, R., Renzulli, C., Guerra, M.C. and Speroni, E. (2002). Evaluation of antioxidant activity of some natural polyphenolic compounds using the Briggs-Rauscher reaction method. **J Agric Food Chem.** 50: 7504-7509.

Chen, W.C., Hayakawa, S., Yamamoto, T., Su, H.C., Liu, I.M. and Cheng, J.T. (2004). Mediation of beta-endorphin by the isoflavone puerarin to lower plasma glucose in streptozotocin-induced diabetic rats. **Plant Med.** 70(2):113-6.

Davies, P.J. (1995). **Plant hormones.** Kluwer Academic publisher dordrecht. Natherland. 833 p.

Davis, S.N. and Gramer, D.K. (1999). Insulin, oral hypoglycemic agents and the pharmacology of the endrocrine pancreas. pp. 1487-1518. In J.G. Hardmon, L. Elsner and M.E. Limbird (eds.) **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**, New York: McGraw-Hill companies.

Dixon, R.A. and Paiva, N.L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**. 7: 1085-1097.

Elias, D., Prigozin, H., Polak, N., Rapoport, M., Lohse, A.W. and Cohen, I.R. (1994). Autoimmune diabetes induced by the beta-cell toxic STZ: immunity to the 60-kDa hest shock protein and to insulin. **Diabetes.** 43: 992-998.

Elsner, M., Guldbakke, B., Tiedge, M., Munday, R. and Lenzen, S. (2000). Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta cell toxicity of streptozotocin. **Diabetologia**. 43: 1528-1533.

Ferner, R.E. and Neil, H.A. (1988). Sulfonylureas and hypoglycemia. **Br Med J.** 246: 949-950.

Frank, A.A., Custer, L. J., Cerna, C.M. and Narala, K.K. (1994). Quantitation of phytoestrogens in legumes by HPLC. **J Agri Food Chem.** 42: 1905-1913.

Ganda, O.P., Rossi, A.A. and Like, A.A. (1976). Studies on streptozotocin diabetes. **Diabetes**. 25: 595-603.

Guldbakke, B., Tiedge, M., Munday, R. and Lenzen, S. (2000). Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. **Diabetologia.** 43: 1528-1533.

Guo, Z., Jin, Q., Fan, G., Duan, Y., Qin, C. and Wen, M. (2001). Microwave assisted extraction of effective constituents from a Chinese herbal medicine *Radix puerariae*. **Anal Chim Acta.** 436: 41-47.

Gutteridge, J.M.C. and Halliwell, B. (1994). Free radicals and antioxidants in aging and disease: fact or fantasy. In **Antioxidants in nutrition, health, and disease**. pp. 111-135. Oxford, UK: Oxford University Press.

Harrigan, R.A., Nathan, M.S. and Beattie, P. (2001). Oral agents for the treatment of type 2 diabetes mellitus: pharmacology, toxicity, and treatment. **Ann Emerg Med.** 38(1): 68-78.

Heike, D. and Dietrich, K. (1995). Strategies for the improvement of secondary metabilyte production in plant cell cultures. **Enzym Microb Tech.** 17: 647-684.

Ingham, J.L., Tahara, S. and Dziedzic, S.Z. (1989). Minor isoflavone from root of *Pueraria mirifica*. **Z Naturforsch**. 44: 742-762.

Joint FAO/WHO Expert Committe on Food Additive. (1992). **Salicylic acid biosynthesis pathway.** [Online]. Available: http:// www.plantphysiol.org/cgi/content/full/125/1/318/F7

Kahn, C.R. (2000). Glucose homeostasis and insulin action. pp. 1303-1306. In C.R. Kahn and L.B. Kenneth (eds.) **Priciples and practice of endocrinology and metabolism**. Lippincott Williams & Wllkins. Philadelphia.

Karunanayake, E.K., Hearse, D.J. and Mellows, G. (1974). The systhesis of [^{14}C] streptozotocin and its distribution and excretion in the rat. **Biochem J.** 142: 673-683.

Katsumata, K., Katsumata, K.Jr. and Katsumata, Y. (1992). Protective effect of diltiazem hydrochloride on the occurrence of alloxan-or streptozotocin-induced diabetes in rats. **Horm Metab Res.** 24: 508-510.

Knight, D.C and Eden, J.A. (1996). A Review of the clinical effect of phytoestrogen. **Obstet Gynecol.** 87(5): 897-904.

Luzi, L. and Pozza, G. (1997). Gilbenclamide: an old drug with a novel mechanism of action. **Acta Diabetol.** 34: 239-244.

Muzzarelli, R.A.A. (Ed.). (1973). **Natural chelating polymers**. New York. Pergamon Press. 83p.

Nukatsuka, M., Yoshimura, Y., Nishida, M. and Kawada J. (1990). Importance of the concentration of ATP in rat pancreatic beta cell in the mechanism of streptozotocin-induced cytotoxicity. **J Endocrinol.** 127: 161-165.

Polle, A. and Rennenberg, H. (1993). Significance of antioxidants in plant adaptation to environmental stress. In: Fowden, L. and Mansfield, T. (eds). **Plant adaptation to environmental stress**. 263-273 pp.

Rang, H.P. and Dale, M.M. (1991). **The endocrine system pharmacology.** 2nd (ed.). UK. Longman Group. 504-508 pp.

Raskin, I. (1992). Role of salicylic acid in plants. **Ann Rev Plant Physiol Mol Biol**. 43: 439-463.

Schnedl, W.J., Ferbes, S., Johnson, J.H. and Newgard, C.B. (1994). STZ transport and cytotoxicity: specific enhancement in GLUT2-expressing cells. **Diabetes.** 43: 1326-1333.

Sharma, Y.K. and Davis, K.R. (1997). The effects of ozone on antioxidant responses in plants. **Free Radical Biol Med.** 23: 480-488.

Schmidt, F.H., Siegel, E.G. and Trapp, V.E. (1980). Metabolic and hormonal investigations in long-term streptozotocin diabetic rats on different dietary regimens. **Diabetologia.** 18: 161-168.

Schmid-Antomarchi, H., De Weille J., Fosset, M. and Lazdunski, M. (1987). The receptor for antidiabetic sulfonylureas controls the activity of the ATP-modulated K^+ channel in insulin-secreting cells. **J Biol Chem.** 262: 15840-15844.

Sigma-aldrich. (2009a). **Genistein**. [Online]. Available: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/productdetail.do?n4=82435|sigma&m5=search_concat_pno|brand_key&f=spec

Sigma-aldrich. (2009b). **Puerarin.** [Online]. Available :http://www.sigmaaldrich.com/catalog/productdetail.do?n4=g6649|sigma&n5=search_concat_pno|brand_key&f=spec

Singh, G. and Kaur, M. (1980). Effect of growth regulators on podding and yield of mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). **Indian J Plant Physiol.** 23: 366-370.

Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in ß-cell of the rat pancreas. **Physiol Res**. 50: 536-546.

William, C.A. and Harborne, J.B. (1989). Isoflavonoides. pp. 421-449. In J. B. Harborne (ed.) **Method in plant biochemistry. Vol. 1. Plant phenolics**. Academic Press. London.

Wong, K.K. and Wu, H.M. (1994). Effect of age and streptozotocin concentration on the induction by streptozotocin of hyperglycemia in fasting rats. **Biochem Mol Biol Int**. 33: 131-136.

Xu, M.E., Xiao, S.Z., Sun, Y.H., Zheng, X.X., Ou-Yang, Y. and Guan, C. (2005). The study of anti-metabolic syndrome effect of puerarin in vitro**. Life Sci.** 77: 3183-3196

Young, D.H. and H. Kauss. (1983). Release of calcium from suspension cultured *Glycine max* cells by chitosan, other polycations and polyamines in relation to effects on membrane permeability. **Plant Physiol.** 73: 698-702.

Zhao, H.J., Lin, X.W, Shi, H.Z. and Chang, S.M. (1995). The regulating effects of phenolic compounds on the physiological characteristics and yield of soybeans. **Acta Agron. Sin.** 21: 351-355.

Zhu, J.H., Wang, X.X. and Chen, J.Z. (2004). Effects of puerarin on number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood. **Acta Pharmacol Sin.** 25: 1045-1051.

บทที่ 3
ชนิดและความเข้มข้นของสารชักนำต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการเจริญเติบโตของกวาวเครือขาว

บทคัดย่อ

ทดลองที่ห้องปฏิบัติการสรีรวิทยาพืช อาคารเครื่องมือ 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เพื่อคัดเลือกความเข้มข้นและจำนวนวันที่เหมาะสมของสารชักนำต่อสารประกอบฟีนอลิค สารประกอบฟลาโวนอยด์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการเจริญเติบโตของกวาวเครือขาว แยกเป็น 3 การทดลองย่อย เพื่อศึกษาถึงผลของการชักนำด้วย ไคโตซาน กรดซาลิไซลิกและสารคอปเปอร์คลอไรด์ ชนิดละ 5 ความเข้มข้น ในต้นกวาวเครือขาวอายุ 4 เดือน ที่ปลูกใน growth chamber วางแผนการทดลองแบบ CRD 5 ทรีตเมนต์ ๆ ละ 12 ซ้ำ ให้สารชักนำ 4 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 7 วัน เก็บข้อมูลหลังหยุดชักนำ 1 วัน 7 วัน 15 วัน และ 30 วัน การทดลองที่ 1 พบว่า การเก็บข้อมูลที่ 15 วัน หลังชักนำด้วยไคโตซานความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ให้ปริมาณสารฟีนอลิคในหัวกวาวเครือขาวเท่ากับ 14.0 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง สารฟลาโวนอยด์เท่ากับ 2.76 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ยับยั้งสารอนุมูลอิสระได้ 54.7 เปอร์เซ็นต์และสามารถรีดิวซ์สารอนุมูลอิสระได้ 5.72 ไมโครโมลของ Fe^{2+}/กรัมน้ำหนักแห้ง การทดลองที่ 2 พบว่า การเก็บข้อมูลในวันที่ 7 หลังชักนำด้วยกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ให้สารฟีนอลิคเท่ากับ 15.5 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ปริมาณฟลาโวนอยด์เท่ากับ 3.01 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ยับยั้งสารอนุมูลอิสระได้ 58.3 เปอร์เซ็นต์ และรีดิวซ์สารอนุมูลอิสระได้ 5.89 ไมโครโมลของ Fe^{2+}/กรัมน้ำหนักแห้ง การทดลองที่ 3 พบว่าการเก็บข้อมูลที่ 15 วัน หลังชักนำคอปเปอร์คลอไรด์ 200 มิลลิกรัม/ลิตร มีสารฟีนอลิคเท่ากับ 15.5 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง สารฟลาโวนอยด์เท่ากับ 2.98 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ยับยั้งสารอนุมูลอิสระได้ 49.9 เปอร์เซ็นต์ รีดิวซ์สารอนุมูลอิสระได้ 6.05 ไมโครโมลของ Fe^{2+}/กรัมน้ำหนักแห้ง ดังนั้น ไคโตซาน ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร กรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร และคอปเปอร์คลอไรด์ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร หลังการชักนำ 15 วัน 7 วัน และ 15 วัน ตามลำดับ ทำให้กวาวเครือขาวมีสารฟีนอลิค ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด โดยไม่มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโต การสร้างพิวรารินและจีนิสทีอินของกวาวเครือขาว

3.1 บทนำ

กวาวเครือขาว *Pueraria candollei* Grah. var. *mirifica* (Airy Shaw et Suvatabandhu) Niyomdham] มีสรรพคุณตามตำรายาหัวกวาวเครือขาวของหลวงอนุสารสุนทร ว่า เป็นยาอายุวัฒนะ และบรรเทาอาการไม่สุขสบายที่เกิดจากภาวะการหมดประจำเดือน ในระยะต่อมาจึงพบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูง (จรรยา แสงอรุณและคณะ, 2545; Cherdshewasart *et al.*, 2008) ในหัวกวาวเครือขาวยังมีสาร กลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ ซึ่งเป็นสารในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิค (Ingham *et al.*, 1989) สารประกอบฟีนอลิคจัดเป็นสารทุติยภูมิซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาของพืช หลายอย่าง เช่น การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นสารต้านจุลชีพ เป็นตัวรับพลังงานแสง ช่วยเพิ่มสีสันสวยงามให้กับพืชเพื่อดึงดูดแมลง ช่วยป้องกันหรือขับไล่แมลงศัตรูพืช (Pietta, 2000) ขณะที่สารฟลาโวนอยด์เป็นสารอนุพันธ์ของสารประกอบฟีนอลิค จึงมีคุณสมบัติต่าง ๆ ใกล้เคียงกัน คุณสมบัติที่สำคัญของสารทั้งสองกลุ่มคือ การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ในการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารดังกล่าว อาศัยวิธีการตรวจสอบ 2 แนวทาง แนวทางที่ 1 คือ การวัดความสามารถในการจับสารอนุมูลอิสระ (scavenging method) ซึ่งใช้วิธี DPPH เป็นวิธีทดสอบ และแนวทางที่ 2 คือ การวัดความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ (reducing method) ซึ่งใช้วิธี FRAP เป็นวิธีทดสอบ โดยหลักการวิธี DPPH ใช้อนุมูลอิสระที่เป็นไนโตรเจน มีสีม่วงเข้ม ที่ละลายได้ดีในเมทานอล และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร วิธีนี้มีข้อจำกัด คือใช้ได้เฉพาะสารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ชอบน้ำเท่านั้น (Arnao, 2000) ส่วนวิธี FRAP จะแสดงผลในรูปของ FRAP values ซึ่งถ้ามีค่าสูงแสดงว่าเป็นตัวรีดิวซ์ที่ดี การทดสอบอาศัยปฏิกิริยารีดักชันของ Fe^{3+}-TPTZ ให้เปลี่ยนเป็น Fe^{2+}-TPTZ ซึ่งเป็นสีฟ้าในสภาวะของสารละลายที่เป็นกรด (pH 3.6) สามารถตรวจการเปลี่ยนแปลงของสีจากการวัดการดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตรซึ่งความสามารถในการรีดิวซ์สารอนุมูลอิสระจะมีความสัมพันธ์กันกับ degree of hydroxylation และ extent of conjugation ของสารประกอบฟีนอลิค (Pulido *et al.*, 2000) ในการตรวจหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิคมีหลักการคล้ายกับวิธี reducing power คือ อาศัยคุณสมบัติในการเป็นตัวรีดิวซ์ของสารในการรีดิวซ์โมลิปดีนัม (VI) ให้เป็น โมลิปดีนัม (V) ผลการทดลองจะแสดงในรูปของค่า equivalent ของกรดแกลลิค เนื่องจากสารสกัดที่นำมาตรวจสอบด้วยวิธีนี้เป็นสารสกัดจากพืชที่มีสารประกอบฟีนอลิคเป็นองค์ประกอบอยู่ จึงนิยมใช้ตรวจสารประกอบฟีนอลิค (total phenolic acid) (Folin and Ciocalteu, 1927; Singleton and Rossi, 1965) การใช้สารชักนำเพื่อเพิ่มการสร้างสารประกอบฟีนอลิค และสารประกอบฟลาโวนอยด์ อาจเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในกวาวเครือขาว เนื่องจาก Ali *et al.* (2006) พบว่าปริมาณฟีนอลิค ฟลาโวนอยด์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีสหสัมพันธ์ในเชิงบวกต่อกัน มีหลายการทดลองที่พบว่าสารบางอย่างชักนำ

ให้ปริมาณของสารฟีนอลิค สารฟลาโวนอยด์ ในพืชหลายชนิดเพิ่มขึ้นได้ เช่น ไคโตซานสามารถเพิ่มสารประกอบฟีนอลิคในถั่วเหลือง (Khan *et al.*, 2003) และเพิ่มปริมาณของฟลาโวนอยด์ในถั่วลูปินได้ (Hubert and Ragai, 1997) กรดซาลิไซลิกเพิ่มสารประกอบฟีนอลิคและฟลาโวนอยด์ในโสมจีนได้ Ali *et al.* (2007) และ คอปเปอร์คลอไรด์เพิ่มปริมาณของฟลาโวนอยด์ในถั่วลูปินได้ (Hubert and Ragai, 1997)

การศึกษาในครั้งนี้ จึงใช้สารไคโตซาน กรดซาลิไซลิกและสารคอปเปอร์คลอไรด์ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน มาใช้ชักนำให้กวาวเครือขาวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลิคและสารฟลาโวนอยด์สูงขึ้น พร้อมกับศึกษาผลของสารชักนำเหล่านี้ต่อการเจริญเติบโตของต้นกวาวเครือขาวควบคู่ไปด้วย เพื่อจะคัดเลือกความเข้มข้นและระยะเวลาหลังการชักนำที่เหมาะสมที่สุดของสารชักนำแต่ละชนิด ไปใช้ประโยชน์ต่อไป

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการสรีรวิทยาพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยแบ่งเป็น 3 การทดลองย่อย ก่อนการชักนำเตรียมต้นกวาวเครือขาวจากการเพาะเมล็ดและปลูกใน growth chamber ที่กำหนดค่าความชื้นสัมพัทธ์เท่ากับ 85 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิกลางวัน/กลางคืน เท่ากับ 27/25 °C ช่วงแสงกลางวัน/กลางคืน 14/10 ชั่วโมง ความเข้มแสงเท่ากับ 270 ลักซ์ เมื่อต้นกวาวเครือขาวอายุ 4 เดือน จึงทำการทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD 5 ทรีตเมนต์ (ความเข้มข้นของสารแต่ละชนิด) ทรีตเมนต์ ละ 12 ซ้ำ (1 ต้น/ซ้ำ) ดังแสดงในตาราง ที่ 3.1

3.2.1 การทดลองที่ 1 ชักนำด้วยไคโตซาน

3.2.1.1 การเตรียมสารชักนำ นำผงไคโตซานขนาด 0.01 0.5 1.0 และ 1.5 กรัม นำใส่ในน้ำสะอาด ปริมาตร 990 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน เติมกรดอะซิติกเข้มข้น (glacial acetic acid) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และคนจนผงไคโตซานละลายหมดจะได้สารละลายไคโตซานเข้มข้น 0, 10, 500 1,000 และ 1,500 มิลลิกรัม/ลิตร ในกรดอะซิติก 1 เปอร์เซ็นต์

3.2.1.2 การชักนำ เมื่อกวาวเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber อายุ 4 เดือน จึงทำการชักนำโดยนำสารละลายแต่ละความเข้มข้นไปราดลงดินบริเวณโคนต้นกวาวเครือขาวแล้วพรวนดินกลบ ทำทั้งหมด 4 ครั้ง แต่ละครั้ง ห่างกัน 7 วัน จากนั้นเก็บข้อมูลจากทุกทรีตเมนต์ หลังจากทำการชักนำครั้งที่ 4 แล้ว 1 วัน 7 วัน 15 วัน และ 30 วัน เพื่อวิเคราะห์ผลที่เกิดขึ้นต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิค ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ พื้นที่ใบ อัตราการสังเคราะห์แสง อัตราส่วนของน้ำหนักสด/น้ำหนักแห้ง และน้ำหนักสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากแต่ละทรีตเมนต์

ตารางที่ 3.1 การทดลองและระดับความเข้มข้นของสารชักนำในแต่ละการทดลองย่อย

ชนิดของสารชักนำ	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/ลิตร)
การทดลองที่ 3.1 ไคโตซาน	0, 10, 500, 1000 และ 1500 (Al-Tawaha *et al*., 2005)
การทดลองที่ 3.2 กรดซาลิไซลิก	0, 10, 100, 150 และ 200 (Kneer *et al*., 1999)
การทดลองที่ 3.3 คอบเปอร์คลอไรด์	0, 10 , 100, 200, และ 300 (ประสาร ฉลาดคิด, 2546)

3.2.1.3 การสกัดสารจากหัวกวาวเครือขาว ใช้วิธีของวิโรจน์ เชาว์วิเศษ (2551) โดยอบหัวกวาวเครือขาวแต่ละตัวอย่างที่หั่นเป็นชิ้นบาง ๆ ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด (ultra centrifuge mill) จะได้ผงกวาวเครือขาวที่มีขนาดของอนุภาค 100 mesh ชั่งผงกวาวเครือขาวหนัก 10 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมเอทานอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วจึงเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง (whatman เบอร์ 42) แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4000 รอบ/นาที (Yu *et al.*, 2000) เป็นเวลา 12 นาที แล้วแยกสารละลายส่วนที่ใสไประเหยตัวทำละลายออกด้วย rotary evaporator ภายใต้การลดอุณหภูมิและความดันบรรยากาศ จนได้สารสกัดซึ่งมีความหนืด สีน้ำตาล ติดอยู่ใน flask ชั่งน้ำหนักของสารสกัดกวาวเครือขาวที่สกัดได้และเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ -20°C เพื่อรอการวิเคราะห์ในกรณีต่าง ๆ ต่อไป

3.2.1.4 วัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ใช้วิธีการทดลองของ Brand-Williams *et al.* (1995) นำสารที่สกัดได้จากแต่ละทรีตเมนต์ 1.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH (ที่ละลายในเมทานอล) ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มไว้ในที่มืดอุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง 517 นาโนเมตรและคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสารอนุมูลอิสระจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสารอนุมูลอิสระ} = \{ [Abs_{control} - Abs_{sample}] / Abs_{control} \} \times 100$$

Abs_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด 1.5 มิลลิลิตรผสมกับสารละลาย DPPH 1.5 มิลลิลิตร

$Abs_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรผสม กับเมทานอล 1.5 มิลลิลิตร

3.2.1.5 การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ตามวิธีของ Benzie and Strain (1999) สร้างกราฟมาตรฐานของ ferrous sulfate ($FeSO_4.7H_2O$) โดยผสมสารละลาย $FeSO_4$ ความเข้มข้น 0.101-1.011 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร กับสารละลาย FRAP reagent ปริมาตร 950 ไมโครลิตร และผสม FRAP reagent กับเมทานอล (สารละลายควบคุม) ที่บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย acetate buffer pH 3.6 เป็น blank สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ $FeSO_4$ กับค่าผลต่างของค่าดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร (ค่าการดูดกลืนแสงของสาร $FeSO_4$–ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายควบคุม) แล้วคำนวณหาสมการเส้นตรง (ภาพผนวกที่ 1) เพื่อใช้คำนวณค่า FRAP value ของแต่ละตัวอย่าง กรณีหาค่า FRAP value ของตัวอย่าง ให้ผสมสารสกัดของแต่ละตัวอย่าง ความเข้มข้น 100 มิลลิลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร กับ FRAP reagent ปริมาตร 950 ไมโครลิตร วัดค่าดูดกลืนแสง แล้วคำนวณ ค่าผลต่างของค่าดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร ของแต่ละตัวอย่าง แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณค่า FRAP value

3.2.1.6 การตรวจหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิค ตามวิธีการของ Singleton *et al.* (1999) โดยผสมสารสกัดแต่ละตัวอย่าง ความเข้มข้น 0.0263 กรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กับสารละลาย folin-ciocalteu's phenol reagent ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ใน volumetric flash ทิ้งไว้ 10 นาที เติมสารละลาย 7.5 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (w/v) ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50ºC เป็นเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร โดยใช้เมทานอล 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารต่าง ๆ แทนการใช้สารละลายตัวอย่างเพื่อใช้เป็น blank นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณหาปริมาณสารฟีนอลิคโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลิค (gallic acid) สร้างกราฟมาตรฐานของกรดแกลิค ความเข้มข้น 1-100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยผสมกรดแกลิคแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กับสารละลายต่าง ๆ เช่นเดียวกับกรณีของสารสกัดแต่ละตัวอย่าง วัดค่าการดูดกลืนแสงแล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของกรดแกลิค (ภาพผนวกที่ 2) รายงานปริมาณฟีนอลิคของแต่ละทรีตเมนต์ เป็นค่า gallic acid equivalent

3.2.1.7 ตรวจหาฟลาโวนอยด์ ด้วย aluminium chloride complex colorimatric method ตามวิธีของ Chang *et al.* (2002) โดยผสมสารสกัดความเข้มข้น 0.0263 กรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กับ เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมอลูมิเนียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และโพแทสเซียมอะซีเตท ความเข้มข้น 1 โมล ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงวัดการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของเคอร์ซีติน (quercetin) การสร้างกราฟมาตรฐานของเคอร์ซีติน

ความเข้มข้น 1-16 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใช้ขั้นตอนและผสมกับสารละลายต่าง ๆ เหมือนกรณีของสารสกัดตัวอย่าง วัดค่าการดูดกลืนแสงแล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารเคอร์ซีติน (ภาพผนวกที่ 3) และรายงานปริมาณฟลาโวนอยด์ของแต่ละทรีตเมนต์เป็นค่า quercetin equivalent

3.2.1.8 การวัดตัวแปรที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต ตัวแปรที่วัดได้แก่ พื้นที่ใบของกวาวเครือขาวด้วยเครื่อง delta-T image analysis system วัดอัตราการสังเคราะห์แสงด้วยเครื่อง Portable Photosynthesis รุ่น LCA-4 (portable photosynthesis and transpiration measurement system) คำนวนอัตราส่วนของน้ำหนักสด/น้ำหนักแห้งของแต่ละตัวอย่างและชั่งน้ำหนักของสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง

3.2.1.9 การวิเคราะห์ข้อมูล วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (ANOVA) ของทุกตัวแปร (ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารฟีนอลิค ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ อัตราส่วนน้ำหนักสด/แห้ง น้ำหนักของสารที่สกัดได้และอัตราการสังเคราะห์แสง) ของแต่ความเข้มข้น ในแต่ละการทดลอง ด้วยวิธี F-test และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละความเข้มข้นด้วยวิธี Duncan's Multiple Rang Test (DMRT) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS version 14 (Statistical Package for Social Science) (Levesque and SPSS Inc., 2006) โดยวิเคราะห์แยกตามวันที่เก็บข้อมูลหลังการชักนำและแสดงผลในรูปของกราฟแท่งที่กำกับด้วยตัวอักษรแสดงความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ย โดยค่าข้อมูลที่ปรากฏในวันเดียวกัน ที่ถูกกำกับด้วยตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.2.2 การทดลองที่ 2 ชักนำด้วยกรดซาลิไซลิก

3.2.2.1 การเตรียมสารชักนำ เตรียมสารละลายกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 0 10 100 150 และ 200 มิลลิกรัม/ลิตร โดยชั่งกรดซาลิไซลิก 0.01 1.1 1.5 และ 2.0 กรัม แล้วละลายด้วยสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.5 โมลาห์ ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

3.2.2.2 การชักนำ เมื่อกวาวเครือขาวใน growth chamber มีอายุ 4 เดือน นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นไปฉีดพ่นให้ทั่วทั้งต้นจนสารละลายหยดลงจากใบ ทำการชักนำ 4 ครั้ง แต่ละครั้ง ห่างกัน 7 วัน เก็บข้อมูลเพื่อวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิค ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ วัดพื้นที่ใบ อัตราการสังเคราะห์แสง คำนวนอัตราส่วนของน้ำหนักสด/น้ำหนักแห้ง และชั่งน้ำหนักของสารสกัดหยาบของแต่ละทรีตเมนต์ และวิเคราะห์ข้อมูล เหมือนการทดลองที่ 1

3.2.3 การทดลองที่ 3 ชักนำด้วยคอปเปอร์คลอไรด์

เตรียมสารละลายความเข้มข้น 0 10 100 200 และ 300 มิลลิกรัม/ลิตร โดยเตรียม stock solution ของทองแดงความเข้มข้น 10,000 มิลลิกรัม/ลิตร จาก คอปเปอร์คลอไรด์ โดยชั่งสาร 2.68 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เตรียมสารละลายทองแดงความเข้มข้น 10 100 200 และ 300 มิลลิกรัม/ลิตร จากคอปเปอร์คลอไรด์โดยใช้ stock solution ของคอปเปอร์คลอไรด์ ปริมาตร 1 10 20 และ 30 มิลลิลิตรตามลำดับ ละลายในน้ำแล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร การชักนำทำเหมือนการทดลองที่ 2

3.2.4 ตรวจหาการมีอยู่ของพิวรารินและจีนิสทีอิน

ตรวจหาการมีอยู่ของสารทั้งสองในทุกทรีตเมนต์ด้วย thin layer chromatography (TLC) ใช้วิธีการทดสอบของ Dan *et al.* (2004) โดยการจุด (spot) สารมาตรฐานของสารพิวรารินและสารจีนิสทีอินที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร และจุดสารสกัดหยาบของแต่ละทรีตเมนต์อย่างละ 2 ไมโครลิตรลงบน TLC silicagel 60 F_{254} (MERK) ขนาด 10 x 10 เซนติเมตร แล้ว develop ด้วยตัวทำละลายเคลื่อนได้แก่ *n*-butanol : acetic acid : น้ำ (5 : 3 : 1 โดยปริมาตร) แล้วตรวจหาสารพิวรารินภายไต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และสารจีนิสทีอินภายไต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่า retention mobility (R_f) ของสารสกัดหยาบของแต่ละทรีตเมนต์กับสารละลายมาตรฐาน ยืนยันผลการตรวจหาโดยนำแผ่น TLC แผ่นเดิมมาอบที่อุณหภูมิ 110ºC เป็นเวลา 10 นาที เปรียบเทียบตำแหน่งของสารทั้งสองในแต่ละตัวอย่างกับสารละลายมาตรฐานของสารพิวรารินและสารจีนิสทีอิน

3.3 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

จากผลการทดลองเมื่อพิจารณาผลของความเข้มข้นของสารชักนำแต่ชนิดและจำนวนวันหลังการชักนำครั้งสุดท้ายต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต่อปัจจัยที่คาดว่าจะมีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของกวาวเครือขาว เช่น ปริมาณสารประกอบฟีนอลิค สารฟลาโวนอยด์ ได้ผลดังต่อไปนี้

3.3.1 การทดลองที่ 1 ผลของการชักนำด้วยไคโตซาน

เมื่อการชักนำด้วยไคโตซานทั้ง 5 ความเข้มข้น (0 10 500 1,000 และ 1,500 มิลลิกรัม/ลิตร) แล้วมีผลต่อตัวแปรต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

3.3.1.1 ผลต่อสารปริมาณของประกอบฟีนอลิค พบว่า การเก็บข้อมูลที่ 15 วัน หลังชักนำด้วยความเข้มข้นที่ 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิคในหัวกวาวเครือขาวสูงที่สุด คือ 14.0 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกความความเข้มข้นที่ใช้ทดลองและยังสูงกว่าที่พบในวันที่ 1 วันที่ 7 และวันที่ 30 ที่ใช้ความเข้มข้นเดียวกันถึง 58.7, 32.8 และ 11.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 3.1) แสดงว่าสารไคโตซานสามารถชักนำสารประกอบฟีนอลิคให้เพิ่มขึ้นได้ สอดคล้องกับ Khan *et al.* (2003) ที่พบว่าการฉีดพ่นไคโตซานในถั่วเหลืองสามารถเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ phenylalanine ammonia-lysase (PAL) และ tyrosine ammonia-lysase (TAL) และทำให้ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิคในถั่วเหลืองเพิ่มขึ้นดังนั้นความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร จึงเป็นค่าที่เหมาะสมต่อการชักนำ การใช้ความเข้มข้นที่สูงกว่า เช่น 1,500 มิลลิกรัม/ลิตร จะได้ผลที่ต่ำลง แสดงว่าสารฟีนอลิคตอบสนองเป็นแบบระฆังคว่ำ (bell shape) ต่อความเข้มข้นของสารชักนำที่เพิ่มขึ้น โดยปริมาณสารจะเพิ่มสูงสุดที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม ถ้าความเข้มข้นเพิ่มขึ้นอีกจะทำให้ปริมาณสารลดลง สอดคล้องกับการชักนำสารไอโซฟลาโวนอยด์ในถั่วเหลืองโดย Kneer *et al.* (1999)

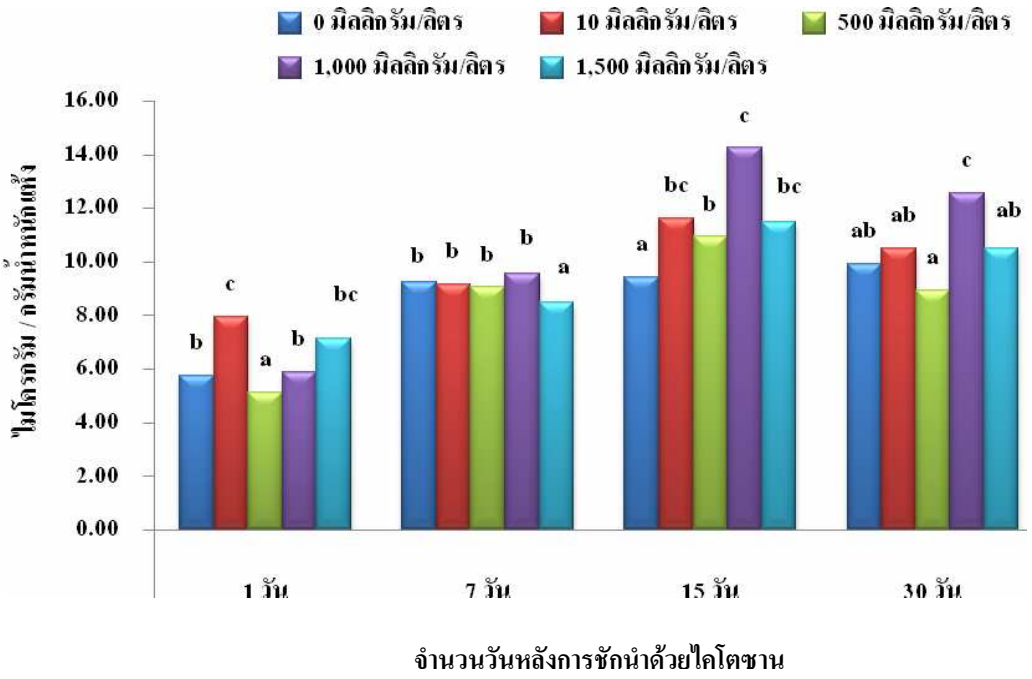
3.3.1.2 ผลต่อสารประกอบฟลาโวนอยด์ พบว่า มีผลคล้ายกับผลต่อสารประกอบฟีนอลิคที่ตรวจสอบในข้างต้น คือ วันที่ 15 หลังชักนำด้วยความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ สูงที่สุดคือ 2.76 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกความเข้มข้นที่ใช้ทดลอง (ภาพที่ 3.2) สอดคล้องกับ Hubert and Ragai (1997) ที่พบว่าไคโตซานเพิ่มปริมาณของฟลาโวนอยด์ในถั่วลูปินได้สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากสารฟลาโวนอยด์เป็นสารในกลุ่มฟีนอลิค (Santos and Mira, 2004) กลไกของการชักนำน่าจะไปเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ PAL (Inui *et al.*, 1997)

