



รายงานการวิจัย

การตรวจสอบความเป็นพิษและฤทธิ์ทางชีวภาพของว่านขันหมาก
(*Aglaonema simplex* BL.)

Evaluation of toxicity and biological activities of Wan Khan Mark
(*Aglaonema simplex* BL.)

ผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผศ. ดร. เบ็ญจมาศ จิตรสมบูรณ์

สาขาวิชา ปรีคลินิก

สำนักวิชา วิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2550
ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กันยายน/2560

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2550-2552 ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ความสำคัญและให้ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยนี้อย่างต่อเนื่องรวมทั้งความอดกลั้นที่โครงการนี้ล่าช้ากว่ากำหนด ขอขอบคุณบุคลากรของศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี บุคลากรในสถาบันวิจัยและพัฒนา เพื่อนคณาจารย์และบุคลากรในสาขาวิชาปรีคลินิก มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่เกี่ยวข้องทุกท่าน สำหรับสถานที่ทำการวิจัย อุปกรณ์และเครื่องมือต่าง ๆ ที่ใช้ในงานวิจัย ตลอดจนการอำนวยความสะดวกและบริการในทุก ๆ ส่วนที่เกี่ยวข้อง รวมทั้งข้อชี้แนะในโครงการวิจัยต่าง ๆ ผู้วิจัยขอขอบคุณคุณแม่ซีที่สำนักปฏิบัติธรรมแม่ชีภูหลวง อ ปักธงชัย โดยเฉพาะหลวงแม่ราตรี ตูรงควัธน์ แม่ชีกอบแก้ว ไชยกิตติ แม่ชีสมพร และคุณแม่ซีอื่น ๆ ทุกท่านที่เมตตาให้ข้อมูลและช่วยเหลือเกี่ยวกับตัวอย่างของวุ้นชันหมาก ถ้าปราศจากความกรุณาชี้แนะ โครงการวิจัยนี้จะเกิดขึ้นไม่ได้ ขอขอบคุณ ผศ. ทนพญ. ดร. วิไลรัตน์ ถิ่นอนันต์ศักดิ์ศิริ สำหรับข้อแนะนำในการทดสอบฤทธิ์ก่อภูมิแพ้ ขอขอบคุณ ดร. รัตนา เกียรติทรงชัย ซึ่งในขณะนั้นเป็นผู้ช่วยวิจัยของโครงการ ที่ทำงานอย่างแข็งขันและอดทน ช่วยให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ ขอขอบคุณลูกศิษย์ทุกคน คุณเบญจวรรณ คุณบุณฑร คุณเบญจมาศ ศาลางาม ดร. พัชรวรรณ สิทธิศาสตร์ และคุณเอกสิทธิ์ อักษร ที่มีส่วนผลักดันให้โครงการนี้สำเร็จลุล่วงไปได้โดยตรง หรือ ทางอ้อม

ท้ายสุดขอกราบบูชาพระคุณของคุณพ่อ-คุณแม่ ที่ให้ความรัก ความอบอุ่น อบรมสั่งสอนและดูแลลูกอย่างดีเยี่ยม ขอกราบขอบพระคุณครูอาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้ ความรักและเมตตาอบรมสั่งสอนศิษย์เสมอมา ท้ายสุดขอขอบคุณครอบครัว รศ. ดร. ทวีช จิตรสมบูรณ์ และ นายโพธิพล จิตรสมบูรณ์ที่เป็นขวัญและกำลังใจ เป็นน้ำหล่อเลี้ยงให้มีพลังในการทำงาน ทำให้สามารถฟันฝ่าอุปสรรคทั้งปวงจนงานสำเร็จได้ในท้ายที่สุด

เบ็ญจมาศ จิตรสมบูรณ์
หัวหน้าโครงการวิจัย

บทคัดย่อ

ว่านขันหมาก (*Aglaonema simplex* BL.) เป็นพืชในวงศ์ Araceae ที่ได้รับการยกย่องว่าเป็นพืชมหัศจรรย์ มีสรรพคุณทางเภสัชมากมาย แต่ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีววิทยา และการศึกษาความเป็นพิษของว่านขันหมาก งานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาสารพฤกษเคมี ฤทธิ์ด้านออกซิเดชั่น ด้านภูมิแพ้ และด้านการอักเสบของสารสกัดว่านขันหมาก รวมถึงการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์เพื่อประเมินความเป็นพิษจากการใช้ว่านขันหมากในระยะยาว ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบของว่านขันหมากที่ได้จากการสกัดผลอบแห้งบดโดยใช้ 95% เอทิลแอลกอฮอล์มีสารประกอบฟีนอลิก เทียบเท่าน้ำหนักกรดแกลลิก 56.73 ± 0.37 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัดแห้ง มีสารประกอบฟลาโวนอยด์ เทียบเท่าน้ำหนักคาเทชิน 5.03 ± 0.03 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัดแห้ง มีสารโปรแอนโทไซยานิดินเทียบเท่าน้ำหนักคาเทชิน 7.02 ± 0.12 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัดแห้ง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมื่อประเมินโดยวิธี DPPH มีค่า IC_{50} เท่ากับ 399.77 ± 15.33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า FRAP เทียบเท่าน้ำหนักวิตามินซี 44.07 ± 0.59 ไมโครกรัมต่อกรัมสารสกัดแห้ง ในช่วงความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์โดยตรง (125-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สารสกัดสามารถลดการสร้างอนุมูลอิสระ (Reactive oxygen species) ภายในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 เมื่อถูกชักนำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่นโดย *tert*-Butyl hydroperoxide และติดตามโดยใช้ DCFH-DA ที่สามารถให้สารเรืองแสง สารสกัดที่ความเข้มข้น 125-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ต้านภูมิแพ้ สามารถยับยั้งการการหลั่งเอนไซม์ β -hexosaminidase ที่หลั่งร่วมกับสารก่อภูมิแพ้อื่น ๆ จากเซลล์ของ rat basophil leukemia (RBL-2H3) เมื่อถูกกระตุ้นจากแอนติเจนให้หลั่งสารก่อภูมิแพ้จากแกรนูล (degranulation) ความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งการหลั่ง β -hexosaminidase แปรผันตามความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ นอกจากนี้ สารสกัดที่ความเข้มข้น 125-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรยังสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ควบคู่กับการลดระดับการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS และ COX-2 ใน RAW 264.7 เซลล์ที่กระตุ้นด้วย LPS (1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ IFN- γ (25 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) การศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดพบว่า สารสกัดที่ปริมาณ 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อจานเพาะเชื้อ ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ เมื่อทดสอบโดยวิธีของแอมส์ (Ames test)

โดยรวมการศึกษาชี้ชัดว่า สารสกัดจากผลของว่านขันหมากเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ ตามธรรมชาติที่มีราคาถูก และมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่ควรค่าต่อการศึกษาและพัฒนาให้เป็นผลิตภัณฑ์ยาจากธรรมชาติหรือเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต่อไปในอนาคต

Abstract

Wan Khan Mak (*Aglaonema simplex* BL.; WKM) is the plant in Araceae family that has been referred as a miracle plant possessing several ethno-pharmacologic properties; however, neither research in its claimed biological properties nor its toxicity have been conducted. The present study aimed to investigate the phytochemicals and explore the antioxidant, anti-allergic and anti-inflammatory activities of 95% ethanol crude extract of dried fruits of WKM. The results suggested that the yield of WKM extraction was 12.65% and the total contents of phenolics, flavonoids, and proanthocyanidins were 56.73 ± 0.37 mg GAE/g dry extract, 5.03 ± 0.03 mg CE/g dry extract and 7.02 ± 0.12 mg CE/g dry extract, respectively. For antioxidant studies, the IC_{50} of DPPH scavenging activity of the extract was 399.77 ± 15.33 μ g/ml and the FRAP value was 44.07 ± 0.59 μ g AEAC/g dry extract. At non-cytotoxic concentrations (125-500 μ g/ml), WKM extract effectively attenuated intracellular reactive oxygen species generation in *tert*-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress in macrophage RAW264.7 cells, as monitored by DCFH-DA fluorescent probe. The anti-allergic activity of the extract was suggested by a dose-dependent suppression of the release of β -hexosaminidase, the enzyme that co-release with various preformed allergic mediators, upon antigen-induced degranulation of rat basophil leukemia RBL-2H3 cells. In addition, WKM at 125-500 μ g/ml also strongly suppressed NO production in concomitant with iNOS and COX-2 suppression in LPS plus IFN- γ -activated RAW 264.7 cells. The mutagenic study revealed that the extract at 500 and 1,000 μ g/plate had no mutagenic activity in the Ames assay.

Overall, the present data suggest that WKM extract has a potential as an effective, low-cost source of natural antioxidants with many pharmaceutical properties and is worthwhile to be developed as natural chemopreventive products or nutraceuticals in the future.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง.....	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1-4
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	4
ขอบเขตของการวิจัย.....	4-5
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย.....	5
บทที่ 2 การวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
อนุมูลอิสระ	6-20
Nitric oxide.....	20-27
ว่านขันหมาก.....	27-32
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
สารเคมี น้ำ และวัสดุที่ใช้ในการวิจัย.....	33-35
เครื่องมือและอุปกรณ์ การวิจัย.....	35
สถานที่ทำการวิจัย.....	36-37
วิธีดำเนินการวิจัยที่เกี่ยวกับเซลล์สายพันธุ์.....	37-38
วิธีดำเนินการวิจัยที่เกี่ยวกับแบคทีเรีย.....	38-39
การเตรียมสารสกัดจากว่านขันหมาก.....	39-40
ปริมาณของสารฟลูกษเคมีของว่านขันหมาก.....	40-42
ฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลว่านขันหมาก.....	42-45
การหาความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์.....	46-48
การหาปริมาณ Nitrite	48-49
การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน iNOS และ COX-2	49-52

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
การทดสอบการต้านการหลั่งสารก่อภูมิแพ้.....	52-53
การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดย Ames test.....	53-54
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
การสกัดผลว่านชันหมาก.....	55
ปริมาณฟีนอลิก เฟโวนอยด์ และ โพรแอนโทไซยานิดิน ของสารสกัดว่านชันหมาก.....	55-56
คุณสมบัติการต้านออกซิเดชันจากสารสกัดผลว่านชันหมาก.....	56-60
การศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดว่านชันหมากที่ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ RAW264.7 และ RBL-2H3.....	60-63
การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ NO ของ RAW264.7 โดยสารสกัดว่านชันหมาก.....	64-66
การยับยั้งเอ็นไซม์ iNOS และ COX-2 ในเซลล์ RAW264.7 โดยสารสกัดจากว่านชันหมาก.....	66-69
การทดสอบการต้านการหลั่งสารก่อภูมิแพ้.....	69-71
การทดสอบการกลายพันธุ์ของว่านชันหมาก.....	71-73
บทที่ 5 การวิจารณ์	74-84
บทที่ 6 สรุป	
สรุปผลการวิจัย	85-86
ข้อเสนอแนะ	86-88
บรรณานุกรม	89-104
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	105-115
ภาคผนวก ข	116-117
ภาคผนวก ค	118-121
ภาคผนวก ง.....	122-134
ประวัติผู้วิจัย.....	135

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดง ROSs และ RNSs ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นระหว่างกระบวนการ metabolism.....	7-8
2.2 เอนไซม์ที่สร้าง ROSs ใน peroxisomes.....	10
2.3 การเกิด ROSs จากแหล่งภายนอกร่างกาย.....	11
2.4 สารต้านออกซิเดชั่นที่จัดเป็นเอนไซม์ และไม่ใชเอนไซม์ที่พบในร่างกาย.....	12
2.5 อวัยวะที่เกิดความเสียหายและโรค ที่เกี่ยวข้องซึ่งชักนำโดย ภาวะเครียดออกซิเดชั่น.....	17
2.6 แสดงสารสกัดจากสมุนไพรรพีชผักผลไม้และกลไกต้านมะเร็งในระดับ โมเลกุล.....	19
2.7 ตัวอย่างสารสกัดจากพืชสมุนไพรรพีชผลไม้ ที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง โดยการควบคุมผ่าน epigenetic (epigenetic modulators)	20
2.8 ลักษณะของ NOS ทั้ง 3 isoform	24
2.9 ความสัมพันธ์ของ NOS isoform และการเกิดโรคต่าง ๆ.....	25
4.1 ปริมาณรวมของสารฟีนอลิก ปริมาณรวมของสารเฟโวนอยด์ และปริมาณของสารแอนโทไซยานิน จากสารสกัดผลว่านชันหมาก.....	56
4.2 การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากผลว่านชันหมากและ สารมาตรฐานอื่นที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น quercetin, catechin และ trolox.....	57
4.3 กำลังความสามารถในการรีดิวซ์ (Ferric reducing ability power) ของสารสกัดว่านชันหมากเมื่อวัดโดย FRAP assay.....	58
4.4 ผลของสารสกัดว่านชันหมากต่อการกลายพันธุ์ของ <i>Salmonella typhimurium</i> strains TA98 และ TA 100 เมื่อทดสอบ โดยไม่มี และ มีส่วนผสม S9.....	73

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 การสร้าง ROSs ใน mitochondria	9
2.2 แสดงระยะของการเกิด lipid peroxidation	14
2.3 ระยะ initiation และ propagation ของการเกิด lipid peroxidation ของ arachidonic acid	15
2.4 L-arginine ถูกเปลี่ยนเป็นสารตัวกลาง NO-hydroxy-L-arginine (NOHLA).....	23
2.5 แสดงส่วนที่เป็นลำต้น (ก) ใบ (ข) ดอก (ค) และผลสุก (ง) ของต้นพรหมตีนสูงหรือว่านขันหมาก.....	29
4.1 การกำจัดอนุมูลอิสระที่สร้างขึ้นภายในเซลล์ RAW264.7 โดยสารสกัดจากผลว่านขันหมาก.....	59
4.2 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิด ROS หรือ DCF ของสารสกัดว่านขันหมาก ภายในเซลล์ RAW264.7.....	60
4.3 ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของ RAW264.7 เซลล์ที่บ่มร่วมกับสารสกัดว่านขันหมาก (WKM) หรือ 10 mM quercetin (Q) เป็นระยะเวลา 24 ชม.และ ประเมินเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตรอดด้วยวิธี MTT	61
4.4 ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของ RAW264.7 เซลล์ที่บ่มร่วมกับสารสกัดว่านขันหมาก (WKM) หรือ 10 mM quercetin (Q)เป็นระยะเวลา 24 ชม.และประเมิน เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตรอดด้วยวิธี trypan blue.....	62
4.5 ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของ RBL-2H3 เซลล์ที่บ่มร่วมกับสารสกัดว่านขันหมาก (WKM) หรือ 10 mM quercetin (Q) เป็นระยะเวลา 24 ชม.และประเมิน เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตรอดด้วยวิธี MTT	63
4.6 ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของ RBL-2H3 เซลล์ที่บ่มร่วมกับสารสกัดว่านขันหมาก (WKM) หรือ 10 mM quercetin (Q) เป็นระยะเวลา 24 ชม.และประเมิน เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตรอดด้วยวิธี trypan blue.....	63
4.7 ผลของว่านขันหมากต่อการสร้าง NO ของ RAW 264.7 เซลล์ เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ	65
4.8 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง NO ของว่านขันหมากในเซลล์ RAW264.7 ที่ถูกชักนำให้เกิดการสังเคราะห์ขึ้นด้วย 1 mg/ml LPS และ 25 U/ml IFN- γ	66

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.9 ผลของวุ้นชั้นหมาก ต่อการแสดงออกของโปรตีน iNOS ในเซลล์ macrophage RAW264.7 ที่ถูกชักนำให้สังเคราะห์ขึ้นโดยการ กระตุ้นด้วย 1 mg/ml LPS และ 25 U/ml IFN- γ เป็นเวลา 24 ชม.....	68
4.10 ผลของวุ้นชั้นหมาก ต่อการแสดงออกของโปรตีน COX-2 ในเซลล์ macrophage RAW264.7 ที่ถูกชักนำให้สังเคราะห์ขึ้นโดยการ กระตุ้นด้วย 1 mg/ml LPS และ 25 U/ml IFN- γ เป็นเวลา 24 ชม.	69
4.11 ผลของสารสกัดวุ้นชั้นหมากต่อการชักนำให้เกิดการหลั่งของ β -hexosaminidase จาก granule ของ basophilic RBL-2H3 เซลล์ เมื่อถูกกระตุ้น โดยแอนติเจน DNP-BSA	71

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ในปัจจุบัน แม้งานวิจัยของพืชสมุนไพรไทยจะมีความก้าวหน้าและพัฒนาขึ้นมาก แต่การศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับว่านมีปริมาณจำกัด เมื่อเทียบกับพืชสมุนไพรกลุ่มอื่น ทั้งที่ตำรายาไทยของว่านหลายเล่ม เช่น แพทย์ศาสตร์สงเคราะห์ (โดยพระยาพิศประสาทเวช ในปี พ.ศ. 2452) แพทย์ตำบลด (โดยพระยาแพทย์พงศา วิสุธาธิบดี ในปี พ.ศ. 2464) ตำรากระบิลว่าน (โดยหลวงประพัฒน์สรรพกร ในปี พ.ศ. 2476) และว่านกับคุณลักษณะ (โดยนายเลื่อน กัณหะกาญจนะ) ได้ระบุว่าว่านเป็นพืชที่มีคุณภาพ ว่านหลายชนิดเป็นพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์เป็นยา สามารถป้องกันอันตราย พิษสัตว์กัดต่อย ยาเบื่อเมา ยาสิ่ง ยาเสพติด สามารถดับพิษร้ายให้หาย และเป็นยาอายุวัฒนะ ในขณะที่ว่านบางชนิดอาจใช้เป็นเครื่องรางของขลัง บันดาลให้เกิดโชคลาภ ทำมาค้าขึ้น ร่ำรวยเงินทอง เมตตามหานิยม มีคนรักใคร่ เคารพนับถือ หรือว่านบางชนิดปลูกเป็นไม้ประดับ เป็นต้น (อภิญา สันยาสิ, 2548) ในบรรดาว่านที่มีการจัดแบ่งไว้ 34 วงศ์ 512 สกุล และกว่า 1700 พันธุ์ มีว่านที่น่าสนใจมากมาย และหนึ่งในจำนวนนั้น ได้แก่ ว่านขันหมากซึ่งตำราแพทย์โบราณจัดให้เป็นพืชมหัศจรรย์ เพราะเป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณด้านยาอายุวัฒนะชั้นเยี่ยม ในตำราระบุว่าหากผู้ใดกินผลสุกของว่านขันหมาก เป็นประจำทุกวัน วันละ 4 ผลก่อนนอน จะทำให้ผู้นั้นคงความเป็นหนุ่มสาว ไม่รู้จักแก่ อายุยืน เนื้อหนังเต่งตึง ไม่เหี่ยวยุบ ฟันทน ไม่หักหลุด ผมไม่หงอก ทำให้เป็นผู้ทรงเสน่ห์แก่ผู้พบเห็น มีพลังกำลังมาก เดินเห็นคล่องแคล่ว ไม่รู้จักเมื่อยขบ จนมีคำกล่าวว่หากผู้ใดได้ครอบครองว่านขันหมากที่ออกผลสุก เปรียบเสมือนมีของขวัญเป็นสมบัติ (สวนพฤกษศาสตร์, 2548; อภิญา สันยาสิ, 2548)

การศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับว่านขันหมากมีน้อยมาก เนื่องจากเป็นพืชที่ค่อนข้างหายาก ส่วนที่เป็นผลอาจไม่ได้เกิดทุกปี โดยเฉพาะถ้าว่านขึ้นอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ในปัจจุบัน ชนชาวไทยหลายกลุ่มเริ่มตระหนักถึงความมหัศจรรย์ของว่านขันหมาก และได้กล่าวขวัญถึงสรรพคุณทางยาของว่านขันหมากมากมายในโลกออนไลน์ ที่เรียกว่านขันหมากว่า “ว่านขันหมากเศรษฐกิจ” ดังเช่นชีวประวัติของหลวงพ่อดำ สยบโรค ที่มีอายุเกือบแปดสิบปี แต่ยังมีร่างกายแข็งแรงและคล่องแคล่วว่องไวเหมือนคนหนุ่ม ไม่มีอาการปวดเมื่อยอ่อนเพลีย หลวงพ่อให้สัมภาษณ์ว่า เพราะได้ฉันทว่านขันหมากติดต่อกัน โดยฉันทวันละเม็ด นอกจากนั้น มีตัวอย่างหมอยา หมอนวด และผู้คนอื่น ๆ ที่ระบุว่าการกินว่านขันหมากช่วยให้ร่างกายที่เคยถดถอย กลับฟื้นแข็งแรงขึ้น คนที่สามารถบอกสรรพคุณว่านขันหมากได้ดีที่สุดคือ

คนที่ร่างกายอ่อนแอ หรือมีปัญหาสุขภาพเกี่ยวกับโรคที่เกิดจากความเสื่อมของร่างกายที่ไม่ใช่โรคติดต่อ (Non-communicable disease; NCD) เช่น ผู้ป่วยที่เป็นโรคเอ็นหัดหนึ่งแข็ง มีลักษณะเหมือนผู้ป่วยโรคเอดส์ แต่ภายหลังบริโภคว่านขันหมาก วันละ 3 เม็ด ครบ 9 วัน ร่างกายกลับเปลี่ยนแปลงดีขึ้น (อภิญาสันยาสี, 2548) ในปัจจุบัน สรรพคุณของว่านขันหมากเป็นที่โจษจันในกลุ่มผู้บริโภค โดยเริ่มต้นขยายวงกว้างจากกลุ่มชนท้องถิ่นสู่ชนกลุ่มอื่นที่ได้ยินกิตติศัพท์ของว่านขันหมาก และต้องการทดลองใช้ ว่านขันหมากจัดเป็นพืชสมุนไพรหนึ่งที่มีผู้แสวงหาและมีความต้องการเพิ่มมากขึ้นทุกปี โดยขยายจากจังหวัดต่าง ๆ เช่น จากเชียงราย แพร่ สุพรรณบุรี และกรุงเทพฯ เป็นต้น ในโลกออนไลน์ มีการแชร์ถึงความมหัศจรรย์ และสรรพคุณของว่านขันหมากมากมาย เช่น การใช้ว่านขันหมากช่วยให้แลดูหนุ่มสาวขึ้น เพราะผมที่ดูหงอกก็กลับดำดำ ผิวพรรณที่เคยเหี่ยวยุบก็กลับเต่งตึง มีน้ำมีนวลขึ้น ว่านขันหมากได้รับการกล่าวอ้างจากหมอพืชสมุนไพรว่ามีสรรพคุณดูแลรักษาระบบน้ำเหลือง ดูแลไขกระดูก ปรับปรุงการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน กระตุ้นการไหลเวียนของเลือด รักษาโรคมะเร็ง และโรคเมเร็ง เป็นต้น (อานนท์ แก้วมัน 2559, พิทักษ์ แสงเนียม 2558) เมื่อ 6-7 ปีที่แล้ว ผลว่านขันหมากมีราคาแพง ในเชียงรายจึงมีการซื้อขายกันในราคาสูง เช่นระหว่าง 50-100 บาทต่อว่านขันหมากเพียง 1 ผล และบ่อยครั้งที่ไม่สามารถหาซื้อได้ แต่ในปัจจุบัน หมอพืชสมุนไพรได้มีการนำต้นว่านมาทดลองปลูกและขยายพันธุ์ ราคว่านขันหมากจึงถูกลงเมื่อเทียบกับหลายปีก่อน แหล่งจำหน่ายหลักของว่านขันหมากในโลกออนไลน์เป็นของหมอพืชสมุนไพรซึ่งมีการจำหน่ายว่านขันหมากในหลายรูปแบบ ซึ่งแต่เดิมที่ขายเฉพาะผลสดซึ่งมีการจำหน่ายเฉพาะช่วงฤดูกาล (1 กิโลกรัมซึ่งมีประมาณ 850 ถึง 1,000 ลูก ราคาประมาณ 2,000 บาท) ในปัจจุบันมีการปรับเปลี่ยนรูปแบบการจำหน่ายเพิ่มเติมเพื่อให้สามารถจำหน่ายได้ตลอดปี โดยนำผลมาตากแห้ง บดและบรรจุแคปซูล (80 แคปซูลประมาณ 1200-1500 บาท) หรือเอาผลสดมาดองน้ำผึ้ง (109 เม็ดประมาณ 1,250 บาท) ตลอดจนขายต้นว่านขันหมาก (ราคาประมาณ 100 บาทต่อต้น) แต่ถ้าซื้อว่านขันหมากจากพ่อค้ารายย่อย ที่ไม่ใช่หมอพืชสมุนไพร ราคาก็ค่อนข้างสูง เช่น ขายผลสดลูกละ 15-20 บาท หรือตกกิโลกรัมละ 15,000-20,000 บาท หรือลูกว่านดองน้ำผึ้ง ซีดละ 600-800 บาทโดยประมาณ เป็นต้น (อานนท์ แก้วมัน 2559; พิทักษ์ แสงเนียม 2558)

ผู้วิจัยได้มีโอกาสสัมภาษณ์แม่ชีที่นำเชื่อถือท่านหนึ่งซึ่งมีประสบการณ์ตรงจากการบริโภคว่านขันหมากเอง และรู้จักผู้อื่นที่ทดลองบริโภคว่านขันหมาก แม่ชีกล่าวถึงสรรพคุณของว่านขันหมากว่าดีเยี่ยม เพราะมีตัวอย่างแม่ชีหลายท่านที่บริโภคผลว่านขันหมากแล้ว ทำให้ร่างกายแข็งแรง ไม่ปวดเมื่อยและอ่อนเพลียเหมือนอย่างเคย มีเรี่ยวแรงในการทำงาน โดยเฉพาะการขึ้น-ลงเขาเพื่อไปเก็บว่าน นอกจากนั้น แม่ชีท่านนั้นยังเชื่อว่า ว่านขันหมากมีสรรพคุณช่วยรักษาโรคมะเร็ง เนื่องจากเคยส่งว่าน

ชันหมากตามคำร้องขอของผู้ป่วยที่เป็น โรคมูมิแพ้อย่างรุนแรงทดลองบริโกล เนื่องจากผู้ป่วยรายนั้นไม่สามารถหาซื้อว่านได้ และในช่วงระยะเวลานั้น ว่านชันหมากหายากกว่าในปัจจุบันมากและมีราคาแพง ผู้ป่วยรายงานว่า ภายหลังการบริโกลว่านชันหมากติดต่อกันเพียงไม่กี่วัน อาการภูมิแพ้ของเขาบรรเทาลงอย่างชัดเจน ผู้วิจัยได้ติดต่อผู้ป่วยโรคมูมิแพ่ที่แม่ชีอ้างถึง จากการสัมภาษณ์ผู้ป่วย และญาติใกล้ชิดผู้ดูแลผู้ป่วยที่จังหวัดเชียงราย ได้ข้อมูลยืนยันถึงสรรพคุณของว่านชันหมาก และผู้ป่วยมีความพึงพอใจในว่านชันหมากมาก ผู้ป่วยระบุว่า ว่านชันหมากได้ช่วยบรรเทาอาการ โรคมูมิแพ่ได้ดีกว่ายารักษาโรคมูมิแพ่แผนปัจจุบันหลายชนิดที่เขาใช้อยู่ในปัจจุบันเขาจึงใช้ว่านชันหมากแทนการใช้ยารักษาโรคมูมิแพ่แผนปัจจุบัน อย่างไรก็ตาม ผู้ป่วยมีความกังวลใจเกี่ยวกับผลของการบริโกลว่านชันหมากในระยะยาวว่าอาจก่อให้เกิดพิษ หรือผลอันไม่พึงประสงค์ แม้กระนั้น ผู้ป่วยกล่าวว่าเขายอมเสี่ยงต่อการบริโกลว่านชันหมาก เพราะเมื่อใช้ว่านชันหมาก เขาไม่ต้องทนทรมานกับอาการของโรคมูมิแพ่อีกต่อไป ซึ่งต่างจากยารักษาโรคมูมิแพ่แผนปัจจุบันหลายชนิดที่เขาเคยใช้มาเป็นระยะเวลานาน แต่ยาเหล่านั้นไม่เคยมีประสิทธิภาพเพียงพอในการบรรเทาอาการภูมิแพ้ของเขา ในช่วงเวลาที่สัมภาษณ์ เขาได้ใช้ว่านชันหมากมาเป็นระยะเวลาเกือบ 6 เดือน และยังไม่ได้แสดงอาการเป็นพิษแต่อย่างใด