3.3.1.3 ผลต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี DPPH พบว่าความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ที่ 15 วัน มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งสารอนุมูลอิสระสูงที่สุดเท่ากับ 54.7 เปอร์เซ็นต์ (สูงกว่ากลุ่มควบคุมในวันเดียวกันถึง 61 เปอร์เซ็นต์) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความเข้มข้นอื่น ๆ (ภาพที่ 3.3) ซึ่งอาจเกิดผลของการมีสารฟีนอลิคและสารฟลาโวนอยด์ ที่เพิ่มขึ้น ดังที่พบในผลการทดลองข้างต้น เนื่องจากสารทั้งสองกลุ่มเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ทำให้กวาวเครือขาวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น สอดคล้องกับ Ding *et al.* (2002) ที่พบว่าปริมาณของสารฟีนอลิค สารฟลาโวนอยด์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีสหสัมพันธ์ในเชิงบวกต่อกัน หรืออาจเกิดจากค่า pH ของสารละลายไคโตซานที่เป็นกรด เมื่อใช้ชักนำหลายครั้งโดยการคลุกกับดิน อาจมีผลเปลี่ยนแปลงค่า pH ของดินให้เป็นกรดด้วย จนเกิดความเปลี่ยนแปลงของความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหารพืชในดินได้ เนื่องจากขณะทำการทดลองไม่ได้วัด pH ของดิน ข้อมูลดังกล่าวจึงเป็นเพียงข้อสัณนิฐานของผู้วิจัยเท่านั้น ยงยุทธ โอสถสภา (2543) กล่าวถึงความเป็นประโยชน์ของธาตุ

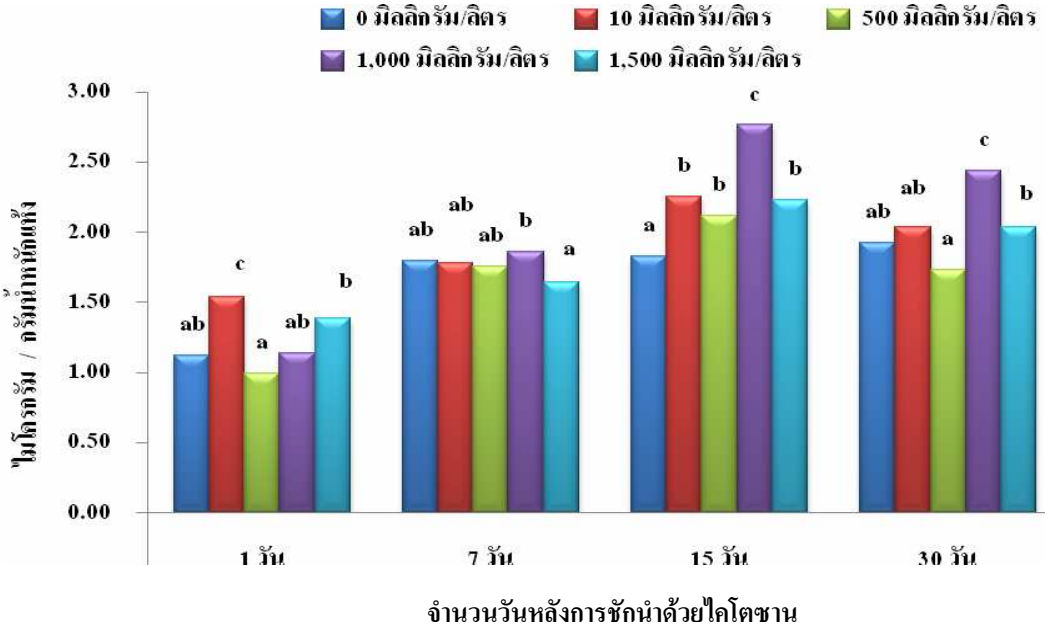
อาหารพืชในสภาวะดินกรดว่า ธาตุแคลเซียม แมกนีเซียมและโพแทสเซียมจะละลายได้ง่ายขึ้น แต่ฟอสฟอรัสจะถูกตรึงทำให้ละลายได้ยาก การมีธาตุบางอย่างละลายได้มากขึ้นอาจมีผลต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ Juan *et al.* (2008) พบว่าการมีไนโตรเจนสูงจะลดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วย วิธี DPPH และ FRAP ลง แต่การมีกำมะถันเพิ่มขึ้นจะทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในพืชเพิ่มขึ้น

3.3.1.4 ผลต่อการเป็นตัวรีดิวซ์สารอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี FRAP พบว่าที่ 15 วัน หลังชักนำด้วยคลโตซานความเข้มข้นที่ 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร และ 1,500 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้ความสามารถในการรีดิวซ์สารอนุมูลอิสระของสารสกัดกวาวเครือขาวของทั้งสองความเข้มข้นสูงที่สุดเท่ากับ 5.72 และ 6.29 ไมโครโมลาห์ของ Fe^{2+}/กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับและไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความเข้มข้นอื่น การชักนำเพิ่มความสามารถในการรีดิวซ์สารอนุมูลอิสระขึ้นอย่างต่อเนื่อง ตั้งแต่วันที่ 1 และมีค่าสูงที่สุดในวันที่ 15 หลังจากนั้นจะลดต่ำลงจนใกล้เคียงกับผลในวันที่ 1 (ภาพที่ 3.4) ซึ่งอาจเกิดจากสารชักนำสามารถไปเพิ่มปริมาณสารฟีนอลิคและสาร ฟลาโวนอยด์ขึ้นได้ดังที่พบในผลการทดลองข้างต้น

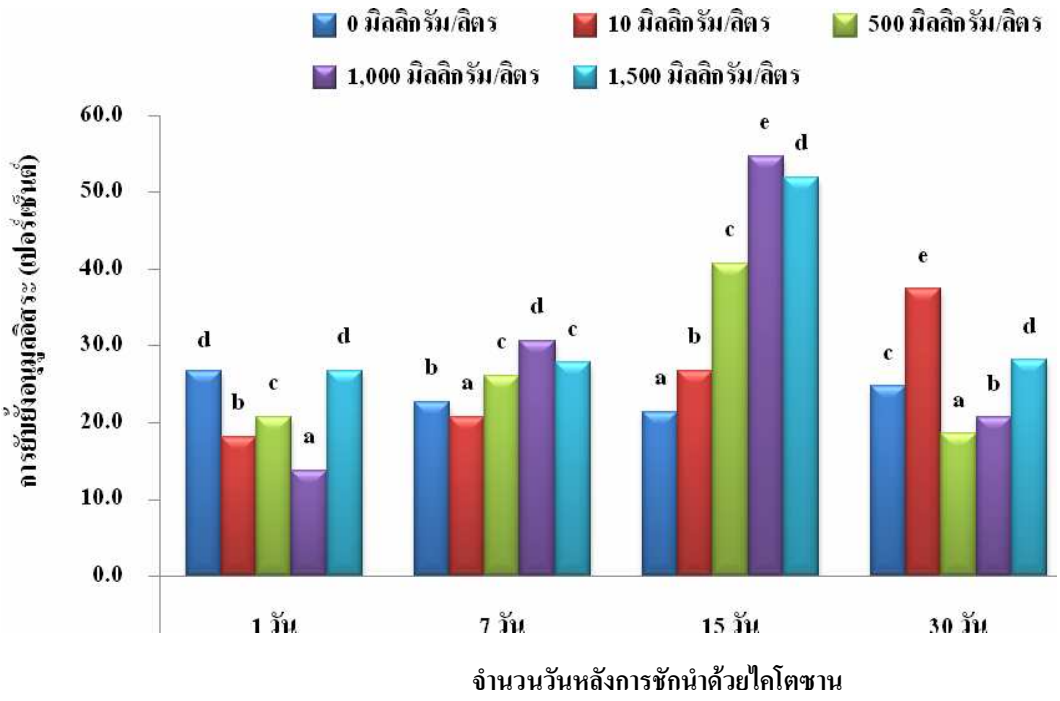
เพื่อกำหนดเกณฑ์ในการคัดเลือกความเข้มข้นและจำนวนวันหลังการชักนำที่เหมาะสมจึงใช้วิธีการให้คะแนน (score) เป็น ระดับ ตั้งแต่ 1 คะแนน ถึง 3 คะแนน โดยกำหนดให้ค่าที่สูงที่สุดที่มีนัยสำคัญทางสถิติมีระดับคะแนนเท่ากับ 3 และกำหนดให้ ค่าที่สูงเป็นอันดับ 2 มีระดับคะแนนเท่ากับ 2 ค่าที่สูงเป็นอันดับที่ 3 มีระดับคะแนนเท่ากับ 1 ดังนั้น ทรีตเมนต์ที่เหมาะสมที่สุดจะต้องมีคะแนนผลรวมของทุกปัจจัยที่เกี่ยวข้องการสารสร้างสารเคมี (total score A) สูงที่สุด ส่วนการคัดเลือกวันที่เหมาะสมต่อการเก็บผลข้อมูลหลังการชักนำ ได้จากวันเก็บข้อมูลที่มีผลรวมของ total score B ของแต่ละวันของทุกปัจจัยที่เกี่ยวข้องสูงที่สุด แสดงในตารางผนวกที่ 1 พบว่าไคโตซานความเข้มข้น 1000 ppm เหมาะสมต่อการชักนำให้กวาวเครือขาวสร้างส่วนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารเคมีมากที่สุด และระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเก็บข้อมูลหลังการชักนำคือ ที่ 15 วัน เนื่องจากมีคะแนนรวมของวันสูงที่สุด คือ 22 ได้จาก 6+8+4+4 จะพบว่าการชักนำด้วยไคโตซานความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคและสารประกอบฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้นสูงที่สุดนั้น ทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วย วิธี DPPH และ FRAP เพิ่มขึ้นด้วย ส่วนกลไกของการเพิ่มขึ้นนั้นยังไม่ทราบแน่ชัดและต้องศึกษาในรายละเอียดต่อไป ส่วนการลดลงของสารอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยทั้งสองวิธีในวันที่ 30 หลังสิ้นสุดการชักนำแสดงว่าสารอนุมูลอิสระในกวาวเครือขาวมีการตอบสนองต่อสารชักนำอย่างรวดเร็ว และลดปริมาณลงเมื่อระยะเวลาหลังถูกกระตุ้นเพิ่มขึ้น ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าถ้าต้องใช้สารดังกล่าวเพื่อชักนำจะต้องรู้กำหนดเวลาที่แน่นอนถึงจุดที่จะให้สารต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดก่อนทำการเก็บเกี่ยวให้ทันช่วงเวลานั้นต่อไป



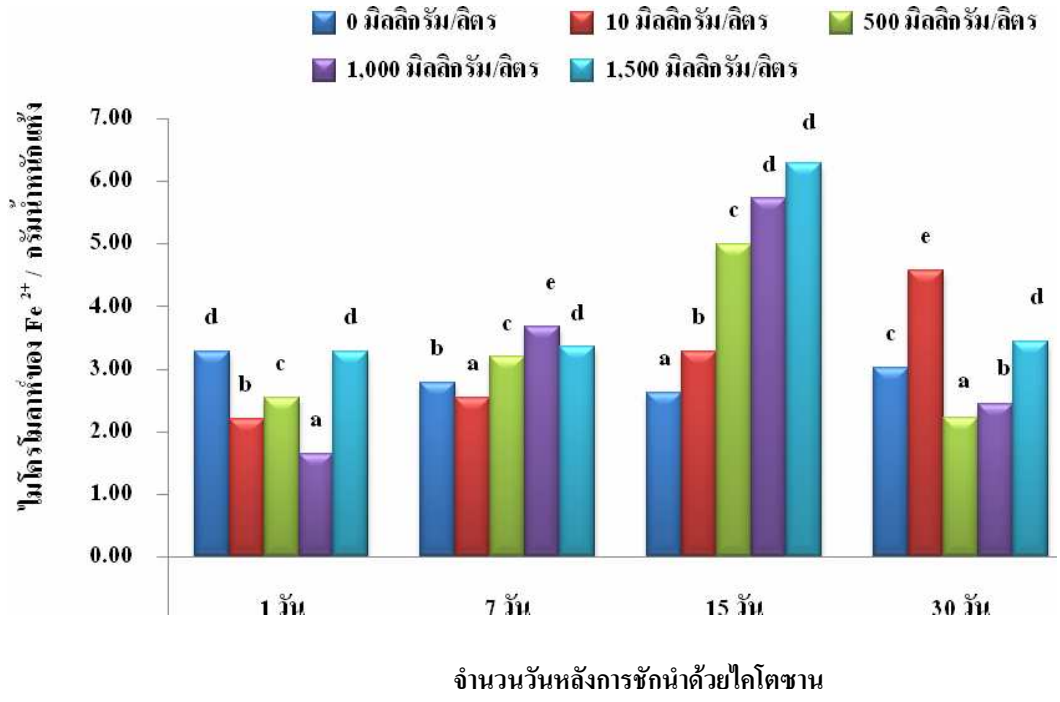
ภาพที่ 3.1 สารฟีนอลิคหลังการชักนำด้วยไคโตซาน



ภาพที่ 3.2 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์หลังการชักนำด้วยไคโตซาน



ภาพที่ 3.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี DPPH หลังชักนำด้วยไคโตซาน



ภาพที่ 3.4 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี FRAP หลังชักนำด้วยไคโตซาน

4) ผลต่อปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของกวาวเครือขาว ใน ตารางผนวกที่ 2 พบว่าทุกตัวแปรที่ใช้วัดการเจริญเติบโตหลังการชักนำไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าไคโตซานไม่มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของกวาวเครือขาว เนื่องจากผลการทดลองที่ได้ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แม้จะมีรายงานว่ามีธาตุในโตรเจนเป็นส่วนประกอบอยู่ในไคโตซานประมาณ 8.7 เปอร์เซ็นต์ (Ohta *et al.*, 1999) อย่างไรก็ตาม กวาวเครือขาวมีแนวโน้มเจริญเติบโตเป็นปกติและเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ทำการทดลอง

3.3.2 การทดลองที่ 2 ผลของการชักนำด้วยกรดซาลิไซลิก

การชักนำด้วยกรดซาลิไซลิกทั้ง 5 ความเข้มข้น (0 10 100 150 และ 200 มิลลิกรัม/ลิตร) มีผลต่อตัวแปรต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

3.3.2.1 ผลต่อสารประกอบฟีนอลิค พบว่า การเก็บข้อมูลที่ 7 วัน หลังสิ้นสุดการชักนำ พบว่าความเข้มข้นที่ 100 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิคในหัวกวาวเครือขาวสูงที่สุดคือ 15.5 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเงื่อนไขอื่น ๆ ที่ทำการทดลอง (ภาพที่ 3.5)

3.3.2.2 ผลต่อสารประกอบฟลาโวนอยด์ พบว่า การเก็บข้อมูลที่ 7 วัน หลังสิ้นสุดการชักนำ พบว่าความเข้มข้นที่ 100 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้มีปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ในหัวกวาวเครือขาวสูงที่สุดคือ 3.01 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเงื่อนไขอื่น ๆ ที่ทำการทดลอง (ภาพที่ 3.6)

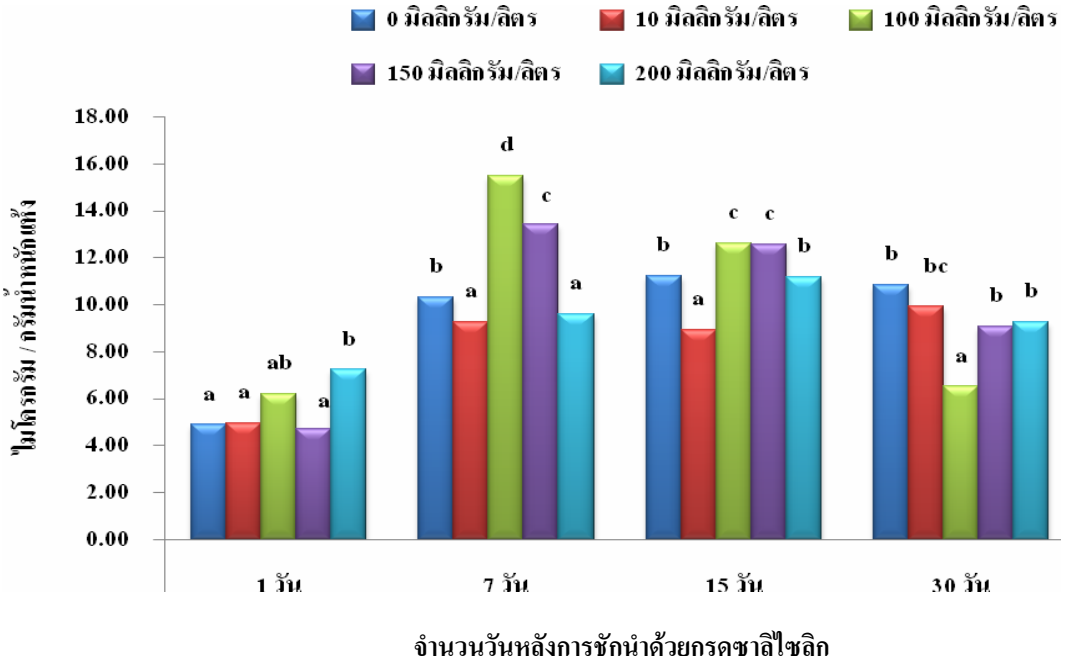
3.3.2.3 ผลต่อการยับยั้งสารอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี DPPH พบว่า การเก็บข้อมูลที่ 7 วัน หลังสิ้นสุดการชักนำ พบว่าความเข้มข้นที่ 100 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้การยับยั้งอนุมูลอิสระในหัวกวาวเครือขาวสูงที่สุดคือ 58.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเงื่อนไขอื่น ๆ ที่ทำการทดลอง (ภาพที่ 3.7)

3.3.2.4 ผลต่อการเป็นตัวรีดิวซ์สารอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี FRAP พบว่า การเก็บข้อมูลที่ 7 วัน หลังสิ้นสุดการชักนำ พบว่าความเข้มข้นที่ 100 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้การยับยั้งอนุมูลอิสระในหัวกวาวเครือขาวสูงที่สุดคือ 5.89 ไมโครโมลาห์ของ Fe^{2+}/กรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเงื่อนไขอื่น ๆ ที่ทำการทดลอง (ภาพที่ 3.8)

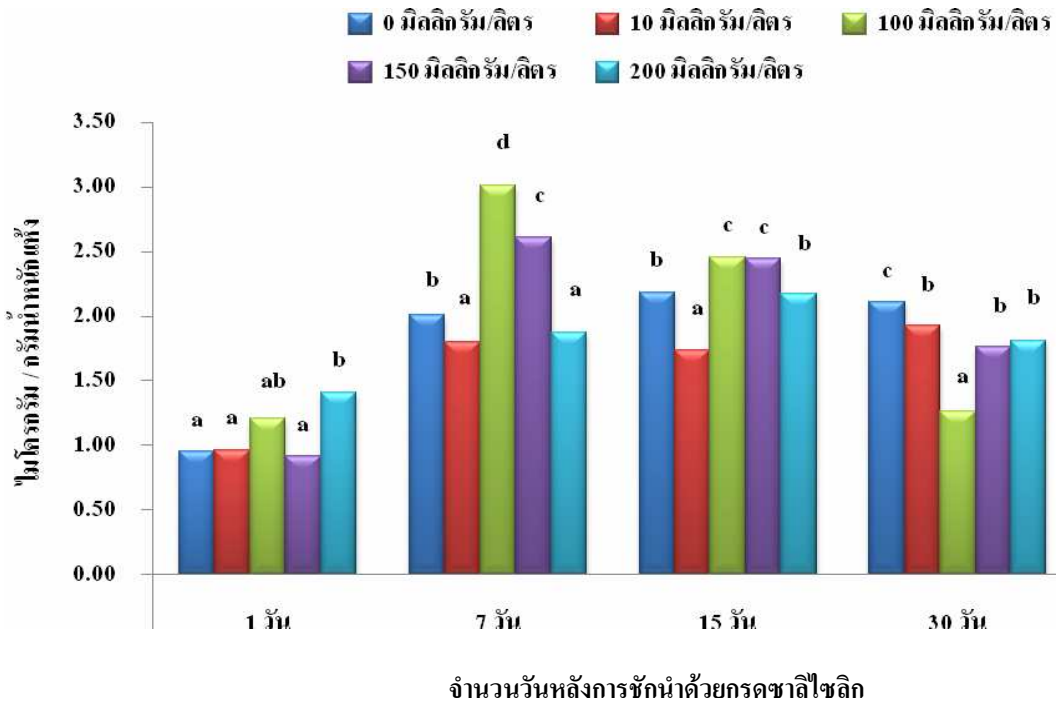
ผลจากการชักนำด้วยกรดซาลิไซลิก มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งความเข้มข้นที่ใช้และระยะเวลาการเก็บข้อมูลหลังสิ้นสุดการชักนำ ต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคและปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ การคัดเลือกความเข้มข้นและจำนวนวันหลังการชักนำที่เหมาะสมใช้เกณฑ์การให้คะแนนเหมือนกับกรณีชักนำด้วยไคโตซาน ดังแสดงในตารางผนวกที่ 3 พบว่า การชักนำด้วยกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ที่ 7 วัน

หลังการชักนำ ทำให้ผลของการชักนำค่าต่าง ๆ ในข้างต้นดีที่สุด สอดคล้องกับ Ali *et al.* (2007) ที่พบว่า ค่าดังกล่าวสูงขึ้นในวันที่ 7 และ วันที่ 9 ของการชักนำด้วยกรดซาลิไซลิกในโสมจีน เนื่องจากกรดซาลิไซลิกจึงเป็นเสมือนสารสัญญาณที่ส่งให้พืชสร้างยีนที่เกี่ยวข้อง ไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ PAL จึงเกิดการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิคชนิดต่าง ๆ รวมถึงฟลาโวนอยด์เพื่อตอบสนองต่อสัญญานที่ได้รับ (Rao *et al.*, 2000)

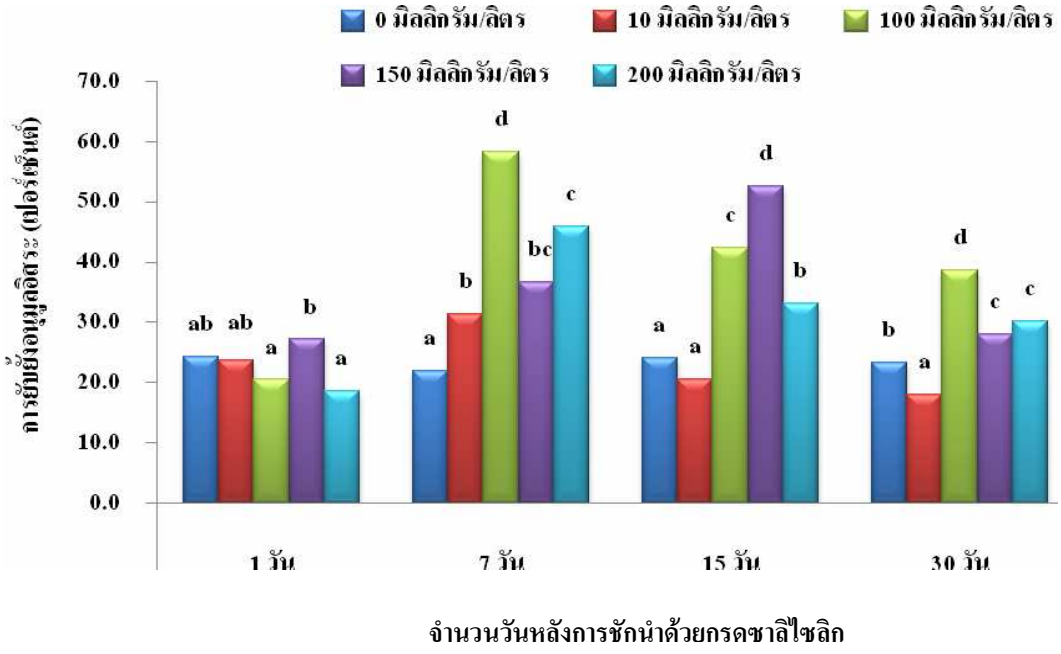
3.3.2.5 ผลต่อปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของกวาวเครือขาว ในตารางผนวกที่ 4 พบว่ากรดซาลิไซลิกไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของกวาวเครือขาว เนื่องจากผลการทดลองที่ได้ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แม้จะมีรายงานว่ากรดซาลิไซลิกมีผลส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืชอื่น ๆ ก็ตาม เช่น การฉีดพ่นที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาห์ ให้แก่ถั่วเหลือง พบว่า ทำให้ของน้ำหนักสด น้ำหนักแห้งของต้นและราก เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น จำนวนใบต่อต้นและปริมาณของคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ฉีดพ่นสารนี้ (Yildirim *et al.*, 2008) กรดซาลิไซลิกมีผลต่อความยาวรากและอาจเกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวและการขยายตัวของเซลล์ หรือออกฤทธิ์ในทางเสริมกันสารออกซิน (Kling and Meyer, 1983; Li and Li, 1993; Singh, 1993) การฉีดพ่นในถั่วในแปลงทดลองพบว่าสามารถเพิ่ม คลอโรฟิลล์ชนิดเอ และ ชนิดบี และแคโรทีนอยด์ (Türkyılmaz *et al.*, 2005) Khan *et al.* (2003) พบว่ากรดซาลิไซลิกเพิ่มอัตราการสังเคราะห์แสงในถั่วเหลืองและข้าวโพด Wang and Li (2006) พบว่าการฉีดพ่นกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาห์/ลิตร ที่ให้แก่ถั่วเหลือง ทำให้อัตราการสังเคราะห์แสงสุทธิและค่า F_v / F_m (chlorophyll a fluorescence parameter) มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม จึงสรุปว่ากรดซาลิไซลิกเพิ่มอัตราการสังเคราะห์แสงได้ Hirano *et al.* (2000) รายงานว่ากรดซาลิไซลิกมีผลในทางอ้อมของการใช้สารชักนำต่อการเจริญเติบโตของพืช โดยทำให้พืชมีระบบการป้องกันตัวจากสภาวะที่ไม่เหมาะสม ทำให้พืชสร้างสารบางอย่างขึ้นมาเพื่อป้องกันตัวก่อนที่จะมีการเข้าทำลายของเชื้อโรคจริง ๆ จึงช่วยลดความเสียหายของผลผลิตลงได้เมื่อมีการเข้าทำลายของเชื้อ ทำให้การเจริญเติบโตของพืชหรือผลผลิตดีขึ้น



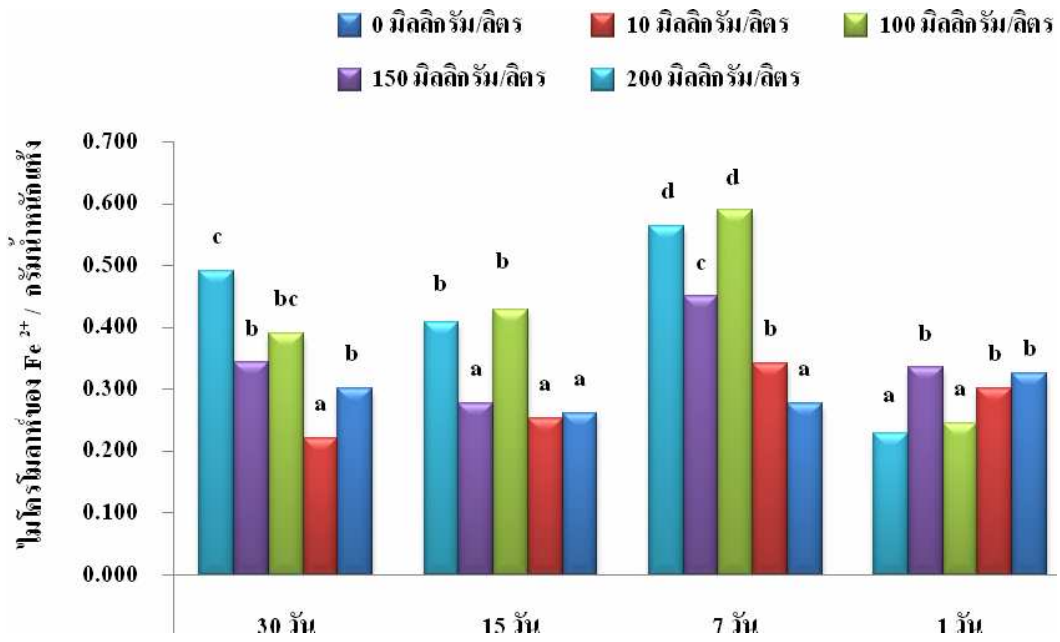
ภาพที่ 3.5 สารฟีนอลิค ของกวาวเครือขาวที่ชักนำด้วยกรดซาลิไซลิก



ภาพที่ 3.6 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์หลังชักนำด้วยกรดซาลิไซลิก



ภาพที่ 3.7 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี DPPH หลังชักนำด้วยกรดซาลิไซลิก



ภาพที่ 3.8 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี FRAP หลังชักนำด้วยกรดซาลิไซลิก

3.3.3 การทดลองที่ 3 ผลของการชักนำด้วยคอปเปอร์คลอไรด์

การชักนำด้วยคอปเปอร์คลอไรด์ 5 ความเข้มข้น (0 10 100 200 และ 300 มิลลิกรัม/ลิตร) มีผลต่อ สารประกอบฟีนอลิค สารประกอบฟลาโวนอยด์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังนี้

3.3.3.1 ผลต่อสารประกอบฟีนอลิคของการเก็บข้อมูลที่ 15 วัน หลังชักนำด้วยความเข้มข้น 200 และ 300 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิคในหัวกวาวเครือขาวสูงที่สุดคือ 15.5 และ 15.4 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความเข้มข้นอื่นที่ทำการทดลอง (ภาพที่ 3.9)

3.3.3.2 สารประกอบฟลาโวนอยด์ของการเก็บข้อมูลที่ 15 วัน หลังชักนำด้วยความเข้มข้นที่ 100 200 และ 300 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้มีปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ในหัวกวาวเครือขาวสูงที่สุดคือ 2.98 และ 2.99 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง 1 กรัม ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความเข้มข้นอื่นที่ทำการทดลอง (ภาพที่ 3.10)

3.3.3.3 ผลต่อการยับยั้งสารอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี DPPH ของการเก็บข้อมูลที่ 15 วัน หลังชักนำด้วยความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้การยับยั้งอนุมูลอิสระในหัวกวาวเครือขาวสูงที่สุดคือ 49.9 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกับความเข้มข้นอื่นที่ทำการทดลอง (ภาพที่ 3.11)

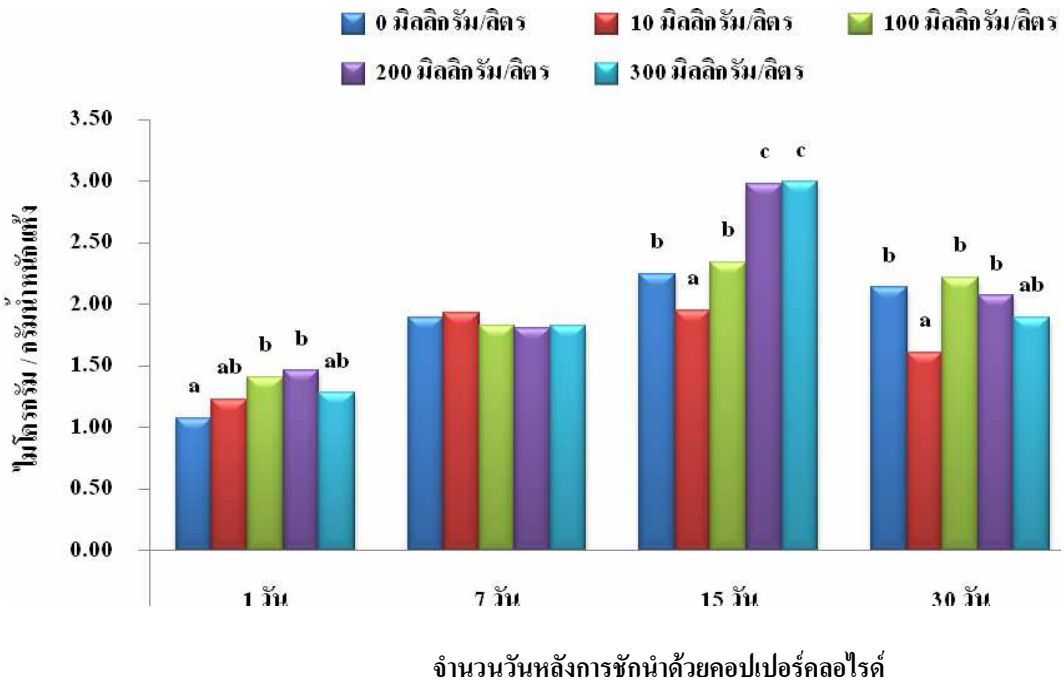
3.3.3.4 ผลต่อการเป็นตัวรีดิวซ์สารอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี FRAP ของการเก็บข้อมูลที่ 15 วัน หลังชักนำด้วยความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้สารสกัดสามารถรีดิวซ์สารอนุมูลอิสระได้สูงที่สุด คือ 6.05 ไมโครโมลาห์ของ Fe^{2+}/กรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความเข้มข้นอื่นที่ทำการทดลอง (ภาพที่ 3.12)

3.3.3.5 ผลต่อปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของกวาวเครือขาว ในตารางผนวกที่ 6 พบว่า คอปเปอร์คลอไรด์ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของกวาวเครือขาว เนื่องจากผลการทดลองที่ได้ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตาม กวาวเครือขาวมีแนวโน้มเจริญเติบโตเป็นปกติและเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ทำการทดลอง

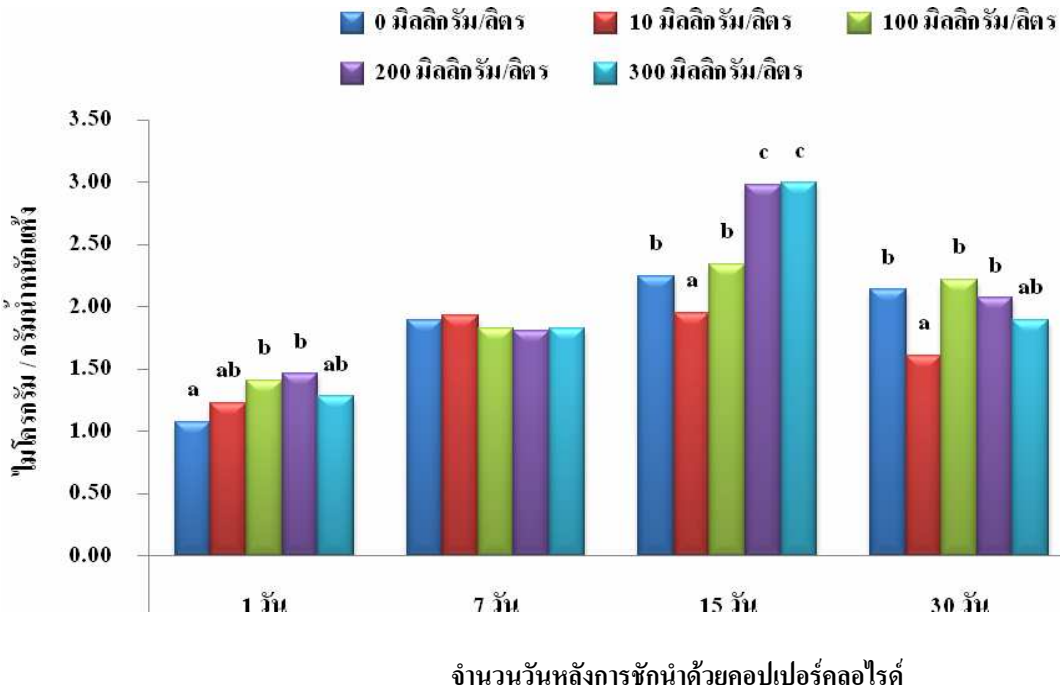
ผลที่เกิดจากการชักนำด้วยคอปเปอร์คลอไรด์ ต่อการยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระ การเป็นตัวรีดิวซ์สารอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลิคและสารฟลาโวนอยด์ที่ อาจเกิดจากคอปเปอร์คลอไรด์มีทองแดงเป็นส่วนองค์ประกอบ ทองแดงเป็นจุลธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับพืช เป็นโคเอนไซม์เป็นส่วนประกอบของโปรตีนหลายชนิดและมีส่วนร่วมในวิถีการสังเคราะห์สารทุติยภูมิชนิดต่าง ๆ การที่ปริมาณฟีนอลิคและฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้นหลังการชักนำอาจเกิดจาก ทองแดงไปชักนำให้เกิดสารอนุมูลอิสระที่เป็นอนุพันธ์ของออกซิเจน (reactive oxygen species; ROS) (Schutzendubel and Polle, 2002) เช่น superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), singlet oxygen ($^1O_2$) และ hydrogen peroxide (H_2O_2) ให้

สูงขึ้น อนุมูลอิสระเหล่านี้จะออกซิไดซ์สารชีวโมเลกุล ทำให้เซลล์และดีเอนเอถูกทำลาย (De Vos *et al.*, 1992) เพื่อป้องกันผลกระทบของ ROS พืชจึงกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์หลัก ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารประกอบฟีนอลขึ้นเพื่อใช้ป้องกันตัว เช่น phosphate dehydrogenase (G6PDH), shikimate dehydrogenase (SKDH), phenylalanine ammonia lyase (PAL) และ cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) สอดคล้องกับ Hubert and Ragai (1997) ที่พบว่าการชักนำด้วยคอปเปอร์คลอไรด์ในถั่วลูปินสามารถเพิ่มปริมาณของฟลาโวนอยด์ได้ การที่วันที่ 15 หลังชักนำด้วยความเข้มข้น 200 และ 300 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้มีสารฟีนอลิคและสารฟลาโวนอยด์ที่สูงที่สุดและไม่แตกต่างกันทางสถิติกัน แสดงว่าการตอบสนองต่อปริมาณคอปเปอร์คลอไรด์ที่เพิ่มขึ้นนั้นเริ่มคงที่และน่าจะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นให้มากกว่านี้ ประสาร ฉลาดคิด (2547) พบว่าการฉีดพ่นคอปเปอร์คลอไรด์ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้เกิดอาการใบไหม้เป็นจุดและปริมาณของจีนิสทีอินและดาอิดซีอินซึ่งเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ลดลง การคัดเลือกความเข้มข้นและจำนวนวันหลังการชักนำที่เหมาะสมใช้เกณฑ์การให้คะแนนเหมือนกับกรณีชักนำด้วยไคโตซานและการชักนำด้วยกรดซาลิไซลิค ดังแสดงในตารางผนวกที่ 5 ดังนั้นในการชักนำครั้งนี้จึงเลือกความเข้มข้นที่ 200 มิลลิกรัม/ลิตร เนื่องจากได้ผลการชักนำที่ดีเท่ากับความเข้มข้น 300 มิลลิกรัม/ลิตร แต่จะลดความเสี่ยงต่อการเป็นพิษได้ดีกว่า

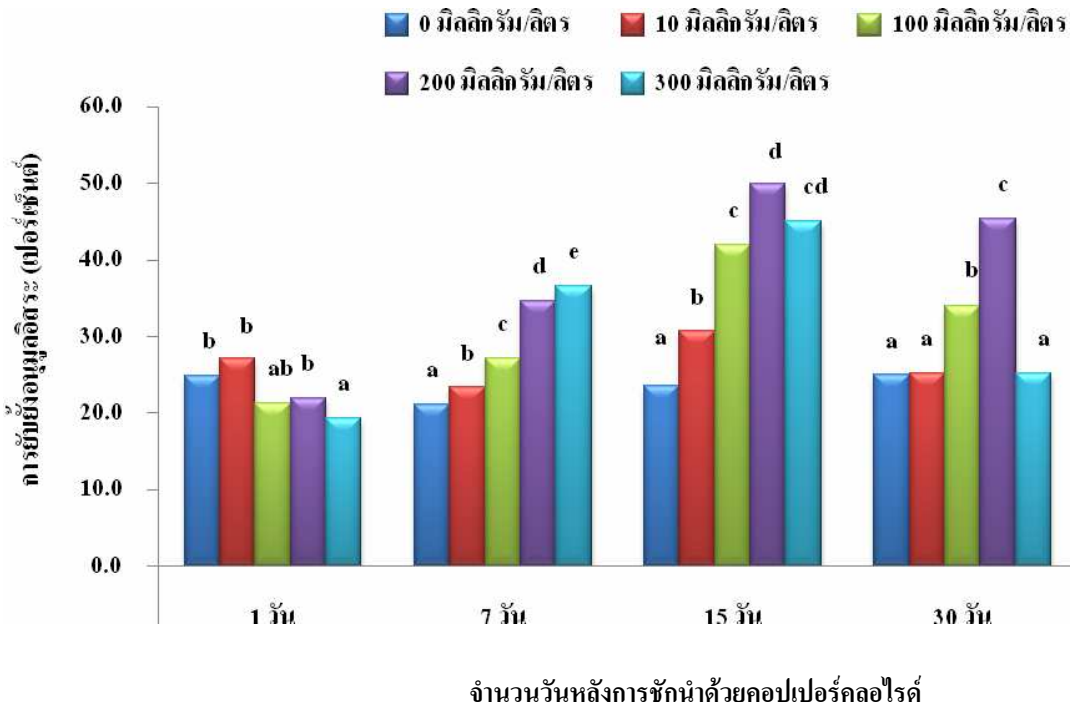
ผลการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay สารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาวจะให้โปรตอน (H^+) แก่สารอนุมูลอิสระ DPPH เมื่อได้รับโปรตอน DPPH จะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ทำให้การดูดกลืนแสงลดลง จึงคำนวณเป็นการยับยั้งสารอนุมูลอิสระเมื่อตรวจสอบตัวอย่างต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นเดียวกัน และรายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสารอนุมูลอิสระได้ เช่น การทดลองของ Arokiyaraj *et al.* (2008) จึงตั้งสมมุติฐานว่า ถ้าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสารอนุมูลอิสระแตกต่างกันแสดงว่าในสารสกัดนั้นต้องมีชนิด หรือ ปริมาณ หรือทั้งสองอย่าง แตกต่างกันและความแตกต่างนั้นน่าจะเกิดจากผลของสารชักนำ จึงทำให้คัดเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมได้ จากการศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระทั้ง 2 วิธี การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลโดยรวมและปริมาณของฟลาโวนอยด์ ให้ผลการทดลองไปในทางเดียวกันคือ ตัวอย่างที่มีสารประกอบฟีนอลิคสูงก็จะมีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระและเป็นตัวรีดิวซ์ที่ดีด้วย



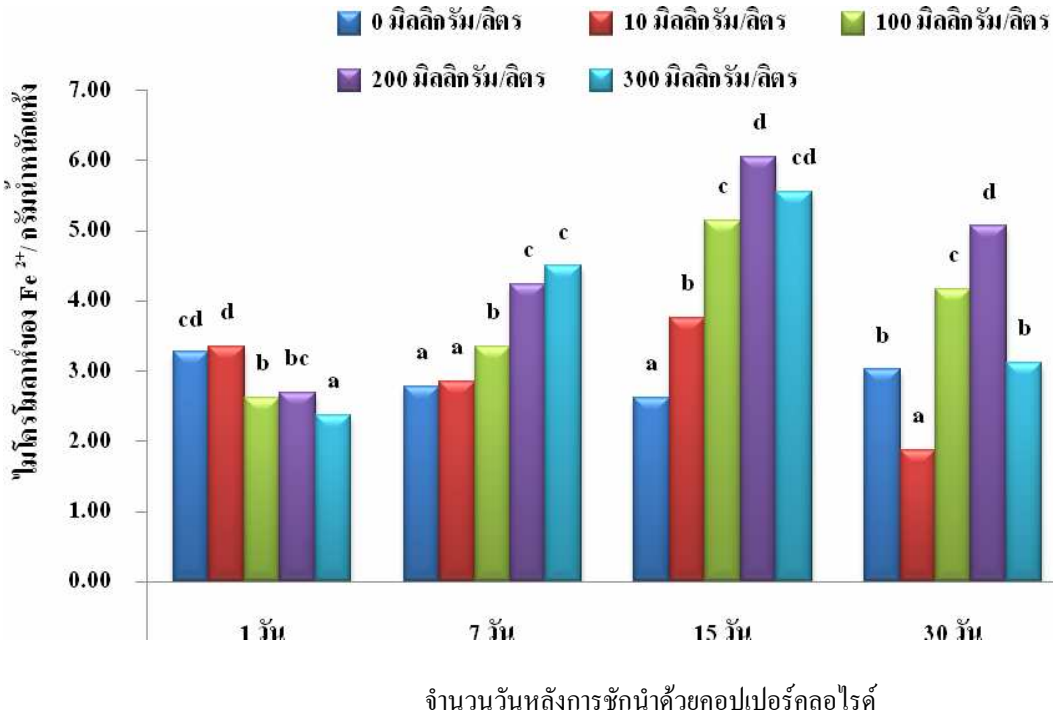
ภาพที่ 3.9 สารฟีนอลิคหลังชักนำด้วยคอปเปอร์คลอไรด์



ภาพที่ 3.10 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์หลังชักนำด้วยคอปเปอร์คลอไรด์



ภาพที่ 3.11 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี DPPH หลังชักนำด้วยคอปเปอร์คลอไรด์



ภาพที่ 3.12 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี FRAP หลังชักนำด้วยคอปเปอร์คลอไรด์

Prior *et al.* (1998) และ Wang and Lin (2000) กล่าวถึงการชักนำด้วยทรีตเมนต์ที่แตกต่างกันว่า อาจมีผลไปกระตุ้นให้เกิดสารชนิดที่แตกต่างกันไป จึงมีผลให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกันและ Fahrendorf *et al.* (1995) รายงานว่าเมื่อสารชักนำเข้าสู่พืช ทำให้พืชสร้างสารต่าง ๆ เพื่อใช้ในระบบป้องกันตัว โดยสร้างเอนไซม์ G6PDH ซึ่งเป็นเอนไซม์ใน pentose phosphate pathway (PPP) และสร้างสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิคขึ้น จนได้สารฟีนอลิคในกลุ่มต่าง ๆ เพิ่มขึ้น

มีแนวโน้มว่าการชักนำเกือบทุกความเข้มข้นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระลดลงในวันที่ 30 หลังสิ้นสุดการชักนำ แสดงว่าสารชักนำแต่ชนิดมีความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการชักนำและจะลดอิทธิพลลงเมื่อผ่านจุดที่เหมาะสมนั้นไป ระยะเวลาเก็บข้อมูลหลังการชักนำครั้งสุดท้าย (1 7 15 และ 30 วัน) มีผลอย่างชัดเจนต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ อาจเกิดจากผลของปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการดูดซึมและการเคลื่อนย้ายสารภายในต้นพืช ดังนี้ (1) ชนิดและอายุของพืช ใบพืชที่อายุน้อยจะมีอัตราการดูดซึมสารได้มากกว่าใบแก่ เนื่องจากการพัฒนาของไขและคิวทิเคิลนั้นยังไม่สมบูรณ์ จึงทำให้สารผ่านเข้าไปได้ง่ายกว่าและส่วนที่จะดูดซึมสารได้ดีคือขนราก รากที่เริ่มแตกใหม่หรือมีอายุน้อย จะมีขนรากมากและดูดซึมสารได้ดีกว่า (2) อุณหภูมิ เมื่อสูงขึ้นการดูดซึมสารจะมากขึ้น เพราะทำให้โมเลกุลของไขเกาะกันอย่างหลวม ทำให้น้ำผ่านไปได้ง่าย แต่ถ้าอุณหภูมิสูงเกินไปจะทำให้การดูดซึมสารลดลงเนื่องจากปากใบปิด (3) ความชื้นสัมพัทธ์ สารชักนำที่เป็นสารละลายน้ำเมื่อฉีดพ่นไปยังใบพืช ส่วนของน้ำจะระเหยสู่บรรยากาศ ถ้าความชื้นสัมพัทธ์ต่ำน้ำจะได้เร็ว เนื้อสารจะแห้งติดอยู่บนใบ การดูดซึมจะเกิดขึ้นได้ยากมาก ถ้าให้สารขณะความชื้นสัมพัทธ์สูง น้ำอยู่ในสารละลายเมื่อฉีดพ่นไปยังใบจะระเหยได้ช้า จึงทำให้ใบพืชดูดซึมสารได้ดีกว่า (4) ปัจจัยอื่น ๆ เช่น ความเข้มข้นของสารละลาย ค่า pH ของสารละลาย ความเข้มข้นของสารละลาย สารละลายที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นจะทำให้การดูดซึมสารได้มากขึ้น (Greene and Bukovac, 1971)

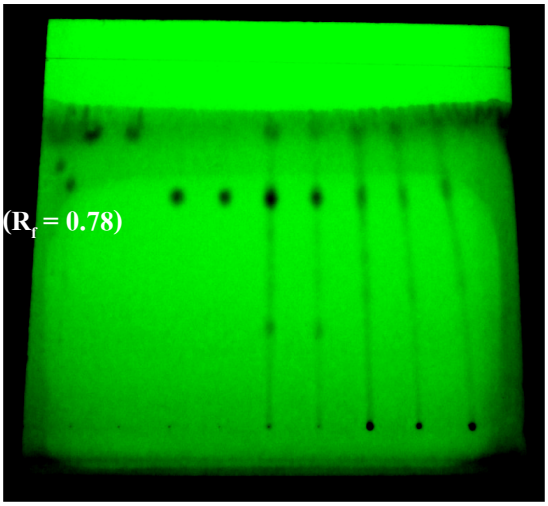
3.3.4 ผลของสารชักนำต่อการมีอยู่ของจีนิสทีอินและพิวรารินในแคลลัส

เนื่องจากต้องการใช้ผลทดลองนี้ไปใช้ในการศึกษาผลของการใช้สารชักนำทั้งสามชนิดร่วมกันเพื่อชักนำพิวรารินและจีนิสทีอินในการทดลองต่อไป จึงทดสอบการมีอยู่ของสารทั้งสองจากทุกการทดลอง พบว่าตำแหน่งของจุดในสารสกัด และค่า retention mobility (R_f) ของแต่ละตัวอย่างตรงกับจุดของสารมาตรฐานทั้งสองชนิด และพบว่า ทุกทรีตเมนต์รวมทั้งกลุ่มควบคุมด้วยมีการสร้างสารจีนิสทีอินและพิวรารินขึ้นเป็นปกติ เห็นได้จากตำแหน่งของสารจากแต่ละตัวอย่างที่ปรากฏขึ้นในตำแหน่งที่ตรงกันกับสารมาตรฐานทั้งสองชนิดเมื่อทดสอบด้วยวิธี TLC ดังแสดงในภาพที่ 3.17 และ 3.18 แสดงว่าสารชักนำไม่มีผลไปยับยั้งการสร้างพิวรารินและจีนิสทีอิน และอาจมีผลส่งเสริมให้เกิดการสร้างที่เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับ Hubert and Ragai (1997) การชักนำด้วยไคโต

ซาน และคอปเปอร์คลอไรด์ ในถั่วลูปินสามารถเพิ่มปริมาณของจีนิสทีอินได้ประมาณ 6 ถึง 13 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม Kneer *et al.* (1999) รายงานว่าสารไคโตซานและกรดซาลิไซลิก สามารถเพิ่มการสังเคราะห์สารไอโซฟลาโวนและจีนิสทีอินในรากถั่วลูปินได้มากขึ้น ซึ่งจะได้ทดลองและหาปริมาณของสารทั้งสองที่เกิดจากการใช้สารชักนำร่วมกันในการทดลองต่อไป

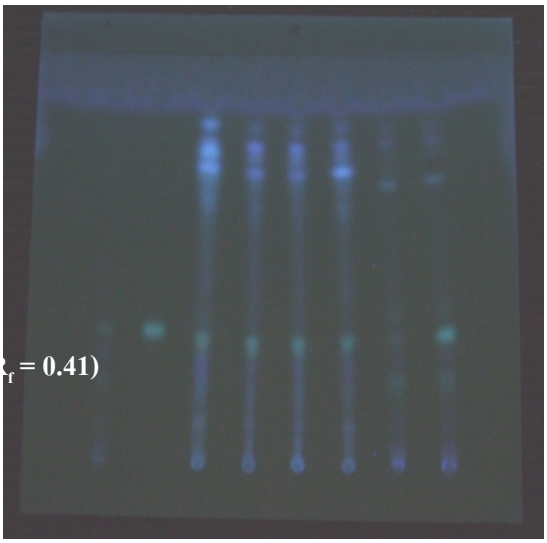
3.4 สรุปผลการวิจัย

ความเข้มข้นและระยะเวลาการเก็บข้อมูลที่เหมาะสมต่อการชักนำให้หัวกวาวเครือขาวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลิค และสารประกอบฟลาโวนอยด์ คือไคโตซานความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ที่ 15 วัน หลังหยุดการชักนำ กรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ที่ 7 วัน หลังหยุดชักนำและคอปเปอร์คลอไรด์ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ที่ 15 วัน หลังหยุดชักนำ สารชักนำทั้งหมดไม่มีผลยับยั้งหรือส่งเสริมการเจริญเติบโตของกวาวเครือขาวอายุ 4 เดือน ที่ปลูกใน growth chamber สารชักนำทั้งหมดไม่มีผลยับยั้งการสังเคราะห์จีนิสทีอินและพิวรารินิน



{---A---} {---------- B -------}

ภาพที่ 3.6 TLC โครมาโตแกรมของ puerarin มาตรฐาน (A) และ puerarin ของสารสกัดจากหัวกวาวเครือขาว (B) ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้คือ n-butanol : acetic acid : water (5 : 3 : 1 โดยปริมาตร)



{A} {---------- B ----------}

ภาพที่ 3.6 TLC โครมาโตแกรมของจีนิสทีอินมาตรฐาน (A) และจีนิสทีอินของสารสกัดจากหัวกวาวเครือขาว (B) ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV) ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้คือ n-butanol : acetic acid : water (5 : 3 : 1 โดยปริมาตร)

3.5 รายการอ้างอิง

ประสาร ฉลาดคิด. (2546). อิทธิพลของสภาพแวดล้อมและปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโต การออกดอก การติดฝักและเมล็ด และการสะสมสาร daidzein และ genistein ในหัวกวาวเครือขาว [*Pueraria candollei* Grah. var. *mirifica* (Airy Shaw et. Suvatabandhu) Niyomdham] **วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.**

วิโรจน์ เชาว์วิเศษ. (2550). ผลของสังกะสีต่อการสะสม puerarin ในรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาว [*Pueraria candollei* grah. var. *mirifica* (Airy shaw et. suvatabandhu) niyomdham] และผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อการคลายตัวของหลอดเลือดหนูขาว *(Rattus norvegicus*). **วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.**

Al-Tawaha, A., Seguin, P., Smith, D.L. and Beaulieu, C. (2005). Biotic elicitors as a mean of increasing isoflavone concentration of soybean seeds. **Annu. Appl. Biol.** 146: 303-310.

Ali, M.B., Khatun, S., Hahn, E.J. and Paek, K.Y. (2006). Enhancement of phenylpropanoid enzymes and lignin in *Phalaenopsis* orchid and their influence on plant acclimatisation at different levels of photosynthetic photon flux. **Plant Grow Regul**. 49: 137-146.

Arnao, M.B. (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: A practical case. **Trends Food Sci Tech**. 11: 419-421.

Arokiyaraj, S., Martin, S., Perinbam1, K., Arockianathan, P.M. and Beatrice, V. (2008). Free radical scavenging activity and HPTLC finger print of *Pterocarpus santalinus* L. an in vitro study. **INDJST.** 1(7): 1-3.

Benzie, I. and Strain, J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Meth Enzymol.** 299: 15-27.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. (1995). Use of a free radicals method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm Wiss Technol.** 28: 25-30.

Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M. and Chern, J.C. (2002). Estimation of total flavonoids content in propolis by two complementary colorimatric method. **J Food Drug Anal.** 10: 178-182.

Cherdshewasart, W. and Sutjit, W. (2008). Correlation of antioxidant activity and major isoflavonoid contents of the phytoestrogen-rich *Pueraria mirifica* and *Pueraria lobata* tubers. **Phytomedicine**. 15: 38-43.

Ding, C.K., Wang, C.Y., Gross, K.C. and Smith, D.L. (2002). Jasmonate and salicylate induce the expression of pathogenesis-related-proteins genes and increase resistance to chilling injury in tomato fruit. **Planta.** 214: 895-901.

Folin, O. and Ciocalteu, V. (1927). On tyrosine and tryptophan determination in protein. **J Biol Chem.** 73: 627–650.

Greene, D.W. and Bukovac, M.J. (1977). Foliar penetration of naphthalene-acetic acid: enhancement by light and role of stomata. **Am J Bot.** 64: 96101

Hirano, S., Hayashi, M. and Okuno, S. (2000). Soybean seeds surface-coated with depolymerised chitins: chitinase activity as a predictive index for the harvest of beans in field culture. **J Sci Food Agr.** 81: 205-209.

Hubert, G. and Ragai, K.I. (1997). Effects of various elicitors on the accumulation and secretion of isoflavonoids in white lupin. **Phytochemistry.** 44: 1463-1467.

Ingram, J. L., Tahara, S. and Dziedzic, S. Z. (1989). Minor isoflavone from root of *Pueraria mirifica*. **Z Naturforsch.** 44: 742-762.

Inui, H., Yamaguchi, Y. and Hirano, S. (1997). Elicitor actions of nacetyl-chitooligosaccharides and laminari-oligosaccharides for chitinase and L-phenylalanine ammonia-lyase induction in rice suspension culture. **Biosci Biotechnol Biochem.** 61: 975-978.

Khan, W., Balakrishnan, P. and Smith, D.L. (2003). Photosynthetic responses of corn and soybean to foliar application of salicylates. **J Plant Physiol.** 160(5): 485-492.

Kling, G.J. and Meyer, M.M. (1983). Effects of phenolic compounds and indoleacetic acid on adventitious root initiation in cuttings of *Phaseolus am-us*, *Acer saccharium*, and *Acer griseum*. **Hortic Sci.** 18: 353-354.

Kneer, R, Poulev, A.A., Olesinski, A. and Raskin, L. (1999). Characterization of the elicitor-induced biosynthesis and secretion of genistein from roots of *Lupinus luteus* L. **J Exp Bot.** 50: 1553-1559.

Levesque, R. and SPSS, Inc. (2006). **SPSS programming and data management**, 3rd edition. SPSS institute. USA.

Li, D., Park, S.H., Shim, J.H., Lee, H.S., Tang, S.Y., Park, C.S. and Park, K.H. (2004). In vitro enzymatic modification of puerarin to puerarin glycoside by maltogenic amylase. **Carbohydr Res.** 339: 2789-2797.

Li, L. and Li, L. (1995). Effects of resorcinol and salicylic acid on the formation of adventitious roots on hypocotyl cutting of *Vigna radiate*. **J Trop Subtrop Bot.** 3: 67-71.

Ohta, K., Taniguchi, A., Konishi, N. and Hosoki, T. (1999). Chitosan treatment effects growth and flower quality in *Eustoma gradiflorum*. **Hort Sci**. 34: 233-234.

Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. **J Nat Prod.** 63: 1035-1042.

Prior, R.L., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., O'Brien, C, Lischner, N, Ehlenfeldt, M., Kalt, W., Krewer, G. and Mainland, C.M. (1998). Antioxidant capacity as influenced by total phenolics and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. **J Agric Food Chem.** 46(7): 2686-2693.

Pulido, R., Bravo, L. and Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **J agric Food Chem.** 48: 3396–3402.

Rao, M.V., Lee, H.I., Creelman, R.A., Mullet, J.E. and Davis, K.R. (2000). Jasmonic acid signaling modulates ozone-induced hypersensitive cell death. **Plant Cell.** 12: 1633-1646.

Santos, M.R. and Mira, L. (2004). Protection by flavonoids against the peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine. **Free Radic Res.** 38: 1011-1018.

Schutzendubel, A. and Polle, A. (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. J. Exp.Bot. 53: 1351–1365.

Singleton, V.L. and Rossi Jr., J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **AJEV**. 16: 144-158.

Türkyılmaz, B., Akta, L.Y. and Güven, A. (2005). Salicylic acid induced some biochemical and physiological changes in *Phaseolus vulgaris* L. **Sci Eng J Firat Univ.** 17(2): 319-326.

Wang, L.J. and Li, S.H. (2006). Salicylic acid-induced heat or cold tolerance in relation to Ca^{2+} homeostasis and antioxidant systems in young grape plants, **Plant Sci**. 170: 685-694.

Wang, S.Y. and Lin, H.S. (2000). Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry and strawberry varies with cultivar and developmental stage. **J Agric Food Chem.** 48: 140-146.

Yildirim, E., Turan, M. and Guvenc, I. (2008). Effect of foliar salicylic acid applications on growth, chlorophyll and mineral content of cucumber (*Cucumis sativus* L.) grown under salt stress. **J Plant Nutr**. 31: 593-612.

Yu, O., Jung, W., Shi, J., Croes, R.A., Farder, G.M., MaGonigle, B. and Odell. J.T. (2000). Production of the isoflavones genistein and daidzein in non-legume Dicot and monocot tissues. **Plant Physiol**. 124: 781-793.

บทที่ 4
พิวราริน จีนิสทีอิน และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในกวาวเครือขาวที่ถูกชักนำด้วยไคโตซาน กรดซาลิไซลิก และคอปเปอร์คลอไรด์ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน

บทคัดย่อ

พิวราริและจีนิสทีอินในหัวกวาวเครือขาวมีคุณสมบัติเป็นสารไฟโตเอสโตรเจนและเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ จึงศึกษาการเพิ่มพิวราริน จีนิสทีอิน โดยใช้ไคโตซานความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร กรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร และคอปเปอร์คลอไรด์ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นสารชักนำร่วมกันเพื่อเพิ่มปริมาณของพิวราริน จีนิสทีอินและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหัวกวาวเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber ปลูกในโรงเรือน และปลูกในแปลงทดลอง พบว่า การใช้ไคโตซานที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับคอปเปอร์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ให้ปริมาณของพิวรารินและจีนิสทีอินสูงที่สุด แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกทรีตเมนต์ หัวกวาวเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber มีปริมาณพิวรารินและจีนิสทีอินสูงที่สุดเท่ากับ 423 และ 22.6 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง และที่ปลูกในโรงเรือน มีปริมาณสารพิวรารินและจีนิสทีอินสูงที่สุดเท่ากับ 386 และ 22.4 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติของพิวรารินและจีนิสทีอินเมื่อชักนำในต้นที่ปลูกในแปลงทดลอง ขณะที่การใช้ไคโตซานที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับกรดซาลิไซลิกที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร และคอปเปอร์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้กวาวเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber ปลูกในโรงเรือนและปลูกในแปลงทดลอง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2,482 1,050 และ 1,026 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และมี FRAP value เท่ากับ 4.55 4.73 และ 6.69 ไมโครโมลของ Fe^{2+}/กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ สารชักนำทั้งหมด ไม่ทำให้การเจริญเติบโตของกวาวเครือขาวทุกสภาพการปลูกลดลงต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ดังนั้นสารชักนำที่เหมาะสมที่สุดในการเพิ่มปริมาณของพิวรารินและจีนิสทีอินคือ การใช้ไคโตซานที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับคอปเปอร์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตรและสารที่เหมาะสมที่สุดในการเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหัวกวาวเครือขาวคือ การใช้การใช้ไคโตซานที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับกรดซาลิไซลิกที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร และคอปเปอร์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร

4.1 บทนำ

กวาวเครือขาว [*Pueraria candollei* Grah. var. mirifica (Airy Shaw et Suvatabandhu) Niyomdham] มีสรรพคุณตามตำรายาหัวกวาวเครือขาวของหลวงอนุสารสุนทรว่าเป็นยาอายุวัฒนะ และได้รับความสนใจจากการมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน พิวรารินและจีนิสทีอินที่พบในหัวกวาวเครือขาวมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง จากการไปยับยั้ง tyrosine kinases หรือ การยับยั้งเอนไซม์ DNA topoisomer ase II ผลการทดสอบเบื้องต้นพบว่ายับยั้งการเกิดมะเร็งเต้านมได้ (Adlercreutz, 1995) จีนิสทีอินเป็นสาร phytoalexin ในพืช มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และต้านการเข้าทำลายของเชื้อราได้ในระดับปานกลาง (Geibel, 1990) พิวรารินมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงไม่แตกต่างจาก œ-tocopherol ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน (Cherdshewasart *et al.*, 2008) ปัจจุบันมนุษย์ป่วยด้วยโรคที่มีสาเหตุมาจากอนุมูอิสระมีจำนวนมากขึ้น การบริโภคหรือใช้สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจึงเป็นการป้องกันความเสี่ยงต่อโรคที่มีสาเหตุจากอนุมูลอิสระได้ (เฉลิมพงษ์ แสนจุ้ม และไชยวัฒน์ ไชยสุต, 2547) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสามารถตรวจวัดได้หลายวิธี เช่น DPPH radical scavenging assay มีหลักการคือสาร 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระที่เสถียรและมีสีฟ้า เมื่อมีสารต้านอนุมูลอิสระมาจับกับ DPPH จะทำให้สีฟ้าของ DPPH จางลงจึงมีค่าการดูดกลืนแสงลดลง (Tagashira and Ohtake, 1998) การตรวจวัดสามารถรายงานเป็นค่า IC_{50} ที่บอกถึงความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ สารต้านอนุมูลอิสระที่มีค่า IC_{50} ต่ำ จึงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง เนื่องจากใช้ความเข้มข้นต่ำ ๆ ก็สามารถยั้บยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH ได้ และยังสามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธี ferric reducing /antioxidant power (FRAP) assay หลักการคือในสภาวะที่เป็นกรด สารประกอบเชิงซ้อนของ ferric tripyridyltriazine (Fe^{III}-TPTZ) จะถูกรีดิวซ์เป็น ferrous (Fe^{II}-TPTZ) ซึ่งมีสีฟ้า สารต้านอนุมูลอิสระที่ให้อิเล็กตรอนเพื่อเปลี่ยน Fe^{III}-TPTZ ไปเป็น Fe^{II}-TPTZ ได้ มากจึงเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี (Benzie and Strain, 1999) การมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พิวรารินและจีนิสทีอินอยู่ในหัวกวาวเครือขาวในระดับที่สูงจะทำให้หัวกวาวเครือขาวมีคุณภาพดี มีรายงานว่าไคโตซาน สามารถเพิ่มความเข้มข้นของไอโซฟลาโวนอยด์ เช่น เพิ่มจีนิสทีอินในเมล็ดถั่วเหลืองได้ 21-84 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Al-Tawaha *et al.*, 2005) และกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/ลิตร ที่ใส่ในสูตรอาหารที่เลี้ยงเซลล์รากของถั่วลูปินสามารถเพิ่มปริมาณของจีนิสทีอินได้ (Kneer *et al.*, 1999) และการฉีดพ่นธาตุทองแดงทำให้กวาวเครือขาวที่ปลูกในแปลงสร้างจีนิสทีอินเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ประสาร ฉลาดคิด, 2547) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีสหสัมพันธ์ในเชิงบวกกับสารฟีนอลิคและสารฟลาโวนอยด์ (Ali *et al.*, 2006) พิวรารินและจีนิสทีอินเป็นสารในกลุ่มย่อยของฟลาโวนอยด์ สารชักนำอาจจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสารเหล่านี้ เนื่องจากสารไคโตซาน กรด

ซาลิไซลิก และคอปเปอร์คลอไรด์อาจไม่มีผลจำเพาะต่อปริมาณของพิวรารินและจีนิสทีอินเท่านั้น การตวจวัดสารฟีนอลิกและ ฟลาโวนอยด์อาจจะบอกได้ถึงการตอบสนองของกวาวเครือขาวต่อสารที่ใช้ชักนำได้ การนำสารชักนำแต่ละชนิดที่ได้ผลการชักนำฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีจากการทดลองในบทที่ 3 มาใช้ร่วมกันชักนำให้กวาวเครือขาวสร้างสารสำคัญ เช่น พิวรารินจีนิสทีอินในหลายสภาพแวดล้อม เป็นการทดสอบประสิทธิ์ภาพของสารชักนำว่าเหมาะสมที่จะใช้เพิ่มคุณภาพของหัวกวาวเครือได้หรือไม่ ซึ่งทำให้ได้แนวทางใหม่ ๆ ในการเพิ่มคุณภาพของหัวกวาวเครือขาว

4.2 วิธีดำเนินการวิจัย

4.2.1 การเตรียมสารชักนำและต้นกวาวเครือขาว

สารที่ใช้ชักนำทั้ง 8 ทรีตเมนต์ ได้จากการนำไคโตซาน ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร คอปเปอร์คลอไรด์ 200 มิลลิกรัม/ลิตร และกรดซาลิไซลิก 100 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งเป็นสารชักนำที่ดีที่สุดจากการทดลองในบทที่ 3 ใช้เป็นสารชักนำร่วมกัน โดยจัดเป็นทรีตเมนต์ได้ทั้งหมด 8 ทรีตเมนต์ ดังนี้

ทรีตเมนต์ที่ 1 ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น (control)

ทรีตเมนต์ที่ 2 ฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิกที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร (SA)

ทรีตเมนต์ที่ 3 ฉีดพ่นด้วยคอปเปอร์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ($CuCl_2$)

ทรีตเมนต์ที่ 4 ฉีดพ่นด้วยคอปเปอร์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับกรดซาลิไซลิกความที่เข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ($CuCl_2$ + SA)

ทรีตเมนต์ที่ 5 ราดโคนต้นด้วยไคโตซานที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร (Chitosan)

ทรีตเมนต์ที่ 6 ราดโคนต้นด้วยไคโตซานที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับฉีดพ่นกรดซาลิไซลิกที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร (Chitosan + SA)

ทรีตเมนต์ที่ 7 ราดโคนต้นด้วยไคโตซานที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ฉีดพ่นด้วยคอปเปอร์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร (Chitosan + $CuCl_2$)

ทรีตเมนต์ที่ 8 ราดโคนต้นด้วยไคโตซานที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับการฉีดพ่นด้วยคอปเปอร์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร และกรดซาลิไซลิกที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร (Chitosan + $CuCl_2$ + SA)

นำทรีตเมนต์ทั้งหมดไปชักนำในกวาวเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber ในโรงเรือนและในแปลงทดลอง ก่อนการชักนำเตรียมต้นพืชและวางแผนการทดลอง ดังนี้

การปลูกใน growth chamber ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการสรีรวิทยาพืช อาคารเครื่องมือ 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยนำต้นกวาวเครือขาว อายุ 3 เดือน ที่ได้จากการเพาะเมล็ดและ

ปลูกในกระถางที่บรรจุดินปลูกสำเร็จรูป (ดินปลูก มทส) เข้า growth chamber ที่ตั้งค่าความชื้นสัมพัทธ์ 85 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 27/25°C ช่วงแสง 14/10 ชั่วโมง ความเข้มแสง 270 ลักซ์ เมื่อต้นกวาวเครือขาวอายุ 8 เดือน (ภาพผนวกที่ 4) จึงทำการชักนำ ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (complete randomized design: CRD) 8 ทรีตเมนต์ ๆ ละ 4 ซ้ำ (1 ต้น/ซ้ำ)