ข้อมูลเบื้องต้นจูงใจให้ผู้วิจัยมีความสนใจในการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของว่านชันหมาก เพราะน่าจะเป็นพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายด้าน ประกอบกับข้อมูลที่ชี้แนะว่า ผลว่านชันหมากที่เก็บจากแหล่งของแม่ชีน่าจะมีศักยภาพสูงในสรรพคุณตามที่อ้างในตำรา เพราะมีตัวอย่างของบุคคลหลายคนที่ได้ทดลองบริโกลและได้ผลดี จากการสืบค้นฐานข้อมูลทั้งภายในและภายนอกประเทศ ยังไม่มีรายงานการวิจัย หรือการศึกษาเกี่ยวกับความเป็นพิษ หรือฤทธิ์ทางชีวภาพของว่านชันหมากแต่อย่างใด นอกจากนี้มีการกล่าวอ้างถึงความมหัศจรรย์และสรรพคุณทางยาของว่านชันหมากในหมู่ผู้บริโกล และมีผู้ให้ความสนใจในการหาซื้อว่านชันหมาก รวมทั้งหามาเพาะเลี้ยงมากขึ้นในโลกออนไลน์ ซึ่งสังเกตได้จากเริ่มมีข้อมูลของว่านชันหมากใน web site ต่าง ๆ มากขึ้น ทั้งฐานข้อมูลที่เป็นภาษาไทย และภาษาอังกฤษ และเริ่มมีการลงโฆษณาขายว่านชันหมาก และพืชในตระกูลใกล้เคียงใน web site ต่าง ๆ เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะชาวญี่ปุ่นที่ให้ความสนใจและแสวงหาว่านชันหมากมาบริโกล การศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับพิษและฤทธิ์ทางชีวภาพของว่านชันหมากจึงสมควรได้รับการสนับสนุนโดยเร่งด่วน เพราะจัดเป็นสมุนไพรที่ยังไม่เคยมีการศึกษาสรรพคุณและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาแต่อย่างใด นอกจากการอ้างสรรพคุณในตำราโบราณ และหลักฐานเบื้องต้นที่สนับสนุนสรรพคุณของว่านโดยการเล่าต่อกันมาในหมู่ผู้บริโกลที่มีประสบการณ์จากการใช้ว่าน ผู้วิจัยมีความเชื่อมั่นว่าว่านชันหมากเป็นพืชสมุนไพรที่มีศักยภาพสูง น่าจะได้รับการพิจารณานำมาศึกษาเพื่อพัฒนาให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ก่อให้เกิดประโยชน์ และ

สร้างรายได้ให้กับท้องถิ่น และประเทศได้ในอนาคต และอาจเป็นหนทางเบื้องต้นของการค้นพบยารักษาโรคมะเร็งที่มีกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างจากยาที่จำหน่ายในแผนปัจจุบัน ข้อมูลที่ได้จากโครงการวิจัยน่าจะมีผลกระทบสูง และเป็นประโยชน์อย่างแท้จริงและเกิดผลทันที เพราะอย่างน้อยที่สุด ข้อมูลเกี่ยวกับความเป็นพิษของว่าน รวมทั้งสรรพคุณจะเป็นประโยชน์ต่อการตัดสินใจในการใช้ว่านของผู้บริโภคที่มีความไว้วางใจเพิ่มขึ้น และรัฐบาลไทยจะได้ไม่เสียใจภายหลังว่าพืชสมุนไพรไทย และภูมิปัญญาของบรรพบุรุษไทยโบราณกลายเป็นสิทธิบัตรของชนต่างชาติ ดังตัวอย่างของสมุนไพรอื่นที่เคยเกิดขึ้นในอดีต

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้เสนอขอเพื่อตรวจสอบหาความเป็นพิษของผลว่านชันหมาก พร้อมทั้งทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของว่านชันหมากหลายด้านพร้อมกัน โดยมีวัตถุประสงค์ย่อยดังนี้คือ

1. หาสารพฤกษเคมี (phytochemical) ในสารสกัดจากผลว่านชันหมาก
2. หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลว่านชันหมาก
3. หาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากผลว่านชันหมาก
4. ทดสอบฤทธิ์ต้าน โรคมะเร็งของสารสกัดจากผลว่านชันหมาก
5. ทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดจากผลว่านชันหมาก

1.3 ขอบเขตของกรวิจัย

โครงการนี้จำกัดการศึกษาพิษและฤทธิ์ทางชีวภาพของว่านชันหมากโดยศึกษาเฉพาะส่วนที่เป็นผล หรือที่ชาวบ้านนิยมเรียกว่า “เม็ด” และใช้รูปแบบการทดสอบของ *in vitro* ในระยะเบื้องต้น เพื่อเป็นโครงการนำร่อง ให้ได้มาซึ่งข้อมูลที่น่ามาวางแผนการทดสอบโดยใช้สัตว์ทดลองต่อไปในอนาคต การหาสารพฤกษเคมีจำกัดที่การหาปริมาณ polyphenols, flavonoids และ proanthocyanidins ในสารสกัดจากผลว่านชันหมาก การหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจำกัดที่การทดสอบความสามารถของสารสกัดในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH• (DPPH radical) ความสามารถในการรีดิวส์ใน FRAP assay และการลดสถานะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ภายในเซลล์ RAW264.7 โดย DCFHDA assay การหาฤทธิ์ต้านการอักเสบ จำกัดที่ศึกษาความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งการสร้าง nitric oxide (NO) ควบคู่กับการยับยั้งการแสดงออกของของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบคือ inducible nitric oxide synthase (iNOS) และ cyclooxygenase-2 (COX-2) โดยใช้โมเดลของเซลล์ RAW264.7 กระตุ้นด้วย

lipopolysaccharide (LPS) และ mouse interfereon-gamma (IFN- γ) สำหรับความเป็นพิษของการบริโภค
วุ้นหนากในระยชยว ใช้วิธีทดสอบฤทธิ์ก่อกลยพันธุ์ด้วยการใช้ Ames assay

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. ได้ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับความเป็นพิษของสารสกัดจากผลของวุ้นหนากอันเป็นประโยชน์
โดยตรงต่อประชาชนที่ใช้วุ้นหนากอยู่ในปัจจุบัน
2. ได้ข้อมูลทางพิษ และฤทธิ์ทางชีวภาพของของสารสกัดจากผลของวุ้นหนาก ซึ่งจะช่วย
ส่งเสริมการพัฒนาพืชสมุนไพรไทย และตำรายาแผนโบราณ อันเป็นภูมิปัญญาของบรรพบุรุษ
ไทย
3. ได้หลักฐานทางวิทยาศาสตร์เพื่อยืนยันฤทธิ์ทางด้านเภสัชวิทยาของผลวุ้นหนาก ที่ได้มีการ
กล่าวอ้างไว้ในตำราแพทย์แผนโบราณของไทย แต่ไม่เคยมีการศึกษาวิจัยอย่างเป็นระบบแบบ
แผนตามหลักการวิทยาศาสตร์มาก่อน
4. เป็นการเสริมความแข็งแกร่งให้กับความรู้และการรักษาในศาสตร์ทางการแพทย์แผนไทย

บทที่ 2

การวิจัยที่เกี่ยวข้อง

องค์ความรู้ในปัจจุบันชี้ชัดว่า ผักและผลไม้ต่าง ๆ มีองค์ประกอบของกลุ่มสารหลากหลายตามธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางเคมี เรียกรวมกันว่าสารพฤกษเคมี (phytochemicals) สารสำคัญในพืชเหล่านี้มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมาย เช่น ช่วยป้องกันการเกิดมะเร็ง โรคหัวใจ ด้านการอักเสบและช่วยรักษาโรคเรื้อรังต่าง ๆ ตัวอย่างของสารเหล่านี้ได้แก่ curcumin ในขมิ้น gingerol ในขิง capsaicin ในพริก catechin ในชา diallyl sulphide ในกระเทียม indole-3-carbinol ในกะหล่ำปลี sulphoraphane ใน บร็อคโคลี่ lycopene ในมะเขือเทศ resveratrol ในองุ่น quercetin ในหัวหอมและมันฝรั่ง และ flavonoids ในผลไม้ที่มีสี เช่น oligomeric proanthocyanidin (OPC) ในเมล็ดองุ่น เป็นต้น ในปี ค.ศ. 1991 องค์การอนามัยโลกและสถาบันมะเร็งแห่งชาติสหรัฐอเมริกาได้รณรงค์ให้ประชากรรับประทานผักและผลไม้ให้หลากหลายชนิด และมีปริมาณมากเพียงพอ เพื่อสุขภาพพลานามัยที่แข็งแรง ตามคำขวัญที่ว่า “Five-A-Day” ซึ่งหมายถึงให้ประชาชนเพิ่มการบริโภคผักผลไม้อย่างต่ำวันละ 5 ถ้วยเพื่อลดความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็ง และลดความเจ็บป่วยของชาวโลกสืบเนื่องจากโรคเรื้อรังต่าง ๆ (Surh, 2003, วีรพล คู่คงวิริยพันธุ์ 2548) หนึ่งในฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ phytochemicals ที่เด่นที่สุด คือฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (antioxidant activity) หรือที่คนส่วนใหญ่นิยมเรียกว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (anti-free radical activity)

2.1 อนุมูลอิสระ (free radicals)

อนุมูลอิสระเป็นอะตอม อิออน หรือโมเลกุลที่มีหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งอิเล็กตรอนวงนอกสุดของ orbital ที่ไร้คู่ (unpaired electron) และสามารถดำรงอยู่ได้อย่างเป็นอิสระ อนุมูลอิสระเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียร มีอายุครึ่งชีวิต (half-life) สั้นมาก ประมาณ 10^{-3} - 10^{-10} หรือ 1 วินาที มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาเคมี สามารถดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลของสารอื่นมาเข้าคู่กับอิเล็กตรอนไร้คู่ จึงทำให้โมเลกุลอื่นที่สูญเสียอิเล็กตรอนไปกลายเป็นอนุมูลอิสระโมเลกุลใหม่ อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นใหม่นี้สามารถดึงอิเล็กตรอนจากสารอื่นต่อกันเป็นทอด ๆ เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) อนุมูลอิสระมีหลายชนิด ส่วนใหญ่มักเป็นสารประกอบออกซิเจนใน reactive oxygen species (ROSs) หรืออาจเป็นอนุพันธ์ของสารประกอบอื่น ตัวอย่างอนุมูลอิสระที่มีออกซิเจน (oxygen radicals) เช่น superoxide anion (O_2^-), hydroxyl radicals ($\cdot OH$), peroxy radical ($LOO\cdot$) เป็นต้น หรือ ROSs อาจประกอบด้วยอนุพันธ์ของสารที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระ (non-radical derivatives) อาทิ hydrogen peroxide (H_2O_2) และ singlet oxygen (1O_2)

เป็นต้น อนุมูลอิสระที่เป็นอนุพันธ์ของสารประกอบอื่นที่ไม่ใช่ออกซิเจน ได้แก่อนุพันธ์ของไนโตรเจนหรือคลอรีน ตัวอย่างของ reactive nitrogen species (RNSs) ได้แก่ nitric oxide (NO) ตัวอย่างอนุมูลอิสระของคลอรีน ได้แก่ trichloromethyl ($\text{CCl}_3\cdot$) เป็นต้น (Halliwell และ Gutteridge, 1999; Fang et al., 2009; สหพัฒน์ 2548)

2.1.1 แหล่งกำเนิดอนุมูลอิสระ อนุมูลอิสระแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มตามแหล่งกำเนิดคือ

ก. อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย (endogenous free radicals) อนุมูลอิสระเกิดขึ้นภายในเซลล์ ที่ nucleus, mitochondria, endoplasmic reticulum, peroxisome และ lysosome ซึ่งเป็น cell organelle ที่มีการใช้ oxygen สูง โดยเกิดจากกระบวนการ metabolism ในร่างกายตามปกติ หรือในสภาวะที่มี oxygen มากกว่าปกติ รวมทั้งเกิดในสภาวะที่ร่างกายผิดปกติ เช่น เกิดการอักเสบ การติดเชื้อจากแบคทีเรีย ไวรัส รวมทั้งการออกกำลังกายอย่างหักโหม ตารางที่ 2.1 แสดงตัวอย่างของ ROSs และ RNSs ที่ถูกสร้างขึ้นระหว่างกระบวนการ metabolism (Phaniendra et al., 2015; สหพัฒน์ 2548)

ตารางที่ 2.1 แสดง ROSs และ RNSs ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นระหว่างกระบวนการ metabolism

(Phaniendra et al., 2015)

อนุมูลอิสระ	สัญลักษณ์	เวลาครึ่งชีวิต
Reactive oxygen species (ROSs)		
Radicals		
Superoxide	$\text{O}_2\cdot^-$	10^{-6} s
Hydroxyl	$\text{OH}\cdot$	10^{-10} s
Alkoxy radical	$\text{RO}\cdot$	10^{-6} s
Peroxy radical	$\text{ROO}\cdot$	17s

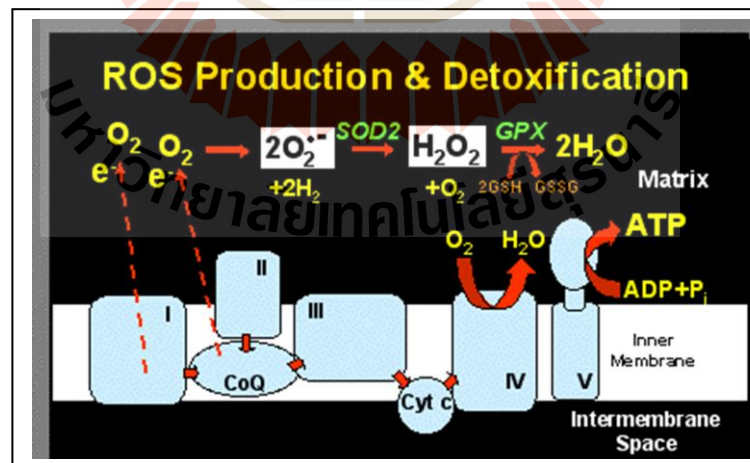
ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

อนุมูลอิสระ	สัญลักษณ์	เวลาครึ่งชีวิต
Non-radicals		
Hydrogen peroxide	H ₂ O ₂	Stable
Singlet oxygen	¹ O ₂	10 ⁻⁶ s
Ozone	O ₃	s
Organic peroxide	ROOH	Stable
Hypochlorous acid	HOCl	Stable (min)
Hypobromous acid	HOBr	Stable (min)
Reactive nitrogen species (RNSs)		
Radicals		
Nitric oxide	NO [•]	^a s
Nitrogen dioxide	NO ₂ [•]	s
Non-radicals		
Peroxynitrite	ONOO ⁻	10 ⁻³ s
Nitrosyl cation	NO ⁺	s
Nitrosyl anion	NO ⁻	s
Dinitrogen trioxide	N ₂ O ₃	s
Dinitrogen tetroxide	N ₂ O ₄	s
Nitrous acid	HNO ₂	s
Peroxynitrous acid	ONOOH	Fairly stable
Nitryl chloride	NO ₂ Cl	s

^aเวลาครึ่งชีวิตของอนุมูลอิสระบางชนิดขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อม เช่น ค่าครึ่งชีวิตของ NO[•] ในอากาศที่อึมครึมอาจมีค่า 2-3 นาที อักษร s = วินาที m = นาที

ROSs ส่วนใหญ่ที่เกิดภายในเซลล์ (intracellular ROSs) ได้มาจาก mitochondria ดังแสดงในรูปที่ 1 การสร้าง ROS ใน mitochondria เกิดที่ 2 ตำแหน่งของระบบการขนส่ง electron แบบลูกโซ่ (electron transport chain) คือ complex I (NADH dehydrogenase) และ complex III (ubiquinone

cytochrome c reductase) เมื่อเกิดการส่ง electron จาก complex I หรือ II ไปยัง coenzyme Q หรือ ubiquinone (Q) เกิด reduced form coenzyme Q (QH₂) ซึ่งเมื่อเปลี่ยนกลับเป็น coenzyme Q จะได้ตัวกลาง semiquinone anion (•Q⁻) ที่ไม่เสถียร ใน Q-cycle สารตัวกลาง •Q⁻ ที่เกิดส่งต่อ electron อย่างรวดเร็ว ให้โมเลกุลของ O₂ เกิดอนุมูลอิสระ superoxide (superoxide radical) ดังนั้น ยังมีอัตราการเผาผลาญสูง (high metabolic rate) ยิ่งเกิดการสังเคราะห์ ROS_s สูง superoxide anion ที่เกิดขึ้น จะถูกเปลี่ยนต่อเป็น hydrogen peroxide (H₂O₂) โดยเอนไซม์ mitochondrial superoxide dismutase (MnSOD) ความเป็นพิษของ H₂O₂ ถูกกำจัดด้วยเอนไซม์ catalase (CAT) และ glutathione peroxidase (GPx) ส่วนประกอบอื่นของ mitochondria ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง ROSs ได้แก่ monoamine oxidase, α-ketoglutarate dehydrogenase, glycerol phosphate dehydrogenase และ p66shc โปรตีน p66shc มีบทบาทเกี่ยวกับการเกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ส่วนใหญ่ p66shc อยู่ที่ cytoplasm ในสภาวะ oxidative stress p66shc ย้าย (translocate) เข้าสู่ mitochondrial intermembrane space จับกับ cytochrome c ชักนำไปให้เกิดการสังเคราะห์ ROS ขึ้นใน mitochondria ใน peroxisomes มีการสังเคราะห์อนุมูลอิสระหลายชนิด เช่น H₂O₂, O₂•⁻, OH• และ NO• การเกิด β-oxidation ของ fatty acid เป็นกระบวนการ metabolism หลักที่ทำให้เกิด H₂O₂ ใน peroxisomes เอนไซม์ที่แตกต่างกัน ใน peroxisome เช่น acyl CoA oxidases, D-amino acid oxidase, L-α-hydroxy oxidase, urate oxidase, xanthine oxidase, D-aspartate oxidase ทำให้เกิดการสร้าง ROSs ที่ต่างกัน (ตารางที่ 2.2) (Phaniendra et al., 2015)



รูปที่ 2.1 การสร้าง ROSs ใน mitochondria (<http://www.mayo.edu/research/labs/mitochondrial-genetics/mitochondrial-oxidative-phosphorylation>)

ตารางที่ 2.2 เอนไซม์ที่สร้าง ROSs ใน peroxisomes (Phaniendra et al., 2015)

Enzyme	Substrate	ROS
Acyl CoA-oxidases (enzymes of β -oxidation)	Fatty acids	H_2O_2
D-amino acid oxidase	D-proline	H_2O_2
L- α -hydroxy oxidase	Glycolate	H_2O_2
Urate oxidase	Uric acid	H_2O_2
Xanthine oxidase	Xanthine	$O_2^{\bullet-}, H_2O_2$

ในการเกิดปฏิกิริยาใน endoplasmic reticulum เอนไซม์ cytochrome p450, b5 เอนไซม์ และ diamine oxidase ทำให้เกิดการสังเคราะห์ ROSs เอนไซม์ thiol oxidase, Erop1p เร่งการถ่ายทอด electron จาก dithiols ให้ O_2 ทำให้เกิดการสร้าง H_2O_2 แหล่งกำเนิด ROS ภายในร่างกายยังเกิดขึ้นในปฏิกิริยาอื่น ๆ อีกมากมาย เช่น ระหว่างขั้นตอนการสังเคราะห์ prostaglandin, การเกิด auto-oxidation ของ adrenalin, การกลืนกินของเม็ดเลือดขาว (phagocytic cell) การ reduce riboflavin, FMNH₂, FADH, การกระตุ้น เซลล์ภูมิคุ้มกัน การเกิดการอักเสบ สภาวะเครียดของจิตใจ (mental stress) การออกกำลังกายหักโหม การติดเชื้อ การเกิดมะเร็ง การแก่ (aging) และสภาวะขาดเลือดหล่อเลี้ยง (ischemia) เป็นต้น

ข. อนุมูลอิสระที่เกิดภายนอกในร่างกาย (exogenous free radicals) เกิดได้หลายสาเหตุ เช่น สารเคมี มลภาวะ และ แสงแดด (รังสี UVA และ UVB) ตารางที่ 2.3 แสดงแหล่งกำเนิดอนุมูลอิสระจากภายนอก สิ่งเหล่านี้เป็นตัวกระตุ้นให้มีการผลิตอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 2.3 การเกิด ROSs จากแหล่งภายนอกร่างกาย (Phaniendra et al., 2015)

Air & water pollution	Ultraviolet light
Alcohol	Cooking (smoked meat, used oil, fat)
Tobacco smoke	
Transition metals-Cd, Hg, Pb, As	Drugs such as Halothene, Paracetamol, Bleomycine, Deoxorubicin
Heavy metals- Fe, Cu, Co, Cr	
Industrial solvents	Metrenidazole, Ethanol
Pesticides	CCl ₄
High temperature	

2.1.2 ประโยชน์ของอนุมูลอิสระ ทั้ง ROSs และ RNSs มีบทบาทสำคัญทางชีววิทยา อนุมูลอิสระมีทั้งประโยชน์และโทษ ที่ความเข้มข้นต่ำ หรือ ปานกลาง ROS/RNS มีหน้าที่ทางสรีรวิทยา อาทิ การทำหน้าที่ของระบบภูมิคุ้มกัน การทำลายเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมของเซลล์ macrophage และ neutrophils อนุมูลอิสระจึงมีบทบาทสำคัญในการทำลายแบคทีเรีย (bacteriocidal) ต้านไวรัส และต้านสารก่อเนื้องอก (anti-tumor agents) RNS ควบคุมความดันโลหิตผ่าน cGMP ทั้ง ROS/RNS ทำหน้าที่เป็นสารสื่อกลางในการสื่อสารภายในเซลล์ (intracellular messengers) ในหลายวิถีทางของการส่งสัญญาณของเซลล์ (cellular signaling pathway) โดยเฉพาะในการตอบสนองของ mitogen (mitogenic response) และการควบคุมรีดอกซ์ (redox regulation) บทบาทของอนุมูลอิสระในด้านเป็นสารสื่อสารของเซลล์ (intracellular messengers) แบ่งออกได้เป็น 5 ประการคือ 1) ทำหน้าที่เป็น cytokine, growth factor, มีฤทธิ์ของ hormone (hormone action) และการหลั่งสาร (secretion) 2) ทำหน้าที่เป็นตัวขนส่ง ion (ion transport) 3) เป็น transcription 4) ควบคุมระบบประสาท (neuromodulation) และ 5) เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบ apoptosis (Phaniendra et al., 2015; Lander, 1997)

2.1.3 อันตรายของอนุมูลอิสระ ในความเข้มข้นที่สูง ทั้ง ROS และ RNS ก่อให้เกิดสภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) และ สภาวะเครียดไนโตรเซชัน (nitrosative stress) ในร่างกาย ซึ่งเกิดจากกรณีที่มีการสังเคราะห์ ROS/RNS ในปริมาณสูงเกินไป (excess) แต่ขาดแคลนสารต้านออกซิเดชันซึ่งมีทั้งแบบที่เป็นเอนไซม์ และไม่เอนไซม์ (enzymatic และ non enzymatic antioxidants) ตารางที่ 2.4 แสดงสารต้านออกซิเดชันที่พบในร่างกาย เมื่อขาดความสมดุลระหว่างการสร้างอนุมูลอิสระ และสารต้านออกซิเดชัน ความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาของ ROS/RNS ทำให้เกิดความเสียหายต่อสารที่มี

โมเลกุลขนาดใหญ่ในร่างกาย (macromolecules) ทั้งไขมัน กรดนิวคลีอิก และโปรตีน ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์

ตารางที่ 2.4 สารต้านออกซิเดชั่นที่จัดเป็นเอนไซม์ และไม่เอนไซม์ที่พบในร่างกาย (ดัดแปลงจากสหพัฒน์ 2548)

คุณสมบัติ	สารต้านออกซิเดชั่น
จัดเป็นเอนไซม์	Superoxide dismutase (SOD)
	Catalase (CAT)
	Glutathione peroxidase (GPX)
	Glutathione reductase (GR)
	Glutathione S-transferase (GST)
ไม่จัดเป็นเอนไซม์	Glutathione Lipoic acid
	Ceruloplasmin Albumin
	Transferrin Haptoglobin
	Hemopexin Uric acid
	Bilirubin Cysteine

ก. ผลของอนุมูลอิสระต่อ Deoxyribonucleic acid (DNA) ทั้ง ROS/RNS สามารถทำความเสียหายต่อ DNA DNA ใน mitochondria มีความไวต่อความเสียหายจาก ROS มากกว่า DNA ใน nucleus เพราะอยู่ใกล้ที่เกิด ROS มากกว่า อนุมูลอิสระที่สำคัญ OH^\bullet สามารถทำปฏิกิริยาโดยตรงกับทุกส่วนประกอบของ DNA ทั้งที่เบส purine, pyrimidine และ ส่วนที่เป็นน้ำตาลในโครงสร้าง (deoxyribose sugar backbone) ก่อให้เกิดการแตกหักแบบสายเดี่ยว (single stranded break) และสายคู่ (double stranded breaks) ของ DNA การดึงอะตอม H ของ OH^\bullet ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของทั้ง purine และ pyrimidine และเกิดการ cross-link ระหว่าง DNA และ protein อนุมูลอิสระ OH^\bullet ทำให้เกิด pyrimidine adducts หลายชนิด เช่น thymine glycol, uracil glycol, 5-hydroxydeoxy uridine, 5-hydroxy deoxycytidine, hydantoin เป็นต้น ส่วน purine adducts ที่เกิดจาก OH^\bullet ได้แก่ 8-hydroxydeoxy guanosines (8-OHdG), 8-hydroxy deoxy adenosine เป็นต้น ส่วน DNA adduct ของ base ที่เกิดจากการชักนำของอนุมูลอิสระอื่น

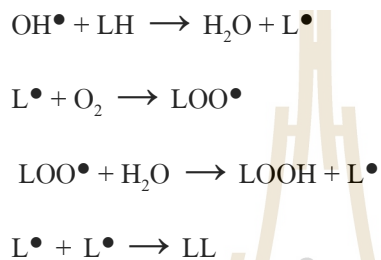
ได้แก่ 5-formyl uracil, cytosine glycol, 5,6-dihydrothymine, 5-hydroxy-6-hydro-cytosine, 5-hydroxy-6-hydro uracil, uracil glycol, และ alloxan ตัวอย่าง adduct ของส่วนที่เป็นน้ำตาลในโครงสร้างของ DNA ได้แก่ glycolic acid และ 2-deoxypentose-4-ulose ตัวบ่งชี้ชีวภาพ (biomarker) ของความเสียหายของ DNA ที่ถูก oxidize (oxidative DNA damage) คือ 8-OHdG ที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดการกลายพันธุ์ (mutagenesis) การเกิดมะเร็ง (carcinogenesis) และความชราภาพ (aging) DNA ใน mitochondria มีระดับของ 8-OHdG สูงกว่า DNA ใน nucleus (Phaniendra et al., 2015; Dizdaroglu et al., 2002)

RNS โดยเฉพาะ peroxy nitrite (OONO-) จับกับ guanine ได้ nitrative- และ oxidative DNA lesions เช่น 8-nitroguanine และ 8-oxodeoxyguanosine ตามลำดับ 8-nitroguanine ไม่เสถียร และจะถูกกำจัดออกโดยเอนไซม์ ทำให้เกิด apurinic site ในระหว่างการสังเคราะห์ DNA เบส adenine สามารถจับคู่กับ 8-nitroguanine ส่งผลให้เกิด G-T transversion ดังนั้น 8-nitroguanine ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของ DNA และเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดมะเร็ง (Phaniendra et al., 2015)

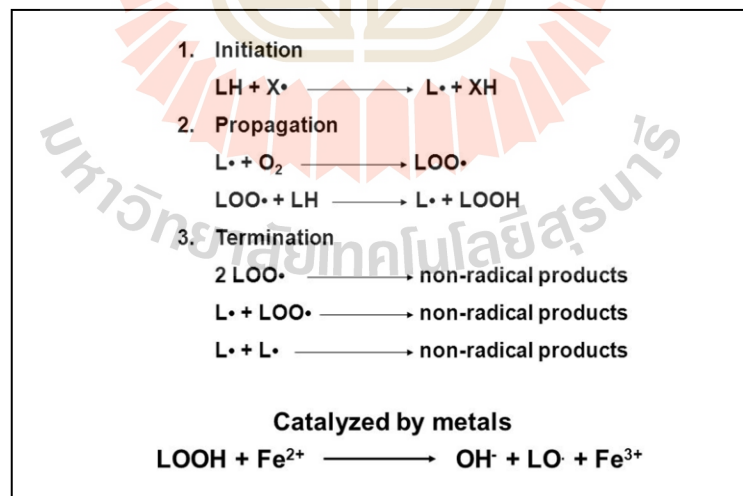
นอกจาก DNA RNA หลายชนิดก็เป็นเป้าหมายการโจมตีที่สำคัญของ ROS อันที่จริง ในคน RNA สามารถเกิด oxidative damage จาก ROS ได้มากกว่า DNA เนื่องจากโครงสร้างของ RNA เป็นสายเดี่ยว ไม่มีเกลียวคู่การซ่อมแซม oxidized RNA ที่ดีพอ และ RNA ไม่มี protein คอยป้องกันอันตรายเหมือนดัง DNA นอกจากนี้ RNA ใน cytoplasm ยังอยู่ใกล้ mitochondria ซึ่งเป็นแหล่งสังเคราะห์ ROS ผลผลิตจาก RNA ที่เสียหายที่มีการศึกษามากที่สุดคือ 7,8-dihydro-8-oxoguanosine (8-oxoG) ซึ่งระดับที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับโรคต่าง ๆ เช่น Alzheimer, Parkinson, โรคหัวใจและหลอดเลือด (atherosclerosis), hemochromatosis และ myopathy (Phaniendra et al., 2015)

ข. ผลของอนุมูลอิสระต่อไขมัน (lipids) polyunsaturated fatty acid ของ phospholipid ที่เชื่อมเซลล์มีความไวต่อการถูก oxidize โดยอนุมูลอิสระเกิด lipid peroxidation ซึ่งส่งผลให้ membrane สูญเสียสภาพและการทำหน้าที่ เช่น ลดสถานะการเป็นของไหล สูญเสียการทำหน้าที่ของเอนไซม์ หรือตัวรับ (receptor) ต่าง ๆ ที่อยู่ที่ยึดเซลล์ ปฏิกิริยา lipid peroxidation เกิดเมื่ออนุมูลอิสระดึง H อะตอมจาก methylene group (CH_2) ใน fatty acid (LH) เกิด การสร้าง carbon centered lipid radical (L^\bullet) ซึ่งรวมตัวกับ O_2 ได้ lipid peroxy radical (LOO^\bullet) ที่สามารถจัดเรียงโมเลกุลใหม่โดยการจับตัวเป็นวง (cyclization) เกิดพวก endoperoxides นำไปสู่ผลผลิตสุดท้ายที่เป็นพิษของ lipid peroxidation คือเกิด malondialdehyde (MDA) และ 4-hydroxynonenal (4-HNA) ซึ่งทำความเสียหายต่อ DNA และ protein LOO^\bullet สามารถชักนำให้เกิด peroxidation อย่างต่อเนื่องโดยการดึง H อะตอมจากโมเลกุลของไขมันอื่น isoprostanes (สารที่คล้าย prostaglandin ที่สร้างขึ้นในร่างกายจากการเกิด esterification ของ arachidonic

acid) เป็น ผลลัพธ์ที่ได้จากการเกิด lipid peroxidation ของ arachidonic acid และจัดเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญของไขมันที่เสียหายจากการถูก oxidize นอกจากนี้ lipid peroxy radical (LOO•) เมื่อรวมตัวกับน้ำจะ ได้เป็น lipid alkyl radical L• อีกครั้ง สุดท้าย L• รวมตัวกันเป็น polymerized lipids (LL) ทำให้ membrane ต่าง ๆ ของเซลล์โดยเฉพาะ membrane ของ mitochondria สูญเสียคุณสมบัติ ผลของอนุมูลอิสระต่อไขมันและการเกิด lipid peroxidation สรุปดังสมการด้านล่าง (สหพัฒน์ 2548; Phaniendra et al., 2015)

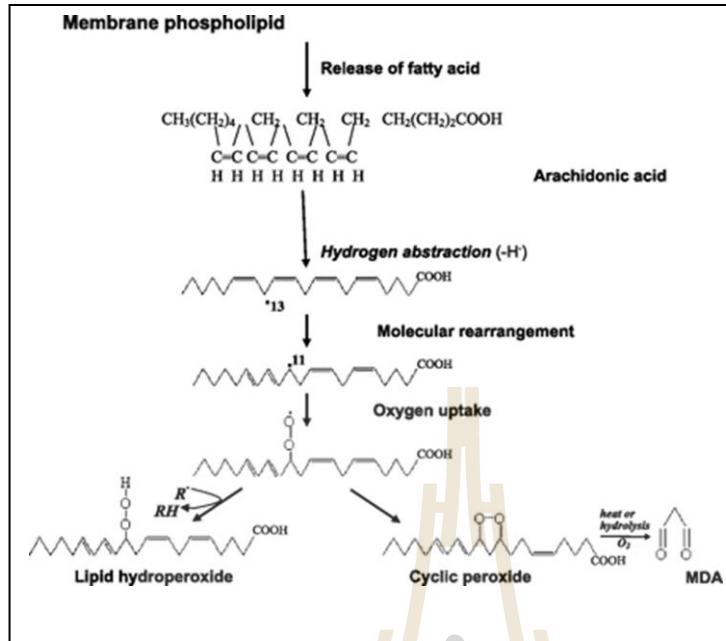


ดังนั้น การเกิด lipid peroxidation สามารถแบ่งออกเป็น 3 ระยะคือ ระยะเริ่มต้น (initiation) ระยะการเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่อง (propagation) และระยะสิ้นสุดปฏิกิริยา (termination) การเกิด lipid peroxidation สามารถถูกเร่งให้เกิดเร็วขึ้นโดยโลหะต่าง ๆ เช่น เหล็ก (รูปที่ 2.2) รูปที่ 2.3 แสดงตัวอย่างการเกิด lipid peroxidation ของ arachidonic acid



รูปที่ 2.2

แสดงระยะของการเกิด lipid peroxidation (<http://slideplayer.com/slide/5372691/>)



รูปที่ 2.3 ระยะ initiation และ propagation ของการเกิด lipid peroxidation ของ arachidonic acid (Power และ Jackson, 2008)

ค. ผลของอนุมูลอิสระต่อโปรตีน การออกซิไดซ์โปรตีนสามารถเกิดผ่านอนุมูลอิสระหลายชนิด เช่น $O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} , peroxy, alkoxy, hydroperoxy และสามารถเกิดผ่านสารที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระ เช่น H_2O_2 , O_3 , $HOCl$, singlet oxygen, $OONO^-$ เป็นต้น ROS ออกซิไดซ์ amino acid ในโปรตีน ทำให้เกิด protein-protein cross linkages ส่งผลให้โปรตีนเสียสภาพ (denature) สูญเสียการทำหน้าที่ของเอนไซม์ ตัวรับรู้ หรือหน้าที่การขนส่งของโปรตีน amino acid ที่มี sulfur เป็นองค์ประกอบ เช่น methionine และ cysteine มีความไวต่อการถูก oxidize โดย ROS และเปลี่ยนเป็น disulfides และ methionine sulphoxide ซึ่งทางชีววิทยาสามารถถูกเปลี่ยนกลับสู่สภาพเดิมได้โดยใช้ เอนไซม์ disulfide reductase และ methionine sulfoxide reductase ตามลำดับ ตัวอย่าง amino acid และ oxidation product ของ amino acid ที่เกิดจากการถูกโจมตีโดย ROS เช่น tryptophan ทำให้เกิดการสร้าง nitrotryptophan, kynurenine, formylkynurine; phenylalanine เกิดการสร้าง 2,3-dihydroxyphenylalanine, 2-, 3-, และ 4-hydroxyphenylalanine; tyrosine เกิดการสร้าง 3,4-dihydroxyphenylalanine, tyrosine-tyrosine cross-linkages, Tyr-O-Tyr, cross-linked nitrotyrosine; histidine สร้าง 2-oxohistidine, asparagine, aspartic acid; arginine เกิดการสร้าง glutamic semialdehyde, lysine เกิดการสร้าง α -amino adipic semialdehyde;

proline เกิดการสร้าง 2-pyrrolidone, 4- และ 5-hydroxyproline pyroglutamic acid, glutamic semialdehyde; threonine เกิดการสร้าง 2-amino-3-ketobutyric acid ; leucine และ valine เกิดการสร้าง hydroxyl residue การชักนำให้เกิด oxidative damage ของ amino acid เช่น lysine, proline, threonine และ arginine ให้อ่อนพันธะของ carbonyl (carbonyl derivative) ดังนั้น การมีหมู่ carbonyl ในโปรตีนถือว่าเป็นตัวบ่งชี้ความเสียหายของ protein ที่ถูก oxidize โดย ROS ตัวบ่งชี้อื่นของ protein ที่เกิด oxidation คือ O-tyrosine (ตัวบ่งชี้ของ hydroxyl radical), 3-nitrotyrosine (ตัวบ่งชี้ของ RNS) นอกจากนั้น การเพิ่มระดับของ protein carbonyl มีความสัมพันธ์กับพยาธิสภาพของโรคต่าง ๆ มากมาย เช่น โรค Alzheimer, Parkinson, muscular dystrophy, cataractogenesis, rheumatoid arthritis, diabetes, progeria, atherosclerosis, respiratory distress syndrome, Werner's syndrome และ ชราภาพ (Phaniendra et al., 2015; Chevion et al., 2000; Berlett et al., 1997)

2.1.4 อนุมูลอิสระและการเกิดโรค มีงานวิจัยมากมายที่รายงานความไม่สมดุลของการสร้างอนุมูลอิสระ ROS/RNS ที่ก่อให้เกิดสภาวะเครียดออกซิเดชันและพยาธิสภาพของการเกิดโรคต่าง ๆ เช่น เกี่ยวข้องกับโรคเบาหวานหลายประเภท โรคเกี่ยวกับการเสื่อมของระบบประสาท (neurodegenerative diseases) เช่น Alzheimer's disease, Parkinson's disease, multiple sclerosis โรคหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular disease) โรคมะเร็งในอวัยวะต่าง ๆ เช่น มะเร็งที่ทรวงอก มะเร็งในลำไส้ใหญ่และทวารหนัก (colorectal cancer) มะเร็งที่ต่อมลูกหมาก (prostate cancer) มะเร็งปอด (lung cancer) โรคต้อกระจก (cataracts) โรคหอบหืด (asthma) โรคไขข้ออักเสบ (rheumatoid arthritis) อาการอักเสบ (inflammation) โรคความดันสูง โรคภูมิคุ้มกันตนเอง (autoimmunity) Down's syndrome hepatitis ความเสียหายต่อปอดจากการได้รับ asbestos, nitrogen dioxide, ozone, paraquat, hyperoxia, carbon tetrachloride ความเสียหายที่เกิดจากการออกกำลังกายหักโหม รวมทั้งการชักนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ภาวะทารกเจริญเติบโตช้าในครรภ์ (intrauterine growth restriction) ภาวะครรภ์เป็นพิษ (preeclampsia หรือ pregnancy-induced hypertension หรือ toxemia of pregnancy) และ เกี่ยวข้องกับความชราภาพ (aging) (Ullah et al., 2016 ; Phaniendra et al., 2015; Chen et al., 2011; Matés และ Sánchez-Jiménez, 1999; Atalay และ Laaksonen, 2002; Pham-Huy et al., 2008; Halliwell และ Gutteridge, 1999)

ตารางที่ 2.5 สรุปอวัยวะที่เกิดความเสียหายและโรคที่เกี่ยวข้องกับสภาวะเครียดออกซิเดชัน

ตารางที่ 2.5 อวัยวะที่เกิดความเสียหายและโรค ที่เกี่ยวข้องกับภาวะเครียดออกซิเดชั่น (ดัดแปลงจาก Ullah et al.,2016)

อวัยวะที่เกี่ยวข้อง	โรคที่เกิด
ปอด	Ashma, chronic bronchitis
ไต	Glomerulonephritis, chronic renal failure
ไขข้อ	Arthritis, rheumatism
สมอง	Alzheimer's disease, Parkinson's disease, memory loss, depression, stroke
ตา	Cataract, retinal diseases
ตัวอ่อนในครรภ์	Preeclampsia, Intrauterine growth restriction
หัวใจ	Arteriosclerosis, hypertension, ischemia
หลอดเลือด	Cardiomyopathy, heart failure
เกี่ยวข้องกับหลายอวัยวะ	Cancer, diabetes, inflammation infection, aging

2.1.5 สารต้านอนุมูลอิสระในพืช ในปัจจุบัน มีงานวิจัยมากมายทั้ง *in vitro* และ *in vivo* รวมทั้งหลักฐานทางระบาดวิทยาที่สนับสนุนบทบาทของสารต้านอนุมูลอิสระในพืช ผัก ผลไม้หลากหลายชนิดที่ช่วยต่อต้านกระบวนการเกิดมะเร็ง ชะลอการแก่ ด้านการอักเสบ มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลและ cholesterol ในเลือด ลดการเกิดต้อกระจก ลดอาการโรคภูมิแพ้ ช่วยให้หลอดเลือดขยายตัว กระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ในลำไส้ (probiotic) และด้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค (Surh, 2003; Aruoma, 2003; Fine,2000; Bagchi et al., 2000; Ames et al., 1993; Block et al., 1992; Shigenaga et al., 1994 และ อุดมกัณฑ์ ขาลสุวรรณ, 2548) ตัวอย่างสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีมากมาย ได้แก่ ฝรั่ง มะขาม ฝรั่ง พริก ถั่วเหลือง ชาเขียว ลูกยอ ทับบิม มะเขือเทศ ว่านหางจิ้งจอก (*Belamcanda chinensis*) สะเดา (Surh, 2003; Su et al., 2005; Subapriya and Nagini, 2005; Monthakantirat et al., 2005; Wang et al., 2004 และ วีรพล คู่คงวิริยพันธ์, 2548) รวมทั้งผลิตภัณฑ์ทางการค้าของสารสกัดจากพืชหลายชนิดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น ผงกาแฟ (*Coffea Arabica*) หนามกระสุนที่ใช้เพิ่มฮอร์โมนเพศชาย (*Tribulus terrestris*) ขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) พรหมมี ที่ใช้บำรุงสมอง รักษาความจำเสื่อม (*Bacopa moonieri*) และลูกช้ด (*Trigonella foenum-graecum*) ที่ใช้เป็นเครื่องเทศ ช่วย

เพิ่มน้ำนมแม่ กระตุ้นมดลูก และลดน้ำตาล เป็นต้น (Sathisha et al., 2011) สาร antioxidants ที่พบในพืชสมุนไพร ผัก ผลไม้ ได้แก่ tocopherols, carotenoids, ascorbic acid, ubiquinones, steroids, thiols, inosine, pyruvate, taurine, gallic acid และ flavonoids (สหพัฒน์ 2548) เป็นต้น

ในปัจจุบัน มีการศึกษาถึงกลไกของพฤกษเคมี (phytochemicals) ต่าง ๆ ที่อยู่ในพืชสมุนไพร ผัก และผลไม้ในอาหารซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระว่าสามารถยับยั้ง หรือบรรเทาการเกิดโรคต่าง ๆ ได้อย่างไร ในระดับโมเลกุล ดังตัวอย่างสารสกัดจากพืชหลายชนิดสามารถยับยั้งกระบวนการเกิดมะเร็ง โดยทำหน้าที่เป็น “blocking agent” ออกฤทธิ์ในระยะเริ่มต้นของการเกิดมะเร็ง (initial phase of carcinogenesis) ด้วยการป้องกันไม่ให้เกิดการกลายพันธุ์ ใน DNA หรือกระตุ้นเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยการส่งเสริมการทำงานของ Nrf-2 (NF-E2-related factor 2; transcription factor ที่ควบคุมการสร้าง antioxidant enzymes ที่สำคัญหลายชนิด) นอกจากนั้น พฤกษเคมียังสามารถออกฤทธิ์ในระยะหลังของกระบวนการเกิดมะเร็ง คือในระยะส่งเสริม (promotion) และระยะก้าวหน้า (progression) ของการเกิดมะเร็ง โดยทำหน้าที่เป็น “suppressive agent” ยับยั้ง transcription factor ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของเซลล์มะเร็ง กระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งด้วยกระบวนการ apoptosis หรือยับยั้งการแพร่กระจาย (metastasis) ของเซลล์มะเร็ง โดยไปรบกวนวิถีทางของการส่งสัญญาณติดต่อ (signal transduction pathway) ระหว่างเซลล์มะเร็ง การสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) ของเซลล์มะเร็ง เป็นต้น (Landis-Piwowar และ Lyer, 2014) ตารางที่ 2.6 แสดงกลไกของพฤกษเคมีในสารสกัดพืชจากอาหารในการป้องกันการเกิดมะเร็งในระดับโมเลกุล และตารางที่ 2.7 แสดงกลไกของพฤกษเคมี ที่เปลี่ยนการแสดงออกของ gene โดยไม่เปลี่ยนแปลงระดับเบสของ DNA ซึ่งเรียกว่า epigenetic mechanism

ตารางที่ 2.6 แสดงสารสกัดจากสมุนไพร พืชผักผลไม้และกลไกต้านมะเร็งในระดับโมเลกุล (คัดแปลงจาก Landis-Piwowar และ Lyer, 2014)

Dietary	Chemopreventive Effects
2-methoxystyandrone (<i>Polygonum cuspidatum</i>)	Inhibits JAK and IKK β kinase signaling to NF- κ B
Apigenin (numerous plant source)	Inhibits NF- κ B DNA binding, IKB- α phosphorylation, and IKK β activity
Curcumin (<i>Curcuma longa</i> ; turmeric)	Up regulate Nrf2 signaling; induces apoptosis; inhibit NF- κ B signaling; decrease cell invasion and motility
EGCG (<i>Camillia sinensis</i> ; green tea)	Inhibits proteasome activity for IKB- α stabilization and NF- κ B inhibition; increase expression of E-cadherin; inhibits signal transduction through ERK
[6]-gingerol (<i>Zingiber officinale</i> ; ginger root)	Increase expression of E-cadherin; inhibits signal transduction through ERK; inhibit MMP-9 expression
Isothiocyanate/Sulphoraphane (Cruciferous vegetables)	Increase Nrf2 expression
Luteolin (<i>Terminalia chebula</i>)	Inhibits MMP-9 expression
Resveratrol (skin of red grapes)	Increase expression of E-cadherin; inhibits signal transduction through PI3K/Akt

ตารางที่ 2.7 ตัวอย่างสารสกัดจากพืชสมุนไพร ผัก ผลไม้ ที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง โดยการควบคุมผ่าน epigenetic (epigenetic modulators) (คัดแปลลงจาก Landis-Piwowar และ Lyer, 2014)

Dietary	Epigenetic Modification(s)	Role(s) in Chemoprevention
Curcumin	Inhibits DNA methylation (DNMT) Inhibits histone acetylation (HAT) and deacetylation (HDAC) Modulates miRNA expression	Prevent DNA damage and inhibits NF- κ B signaling
EGCG	Inhibits DNA methylation (DNMT) Inhibits histone acetylation (HAT) Modulates miRNA expression	Trigger apoptosis and cell cycle arrest in tumor cells
Isothiocyanate/ Sulphoraphane	Inhibits DNA methylation (DNMT) Inhibits histone deacetylation (HDAC)	Inhibits tumor cell growth and triggers cell cycle arrest and apoptosis
Resveratrol	Inhibits DNA methylation (DNMT) Inhibits histone deacetylation (HDAC)	Inhibits NF- κ B signaling

2.2 Nitric oxide (NO)

Nitric oxide (NO) ถูกค้นพบโดย นักเคมีชาวอังกฤษ Joseph Priestley ในปี ค.ศ. 1772 ภายหลังจากเขาค้นพบก๊าซ oxygen เป็นระยะเวลา 2 ปี กว่า 2 ศตวรรษ หลังจากถูกค้นพบ ก๊าซ NO ซึ่งไม่มีสี ไม่มีกลิ่นถูกจัดเป็นสารที่มีพิษสูง เนื่องจากนักเคมีหลายท่านที่สูดดมก๊าซนี้เข้าไปในปริมาณสูงโดยไม่ตั้งใจ เสียชีวิตจากอาการของ toxic shock syndrome จนครึ่งหลังของศตวรรษที่ 20 นักวิทยาศาสตร์จึงเริ่มตระหนักว่า NO เป็นโมเลกุลชีวภาพที่มีความสำคัญยิ่ง และจัดให้ NO เป็นโมเลกุลแห่งปี (molecule of the year) ในปี 2002 ภายหลังจากที่ Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro and Ferid Murad ได้รับรางวัลโนเบลร่วมกันในสาขาสรีรวิทยาและด้านการแพทย์ในปี 1998 จากการค้นพบว่า NO เป็นโมเลกุลที่ทำหน้าที่สื่อสารระหว่างเซลล์ (signaling molecule) ในระบบหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular system)

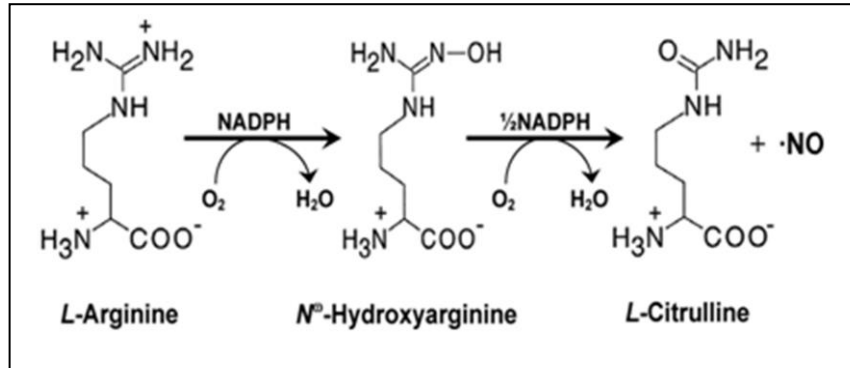
2.2.1 ความสำคัญของ NO ในด้านสุขภาพ (health) และการเกิดโรค (diseases)

ในปัจจุบัน เป็นที่ทราบกันดีว่า NO มีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับสุขภาพและการเกิดโรค NO มีทั้งคุณสมบัติประโยชน์และโทษต่อร่างกาย ในด้านที่เป็นประโยชน์ NO มีหน้าที่สำคัญหลายอย่าง ขึ้นกับว่า NO ถูกสังเคราะห์ขึ้นที่ตำแหน่งใด เช่น เป็น neurotransmitter และ signaling molecule ใน signal transduction pathway ควบคุมพัฒนาการ และความเสื่อม (degenerative) ของเซลล์ประสาท มีบทบาทในการขยายตัวของหลอดเลือด ยับยั้งการแข็งตัวของเลือดใน endothelial cell การคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบ การแข็งตัวขององคชาติ ช่วยควบคุมการทำหน้าที่ของระบบภูมิคุ้มกัน และมีฤทธิ์ทำลายจุลินทรีย์ และเซลล์มะเร็ง เป็นต้น บทบาทของ NO ที่เป็นโทษเกิดเมื่อความเข้มข้นของ NO ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นในร่างกายผิดปกติซึ่งสามารถชักนำไปให้เกิดโรคต่าง ๆ เช่น ถ้าระดับของ NO ต่ำกว่าปกติ สามารถนำไปสู่โรคความดันสูง โรคหลอดเลือดสมองตีบ (strokes) ภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน (heart attack) หรือ หัวใจวาย และโรคมะเร็ง แต่ถ้าระดับของ NO สูงเกินไป จะสัมพันธ์กับภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด (sepsis) โรคความดันต่ำ โรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบเรื้อรังและเฉียบพลันต่าง ๆ เช่น โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningitis) ข้ออักเสบรูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis) และ โรคเบาหวาน เป็นต้น นอกจากนี้ นักวิทยาศาสตร์ได้ชี้ชัดว่า NO สัมพันธ์กับการเกิดโรคมิตochondrial โรคมะเร็ง การกลายพันธุ์ ตลอดจนการชักนำไปให้เกิดกระบวนการ apoptosis ของเซลล์ (Medical Research Council, 2014; Sharma et al., 2007; Robbin and Sisson, 1996; Park et al., 2000; Morgan and Dabco, 2000; deRojas-Walker et al., 1995; Sandoval et al., 1997; Kolb and Kolb-Bachofen, 1992; Alessandro et al., 1994) แนวโน้มงานวิจัยในปัจจุบัน ประยุกต์ใช้ NO ในเชิงการแพทย์เพื่อช่วยรักษาโรคต่าง ๆ เช่น ใช้คุณสมบัติการขยายหลอดเลือดและการยับยั้งการแข็งตัวของเลือดของ NO ในการรักษาโรค stroke (Culotta และ Koshland, 1992) ใช้รักษาโรคความดันโลหิตสูง จากผลงานวิจัยที่ค้นพบว่ายีน dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) มีบทบาทสำคัญยิ่งในการควบคุมความดันโลหิต และการสูญเสียการทำงานของยีนนี้ ส่งผลรบกวนการสังเคราะห์ NO (Leiper et al., 2007; Leiper and Nandi, 2011) ใช้รักษาโรคความเสื่อมทางสมอง เช่น Alzheimer's disease และโรคประสาทซึกกระตุก (Huntington's disease) จากผลงานวิจัยที่แสดงว่า NO มีผลต่อความสามารถในด้านการคำนวณ (computational ability) ของสมอง (Khazan และ Hdayati, 2015; Medical Research Council, 2014; Fernandez et al., 2010; Shukla, 2007) ใช้ยับยั้งความผิดปกติของ epithelial cell ใน Barrett's oesophagus ก่อนที่จะพัฒนาการเป็นมะเร็ง จากงานวิจัยที่ค้นพบว่า NO มีบทบาทเพิ่มการสังเคราะห์ MMP (matrix metalloproteinases) ซึ่งเป็น enzyme family ที่ส่งเสริมให้เกิดความผิดปกติของ epithelial cells (Clemons et al., 2010) นอกจากนี้ มี

งานวิจัยที่แสดงว่า NO สามารถมีผลต่อกระบวนการเกิดมะเร็งทั้ง 3 ระยะคือ ระยะ initiation, promotion และ progression โดยไปควบคุม (modulate) กระบวนการสำคัญที่เกี่ยวกับพัฒนาการของมะเร็ง คือ กระบวนการแบ่งเซลล์และการเจริญ การตายแบบ apoptosis กระบวนการอักเสบ และการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) ของเซลล์มะเร็ง เป็นต้น (Khazan และ Hdayati, 2015) จากความสำเร็จในการค้นพบวิธีวัดปริมาณของ NO ภายในร่างกาย มีรายงานวิจัยที่แสดงว่าในบุคคลที่ป่วยด้วย metabolic syndrome ในโรคอ้วน (obesity) ความดันโลหิตสูง และเบาหวาน มีปริมาณการสังเคราะห์ NO ในร่างกายต่ำกว่าระดับปกติ (Siervo et al., 2011; Siervo และ Bluck, 2012) ซึ่งสัมพันธ์ผกผันกับระดับของ VEGF (vascular endothelial growth factor (Siervo et al., 2012)