การปลูกในโรงเรือน (ภาพผนวกที่ 5) ทำการทดลองที่ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยนำต้นกวาวเครือขาว อายุ 3 เดือน จากการเพาะเมล็ดและปลูกในกระถางเข้าไปไว้ในโรงเรือน ให้น้ำด้วยระบบสปริงเกลอร์ (แบบปีกผีเสื้อ ติดตั้งบนหลังคาด้านในโรงเรือน) ในเวลา 9.00-9.30 ทุกวัน ให้ปุ๋ยคอกผสมปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 ในอัตราส่วน 1 : 1 เดือนละ 1 ครั้ง แต่ละครั้งให้ปริมาณ 5 กรัม/ต้น ไม่ฉีดพ่นสารกำจัดศัตรูพืชตลอดการทดลอง เมื่อต้นกวาวเครือขาวอายุ 8 เดือนจึงเริ่มทำการชักนำสารสำคัญ โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ 8 ทรีตเมนต์ ๆ ละ 8 ซ้ำ (1 ต้น/ซ้ำ)

การปลูกในแปลงทดลอง (ภาพผนวกที่ 6) ทำการทดลองที่ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีโดยนำเอาต้นกวาวเครือขาว อายุ 3 เดือน ที่ได้จากการเพาะเมล็ด ย้ายลงดินที่ยกร่องสูง 0.5 เมตร ด้วยระยะปลูกระหว่างแถวห่างกัน 3 เมตร และระยะระหว่างต้นห่างกัน 2 เมตร ทำค้างแบบแยกต้น ให้น้ำด้วยระบบสปริงเกลอร์ (แบบปีกผีเสื้อ ติดตั้งสูงจากโคนต้น 0.5 เมตร) ในเวลา 9.00-9.30 ทุกวัน ให้ปุ๋ยคอกผสมปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 ในอัตราส่วน 1:1 เดือนละ 1 ครั้ง แต่ละครั้งให้ปริมาณ 5 กรัม/ต้น ไม่ฉีดพ่นสารกำจัดศัตรูพืชตลอดการทดลอง เมื่อต้นกวาวเครือขาวอายุ 12 เดือน และใบอยู่ในระยะเพสลาดจึงเริ่มทำการชักนำ (ไม่สามารถชักนำที่อายุ 8 เดือนได้ เนื่องจากกวาวเครือขาวอยู่ในระยะใบแก่และกำลังผลัดใบ) ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ภายในบล็อก (randomized complete block design: RCB) 8 ทรีตเมนต์ ๆ ละ 3 ซ้ำ (block) ซ้ำละ 4 ต้น

เมื่อต้นกวาวเครือขาวในแต่ละกรณี ถึงระยะที่ต้องทำการชักนำด้วยทรีตเมนต์ต่าง ๆ ตามแผนการทดลอง จึงใช้ทรีตเมนต์ทั้ง 8 ชนิด มาชักนำอย่างต่อเนื่องจำนวน 4 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 7 วัน โดยการฉีดพ่นลงบนต้นกวาวเครือขาว (กรณีคอปเปอร์คลอไรด์และกรดซาลิไซลิก) หรือราดลงดินบริเวณโคนต้นแล้วพรวนดินกลบไว้ (กรณีไคโตซาน) เก็บข้อมูลจากทุกทรีตเมนต์ หลังการชักนำครั้งสุดท้าย 15 วัน เพื่อเปรียบเทียบปริมาณพิวรารินและจีนิสทีอิน ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารฟีนอลลิค ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ และผลที่มีต่อการเจริญเติบโตของต้นกวาวเครือขาว ได้แก่ อัตราส่วนน้ำหนักสด/แห้งของหัว น้ำหนักของสารที่สกัดได้และอัตราการสังเคราะห์แสง (วัดด้วยเครื่อง leaf chamber analysis type LCA-4) ในเวลา 10.00-12.00 นาฬิกา

4.2.2 การสกัดสารจากหัวกวาวเครือขาว

ตามวิธีของ วิโรจน์ เชาว์วิเศษ (2550) โดยอบหัวกวาวเครือขาวแต่ละตัวอย่างที่หั่น

เป็นชิ้นบาง ๆ ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดชนิด ultra centrifuge mill ได้ผงกวาวเครือขาวที่มีขนาดอนุภาค 100 mesh จากนั้นชั่งผงกวาวเครือขาว 10 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมเอทานอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วจึงเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง (whatman เบอร์ 42) แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที (Yu *et al.*, 2000) เป็นเวลา 12 นาที แยกเอาสารละลายส่วนที่ใสไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้สภาวะอุณหภูมิต่ำและการลดความดันบรรยากาศ จนได้สารสกัดสีน้ำตาล ติดอยู่ใน flask ที่ใช้ระเหยตัวทำละลาย บันทึกน้ำหนักของสารที่สกัดจากหัวกวาวเครือขาว แล้วเก็บในอุณหภูมิ -20°C

4.2.3 การตรวจหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิค

ตามวิธีการของ Singleton *et al.* (1999) โดยผสมสารสกัดแต่ละตัวอย่าง ความเข้มข้น 0.0263 กรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรกับสารละลาย folin-ciocalteu's phenol reagent ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ใน volumetric flash ทิ้งไว้ 10 นาที เติมสารละลาย 7.5 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (w/v) ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50ºC เป็นเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร โดยใช้เมทานอล 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารต่าง ๆ แทนการใช้สารละลายตัวอย่างเพื่อใช้เป็น blank นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณหาปริมาณสารฟีนอลิคโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลิค (gallic acid) สร้างกราฟมาตรฐานของกรดแกลิค ความเข้มข้น 1-100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยผสมกรดแกลิคแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กับสารละลายต่าง ๆ เช่นเดียวกับกรณีของสารสกัดแต่ละตัวอย่าง วัดค่าการดูดกลืนแสงแล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของกรดแกลิค รายงานปริมาณฟีนอลิคของแต่ละทรีตเมนต์ เป็นค่า gallic acid equivalent

4.2.4 การตรวจหาฟลาโวนอยด์

ด้วยวิธี aluminium chloride flavonoids complex colorimatric method ตามวิธีของ Chang *et al.* (2002) และ Harbone (1998) โดยผสมสารสกัดแต่ละตัวอย่าง ความเข้มข้น 0.0263 กรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กับ เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมอลูมิเนียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และโพแทสเซียมอะซีเตท ความเข้มข้น 1 โมล ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่

อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงวัดการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของเคอร์ซีติน (quercetin) การสร้างกราฟมาตรฐานของเคอร์ซีตินความเข้มข้น 1-16 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใช้ขั้นตอนและผสมกับสารละลายต่าง ๆ เหมือนกรณีของสารสกัดตัวอย่าง วัดค่าการดูดกลืนแสงแล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารเคอร์ซีตินและรายงานปริมาณฟลาโวนอยด์ของแต่ละทรีตเมนต์เป็นค่า quercetin equivalent

4.2.5 การหาปริมาณของพิวรารินและจีนิสทีอินด้วย HPLC

ตามวิธีของ Zhang *et al.* (1999) และวิโรจน์ เชาว์วิเศษ (2550) โดยกรองสารละลายของสารสกัดกวาวเครือขาวแต่ละตัวอย่างด้วยกระดาษกรองไนลอนเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บสารละลายที่กรองได้ใน vial ขนาด 1.5 มิลลิลิตร วิเคราะห์ด้วย HPLC (hewlett-packard 1050 series) ที่ใช้ diode array เป็น detector โดยฉีดสารสกัด 20 ไมโครลิตร/ครั้ง/ตัวอย่าง ผ่านคอลัมน์ชนิด RP-C_{18} agilent® column (4.6x150 มิลลิเมตร) ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของคอลัมน์เท่ากับ 5 ไมโครเมตร ใช้เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) acetic acid ในน้ำ (A) และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) acetic acid ใน acetonitrile (B) โดยทำเป็น gradient (ตารางที่ 4.1) ใช้อัตราการเคลื่อนที่ของสารเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตร/นาที อุณหภูมิของระบบเท่ากับ 30°C คำนวณพื้นที่ใต้กราฟด้วยโปรแกรม Chem station 3D (hewlett-packard company, scientific instruments division) เปรียบเทียบตำแหน่งของสาร พิวรารินและจีนิสทีอินในสารสกัดกวาวเครือขาวแต่ละตัวอย่างกับสารมาตรฐาน แล้วนำพื้นที่ใต้กราฟของสารทั้งสองมาคำนวนหาปริมาณสารที่แต่ละตัวที่มีอยู่ในตัวอย่าง โดยแทนค่าในสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐานของพิวรารินี (ภาพผนวกที่ 7) และจีนิสทีอิน (ภาพผนวกที่ 8) ที่วิเคราะห์ในสภาวะเดียวกับสารสกัดกวาวเครือขาว แล้วจึงคำนวณเป็นปริมาณของสารต่อหน่วยน้ำหนักแห้งเพื่อรายงานผลการวิเคราะห์ต่อไป

ตารางที่ 4.1 gradient ของเฟสเคลื่อนที่ชนิด (A) และชนิด (B)

เวลา (นาที)	ปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่ (เปอร์เซ็นต์)	
	(A)	(B)
0	90	10
35	72	28

4.2.6 ฤทธิ์การยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH

ตามวิธีของ Brand-Williams *et al.* (1995) โดยนำสารสกัดแต่ละตัวอย่างมาละลายด้วยเมทานอลให้ได้ความเข้มข้น 750-4500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นผสมสารสกัดแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 4.9 มิลลิลิตร กับสารลาย DPPH ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาห์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เมื่อผสมให้เข้ากันแล้วบ่มไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร แล้วจึงคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสาร DPPH ด้วยจากสูตร

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสารอนุมูลอิสระ = { [Abs $_{control}$ - Abs $_{sample}$] / Abs $_{control}$ } x 100

Abs$_{sample}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด 1.5 มิลลิลิตรผสมกับสารละลาย DPPH 1.5 มิลลิลิตร

Abs$_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรผสม กับเมทานอล 1.5 มิลลิลิตร

สร้างกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสารอนุมูลอิสระกับความเข้มข้นของสารสกัดแต่ละตัวอย่าง สร้างสมการเส้นตรงเพื่อคำนวณ IC_{50}

4.2.7 การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

ตามวิธีของ Benzie and Strain (1999) สร้างกราฟมาตรฐานของ ferrous sulfate ($FeSO_4.7H_2O$) โดยผสมสารละลาย $FeSO_4$ ความเข้มข้น 0.101–1.011 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับ FRAP reagent ปริมาตร 950 ไมโครลิตร และผสม FRAP reagent กับเมทานอล (สารละลายควบคุม) ที่บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย acetate buffer pH 3.6 เป็น blank สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ $FeSO_4$ กับค่า ผลต่างของค่าดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร (ค่าดูดกลืนแสงของสาร $FeSO_4$–ค่าดูดกลืนแสงของสารละลายควบคุม) แล้วคำนวณหาสมการเส้นตรง เพื่อใช้คำนวณค่า FRAP value ของแต่ละตัวอย่าง การหาค่า FRAP value ของแต่ละตัวอย่าง ผสมสารสกัดของแต่ละตัวอย่าง ความเข้มข้น 100 มิลลิลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร กับ FRAP reagent ปริมาตร 950 ไมโครลิตร วัดค่าดูดกลืนแสง แล้วคำนวณ ผลต่างของค่าดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร ของแต่ละตัวอย่าง นำค่าที่ได้ไปคำนวณค่า FRAP value ของตัวอย่างต่อไป

4.2.8 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ความปรวนแปรของข้อมูล (ANOVA) ปริมาณพิวรารินจีนิสทีอิน ฤทธิ์

ต้านอนุมูลอิสระ สารฟีนอลลิค สารฟลาโวนอยด์ อัตราการสังเคราะห์แสง อัตราส่วนน้ำหนักสด/แห้ง และน้ำหนักของสารที่สกัดได้ ของแต่ละทรีตเมนต์ ด้วยวิธี F-test และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างทรีตเมนต์ ด้วยวิธี Duncan's Multiple Rang Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS (Statistical Package for Social Science) version 14 (Levesque และ SPSS Inc., 2006)

4.3 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.3.1 ผลของสารชักนำต่อปริมาณพิวรารินและจีนิสทีอิน

4.3.1.1 ผลต่อปริมาณพิวราริน พบว่าการชักนำด้วย Chitosan+$CuCl_2$ ทำให้กวาวเครือขาวมีปริมาณพิวรารินสูงที่สุดทั้งการทดลองใน growth chamber (423 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง) และในโรงเรือน (386 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง) แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติเมื่อชักนำในแปลงทดลอง กวาวเครือขาวที่ปลูกในแปลงทดลองมีแนวโน้มของการสร้างพิวรารินสูงกว่าการปลูกใน growth chamber หรือ ปลูกในโรงเรือน (ตารางที่ 4.2) พิวรารินที่ขึ้นอาจเกิดจากสารชักนำไปกระตุ้นการทำงานของเอ็นไซม์ 2 ชนิด ในกระบวนการไกลโคไลซิส คือ fructose-1,6-bisphosphatase จะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน fructose-1,6-bisphosphate ไปเป็น fructose-6-phosphate และเอ็นไซม์ aldolase จะแยก fructose-1,6-bisphosphate ให้เป็น dihydroxyacetonephos-phate และ glyceroldehyde-3-phosphate ซึ่ง glyceroldehyde-3-phosphate จะถูกเปลี่ยนเป็น phophoenolpyruvate (PEP) เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ไอโซฟลาโวน (สมบุญ เตชภิญญาวัฒน์, 2548) พิวรารินซึ่งเป็นสารกลุ่มไอโซฟลาโวนส์จึงเพิ่มขึ้น การชักนำด้วย Chitosan+$CuCl_2$ อาจทำให้การทำงานของเอ็นไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ดีที่สุด การสังเคราะห์พิวรารินจึงเกิด ผลการทดลองใน growth chamber และ ในโรงเรือนให้ผลเหมือนกันและไม่มีสารชักนำที่ทำให้ปริมาณพิวรารินในหัวกวาวเครือขาวต่ำกว่ากลุ่มควบคุม แสดงว่าสารชักนำทั้งหมดไม่เป็นพิษต่อเซลล์ เซลล์จึงยังกิจกรรมของเอนไซม์ต่าง ๆ ได้ปกติ ในแปลงทดลองไม่มีความแตกต่างกันของพิวรารินอาจเกิดจากปัจจัยที่ควบคุมไม่ได้ เช่น รังสียูวี ลม หรือศัตรูพืช (Stafford, 1997; Olsson *et al.*, 1998) มีผลในทางเสริมหรือลดบทบาทของสารชักนำ หรือเกิดจากพิวรารินถูกสร้างเพื่อการป้องกันตัวของพืชอยู่แล้วจึงมีปริมาณสูงเมื่อมีปัจจัยที่ควบคุมไม่ได้ในแปลงทดลองมากระตุ้นอย่างต่อเนื่อง เห็นได้จากกลุ่มควบคุมในแปลงทดลองมีปริมาณพิวรารินสูงกว่าในโรงเรือนและใน growth chamber การกระตุ้นด้วยสารชักนำจึงไม่เพิ่มปริมาณของสารดังกล่าวขึ้นไปได้อีก ขีดจำกัดดังกล่าวอาจมีผลของพันธุกรรมมาเกี่ยวข้อง ในบางพันธุ์อาจมีขีดจำกัดของการสร้างพิวรารินได้มากกว่าพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองนี้ได้

ตารางที่ 4.2 ผลของสารชักนำต่อพิวรารินในกวาวเครือขาวที่ปลูกในสภาพแวดล้อมต่างกัน

ทรีตเมนต์	ปริมาณของพิวราริน (ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง)		
	growth chamber	โรงเรือน	แปลงทดลอง
Water (control)	132 a	277 a	355
SA	292 c	299 abc	383
$CuCl_2$	311 cd	297 ab	341
$CuCl_2$+SA	201 ab	288 a	333
Chitosan	257 bc	341 bcd	386
Chitosan+SA	282 bc	344 cd	371
Chitosan+$CuCl_2$	423 e	386 d	4351
Chitosan+$CuCl_2$ + SA	384 de	365 c	413
CV (เปอร์เซ็นต์)	1.59	1.70	1.91

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ถูกกำกับด้วยตัวอักษรเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

4.3.1.2 ผลต่อปริมาณจีนิสทีอินพบว่าการชักนำด้วย Chitosan+$CuCl_2$ ทำให้กวาวเครือขาวมีปริมาณจีนิสทีอินสูงที่สุด (22.6 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในการทดลองใน growth chamber และในโรงเรือน (22.4 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง) และในโรงเรือน การชักนำด้วย Chitosan และ Chitosan+$CuCl_2$+SA ทำให้ปริมาณของพิวรารินสูงไม่แตกต่างจากการใช้ Chitosan+$CuCl_2$ การชักนำในแปลงทดลองไม่ทำให้ปริมาณจีนิสทีอินมีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 4.3) จากการทดลองไคโตซาน คอปเปอร์คลอไรด์ และกรดซาลิไซลิกมีผลต่อการเพิ่มปริมาณจีนิสทีอินสอดคล้องกับ Hubert and Ragai (1997) ที่พบว่าการชักนำด้วยไคโตซาน และคอปเปอร์คลอไรด์ ในถั่วลูปินเพิ่มปริมาณจีนิสทีอินได้ 6 ถึง 13 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม Kneer *et al.* (1999) พบว่าไคโตซานความเข้มข้น 0.12 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ที่ใช้ร่วมกับการเลี้ยงเซลล์รากถั่วลูปิน เพิ่มจีนิสทีอินได้ 108.0 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง และการใช้กรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 800 ไมโครโมลาห์ เพิ่มจีนิสทีอินได้ 122.2 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ขณะที่การให้น้ำกลั่นมีปริมาณพิวราริน เท่ากับ 5.0 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้งเท่านั้น รูปแบบการชักนำ Mithofer *et al.* (1996) รายงานว่าเมื่อไคโตซานถูกย่อยสลายจะปลดปล่อยสารโอลิโกแซกคาไรด์ซึ่งสามารถไปจับกับ beta-glucan-binding protein ที่อยู่ในบริเวณ plasmalemma ของรากพืช จึงทำให้พืชสร้างสารทุติยภูมิขึ้นมาตอบสนอง คอปเปอร์คลอไรด์อาจมีผลในทางส่งเสริมกันกับไคโตซาน

เห็นได้จากการใช้คอปเปอร์คลอไรด์อย่างเดียว เพิ่มจีนิสทีอินได้น้อยกว่าการใช้ร่วมกันกับไคโตซาน มีรายงานถึงอิทธิพลของธาตุทองแดงในคอปเปอร์คลอไรด์ต่อเพิ่มสารในกลุ่มจีนิสทีอินในสภาพแปลงทดลองของประสาร ฉลาดคิด (2546) ว่าการฉีดพ่นสารละลายทองแดงทำให้ปริมาณจีนิสทีอินในหัวกวาวเครือขาวมากกว่ากลุ่มควบคุม ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัม/ลิตร เพิ่มจีนิสทีอินได้สูงสุด Hakamatsuka (1991) พบว่าคอปเปอร์คลอไรด์ 10 มิลลิโมลาห์ ทำให้ถั่ว *P. lobata* มีจีนิสทีอินเพิ่มขึ้น 5-10 เท่า ความถี่ในการชักนำเป็นปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณจีนิสทีอิน Kneer *et al.* (1999) พบว่าการชักนำด้วยไคโตซานและกรดซาลิไซลิกเพียงครั้งเดียวทำให้ปริมาณจีนิสทีอินเพิ่มขึ้นในวันแรกและจะค่อย ๆ ลดลง จึงต้องชักนำแบบต่อเนื่องเพื่อคงปริมาณสารไว้

ตารางที่ 4.3 ผลของสารชักนำต่อจีนิสทีอินในกวาวเครือขาวที่ปลูกในสภาพแวดล้อมต่างกัน

ทรีตเมนต์	ปริมาณของจีนิสทีอิน (ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง)		
	growth chamber	โรงเรือน	แปลงทดลอง
Water (control)	6.2 a	12.2 b	11.4
SA	5.2 a	8.6 a	9.3
$CuCl_2$	20.6 cd	19.8 c	14.2
$CuCl_2$+SA	10.3 ab	17.8 c	14.1
Chitosan	10.4 ab	23.7 d	14.9
Chitosan+SA	9.8 ab	20.7 cd	14.3
Chitosan+$CuCl_2$	22.6 d	22.4 d	19.0
Chitosan+$CuCl_2$ + SA	15.7 bc	22.7 d	16.5
CV (เปอร์เซ็นต์)	2.47	3.56	3.48

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ถูกกำกับด้วยตัวอักษรเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

4.3.2 ผลต่อปริมาณสารฟีนอลิค

สารประกอบฟีนอลิคเป็นสารทุติยภูมิที่สำคัญในพืช สังเคราะห์จากกรดอะมิโนฟีนิลอะลานินและไทโรซีนอนุพันธ์ของสารประกอบฟีนอลิคที่พบในพืชได้แก่ ฟลาโวนอยด์ แทนนิน ลิกนิน เป็นต้น กวาวเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber และที่ปลูกในโรงเรือนให้ผลสอดคล้องกัน เมื่อชักนำด้วย Chitosan+$CuCl_2$+SA คือทำให้มีปริมาณฟีนอลิคสูงที่สุด คือ 15.0 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง แตกต่างจากในโรงเรือนและในแปลงทดลองที่พบว่า Chitosan+$CuCl_2$ มีปริมาณของ

สารฟีนอลิคสูงที่สุดคือ 16.1 และ 16.6 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4) จากการทดลองพบว่าไคโตซานมีผลต่อการเพิ่มปริมาณฟีนอลิค Fahrendorf *et al.* (1995) รายงานว่าเมื่อสารชักนำเข้าสู่พืช พืชอาจสร้างระบบป้องกันตัวโดยสร้างเอนไซม์ G6PDH ซึ่งเป็นเอนไซม์ใน pentose phosphate pathway (PPP) และจะสร้างสารตั้งต้นที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิคขึ้น และไคโตซานอาจจะไปเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ต่าง ๆ ที่ควบคุมการสังเคราะห์สารไอโซฟลาโวนอยด์ โดยกระตุ้นกิจกรรมของ phenylalanine ammonia-lysase (PAL) (Inui *et al.*, 1997) สอดคล้องกับ Khan *et al.* (2002) ที่พบว่าการฉีดพ่นไคโตซานในของถั่วเหลืองสามารถเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ PAL และ tyrosine ammonia-lysase (TAL) ให้สูงขึ้นได้จึงส่งผลให้มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิคในใบของถั่วเหลืองเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 4.4 สารฟีนอลิคในหัวกวาวเครือขาวหลังการชักนำในสภาพการปลูกที่แตกต่างกัน

ทรีตเมนต์	ปริมาณของสารฟีนอลิค (ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง)		
	growth chamber	โรงเรือน	แปลงทดลอง
Water (control)	11.7 b	9.8 a	12.4
SA	9.3 a	12.0 b	13.2
$CuCl_2$	13.1 b	11.3 b	13.2
$CuCl_2$+SA	13.0 b	14.8 cd	12.6
Chitosan	11.6 b	12.0 b	12.1
Chitosan+SA	13.0 b	11.0 ab	12.8
Chitosan+$CuCl_2$	12.5 b	16.1 d	16.6
Chitosan+$CuCl_2$ + SA	15.0 c	14.0 c	16.0
CV (เปอร์เซ็นต์)	5.81	7.13	13.92

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ถูกกำกับด้วยตัวอักษรเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

4.3.3 ผลต่อปริมาณฟลาโวนอยด์

สารประกอบฟลาโวนอยด์เป็นสารกลุ่มหนึ่งของสารประกอบฟีนอลิค ตัวอย่างสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ แอนโทไซยานิน และไอโซฟลาโวนอยด์ เป็นต้น จากการทดลอง พบว่ากวาวเครือที่ปลูกใน growth chamber และที่ปลูกในโรงเรือนให้ผลที่ไม่สอดคล้องกันการชักนำด้วย Chitosan+$CuCl_2$+SA ทำให้หัวกวาวเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber มีปริมาณฟลาโวนอยด์สูง

ที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ 3.09 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง แต่การปลูกในโรงเรือนพบว่าการชักนำด้วย Chitosan+SA มีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ 2.50 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ แต่ในแปลงทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติของสารฟลาโวนอยด์ (ตารางที่ 4.5) แสดงให้เห็นว่าไคโตซาน คอปเปอร์คลอไรด์ และกรดซาลิไซลิกมีผลต่อปริมาณของฟลาโวนอยด์ สอดคล้องกับ Hubert and Ragai (1997) ที่พบว่า การชักนำด้วยไคโตซาน และคอปเปอร์คลอไรด์ ในถั่วลูปินเพิ่มปริมาณของฟลาโวนอยด์ให้สูงกว่ากลุ่มควบคุมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากฟลาโวนอยด์เป็นสารในกลุ่มฟีนอลิคกลไกของการชักนำน่าจะคล้ายกัน คือไปเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ PAL แล้วทำให้เกิดการกระบวนการเปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่องจนได้สารประกอบ ฟลาโวนอยด์ชนิดต่าง ๆ (Inui *et al.*, 1997) ส่วนผลที่เกิดจากกรดซาลิไซลิก Ali *et al.* (2007) พบว่า กรดซาลิไซลิกเป็นสัญญาณกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ Andrew *et al.* (1994) พบว่าการฉีดพ่นคอปเปอร์คลอไรด์ทำให้ถั่วอัลฟาฟา (*M. sativa* L.) สร้างสารไอโซฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้น เพราะคอปเปอร์คลอไรด์ซึ่งมีธาตุทองแดงซึ่งเป็นจุลธาตุอาหารพืช เป็นโคเอนไซม์ที่มีส่วนร่วมในการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ได้ แต่ทองแดงที่มากเกินความต้องการของพืชอาจชักนำให้เกิดสารอนุมูลอิสระที่เป็นอนุพันธ์ของออกซิเจน (reactive oxygen species; ROS) (Schutzendubel and Polle, 2002) เช่น superoxide anion (O_2^-), singlet oxygen ($^1O_2$) และ hydrogen peroxide (H_2O_2) ให้สูงขึ้น อนุมูลอิสระเหล่านี้จะออกซิไดซ์สารชีวโมเลกุลภายในเซลล์และยังทำลายดีเอนเอ (De Vos *et al.*, 1992) ROS จะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารประกอบฟลาโวนอยด์เพื่อใช้ป้องกันตัวเอง เช่น phosphate dehydrogenase (G6PDH), shikimate dehydrogenase (SKDH), phenylalanine ammonia lyase (PAL) และ cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) จึงทำให้ปริมาณของฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้น

4.3.4 ผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารที่สามารถจับอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวของอนุมูลอิสระ ทำให้ไม่สามารถก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (Gutteridge and Halliwell, 1994) ในการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอาศัยวิธีการตรวจ 2 แนวทาง แนวทางที่ 1 คือ การวัดความสามารถในการจับสารอนุมูลอิสระ (scavenging method) ซึ่งใช้วิธี DPPH assay เป็นวิธีทดสอบ และแนวทางที่ 2 คือ การวัดความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์สารต้านอนุมูลอิสระ (reducing method) ซึ่งใช้วิธี FRAP เป็นวิธีทดสอบ

4.3.4.1 DPPH assay พบว่าการชักนำด้วย Chitosan+$CuCl_2$+SA ทำให้กวาวเครือขาวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดจากการทดลองใน growth chamber ในโรงเรือน และในแปลง

ทดลองโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2,482 1,049 และ 1,025 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กวาวเครือขาวที่ปลูกในโรงเรือน และในแปลงทดลอง มีแนวโน้มของการมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้นเมื่อปรียบเทียบกับการปลูกใน growth chamber (ตารางที่ 4.6)

ตารางที่ 4.5 ปริมาณฟลาโวนอยด์ในหัวกวาวเครือขาวหลังถูกชักนำในสภาพการปลูกแตกต่างกัน

ทรีตเมนต์	ปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ (ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง)		
	growth chamber	โรงเรือน	แปลงทดลอง
Water (control)	1.87 a	2.19 bc	2.80
SA	2.38 bc	1.65 a	2.46
$CuCl_2$	2.23 b	2.27 bc	2.92
$CuCl_2$+SA	2.91 d	2.12 bc	3.73
Chitosan	2.34 bc	1.94 ab	3.77
Chitosan+SA	2.57 c	2.50 c	3.07
Chitosan+$CuCl_2$	2.14 ab	2.09 bc	3.06
Chitosan+$CuCl_2$ + SA	3.09 d	2.16 bc	2.73
CV (เปอร์เซ็นต์)	6.85	9.81	19.2

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ถูกกำกับด้วยตัวอักษรเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 4.6 ค่า IC_{50} ของกวาวเครือขาวหลังการชักนำในสภาพการปลูกที่แตกต่างกัน

ทรีตเมนต์	IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)		
	growth chamber	โรงเรือน	แปลงทดลอง
Water (control)	3,042 h	1,889 a	1,167 a
SA	2,563 b	1,600 b	1,480 abc
$CuCl_2$	2,900 f	1,810 a	1,746 c
$CuCl_2$+SA	2,612 d	1,630 b	1,635 bc
Chitosan	2,915 g	1,820 a	1,218 ab
Chitosan+SA	2,596 c	1,621 b	1,629 bc
Chitosan+$CuCl_2$	2,893 e	1,183 c	1,187 a
Chitosan+$CuCl_2$ + SA	2,482 a	1,049 c	1,025 a

ตารางที่ 4.6 ค่า IC_{50} ของกวาวเครือขาวหลังการชักนำในสภาพการปลูกที่แตกต่างกัน (ต่อ)

ทรีตเมนต์	IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)		
	growth chamber	โรงเรือน	แปลงทดลอง
CV (เปอร์เซ็นต์)	2.57	2.32	14.2

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ถูกกำกับด้วยตัวอักษรเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

4.3.4.2 FRAP กวาวเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber ปลูกในโรงเรือนและในแปลงทดลองได้ผลสอดคล้องกัน เมื่อชักนำด้วย Chitosan+$CuCl_2$+SA ทำให้กวาวเครือขาวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ FRAP value = 4.55 4.73 และ 6.69 ไมโครโมลของ Fe^{2+}/กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7)

การชักนำด้วย Chitosan+$CuCl_2$+SA สามารถเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้สูงที่สุดทั้งจากการตรวจวัดด้วย DPPH และ FRAP สอดคล้องกับการทดลองข้างต้นที่พบว่าทรีตเมนต์ดังกล่าวสามารถชักนำสารฟีนอลิค และสารฟลาโวนอยด์ ให้สูงที่สุดได้ เช่นกัน แสดงว่าสารทั้งสองกลุ่มเป็นสารที่มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหัวกวาวเครือขาวด้วย สอดคล้องกับ Ding *et al.* (2002) ที่รายงานว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีสหสัมพันธ์ในเชิงบวกกับปริมาณของฟีนอลิค และปริมาณของฟลาโวนอยด์ ปวีณา ข่วงทิพย์ (2546) และ นวลศรี รักอริยะธรรมและอัญชนา เจนวิถีสุข (2545) รายงานว่าสารต้านอนุมูลอิสระในพืชที่สำคัญได้แก่ สารประกอบฟีนอลิค และฟลาโวนอยด์ ดังนั้นการพบว่า Chitosan+$CuCl_2$+SA สามารถชักนำให้มีสารประกอบฟีนอลิคและสารประกอบฟลาโว-นอยด์สูงขึ้นจากการทดลองในข้างต้น จึงทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจวัดด้วยทั้งสองเพิ่มขึ้นในทิศทางเดียวกัน

ตารางที่ 4.7 FRAP value ของกวาวเครือขาวหลังการชักนำในสภาพการปลูกที่แตกต่างกัน

ทรีตเมนต์	FRAP value (ไมโครโมลของ Fe^{2+}/สารสกัด 1 กรัม)		
	growth chamber	โรงเรือน	แปลงทดลอง
Water (control)	24.7 b	30.4 a	42.9 a
SA	37.3 c	32.2 ab	44.9 a
$CuCl_2$	18.5 a	28.6 a	40.4 a
$CuCl_2$+SA	20.6 a	29.2 a	40.5 a

ตารางที่ 4.7 FRAP value ของกวาวเครือขาวหลังการชักนำในสภาพการปลูกที่แตกต่างกัน (ต่อ)

ทรีตเมนต์	FRAP value (ไมโครโมลของ Fe^{2+}/สารสกัด 1 กรัม)		
	growth chamber	โรงเรือน	แปลงทดลอง
Chitosan	28.1 b	29.3 a	41.3 a
Chitosan+SA	18.0 a	29.9 a	41.9 a
Chitosan+$CuCl_2$	38.7 c	40.3 bc	57.3 ab
Chitosan+$CuCl_2$ + SA	45.5 d	47.3 c	66.9 b
CV (เปอร์เซ็นต์)	7.22	12.31	17.26

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ถูกกำกับด้วยตัวอักษรเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

Wang and Lin (2000) กับ Prior *et al.* (1998) รายงานว่าสารชักนำที่ต่างกันมีผลกระตุ้นให้เกิดสารชนิดที่แตกต่างกัน ทำให้พืชที่ถูกชักนำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่างกัน Cherdshewasart *et al.* (2008) พบว่า พิวรารินมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงไม่แตกต่างจาก œ-tocopherol ซึ่งใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน จากการทดลองพบว่า Chitosan+$CuCl_2$ ที่สามารถชักนำให้กวาวเครือขาวสร้างพิวรารินสูงที่สุด แต่ยังชักนำฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหัวกวาวเครือขาวได้น้อยกว่าการชักนำด้วย Chitosan+$CuCl_2$+SA แสดงว่าพิวรารินไม่ใช่สารชนิดเดียวที่มีผลต่อฤทธ์ต้านอนุมูลอิสระในหัวกวาวเครือขาว การเพิ่มกรดซาลิไซลิกเข้าไปอาจจะมีผลในทางส่งเสริมให้มีการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระชนิดใหม่ ๆ ขึ้นมาได้อีก สอดคล้องกับการพบว่ามี peak intensity ของสารอื่น ๆ ที่ปรากฏในโครมาโตแกรมร่วมกับพิวรารินและจีนิสทีอิน พบว่าการเปลี่ยนแปลงของ peak intensity ของสารในตำแหน่ง retention time ในนาทีที่ 13.2 18.3 และนาทีที่ 20.1 การชักนำด้วยทรีตเมนต์ต่าง ๆ พบว่า ratio of peak intensity ที่ตำแหน่ง 13.2 มีการเปลี่ยนแปลงมากกว่าตำแหน่ง 18.3 และ 20.1 และพบว่าการชักนำด้วย Chitosan+$CuCl_2$+SA มีค่าสัดส่วนของ ratio of peak intensity ที่ตำแหน่ง 13.2 สูงที่สุด สอดคล้องกับการชักนำให้กวาวเครือขาวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดด้วย ดังนั้นสารในตำแหน่งดังกล่าวอาจเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่ได้จากการชักนำ พบว่ามีอัตราส่วนสูงกว่าที่พบในสารชักนำทุกทรีตเมนต์ (ตารางผนวกที่ 7) สอดคล้องกับการมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดทั้งจากการตรวจวัดด้วยวิธี DPPH และวิธี FRAP ดังนั้นสารในตำแหน่งดังกล่าวอาจเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี ผลที่ไม่สอดคล้องในทรีตเมนต์ Chitosan อาจเกิดจากค่าในแปลงที่สูงเนื่องจากเป็นการหาค่าเฉลี่ยจากทั้งสามสภาพการทดลอง ควรศึกษาถึงชนิดและความสามารถใน