2.2.2 การสังเคราะห์ NO ภายในร่างกาย

NO ถูกสังเคราะห์ในรูปของอนุมูลอิสระจาก L-arginine โดยเอนไซม์ตระกูล nitric oxide synthase (NOSs) ทั้งนี้ NO เกิดจาก guanidine nitrogen ของ L-arginine ผ่าน oxidative-reductive pathway ซึ่งใช้ 5 electron ส่งผลให้เกิด L-citrulline (Shukla, 2007) cofactors ต่าง ๆ ที่ใช้ในปฏิกิริยา คือ oxygen, tetrahydrobiopterin (BH_4), nicotinamide-adeninedinucleotide phosphate (NADPH), flavin adenine dinucleotide (FAD) และ flavin mononucleotide (FMN) สารสื่อกลาง (intermediate) ที่ได้คือ N ω -hydroxy-L-arginine (NOHLA) (รูปที่ 2.4) (Khazan et al., 2015)



รูปที่ 2.4 L-arginine ถูกเปลี่ยนเป็นสารตัวกลาง N^ω-hydroxy-L-arginine (NOHLA) ในปฏิกิริยาขั้นที่ 1 ต้องการ 1 โมเลกุลของ O₂ และ NADPH เมื่อมี tetrahydrobiopterin (BH₄), flavin mononucleotide (FMN), flavin adenine dinucleotide (FAD) และ haem ในปฏิกิริยาขั้นที่ 2 เกิดโดย oxidation ของ NOHLA ได้ L-citrulline และ NO (Khazan et al., 2015; รูปจาก <http://www.gbhealthwatch.com/GND-Cardiovascular-Disease-NOS3.php>)

2.2.3 Isoform ของ nitric oxide synthase

ผลจากการศึกษาด้าน cloning พบว่าเอนไซม์ในตระกูล NOS มีทั้งหมด 3 isoform คือ neuronal NOS (nNOS) หรือ type I NOS (NOS1), immunologic NOS (iNOS) หรือ type 2 NOS (NOS2) และ endothelial NOS (eNOS) หรือ type 3 NOS (NOS3) ซึ่งเอนไซม์ nNOS และ eNOS ถูกสังเคราะห์โดยประสาท (neuron) และเซลล์เยื่อผิวของผนังหลอดเลือดตามลำดับ และมีการสังเคราะห์ขึ้นตลอดเวลา (constitutive) จัดเป็น cNOS และการทำงานขึ้นกับ calcium-calmodulin ส่วน iNOS ถูกสังเคราะห์โดยการชักนำ (inducible) เมื่อเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันถูกกระตุ้น (activated immune cell) การทำงานของ iNOS ไม่ขึ้นกับ calcium (Khazan et al., 2015) น้ำหนักโมเลกุลของ nNOS, eNOS และ iNOS มีค่าเท่ากับ 160 kDa, 135 kDa และ 130 kDa ตามลำดับ (Xu and Liu, 1998) NO ที่ทำหน้าที่เป็น neurotransmitter สร้างโดยระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system) และระบบประสาทส่วนปลาย (peripheral nervous system) โดย nNOS มีบทบาทสำคัญในด้านความทรงจำและการเรียนรู้ นอกจากนี้ nNOS ยังทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของหัวใจ การบีบตัวของทางเดินอาหาร (peristalsis) และการเร้าอารมณ์ทางเพศ (sexual arousal) ทั้งในเพศหญิงและเพศชาย spliced isoform ของ nNOS เป็นโปรตีนในกล้ามเนื้อสร้างสัญญาณในการตอบสนองต่อ calcium ที่หลั่งจาก sarcoplasmic reticulum (SR)

สำหรับ inducible isoform iNOS ทำหน้าที่สร้าง NO ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันต่อการต่อสู้จุลินทรีย์ก่อโรคและตอบสนองต่อ cytokine ส่วน endothelial NOS สร้าง NO ในหลอดเลือด และมีบทบาทสำคัญในการควบแน่นที่ของหลอดเลือด การทำงานของหัวใจ การสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) และการหลั่ง insulin eNOS ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการบีบตัวของกล้ามเนื้อเรียบ (Khazan et al., 2015) ตารางที่ 2.8 เปรียบเทียบเอนไซม์ NOS ทั้ง 3 isoforms ตารางที่ 2.9 แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณ NOS ทั้ง 3 isoform และความสัมพันธ์กับการเกิดโรคต่าง ๆ

ตารางที่ 2.8 ลักษณะของ NOS ทั้ง 3 isoform (ดัดแปลงจาก Khazan et al., 2015, Nahrevanian, 2009)

Name	Human Chromosome	Location	Function	Regulated by
Neuron NOS (nNOS, NOS ₁)	NOS ₁ , chromosome 12	Nervous tissue, skeleton muscle type II	Cell communication, signal transduction, neurotransmission	Ca ⁺² / Calmodulin
Inducible NOS iNOS, NOS ₂	NOS ₂ , chromosome 17	Immune system (macrophages, neutrophils), chondrocytes, hepatocytes, cardiovascular system	Immune defense against pathogens	Ca ⁺² -independent endotoxin, cytokines
Endothelial NOS (eNOS, NOS ₃)	NOS ₃ , chromosome 7	Endothelium	Vasodilation, modulation of platelet aggregation, modulation of leukocyte endothelial interactions	Ca ⁺² / Calmodulin

ตารางที่ 2.9 ความสัมพันธ์ของ NOS isoform และการเกิดโรคต่าง ๆ (ดัดแปลงจาก Khazan et al., 2015)

Disease	NO Isoform
Cardiac diseases Myocardial ischemia Reperfusion injury Myocarditis Heart failure	↑ iNOS
Vascular disease Atherosclerosis Hypertension Aging	↑ eNOS ↑ eNOS ↓ eNOS
Neurodegenerative disorders Parkinson's disease Alzheimer's disease Huntington's disease Multiple sclerosis Amyotrophic lateral sclerosis Traumatic brain injury	↑ iNOS
Local inflammation Chronic arthritis Inflammatory bowel diseases Tissue inflammation from toxic origi	↑ iNOS
Cancer	↑ iNOS, ↑ eNOS, ↑ nNOS
Metabolic syndrome	↑ iNOS
Diabetes	↑ eNOS
Obesity	↑ iNOS
Dyslipidemias (hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia)	↑ eNOS

2.2.4 การวัดปริมาณ NO ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น

การศึกษาเกี่ยวกับ NO ไม่ใช่เรื่องง่าย เนื่องจาก NO ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นในร่างกายไม่เสถียร จะสลายตัวอย่างรวดเร็ว NO มีอายุครึ่งชีวิต (half life) ในเนื้อเยื่อโดยเฉลี่ยประมาณ 3-6 วินาที ในเลือดประมาณ 1-2 วินาที (Malinski, T, 2000) ในสิ่งมีชีวิต NO ที่เกิดขึ้นจะถูก oxidize โดย O_2 อย่างรวดเร็ว ได้ nitrite และ nitrate ซึ่งเป็น metabolite product ใน plasma และในเลือด (whole blood) ตามลำดับ โดย metabolite product ที่เสถียรอันเป็นผลลัพท์จากการสลายของ NO คือ nitrite และ ในกรณีที่มีปริมาณของ O_2 ที่เพียงพอ nitrite จะถูกเปลี่ยนต่อได้ nitrate อายุครึ่งชีวิตของ nitrate และ nitrite ในระบบไหลเวียนของร่างกาย (circulation) คือ 5-8 ชม และ 110 วินาทีตามลำดับ (Khazan et al., 2015) เนื่องจาก NO มีอายุครึ่งชีวิตที่สั้นมาก การหาปริมาณการสังเคราะห์ NO จึงไม่นิยมวัดค่าของ NO โดยตรง เพราะกระทำได้ยาก โดยทั่วไปจึงนิยมวัดปริมาณของ metabolite product ของ NO คือ nitrite และ nitrate ใน serum, plasma และในปัสสาวะแทน เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ ปริมาณการสังเคราะห์ NO ในร่างกาย (Khazan et al., 2015; Ghasemi et al., 2007)

ในปัจจุบัน มีหลากหลายวิธีในการวัดปริมาณของ NO เช่น การวัดค่าการดูดกลืนแสงของรังสี UV (UV absorbance), การใช้ GC-MS, HPLC, ion-selective electrode, capillary electrophoresis, fluorescent assay, chemiluminescence assay และ electrochemical detection แต่วิธีที่รวดเร็ว ง่ายดาย ประหยัด และเป็นที่ยอมรับมากที่สุดคือ Griess assay ซึ่งรายงานโดย Johan Peter Griess ในปี ค.ศ. 1879 ปริมาณ NO ที่วัดได้จากปฏิกิริยา Griess มีความสัมพันธ์ที่ดีกับวิธี GC-MS ซึ่งถือว่าเป็นวิธีที่ให้ค่าที่ถูกต้องที่สุดในการหาปริมาณของ NO ในซีรัม (Romitelli et al., 2007; Khazan et al., 2015)

2.2.5 สมุนไพรต้านการอักเสบและการยับยั้ง iNOS

NO ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจาก inducible isoform iNOS เป็นสื่อกลางที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบทั้งชนิดเฉียบพลัน และเรื้อรัง (Heras et al., 2001) iNOS เป็นเอนไซม์ที่สร้างโดยเซลล์ macrophage ที่ถูกกระตุ้น (activated macrophage) เพื่อใช้ควบคุมและทำลายจุลินทรีย์ก่อโรค หรือตอบสนองต่อ endotoxin และ cytokine ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (inflammatory cytokines) เอนไซม์ iNOS จึงจัดเป็น immune inflammatory factor ที่พบในเซลล์ macrophage, hepatocytes, และใน glial cells (Nahrevanian, H. 2009) NO ที่สร้างจาก iNOS มีปริมาณสูง และสร้างโดยเซลล์หลายชนิดเพื่อตอบสนองต่อ cytokines iNOS จัดเป็นปัจจัยที่สำคัญของร่างกายในการตอบสนองต่อปรสิต การติดเชื้อแบคทีเรีย และการเจริญของเนื้องอก (tumor growth) NO ที่สร้างโดย iNOS เป็นสาเหตุของ septic shock และ โรค

ต่าง ๆ ที่มีสาเหตุจากโรคภูมิคุ้มกันตนเอง (autoimmune etiology) และโรคหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ รวมทั้งโรคมะเร็ง โรคอ้วน และโรคเกี่ยวกับเมตาบอลิซึม (ตารางที่ 2.9)

RAW 264.7 เป็นเซลล์ macrophage ในหนูเม้าส์ เมื่อถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide และ/หรือ IFN- γ จะเกิดการสังเคราะห์ iNOS และสร้าง NO ในปริมาณสูง ที่สามารถวัดปริมาณทางอ้อมโดยวัดปริมาณ nitrite ด้วยการใช้นิไตรต์ Griess reagent (Park et al., 2000; Nathan and Xie, 1994; Komutarin et al., 2004) สารในพืชสมุนไพรหลายชนิดโดยเฉพาะในกลุ่ม flavonoids สามารถยับยั้งการสร้าง NO ที่สร้างโดย iNOS เช่น quercetin, apigenin, wogonin, luteolin, tectorigenin, galangin, morin, epigallocatechin gallate, ginkgo biloba extract, silymarin, hesperidin, สารสกัดจากเมล็ดองุ่น เปลือกต้นสน และจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม เป็นต้น (Kim et al., 1999; Raso et al., 2001, Kobuchi et al., 1997; Sakata et al., 2003; Chan et al., 1997; Kang et al., 2002; Fine, 2000; Komutarin et al., 2004) โดยเฉพาะสารสกัด OPC จากเปลือกต้นสน (French maritime pine bark) ที่จำหน่ายทางการค้า ภายใต้ชื่อ Pycnogenol® มีงานวิจัยมากมายที่สนับสนุนว่าเป็นสารสกัดซึ่งมีทั้งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งการสร้าง NO และมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมาย เช่นฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส โรคมะเร็ง โรคภูมิแพ้ กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน เพิ่มความยืดหยุ่นของ collagen ป้องกันการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด ป้องกันและลดความเสียหายจากโรคหัวใจ และโรคไขข้ออักเสบต่าง ๆ เป็นต้น (Fine, 2000; Ray et al., 1999; Dhanalakshmi et al., 2003; Shafiee et al., 2003)

2.3 ว่านขันหมาก

2.3.1 ลักษณะทั่วไปของว่านขันหมาก

ว่านขันหมาก หรือที่จังหวัดจันทบุรีเรียกว่า เป็นพืชในวงศ์บอน (Araceae) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Aglaonema simplex* Bl. (เต็ม สมิตินันท์, 2544) มีชื่อท้องถิ่นต่างๆ กัน เช่น โหระ (ตราด ชุมพร) ว่านงดหิน (ตรัง) ว่านขันหมาก (ภาคกลาง) พรหมตีนสูง (ภาคใต้) และ ว่านขันหมากเศรษฐี (ใน internet) เป็นต้น (วิทย์ เทียงบูรณธรรม, 2542; [http:// medthai.com/พรหมตีนสูง](http://medthai.com/พรหมตีนสูง)) ว่านขันหมากอยู่ในสกุลเดียวกับสาวน้อยประแป้ง (*Homalomena rubescens* Kunth.) ว่านในสกุล *Aglaonema* มีอยู่หลายชนิด เช่น ว่านเขียวหมื่นปี ว่านกวักทางลายใบยาว ว่านกวักทางลายใบป้อม ว่านโพธิ์บัลลังก์ ว่านโพธิ์สัตย์ ว่านโพธิ์-รางเงินทั้งใบเล็กและใบใหญ่ ทางสายเดี่ยว สตาร์ไบต์ ซิลเวอร์คิงส์ ว่านกวักทองคำ ว่านกวักทองสัมฤทธิ์ กวักทองเกี๋ย ลายแดงและว่านขันหมาก เป็นต้น (ฝ่ายสารนิเทศพิเศษ, 2004) ต้นพรหมตีนสูง หรือว่านขันหมากเป็นพรรณไม้ล้มลุก ลำต้นกว้างประมาณ 1.5 เซนติเมตร แทงจากง่ามใต้ดิน สูงได้

ประมาณ 35 เซนติเมตร ถึง 1 เมตร มีสีเขียวเป็นข้อ ๆ อวบน้ำเล็กน้อย (รูปที่ 2.5 ก) ใบขนาดฝ่ามือ สีเขียวสด ปลายใบแหลม ใบเดี่ยวออกสลับ ออกใบที่ปลายต้นแบบคั่นหมาก ต้นหนึ่งมีใบไม่เกิน 10 ใบ (รูปที่ 2.5 ข) ดอกสีขาว หรือสีเหลืองอ่อน ๆ ออกเป็นช่อที่ซอกใบ และก้านช่อดอกยาว ดอกมีรูปร่างลักษณะคล้ายดอกหน้าวัว แต่มีสีขาวโอบตัวช่อเกสรไว้ (รูปที่ 2.5 ค) ผลรูปกลมรีคล้ายผลพิทูล หรือคล้ายลูกแตงตาหนู มีขนาดเล็ก ติดเป็นพวง 3-12 ผล ผลดิบสีเขียว เมื่อแก่หรือสุกเป็นสีเหลืองแกมส้ม หรือสีแดงสด (รูปที่ 5 ง) ว่านขันทมหากขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเมล็ด ขึ้นตามพื้นที่ชุ่มชื้น มีถิ่นกำเนิดตามเชิงเขาทั่วไปทุกภาคของไทย แต่คงว่านมักพบบนภูเขาหินที่มีความร่มชื้นตลอดปี (อภิญา สันยาสิทธิ์, 2548; <http://medthai.com/พรหมตีนสูง>)

ก



ข



ค



ง



รูปที่ 2.5 แสดงส่วนที่เป็นลำต้น (ก) ใบ (ข) ดอก (ค) และผลสุก (ง) ของต้นพรหมดินสูงหรือ
ว่านขันหมาก (<http://medthai.com/พรหมดินสูง>)

2.3.2 สรรพคุณของว่านขันหมาก

ตามตำรายาไทย (วิทย์ เทียงบุรณธรรม, 2542; สำนักงานข้อมูลสมุนไพร 2014;
<http://medthai.com/พรหมดินสูง>) ระบุสรรพคุณของว่านขันหมาก หรือพรหมดินสูงไว้ดังนี้

1. ผลมีสรรพคุณด้านอายุวัฒนะและด้านความชรา เชื่อกันว่าถ้ารับประทานผลสุกก่อนนอน เป็นประจำวันละ 4 ผล จะทำให้อายุยืนยาว ช่วยชะลอความแก่ คงความเป็นหนุ่มสาว หน้าตา ผิวพรรณขาวผุดผ่อง เนื้อหนังเต่งตึงและผมดำ ไม่หงอก
2. ผล และทั้งต้นใช้เป็นยาบำรุงร่างกาย ช่วยให้แข็งแรง มีกำลังวังชา ว่องไว ไม่เหนื่อยง่าย ช่วย แก้อาการอ่อนเพลีย และทำให้อาการของโรคเรื้อรังที่เป็นอยู่ดีขึ้น
3. ต้นใช้ต้มกินเป็นยาระบาย
4. ทั้งต้นใช้ต้มกับน้ำดื่มเป็นยาบำรุงกำลังในเพศชาย ช่วยเพิ่มพลังกำลังทางเพศ

2.3.3 ข้อแนะนำการใช้และการรับประทาน

ให้ใช้ลำต้น ราก ใบ และเมล็ด ไปสดหรือทำให้ฤทธิ์ยาอ่อนลงก่อน แล้วจึงนำไปผึ่งให้แห้ง ประมาณ 4-5 วัน หรือนำไปย่างกับไฟให้น้ำยางที่คั้นออกมาเสียก่อน แล้วจึงนำไปต้มกิน สำหรับผลสด โบราณให้กลืนทั้งผล หรือทั้งเม็ด ห้ามรับประทานโดยการเคี้ยว เพราะมีรสขื่น มียางทำให้ปากคัน ลิ้นชา และเกิดอาการบวมพองได้ แต่สามารถกลืนลงไปในห้องได้ทั้งผล ถ้านำผลมาตากแห้ง เคี้ยวกินจะไม่มี

อาการคัน และมีรสมันหอมอร่อย ในเชิงการค้า มักจะนำผลดิบมาตากแห้งแล้วคบเป็นผงอัดเป็นเม็ด แคปซูลรับประทาน (<http://medthai.com/พรหมตีนสูง>; อภิญญา สันยาสิ, 2548)

การเกี่ยวผลสดที่ทำให้เกิดการระคายเคืองและคัน อาจสืบเนื่องจากต้นว่านชันหมากมี calcium oxalate ซึ่งก่อให้เกิดความระคายเคืองต่อผิวเยื่อเมือก (mucous membrane) ต่าง ๆ calcium oxalate 3 ชนิดหลักที่พบในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวคือ raphides, styloids และ druses พืชในวงศ์ Araceae สามารถพบ calcium oxalate ได้ทั้ง 3 ชนิด และมีรายงานพบ calcium oxalate ชนิด druses และ raphides ทั้งชนิด defensive และ nondefensive idioblast ในส่วนใบของ *Aglaonema commutatum* (Saadi และ Mondal, 2012; Prychid และ Rudall, 1999)

2.3.4 งานวิจัยสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของว่านชันหมาก

จากการสืบค้นฐานข้อมูลทั้งในและต่างประเทศ ยังไม่มีรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารพฤกษเคมี ความเป็นพิษและฤทธิ์ทางชีวภาพของว่านชันหมากแต่อย่างใด อย่างไรก็ตาม ในฐานข้อมูลต่างประเทศมีรายงานเกี่ยวกับสรรพคุณของว่านในสกุล *Aglaonema* ในวงศ์ Araceae อยู่บ้าง แต่มีเพียงไม่กี่ชนิด เช่น มีรายงานส่วนประกอบของสารออกฤทธิ์ใน *Aglaonema commutatum* ว่าเป็น alpha-carotene, beta-carotene, delta-carotene, gamma-carotene, lutein, lycopene, lycocanthin และ violaxanthin หรือมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ *Aglaonema commutatum* ไว้มากมาย เช่น เป็นสารต้านโรคมะเร็ง และหอบหืด ด้านการแก้ชรา ด้านการก่อกลายพันธุ์ ด้านมะเร็งในอวัยวะต่าง ๆ และด้านโรคผนังเส้นเลือดอุดตัน ด้านอนุมูลอิสระ และมีสารกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น *Aglaonema angustifolium* ช่วยต้านอาการบวมต่าง ๆ (swelling) และใช้ลดไข้ *Aglaonema marantifolium* มีฤทธิ์ต้านเนื้องอก และ *Aglaonema pictum* ใช้รักษาโรคพยาธิ และเป็นยาอายุวัฒนะ (Duke, 2005) มีรายงานวิจัยการศึกษาเกี่ยวกับการลดปริมาณน้ำตาลในหนูที่เป็นเบาหวาน (streptozotocin-diabetic mice) โดยใช้ น้ำตาลที่มี nitrogen เป็นองค์ประกอบสกัดจาก *Aglaonema treubii* เทียบกับพืชชนิดอื่นคือ *Xanthocercis zambesiaca*, *Morus bombycis*, และ *Castanospermum australe* (Nojima et al., 1998) และรายงานฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง nitric oxide (NO) ในเซลล์ macrophage ที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS) โดย *Aglaonema modestum* Schott ex Engl. เทียบกับพืชสมุนไพรจีนชนิดอื่น (Ryu et al., 2001) นอกจากนี้ มีรายงานการศึกษาสารสำคัญที่สกัดจากพืชสกุล *Aglaonema* เช่น รายงานการสกัดสารกลุ่ม polyhydroxyalkaloids คือ 2,5-dihydroxymethyl-3,4-dihydroxypyrrolidine และ α -homonojirimycin จากพืชกลุ่ม Aglaonemateae ที่แสดงถึงความสัมพันธ์กับพืชในวงศ์บอน หรือ Araceae อื่นคือ *Nephtytis*

Schott, *Anchomanes* Schott และ *Pseudohydrosme* Engl. (Kite et al., 1997) รายงานการสกัดสารที่เป็น homoazasugars หลายชนิด เช่น α -homonojirimycin, homonojirimycin isomer รวมทั้งการค้นพบสารชนิดใหม่คือ α -4-di-epi-homonojirimycin หรือ α -homoallonojirimycin ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ glycosidase จาก *Aglaonema treubii* Engl. (Martin et al., 1999) สารประเภท azasugars ที่สามารถยับยั้ง glycosidases และ glycosyltransferases เป็นกลุ่มสารที่มีความสำคัญมากในปัจจุบันและกำลังได้รับความสนใจเป็นพิเศษ เนื่องจากมีศักยภาพสูงในการรักษาโรคเบาหวาน มะเร็ง และรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับไวรัส รวมทั้งโรค AIDS (Winchester, et al., 1992; Asano et al., 2000; Jacob, 1995) และไม่นานมานี้ มีการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ต่าง ๆ ของพืชในสกุล *Aglaonema* 9 species ด้วยการใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาคือ amplified fragment length polymorphism (AFLP) marker (Chen et al., 2004)

ผลสุกของว่านขันทมหกมีสีแดงอมส้ม จึงน่าจะมีสาร polyphenol อยู่สูง โดยเฉพาะกลุ่ม proanthocyanidins ซึ่งเป็น flavanoids ชนิดหนึ่งที่มีอยู่ในพืชผัก และผลไม้ที่มีสีแดง ม่วง หรือน้ำเงิน และสีของผลว่านที่ออกสีส้มน่าจะมีสารกลุ่มพวก β -carotene, lutein หรือ lycopene ซึ่งเป็นสารที่ให้สีเหลืองส้ม ในผักผลไม้ทั่วไป ซึ่งกลุ่มสารดังกล่าวล้วนเป็นพฤกษเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย โดยเฉพาะฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการสร้าง NO ที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับกลไกการเสื่อมของเซลล์ การเกิดโรคต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับอาการอักเสบเรื้อรังดังระบุเบื้องต้น นอกจากนั้น งานวิจัยชี้แนะว่าสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการสร้าง NO สามารถมีฤทธิ์รักษาโรคมะเร็งได้ด้วย เพราะ NO เป็นตัวกลางหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับกลไกของการเกิดโรคมะเร็งได้ ดังเช่นสารกลุ่ม OPCs ในเปลือกต้นสน และเมล็ดองุ่น ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการสร้าง NO สามารถช่วยรักษาโรคมะเร็งได้ (Bagchi et al., 2000, Fine, 2000) ตัวอย่างพืชที่สามารถต้านโรคมะเร็งได้มีมากมาย เช่น แห้วโกวเช่า (*Prunella vulgaris*), ออริกาโน่ (*Origanum vulgare*) หรือ common Turkish oregano, ต้นยาร์โรว์ (Yarrow; *Achillia millefolium*), หัวหอม (*Allium cepa*), จิง (*Zingiber officinale*), ชาเขียว (*Camellia sinensis*), โหระพา (*Ocimum basilicum*) และ โรสแมรี่ (*Rosmarinus officinalis*) เป็นต้น (Ryu et al., 2000; Duke, 2005)

จะเห็นได้ว่า ในปัจจุบัน แม้จะมีงานวิจัยที่ชี้แนะฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชในสกุล *Aglaonema* บ้าง แต่การศึกษาวิจัยยังมีปริมาณต่ำ และไม่มีการวิจัยเกี่ยวกับว่านขันทมหกแต่อย่างใด มีแนวโน้มสูงว่าว่านขันทมหกอาจมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเหมือนพืชในสกุล *Aglaonema* เดียวกัน ดังนั้น การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับความเป็นพิษ องค์ประกอบทางพฤกษเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากผลว่านขันทมหกจึงเป็นการบุกเบิกของงานวิจัยที่นำไปสู่องค์ความรู้ใหม่ของผู้บริโภคพืชสมุนไพรที่ยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน

โครงการวิจัยนี้จึงเสนอเพื่อหาปริมาณ polyphenol ในผลว่านชันหมาก และวัดปริมาณ flavonoids, proanthocyanidin ซึ่งเป็น subclass ของ flavonoids ที่เป็นสาร polyphenol ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง พร้อมตรวจสอบฤทธิ์ชีวภาพเบื้องต้นของว่านชันหมาก โดยหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งการสร้าง NO ควบคู่กับการต้านโรคมะเร็ง เพื่อให้สอดคล้องกับสรรพคุณของว่านชันหมากในตำราโบราณว่าเป็น ยาอายุวัฒนะ ช่วยให้ร่างกายแข็งแรง ชะลอการแก่ ซึ่งสามารถอธิบายได้ด้วยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และตรงกับข้อมูลเบื้องต้นที่ได้จากการสัมภาษณ์ผู้บริโภคว่าว่านชันหมากว่าอาจจะมีฤทธิ์รักษาโรคมะเร็ง สำหรับความเป็นพิษเฉียบพลันของการบริโภคว่านชันหมาก ไม่น่าจะเป็นปัญหามากนัก เพราะมีผู้บริโภคว่านชันหมากที่ซื้อขายกันประจำอยู่แล้ว และไม่เคยมีข่าวหรือรายงานเกี่ยวกับความเป็นพิษจากการบริโภค สิ่งที่ต้องกังวลน่าจะเป็นพิษจากการบริโภคต่อเนื่องในระยะยาวมากกว่า งานวิจัยนี้จึงศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดจากว่านชันหมาก เพราะอาจเป็นผลระยะยาวจากการบริโภคว่านชันหมากอย่างต่อเนื่อง การเกิดการกลายพันธุ์ สามารถชักนำให้เกิดผลเสียต่อเซลล์และมีศักยภาพสูงในการชักนำให้เกิดโรคมะเร็งได้ ซึ่งเป็นความกังวลทั่วไปของผู้บริโภคว่านชันหมากอย่างต่อเนื่องเป็นระยะยาว

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมี น้ำ และวัสดุที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1 สารเคมี

- (+)- Catechin hydrate, vitamin C (Fluka Chemine GmbH, Buchs, Switzerland)
- 1, 4-Piperazinediethanesulfonic acid (PIPES) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)
- 2-AA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)
- 2-NF (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)
- 4-Nitrophenyl N-acetyl- β -D-glucosaminide (p-NAG) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)
- Albumin, dinitrophenyl (DNP-albumin) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)
- Aluminum chloride hexahydrate ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)
- Ampicillin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)
- Anti-DNP (mouse monoclonal IgE) (SPE-7) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)
- Ascorbic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)
- Bacto agar (Becton Dickinson, Sparks, MD)
- Biotin (ACROS, NJ, USA)
- Crystal violet (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)
- DCFH-DA: 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)
- DMSO (AMRESCO, Fountain Parkway Solon, OH)
- DPPH: 2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)
- FBS: Fetal bovine serum (Hyclone, Logan, Utah)
- Ferric chloride hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Carlo Erba , Italy)
- Ferric-2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine (FeIII-TPTZ) (ACROS, NJ, USA)
- Ferrous sulfate heptahydrate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)
- Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)
- G-6-P (D-Glucose 6-phosphate disodium salt hydrate) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Gallic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Glucose (fluka, Germany)

Hank's balance salts solution (HBSS) (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR)

KCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

L-histidine (ACROS, NJ, USA)

LPS: lipopolysaccharide (*Escherichia coli* O111:B4) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

mIFN- γ : Mouse interferon gamma (Pierce Protein Research Products, Rockford, IL)

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR)

N-(1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Na₂HPO₄ (Carlo Erba, Italy)

NaCl (AMRESCO, Fountain Parkway Solon, OH)

NADP-Na₂ (β -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt hydrate) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

NaH₂PO₄ (Carlo Erba, Italy)

Nutrient broth no. 2 (Oxiod, Hampshire, UK)

Penicillin G (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Quercetin dihydrate (INDOFINE Chemical Company, Inc., Hillsborough, NJ).

RPMI medium 1640, HBSS: hank's balanced salt solution (Gibco Invitrogen, Grand Island, NY).

S9 fraction (ภาควิชาชีวเคมี, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่)

Sodium azide (NaN₃) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Sodium nitrite (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Streptomycin sulfate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Sulfanilamide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

*t*BuOOH: *tert*-butyl hydroperoxide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Trolox: 6-Hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany)

Trypan blue solution (0.4%) (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR)

3.1.2 น้ำ

น้ำที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดเป็น deionized water ที่ได้จากเครื่องกรองน้ำของ Cascada Bio water (Life sciences, Ann Arbor, MI)

3.1.3 วัสดุปลอดเชื้อสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์

15 ml และ 50 ml conical tubes (Corning Inc., Corning, NY)

96 well flat bottom plate (Corning Inc., Corning, NY)

96 well plate costar black/clear bottom (Corning Inc., Corning, NY)

Culture flasks ขนาด 25 และ 75 cm² (Nunc, Rochester, NY)

Petri dish ขนาด 60x15 mm และ 100x15 mm (Corning Inc., Corning, NY)

Cell scraper (SPL Life Sciences Inc., Gyeonggi-do, Korea)

3.1.4 Antibodies

Anti-COX-2 (murine polyclonal) (160106) Cayman

Anti-DNP (mouse monoclonal IgE) (SPE-7) Sigma

Anti-iNOS (mouse monoclonal IgG1) (C-11) Santa cruz

Goat-anti-mouse-IgG-HRP conjugate (Sc-2005) Santa cruz

Goat-anti-rabbit-IgG-HRP conjugate (10004301) Cayman

α -Tubulin (mouse monoclonal IgG) (B-7, Sc5286) Santa cruz

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์การวิจัย

Blender (Phillips)

Autoclave (model HVE-50) Hirayama)

เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (model PG5 002-S), Mettler Toledo)

เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (model PW254, ADAM[®])

Centrifuge (model ICT15RT, Techcomp)

Compound microscope (model CX21, Olympus)

Inverted microscope (model CKX41, Olympus)

Biohazard safety carbinet class II (model SG600E, Holton)

Hot-air oven (Mettler Gmbh & Co. KG,)

ตู้เย็น (4°C) (model Superior frost free T H 8903, Sharp)

ตู้แช่แข็ง(-20°C) (Whirlpool)

ตู้แช่แข็ง(-80°C) (Forma 900 series, Thermo scientific)

Microplate spectrophotometer (Cecil 1000 Series,Cecil instrument)

Gemini EM fluorescence microplate reader (Molecular Device)

Electrophoresis system (model HE33, Hoefer)

Electrophoresis power supply (EPS601, Amersham)

Dessicator (Schott)

Rotary evaporator with vacuum (model R205, Buchi)

Lyophilizer (Freeze-zone 12 plus, Labconco Corporation)

Water bath (Mettler)

pH meter (Metrohm)

8-Multichannel pipette 5-50 μ l และ 50-300 μ l (Gibco)

Micropipette 0.5-10 μ l, 2-20 μ l, 20-200 μ l, 100-1000 μ l และ 500-5000 μ l (Pipetman[®], Gilson)

Carbon dioxide incubator (SHEL LAB)

Haemocytometer and cover slip (Fisher Scientific)

Pasteur pipettes (Fisher Scientific)

Glasswares (Pyrex)

3.3 สถานที่ทำการวิจัย

ทุกการทดลองที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture) และ เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย กระทำในตู้ปลอดเชื้อ (biosafety cabinet class II) วัสดุและอุปกรณ์ต่างๆปลอดเชื้อ รวมทั้งใช้เทคนิค ปลอดเชื้อ ความเข้มข้นของสารต่าง ๆ ที่ระบุในการทดลองเกี่ยวกับเซลล์เป็นความเข้มข้นสุดท้ายของสาร

ใน culture การบ่มเซลล์กระทำในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 37°C และ 5% CO₂ การทดลองอื่นๆ ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเซลล์กระทำในห้องปฏิบัติการพิษวิทยา อาคารเฉลิมพระเกียรติ 80 พรรษา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ผลการทดลองที่แสดงทุกการทดลองเป็นตัวแทนของการทดลองแบบเดียวกันอย่างน้อยที่สุด 2 ซ้ำ

3.4 วิธีดำเนินการวิจัยที่เกี่ยวกับเซลล์สายพันธุ์ (Cell lines)

3.4.1. เซลล์สายพันธุ์

ใช้เซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW264.7 (Mouse macrophage RAW264.7 cells, Cell Lines Service, Eppelheim, Germany) เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากว่านขันหมาต่อการยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระในเซลล์ และการยับยั้งการอักเสบ ใช้เซลล์เบโซฟิลสายพันธุ์ RBL-2H3 (Rat basophilic leukemic cells, ATCC, Manassas, VA, USA) เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากว่านขันหมาต่อการต้านโรคมะเร็ง โดยดูฤทธิ์การยับยั้งของสารสกัดต่อการปล่อยสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

3.4.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์

อาหารเลี้ยงเซลล์ RAW264.7 คือ RPMI-1640 media ที่เติม (supplement) ด้วย 10% heat-inactivate fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin และ 100 µg/ml streptomycin เพื่อให้เป็น complete media เลี้ยงเซลล์ในตู้ carbon dioxide incubator ภายใต้สภาวะ 37°C, 5% CO₂ จนกระทั่งเซลล์เจริญเติบโตคิดเป็น 80% ครอบคลุมพื้นที่ผิว flask (confluence) ที่ใช้เลี้ยงเซลล์ทุกครั้งก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

เลี้ยงเซลล์ RBL-2H3 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM media ที่เพิ่มเติมด้วย 15% heat-inactivate fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin และ 100 µg/ml streptomycin เพื่อใช้เป็น complete media เลี้ยงเซลล์ในตู้ carbon dioxide incubator ภายใต้สภาวะ 37°C, 5% CO₂ จนกระทั่งเซลล์เจริญเติบโตประมาณ 80% ครอบคลุมพื้นที่ผิว flask ที่ใช้เลี้ยงเซลล์ทุกครั้งก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

3.4.3 การ trypsinize เซลล์

ในกรณีที่มีการเจริญของเซลล์เป็นประเภทต้องการสิ่งเกาะยึด (adherent cell) การเก็บเกี่ยว (harvest) หรือนำเซลล์ออกจาก culture flask สามารถกระทำโดยวิธี trypsinize เพื่อให้เซลล์หลุดจากพื้นที่

ผิวเกาะยึดใน flask ที่ใช้เพาะเลี้ยง การ trypsinize เซลล์กระทำเมื่อปริมาณเซลล์เจริญคลุมพื้นที่ผิวใน culture flask ประมาณ 80-90 % รายละเอียดของขั้นตอนในการ trypsinize เซลล์ มีดังนี้คือ

1. Pipette RPMI media ออกจากเซลล์ที่อยู่ใน culture flask
2. ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วย PBS
3. Trypsinize เซลล์ออกด้วยการใช้สารละลาย trypsin (0.25% trypsin 1 mM EDTA ใน PBS) โดยใช้ปริมาตรของสารละลาย trypsin ให้น้อยที่สุด แต่สามารถคลุมพื้นที่ผิวทั้งหมดของเซลล์ ซึ่งกระทำโดยขยับ flask ไปมาอย่างนุ่มนวลให้ trypsin ไหลคลุมผิวเซลล์ให้ทั่ว เช่น ถ้าใช้ culture flask ขนาดกลาง ที่มีพื้นที่ผิว 75 m² ใช้ trypsin ประมาณ 20-50 μ l
4. บ่มเซลล์ร่วมกับ trypsin ที่ตู้บ่ม 37 °C 5% CO₂ เป็นระยะเวลาประมาณ 5-10 นาที ในระหว่างการบ่ม นำเซลล์ออกมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (invert microscope) เป็นระยะเพื่อตรวจดูว่าเซลล์ได้หลุดจากพื้นที่ผิวเกาะยึดหมดหรือยัง ทั้งนี้สามารถเคาะ flask เบา ๆ และหมั่นกลิ้ง trypsin ให้คลุมพื้นที่ผิวให้ทั่ว flask เพื่อช่วยให้เซลล์หลุดง่ายขึ้น ระยะเวลาของการบ่มเซลล์กับ trypsin ควรใช้ระยะเวลาให้สั้นที่สุดเท่าที่จะกระทำได้ และไม่ควรใช้เวลามากกว่า 15 นาที เพราะ trypsin เป็น protease ถ้าสัมผัสกับเซลล์นาน จะเป็นพิษต่อเซลล์
5. เมื่อเซลล์หลุดออกจากพื้นที่ผิวเรียบร้อย รีบทำการต้านฤทธิ์ (neutralize) ของ trypsin ด้วยการใส่ complete RPMI media ซึ่งมี 10% FCS
6. ทำการปั่นเหวี่ยงเซลล์ที่ 1,500 rpm เป็นระยะเวลา 10 นาที
7. ล้างเซลล์ 1 ครั้งด้วย PBS และ resuspend เซลล์ใน media ที่ต้องการใช้ในการทดลอง

3.5 วิธีดำเนินการวิจัยที่เกี่ยวกับแบคทีเรีย (Bacteria)

3.5.1 แบคทีเรีย

โครงการนี้ทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดจากชันหามากที่ได้จาก 95% EtOH แบบ *in vitro* โดยใช้ Ames test วิธีทดสอบที่ใช้ แบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* โดยงานวิจัยนี้เลือกใช้ *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ที่สามารถตรวจวัดการกลายพันธุ์แบบ frameshift

mutation และการกลายพันธุ์แบบ base-pair substitution mutation ตามลำดับ (Maron and Ames, 1983)

3.5.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

เลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ *Salmonella typhimurium* ในอาหารเลี้ยง Oxiod nutrient broth No. 2 เขย่าที่ 37 °C ความเร็วรอบ 90 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชม. วัดความขุ่นของอาหารเพื่อหาปริมาณของแบคทีเรีย โดยเจือจาง ด้วย 0.9% NaCl ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.3-0.4 ที่ความยาวคลื่น 620 nm (การทดลองนี้เจือจางประมาณ 8 เท่า)

3.6 การเตรียมสารสกัดจากว่านขันหมาก

ผลของว่านขันหมาก (*Agloanema simplex* BL.) ถูกเก็บมาจากเนินเขาบริเวณ อ. ปักธงชัย จังหวัด นครราชสีมา ในระหว่างเดือนธันวาคม ถึงเดือนมกราคม เนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่ว่านขันหมาก กำลังสุกพอดี ถ้าเลยจากช่วงเวลาดังกล่าว ผลของว่านขันหมากจะหายาก ตัวอย่างพืชถูกอ้างอิงตาม Flora of Thailand เล่ม 11 part 2 และตัวอย่างพืช (BKF 186333) ถูกเก็บไว้ที่หอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช

สกัดผลว่านขันหมากโดยใช้ 95% ethanol ด้วยวิธีการหมัก (maceration) ดังมีขั้นตอนดังนี้

1. คัดเฉพาะผลว่านขันหมากที่สุก มีสีส้มจัดจนถึงแดงเข้ม นำมาล้างด้วยน้ำให้สะอาด ฟึ่งในที่ร่มจนกระทั่งแห้ง นำไปปั่นใน blender พอหยาบ จากนั้นนำไปอบใน hot air oven ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นระยะเวลา 16 ชม.
2. นำผลแห้งไปบดด้วยเครื่องบดจนกระทั่งได้ผงแห้งที่ละเอียด
3. หมักว่านขันหมากในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 ml โดยใช้ผงบดแห้งของว่านขันหมาก 100 g ต่อตัวทำละลาย 95% ethanol 200 ml
4. เขย่าด้วยการใช้ shaker ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชม เก็บสารสกัดไว้ที่ 4°C และเติม 200 ml ของ 95% ลงไปเขย่าอีก ทำแบบเดิมจนกระทั่งครบ 3 รอบ
5. นำสารสกัดทั้งหมดมารวมกัน ปั่นเหวี่ยงที่ 3500 x g ที่ 4°C เป็นเวลา 10 นาที และกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1

6. ทำให้สารสกัดเข้มข้นด้วยการระเหยโดยใช้ rotary evaporator และทำให้เป็นผงแห้งด้วยวิธี freeze dry ใน lyophilizer
7. นำผงแห้งของสารสกัดที่เตรียมได้ทั้งหมดมาผสมรวมกัน ชั่งน้ำหนัก และเก็บสารสกัดที่เป็นผงแห้ง ไว้ที่ -80°C สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป ในการทดลองแต่ละครั้ง ชั่งผงแห้งของสารสกัดที่ได้จาก ethanol ในปริมาณที่ต้องการ แล้วนำมาละลายใน dimethyl sulfoxide (DMSO)

3.7 ปริมาณของสารพฤกษเคมี (phytochemical) ของว่านขันหมาก

สารสกัดหยาบของผลว่านขันหมากที่ได้จากการสกัดด้วย ethanol 95% ถูกส่งไปห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีทางอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เพื่อวิเคราะห์ทางเคมีแบบประมาณ (Proximate analysis) เพื่อหาความชื้น ปริมาณรวมของโปรตีนรวม (crude protein) ไขมัน (crude fat) ขี้เถ้า (crude ash) และกากหยาบ (crude fiber) โดยใช้วิธีมาตรฐานของ AOAC (1997) ซึ่งหาปริมาณความชื้นจากการอบแห้งโดย weight difference method หาปริมาณรวมของกากหยาบ และขี้เถ้าจากการเผา (ignition) ตัวอย่าง ส่วนปริมาณโปรตีนหยาบ และไขมันหยาบ หาได้โดยใช้ Kjeldahl method และ Soxhlet extraction method ตามลำดับ

3.7.1 ปริมาณรวมของสารฟีนอลิก (Total phenolic content)

การตรวจหาปริมาณทั้งหมดของสารฟีนอลิก ใช้วิธี Folin-Ciocalteu ซึ่งอาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์ในการทำให้เกิดปฏิกิริยาสีเนื่องจาก molybdate tungstate ion สารละลาย Folin-Ciocalteu (Folin-Ciocalteu reagent) ประกอบด้วย sodium tungstate, sodium molybdate, phosphoric acid และ sodium carbonate หลักการของวิธีทดสอบคือ เมื่อได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านออกซิเดชัน ไอออน Mo(VI) ซึ่งมีสีเหลืองใน Folin-Ciocalteu จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ Mo(V) ซึ่งมีสีน้ำเงิน ที่สามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงสีจากปฏิกิริยา และวิเคราะห์หาปริมาณได้โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร แล้วนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานซึ่งอาจใช้กรดแทนนิก (tannic acid) กรดแกลลิก (gallic acid) หรือคาทีชิน (catechin) เป็นตัวแทนของสารประกอบฟีนอลิก (Singleton et al., 1999) ดังนั้นจึงสามารถหาค่า

ของปริมาณของ phenolic ในแต่ละสารสกัดด้วยวิธีการของ Folin Ciocalteu (Mariod et al., 2008) สำหรับขั้นตอนของการทดสอบมีรายละเอียดดังนี้

1. เติมสารสกัด 100 μ l ลงไปในหลอดทดลอง ตามด้วย 2 ml ของ 2% NaCO_3 และ ผสมด้วย vortex บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที
2. เติม 100 μ l ของ 50% Folin-Ciocalteu reagent (เตรียมสด 1:1 ของ สารละลาย Folin : DI water) และผสมด้วย vortex บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องอีกเป็นเวลา 30 นาที
3. วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่ 750 nm โดยการใช้ Cecil 1000 Series spectrophotometer
4. นำไปคำนวณเปรียบเทียบกับ calibration curve ของสารมาตรฐาน gallic acid ที่มีค่าอยู่ระหว่าง 0.05-0.5 mg/ml
5. รายงานผลความเข้มข้นของสารประกอบ phenolic ในสารสกัดเป็น mg ของ gallic acid equivalent (GAE) ต่อกรัมของสารสกัด

3.7.2 ปริมาณรวมของ flavonoids (Total flavonoid content)

ปริมาณรวมของ flavonoids สามารถหาได้โดยใช้ aluminium chloride (AlCl_3) colorimetric method (Liu et al., 2002) หลักการทดสอบคือ AlCl_3 ทำปฏิกิริยากับ C-4 keto group, C3 หรือ C-5 hydroxyl group ของ flavones และ flavonols เกิดการสร้างสารประกอบเชิงซ้อนที่เสถียรต่อกรด (acid stable complex) นอกจากนี้ AlCl_3 สามารถทำปฏิกิริยากับ ortho-dihydroxyl group ของ flavonoids ได้ สารประกอบเชิงซ้อนที่ไม่เสถียรในกรด (acid labile complex) flavonoid ที่ทำปฏิกิริยากับ AlCl_3 ใน acetate buffer ได้สาร kelate ที่มีสีเหลืองซึ่งวัดได้ด้วย spectrophotometre (Constanta และ Rodica, 2010) ขั้นตอนการทดสอบมีดังนี้คือ

1. เติมตัวอย่างสารสกัด หรือ positive control (catechin 0.05-0.2 mg/ml) 250 μ l ลงในหลอดทดลอง ตามด้วยน้ำกลั่น 1.25 ml และ 75 μ l 5% sodium nitrite ผสมให้เข้ากันด้วย vortex
2. หลังจากนั้น 6 นาที ใส่ 150 μ l 10% AlCl_3 ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ 5 นาที

3. เมื่อครบกำหนดเวลา เติม 500 μ l sodium hydroxide (1M) และน้ำกลั่น 275 μ l ผสมให้เข้ากัน
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ 510 nm โดยการใช้ Cecil 1000 Series

3.7.3 ปริมาณรวมของ proanthocyanidins (Total proanthocyanidins content)

ปริมาณรวมของสารประกอบ proanthocyanidins สามารถวัดได้ด้วยวิธี vanillin-HCl assay (Sun et al., 1998) หลักการทดสอบคือ vanillin มีความจำเพาะต่อกลุ่ม flavan-3-ol ในสารละลายที่เป็นกรด vanillin ถูกเติม proton (protonated) ได้สารซึ่งเป็น weak electrophilic carbonation ที่ทำปฏิกิริยากับวงแหวน flavonoid (flavonoid ring) ที่ตำแหน่ง 6 และ 8 สารตัวกลางที่ถูกดึงโมเลกุลของน้ำออก ได้สารที่มีสีแดง ขั้นตอนการทดสอบของ vanillin-HCl มี ดังนี้คือ

1. เติมตัวอย่างสารสกัด 125 μ l ลงไปในหลอดทดลอง ตามด้วย 4% vanillin-methanol 750 μ l จากนั้นเติม 375 μ l ของสารละลาย 4% HCl-methanol ผสมสารละลายด้วย vortex
2. วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่ 500 nm โดยการใช้ Cecil 1000 Series spectrophotometer คำนวณเปรียบเทียบกับ calibration curve ของสารมาตรฐาน catechin มีค่าความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 0.05-0.2 mg/ml
3. รายงานความเข้มข้นของสารประกอบ proanthocyanidins ในสารสกัด เป็น mg ของ catechin equivalent (CE) ต่อกรัมของสารสกัด

3.8 ฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลว่านขันหมา

เนื่องจากอนุมูลอิสระมีหลายชนิด และกลไกการต้านอนุมูลอิสระมีหลายประเภท การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากว่านขันหมา จึงใช้วิธีการทดสอบทั้งหมด 3 วิธีคือ ตรวจสอบความสามารถในการ scavenging free radical ด้วยการใช้อนุมูลอิสระที่เสถียร DPPH \bullet ตรวจสอบความสามารถในการรีดิวซ์ ด้วยวิธี FRAP ซึ่งทั้ง 2 วิธีนี้เป็นการทดสอบในหลอดทดลอง ส่วนวิธีที่ 3 เป็น

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่เกิดภายในเซลล์ ด้วยการใส่สาร DCFH-DA ที่สามารถให้สารเรืองแสงภายในเซลล์

3.8.1 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging assay

DPPH assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ที่ใช้ reagent คือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) ซึ่งเป็น organic nitrogen radical ที่เสถียรและมีสีม่วงในตัวทำละลาย methanol ถ้าตัวอย่างมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ คือกำจัด (scavenge) free radical ได้ ความเข้มของสารละลายสีม่วงจะจางลง ให้สารที่ดูดกลืนแสงได้ดีที่มีความยาวคลื่น 517 nm (Katsube et al., 2004) ขั้นตอนการทดสอบมีดังนี้คือ

1. เติม 0.2 ml ของแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดลงไปในห้องทดลอง ตามด้วย 3.0 ml ของสารละลาย DPPH (2.5×10^{-2} g/L methanol) ผสมด้วย vortex และบ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 30 นาที
2. วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่ 517 nm โดยการใช้ Cecil 1000 Series spectrophotometer
3. การรายงานผลของฤทธิ์ในการทำลายอนุมูลอิสระกระทำในรูปแบบ median inhibitory concentration (IC_{50}) ซึ่งหมายถึงความเข้มข้นของสารตัวอย่างในการยับยั้ง DPPH• 50% ค่า IC_{50} หาได้โดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition ของ DPPH• กับความเข้มข้นของสารตัวอย่าง ค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่มี % inhibition เท่ากับ 50 คือค่า IC_{50} เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระชนิด DPPH สามารถคำนวณได้ดังสูตร

$$\text{DPPH}^{\bullet} \text{ radical scavenging activity (\%)} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

A_{sample} และ A_{control} คือค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm ของสารตัวอย่าง (หลอดทดลองมีสารสกัด และ DPPH•) และ กลุ่ม control (หลอดทดลองมีเฉพาะ DPPH•) ตามลำดับ การลดลงของค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH• บ่งบอกถึงการเพิ่มขึ้นของความสามารถในการทำลาย DPPH•

3.8.2 FRAP (ferric reducing/antioxidant power) assay

FRAP assay เป็นวิธีตรวจสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชัน โดยอาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์ และติดตามการเปลี่ยนแปลงสีของสารประกอบเชิงซ้อน คือ เมื่อสารประกอบเชิงซ้อน ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+} -TPTZ) ได้รับความรีดิวซ์จากสารต้านออกซิเดชัน จะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อน ferrous tripyridyltriazine (Fe^{2+} -TPTZ) ที่มีสีน้ำเงิน ที่สามารถดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 593 nm ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารตัวอย่าง กระทำโดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน แล้วรายงานเป็นค่า FRAP value การวัดความสามารถในการรีดิวซ์ของสารสกัดกระทำตามวิธีการของ Benzie และ Strain (1996) ดังมีรายละเอียดของขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมส่วนผสมของ FRAP reagent ดังต่อไปนี้ 0.1 M acetate buffer (pH 3.6), 10 mM 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ) solution ใน 40 mM HCl และ สารละลาย 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
2. นำส่วนผสมของสารทั้ง 3 ชนิด ผสมรวมกันในอัตราส่วน 10:1:1, v/v/v
3. เติม FRAP reagent (3 ml) ลงไปใน หลอดทดลองที่มี 0.1 ml ของ สารสกัด และ ผสมด้วย vortex
4. บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็น เวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่ 593 nm โดยการใช้อยู่ Cecil 1000 Series spectrophotometer
5. นำไปคำนวณเปรียบเทียบกับ calibration curve ของสารมาตรฐาน vitamin C ที่มีค่าอยู่ระหว่าง 0.002-0.04 $\mu\text{g/ml}$
6. รายงานความสามารถในการรีดิวซ์ของสารสกัด เป็น mg ของ vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) ต่อกรัมของสารสกัด

3.8.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ (Cellular antioxidant activity; CAA)

งานวิจัยนี้เลือกใช้ DCFH-DA assay เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ หรือต้าน oxidative stress ภายในเซลล์ สาร DCFH-DA (2',7'-dichlorofluorescein-diacetate) เป็นสารประกอบ non-fluorescent ที่สามารถซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ เมื่อเข้าสู่เซลล์ เอนไซม์ esterase ภายในเซลล์จะตัดหมู่ diacetate

ออกจากโมเลกุลของ DCFH-DA ได้สาร DCFH ที่มีขั้วสูงขึ้น ทำให้อนุมูลอิสระที่อยู่ภายในเซลล์สามารถ oxidize DCFH และให้ผลผลิตสุดท้ายเป็น DCF ซึ่งเป็นสาร fluorescent ที่เรืองแสง (Wolfe และ Liu, 2007) สัญญาณ fluorescent ที่เกิดจาก DCF จึงเป็นค่าแปรผันตาม intracellular oxidative stress ภายในเซลล์ การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ของ DCFH-DA assay ดำเนินตามวิธีการของ Kim et al., 2011 โดยมีการดัดแปลงเล็กน้อย ดังมีรายละเอียดของขั้นตอนดังนี้