การต้านอนุมูลอิสระต่อไป ส่วนสารในตำแหน่งที่ 18.3 และ 20.1 มีการเปลี่ยนแปลงของ ratio of peak intensity น้อยอาจไม่มีผลจากทรีตเมนต์ที่ใช้ชักนำ

4.3.5 ผลของสารชักนำต่อการเจริญเติบโตของกวาวเครือขาว

ผลของสารชักนำต่อการเจริญเติบโตของกวาวเครือขาวทั้งสามสภาพแวดล้อมควรให้ผลที่สอดคล้องกัน เช่น มีการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของตัวแปรที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตที่เหมือนกันเมื่อชักนำด้วยทรีตเมนต์เดียวกัน ผลที่ไม่สอดคล้องกันอาจหมายถึงมีอิทธิพลของปัจจัยอื่นมาเกี่ยวข้อง แล้วมีผลมากกว่าสารชักนำ หรือ สารชักนำบางทรีตเมนต์อาจได้รับอิทธิพลจากปัจจัยอื่นแล้วมีผลส่งเสริมหรือลดบทบาทของสารชักนำ ผลการทดลองสามารถบอกถึงอิทธิของสารชักนำเมื่อใช้ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะการผลการทดลองในแปลงปลูกจะช่วยยืนยันถึงผลของสารชักนำว่าสามารถแนะนำให้เกษตรกรใช้ได้หรือไม่

4.3.5.1 ผลของสารชักนำต่อน้ำหนักสด/น้ำหนักแห้งของหัวกวาวเครือขาวไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งในการชักนำใน growth chamber และในโรงเรือน แต่พบความแตกต่างของการชักนำในแปลงทดลอง โดยพบว่าทรีตเมนต์ที่มีไคโตซานร่วมด้วยทุกทรีตเมนต์จะมีอัตราส่วนของน้ำหนักสด/น้ำหนักแห้งสูง (ตารางที่ 4.8) สอดคล้องกับการทดลองของ Boonlertnirun *et al.* (2008) ที่ใช้เมล็ดข้าวคลุกกับสารละลายไคโตซานความเข้ม 80 มิลลิกรัม/ลิตร ตามด้วยการราดลงดินอีก 4 ครั้ง ในหนึ่งฤดูการเพาะปลูกพบว่าสามารถเพิ่มการเจริญเติบโตและผลผลิตได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าไคโตซานมีส่วนช่วยให้กวาวเครือขาวเจริญเติบโตดีซึ่งอาจจะเกิดจากไคโตซานในดินเป็นแหล่งของคาร์บอนสำหรับจุลินทรีย์ในดิน เมื่อจุลินทรีย์ในดินเจริญเติบโตดีก็จะช่วยเปลี่ยนสารอินทรีย์ให้เป็นสารอนินทรีย์ให้อยู่ในรูปที่รากพืชสามารถดูดซึมไปใช้ประโยชน์ได้ดีขึ้น จะเห็นได้จากการทดลองใส่ไคโตซานในดินโดยที่ไม่ใส่ปุ๋ยเคมี ทำให้มีการเพิ่มของจุลินทรีย์ในดินได้มากขึ้นและทำให้การเจริญเติบโตของพืชดีขึ้นด้วย (Bolto *et al.*, 2004; Somashekar and Richard, 1996) ในแปลงทดลองมีความแตกต่างของการเจริญเติบโตของต้นที่ไม่ต่างกันมาก แต่ในส่วนที่อยู่ใต้ดินมีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด เช่นขนาดของหัว ที่ต่างกัน นอกจากไคโตซานแล้ว จึงน่าจะมีอิทธิพลของดิน และจุลินทรีย์ในดิน ต่อการเจริญเติบโตด้วย

ตารางที่ 4.8 ผลของสารชักนำต่อน้ำหนักสด/น้ำหนักแห้งของกวาวเครือขาว

ทรีตเมนต์	growth chamber	โรงเรือน	แปลงทดลอง
Water (control)	10.6 : 1	16.8 : 1	25.5 : 1 a
SA	12.2 : 1	18.1 : 1	30.3 : 1 bc
$CuCl_2$	10.4 : 1	13.8 : 1	23.5 : 1 a
$CuCl_2$+SA	12.4 : 1	18.2 : 1	27.1 : 1 ab
Chitosan	12.7 : 1	18.6 : 1	32.2 : 1 c
Chitosan+SA	13.7 : 1	19.1 : 1	32.7 : 1 c
Chitosan+$CuCl_2$	11.1 : 1	17.8 : 1	30.5 : 1 bc
Chitosan+$CuCl_2$ + SA	12.1 : 1	18.5 : 1	32.3 : 1 c
CV (เปอร์เซ็นต์)	6.95 : 1	14.6 : 1	19.8

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ถูกกำกับด้วยตัวอักษรเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

4.3.5.2 ผลต่อปริมาณสารสกัดหยาบ สารสกัดหยาบเป็นเหมือนผลผลิตของพืชสมุนไพร มีสมุนไพรหลายชนิดรวมถึงกวาวเครือขาว ที่ซื้อขายในรูปของสารสกัดหยาบแทนการใช้ตัวอย่างแห้ง เนื่องจากจะช่วยลดขั้นตอนในกระบวนการผลิต การขนส่งและการเก็บรักษา ผลที่แตกต่างกันอาจเกิดจากสารชักนำน้อยกว่าเกิดจากปัจจัยอื่น ๆ เนื่องจากไม่พบความแตกต่างของการชักนำใน growth chamber แต่พบความแตกต่างทางสถิติของหัวที่ปลูกในโรงเรือนและในแปลงปลูก (ตารางที่ 4.9) น่าจะเกิดจากอิทธิพลของสภาพแวดล้อมอื่น ๆ มาเกี่ยวข้องด้วย ทรีตเมนต์ส่วนใหญ่แสดงผลที่สอดคล้องกันเมื่อเปลี่ยนสภาพแวดล้อม เช่น การชักนำด้วยไคโตซานให้ค่าที่สูงกว่าการชักนำด้วยทรีตเมนต์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของทั้งสองสภาพแวดล้อม แสดงว่ามีปัจจัยของสภาพแวดล้อมมีผลในทางเสริมการชักนำด้วยไคโตซาน ไม่เคยมีรายงานที่แสดงว่าไคโตซานมีความเกี่ยวข้องกับปริมาณสารสกัดหยาบในพืช แต่มีรายงานว่าสามารถเพิ่มอัตราการสังเคราะห์แสงในพืชได้ (Khan *et al.*, 2002) จึงน่าจะมีผลทางอ้อมต่อสารสกัดหยาบ เนื่องจากการสังเคราะห์จะสร้างสารปฐมภูมิ เช่น สารไขมัน โปรตีน หรือแป้ง ในพืช สารเหล่าเปลี่ยนเป็นสารทุติยภูมิอย่างสารประกอบฟีนอลิค สารฟลาโวนอยด์ การพบปริมาณสารสกัดหยาบที่สูงกว่าอาจคาดหวังได้ว่าจะมีสารทุติยภูมิชนิดดังกล่าวมากขึ้นได้

ตารางที่ 4.9 ผลของสารชักนำต่อสารสกัดหยาบ (มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง)

ทรีตเมนต์	growth chamber	โรงเรือน	แปลงทดลอง
Water (control)	32.8	42.0 bcd	79.8 cd
SA	29.4	34.1 ab	53.7 a
$CuCl_2$	31.1	32.0 a	64.7 b
$CuCl_2$+SA	31.9	42.6 bcd	71.7 bc
Chitosan	35.3	49.7 d	84.2 d
Chitosan+SA	31.5	42.3 bcd	70.2 bc
Chitosan+$CuCl_2$	33.6	47.7 cd	79.7 cd
Chitosan+$CuCl_2$ + SA	30.4	38.6 abc	72.1 bc
CV (เปอร์เซ็นต์)	7.11	10.0	17.1

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ถูกกำกับด้วยตัวอักษรเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

4.3.5.3 ผลต่ออัตราการสังเคราะห์แสงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของต้นที่ปลูกใน ในแปลงทดลอง (ตารางที่ 4.10) โดยการชักนำด้วย $CuCl_2$+SA และ chitosan+SA ทำให้การสังเคราะห์แสงสูงที่สุด ขณะที่การชักนำด้วย ไคโตซาน หรือ คอปเปอร์คลอไรด์ อย่างเดียวมีอัตราการสังเคราะห์แสงต่ำ โดยเฉพาะการใช้ กรดซาลิไซลิก มีอัตราการสังเคราะห์แสงต่ำสุด แต่การใช้ร่วมไคโตซาน หรือ คอปเปอร์คลอไรด์ นั้นจะมีผลส่งเสริมให้เกิดการสังเคราะห์แสงสูงขึ้น ขณะที่การใช้สารทั้งสามชนิดทำให้อัตราการสังเคราะห์แสงสูงกว่าการใช้สารชักนำแต่ละตัวเพียงเล็กน้อย ผลที่ได้อาจถึงสารชักนำที่ใช้ร่วมกันเพิ่มการสังเคราะห์แสงได้ดีขึ้น Khan *et al.* (2003) พบว่าไคโตซานและกรดซาลิไซลิกเพิ่มอัตราการสังเคราะห์แสงในถั่วเหลือง Wang and Li (2007) พบว่าการฉีดพ่นกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาห์/ลิตร ที่ให้แก่ถั่วเหลือง ทำให้อัตราการสังเคราะห์แสงสุทธิ และค่า F_v/F_m (chlorophyll a fluorescence parameter) มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม กลไกการชักนำยังไม่เคยมีผู้ศึกษามาก่อน เนื่องจากการทดลองในโรงเรือน และ growth chamber ได้ผลที่ไม่แตกต่างทางสถิติ จึงไม่สอดคล้องกับผลการทดลองในแปลงปลูก ผลจากแปลงทดลองอาจเกิดจากอิทธิพลของปัจจัยอื่นได้ สมบุญ เตชภิญญาวัฒน์ (2538) ปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์แสงเช่น 1) ความเข้มของแสง 2) อุณหภูมิ 3) อายุของใบ 4) ปริมาณน้ำที่พืชได้รับ และ 5) ธาตุอาหาร แต่จากการทดลองในแปลง ปัจจัยที่ควบคุมไม่ได้และน่าจะมีผลมากที่สุดคือ 1)ความเข้มแสงซึ่งในแปลงมีสูงกว่าในโรงเรือนที่มีหลังคาพลาสติกคลุมและใน growth chamber ถ้าความ

เข้มแสงมากจะเพิ่มอัตราการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์สุทธิให้สูงขึ้นจึงมีผลต่อการสังเคราะห์แสง 2) อุณหภูมิ มีอิทธิพลต่อการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ ถ้าอุณหภูมิเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์จะทำให้พืชมีอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงสูงขึ้น 3) อายุของใบ ในพืชที่อ่อนหรือแก่เกินไปจะสังเคราะห์ด้วยแสงต่ำกว่าใบพืชที่เจริญเติบโตเต็มที่เพราะว่าใบที่อ่อนเกินไปการพัฒนาของคลอโรพลาสต์ยังไม่เจริญเต็มที่ส่วนใบที่แก่เกินไปจะมีการสลายตัวของกรานุมและคลอโรฟิลล์ 4) ธาตุอาหาร ธาตุแมกนีเซียมและไนโตรเจนเป็นธาตุสำคัญในองค์ประกอบของคลอโรฟิลล์ ธาตุเหล็กจำเป็นต่อการสร้างคลอโรฟิลล์และเป็นองค์ประกอบของไซโทโครมซึ่งเป็นตัวถ่ายอิเล็กตรอนส่วนธาตุแมงกานีส และคลอรีนจำเป็นต่อกระบวนการแตกตัวของน้ำในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ด้วยแสง การขาดธาตุอาหารเหล่านี้ทำให้อัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงลดลง ในแปลงทดลองจะมีความแปรปรวนของชนิดและปริมาณมากกว่าจึงอาจส่งผลให้เกิดความแตกต่างได้

ตารางที่ 4.10 ผลของสารชักนำต่อการสังเคราะห์แสง (มิลลิโมลาห์/ตารางเซนติเมตร.วินาที)

ทรีตเมนต์	growth chamber	โรงเรือน	แปลงทดลอง
Water (control)	20.2	22.2	23.9 b
SA	20.5	20.2	20.0 a
$CuCl_2$	21.1	20.2	21.1 ab
$CuCl_2$+SA	19.0	23.0	26.6 c
Chitosan	22.1	20.0	23.5 b
Chitosan+SA	23.6	23.1	26.5 c
Chitosan+$CuCl_2$	21.9	23.2	20.5 a
Chitosan+$CuCl_2$ + SA	21.7	21.5	21.5 ab
CV (เปอร์เซ็นต์)	5.89	7.81	6.22

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ถูกกำกับด้วยตัวอักษรเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

4.4 สรุปผลการวิจัย

การฉีดพ่นด้วย Chitosan+$CuCl_2$ ทำให้กวาวเครือขาวสร้างพิวรารินสูงที่สุด ทั้งการทดลองใน growth chamber และในโรงเรือน และยังทำให้กวาวเครือขาวสร้างจีนิสทีอินและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดด้วย การฉีดพ่นด้วย Chitosan+$CuCl_2$+SA ทำให้กวาวเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber และในโรงเรือน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณของสารฟีนอลิค และสารฟลาโว

นอยด์สูงที่สุดด้วย และการชักนำด้วยทรีตเมนต์ต่าง ๆ ไม่มีผลเสียหายต่อการเจริญเติบโตของกวาวเครือขาวในทุกสภาพแวดล้อมที่ทำการทดลอง ที่สำคัญพบว่าการฉีดพ่นด้วย Chitosan+SA ทำให้กวาวเครือขาวมีมีอัตราการสังเคราะห์แสง สารที่สกัดได้ และอัตราส่วนของน้ำหนักสด/น้ำหนักแห้งสูงขึ้นด้วย

4.5 รายการอ้างอิง

เฉลิมพงษ์ แสนจุ้ม และไชยวัฒน์ ไชยสุต. (2547). **การประเมินฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดกระชายดำและน้ำหมักชีวภาพที่สกัดจากกระชายดำ** [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.irpus. org/project_file/2547_2006-08-23_R10003-47.pdf.

นวลศรี รักอริยะธรรม และอัญชนา เจนวิถีสุข. (2545). **แอนติออกซิแดนท์: สารต้านมะเร็งในผักสมุนไพรไทย.** เชียงใหม่: นพบุรี

ประสาร ฉลาดคิด. (2546). อิทธิพลของสภาพแวดล้อมและปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโต การออกดอก การติดฝักและเมล็ด และการสะสมสาร daidzein และ genistein ในหัวกวาวเครือขาว [*Pueraria candollei* Grah. var. *mirifica* (Airy Shaw et Suvatabandhu) Niyomdham] **วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.**

ปวีณา ข่วงทิพย์. (2546). ฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระและต้านออกซิเดชันของพืชผักพื้นบ้าน **วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.**

วิโรจน์ เชาว์วิเศษ. (2550). ผลของสังกะสีต่อการสะสม puerarin ในรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาว *[Pueraria candollei* grah. var. *mirifica* (Airy shaw et.suvatabandhu) niyomdham] และผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อการคลายตัวของหลอดเลือดหนูขาว *(Rattus norvegicus*) **วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.**

สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์. (2548). **ชีววิทยาพืช.** กรุงเทพฯ: จามจุรีโปรดักท์. 297 หน้า.

Adlercreutz, H. (1995). Phytoestrogens epidemiology and a possible role in cancer protection, **Environ Health Perspect.** 103: 103-112.

Al-Tawaha, A., Seguin, P., Smith, D.L. and Beaulieu, C. (2005). Biotic elicitors as a mean of increasing isoflavone concentration of soybean seeds. **Annu Appl Biol.** 146: 303-310.

Ali, M.B., Hahn, E.J. and Paek, K.Y. (2007). Methyl jasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in *Panax ginseng* bioreactor root suspension cultures. **Molecules.** 12; 607-621.

Ali, M.B., Khatun, S., Hahn, E.J. and Paek, K.Y. (2006). Enhancement of phenylpropanoid enzymes and lignin in *Phalaenopsis* orchid and their influence on plant acclimatisation at different levels of photosynthetic photon flux. **Plant Grow Regul.** 49: 137-146.

Andrew, D.P., Sarah, A.T. and Robert, E. (1994). The effect of heavy metal on isoflavone metabolism in alfafa (*Medicago sativa*). **Plant Physiol.** 106: 195-202.

Anthony, M.S., Clarkson, T.B., and Hughes, C.L. (1996). Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. **J Nutr.** 126(1): 43-50.

Benzie, I. and Strain, J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Meth Enzymol.** 299: 15-27.

Bolto, B., Dixon, D. and Eldridge, R. (2004). Ion exchange for the removal of natural organic matter. **Reactive and Functional Polymers**. 60: 171-182.

Boonlertnirun, S., Boonruang, C. and Suvanasara, R. (2008). Application of chitosan in rice production. **J Miner Met Mater Soc.** 8: 47-52.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. (1995). Use of a free radicals method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm Wiss Technol.** 28: 25-30.

Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M. and Chern, J.C. (2002). Estimation of total flavonoids content in propolis by two complementary colorimatric method. **J Food Drug Anal.** 10: 178-182.

Cherdshewasart, W. and Sutjit, W. (2008). Correlation of antioxidant activity and major isoflavonoid contents of the phytoestrogen-rich *Pueraria mirifica* and *Pueraria lobata* tubers. **Phytomedicine.** 15: 38-43.

De Vos, R.C.H., Vonk, M.J., Vooijs, R. and Schat, H. (1992). Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene cucubalus***. Plant Physiol.** 98: 853-858.

Ding, C.K., Wang, C.Y., Gross, K.C. and Smith, D.L. (2002). Jasmonate and salicylate induce the expression of pathogenesis-related-proteins genes and increase resistance to chilling injury in tomato fruit. **Planta.** 214: 895-901.

Fahrendorf, T., Ni, W., Shorroosh, B.S. and Dixon, R.A. (1995). Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) XIX. Transcriptional activation of oxidative pentose phosphate pathway genes at the onset of the isoflavanoid phytoalexin response. **Plant mol Biol.** 28: 885-900.

Geibel, M., Geiger, H. amd Treutter, D. (1990). Tectochrysin 5- and genistein 5-glucosides from the bark of *Prunus cerasus*. **Phyotchemistry.** 29: 1351-1353.

Gutteridge, J.M.C. and Halliwell, B. (1994). Free radicals and antioxidants in aging and disease: fact or fantasy. In **Antioxidants in nutrition, health, and disease**. pp. 111-135. Oxford, UK: Oxford University Press.

Hakamatsuka, T., Ebizuka. Y., and Sankawa, U. (1991). Induce isoflavonoid from copper chloride treat stems of *Pueraria lobata.* **Phytochemistry.** 30(5): 1481-1482.

Harbone, J.B. (1998). **Phytochemical methods**: a guide to modern techniques of plant analysis. 3.ed. London: Chapman & Hall, 302p.

Hubert, G. and Ragai, K.I. (1997). Effects of various elicitors on the accumulation and secretion of isoflavonoids in white lupin. Phytochemistry. 44: 1463-1467.

Inui, H., Yamaguchi, Y. and Hirano, S. (1997). Elicitor actions of nacetyl-chitooligosaccharides and laminari-oligosaccharides for chitinase and L-phenylalanine ammonia-lyase induction in rice suspension culture. **Biosci Biotechnol Biochem.** 61: 975-978.

Khan, W.M., Prithiviraj, B. and Smith, D.L. (2002). Effect of foliar application of chitin and chitosan oligosaccharides on photosynthesis of maize and soybean. **Photosynthetica**. 40: 621-624.

Kneer, R., Poulev, A., Olesinski, A. and Raskin, I. (1999). Characterization of the elicitor-induced biosynthesis and secretion of genistein from roots of *Lupinus luteus* L. **J Exp Bot.** 50: 1553-1559.

Levesque, R. and SPSS, Inc. (2006). **SPSS programming and data management**, 3rd edition. SPSS institute. USA.

Mithöfer, A., Lottspeich, F. and Ebel, J. (1996). One-step purification of the ß-glucan elicitor-binding protein from soybean (*Glycine max* L.) roots and characterization of an anti-peptide antiserum. **FEBS Lett.** 381: 203-207.

Olsson, L.C., Veit, M., Weissenbock, C. and Bornman, J.F. (1998). Differential flavonoid response to enhanced UV-B radiation in *Brassica napus*. **Phytochemistry**. 49: 1021-1028.

Prior, R.L., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., O'Brien, C, Lischner, N, Ehlenfeldt, M., Kalt, W., Krewer, G. and Mainland, C.M. (1998). Antioxidant capacity as influenced by total phenolics and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. **J Agric Food Chem.** 46(7): 2686-2693.

Schutzendubel, A. and Polle, A. (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. **J Exp Bot.** 53: 1351-1365.

Singleton, V.L. and Rossi Jr., J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **Am J Enol Viticult**. 16: 144-158.

Stafford, H.A. (1997). Roles of flavonoids in symbiotic and defense functions in legume roots. **Bot Rev.** 63: 27-39.

Somashekar, D. and Richard, J. (1996). Chitosanaseproperties and applications: A Review. **Bioresour Technol.** 55: 35-45.

Tagashira, M. and Ohtake, Y. (1988). A new antioxidative 1,3-benzodioxole from *Melissa officinalis*. **Planta Medica.** 64: 555–558.

Wang, C.J., Wang, J.M., Lin, W.L., Chu, C.Y., Chu, F.P. and Tseng, T.W. (2005). Protective effect of hibiscus anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats. **Food Chem Toxicol.** 38: 411-416.

Wang, L.J. and Li, S.H. (2006). Salicylic acid-induced heat or cold tolerance in relation to Ca^{2+} homeostasis and antioxidant systems in young grape plants. **Plant Sci**. 170: 685-694.

Wang, S.Y. and Lin, H.S. (2000). Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry and strawberry varies with cultivar and developmental stage. **J Agric Food Chem.** 48: 140-146.

Wang, H.J. and Murhy, P.A. (1994). Isoflavone composition of american and japanese soybean in Iowa: Effects of variety, crop year, and location. **J Agric Food Chem.** 42: 1674-1677.

Yu, O., Jung, W., Shi, J., Croes, R.A., Farder, G.M., MaGonigle, B. and Odell, J.T. (2000). Production of the isoflavones genistein and daidzein in non - legume dicot and monocot tissues. **Plant Physiol.** 124: 781-793.

Zhang, Y., Tong, T.S., Cunnick, J.E., Murphy, P.A. and Hendrich, S. (1999). Daidzein and genistein glucuronides in vitro are weakly estrogenic and activate human natural killer cells at nutritionally relevant concentrations. **J Nutr**. 129: 399-405.

บทที่ 5
สารสกัดกวาวเครือขาวกับการลดระดับน้ำตาลในเลือดและผลกระทบต่อเนื้อเยื่อตับอ่อนและตับของหนูแรทที่เป็นเบาหวาน

บทคัดย่อ

พิวรารินมีคุณสมบัติลดระดับน้ำตาลในเลือด เมื่อกวาวเครือขาวมีพิวรารินสะสมอยู่ในปริมาณที่สูงกว่าพืชชนิดอื่น อาจมีผลลดระดับน้ำตาลในเลือดหรือมีประโยชน์ต่อการรักษาโรคเบาหวานได้ จึงศึกษาถึงฤทธิ์สารสกัดจากกวาวเครือขาวต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทพันธุ์วิสตาร์ เพศผู้ อายุ 10 สัปดาห์ น้ำหนัก 350-400 กรัม นำกวาวเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber และชักนำด้วยไคโตซานร่วมกับคอปเปอร์คลอไรด์ จากการทดลองในบทที่ 4 มาสกัดด้วยเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ และป้อนหนูปกติและหนูเบาหวาน เพื่อเปรียบเทียบผลการลดระดับน้ำตาลในเลือดกับกลุ่มควบคุม พบว่าสารสกัดกวาวเครือขาวไม่มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทในภาวะที่มีระดับน้ำตาลสูงเฉียบพลันทั้งในหนูปกติและหนูเบาหวาน แต่มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 30 วัน โดยในวันที่ 14 ของการป้อนสารสกัดสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ 28.95 เปอร์เซ็นต์ และวันที่ 21 ลดได้ 26.37 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยังพบว่าสารสกัดกวาวเครือขาวไม่มีผลก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่อเนื้อเยื่อตับอ่อนและตับของหนูเบาหวาน

5.1 บทนำ

กวาวเครือขาวมีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ [*Pueraria candollei* Grah. var. *mirifica* (Airy Shaw et. Suvatabandhu) Niyomdham] (ชวลิต นิยมธรรม, 2538) สารออกฤทธิ์เป็นกลุ่มไอโซฟลาโว-นอยด์ จึงมีคุณสมบัติเป็นไฟโตเอสโตรเจน (phytoestrogen) และออกฤทธิ์เช่นเดียวกับเอสโตรเจนในสัตว์ ไฟโตเอสโตรเจนมีฤทธิ์ต่อร่างกายหลายอย่าง เช่น กระตุ้นภูมิต้านทาน ต้านอนุมูลอิสระ ทำหน้าที่คล้ายฮอร์โมน (บรรจบ ชุณหสวัสดิกุล, 2543) พิวรารินเป็นสารประกอบไอโซฟลาโวนอยด์ที่พบมากที่สุดในกวาวเครือขาว พิวรารินมีสูตรโมเลกุลคือ $C_{21}H_{20}O_9$ มีและมีผลต่อการรักษาภาวะอ้วน (obesity) ภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance) ความดันโลหิตสูง ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติและภาวะหลอดเลือดแข็งตัว (Xu *et al.*, 2005) ช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูที่เป็นเบาหวาน (Chen *et al.*, 2004) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ต้านการเกิดโรคมะเร็ง (John *et al.*, 2004) และมีผลช่วยให้การไหลเวียนของเลือดดีขึ้น (Zhu *et al.*, 2004; Cervellati, 2002) จากคุณสมบัติดังกล่าวอาจทำให้กวาวเครือขาวมีประโยชน์ต่อการรักษาโรคเบาหวานได้ โรคเบาหวานมีลักษณะสำคัญคือ มีระดับน้ำตาลในเลือดสูงกว่าปกติ (hyperglycemia) และร่างกายไม่สามารถควบคุมให้อยู่ในเกณฑ์ปกติได้ (อรพรรณ มาตังคสมบัติ, 2544) คาดว่าจะมีจำนวนผู้ป่วยทั่วโลกในปี พ.ศ. 2568 ประมาณ 300 ล้านคน ซึ่งอัตราความชุกเพิ่มขึ้นเป็น 5.4 เปอร์เซ็นต์ ของประชากรโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งภูมิภาคเอเชีย และอัฟริกา ซึ่งอาจเพิ่มขึ้น 2-3 เท่า การเกิดโรคพบมากในผู้ที่มีอายุมากกว่า 40 ปี และส่วนใหญ่พบในผู้หญิงมากกว่าผู้ชาย (King *et al.* 1998) เบาหวานเป็นโรคที่ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ เป้าหมายของการรักษา คือ ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดให้อยู่ในเกณฑ์ปกติ ยาที่ใช้ลดระดับน้ำตาลในเลือด ได้แก่ อินซูลินและยาเม็ดลดระดับน้ำตาลในเลือด (oral hypoglycemic agent) แต่การใช้ยาลดน้ำตาลในเลือดก็ยังอาจมีผลข้างเคียงและมีข้อจำกัดของการใช้ยาอยู่มาก (อรพรรณ มาตังคสมบัติ, 2544) ทำให้การใช้สมุนไพรเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่สามารถนำมาใช้ในการควบคุมระดับน้ำตาลในกระแสเลือด

สมุนไพรไทยหลายชนิดมีรายงานการวิจัยสรรพคุณลดน้ำตาลในเลือด เช่น *Pandanus odorus* RIDL. (เตยหอม) (Peungvicha *et al.* 1996) และ *Tinospora crispa* (บอระเพ็ด) (Noor and Ashcroft, 1998) อย่างไรก็ตาม อาจยังมีสมุนไพรอีกหลายชนิดที่พบว่ามีสรรพคุณลดน้ำตาลในเลือดได้ จึงสนใจศึกษาสรรพคุณดังกล่าวของสารสกัดจากหัวกวาวเครือขาวที่สกัดด้วยเอทานอลในการระดับน้ำตาลในเลือดของหนูปกติและหนูที่เป็นเบาหวานรวมทั้งผลต่อเนื้อเยื่อของตับอ่อนและตับของหนูแรทอีกด้วย

5.2 วิธีทดลอง

5.2.1 การเตรียมการทดลอง

5.2.2.1 สารสกัดกวาวเครือขาว คัดเลือกกวาวเครือขาวจากทรีตเมนต์ที่ให้ปริมาณพิวรารินสูงที่สุด ที่ได้จากการชักนำด้วย Chitosan+$CuCl_2$ ในต้นกวาวเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber จากการทดลองในบทที่ 4 มาใช้ทำการทดลอง เตรียมสารสกัดกวาวเครือขาวด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ โดยนำหัวกวาวเครือขาวมาล้างทำความสะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วอบแห้งที่อุณหภูมิ 45ºC เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วบดให้เป็นผงละเอียด ชั่งผงกวาวเครือขาว 5 กรัม เติมเอทิลแอลกอฮอล์ 50 มิลลิลิตร (ต่อครั้ง) คนแบบต่อเนื่องนาน 48 ชั่วโมง กรองแยกกากไปสกัดซ้ำอีกครั้ง นำเอทิลแอลกอฮอล์ที่สกัดได้ทั้งหมดมาระเหยด้วย rotary evaporation และทำให้แห้งด้วยการอบที่อุณหภูมิ 40ºC เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (Singh *et al.* 2001) จะได้สารสกัดสีเหลืองอำพันโดยมี yield เท่ากับ 33.6 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง เก็บสารสกัดไว้ ที่ -20ºC

5.2.1.2 สัตว์ทดลอง หนูแรท (*Rattus norvegicus*) เพศผู้พันธุ์วิสตาร์ อายุ 4 สัปดาห์ น้ำหนัก 200-250 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติมหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม นำมาเลี้ยงที่ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง อาคารสัตว์ทดลองมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยเลี้ยงในกรงสเตนเลสที่มีขี้เลื่อยนึ่งฆ่าเชื้อเป็นวัสดุรองนอน ห้องควบคุมอุณหภูมิ 25±2ºC ให้ช่วงสว่างถึงมืด 12 ชั่วโมง ช่วงสว่างเริ่มต้นเมื่อ 6.00 นาฬิกา ให้น้ำประปาและอาหารเม็ดสำเร็จรูปตลอดเวลา เนื่องจากมีปัญหาด้านการเตรียมการทดลองจึงต้องเลี้ยงหนูทดลองต่อไปจนถึงอายุ 10 สัปดาห์และมีน้ำหนักตัว 350-400 กรัม จึงได้เริ่มทำการทดลอง

5.2.1.3 การเหนี่ยวนำให้หนูเป็นเบาหวาน แบ่งหนูส่วนหนึ่งเพื่อเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานโดย งดให้อาหารหนู 16 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเลือดโดยใช้เข็มเจาะบริเวรปลายหางหนูเพื่อตรวจระดับน้ำตาลในเลือดด้วยกลูโคมิเตอร์ (Agvantage®II, Roch Dianosis) ก่อนฉีดสเตรปโตโซโทซินในขนาด 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ที่ละลายในซิเตรตบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ก) เข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal, ip.) (Kamalakkannan and Stanely, 2006) ในวันที่ 7 หลังฉีดสเตรปโตโซโทซินให้หนูอดอาหาร 16 ชั่วโมง เก็บเลือดมาตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือด คัดเลือกหนูที่มีระดับน้ำตาลในเลือดมากกว่า 250 มิลลิกรัม/เดซิลิตร ซึ่งเป็นหนูที่เกิดภาวะเบาหวานไปทำการทดลอง (Sabu and Subburaju, 2002)

5.2.2 ฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดกวาวเครือขาวในหนูแรทที่มีภาวะกลูโคสในเลือดสูงเฉียบพลันโดยการทำ oral glucose tolerance test (OGTT)

5.2.2.1 ในหนูปกติ งดให้อาหารหนูก่อนทำการทดลอง 16 ชั่วโมง แบ่งหนูเป็น 5 กลุ่ม ๆ ละ 6 ตัว โดยแต่ละตัวต้องเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจระดับน้ำตาลในเลือดที่เวลา 0 นาที

(ก่อนป้อนสาร) แล้วจึงป้อนสารตามกลุ่มที่ถูกจัดไว้ ดังนี้ กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ป้อนน้ำกลั่นขนาด 2 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว กลุ่มที่ 2 ป้อนยาควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด กลัยเบนคลาไมด์ (daonil®) 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว กลุ่มที่ 3-4 ป้อนสารสกัดกวาวเครือขาวที่ 100 และ 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว หลังจากป้อนสารแต่ละกลุ่ม เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงป้อนกลูโคส 3 กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว (Pushparaj *et al.*, 2000) ในหนูทุกกลุ่มแล้วทำการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจระดับน้ำตาลในเลือดอีกครั้งหลังป้อนสารแต่ละกลุ่ม 60 120 180 และ 240 นาที การป้อนสารทำโดยนำกระบอกฉีดยาขนาด 3 มิลลิลิตร มาต่อด้วยเข็มป้อนสารลงกระเพาะ (gastric feeding needle) เบอร์ 18 จากนั้น ป้อนสารครั้งละไม่เกิน 1 มิลลิลิตร

5.2.2.2 ในหนูเบาหวาน คัดเลือกหนูที่เป็นเบาหวานเข้าทำการทดลองโดยทำการทดลองเหมือนในหนูปกติ แต่ใช้กลุ่มทดลองเพียง 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมทำการป้อนน้ำกลั่นขนาด 2 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว กลุ่มที่ 2 ทำการป้อน กลัยเบนคลาไมด์ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว กลุ่มที่ 3 ทำการป้อนสารสกัดกวาวเครือขาวที่ 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัวและเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจระดับน้ำตาลในเลือดอีกหลังป้อนสารแต่ละกลุ่ม 30 60 120 180 240 และ 300 นาที

5.2.3 ฤทธิ์ของสารสกัดกวาวเครือขาวในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทเบาหวานเมื่อให้สารสกัดวันละครั้งติดต่อกัน 30 วัน