1. เก็บเกี่ยวเซลล์ RAW264.7 ที่เลี้ยงใน petri dish ขนาด 100x15 mm โดยการใช้ cell scraper
2. เติมเซลล์ RAW264.7 ที่อยู่ใน complete media ลงในหลุมของ 96 well plate costar black/clear bottom (1×10^5 เซลล์/หลุม) จากนั้นบ่มเซลล์เป็นเวลา 16-18 ชม ในตู้บ่มที่ 37°C และ $5\% \text{CO}_2$
3. เท media ออกจาก plate ในการค้นหาฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ของว่านชันหมาก บ่มเซลล์ร่วมกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 0, 125, 250 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับ antioxidant control ใช้ quercetin (10 μM) บ่มเป็นเวลา 24 ชม. สำหรับความเข้มข้นของสารสกัดที่เลือกใช้ ได้จากการทดลองเบื้องต้น (preliminary study) ที่หาความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ RAW264.7 (รายละเอียดอยู่หัวข้อที่ 3.9 การหาความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์)
4. เมื่อครบ 24 ชม. ล้างสารสกัดออกจากเซลล์ด้วย HBSS 2 ครั้ง ตามด้วยการเติม 20 μM DCFH-DA ที่อยู่ใน HBSS ลงไปในแต่ละหลุม และบ่มในตู้บ่มที่มีด็อกเป็นระยะเวลา 30 นาที (ภายหลังการเติม DCFH-DA ห่อ plate ด้วย aluminum foil เพื่อป้องกันแสง และทำการทดลองในห้องที่มีแสงไฟสลัว)
5. เมื่อครบ 30 นาที ล้าง DCFH-DA ออกด้วย HBSS 3 ครั้ง และ สุดท้ายเติมตัวกระตุ้น 500 μM tert-butylhydroperoxide (tBuOOH) ที่เตรียมใน HBSS ลงไปในแต่ละหลุม
6. อ่านผลด้วยการวัด intensity ของ fluorescence signal ภายหลัง 3 ชม โดยใช้ excitation wavelength ที่ 485 nm และ emission wavelength ที่ 535 nm โดยการใช้ Gemini EM fluorescence microplate reader

3.9 การหาความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์

ในการทดลองเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของว่านขันหมากที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ จำเป็นต้องหาความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ ในโครงการวิจัยนี้ ใช้เซลล์ RAW264.7 ในการศึกษาฤทธิ์ของว่านขันหมากในการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ และ ด้านการอักเสบด้วยการยับยั้งการสร้าง NO สำหรับการศึกษาด้านการหลังสารก่อภูมิแพ้ ของว่านขันหมาก ใช้ เซลล์ RBL-2H3

การหาความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ เริ่มต้นด้วยการบ่มสารสกัดที่ความเข้มข้นแตกต่างกันร่วมกับเซลล์ การหาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ภายหลังการบ่ม กระทำโดย 2 วิธีที่แตกต่างกัน คือ MTT assay และ trypan blue exclusion รายละเอียดของขั้นตอนทั้งหมดมีดังนี้คือ

3.9.1 การบ่มเซลล์ร่วมกับสารสกัด

1. ใส่เซลล์ RAW264.7 (1×10^5 เซลล์/หลุม) หรือ RBL-2H3 (5×10^4 เซลล์/หลุม) ที่อยู่ใน media ลงไปในหลุมของ 96 well plate
2. นำเซลล์ที่อยู่ใน plate เข้าบ่มค้างคืน (16 ชม.) ในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37°C , 5% CO_2
3. หลังจากนั้นเติมสารสกัดว่านขันหมากลงไปในแต่ละหลุมของ plate โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดเป็น 0.125, 0.25 และ 0.50 mg/ml และบ่มเซลล์ต่ออีกเป็นระยะเวลา 24 ชม.
4. เมื่อครบกำหนดเวลา ทำการประเมินความเป็นพิษของสารสกัด TAM ต่อเซลล์ ด้วยการใส่ 2 วิธีเปรียบเทียบกัน คือ MTT assay และ trypan blue exclusion

3.9.2 MTT assay

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) เป็นสีสังเคราะห์ประเภท tetrazolium salt การใช้ MTT assay ประเมินปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตนั้น อาศัยหลักการว่า เฉพาะเซลล์ที่มีชีวิต หรือมี metabolically active เท่านั้น ที่สามารถใช้เอนไซม์ succinate dehydrogenase ใน mitochondria เปลี่ยน MTT ให้เป็น formazan product โดยปฏิกิริยา reduction formazan product ที่

เกิดขึ้นมีสีม่วงน้ำเงินที่ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 550-600 nm (Mosman 1983; Denizot และ Lang, 1986) ดังนั้น ค่าการดูดกลืนแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับ formazan product ที่แปรผันโดยตรงกับปริมาณของ succinate dehydrogenase ซึ่งขึ้นกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตนั่นเอง การประเมินความเป็นพิษของสารสกัดจากผลว่านขันหมาก ต่อเซลล์ RAW264.7 และ RBL-2H3 ด้วย MTT assay ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Martin and Clynes (1993) และ Byun et al. (2008) โดยมีรายละเอียดตามขั้นตอนดังนี้

1. ภายหลังจากบ่มเซลล์ร่วมกับสารสกัดใน 96 well plate (RAW264.7 เซลล์ ใช้ 1×10^5 เซลล์/หลุม สำหรับ RBL-2H3 เซลล์ ใช้ 4×10^4 เซลล์/หลุม) เป็นระยะเวลา 24 ชม นำ plate ไป centrifuge ที่ 1,500 rpm, 4°C เป็นเวลา 10 นาที เท supernatant ออกจาก plate
2. เติม 100 μ l 0.5 mg/ml ของ MTT dye solution ลงไปในแต่ละหลุมของ 96 well plate และบ่มที่ 37 °C, 5% CO₂ ต่ออีกเป็นระยะเวลา 4 ชม.
3. เมื่อครบ 4 ชม. นำ plate ไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 rpm, 4°C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อเท supernatant ออกจากหลุม
4. เติม 100 μ l DMSO ลงไปในแต่ละหลุมเพื่อละลาย formazan crystal ให้อยู่ในรูปของสารละลายสีม่วง
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm ด้วย Benchmark Plus Microplate Spectrophotometer System
6. คำนวณเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิตด้วยสมการดังต่อไปนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิต} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ย OD กลุ่มทดสอบ}}{\text{ค่าเฉลี่ย OD กลุ่มควบคุม}} \times 100$$

3.9.3 Trypan blue exclusion

การประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยการใช้สี trypan blue อาศัยหลักการว่า สี trypan blue ไม่สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีชีวิตได้ ดังนั้น เซลล์ที่มีชีวิตจะข้อมไม่ติดสีของ trypan blue เฉพาะเซลล์ที่ไม่มีชีวิตเท่านั้นที่ข้อมติดสีน้ำเงินของ trypan blue ขั้นตอนของวิธีทดสอบความเป็นพิษของว่านขันหมาก ต่อเซลล์ RAW264.7 และ RBL-2H3 ด้วยวิธีการข้อมสี trypan blue มีขั้นตอนดังนี้คือ

1. หลังจากบ่มเซลล์ด้วยสารสกัด ล้างสารสกัดออกจากเซลล์ 3 ครั้งด้วย PBS และ เก็บเกี่ยวเซลล์โดยการ ใช้ 0.25% trypsin·EDTA (รายละเอียดการ trypsiniz เซลล์อยู่หัวข้อ 3.4.3)
2. ย้อมเซลล์ด้วย 0.4% (w/v) trypan blue (เตรียมใน PBS) โดยใช้อัตราส่วนเซลล์ ต่อ trypan blue 1:1 (v/v) เช่น นำ single cell suspension 100 μ l ใส่ในหลอดทดลอง และ ใส่ 100 μ l 0.4% trypan blue เป็นต้น
3. Pipet เซลล์ที่ผสมอยู่กับสี trypan blue ลงไปในช่องของ haemocytometer สำหรับนับเซลล์และปิดด้วย cover glass
4. นับเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์มีลักษณะใสเพราะไม่ติดสีน้ำเงิน) และเซลล์ที่ไม่มีชีวิต (เซลล์ติดสีน้ำเงิน) ใน haemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบพื้นสว่าง (light microscope)
5. คำนวณเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิตโดยใช้สมการ:

$$\text{เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิต} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด} - \text{จำนวนเซลล์ที่ตาย}}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด}} \times 100$$

3.10 การหาปริมาณ Nitrite

หลักของการทดสอบคือ เมื่อเซลล์ macrophage RAW264.7 ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ เกิดการสร้าง NO ซึ่งไม่เสถียร ใน culture media NO จะถูกออกซิไดซ์อย่างรวดเร็วได้ nitrite ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความเสถียรของ NO ที่สามารถตรวจวัดได้ง่ายโดยใช้ Griess reagent (Green et al., 1982) ขั้นตอนการทดลองมีดังนี้คือ

1. เติมเซลล์ RAW264.7 cells (1×10^5 เซลล์/หลุม) ลงไปในแต่ละหลุมของ 96 well plate และ บ่มไว้เป็นเวลา 24 ชม. เพื่อให้เซลล์ติดพื้นที่ผิวของหลุม
2. เติม antioxidant control ได้แก่ quercetin (10 μ M) และ สารสกัดจากผลว่านขันหมาก (125, 250 and 500 μ g/ml) ลงไปในแต่ละหลุมที่กำหนด

3. หลังจากการบ่มเป็นเวลา 4 ชม. ทำการกระตุ้นการสร้าง NO ด้วยการเติม LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + IFN- γ 25 U/ml และบ่มต่ออีกเป็นเวลา 24 ชม.
4. เมื่อครบ 24 ชม. นำ 96 well plate ไปปั่นเหวี่ยง แล้วย้าย 100 μl ของ supernatant ไปที่ 96 well plate ใหม่
5. เติม 100 μl ของ Griess reagent [1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride และ 3% phosphoric acid] ลงไปใน plate ที่มี culture media ผสมให้เข้ากัน และบ่มในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที
6. วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 540 nm โดยการใช้ Benchmark Plus Microplate Spectrophotometer System
7. ปริมาณของ nitrite ในตัวอย่าง จำนวนได้โดยการเปรียบเทียบกับ calibration curve ของสารมาตรฐาน sodium nitrite

3.11 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน iNOS และ COX-2

การหาฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดว่านขันหมาก นอกจากศึกษาการยับยั้งของการสร้าง NO งานวิจัยนี้ยังศึกษาผลของสารสกัดต่อการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS และ COX-2 ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบควบคู่ไปกับการยับยั้งการสร้าง NO

3.11.1 การเตรียม protein lysate

1. Plate เซลล์ RAW264.7 (2×10^6 เซลล์/หลุม) ลงไปในแต่ละหลุมของ 6-well plate และบ่มเป็นเวลา 24 ชม. ในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 37°C 5% CO_2 เพื่อให้เซลล์ติดที่พื้นผิวของแต่ละหลุม
2. เติม 100 μl antioxidant positive control ได้แก่ quercetin (10 μM) หรือ 100 μl สารสกัดว่านขันหมากเพื่อให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.125, 0.250 และ 0.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ลงไปในแต่ละหลุม
3. บ่มเซลล์ในตู้ CO_2 incubator เป็นเวลา 4 ชม. ตามด้วยการกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ร่วมกับ IFN- γ (25 U/mL) เป็นระยะเวลาอีก 24 ชม.

4. ภายหลังจากบ่ม ล้างสารสกัดออกจากเซลล์ 3 ครั้งด้วย PBS และเติม 150 μ L ของ ice-cold lysis buffer (1 mL RIPA buffer ซึ่งได้เติม 10 μ L 200 mM PMSF, 1 μ L 2 mM leupeptin และ 1 μ L E-64) เป็นเวลา 20 นาที
5. ปิเปต cell lysate ที่ได้จากเซลล์ซึ่งแตกสลายในแต่ละหลุมของ 6-well plate ไปที่ microcentrifuge tubes และปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 \times g ที่ 4°C เป็นเวลา 30 นาที
6. เก็บ supernatant ไว้ใน -80°C เพื่อนำไปใช้ในการทำ Western blot ในขั้นตอนต่อไป และแบ่งอีกส่วนหนึ่งของตัวอย่างเดียวกันนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

3.11.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

วิเคราะห์หาปริมาณของโปรตีนใน lysate โดยใช้วิธีการของ Lowry *et al.* (1951) โดยมีรายละเอียดของขั้นตอนการทดสอบดังนี้

1. เจือจาง protein lysate ใน lysis buffer (1 : 10 v/v)
2. เติม 20 μ L ของโปรตีนที่ได้เจือจางแล้วลงไปในแต่ละหลุมของ 96-well plate ตามด้วย 200 μ L ของ reagent D และบ่มต่อเป็นระยะเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
3. เติม 20 μ L ของ reagent C ลงไปในแต่ละหลุมของ 96-well plat และบ่มที่อุณหภูมิห้องอีกเป็นระยะเวลา 30 นาที
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ 750 nm โดยการใช้ spectrophotometry microplate reader หาปริมาณโปรตีนของสารสกัดโดยใช้ calibration curve ของสารมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA)

3.11.3 SDS-PAGE gel electrophoresis และ Western blot

การค้นหายุทธศาสตร์ของสารสกัดว่าขึ้นหามาต่อการแสดงออกของโปรตีน iNOS และ COX-2 กระทำโดยใช้เทคนิค Western blot ซึ่งเริ่มจากการแยกโปรตีนโดย polyacrylamide gel electrophoresis ตามวิธีการของ Laemmli (1970) และหาชนิดของโปรตีนโดยใช้ monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีนที่ต้องการศึกษา ขั้นตอนการทดสอบมีรายละเอียดดังนี้คือ

1. นำ cell lysate ไปต้มเป็นเวลา 5 นาที ใน 6X sample buffer (50 mM Tris-base, pH 7.4, 4% SDS, 10% glycerol, 4% 2-mercaptoethanol, 0.05 mg/mL ของ bromophenol blue) โดยใช้ในอัตราส่วน sample : buffer = 5 : 1 (v/v)
2. โหลด (load) 15 μ g ของ cellular protein lysate ลงในแต่ละ lane ของ 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) กระทำการแยกโปรตีนที่ 125 โวลต์ เป็นระยะเวลา 120 นาที
3. ย้ายโปรตีนที่อยู่ในแผ่นเจลไปที่ nitrocellulose membrane โดยการ blot ที่ 80 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง
4. Block membrane ด้วยการใส่ 5% BSA ใน 0.1% Tween-20 ใน PBS-buffer (TPBS) ลงไปที่แผ่น nitrocellulose membrane และบ่มต่อเป็นระยะเวลา 4 ชม.
5. บ่ม nitrocellulose membrane ซ้ำกับด้วย 1 : 1000 dilution ของ primary antibody anti-iNOS mouse monoclonal (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) หรือ 1 : 2000 dilution ของ primary antibody anti-COX-2 mouse polyclonal (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI)
6. ตรวจสอบและ normalize โปรตีนที่โหลดในแต่ละ lane ว่ามีปริมาณเท่ากันจริง โดย บ่ม nitrocellulose membrane ด้วย primary antibodies ต่อ protein ของ house keeping gene ต่าง ๆ ซึ่งในการทดลองนี้เลือกใช้ anti-tubulin mouse monoclonal antibody (Santa Cruz) ที่ได้เจือจาง 1 : 2000 และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 2 ชม.
7. ภายหลังการบ่มด้วย primary antibody ล้าง nitrocellulose membrane ด้วย TPBS 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที และบ่ม nitrocellulose membrane ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชม. ด้วย 1:10,000 dilution ของ secondary antibody goat-anti-mouse-HRP conjugate (Santa Cruz) สำหรับ iNOS และ tubulin และ goat-anti-rabbit IgG-HRP conjugate (Cayman) สำหรับ COX-2

8. ภายหลังขั้นตอนการบ่มกับ secondary antibody ล้างแผ่น membrane ด้วย TPBS 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที
9. ในห้องมืด เติม ECL Western blotting substrate (Pierce Protein Research Products) ลงบน nitrocellulose membrane เคลือบให้ทั่วพื้นที่ผิว โดยบ่มเป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยการประกบกับฟิล์มเป็นเวลา 5 นาที สำหรับ iNOS และ 30 วินาที สำหรับ COX-2

3.12 การทดสอบการต้านการหลั่งสารก่อภูมิแพ้

การทดสอบฤทธิ์ต้านอาการภูมิแพ้ของสารสกัดว่านขันหมากโดย *in vitro* model กระทำโดยทดสอบผลการยับยั้งของสารสกัดต่อการหลั่งสารก่อภูมิแพ้จาก RBL-2H3 ซึ่งเป็น basophilic leukemia cell line จากหนู rat และเป็นเซลล์ที่นิยมใช้เป็นตัวแทนของ mast cell ในการศึกษาเกี่ยวกับภูมิแพ้มากที่สุดสายพันธุ์หนึ่ง งานวิจัยนี้เลือกใช้การต้านการหลั่งสารก่อภูมิแพ้ของสารสกัดโดยใช้ β -hexosaminidase assay

หลักของการทดสอบการหลั่งสารก่อภูมิแพ้โดยใช้ β -hexosaminidase assay คือเมื่อบ่มเซลล์ RBL-2H3 ข้ามคืนล่วงหน้ากับ IgE antibody ที่มีความจำเพาะต่อ DNP antigen แล้วตามด้วย DNP-BSA antigen ในวันต่อมา จะเกิดการ crosslink ของ IgE ที่จำเพาะซึ่งจับรอกอยู่ที่ Fc ϵ RI ที่ผิวเซลล์ การ cross-linked Fc ϵ RI นำไปสู่ signal transduction ภายในเซลล์ เกิด phosphorylation ของ tyrosine kinases การเพิ่มระดับของ Ca²⁺ ใน cytosol ส่งผลให้เกิดการหลั่งของสารก่อภูมิแพ้ต่าง ๆ ที่มีอยู่แล้วใน granule (preformed mediators) ออกจากเซลล์ (degranulation) เช่น histamine, serotonin รวมทั้งเอนไซม์ β -hexosaminidase ที่หลั่งออกมาพร้อมกับสารก่อภูมิแพ้ชนิดอื่น ดังนั้น ระดับของเอนไซม์ β -hexosaminidase ใน supernatant สามารถใช้เป็นดัชนีบ่งบอกถึงการหลั่งของสารก่อภูมิแพ้ต่าง ๆ ออกจากเซลล์ได้ โดยไม่จำเป็นต้องวัดปริมาณของสารก่อภูมิแพ้ที่หลั่งออกมาโดยตรง (Fischer et al., 1995; Choi et al., 1996; Abramson et al., 2006; Abramson และ Pecht 2007) รายละเอียดของการทดสอบมีดังนี้คือ

1. เติมเซลล์ RBL-2H3 cells (5×10^4 เซลล์/หลุม) ลงไปในแต่ละหลุมของ 96 well plate และบ่มที่ 37°C 5% CO₂ ใ้ข้ามคืน เพื่อให้เซลล์ติดพื้นที่ผิวของหลุม

2. จากนั้นบ่มข้ามคืนด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ DNP antigen (50 ng/ml anti-DNP IgE) แล้วจึงล้างออกด้วย Siraganian buffer (pH 7.4)
3. เติม antioxidant control ได้แก่ quercetin (10 μ M) หรือ สารสกัดจากผลว่านขันหมาก (125, 250 and 500 μ g/ml) ลงไปในแต่ละหลุมที่กำหนด
4. หลังจากการบ่มเป็นเวลา 12 ชม. ล้างออกด้วย Siraganian buffer ทำการกระตุ้นการปล่อยสารก่อภูมิแพ้ด้วยการเติมแอนติเจน (10 μ g/ml DNP-BSA) และบ่มต่ออีกเป็นเวลา 30 นาที
5. เมื่อครบกำหนดเวลานำ 96 well plate ไปปั่นเหวี่ยง แล้วย้าย 25 μ l ของ supernatant ไป 96 well plate ใหม่
6. เติม 25 μ l ของ substrate buffer ลงไปใน plate ที่มี culture media ผสมให้เข้ากัน และบ่มในที่มีมืดเป็นระยะเวลา 1 ชม.
7. จากนั้นหยุดการทำปฏิกิริยาด้วยการเติม 50 μ l stop solution
8. วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 500 nm โดยการใช้ Benchmark Plus Microplate Spectrophotometer System

3.13 การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดย Ames test

Ames test เป็นการทดสอบแบบการกลายพันธุ์แบบ *in vitro* หลักการของ Ames test คือเลือกใช้แบคทีเรีย *S. typhimurium* ที่ถูกทำให้กลายพันธุ์ ไม่สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนฮิสทีดีนได้เอง ทำให้ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่ไม่มีกรดอะมิโนฮิสทีดีน ถ้าสารทดสอบเป็นสารก่อกลายพันธุ์ จะทำให้แบคทีเรียเกิดการกลายพันธุ์แบบย้อนกลับ (reverse mutation) ส่งผลให้แบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่ไม่มีกรดอะมิโนฮิสทีดีน (Ames et al., 1975; Maron and Ames, 1983; Mortelmans and Zeiger, 2000) เนื่องจากสารก่อกลายพันธุ์บางชนิดไม่มีฤทธิ์การก่อกลายพันธุ์โดยตรง จำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์ในตับเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสาร (metabolize) ให้กลายเป็นสารก่อกลายพันธุ์ ดังนั้น ใน Ames test จึงมีการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ด้วยวิธีที่ใช้ สารทดสอบบ่มร่วมกับ S9 mix ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เตรียมจากตับหนูและมีเอนไซม์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการ metabolize สาร ทั้งนี้ เพื่อให้สามารถตรวจสอบกลุ่มสารที่จำเป็นต้องผ่านกระบวนการ metabolism ของตับก่อนจึงเกิดเป็นสารก่อกลายพันธุ์

ดังนั้น โครงการวิจัยนี้จึงทดสอบการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดจากว่านขันหมากโดยใช้ Ames test เลือกใช้แบคทีเรีย *S.typhimurium* สายพันธุ์ TA98 ซึ่งช่วยในการตรวจวัด (detect) สารที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ frameshift mutation และ TA100 ซึ่งตรวจวัดสารที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ base-pair substitution mutation (Mortlemans and Zeiger, 2000) นอกจากนี้ งานวิจัยนี้ยังเลือกใช้วิธีการบ่มสารสกัดล่วงหน้ากับแบคทีเรีย (pre-incubation method) เพื่อเพิ่มความไว (sensitivity) ของการทดสอบ และทดสอบทั้งในสภาวะแบบมีและแบบไม่มี S9 mix สำหรับรายละเอียดของการทดลองมีขั้นตอนดังนี้คือ

1. ผสมสารสกัดว่านขันหมากที่ได้จาก 95% EtOH ปริมาตร 100 μ L กับ S9 mix (สภาวะที่มี S9 mix) หรือ phosphate buffer (สภาวะที่ไม่มี S9 mix) ปริมาตร 500 μ l
2. เติม 100 μ L แบคทีเรียที่ inoculate ข้ามคืน (TA98 หรือ TA100) ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 nm อยู่ระหว่าง 0.3-0.4 ผสมให้เข้ากัน
3. นำแบคทีเรียไปบ่มที่อ่างควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (shaking water bath) ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 20 นาที
4. เติม top agar ปริมาตร 2 ml ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเทลงใน minimal glucose agar plate ด้วยเทคนิค poured plate
5. รอจนกระทั่ง top agar แข็งตัว จึงนำไปบ่มที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 °C นาน 48 ชั่วโมง
6. เมื่อครบกำหนดเวลา นับจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ย้อนกลับ (revertant colonies) ที่ปรากฏในแต่ละ plate
7. การแปลผลการทดลอง กระทำโดยการหาอัตราส่วนของค่าเฉลี่ยโคโลนีกลายพันธุ์ย้อนกลับ (revertant colonies) ของตัวอย่างที่เป็นสารสกัดต่อค่าเฉลี่ยโคโลนีกลายพันธุ์ย้อนกลับโดยธรรมชาติ (spontaneous revertant colonies) หากอัตราส่วนดังกล่าวมีค่าเท่ากับหรือมากกว่า 2 แสดงว่า สารที่ทดสอบมีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์
8. การทดสอบกลุ่มทดลองบวก (positive control) ในสภาวะแบบไม่มี S9 mix ใช้สารก่อกลายพันธุ์ 2-nitrofluorene (2-NF) และ sodium azide เป็น positive control สำหรับสายพันธุ์ TA98 และ TA100 ตามลำดับ ส่วนในสภาวะแบบมี S9 mix ใช้สารก่อกลายพันธุ์ 2-amino anthracene (2-AA) เป็น positive control สำหรับทั้งสายพันธุ์ TA98 และ TA100

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การสกัดผลวุ้นชันหมาก

การสกัดวุ้นชันหมาก เริ่มจากผลอบแห้ง บดเป็นผง และสกัดด้วย 95% ethanol ได้ปริมาณสุทธิ (percent yield) สารสกัดหยาบ ร้อยละ 12.65 ± 1.27 ของน้ำหนักสารสกัดแห้ง ผลจากการส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์เคมีแบบประมาณ พบว่า ผงแห้งของผลวุ้นชันหมากมีความชื้น $11.96 \pm 1.39\%$ ไขมันรวม $4.72 \pm 0.12\%$ คากหายาบ $0.11 \pm 0.002\%$ ปริมาณรวมของโปรตีน และไขมันเท่ากับ $71.44 \pm 2.25\%$ และ $0.9 \pm 0.08\%$ ตามลำดับ สำหรับ available carbohydrate (nitrogen free extract) มีค่าเท่ากับ $10.88 \pm 1.17\%$

4.2 ปริมาณฟีนอลิก เฟโวนอยด์ และโปรแอนโทไซยานินของสารสกัดวุ้นชันหมาก

ตารางที่ 4.1 แสดงค่า total phenolic content (TPC), total flavonoids content (TFC) และ proanthocyanidins content (PA) ของสารสกัดจากวุ้นชันหมาก ในการทดลองนี้ หาค่า TPC โดยเทียบกับกราฟของสารมาตรฐาน gallic acid และแสดงค่า TPC เป็น mg gallic acid equivalent (GAE) ต่อหนึ่งกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด กราฟของสารมาตรฐาน gallic acid มีค่า $R^2 = 0.997$ (ภาคผนวก ค1) ปริมาณ TPC ได้จากสารสกัดคือ 56.75 ± 0.37 mg gallic acid/gm สารสกัดแห้ง ค่า TFC วิเคราะห์โดยเทียบกับกราฟของสารมาตรฐาน catechin ที่มีค่า $R^2 = 0.985$ (ภาคผนวก ค 2) ค่าของ TFC แสดงหน่วยเป็น mg catechin equivalent (CE) ต่อ กรัมของสารสกัดแห้ง ผลการวิเคราะห์พบว่า สารสกัดวุ้นชันหมากมีปริมาณ TFC 5.03 ± 0.03 mg catechin/gm ของสารสกัดแห้ง สำหรับปริมาณของ PA วิเคราะห์โดยเทียบกับกราฟของสารมาตรฐานคาเทชินซึ่งมีค่า $R^2 = 0.951$ (ภาคผนวก ค 3) และแสดงค่า PA เป็น mg catechin equivalent ต่อ กรัมของสารสกัดแห้ง ผลการวิเคราะห์พบว่าปริมาณสาร PA ที่ได้จากสารสกัดมีค่า 7.02 ± 0.12 mg catechin/gm ของสารสกัดแห้ง (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 ปริมาณรวมของสารฟีนอลิก ปริมาณรวมของสารฟีนอลอยด์ และ ปริมาณของสารแอนโทไซยานินดิน จากสารสกัดผลว่านชันหมาก

สารประกอบพฤกษศาสตร์เคมี	สารสกัดผลว่านชันหมาก
ปริมาณรวมของสารฟีนอลิก (mg GAE/dry extract)	56.75 ± 0.37
ปริมาณรวมของสารฟีนอลอยด์ (mg CE/g dry extract)	5.03 ± 0.03
ปริมาณของสารแอนโทไซยานินดิน (mg CE/g dry extract)	7.02 ± 0.12

ข้อมูลนำเสนอโดย ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จำนวนตัวอย่าง = 3)

4.3 คุณสมบัติการต้านออกซิเดชันจากสารสกัดผลว่านชันหมาก

เพื่อให้ได้ข้อมูลคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดผลว่านชันหมาก ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้วิธีการทดสอบที่แตกต่างกันมา 3 วิธี ได้แก่ DPPH, FRAP และ DCFH-DA assay