แบ่งหนูที่เป็นเบาหวานออกเป็น 3 กลุ่ม ๆ ละ 6 ตัว โดยหนูกลุ่มที่ 1 คือ หนูปกติที่ป้อนน้ำกลั่นขนาด 1 มิลลิลิตร/ตัว/วัน กลุ่มที่ 2 คือ หนูเบาหวานที่ป้อนน้ำกลั่นขนาด 2 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน กลุ่มที่ 3 คือ หนูเบาหวานที่ป้อนกลัยเบนคลาไมด์ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน กลุ่มที่ 4 คือ หนูเบาหวานที่ป้อนกวาวเครือขาว 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน ทำการป้อนน้ำหรือสาร (ของแต่ละกลุ่ม) ผ่านท่อลงสู่กระเพาะโดยตรง โดยใช้ gastric feeding needle เป็นเวลา 30 วัน เก็บเลือดและตรวจระดับน้ำตาลในเลือดทุก 7 วัน แล้วเปรียบผลการลดระดับน้ำตาลในเลือดของแต่ละทรีตเมนต์กับกลุ่มควบคุมในแต่ละครั้งของการตรวจเลือด และในทรีตเมนต์เดียวกันเปรียบเทียบระดับน้ำตาลในเลือดของการตรวจแต่ละครั้งกับข้อมูลก่อนการป้อนสาร (วันที่ 0)

5.2.4 ผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อเนื้อเยื่อในตับอ่อน และตับของหนูแรทเบาหวานที่ได้รับสารสกัดเป็นเวลา 30 วัน

โดยใช้หนูจากการทดลองที่ 2 หลังป้อนสารครบ 30 วัน แล้วทำการฆ่าหนูด้วยเครื่องตัดคอ จากนั้นผ่าหน้าท้องแล้วตัดตับอ่อนและตับไปคงสภาพใน neutral phosphate buffer formalin

(ภาคผนวก ข) เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง จึงนำไปผ่านขั้นตอนจนได้เป็นสไลด์ถาวรของเนื้อเยื่อที่ย้อมด้วยสีฮีมาทอกซินและอีโอซิน (ภาคผนวก ค) เพื่อศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ (light microscope)

5.2.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลระดับน้ำตาลในเลือดด้วย one-way analysis of variance (ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่ม (ทรีตเมนต์) โดยใช้ duncan multiple rang test (DMRT) และเปรียบเทียบข้อมูลก่อนและหลังด้วย student's paired-t test ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS (Statistical Package for Social Science) version 14 (Levesque and SPSS Inc., 2006)

5.3 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

การหาระดับกลูโคสในเลือดของหนูแรทพันธุ์ วิสตาร์ พบว่ามีระดับกลูโคสปกติในเลือดอยู่ในช่วง 63.33±7.64 ถึง 71.33±11.02 มิลลิกรัม/เดซิลิตร (ตารางผนวกที่ 8) ซึ่งผลที่ได้ใกล้เคียงกับการทดลองของ ณัฐธัญ แสนบัวผัน (2548) พบว่าหนูแรทพันธุ์วิสตาร์ ขนาดน้ำหนักตัว 200-250 กรัมมีระดับกลูโคสปกติในเลือดอยู่ในช่วง 64.05-75.80 มิลลิกรัม/เดซิลิตร ส่วนหนูแรทพันธุ์ Spraque-Dawley ขนาดน้ำหนักตัว 250-300 กรัมมีระดับกลูโคสในเลือด 70.50±4.81 ถึง 85.00±3.11 (Singh *et al.*, 2001)

5.3.1 ฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดกวาวเครือขาวในหนูแรทที่มีภาวะกลูโคสในเลือดสูงเฉียบพลันโดยการทำ oral glucose tolerance test (OGTT)

5.3.1.1 หนูปกติ ผลของสารกลุ่มต่าง ๆ ต่อระดับน้ำตาลในเลือดของหนูปกติ โดยการทำ OGTT นั้น พบว่ากลัยเบนคลาไมด์ซึ่งเป็นยาเม็ดลดน้ำตาลในเลือดกลุ่ม sulfonylureas ที่ออกฤทธิ์ต่อเซลล์บีตาในตับอ่อน โดยกระตุ้นการหลั่งอินซูลินและยับยั้งการหลั่งกลูคากอน (Luzi and Pozza, 1997) ที่ใช้เป็นยามาตรฐาน (positive control) นั้น สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตั้งแต่นาทีที่ 120 นาที จนถึง 240 นาทีหลังรับยาเข้าไป สำหรับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดกวาวเครือขาวที่ความเข้มข้น 100 และ 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว นั้นไม่สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 5.1 และตารางผนวกที่ 9) แม้ว่าที่สารที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ที่ 120 นาที จะลดระดับน้ำตาลได้มากกว่ากลุ่มควบคุมถึง 11.23 เปอร์เซ็นต์ ก็ตาม (ตารางที่ 5.2) ผลที่ได้ไม่สอดคล้องกับการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชบางชนิด ซึ่งมีวิธีการทดสอบคล้ายกัน เช่น Mukherjee *et al.* (1972) พบว่า สารสกัด

ใบตำลึง (*Coccinia indica*) ขนาด 1 กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว สามารถต้านการเพิ่มระดับกลูโคสในเลือดของหนูปกติได้ร้อยละ 25 และ Bailey *et al.* (1985) พบว่า สารสกัดเนื้อมะระ (*Momordica charantia*) มีฤทธิ์ทนกลูโคสของหนูเมาส์ในชั่วโมงที่ 8 หลังได้รับสารสกัด ซึ่งแสดงว่าสารสกัดจากพืชหลายชนิดสามารถลดระดับกลูโคสในเลือดเมื่อถูกชักนำให้เกิดภาวะกลูโคสในเลือดสูงเฉียบพลันในหนูปกติได้ แต่ไม่พบผลดังกล่าวในการใช้สารสกัดกวาวเครือขาว

5.3.1.2 หนูเบาหวาน พบว่าผลของกลัยเบนคลาไมด์และสารสกัดกวาวเครือไม่สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลาเดียวกัน กรณีกลัยเบนคลาไมด์อาจเกิดจาก 2 สาเหตุ คือ 1) ขนาดที่ใช้อาจต่ำเกินไป เนื่องจากหนูเป็นเบาหวานบางตัวอาจมีอาการเบาหวานเป็นเบาหวานในขั้นรุนแรงจนยาไม่สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้สอดคล้องกับ Sharma *et al.* (1997) ที่รายงานว่ากลัยเบนคลาไมด์มีผลลดระดับน้ำตาลในหนูที่เป็นเบาหวานที่ไม่รุนแรงถึงปานกลาง เพราะในขั้นนี้เซลล์บีตาของตับอ่อนยังไม่ได้เสียหายทั้งหมดและยังสร้างอินซูลินได้ และ Ratzman *et al.* (1984) หนูที่เป็นเบาหวานขั้นรุนแรงนั้นเซลล์บีตาจะถูกทำลายเกือบทั้งหมดทำให้กลัยเบนคลาไมด์ไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ 2) หนูเบาหวานบางตัวอาจทุเลาจากการเป็นเบาหวานโดยมีการฟื้นคืน (recovery) ของไอเลตส์ออฟแลงเกอร์แฮนส์ได้ ทำให้ค่าเฉลี่ยระดับน้ำตาลในเลือดของกลุ่มลดต่ำลงมากกว่าความเป็นจริง ทำให้ผลการทดลองมีความคลาดเคลื่อนมาตรฐานสูงจนไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 5.3 และตารางผนวกที่ 10) แต่ถ้าพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การลดลงของระดับน้ำตาลในเลือดที่ลดลงจากกลุ่มควบคุมที่เวลาเดียวกันของทั้ง กลัยเบนคลาไมด์และสารสกัดกวาวเครือขาวพบว่ากลัยเบนคลาไมด์มีแนวโน้มลดระดับน้ำตาลในเลือดได้มากขึ้นตั้งแต่นาทีที่ 120 หลังได้รับสารและสามารถลดระดับน้ำตาลได้สูงที่สุดในเวลา 300 นาที คิดเป็น 36.09 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดกวาวเครือขาวให้ผลที่คล้ายกับผลของกลัยเบนคลาไมด์ คือมีแนวโน้มลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ตั้งแต่นาทีที่ 120 และสามารถลดระดับน้ำตาลได้มากที่สุดในเวลา 300 นาที คิดเป็น 36.94 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในเวลาเดียวกัน (ตารางที่ 5.4)

ตารางที่ 5.1 ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทปกติที่ได้รับสารกลุ่มต่าง ๆ ในภาวะการมีกูลโคสใน เลือดสูงในเลือดสูงเฉียบพลัน

การปฏิบัติ	ระดับน้ำตาลในเลือด (มิลลิกรัม/เดซิลิตร)				
	0 นาที	60 นาที	120 นาที	180 นาที	240 นาที
น้ำกลั่น	60.0±4.8	112.5±15.1	95.8±8.9	77.0±3.7	76.5±8.6
กลัยเบนคลาไมด์	63.5±3.9	105.0±5.7	62.0±11.3*	52.8±14.5*	47.5±13.5*
กวาวเครือขาว (100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว)	68.3±9.8	111.5±9.5	86.5±3.1	77.0±2.8	72.5±1.3
กวาวเครือขาว (500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว)	70.3±6.6	116.5±9.3	85.0±4.2	74.5±2.6	70.8±5.8

หมายเหตุ * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมในเวลาเดียวกัน

ตารางที่ 5.2 เปอร์เซ็นต์ระดับน้ำตาลในเลือดที่ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในเวลาเดียวกันในหนูปกติที่มีภาวะกลูโคสในเลือดสูงเฉียบพลัน

กลุ่มทดลอง	0 นาที	60 นาที	120 นาที	180 นาที	240 นาที
กลัยเบนคลาไมด์ (10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว)	-5.83	6.67	35.25	31.49	37.91
กวาวเครือขาว (100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว)	-3.75	0.89	9.66	0.00	5.23
กวาวเครือขาว (500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว)	-7.08	-3.56	11.23	3.25	7.52

ตารางที่ 5.3 ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทเบาหวานที่ได้รับสารกลุ่มต่าง ๆ ในภาวะที่มีระดับกลูโคสในเลือดสูงเฉียบพลัน

	กลุ่มทดลอง		
เวลา (นาที)	น้ำกลั่น	กลัยเบนคลาไมด์	กวาวเครือขาว
0	310.00±32.68	313.75±64.58	324.25±59.71
30	363.50±46.72	359.75±63.74	369.25±69.56
60	548.75±45.13	539.75±100.9	528.00±92.62
120	416.50±57.04	373.00±95.79	375.00±61.03
180	380.50±49.49	338.00±116.59	317.50±49.26
240	349.00±33.74	259.00±103.15	290.50±37.93
300	354.00±38.24	226.25±113.77	223.25±83.05

ตารางที่ 5.4 เปอร์เซ็นต์ระดับน้ำตาลในเลือดที่ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในเวลาเดียวกันในหนูเบาหวานในภาวะที่มีระดับกลูโคสในเลือดสูงเฉียบพลัน

	0 นาที	30 นาที	60 นาที	120 นาที	180 นาที	240 นาที	300 นาที
กลัยเบนคลาไมด์	-1.21	1.03	1.64	10.44	11.17	25.79	36.09
กวาวเครือขาว	-4.60	-1.58	3.78	9.96	16.56	16.76	36.94

5.3.2 ฤทธิ์ของสารสกัดกวาวเครือขาวในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทเบาหวานเมื่อให้สารสกัดวันละครั้งติดต่อกัน 30 วัน

กลัยเบนคลาไมด์สามารถลดระดับน้ำตาลได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในเวลาเดียวกันตั้งแต่วันที่ 7 จนถึงวันที่ 30 ของการทดลอง (ตารางที่ 5.5) โดยลดได้สูงที่สุดในวันที่ 21 คิดเป็น 43.49 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเทียบกับค่าเริ่มต้น (วันที่ 0) (ตารางที่ 5.6) พบว่าวันที่ 21 ลดลงมากที่สุดถึง 38.11 เปอร์เซ็นต์ และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 5.7) Sharma *et al.* (1997) รายงานว่ากลัยเบนคลาไมด์มีผลลดระดับน้ำตาลในหนูที่เป็นเบาหวานที่ไม่รุนแรงถึงปานกลาง เพราะในขั้นนี้เซลล์บีตาของตับอ่อนยังไม่ได้เสียหายทั้งหมดและยังสร้างอินซูลินได้ ดังนั้นกลัยเบนคลาไมด์จึงสามารถกระตุ้นให้เกิดการหลั่งอินซูลินได้ การทดลองครั้งนี้พบว่าในวันที่ 30 กลัยเบนคลาไมด์ยังสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ สอดคล้องกับ Sharma *et al.* (1996) ที่พบว่าการให้กลัยเบนคลาไมด์ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัวเป็นเวลา 10 วัน มีผล

ลดระดับน้ำตาลในเลือดในหนูเบาหวาน และ Peungvicha *et al.* (1996) พบว่าการให้ยาขนาด 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน ติดต่อกัน 8 วัน สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อาจเป็นเพราะหนูทุกกลุ่มยังมีการดำเนินของโรคยังไม่ถึงขั้นรุนแรง ทำให้ในวันที่ 14 ถึงวันที่ 30 ของการทดลองนั้นยากลัยเบนคลาไมด์ยังสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ หรืออาจเป็นไปได้ว่ากลัยเบนคลาไมด์มีฤทธิ์นอกตับอ่อน คือเพิ่มการนำกลูโคสเข้าเซลล์และเพิ่มการใช้กลูโคสได้อีกด้วย (อรพรรณ มาตังคสมบัติ, 2544; Ojewole, 2002)

ส่วนผลของสารสกัดกวาวเครือขาวหลังจากป้อนสารสกัดติดต่อกัน 14 วัน พบว่าสารสกัดกวาวเครือขาวลดระดับน้ำตาลได้มากที่สุดถึง 28.95 เปอร์เซ็นต์ มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในเวลาเดียวกัน (กลุ่มควบคุม: 331.40±44.98 มิลลิกรัม/เดซิลิตร, สารสกัด: 236.67±38.11 มิลลิกรัม/เดซิลิตร) และยังได้ผลใกล้เคียงกับที่เวลา 21 วัน ที่ลดระดับน้ำตาลได้ถึง 26.37 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 5.5 และเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในเวลาเดียวกัน (กลุ่มควบคุม: 345.40±29.90 มิลลิกรัม/เดซิลิตร, สารสกัด: 254.3±67.08 มิลลิกรัม/เดซิลิตร) ดังแสดงในตารางที่ 5.6 และการเทียบกับค่าเริ่มต้น (เปรียบเทียบกับวันที่ 0) ในกลุ่มเดียวกัน พบว่าในวันที่ 14 ลดระดับน้ำตาลในเลือดได้มากที่สุดถึง 18.30 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับระดับน้ำตาลในวันที่ 0 ของกลุ่มที่ได้รับสารสกัด (ตารางที่ 5.7)

สารสกัดกวาวเครือขาวขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทที่เป็นเบาหวานได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตั้งแต่วันที่ 14 ของการป้อนสารอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 30 วันได้ ซึ่งอาจเกิดจากคุณสมบัติของสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ เช่น พิวรารินที่มีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนสอดคล้องกับการทดลองของ ยุทธนา สมิตสิริและคณะ (2551) ที่พบว่าผลิตภัณฑ์อาหารเสริมชนิดหนึ่งซึ่งมีส่วนผสมของกวาวเครือขาวทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูปกติลดลงได้ เป็นที่น่สนใจว่าสารสกัดกวาวเครือขาวออกฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดโดยผ่านกลไกใดบ้าง เช่น อาจผ่านกลไกการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากบีต้าเซลล์เหมือน estradial เช่นเดียวกับ Kooptiwut *et al.* (2007) ที่พบว่าเซลล์ตับอ่อนหลั่งอินซูลินสูงขึ้นเมื่อเลี้ยงในระดับน้ำตาลสูงร่วมกับเอสโตรเจนเป็นเวลา 10 วัน และยังช่วยป้องกันกลุ่มเซลล์ตับอ่อนซึ่งทำงานด้อยลงเมื่ออยู่ในน้ำเลี้ยงที่มีระดับน้ำตาลสูงให้หลั่งอินซูลินได้ดีขึ้น หรืออาจผ่านกลไกการนำกลูโคสเข้าเซลล์ หรืออาจมีฤทธิ์เสริมการทำงานของอินซูลิน เหมือนพิวรารินถูกใช้ในการบำบัดโรคเบาหวานในประเทศจีนมาตั้งแต่ปี 1990 เนื่องจากสามารถเพิ่มการตอบสนองต่ออินซูลิน เพิ่มการใช้กลูโคสและสนับสนุนการไหลเวียนของเลือด (Jia *et al.*, 2003) จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงกลไกการออกฤทธิ์และผลในสัตว์ species อื่นที่สูงขึ้น เพื่อเป็นข้อมูลนำไปสู่การพัฒนากวาวเครือขาวให้เป็นยารักษาโรคเบาหวานต่อไป

ตารางที่ 5.5 ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทเบาหวานที่ได้รับสารแต่ละกลุ่มต่อเนื่อง 30 วัน

กลุ่มทดลอง	ระดับน้ำตาลในเลือด (มิลลิกรัม/เดซิลิตร)				
	วันที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 30
น้ำกลั่น (กลุ่มควบคุม)	297	385	399	299	297
	317	375	328	352	389
	291	396	273	373	229
	297	315	322	368	355
	320	313	335	335	365
ค่าเฉลี่ย	**304.40**	**356.80**	**331.40**	**345.40**	**327.00**
s.d.	13.15	39.78	44.98	29.90	64.37
กลัยเบนคลาไมด์	354	306	178	132	166
	357	319	170	323	298
	283	191	152	202	124
	279	171	232	130	154
	304	223	262	189	272
ค่าเฉลี่ย	**315.40 a**	**242.00* ab**	**198.80* b**	**195.20* b**	**202.80* b**
s.d.	37.83	67.13	46.23	78.52	77.13
กวาวเครือขาว	308	358	270	233	290
	279	210	200	252	200
	325	349	243	239	300
	273	266	206	230	304
	274	369	292	384	309
	279	329	209	188	209
ค่าเฉลี่ย	**289.67 ab**	**313.50 b**	**236.67* a**	**254.33* ab**	**268.67 ab**
s.d.	21.61	62.50	38.11	67.08	50.17

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในแถวเดียวกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ $p<0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 (DMRT)

* หมายถึง แตกต่างกันทางสถิติที่ $p<0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมในเวลาเดียวกัน (LSD)

ตารางที่ 5.6 เปอร์เซ็นต์การลดระดับน้ำตาลในเลือดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลาเดียวกัน

กลุ่มทดลอง	วันที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 30
กลัยเบนคลาไมด์ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว	-3.61	32.17	40.01	43.49	37.98
กวาวเครือขาว 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว	4.84	12.14	28.59	26.37	17.84

ตารางที่ 5.7 เปอร์เซ็นต์การลดระดับน้ำตาลในเลือดของแต่ละกลุ่มทดลองเมื่อเทียบกับค่าเริ่มต้น (เทียบกับวันที่ 0)

กลุ่มทดลอง	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 30
น้ำกลั่น	-17.21	-8.87	-13.47	-7.42
กลัยเบนคลาไมด์ (10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว)	23.27	36.97	38.11	35.70
กวาวเครือขาว (100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว)	-8.23	18.30	12.20	7.25

5.3.3 ผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อเนื้อเยื่อตับอ่อนและเนื้อเยื่อตับของหนูแรทเบาหวานที่ได้รับสารสกัดเป็นเวลา 30 วัน

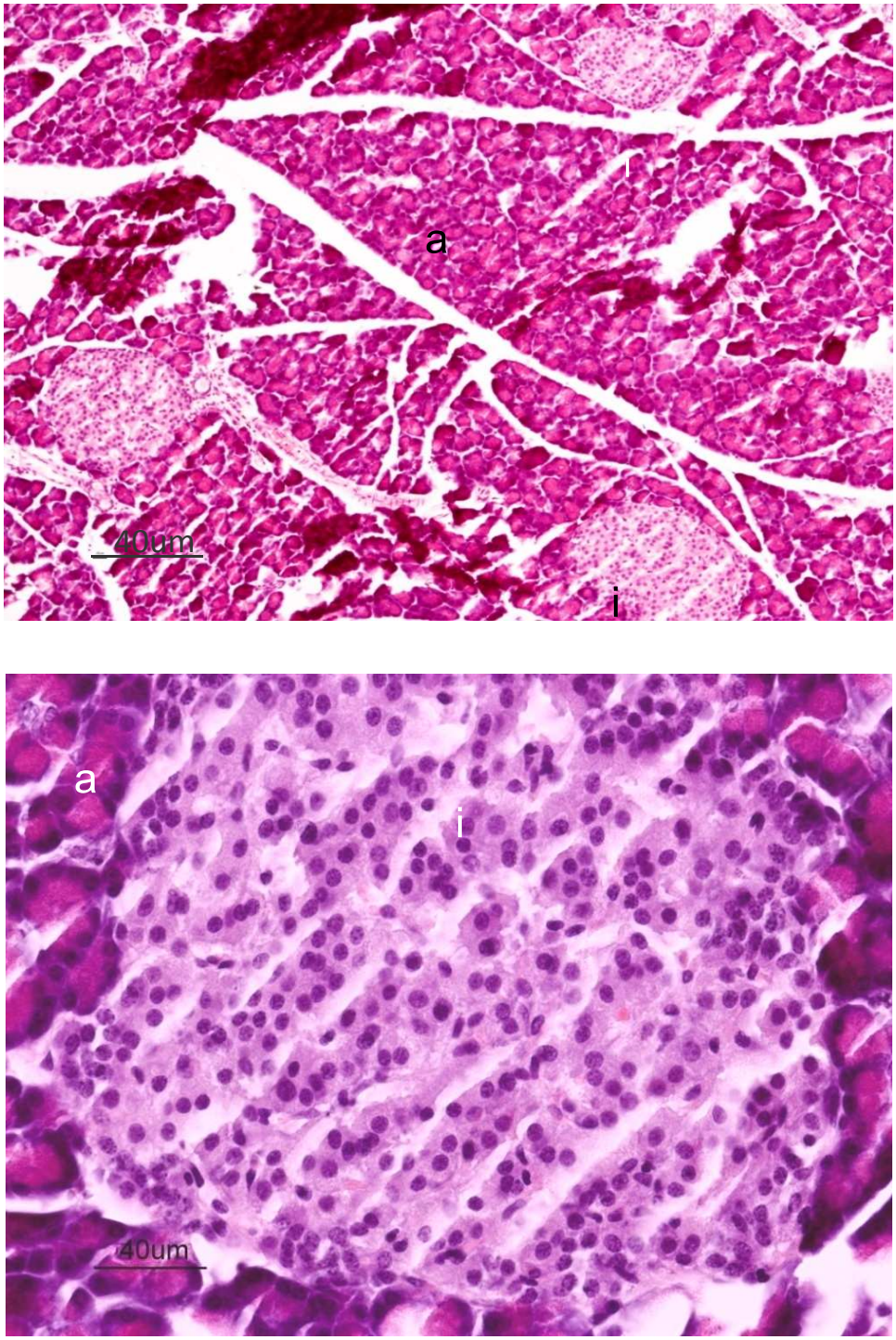
5.3.3.1 ผลต่อจุลพยาธิสภาพของตับอ่อน ลักษณะทางจุลพยาธิสภาพของตับอ่อนหนูกลุ่มปกติ ที่ย้อมด้วยสีฮีมาทอกไซลินและอีโอซิน มีลักษณะดังนี้ พบไอเลตส์ออฟแลงเกอร์-แฮนส์มีรูปร่างกลมหรือรี มีขอบเขตแยกออกจากตับอ่อนส่วนไม่สร้างฮอร์โมน (exocrine pancreas) มีทั้งขนาดใหญ่และขนาดเล็กกระจายกันอยู่ทั่วไป การจัดเรียงตัวของเซลล์ภายในไอเลตส์ออฟแลง-เกอร์แฮนส์เป็นระเบียบ มีช่องว่าง (ภาพตัดขวางของเส้นเลือดฝอย) ที่ชัดเจนและเป็นระเบียบ ภายในไอเลตส์ออฟแลงเกอร์แฮนส์ประกอบด้วยเซลล์รูปร่างหลายเหลี่ยมที่มีขนาดใกล้เคียงกันมีนิวเคลียสรูปร่างกลมติดสีน้ำเงิน เห็นนิวคลีโอลัสชัดเจน ไซโทพลาซึมติดสีชมพูของสีอีโอซินอย่างสม่ำเสมอทั่วเซลล์ (ภาพที่ 5.1)

1) ลักษณะทางจุลพยาธิสภาพของตับอ่อนหนูกลุ่มเบาหวานที่ได้รับน้ำกลั่นขนาด 2 มิลลิลิตร/กิโลกรัมน้ำหนักตัว เป็นเวลา 30 วัน เมื่อย้อมด้วยสีฮีมาทอกไซลินและอีโอซินมีลักษณะแตกต่างจากกลุ่มปกติดังนี้ ไอเลตส์ออฟแลงเกอร์แฮนส์มีรูปร่างไม่แน่นอนส่วนใหญ่จะ

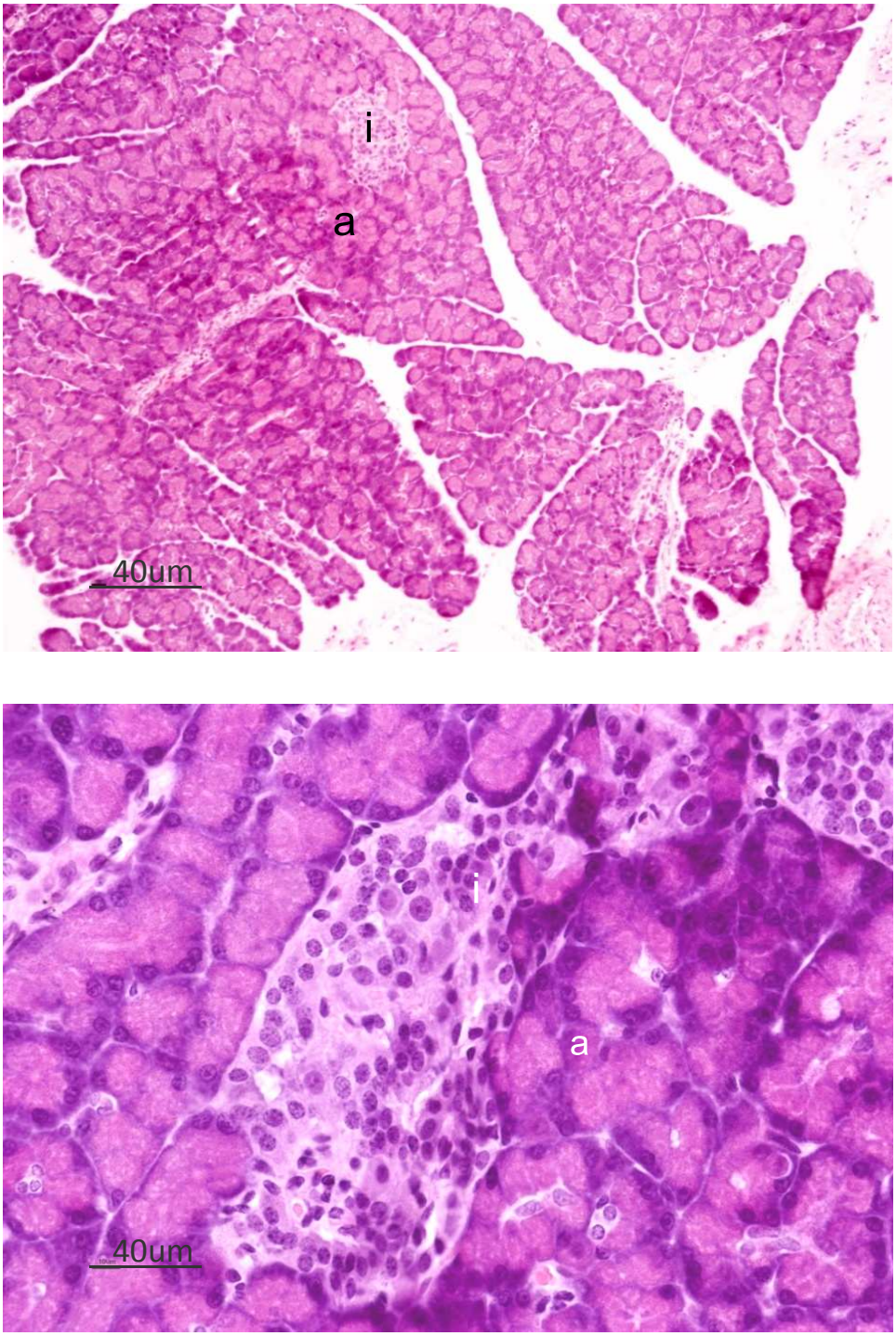
เหี่ยวหรือยุบไป จำนวนไอเลตส์ออฟแลงเกอร์แฮนส์ลดลง 62.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับหนูปกติมีช่องว่างมากขึ้น เซลล์ในไอเลตส์ออฟแลงเกอร์แฮนส์มีขนาดและรูปร่างไม่แน่นอน นิวเคลียสมีรูปร่างค่อนข้างรี (ภาพที่ 5.2)

2) ลักษณะทางจุลพยาธิสภาพของตับอ่อนของหนูกลุ่มเบาหวานที่ได้รับยากลัยเบนคลาไมด์ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน มีลักษณะคล้ายกับหนูเบาหวานกลุ่มควบคุม คือ ไอเลตส์ออฟแลงเกอร์แฮนส์มีขนาดและรูปร่างไม่แน่นอนส่วนใหญ่มีขนาดเล็กกว่าหนูปกติและมีจำนวนลดลง 51.8 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับหนูปกติ เซลล์ในไอเลตส์ออฟแลงเกอร์แฮนส์มีขนาดและรูปร่างไม่แน่นอนและจัดเรียงกันอย่างไม่เป็นระเบียบ เส้นเลือดฝอยแคบลงและไม่เป็นระเบียบ นิวเคลียสมีรูปร่างค่อนข้างรีติดสีน้ำเงินเข้มทึบ (ภาพที่ 5.3)

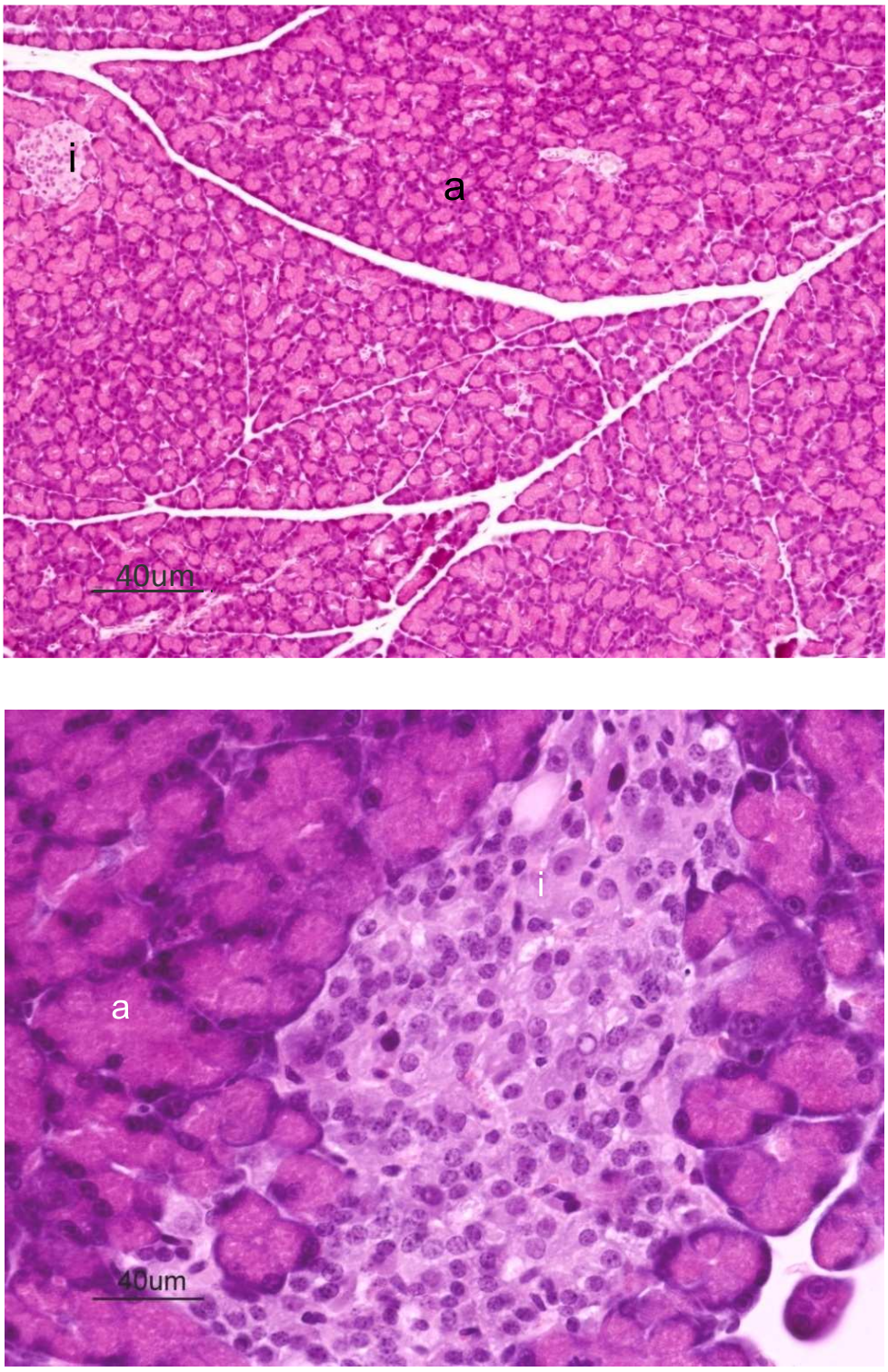
3) ลักษณะทางจุลพยาธิสภาพของตับอ่อนหนูกลุ่มเบาหวานที่ได้รับสารสกัดจากกวาวเครือขาวปริมาณ 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน ที่ย้อมด้วยสีฮีมาทอกไซลินและอีโอซินมีลักษณะคล้ายกับหนูเบาหวานกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับกลัยเบนคลาไมด์ แต่มีลักษณะของเซลล์ที่เป็นปกติมากกว่าและเห็นช่องว่างที่เป็นเส้นเลือดฝอยขยายออกมากกว่าที่พบในไอเลตส์ออฟแลงเกอร์แฮนส์ของกลุ่มควบคุม และกลุ่มได้รับยากลัยเบนคลาไมด์ ซึ่งอาจเกิดจากพิวรารินในสารสกัดกวาวเครือขาวมีฤทธิ์ขยายหลอดเลือดได้ (John *et al.*, 2004) แต่ไอเลตส์-ออฟแลงเกอร์แฮนส์ยังมีรูปร่างไม่แน่นอน มีขนาดเล็กและเป็นระเบียบน้อยกว่าในหนูปกติ โดยมีจำนวนลดลงถึง 41.1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับหนูปกติและพบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดกวาวเครือขาวมีจำนวนไอเลตส์ออฟแลงเกอร์แฮนส์เหลือมากกว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ป้อนกลัยเบนคลาไมด์ เป็นไปได้ว่าสารสกัดจากกวาวเครือขาว ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงนั้น สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระจากสเตรปโตโซโทซินจึงช่วยลดความเสียหายต่อเซลล์ในไอเลตส์ออฟแลงเกอร์แฮนส์ (ภาพที่ 5.4)



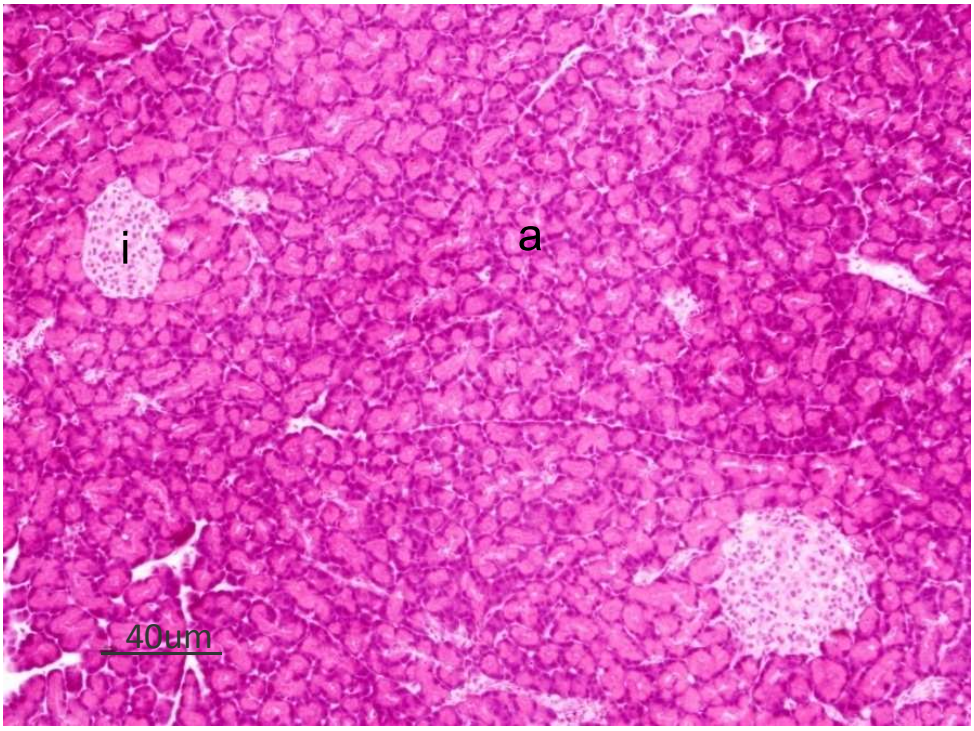
ภาพที่ 5.1 แสดงพยาธิสภาพของตับอ่อน แสดงไอเลตส์ออฟแลงเกอร์แฮนส์ (i) และ acenous cells (a) หลังจากได้รับสารทดสอบติดต่อกัน 30 วัน ของหนูปกติ (ภาพบน กำลังขยาย x10; ภาพล่าง กำลังขยาย x 40)

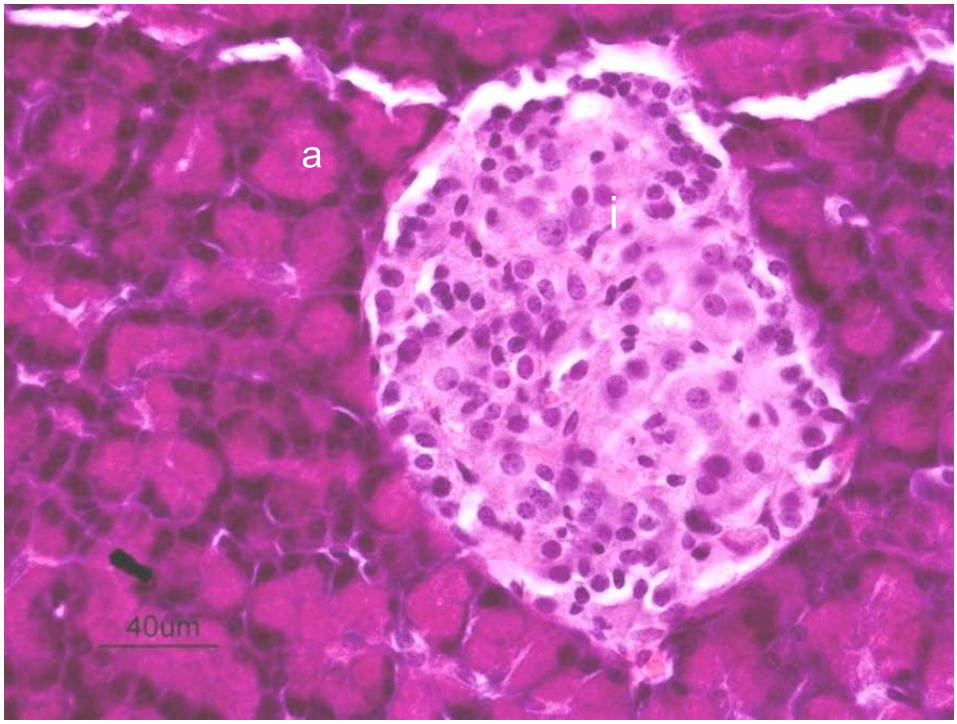


ภาพที่ 5. 2 แสดงพยาธิสภาพของตับอ่อน แสดงไอเลตส์ออฟแลงเกอร์แฮนส์ (i) และ acenous cells (a) หลังจากได้รับสารทดสอบติดต่อกัน 30 วัน ของหนูเบาหวานกลุ่มควบคุม (ภาพบน กำลังขยาย x 10; ภาพล่าง กำลังขยาย x 40)



ภาพที่ 5. 3 แสดงพยาธิสภาพของตับอ่อน แสดงไอเลตส์ออฟแลงเกอร์แฮนส์ (i) และ acenous cells (a) หลังจากได้รับสารทดสอบติดต่อกัน 30 วัน ของหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับกลัยเบน-คลาไมด์ (ภาพบน กำลังขยาย x 10; ภาพล่าง กำลังขยาย x 40)

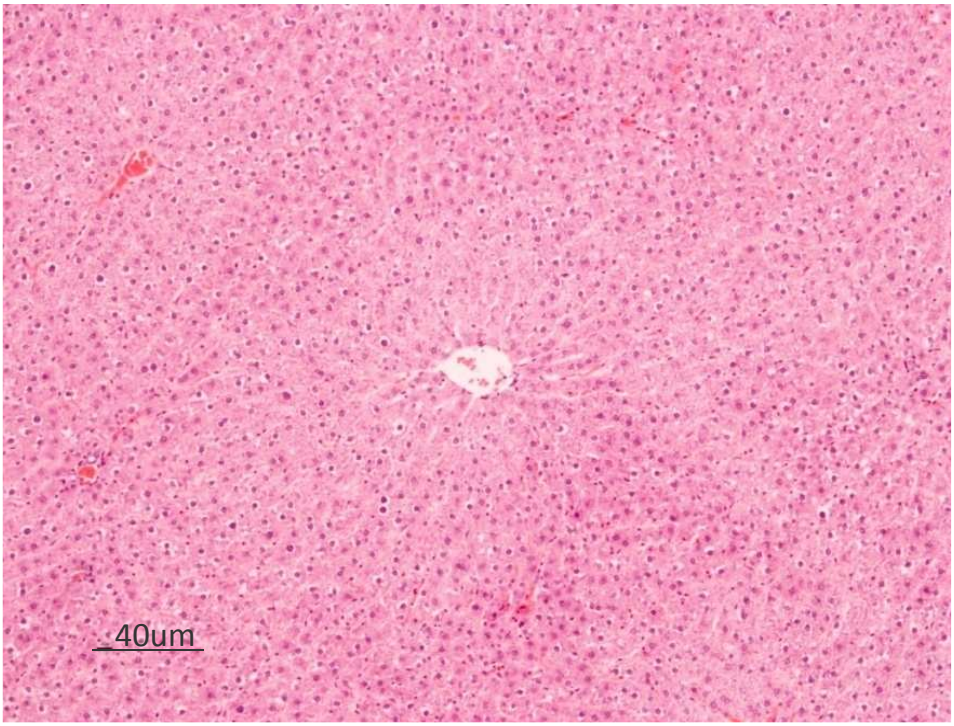


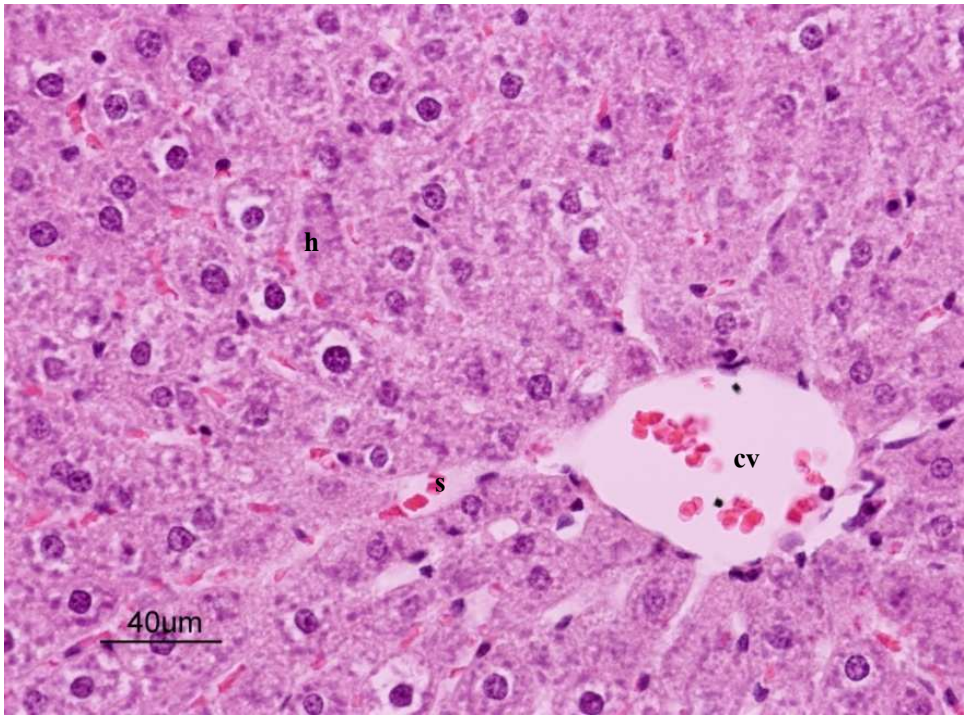


ภาพที่ 5. 4 ตับอ่อนของหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดกวาวเครือขาว แสดงพยาธิสภาพของตับอ่อน แสดงไอเลตส์ออฟแลงเกอร์แฮนส์ (i) และ acenous cells (a) หลังจากได้รับสารทดสอบติดต่อกัน 30 วัน ของหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดกวาวเครือขาว (ภาพบน กำลังขยาย x 10; ภาพล่าง กำลังขยาย x 40)

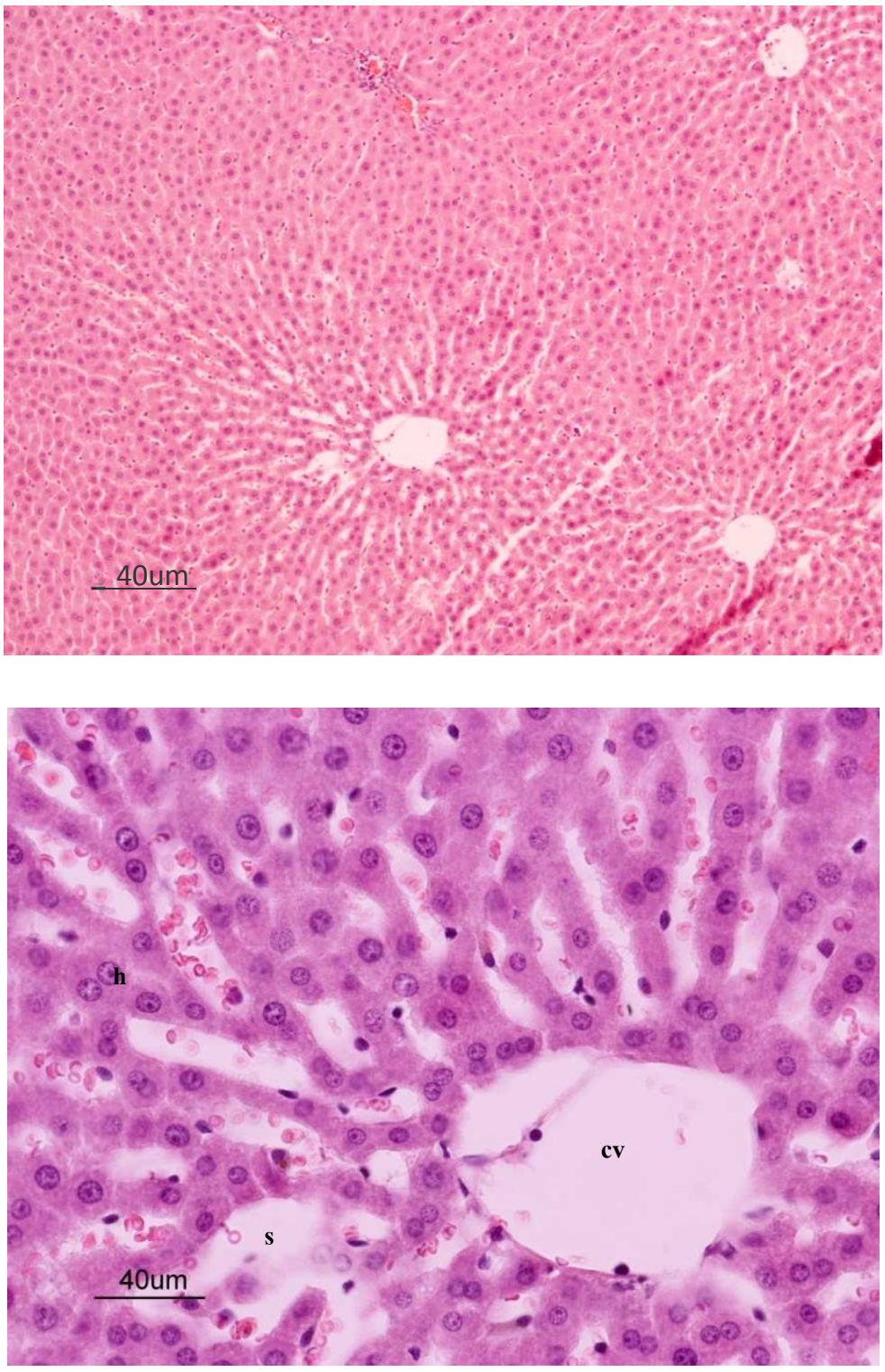
พยาธิสภาพของตับอ่อนในที่พบในหนูที่เป็นเบาหวานทุกกลุ่ม เป็นผลโดยตรงจากการทำลายของ streptozotocin ที่ใช้ชักนำให้หนูทดลองเกิดเป็นเบาหวาน (Rakieten *et al.* 1963; Junod *et al.* 1967; Szkudelski, 2001) สอดคล้องกับ Ahmed *et al.* (1998) ที่รายงานว่าสาร streptozotocin ขนาด 60 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว มีผลทำให้เซลล์บีตาในไอเลตส์ออฟแลงเกอร์แฮนส์เหลือเพียงร้อยละ 27.01 ขณะที่ในหนูกลุ่มปกติมีเซลล์บีตาสูงถึงร้อยละ 60.01 และ Szkudelski (2001) รายงานว่าสาร streptozotocin ที่ใช้ในการชักนำเบาหวานในสัตว์ทดลองนั้น เป็นสารที่เติมกลุ่มเมทิลให้กับดีเอนเอและให้สารอนุมูลอิสระชนิดแรง คือ สารไนตริกออกไซด์ ดังนั้นเซลล์บีตาที่อยู่ภายในไอเลตส์ออฟแลงเกอร์แฮนส์จึงถูกทำลายโดยไนตริกออกไซด์ได้ง่ายเพราะในเซลล์ตับอ่อนไม่มีเอนไซม์กำจัดอนุมูลอิสระ เซลล์จึงถูกทำลายและตายในที่สุด นอกจากนี้ การพบการบวมของเซลล์ในไอเลตส์ออฟแลงเกอร์แฮนส์ที่พบในหนูทุกกลุ่มที่เป็นเบาหวาน อาจเกิดจากภาวะแทรกซ้อนที่พบในโรคเบาหวาน เช่น การติดเชื้อ การอักเสบ หรือความผิดปกติของการเผาผลาญไขมัน เป็นต้น (พงษ์ศักดิ์ วรรณไกรโรจน์ และ พิเชฐ สัมปทานุกุล, 2541) ดังนั้นพยาธิสภาพของตับอ่อนที่พบในการทดลองนี้ พบในหนูเบาหวานทุกกลุ่ม จึงยังไม่อาจสรุป ได้ว่าพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นเป็นผลเนื่องจากสารสกัดกวาวเครือขาว

5.3.3.2 ผลต่อลักณะจุลพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับ ลักษณะทางจุลพยาธิสภาพของตับหนูแรท กลุ่มปกติทุกตัวที่ย้อมด้วยสีฮีมาทอกไซลินและอีโอซินมีลักษณะปกติและเหมือนกัน คือมีหลอดเลือดดำตรงกลาง (central vein: cv) (ภาพที่ 5.5) มีเซลล์ตับเรียงเป็นแถวในแนวรัศมี (hepatic cord: h) มีหลอดเลือดฝอย (sinusoid: s) อยู่ระหว่างแถวของเซลล์ตับ มีเซลล์เม็ดเลือดแดงติดสีชมพูเข้มของสีอีโอซินอยู่ภายในหลอดเลือด ลักษณะทางจุลพยาธิสภาพของตับหนูเบาหวานทุกกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ได้รับน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน 30 วัน (ภาพที่ 5.6) กลุ่มที่ได้รับยากลัยเบนคลาไมด์ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน 30 วัน (ภาพที่ 5.7) และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดกวาวเครือขาว 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน 30 วัน (ภาพที่ 5.8) มีความแตกต่างจากหนูกลุ่มปกติ คือ หลอดเลือดฝอยที่แทรกระหว่างแถวของเซลล์ตับมีการขยายกว้างขึ้น (sinusoid dilation) พยาธิสภาพที่เกิดในตับพบในหนูทุกกลุ่ม Singh *et al.* (2001) รายงานว่าสาร streptozotocin ขนาด 75 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ที่ใช้ชักนำให้หนูทดลองเป็นโรคเบาหวานไม่ทำลายตับของสัตว์ การเกิดการขยายของหลอดเลือดฝอยที่มีมากกว่าในหนูปกติ อาจมีสาเหตุจากตับมีการอักเสบเนื่องจากภาวะแทรกซ้อนของโรคเบาหวานตลอดจนภาวะเลือดไปเลี้ยงไม่เพียงพอ (พงษ์ศักดิ์ วรรณไกรโรจน์และพิเชฐ สัมปทานุกุล, 2541) และกรณีของสารสกัดกวาวเครืออาจมีผลของพิวรารินร่วมด้วยเนื่องจากพิวรารินมีฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดขยายตัวและเพิ่มการไหลเวียนของเลือดในหลอดเลือด coronary artery (John *et al.*, 2004)

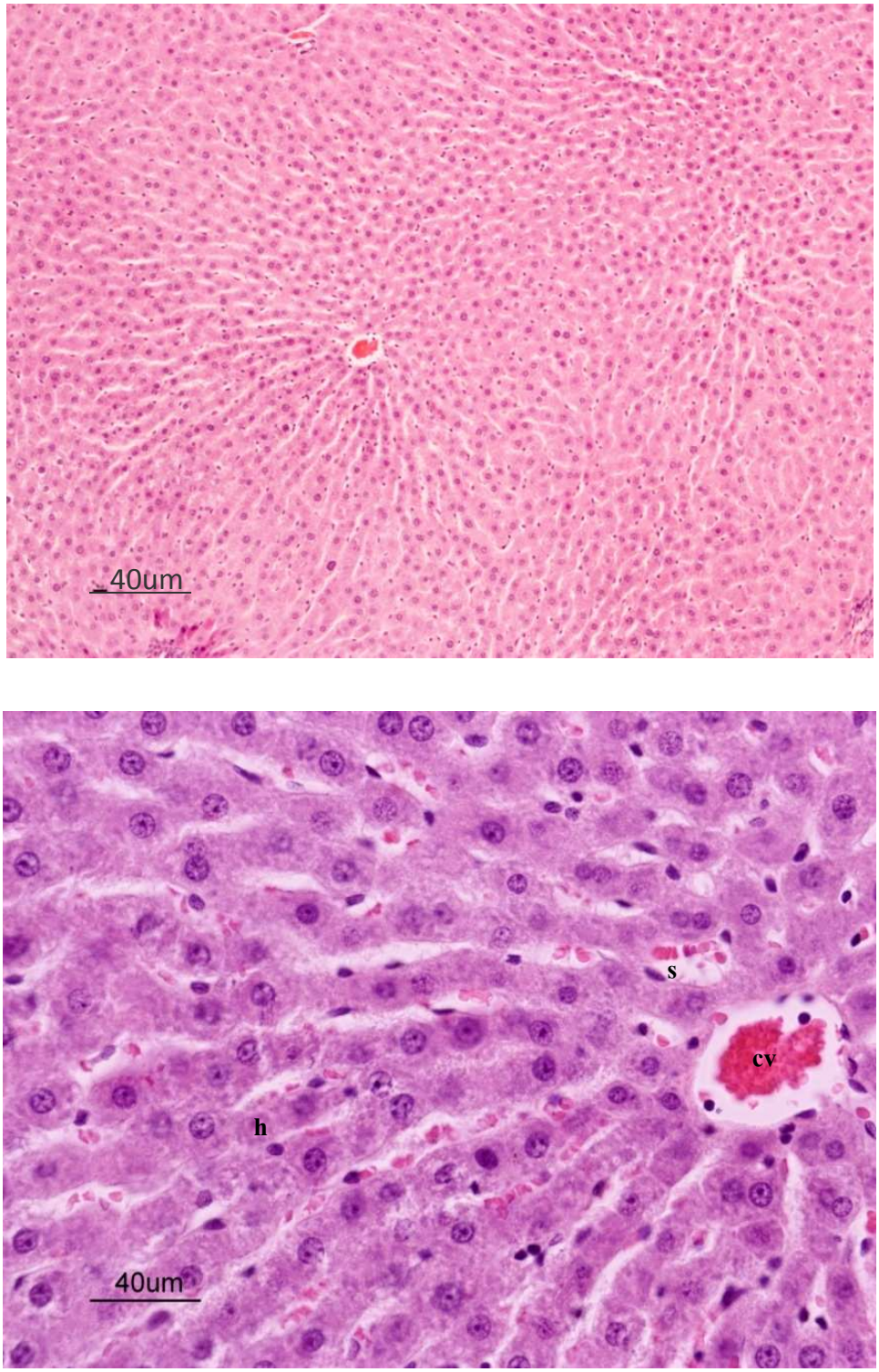




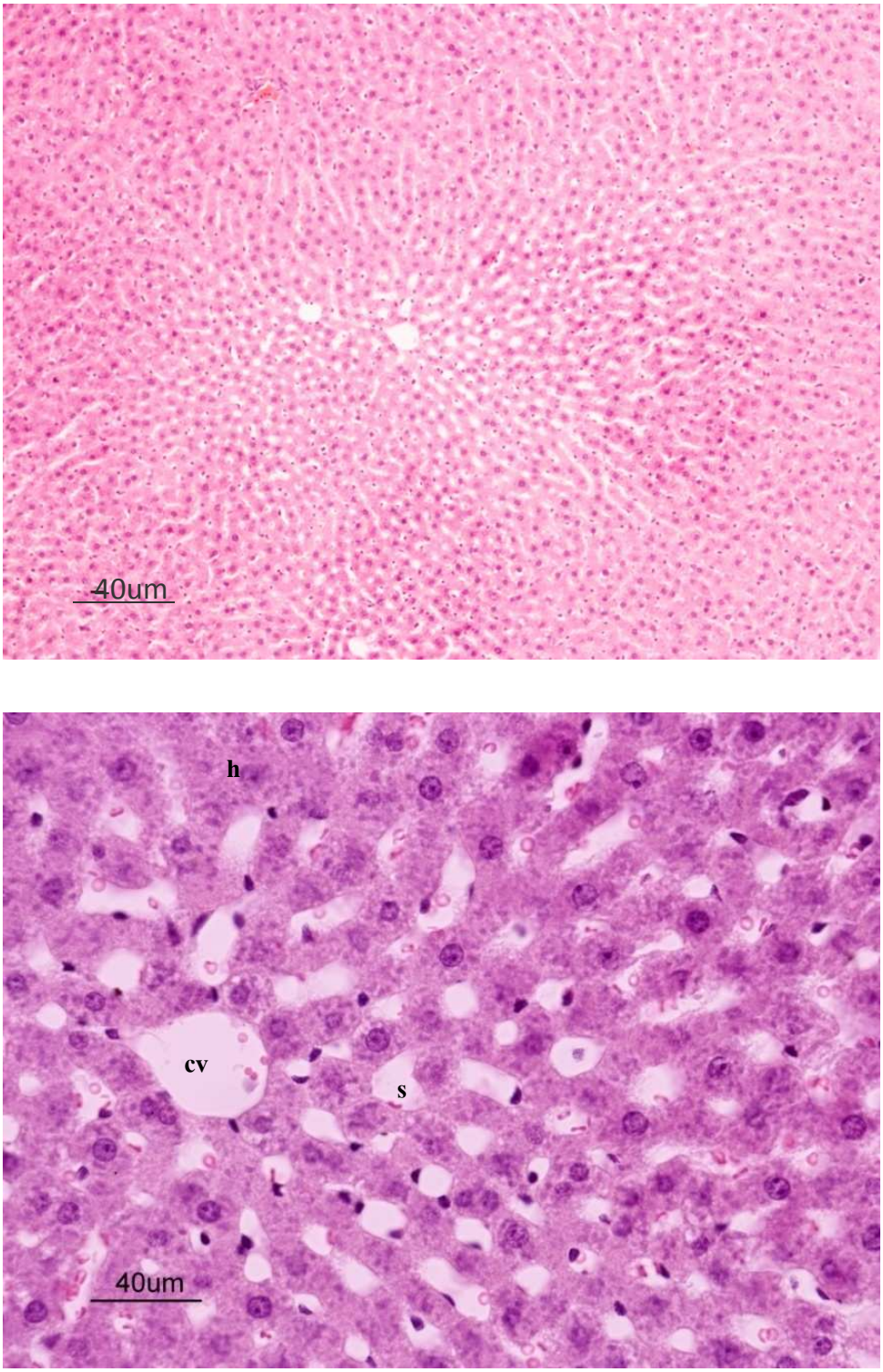
ภาพที่ 5.5 ภาพตัดขวางตับหนูแรทของหนูปกติประกอบด้วยหลอดเลือดดำ (cv) เซลล์ตับ (h) หลอดเลือดฝอยระหว่างแถวของเซลล์ตับ (s) (H&E) (ภาพบน กำลังขยาย x 10; ภาพล่าง กำลังขยาย x 40)



ภาพที่ 5.6 พยาธิสภาพของตับหนูแรทเบาหวานกลุ่มควบคุมประกอบด้วยหลอดเลือดดำ (cv) เซลล์ตับ (h) หลอดเลือดฝอยระหว่างแถวของเซลล์ตับ (s) (H&E) (ภาพบน กำลังขยาย x 10; ภาพล่าง กำลังขยาย x 40)



ภาพที่ 5.7 พยาธิสภาพของตับหนูแรทหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับกลัยเบนคลาไมด์ประกอบด้วย หลอดเลือดดำ (cv) เซลล์ตับ (h) หลอดเลือดฝอยระหว่างแถวของเซลล์ตับ (s) (H&E) (ภาพบน กำลังขยาย x 10; ภาพล่าง กำลังขยาย x 40)



ภาพที่ 5.8 พยาธิสภาพของตับหนูแรทหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดกวาวเครือขาวประกอบด้วยหลอดเลือดดำ (cv) เซลล์ตับ (h) หลอดเลือดฝอยระหว่างแถวของเซลล์ตับ (s) (H&E) (ภาพบน กำลังขยาย x 10; ภาพล่าง กำลังขยาย x 40)

ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าลักษณะดังกล่าวเกิดจากการได้รับสารสกัดกวาวเครือขาว สอดคล้องกับการศึกษาถึงพิษเรื้อรังของกวาวเครือขาวโดย ทรงพล ชีวะพัฒน์และคณะ (2543) ที่ให้ผงกวาวเครือขาวแก่หนูขาวพันธุ์วิสตาร์ในขนาด 10 และ 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน เป็นเวลา 90 วัน ไม่ทำให้เกิดความผิดปกติต่อค่าโลหิตวิทยาและไม่ทำให้เกิดพยาธิสภาพของอวัยวะภายในที่บ่งชี้ถึงความเป็นพิษของกวาวเครือขาว บางพยาธิสภาพมีโอกาสเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ หรืออาจเป็นความผิดปกติที่เกี่ยวเนื่องกับอายุ หรืออาจเกิดเนื่องจากภาวะเบาหวาน เพราะฉะนั้นผลการตรวจทางจุลพยาธิสภาพที่พบครั้งนี้ ยังไม่อาจสรุปได้ว่าสารสกัดจากกวาวเครือขาวทำให้เกิดพยาธิสภาพต่อเนื้อเยื่อตับอ่อนและตับของหนูแรท

5.4 สรุปผลการทดลอง

สารสกัดกวาวเครือขาวไม่สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดในภาวะกลูโคสในเลือดสูงเฉียบพลันได้ทั้งในหนูปกติและหนูเบาหวาน การทดสอบฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดเมื่อป้อนสารสกัดต่อเนื่องกัน 30 วัน พบว่าในวันที่ 14 ของการป้อนสารสกัดความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว สามารถลดระดับน้ำตาลได้มากที่สุดถึง 28.95 เปอร์เซ็นต์ และในที่ 21 วัน ลดระดับน้ำตาลได้ 26.37 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในเวลาเดียวกันและยังพบว่าในวันที่ 14 ลดน้ำตาลในเลือดได้มากที่สุดถึง 18.30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับเวลาก่อนป้อนสารสกัด (วันที่ 0) ขณะที่ยากลัยเบนคลาไมด์สามารถลดระดับน้ำตาลได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตั้งแต่วันที่ 7 จนถึงวันที่ 30 ของการทดลอง โดยลดระดับน้ำตาลในเลือดได้สูงที่สุดในวันที่ 21 ของการป้อนสาร คิดเป็น 43.49 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในเวลาเดียวกันและยังพบว่าสารสกัดไม่มีผลก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่อเนื้อเยื่อตับอ่อนและตับของหนูทดลอง จากผลการทดลองสรุปได้ว่าสารสกัดกวาวเครือขาวสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานได้ จึงอาจจะมีประโยชน์ในทางการรักษาโรคเบาหวานได้

5.5 รายการอ้างอิง

ชวลิต นิยมธรรม. (2538). **กวาวเครือ.** อนุกรมวิธานพืชอักษร ก. ราชบัณฑิตยสถาน. กรุงเทพฯ: เพื่อนพิมพ์. 495 หน้า

ณัฐธัญ แสนบัวผัน. (2548). ฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดของสารสกัดใบขี้เหล็กและผลต่อลักษณะทางจุลพยาธิสภาพของตับอ่อนและตับในหนูแรทเบาหวาน. **วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิตสาขาวิชาชีววิทยา. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.**

ทรงพล ชีวะพัฒน์ ปราณี ชวลิตธำรง สมเกียรติ ปัญญามัง สดุดี รัตนจรัสโรจน์ และ อัญชลี จูฑะพุทธิ. (2543). พิษวิทยาของกวาวเครือขาว. **ว. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.** 42: 202-223.

บรรจบ ชุณหสวัสดิกุล. (2543). **คิดก่อนกิน.** กรุงเทพฯ: รวมทรรศน์.

พงษ์ศักดิ์ วรรณไกรโรจน์ และ พิเชฐ สัมปทานุกุล. (2541). ตำราภาพจุลพยาธิวิทยา. กรุงเทพฯ.

ยุทธนา สมิตสิริ วสันต์ มะโนเรือง และ ชัยณรงค์ โตจรัส. (2551). **การทดสอบผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพที่มีส่วนผสมของกวาวเครือขาว ไบโอ ดี**. มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง. [Online]. Avialable: http://sesamio.com/sg-IIResearch.html.

อรพรรณ มาตังคสมบัติ. (2544). **ยาที่ใช้ในโรคเบาหวาน.** กรุงเทพฯ: 59 หน้า

Ahmed, I., Adeghata, E., Sharma, A.K., Pallot, D.T. and Singh, J. (1998). Effect of *Momordica charantia* fruit juice on islet morphology in the pancreas of the streptozotocin-diabetic rat. **Diabetes Res Clin Pract**. 40: 145-151.

Bailey, C.J., Day, C., Turner, S.L. and Leatherdale, B.A. (1985). Cerasee, a traditional treatment for diabetes. Studies in normal and streptozotocin diabetic mice. **Diabetes Res.** 2: 81-84.

Cervellati, R., Renzulli, C., Guerra, M.C. and Speroni, E. (2002). Evaluation of antioxidant activity of some natural polyphenolic compounds using the Briggs-Rauscher reaction method. **J Agric Food Chem.** 50: 7504-7509.

Chen, W.C., Hayakawa, S., Yamamoto, T., Su, H.C., Liu, I.M. and Cheng, J.T. (2004). Mediation of beta-endorphin by the isoflavone puerarin to lower plasma glucose in streptozotocin-induced diabetic rats. **Plant Med.** 70(2):113-6. [Online]. Available: http://www. nlm.nih.gov

Jia, W., Gao, W.Y., and Xiao, P.G. (2003). Antidiabetic drugs of plant origin used in china: compositions, pharmacology, and hypoglycemic mechanisms. **Chin J Chin Mater Med.** 28: 108–113.

John, I., Baker, Daniel, E., Keyler and Ashok, K.S. (2004). Effects of purified puerarin on voluntary alcohol intake and alcohol withdrawal symptoms in P rats receiving free access to water and alcohol. **J Med Food.** 7(2): 180-186. [Online]. Available: http://www. lieber tonline. com/action/showPreferences.

Junod, A., Lambert, A.E., Orci, L., Pictet, R., Gonet, A.E. and Renold, A.E. (1967). Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. **Proc Soc Exp Biol Med.** 126: 201-205.

Kamalakkannan, N. and Stanely, M.P.P. (2006). Rutin improves the antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic rat tissues. **Mol Cell Biochem.** 293: 211-219.

King, H., Aubert, R.E. and Herman, W.H. (1998). Global burden of diabetes, prevalence numerical estimates and projects. **Diabetes Care.** 21: 1414-1431.

Kooptiwut, S., Semprasert, N. and Chearskul, S. (2007). Estrogen increases glucose-induced insulin secretion from mouse pancreatic islets cultured in a prolonged high glucose condition. **J Med Assoc Thai**. 90: 956-61.

Levesque, R. and SPSS, Inc. (2006). **SPSS programming and data management**, 3rd edition. SPSS institute. USA.

Luzi, L. and Pozza, G. (1997). Gilbenclamide: an old drug with a novel mechanism of action. **Acta. Diabetol.** 34: 239-244.

Mukherjee, K., Ghosh, N.C. and Datta, T. (1972). *Coccinia indica* Linn. as potential hypoglycemic agent. **Indian J Exp Biol.** 10: 347-349.

Noor, H. and Ashcroft, S.J. (1998). Pharmacological characterisation of the antihyperglycemic properties of *Tinospppora crispa* extract. **J Ethnopharmacol**. 62: 7-13.

Ojewole, J.A.O. (2002). Hypoglycemic effect of *Clausena anisata* (Willd) Hook methanolic root extract in rats. **J Ethnopharmacol**. 81: 231-237.

Peungvicha, P., Thirawarapan, S. and Watanabe, H. (19960. Hyperglycemic effect of water extract of the root of *Pandanus odorus* RIDL. **Biol Pharm Bull.** 19: 364-366.