4.3.1 การทดสอบ scavenge activity ต่อ DPPH Radical

DPPH assay ใช้เพื่อทดสอบคุณสมบัติของสารในการกำจัด (scavenge) อนุมูลอิสระ DPPH ที่เสถียร (DPPH•) และรายงานผลการทดลองเป็นค่าความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการยับยั้ง DPPH• ได้ 50% (median inhibitory concentration; IC₅₀) สารที่มีค่า IC₅₀ ต่ำ หมายถึงสารมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระได้สูง เนื่องจากใช้ความเข้มข้นของสารในปริมาณน้อยก็สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50% ผลการทดลองคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลว่านชันหมากแสดงในตารางที่ 4.2 ผลทดลองชี้ชัดว่าสารสกัดจากผลว่านชันหมากสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้ โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นเป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม คุณสมบัติในการกำจัด DPPH• ของสารสกัดมีค่าค่อนข้างต่ำ เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานอื่นที่ใช้เป็น positive control ในการต้านอนุมูลอิสระ ในงานทดลองนี้คือ quercetin, catechin และ trolox สารสกัดจากว่านชันหมากมีค่า IC₅₀ เฉลี่ยเท่ากับ 399.77 ซึ่งเมื่อเทียบกับสารมาตรฐานอื่นที่ใช้ในการทดลองที่มีค่า IC₅₀ อยู่ระหว่าง 2.00-4.46 ความสามารถในการกำจัด DPPH• ของว่านชันหมากจะน้อยกว่าสารมาตรฐานที่ใช้เป็น positive

control ในการทดลองนี้ประมาณ 100-200 เท่า ผลการทดลองนี้ ยังแสดงว่า สารมาตรฐาน quercetin และ catechin มีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ที่ใกล้เคียงกัน คือมีค่า IC_{50} ประมาณ 2 $\mu\text{g/ml}$ และสารทั้งสอง มีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีกว่า trolox ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ของวิตามิน E ประมาณ 2 เท่า

ตารางที่ 4.2 การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากผลว่านชันหมากและสารมาตรฐานอื่นที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน quercetin, catechin และ trolox

ชนิดของสาร	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	% การยับยั้ง DPPH \bullet	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
WKM	78	20.46 ± 0.11	399.77 ± 15.33
	156	38.08 ± 0.22	
	313	54.86 ± 0.25	
	625	76.19 ± 1.09	
Quercetin	0.5	13.33 ± 0.32	2.00 ± 0.02
	1.0	27.16 ± 0.58	
	2.0	53.96 ± 0.70	
	3.0	77.00 ± 0.85	
Catechin	0.5	23.27 ± 0.13	2.14 ± 0.01
	1.0	41.26 ± 0.20	
	2.0	62.14 ± 0.49	
	3.5	77.30 ± 0.20	
Trolox	1.5	15.50 ± 0.31	4.46 ± 0.02
	3.0	35.12 ± 0.25	
	4.5	53.93 ± 0.87	
	8.0	86.82 ± 0.06	

ข้อมูลนำเสนอโดย ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จำนวนตัวอย่าง = 3)

4.3.2 Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assay

หนึ่งในกลไกของการต้านอนุมูลอิสระคือคุณสมบัติของสารที่เป็น reducing agent ที่ไป reduce สาร oxidants เพื่อล้างฤทธิ์ (inactivate) oxidation ของอนุมูลอิสระต่างๆ ซึ่งความสามารถของสารในการเป็น reducing agent สามารถประเมินได้ด้วยวิธี FRAP การทดสอบคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระด้วยการเป็น reducing agent ของสารสกัดว่านขันหมากด้วยวิธี FRAP รายงานผลเป็นค่ากำลังความสามารถในการรีดิวซ์ (Ferric reducing ability power values) หรือ FRAP values โดยใช้สาร ascorbic acid เป็นสารเปรียบเทียบมาตรฐาน ค่า FRAP values ของสารสกัดว่านขันหมากรายงานเป็นค่า μg ของ ascorbic acid equivalent antioxidant capacity (AEAC) ต่อ น้ำหนักแห้งของสารสกัด ผลการทดสอบแสดงว่า สารสกัดว่านขันหมากมีคุณสมบัติเป็น reducing agent สามารถรีดิวซ์สารประกอบ ferric tripyridyltriazine (TPTZ-Fe (III)) complex ไปเป็น ferrous tripyridyltriazine (TPTZ-Fe (II)) complex ในสภาพที่มี pH ต่ำ ซึ่งจะเปลี่ยนสีของสารละลายจากสีม่วงอมเทาไปเป็นสีฟ้าอ่อนถึงน้ำเงินเข้ม (ตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของ TPTZ-Fe (II)) โดยมีค่า FRAP เท่ากับ $44.07 \pm 0.51 \mu\text{g}$ AEAC ต่อ กรัม น้ำหนักแห้งของสารสกัด (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 กำลังความสามารถในการรีดิวซ์ (Ferric reducing ability power) ของสารสกัดว่านขันหมาก เมื่อดูดโดย FRAP assay

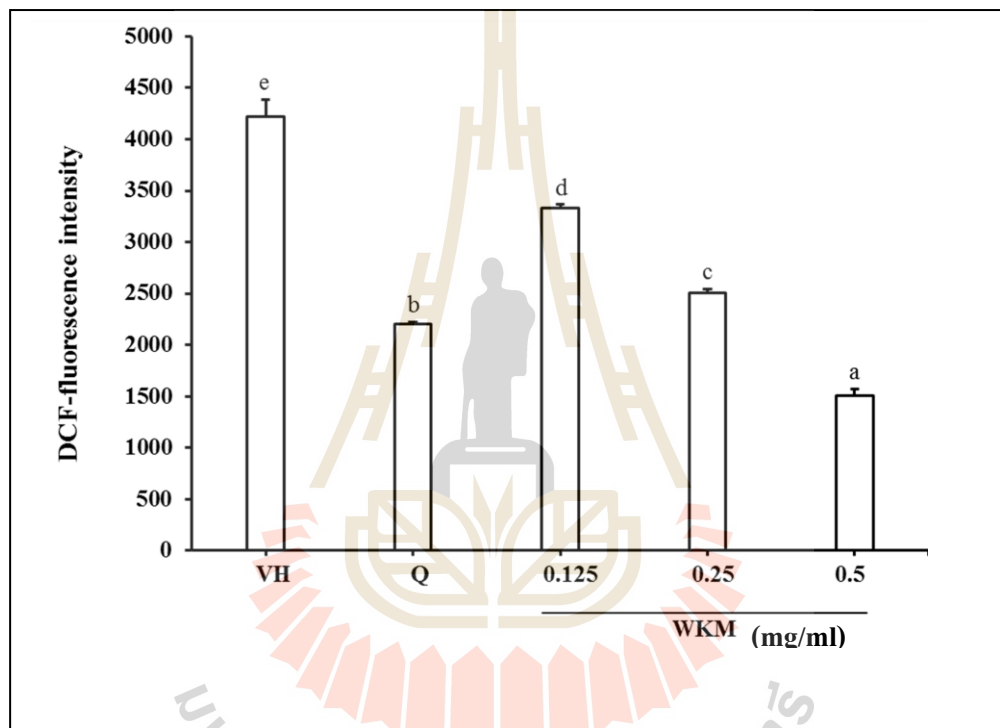
ตัวอย่างสาร	FRAP (μg AEAC/กรัม น้ำหนักแห้ง)
สารสกัดว่านขันหมาก	44.07 ± 0.51

ข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย SD. (n = 3)

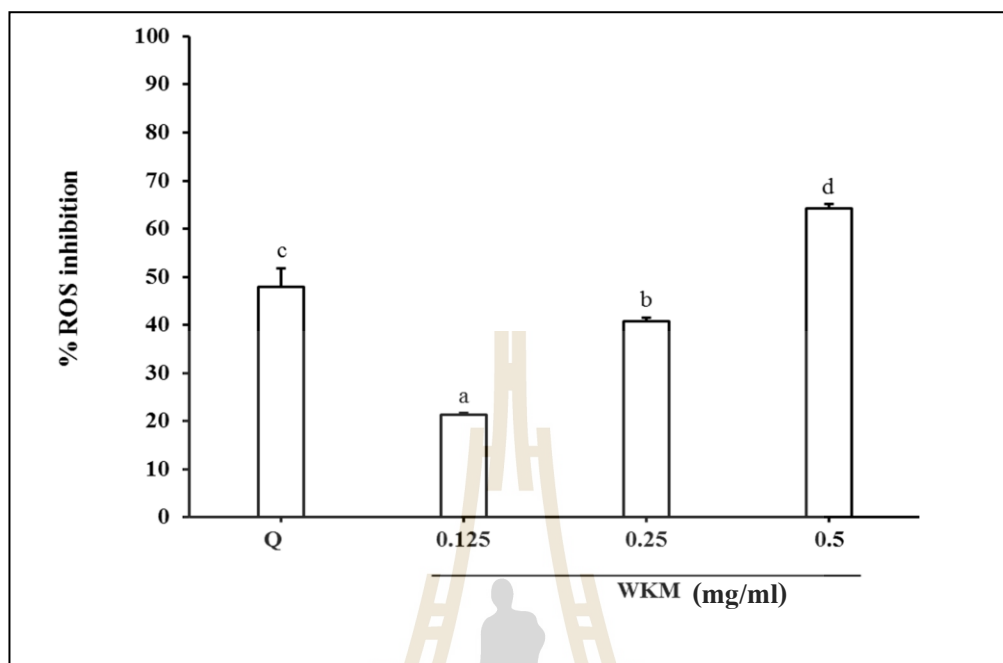
4.3.3 ความสามารถต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ (Cellular antioxidant activity)

การประเมินความสามารถต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ของสารสกัดว่านขันหมากด้วยวิธี DCFH-DA assay แสดงว่า สารสกัดว่านขันหมากสามารถลดการสร้าง DCF ที่เกิดจากการ oxidize DCFH โดย tert-butylhydroperoxide (t-BuOOH) ผลจากการติดตามการเพิ่มขึ้นของ DCF fluorescence emission เป็นระยะเวลา 180 นาที พบว่าทั้ง $10 \mu\text{M}$ quercetin และสารสกัดว่านขันหมากที่ความเข้มข้น 0.125, 0.25 และ 0.50 mg/ml สามารถกำจัดหรือลด ROSs ภายในเซลล์ ซึ่งใน DCFH-DA assay หมายถึงการลด

ปริมาณ DCF อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มตัวทำละลายควบคุม ($p < 0.05$) (รูปที่ 4.1) การลดลงของสารเรืองแสง DCF เป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น ปริมาณการยับยั้งการเกิด DCF มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) คือมีค่าเท่ากับ $21.24 \pm 0.88\%$, 40.64 ± 0.86 และ 64.31 ± 1.59 ที่ความเข้มข้นของสารสกัดว่านขันหมาก 0.125, 0.25 และ 0.50 mg/ml ตามลำดับ (รูปที่ 4.2) เป็นที่น่าสังเกตว่า สารสกัดที่ความเข้มข้นสูงสุดคือ 0.50 mg/ml สามารถลดการสร้าง DCF ได้มากกว่า quercetin 10 μM ที่ใช้เป็น antioxidant positive control อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



รูปที่ 4.1 การกำจัดอนุมูลอิสระที่สร้างขึ้นภายในเซลล์ RAW264.7 โดยสารสกัดจากผลว่านขันหมาก ผลที่แสดงเป็นความเข้มของสารเรืองแสง DCF ที่เกิดภายในเซลล์ RAW264.7 ใน DCFH-DA assay ภายหลังจากเติม t-BuOOH เป็นระยะเวลา 180 นาที เซลล์ RAW264.7 บ่มล่วงหน้ากับสารสกัดจากผลว่านขันหมากที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน หรือ บ่มร่วมกับ 10 μM quercetin เป็นระยะเวลา 24 ชม. ตามด้วยการบ่มกับ fluorescent probe DCFH-DA เป็นระยะเวลา 30 นาที ก่อนที่จะเติม t-BuOOH. แท่งกราฟ ที่มีอักษรต่างกันหมายถึงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ เมื่อทดสอบด้วย one-way analysis of variance. VH = ตัวทำละลายควบคุม, WKM = สารสกัดจากผลว่านขันหมาก, Q = quercetin

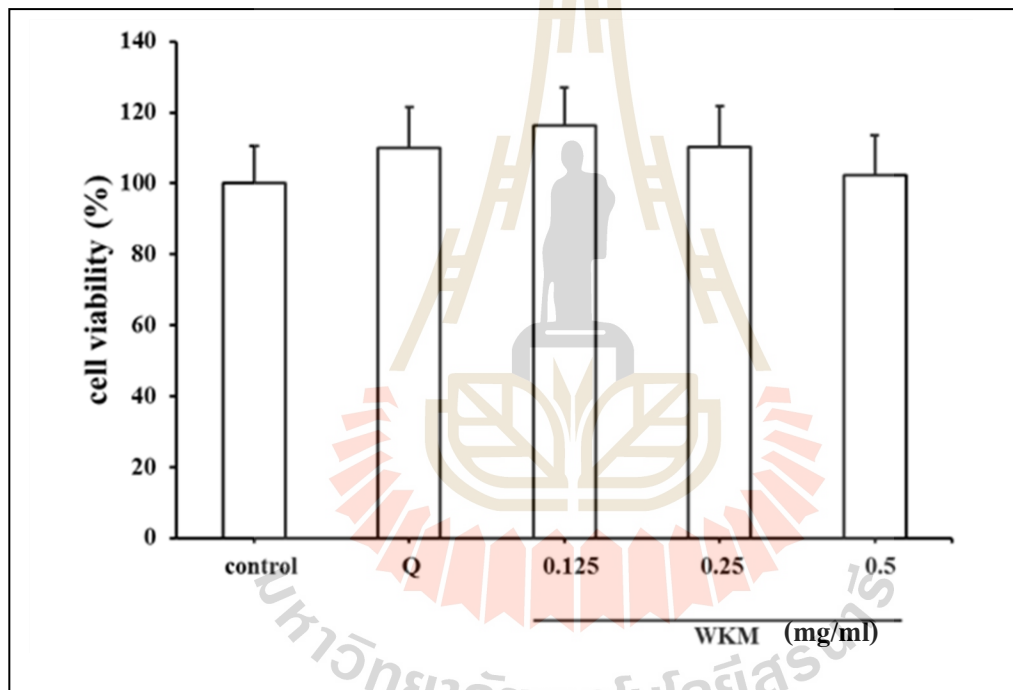


รูปที่ 4.2 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิด ROS หรือ DCF ของสารสกัดว่านขันหมากภายในเซลล์ RAW264.7 ใน DCFH-DA assay ซึ่งใช้ tBuOOH เป็น oxidizing agent แท่งกราฟที่มีอักษรต่างกันหมายถึงค่าเฉลี่ยที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ เมื่อทดสอบด้วย one-way analysis of variance. VH = ตัวทำลายควบคุม, WKM = สารสกัดจากผลว่านขันหมาก, Q = quercetin

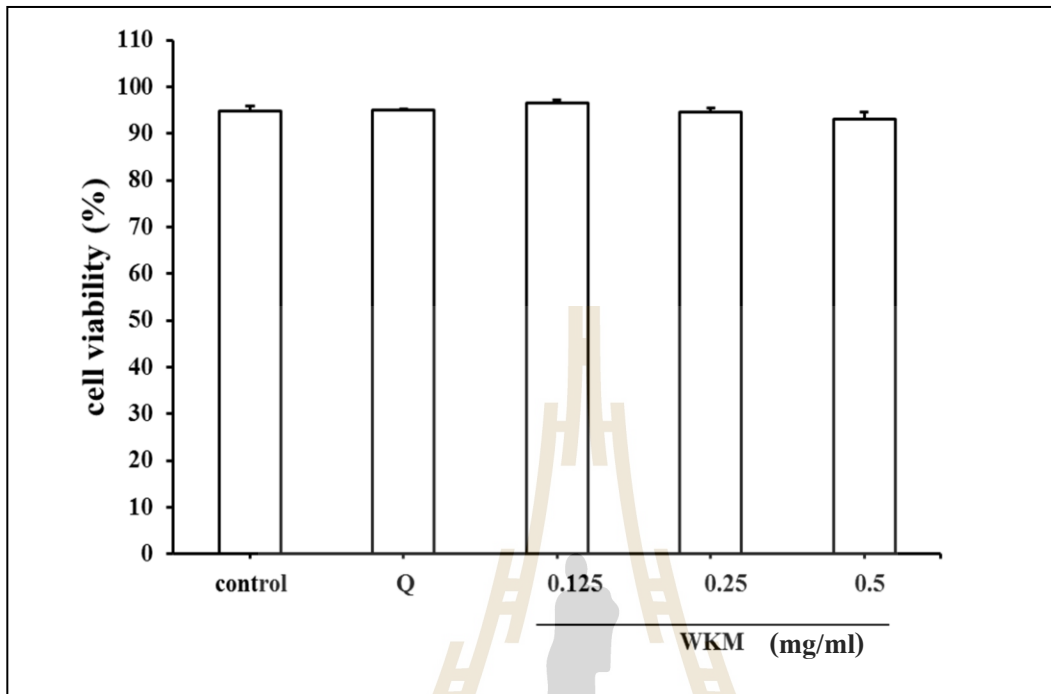
4.4 การศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดว่านขันหมากที่ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ RAW264.7 และ RBL-2H3

ในการหาความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดว่านขันหมากที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ RAW264.7 และ RBL-2H3 เซลล์ RAW264.7 หรือ เซลล์ RBL-2H3 ถูกบ่มร่วมกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.125, 0.250 และ 0.500 mg/mL ที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ เป็นระยะเวลา 24 ชม. ผลการทดลอง พบว่า ความเข้มข้นของสารสกัดที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.5 mg/mL ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษใดๆ ต่อ RAW264.7 เซลล์ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) ไม่ว่าจะประเมินปริมาณเซลล์ซึ่งมีชีวิตอยู่ (cell viability) ด้วยวิธี MTT หรือด้วย trypan blue exclusion method ทั้ง 2 วิธีให้ผลสอดคล้องกัน ในกรณีที่วัดปริมาณเซลล์ที่มี

ชีวิตอยู่ด้วยวิธี MTT เซลล์ที่ได้รับสารสกัดว่านขันหมากที่ความเข้มข้น 0.125, 0.250 และ 0.500 mg/mL เป็นระยะเวลา 24 ชม. มีเซลล์ซึ่งมีชีวิตรอดอยู่ 116.20%, 110.18% และ 102.4% ตามลำดับใน RAW264.7 เซลล์ (รูปที่ 4.3) ถ้าประเมินด้วยการใช้วิธี trypan blue ที่ความเข้มข้นเดียวกันของสารสกัดว่านขันหมาก ปริมาณ RAW264.7 เซลล์ที่มีชีวิตรอดคือ 96.64 %, 94.57%, และ 93.18 % ตามลำดับ (รูปที่ 4.4) ซึ่งไม่แตกต่างจากกลุ่มสารละลายควบคุม ที่มีปริมาณเซลล์รอดอยู่ที่ 95.7% ($P < 0.05$) ส่วนความเข้มข้นของ 10 μM quercetin ที่ใช้เป็น positive control ไม่มีผลกระทบต่อปริมาณเซลล์ซึ่งมีชีวิตอยู่ของ RAW264.7 เช่นเดียวกัน คือเซลล์ที่มีชีวิตรอดอยู่ที่ 110.08% และ 94.92% เมื่อประเมินด้วยวิธี MTT และวิธี trypan blue ตามลำดับ

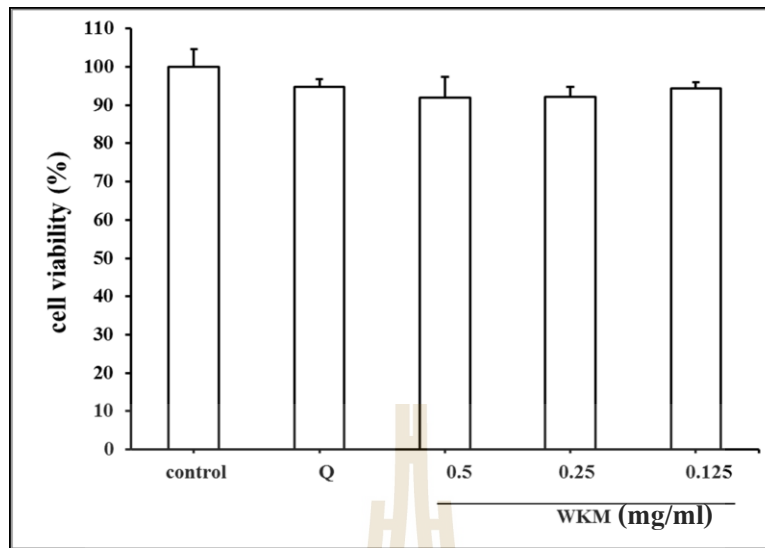


รูปที่ 4.3 ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของ RAW264.7 เซลล์ที่บ่มร่วมกับสารสกัดว่านขันหมาก (WKM) หรือ 10 μM quercetin (Q) เป็นระยะเวลา 24 ชม. และประเมินเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตรอดด้วยวิธี MTT ทุกความเข้มข้นของสารสกัด และ quercetin ไม่มีค่า % cell viability ที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$)

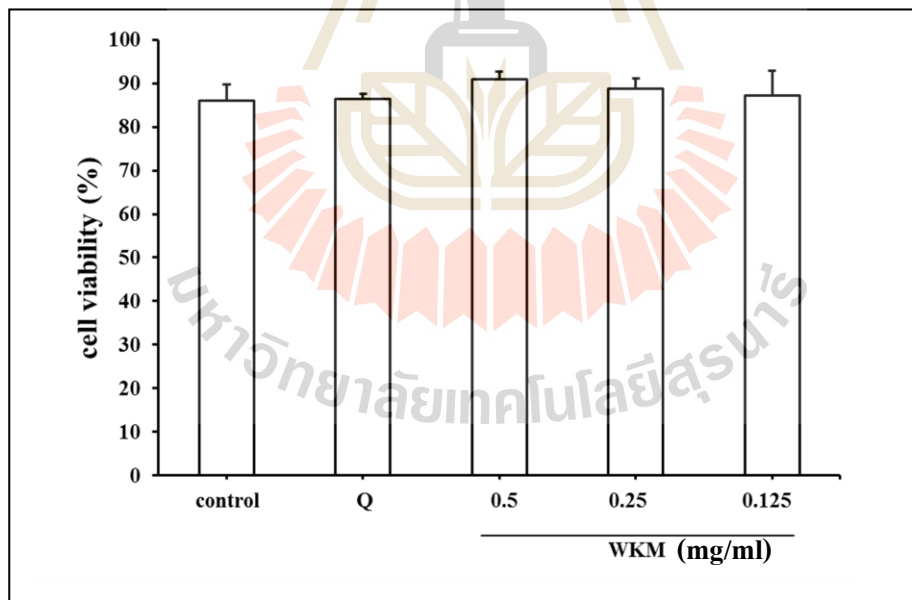


รูปที่ 4.4 ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของ RAW264.7 เซลล์ที่บ่มร่วมกับสารสกัดว่านขันหมาก (WKM) หรือ 10 μM quercetin (Q) เป็นระยะเวลา 24 ชม. และประเมินเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตรอดด้วยวิธี trypan blue ทุกความเข้มข้นของสารสกัด และ quercetin ไม่มีค่า % cell viability ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$)

ผลการทดสอบการหาช่วงความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษของสารสกัดว่านขันหมากต่อ RBL-2H3 ได้ผลที่คล้ายคลึงกับที่พบใน RAW264.7 เซลล์ คือสารสกัดว่านขันหมากที่ความเข้มข้น 0.125, 0.250 และ 0.500 mg/mL ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ RBL-2H3 ไม่ว่าจะประเมินด้วยวิธี MTT (รูปที่ 4.5) หรือด้วยวิธี trypan blue exclusion (รูปที่ 4.6) ผลการทดลองชี้ชัดว่า % ความอยู่รอดของเซลล์เมื่อบ่มร่วมกับสารสกัด หรือ ไม่มีสารสกัดไม่มีค่าแตกต่างกัน เช่นเดียวกับความเข้มข้น 10 M quercetin ที่ไม่มีผลกระทบต่อความอยู่รอดของเซลล์ RBL-2H3



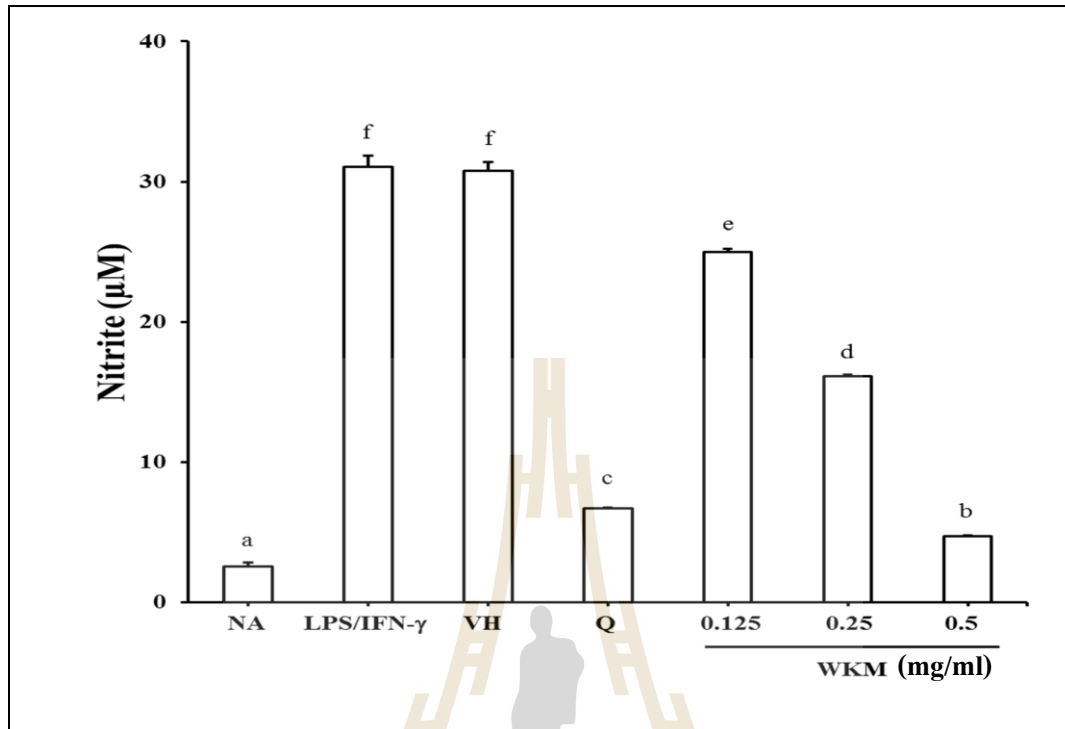
รูปที่ 4.5 ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของ RBL-2H3 เซลล์ที่บ่มร่วมกับสารสกัดว่านขันหมาก (WKM) หรือ 10 μM quercetin (Q) เป็นระยะเวลา 24 ชม.และประเมินเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตรอดด้วยวิธี MTT ทุกความเข้มข้นของสารสกัด และ quercetin ไม่มีค่า % cell viability ที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จากกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$)