Pushparaj, P., Tan, C.H. and Tan, B.K.H. (2000). Effects of *Averrhoa bilimbi* leaf extract on blood glucose and lipids in streptozotocin-diabetic rats. J Ethnopharmacol. 72: 69-76.

Rakieten, N., Rakieten, M.L. and Nadkarni, M.V. (1963). Studies on the diabetogenic action of streptozotocin. **Canc Chemother Rep 1.** 29: 91-98.

Ratzman, K.P., Schulz, B., Heinke, P. and Besch, W. (1984). Tobutamide does not alter insulin requirement in type 1 (insulin-dependent) diabetes. Diabetologia. 27: 8-12.

Sabu, M.C. and Subburaju, T. (2002). Effect of *Cassia auriculata* Linn. on serum glucose level, glucose utilization by isolated rat hemidiaphragm. **J Ethnopharmacol**. 80: 203-206.

Sharma, S.R., Dwivedi, S.K. and Swarup, D. (1997). Hypoglycemic, antihyperglycemic and hypolipidemic activitie of *Cesalpinia bounducella* seeds in rats. **J Ethnopharmacol**. 58: 39-44.

Sharma, S.R., Dwivedi, S.K., Varshney, V.P. and Swarup, D. (1996). Antihyperglycemic and insulin releaseeffects of *Agle marmelos* leaves in streptozotocin-diabetic rats. **Phytother Res.** 10: 426-428.

Singh, N., Singh, S.P., Vrat, S., Misra, N., Dixit, K.S. and Kohli, R.P. (1985). A study on the antidiabetic activity of *Coccinia indica* in dogs. **Indian J Med Sci**. 39: 27-29.

Stanely, P., Prince, M., Menon, V.P. and Gunasekaran, G. (1999). Hypolipidemic actions of *Tinospora cordifolia* roots in alloxan diabetic rats. **J Ethnopharmacol.** 64: 53-57.

Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in b-cells of the rat pancreas. **Physiol Res.** 50: 536-546.

Xu, M.E., Xiao, S.Z., Sun, Y.H., Zheng, X.X., Ou-Yang, Y. and Guan, C. (2005). The study of anti-metabolic syndrome effect of puerarin in vitro**. Life Sci.** 77: 3183–3196

Zhu, J.H., Wang, X.X. and Chen, J.Z. (2004). Effects of puerarin on number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood. Acta Pharmacol Sin**.** 25: 1045-1051.

บทที่ 6
บทสรุปและข้อเสนอแนะ

ผลการทดลองตรงตามวัตถุประสงค์ 3 ข้อ ที่ตั้งไว้คือ

1. เพื่อคัดเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมของไคโตซาน กรดซาลิไซลิก และสารคอปเปอร์คลอไรด์ ในการชักนำให้กวาวเครือขาว มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และการสะสมสารฟีนอลิค สารฟลาโวนอยด์สูงขึ้นนั้น พบว่าการชักนำด้วยกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ไคโตซานความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร และคอปเปอร์คลอไรด์ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้หัวกวาวเครือขาวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีสะสมสารฟีนอลิคและฟลาโวนอยด์สูงสูงที่สุด

2. เพื่อคัดเลือกทรีตเมนต์ที่เหมาะสมจากการใช้สารไคโตซาน กรดซาลิไซลิก และคอปเปอร์คลอไรด์เป็นสารชักนำร่วมกัน ในการเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การสร้างพิวรารินและจีนิสทีอินในหัวกวาวเครือขาว ที่ปลูกใน growth chamber ในโรงเรือน และในแปลงทดลอง พบว่า การใช้ไคโตซานความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับคอปเปอร์คลอไรด์ 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้ปริมาณของพิวรารินและจีนิสทีอินในหัวของกวาวเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber และที่ปลูกในโรงเรือนมีปริมาณสูงที่สุด และการใช้ไคโตซานความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร และคอปเปอร์คลอไรด์ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้กวาวเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber ปลูกในโรงเรือน และปลูกในแปลงทดลองมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด

3. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือดและผลกระทบต่อตับอ่อนและตับของหนูแรทที่เป็นเบาหวาน พบว่าสารสกัดกวาวเครือขาวไม่มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทในภาวะที่มีระดับน้ำตาลสูงเฉียบพลันทั้งในหนูปกติและหนูเบาหวาน แต่มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 30 วัน โดยในวันที่ 14 ของการป้อน และสารสกัดกวาวเครือขาวไม่มีผลก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่อเนื้อเยื่อตับอ่อนและเนื้อเยื่อตับของหนูเบาหวาน

ข้อเสนอแนะ

1. การใช้สารชักนำมีปัญหาด้านการเตรียมสาร การแนะนำให้เกษตรกรใช้ควรจัดให้อยู่ในรูปที่ใช้ได้ง่ายที่สุดก่อนจึงควรศึกษาถึงรูปแบบที่เหมาะสมต่อไป เช่น เป็นสารชักนำสำเร็จรูป

2. การชักนำสารพิวรารินและจีนิสทีอินในแปลงปลูกไม่ได้ผล ควรศึกษาเพิ่มเติม โดยเฉพาะความเข้มข้นที่ใช้ และความถี่ในการชักนำ และต้องคำนึงวิธีปฏิบัติที่ง่ายและมีค่าใช้จ่ายน้อยด้วย จึงจะได้รับความสนใจจากเกษตรกร

3. การชักนำด้วย ไคโตซานความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับคอปเปอร์คลอไรด์ 200 มิลลิกรัม/ลิตร ที่เพิ่มพิวรารินและจีนิสทีอิน และการใช้ไคโตซานความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร และคอปเปอร์คลอไรด์ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ที่เพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหัวกวาวเครือขาวได้ อาจใช้ได้กับสมุนไพรชนิดอื่นๆ เนื่องจากพืชสมุนไพรที่มีสารฟีนอลิคและฟลาโวนอยด์เป็นสารออกฤทธิ์สำคัญ จึงควรนำไปใช้ชักนำในพืชชนิดอื่นๆ ผลที่ได้รับจะเป็นประโยชน์ต่อการเพิ่มคุณภาพสมุนไพรที่ได้จากการปลูกต่อไปได้

4. กวาวเครือขาวควรได้รับความสนใจในการใช้เพื่อรักษาโรคเบาหวาน เนื่องจากสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดหนูแรทที่เป็นเบาหวานได้ จึงควรทำการศึกษาให้มากขึ้น อย่างน้อยที่สุดอาจทำให้ผู้ป่วยที่เป็นเบาหวานสามารถบริโภคกวาวเครือขาวได้ เนื่องจากปัจจุบันยังมีข้อห้ามอยู่ เนื่องจากผลของฮอร์โมนเอสโตรเจนมีผลทั้งทางบวกและทางลบต่อโรคเบาหวาน

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียม citrate buffer

เตรียม NaCl 0.9 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร (โดยชั่ง NaCl 9 กรัม มาละลายในน้ำปริมาตร 991 มิลลิลิตร) เตรียม Citric acid 20 mM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (โดยชั่ง citric acid หนัก 0.04208 กรัม มาละลายใน NaCl 0.9 เปอร์เซ็นต์ แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร)

ภาคผนวก ข การเตรียม Neutral phosphate buffered formalin

$NaH_2PO_4H_2O$	4.0 กรัม
Na_2HPO_4	6.0 กรัม
40เปอร์เซ็นต์ formaldehyde	100.0 มิลลิลิตร
tap/distilled water	900.0 มิลลิลิตร

นำ Na_2HPO_4 ละลายน้ำ คนตลอดเวลาเพื่อให้ละลายได้ง่ายขึ้น จากนั้นเติม $NaH_2PO_4H_2O$ เมื่อละลายดี แล้วจึงเติม 40 เปอร์เซ็นต์ formaldehyde ลงไป ปรับปริมาตรให้ครบตามต้องการ สารละลายบัฟเฟอร์ฟอร์มาลินใช้คงสภาพเนื้อเยื่อเพื่อเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อสำหรับการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา ควรตัดเนื้อเยื่อภายหลังการเปิดซากและแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอร์มาลินทันทีเพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงภายหลังตาย โดยตัดให้หนาไม่เกิน 1.0 เซนติเมตร แช่ไว้ในสารละลายคงสภาพนาน 12-24 ชั่วโมง ให้ ปริมาตรของสารละลายเป็น 10 เท่าของปริมาตรเนื้อเยื่อ

ภาคผนวก ค เทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา (กมลวรรณ ศรีปลั่ง, 2546)

ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อและขบวนการผ่านชิ้นเนื้อในสารละลายต่าง ๆ

1. นำเนื้อเยื่อแช่ใน neutral buffered formalin (pH 7.4)
2. นำเนื้อเยื่อมาตัดให้ได้ขนาดตามต้องการ
3. นำเนื้อเยื่อที่ตัดแต่งแล้วมา dehydrated, cleared และ embedded โดยแช่เนื้อเยื่อในสารละลายต่าง ๆ ตามขั้นตอน ดังนี้
    - 3.1 เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ 30 นาที 2 ครั้ง
    - 3.2 เอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ 30 นาที
    - 3.3 เอทานอล 90 เปอร์เซ็นต์ 30 นาที
    - 3.4 เอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ 30 นาที

3.5 เอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์และ xylene (1 : 1, v : v) 30 นาที

3.6 xylene, 30 นาที 1 ชั่วโมง ตามลำดับ

3.7 soft, medium hard และ hard paraffins อย่างละ 30 นาที ตามลำดับที่ 58ºC ภายใต้สุญญากาศ

3.8 embeded เนื้อเยื่อ โดยเท paraffin ลงในพิมพ์ที่มีเนื้อเยื่ออยู่

4. นำเนื้อเยื่อที่อยู่ในพิมพ์ paraffin มาตัด 5 ไมครอน
5. นำเนื้อเยื่อมาติดบน glass slide โดยใช้ standard warm water technique และรอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 1 คืน
6. ย้อมสี slides ด้วย Hematoxylin & Eosin โดยแช่เนื้อเยื่อ ตามขั้นตอนดังนี้

6.1 เอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ 2 นาที

6.2 เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 2 นาที

6.3 เอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ 2 นาที

6.4 เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ 2 นาที

6.5 Distilled water 2 นาที

6.6 Harris hematoxylin 8 นาที

6.7 เอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ 2 นาที

6.8 Eosin 2 นาที

6.9 เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 2 นาที

6.10 เอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ 2 นาที

6.11 xylene 2 นาที 2 ครั้ง

7. นำ slides ที่ผ่านการย้อมสีแล้ว มาปิดด้วย cover slips โดยใช้น้ำยา permount หยดก่อน 1-2 หยด รอให้แห้ง โดยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 คืน

ตารางผนวกที่ 1 การให้คะแนนเพื่อคัดเลือกความเข้มข้นและจำนวนวันที่เหมาะสม หลังชักนำด้วยไคโตซาน

ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/ลิตร)	DPPH	FRAP		ฟีนอลิค		ฟลาโวนอยด์		รวมความเข้มข้น
	15 วัน	15 วัน	30 วัน	15 วัน	30 วัน	15 วัน	30 วัน	
control	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-
100	1	2	2	1	-	1	-	7
1,000	2	3	-	3	2	3	2	15
1,500	3	3	1	-	-	-	-	7
รวมแต่ละวัน	6	8	3	4	2	4	2	

หมายเหตุ จัดอันดับจากผลการวิเคราะห์ข้อมูลจากภาพที่ 3.1 ถึง 3.4

ตารางผนวกที่ 2 ผลของไคโตซานต่อการเจริญเติบโตของกวาวเครือขาว

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/ลิตร)	จำนวนวันหลังสิ้นสุดการชักนำ			
		1 วัน	7 วัน	15 วัน	30 วัน
พื้นที่ใบ (ตารางเซนติเมตร)	0	863	964	1,033	1,807
	10	817	959	1,060	2,083
	500	866	959	984	1,835
	1,000	824	971	1,061	2,102
	1,500	854	951	1,027	2,077
อัตราการสังเคราห์แสง (มิลลิโมลาห์/ตารางเซนติเมตร . วินาที)	0	17.0	19.0	22.2	22.2
	10	16.9	16.8	18.5	18.5
	500	17.0	18.6	18.6	18.6
	1,000	16.2	23.2	23.0	23.0
	1,500	16.8	17.4	18.7	18.7
น้ำหนักสด/น้ำหนักแห้ง	0	7.57	8.30	8.88	11.69 b
	10	7.10	8.15	9.18	11.39 b
	500	7.39	8.22	8.59	9.82 a
	1,000	7.09	7.57	8.76	12.21 b
	1,500	7.40	8.24	9.18	12.11 b
ปริมาณสารที่สกัดได้ (มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง)	0	2.55	2.85	3.57	4.66
	10	2.54	2.46	3.17	4.51
	500	2.56	2.83	3.21	3.92
	1,000	2.43	3.49	4.01	4.88
	1,500	2.52	2.56	4.04	4.82

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ถูกกำกับด้วยตัวอักษรเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

ตารางผนวกที่ 3 การให้คะแนนเพื่อคัดเลือกความเข้มข้นและจำนวนวันที่เหมาะสม หลังชักนำด้วยกรดซาลิไซลิก

ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/ลิตร)	DPPH		FRAP		ฟีนอลิค		ฟลาโวนอยด์		รวมความเข้มข้น
	7 วัน	15 วัน	7 วัน	30 วัน	7 วัน	15 วัน	7 วัน	15 วัน	
control	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100	3	-	3	-	3	1	3	1	14
150	-	2	-	-	2	1	2	1	8
200	1	-	2	1	-	-	-	-	4
ผลรวมแต่ละวัน	4	2	5	1	5	2	5	2	

หมายเหตุ จัดอันดับจากผลการวิเคราะห์ข้อมูลจากภาพที่ 3.5 ถึง 3.8

ตารางผนวกที่ 4 ผลของกรดซาลิไซลิกต่อการเจริญเติบโตของกวาวเครือขาว

ปัจจัยที่เกี่ยวข้อง	ความเข้มข้น	จำนวนวันหลังสิ้นสุดการชักนำ			
กับการเจริญเติบโต	(มิลลิกรัม/ลิตร)	1 วัน	7 วัน	15 วัน	30 วัน
พื้นที่ใบ (ตารางเซนติเมตร)	0	852	933	1,040	1,869
	10	797	1,010	1,092	1,986
	100	842	920	1,100	2,063
	150	886	934	996	1,916
	200	832	954	1,097	1,351
อัตราการสังเคราห์แสง (มิลลิโมลาห์/ตารางเซนติเมตร .วินาที)	0	16.6	18.5	21.5	24.8
	10	15.0	20.5	23.2	20.7
	100	16.2	21.4	20.2	26.5
	150	16.4	18.5	22.5	20.5
	200	15.7	10.8	15.4	18.2
น้ำหนักสด/น้ำหนักแห้ง	0	7.31	8.00	8.93	11.83
	10	6.56	8.39	9.22	10.87
	100	7.17	7.83	9.35	11.95
	150	7.57	8.29	8.39	10.30
	200	7.22	8.14	9.32	10.00
ปริมาณสารที่สกัดได้ (มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง)	0	0.224	0.274	0.306	0.405
	10	0.215	0.298	0.396	0.431
	100	0.274	0.327	0.350	0.620
	150	0.262	0.276	0.384	0.408
	200	0.206	0.282	0.432	0.401

ตารางผนวกที่ 5 การให้คะแนนเพื่อคัดเลือกความเข้มข้น และจำนวนวันที่เหมาะสมหลังชักนำด้วยคอปเปอร์คลอไรด์

ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/ลิตร)	DPPH				FRAP				Total phenolic				Total flavonoids				Total score A
	Day				Day				Day				Day				
	1	7	15	30	1	7	15	30	1	7	15	30	1	7	15	30	
control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	2
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	2	-	-	-	2	-	6
200	-	-	3	2	-	-	3	1	-	-	3	-	-	-	3	-	15
300	-	-	2	-	-	-	2	-	-	-	3	-	-	-	3	-	10
Total score B	-	-	6	2	-	-	6	1	-	-	9	-	-	-	9	-	

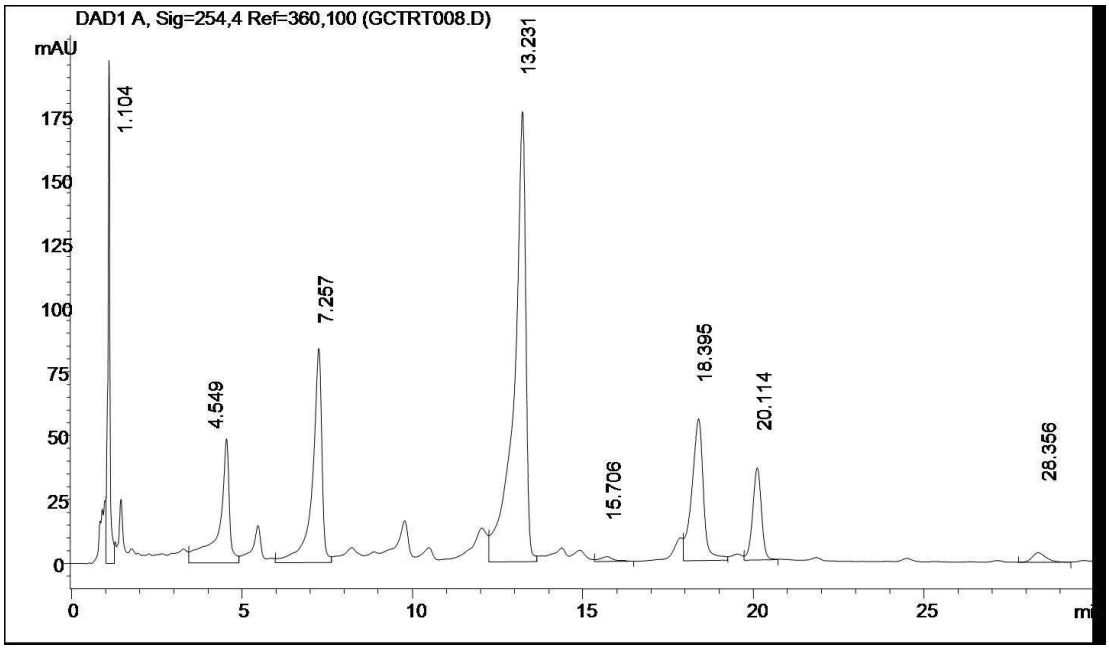
หมายเหตุ จัดอันดับจากผลการวิเคราะห์ข้อมูลจากภาพที่ 3.9-3.12

ตารางผนวกที่ 6 ผลของคอปเปอร์คลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของกวาวเครือขาว

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/ลิตร)	จำนวนวันหลังสิ้นสุดการชักนำ			
		1 วัน	7 วัน	15 วัน	30 วัน
พื้นที่ใบ (ตารางเซนติเมตร)	0	879	967	1,035	1,954
	10	851	997	1,104	1,954
	100	844	892	1,014	1,890
	200	953	977	1,020	2,226
	300	876	964	1,026	1,884
อัตราการสังเคราห์แสง (มิลลิโมลาห์/ตารางเซนติเมตร .วินาที)	0	17.2	18.0	21.9	23.9
	10	16.7	16.2	21.5	18.3
	100	16.6	16.6	23.4	21.1
	200	15.2	18.7	25.5	26.6
	300	16.4	17.5	18.9	19.9
น้ำหนักสด/น้ำหนักแห้ง	0	7.54	8.30	8.88	11.85
	10	7.29	8.19	9.49	10.74
	100	6.92	7.97	8.53	11.19
	200	7.44	8.40	8.78	10.98
	300	7.00	8.21	8.79	10.15
ปริมาณสารที่สกัดได้ (มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง)	0	0.258	0.272	0.303	0.405
	10	0.251	0.244	0.366	0.385
	100	0.249	0.251	0.399	0.442
	200	0.255	0.277	0.433	0.576
	300	0.246	0.260	0.337	0.396

ตารางผนวกที่ 7 เปรียบเทียบ peak intensity ของสารอื่น ๆ ที่ตรวจพบการเปลี่ยนแปลงกับพิวรารินิน

ทรีตเมนต์	ratio of peak intensity = mAU $_{(แต่ละ\ retention\ time)}$ / mAU $_{(ของพิวรารินิน)}$		
	retention time = 13.2 นาที	retention time = 18.3 นาที	retention time = 20.1 นาที
Water (control)	1.4	0.5	0.5
SA	1.9	0.8	0.8
$CuCl_2$	0.6	0.3	0.2
$CuCl_2$ + SA	0.4	0.1	0.1
Chitosan	3.4	0.4	0.3
Chitosan + SA	1.2	0.4	0.4
Chitosan + $CuCl_2$	3.7	1.2	1.6
Chitosan + $CuCl_2$ + SA	4.1	1.3	0.6



ตารางผนวกที่ 8 ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูปกติตลอดการทดลอง 30 วัน (มิลลิกรัม/เดซิลิตร)

การปฏิบัติ	วันที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 30
หนูปกติ	68	96	64	69	71
	64	84	56	58	66
	72	64	71	66	57
	65	66	66	66	68
ค่าเฉลี่ย	67.00	71.33	64.33	63.33	63.67
s.d.	4.36	11.02	7.64	4.62	5.86

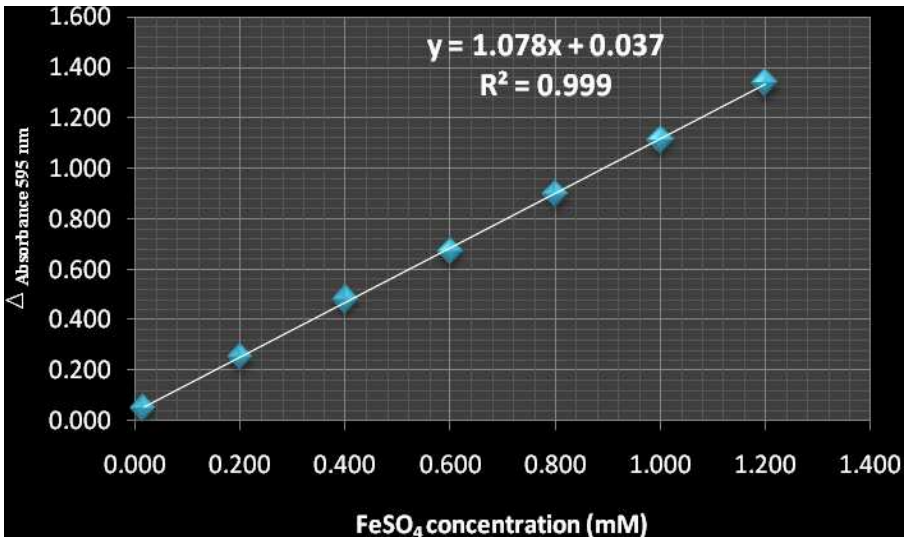
ตารางผนวกที่ 9 ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทปกติที่ได้รับสารกลุ่มต่าง ๆ และมีภาวะกลูโคสในเลือดสูงเฉียบพลัน

การปฏิบัติ	ระดับน้ำตาลในเลือด (มิลลิกรัม/เดซิลิตร)				
	0 นาที	60 นาที	120 นาที	180 นาที	240 นาที
น้ำกลั่น	63	102	91	81	75
	65	120	93	79	72
	55	130	109	75	89
	57	98	90	73	70
ค่าเฉลี่ย	60.0	112.5	95.8	77.0	76.5
s.d.	4.8	15.1	8.9	3.7	8.6
กลัยเบนคลาไมด์	64	98	46	36	31
	67	108	69	61	58
	65	111	62	46	42
	58	103	71	68	59
ค่าเฉลี่ย	63.5	105.0	62.0*	52.8*	47.5*
s.d.	3.9	5.7	11.3	14.5	13.5
กวาวเครือขาว 100 มก./กกน้ำหนักตัว	81	103	82	77	73
	64	117	89	73	74
	70	122	88	79	72
	58	104	87	79	71
ค่าเฉลี่ย	68.3	111.5	86.5	77.0	72.5
s.d.	9.8	9.5	3.1	2.8	1.3
กวาวเครือขาว 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว	69	108	80	77	71
	79	118	89	71	72
	70	111	83	76	63
	63	129	88	74	77
ค่าเฉลี่ย	70.3	116.5	85.0	74.5	70.8
s.d.	6.6	9.3	4.2	2.6	5.8

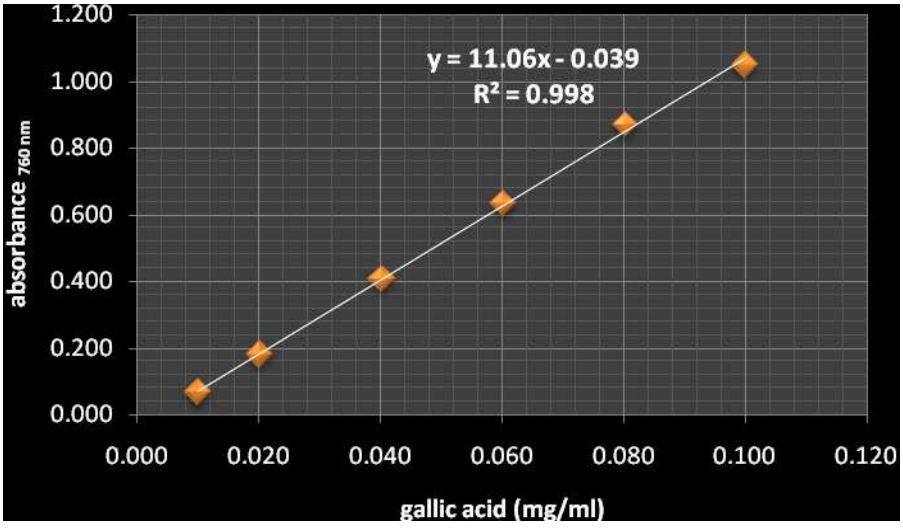
*$p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมในเวลาเดียวกัน

ตารางผนวกที่ 10 ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทเบาหวานที่ได้รับสารกลุ่มต่าง ๆ และมีภาวะกลูโคส ในเลือดสูงเฉียบพลัน

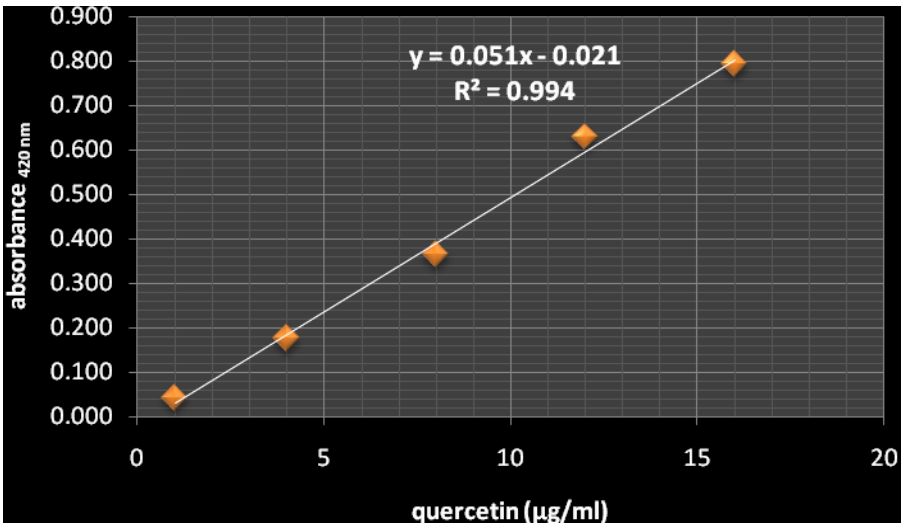
กลุ่มทดลอง	ระดับน้ำตาลในเลือด (มิลลิกรัม/เดซิลิตร)						
	0 นาที	30 นาที	60 นาที	120 นาที	180 นาที	240 นาที	300 นาที
น้ำกลั่น	299	385	566	385	341	315	327
	353	399	600	464	407	379	397
	275	295	535	465	437	377	375
	313	375	494	352	337	325	317
ค่าเฉลี่ย	310.0	363.5	548.8	416.5	380.5	349.0	354.0
s.d.	32.7	46.7	45.1	57.0	49.5	33.7	38.2
กลัยเบนคลาไมด์	375	415	600	470	439	374	363
	364	383	600	429	355	306	254
	255	268	390	256	171	137	90
	261	373	569	337	387	219	198
ค่าเฉลี่ย	313.8	359.8	539.8	373.0	338.0	259.0	226.2
s.d.	64.6	63.7	100.9	95.8	116.6	103.2	113.8
กวาวเครือขาว	254	270	406	306	253	248	122
	331	393	506	345	322	277	206
	313	382	600	407	322	299	243
	399	432	600	442	373	338	322
ค่าเฉลี่ย	324.3	369.3	528.0	375.0	317.5	290.5	223.3
s.d.	59.7	69.6	92.6	61.0	49.3	37.9	83.1



ภาพผนวกที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ $FeSO_4$ กับ ผลต่างของค่าดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร



ภาพผนวกที่ 2 กราฟมาตรฐานของกรดแกลิค

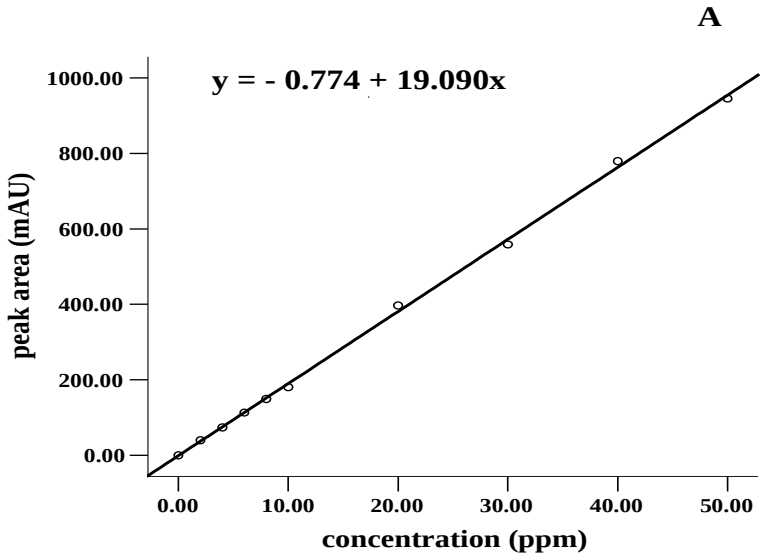


ภาพผนวกที่ 3 กราฟมาตรฐานของเคอร์ซีติน

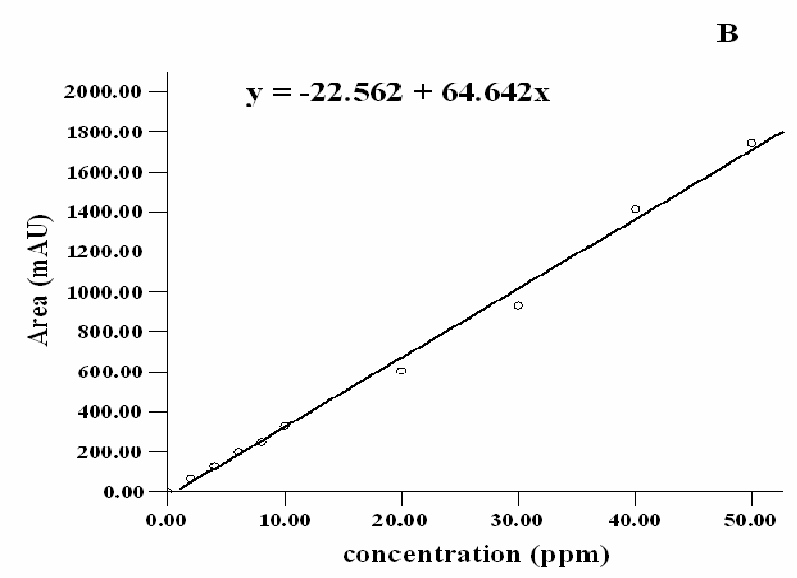
ภาพผนวกที่ 4 ต้นกวาวเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber

ภาพผนวกที่ 5 โรงเรือนที่ใช้ปลูกกวาวเครือขาว

ภาพผนวกที่ 6 ต้นกวาวเครือขาวอายุ 1 ปี ที่ปลูกในแปลงทดลอง



ภาพผนวกที่ 7 กราฟมาตรฐานของพิวรารินิน



ภาพผนวกที่ 8 กราฟมาตรฐานของ จีนิสทีอิน

เลขที่ 12 / 2551

ใบอนุญาตให้ใช้สัตว์

ในงานวิจัย งานทดสอบ งานผลิตชีววัตถุ และงานอื่น ๆ

ใบอนุญาตนี้ให้ไว้เพื่อแสดงว่าคณะกรรมการกำกับดูแลการใช้สัตว์เพื่อการศึกษาวิจัย ซึ่งมีหน้าที่กำกับและดูแลจรรยาบรรณการใช้สัตว์ในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ให้เป็นไปตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์ของสภาวิจัยแห่งชาติ ได้พิจารณาโครงการวิจัยเรื่อง **ผลของสารชักนำต่อผลผลิตและปริมาณโซฟลานอยด์ของหัวกวาวเครือขาว และฤทธิ์ของสารในการลดระดับกลูโคสในเลือดของหนูแรท** ซึ่ง นายบุญร่วม คิดก้า เป็นหัวหน้าโครงการ โดยมี ผศ. ดร. ยุวดี มานะเกษม เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาและเป็นผู้ที่ได้รับอนุญาตให้ดำเนินการตามโครงการนี้ได้ และมีเงื่อนไขว่าผู้ใช้สัตว์ในความรับผิดชอบของโครงการต้องปฏิบัติตามข้อมูลที่ระบุในใบขออนุญาต และโครงการอย่างเคร่งครัด

กรณีที่มีการปฏิบัติอย่างหนึ่งอย่างใดนอกเหนือจากที่กรอกไว้ในข้อมูลและที่เสนอไว้ในโครงการ คณะกรรมการฯ จะดำเนินการงดใบอนุญาตนี้ และแจ้งหน่วยงานที่เกี่ยวข้องทราบ

(ศาสตราจารย์ นาวาอากาศโท ดร. สราวุฒิ สุจิตจร)
ประธานคณะกรรมการกำกับดูแลการใช้สัตว์เพื่อการศึกษาวิจัย
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วันที่ออกใบอนุญาต 6 สิงหาคม 2551
วันที่หมดอายุ 5 สิงหาคม 2553

111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000 โทรศัพท์ (044) 223000 โทรสาร (044) 224070
SURANAREE UNIVERSITY OF TECHNOLOGY
111 UNIVERSITY AVENUE, SUB DISTRICT SURANAREE, MUANG DISTRICT, NAKHON RATCHASIMA 30000, THAILAND Tel. (044) 223000 Fax. (044) 224070

ประวัติผู้เขียน

นายบุญร่วม คิดค้า เกิดวันที่ 21 มีนาคม พ.ศ. 2520 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช จากสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา ในปี พ.ศ. 2542 ทำงานในตำแหน่งนักวิชาการเกษตรประจำฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในปี พ.ศ. 2542-2543 ศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ด้วยทุนพัฒนาอาจารย์วิทยาเขตสารสนเทศของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในปี พ.ศ. 2543-2547 และศึกษาต่อในระดับปริญญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ด้วยทุนพัฒนาอาจารย์วิทยาเขตสารสนเทศพะเยา มหาวิทยาลัยนเรศวร ในปี พ.ศ. 2547-2552