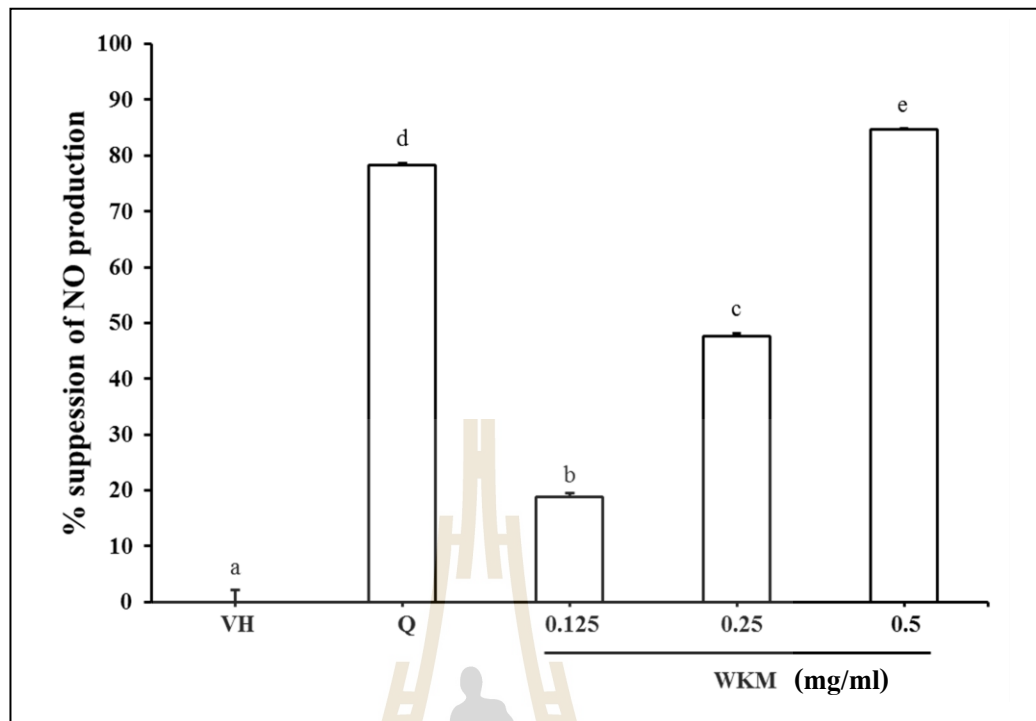
รูปที่ 4.6 ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของ RBL-2H3 เซลล์ที่บ่มร่วมกับสารสกัดว่านขันหมาก (WKM) หรือ 10 μM quercetin (Q) เป็นระยะเวลา 24 ชม.และประเมินเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตรอดด้วยวิธี trypan blue ทุกความเข้มข้นของสารสกัด และ quercetin ไม่มีค่า % cell viability ที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$)

4.5 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ NO ของ RAW264.7 โดยสารสกัดว่านขันหมาก

ในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดว่านขันหมากต่อการสังเคราะห์ NO ของเซลล์ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ เซลล์ RAW264.7 ถูกบ่มล่วงหน้า (pretreat) เป็นระยะเวลา 4 ชม. กับสารสกัดว่านขันหมากที่ความเข้มข้น 0.125, 0.25 และ 0.5 mg/mL ซึ่งเป็นช่วงของความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ (ดังแสดงในรูปที่ 4.3-4.4) หรือบ่มร่วมกับ antioxidant control คือ 10 μ M quercetin ก่อนการชักนำให้เกิดการสังเคราะห์ NO โดยการเติม LPS (1 μ g/ml) ร่วมกับ IFN- γ (25 U/ml) ภายหลังการบ่มเซลล์ต่อเนื่องอีก 24 ชม. ระดับของ NO ถูกประเมินทางอ้อมโดยการวัด nitrite ซึ่งเป็น metabolite product ที่เสถียรของ NO โดยใช้ Griess reagent ผลการศึกษาแสดงในรูปที่ 4.7 RAW264.7 เซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น มีการสร้าง NO ในระดับพื้นฐาน (basal level) ซึ่งมีค่า nitrite ต่ำประมาณ 2.5 μ M เมื่อกระตุ้นด้วย 1 μ g/ml LPS และ 25 U/ml IFN- γ ปริมาณ nitrite เพิ่มขึ้นประมาณ 12 เท่า มีค่าอยู่ที่ $31.06 \pm 0.77 \mu$ M สารสกัดว่านขันหมากมีฤทธิ์ยับยั้งปริมาณ NO ที่ถูกชักนำให้สร้างขึ้น RAW264.7 เซลล์ที่ได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.125, 0.250 และ 0.500 mg/ml มีปริมาณ nitrite อยู่ที่ 24.96 ± 0.22 , 16.10 ± 0.12 และ $4.70 \pm 0.04 \mu$ M ตามลำดับ (รูปที่ 4.7) ผลการทดลองชี้ชัดว่าปริมาณการยับยั้งแปรผันตามระดับของความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น การยับยั้งการสร้าง NO ของสารสกัดว่านขันหมากที่ความเข้มข้น 0.125, 0.250 และ 0.500 mg/ml มีค่า $18.83 \pm 0.70 \%$, $47.66 \pm 0.40 \%$ และ $84.71 \pm 0.15 \%$ ตามลำดับ ซึ่งทุกกลุ่มต่างจากกลุ่มควบคุมที่มี และไม่มีตัวทำละลายอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (รูปที่ 4.7-4.8) สำหรับ RAW264.7 เซลล์ที่บ่มล่วงหน้ากับ 10 μ M quercetin ที่ใช้เป็น positive control ในการทดลองนี้ มีปริมาณ nitrite อยู่ที่ $6.69 \pm 0.09 \mu$ M และสามารถยับยั้งการสร้าง NO ได้ $78.26 \pm 0.29 \%$ (รูปที่ 4.7 และ 4.8) ดังนั้น สารสกัดว่านขันหมากที่ความเข้มข้น 0.5 mg/ml สามารถลดการสร้าง NO ได้ดีกว่า 10 μ M quercetin ($p < 0.05$) (รูปที่ 4.7 และ 4.8)



รูปที่ 4.7 ผลของว่านขันหมากต่อการสร้าง NO ของ RAW 264.7 เซลล์เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ เซลล์ RAW 264.7 บ่มล่วงหน้ากับตัวทำละลายควบคุม หรือ 10 μM quercetin หรือสารสกัดว่านขันหมากที่ความเข้มข้น 0.125, 0.250 หรือ 0.500 $\mu\text{g/ml}$ เป็นระยะเวลา 4 ชม. ก่อนกระตุ้นด้วย 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS และ 25 U/ml IFN- γ เป็นระยะเวลา 24 ชม. วัดปริมาณ NO ทางอ้อมโดยวัดปริมาณของ nitrite ด้วย Griess reagent ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD (n=4) และเป็นตัวแทนของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่ได้ผลที่คล้ายคลึงกัน กราฟแท่งที่มีอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อวิเคราะห์ด้วย one-way ANOVA

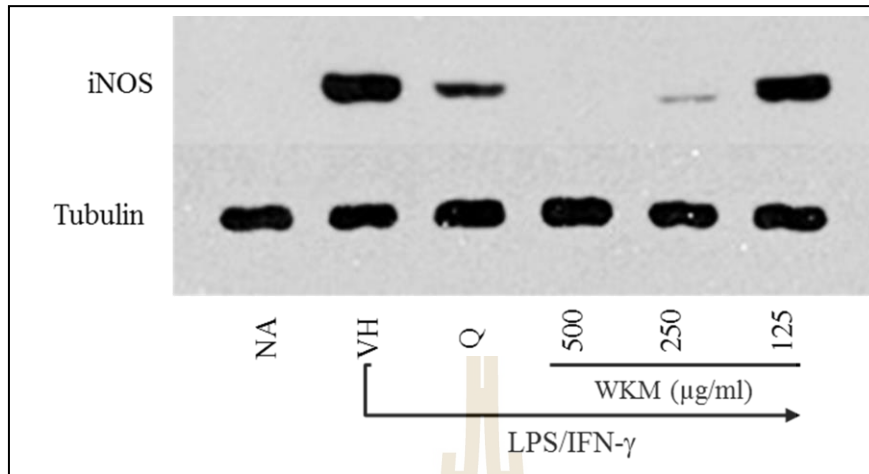


รูปที่ 4.8 เปอร์เซนต์การยับยั้งการสร้าง NO ของวุ้นชันหมากในเซลล์ RAW264.7 ที่ถูกชักนำให้เกิดการสังเคราะห์ขึ้นด้วย 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS และ 25 U/ml IFN- γ NA = naïve; เซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น, VH = vehicle; ตัวทำละลายควบคุม, Q = 10 μM quercetin, WKM = สารสกัดวุ้นชันหมากที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD (n =4) และเป็นตัวแทนของ การทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่ได้ผลที่คล้ายคลึงกัน กราฟแท่งที่มีอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อวิเคราะห์ด้วย one-way ANOVA

4.6 การยับยั้งเอ็นไซม์ iNOS และ COX-2 ในเซลล์ RAW264.7 โดยสารสกัดจากวุ้นชันหมาก

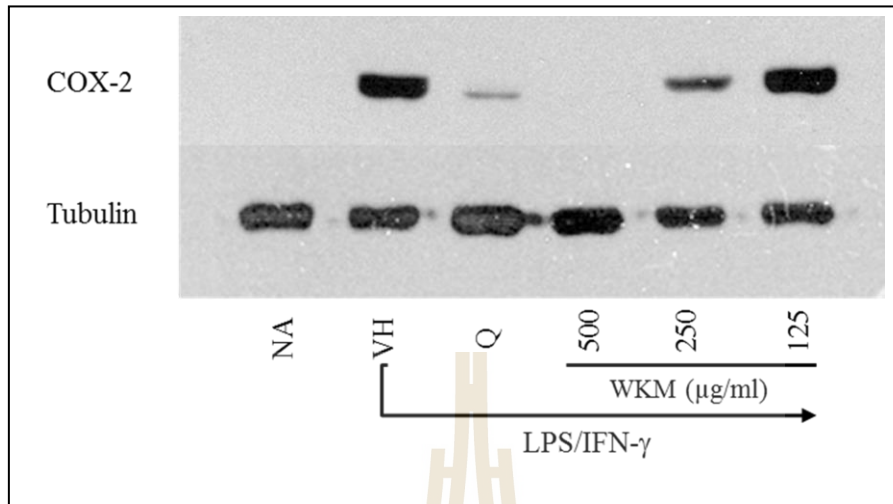
เพื่อค้นหากลไกของสารสกัดวุ้นชันหมากในการยับยั้งการสังเคราะห์ NO ของเซลล์ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นโดย LPS ร่วมกับ IFN- γ งานวิจัยนี้จึงศึกษาผลของสารสกัดวุ้นชันหมาก ต่อ iNOS ซึ่งเป็นเอนไซม์เกี่ยวข้องโดยตรงในการสังเคราะห์ NO ภายใต้สภาวะที่ถูกชักนำ โดย LPS และ IFN- γ ปริมาณของ NO ในสภาวะที่ถูกชักนำ (induced NO) มีระดับสูงและเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ ดังนั้น สารสกัดวุ้นชันหมากที่สามารถยับยั้งการสังเคราะห์ NO ในสภาวะที่ถูกชักนำจึงน่าจะมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ และเพื่อเป็นการยืนยันฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัด เพิ่มเติมจากการยับยั้งการสร้าง NO งานวิจัยนี้จึงศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้ง COX-2 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยน arachidonic

acid ให้เป็น prostaglandin และ thromboxane รวมทั้งสารกลุ่ม eicosanoid ของ fatty acid ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ และการก่อกำเนิดของระบบภูมิคุ้มกัน (Timothy et al., 2015) การแสดงออก (expression) ของทั้ง iNOS และ COX-2 protein ถูกตรวจสอบด้วยวิธี Western blot analysis ในการทดลอง เซลล์ RAW264.7 ได้รับการบ่มล่วงหน้ากับสารสกัดว่านขันหมาก หรือ antioxidant control quercetin 4 ชม. ก่อนได้รับการกระตุ้นด้วย LPS ร่วมกับ IFN- γ เป็นระยะเวลา 24 ชม. และประเมินด้วยวิธี Western blot analysis การทดลองให้ผลที่เป็นไปตามความคาดหมายคือ LPS และ IFN- γ สามารถกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน iNOS ให้เพิ่มขึ้นใน RAW264.7 เซลล์ ซึ่งไม่มีการแสดงออกในสถานะปกติที่ไม่ได้รับการกระตุ้น (lane VH เทียบกับ lane NA) (รูปที่ 4.9) ผลการทดลองชี้ชัดว่าทั้ง สารสกัดว่านขันหมาก และ antioxidant positive control quercetin สามารถยับยั้งการแสดงออกของ iNOS protein ได้เมื่อเทียบกับกลุ่มตัวทำละลายควบคุม จากการตรวจสอบการยับยั้งโดยเชิงปริมาณด้วย densitometry พบว่า สารสกัดว่านขันหมากที่ความเข้มข้น 125, 250 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้งการแสดงออกของ iNOS protein ได้ 12.86% 90.26% และ 97.54% ตามลำดับ ดังนั้น การยับยั้งการแสดงออกของ iNOS โปรตีนของสารสกัดว่านขันหมากเพิ่มขึ้นอยู่กับตามความเข้มข้นของสารสกัด และสารสกัดทั้งที่ 250 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้งการแสดงออกของ iNOS ได้มากกว่า antioxidant positive control 10 μM quercetin ซึ่งยับยั้งการแสดงออกของ iNOS ได้ 58.96% ทุกตัวอย่างมีค่า tubulin ซึ่งเป็นโปรตีนจาก house keeping gene ที่ใกล้เคียงกัน



รูปที่ 4.9 ผลของว่านขันหมาก ต่อการแสดงออกของโปรตีน iNOS ในเซลล์ macrophage RAW264.7 ที่ถูกชักนำให้สังเคราะห์ขึ้นโดยการกระตุ้นด้วย $1 \mu\text{g/ml}$ LPS และ 25 U/ml IFN- γ เป็นเวลา 24 ชม. ภายหลังจากการบ่มเซลล์ล่วงหน้ากับสารสกัดว่านขันหมาก และ antioxidant control เป็นระยะเวลา 4 ชม. ก่อนการกระตุ้น การแสดงออกของ iNOS protein ประเมินโดย Western blot analysis ปริมาณของ protein ที่ถูก load คือ $10 \mu\text{g/lane}$ การแสดงออกของโปรตีนในเชิงปริมาณวัดด้วยวิธี densitometrically โดยใช้ Image J software และปรับค่า (normalize) โดยเทียบกับความเข้มของแถบ tubulin ในแต่ละ lane ข้อมูลที่แสดงเป็นตัวแทนของการทดลองซ้ำกันอย่างน้อย 2 ครั้ง NA = naïve; เซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น, VH = vehicle; ตัวทำละลายควบคุม, Q = $10 \mu\text{M}$ quercetin, WKM = สารสกัดว่านขันหมาก

ผลของ Western blot และการวิเคราะห์เชิงปริมาณโดย densitometry ของโปรตีน COX-2 แสดงในรูปที่ 4.10 ผลการทดลองแสดงว่า การแสดงออกของ COX-2 โปรตีนเกิดในกรณี RAW264.7 เซลล์ได้รับการกระตุ้นจาก LPS และ IFN- γ เท่านั้น (lane VH เทียบกับ lane NA) และการแสดงออกของ COX-2 ที่ถูกชักนำให้เกิดขึ้นสามารถถูกยับยั้งได้โดยสารสกัดว่านขันหมาก และ quercetin การยับยั้งของ COX-2 แปรผันตามความเข้มข้นของสารสกัด ที่ความเข้มข้น 125, 250 และ $500 \mu\text{g/ml}$ สารสกัดสามารถยับยั้งการแสดงออกของ COX-2 protein ได้ 3.86, 47.58, และ 98.21% ตามลำดับ ในขณะที่ antioxidant positive control $10 \mu\text{M}$ quercetin สามารถยับยั้ง COX-2 ได้ 87.38% ทั้งนี้ ทั้งสารสกัด และ quercetin ที่ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองไม่มีผลต่อการแสดงออกของ tubulin ซึ่งเป็นโปรตีนจาก house keeping gene แต่อย่างใด

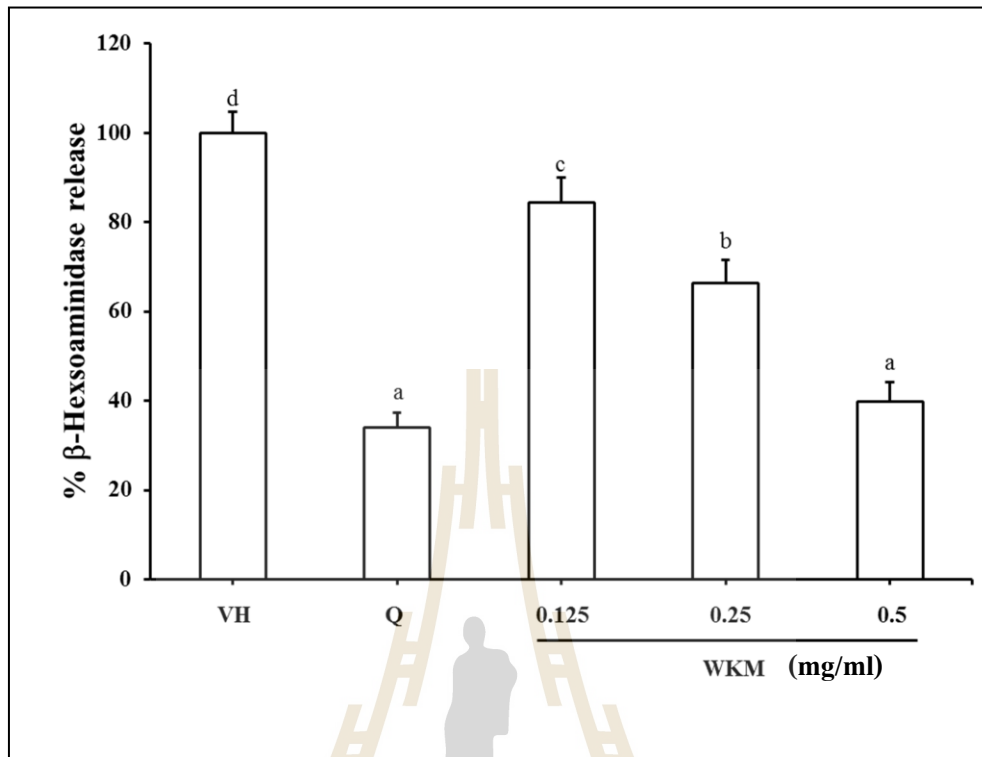


รูปที่ 4.10 ผลของว่านขันหมาก ต่อการแสดงออกของโปรตีน COX-2 ในเซลล์ macrophage RAW264.7 ที่ถูกชักนำให้สังเคราะห์ขึ้นโดยการกระตุ้นด้วย $1 \mu\text{g/ml}$ LPS และ 25 U/ml IFN- γ เป็นเวลา 24 ชม. ภายหลังจากการบ่มเซลล์ล่วงหน้ากับสารสกัดว่านขันหมาก และ antioxidant control เป็นระยะเวลา 4 ชม. ก่อนการกระตุ้น การแสดงออกของ COX-2 ประเมินโดย Western blot analysis ปริมาณของ protein ที่ load ในแต่ละ lane คือ $10 \mu\text{g}$ การแสดงออกของโปรตีนในเชิงปริมาณวัดด้วยวิธี densitometrically โดยใช้ Image J software และปรับค่า (normalize) โดยเทียบกับความเข้มของแถบ tubulin ในแต่ละ lane ข้อมูลที่แสดงเป็นตัวแทนของการทดลองซ้ำกันอย่างน้อย 2 ครั้ง NA = naïve; เซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น, VH = vehicle; ตัวทำละลายควบคุม, Q = $10 \mu\text{M}$ quercetin, WKM = สารสกัดว่านขันหมาก

4.7 การทดสอบการต้านการหลั่งสารก่อภูมิแพ้

สภาวะภูมิไวเกิน type I (immediate-type hypersensitivity) เกิดจากการกระตุ้น mast cell โดย allergen ที่ cross link IgE บนผิวของ mast cell ให้หลั่งสารก่อภูมิแพ้ต่าง ๆ ออกจาก granule (degranulation) รวมทั้งเอนไซม์ β -hexosaminidase ร่วมกับ histamine เนื่องจากการหาปริมาณของ β -hexosaminidase สามารถใช้วิธีทาง colorimetric spectrophotometer จึงกระทำได้ง่าย และสะดวกกว่าการวัดปริมาณของ histamine โดยตรง ดังนั้น การใช้ β -hexosaminidase activity เป็นดัชนีบ่งชี้การหลั่งของสารก่อภูมิแพ้ (degranulation marker) ออกจาก mast cell จึงเป็นที่นิยม และมักใช้เป็นวิธีคัดกรอง (screening method) เบื้องต้นในการค้นหาสารที่มีฤทธิ์ต้านอาการภูมิแพ้ (Fischer et al., 1995; Choi et al.,

1996) สำหรับงานวิจัยนี้เลือกใช้ basophilic leukemia RBL-2H3 เซลล์ เป็นตัวแทน mast cell ในการทดสอบฤทธิ์ต้านการหลั่งสารก่อภูมิแพ้ *in vitro* ของสารสกัดว่านขันหมาก และประเมินการหลั่งสารก่อภูมิแพ้จาก granule ด้วยการวัด β -hexosaminidase activity ภายหลังจากกระตุ้น RBL-2H3 เซลล์ (ที่มี IgE ที่จำเพาะต่อ DNP เคลือบอยู่ที่ผิว) ด้วยแอนติเจน DNP-BSA ในสถานะที่บ่มกับตัวทำละลายควบคุม หรือ บ่มร่วมกับสารสกัดว่านขันหมาก หรือ antioxidant positive control 10 μ M quercetin ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.11 สารสกัดว่านขันหมากทุกความเข้มข้นสามารถลดการหลั่งสารก่อภูมิแพ้จาก RBL-2H3 เซลล์ภายหลังจากกระตุ้นด้วยแอนติเจนอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับตัวทำละลายควบคุม และการลดลงของ % การหลั่งจาก granule ของ β -hexosaminidase เป็นปฏิภาคโดยตรงกับความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น สารสกัดที่ความเข้มข้น 0.125, 0.250 และ 0.500 mg/ml สามารถลดการหลั่งของ β -hexosaminidase ได้ 15.62, 33.70 และ 60.25% ตามลำดับ เป็นที่น่าสังเกตว่า สารสกัดที่ความเข้มข้น 0.500 mg/ml มีความสามารถในการลดการหลั่งสารก่อภูมิแพ้จาก granule ของ RBL2H3 เซลล์ไม่แตกต่างจาก positive control 10 μ M quercetin



รูปที่ 4.11 ผลของสารสกัดว่านขันหมากต่อการชักนำให้เกิดการหลั่งของ β -hexosaminidase จาก granule ของ basophilic RBL-2H3 เซลล์ เมื่อถูกกระตุ้นโดยแอนติเจน DNP-BSA หลังจากที่ใช้เซลล์บ่มล่วงหน้ากับ monoclonal antibody mouse anti-DNP IgE ข้ามคืน ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n = 3$) และเป็นตัวแทนของ การทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่ได้ผลที่คล้ายคลึงกัน กราฟแท่งที่มีอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อวิเคราะห์ด้วย one-way ANOVA. VH = vehicle; ตัวทำละลายควบคุม, Q = 10 μ M quercetin, WKM = สารสกัดว่านขันหมาก

4.8 การทดสอบการละลายพันธุ์ของว่านขันหมาก

สิ่งที่ผู้บริโภคกังวลเกี่ยวกับว่านขันหมาก ไม่ใช่พิษเฉียบพลัน หรือ พิษกึ่งเฉียบพลันของว่านขันหมาก เพราะคนไทยได้มีการใช้ว่านขันหมากเป็นยาอายุวัฒนะมาช้านาน และไม่เคยมีรายงานเกี่ยวกับพิษเฉียบพลันจากการบริโภคว่านขันหมาก แต่ผู้บริโภคมักมีความกังวลเกี่ยวกับพิษเรื้อรังอันเกิดจากการบริโภคว่านขันหมากต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน โดยเฉพาะความกังวลเกี่ยวกับการก่อให้เกิดโรคมะเร็งซึ่งมักเป็นความกังวลทั่วไปของผู้ใช้พืชสมุนไพรต่อเนื่อง งานวิจัยนี้จึงศึกษาพิษระยะยาวเบื้องต้นของสาร

สกด่วนชั้นหมาก โดยเลือกการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกด่วนชั้นหมากด้วยวิธี Ames test ซึ่งเป็นการทดสอบที่นิยมใช้เพื่อเป็นการคัดกรองเบื้องต้นของสารก่อกลายพันธุ์และสารก่อมะเร็ง ทั้งนี้ เพราะสารก่อมะเร็งส่วนใหญ่มักเป็นสารก่อกลายพันธุ์ร่วมด้วย และการกลายพันธุ์เป็นกลไกหนึ่งที่สำคัญยิ่งในการชักนำให้เกิดโรคมะเร็งในร่างกาย (Klaassen, 2008; Griffiths et al., 2000; Tennant, 2014) ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.4 ซึ่งชี้ว่าสารสกด่วนชั้นหมากที่ความเข้มข้น 250, 500 และ 1000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ ไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ของทั้ง TA 98 และ TA100 ในการทดสอบไม่ว่าจะมี หรือ ไม่มี S9 mix เนื่องจากว่านชั้นหมาก และ metabolize product ของว่านชั้นหมากทุกความเข้มข้นที่มีค่า mutagenic index (MI) ต่ำกว่า 2 คือตั้งแต่ 0.78-1.18 สำหรับ TA98 และ ตั้งแต่ 0.63-1.24 สำหรับ TA 100 ในขณะที่สารก่อกลายพันธุ์ทั้งหมดที่ใช้เป็น positive control ให้ค่า MI สูงอย่างที่ควรจะเป็น คือ ในสถานะที่ไม่มี S9 mix สาร 2-NF ที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ มีค่า MI สูงถึง 57.09 ใน TA98, sodium azide ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ มีค่า MI 12.65 ใน TA100 และในสถานะที่มี S9 mix สาร 2-AA ที่ความเข้มข้น 2.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ ให้ค่า MI สูงถึง 48.22 และ 66.66 ใน TA98 และ TA 100 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.4 ผลของสารสกัดว่านขันหมากต่อการกลายพันธุ์ของ *Salmonella typhimurium* strains TA98 และ TA 100 เมื่อทดสอบโดยไม่มี และ มีส่วนผสม S9

ตัวอย่าง	Number of Revertants/plate (Mean±S.D.), (MI)			
	TA98		TA100	
	ไม่มี S9 mix	มี S9 mix	ไม่มี S9 mix	มี S9 mix
2-NF(10 µg/plate) ^{PC}	1,256±164,(57.09)	–	–	–
Sodium azide (10 µg/plate) ^{PC}	–	–	1,830±75,(12.65)	–
2-AA(2.5 µg/plate) ^{PC}	–	1,511±631,(48.22)	–	7,177±378,(66.66)
Control (1.4%DMSO) ^{NC}	22±3.46	13.33±6.03	144.67±10.06	107.67±20.84
WKM (250 µg/plate)	26±3.61, (1.18)	24.33±7.09,(0.78)	91±12.29,(0.63)	134±42.02, (1.24)
WKM (500 µg/plate)	19±8.66, (0.86)	31±13.75, (0.99)	108.06±12, (0.75)	103.67±26.54,(0.96)
WKM (1000 µg/plate)	17.67±3.21,(0.80)	29.33±5.77,(0.94)	105.33±10.69,(0.73)	98.67±13.05, (0.92)

PC = positive control, NC = negative control, WKM = สารสกัดว่านขันหมาก, MI = Mutagenic index; ค่าดัชนีการกลายพันธุ์ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีของการกลายพันธุ์ย้อนกลับ (revertant colony)±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3). MI =จำนวนโคโลนีของการกลายพันธุ์ย้อนกลับของสารสกัด/จำนวนโคโลนีของการกลายพันธุ์ย้อนกลับของตัวทำละลายควบคุม (spontaneous revertant) ค่า MI ในวงเล็บที่มีค่า ≥ 2 หมายถึงก่อให้เกิดการกลายพันธุ์

บทที่ 5

การวิจารณ์

ในประเทศไทย แม้งานวิจัยเกี่ยวกับพืชสมุนไพรมีความก้าวหน้าในระดับหนึ่ง แต่งานวิจัยเกี่ยวกับว่านต่าง ๆ ยังมีน้อยมาก โดยเฉพาะว่านชันหมาท ที่ถึงแม้มีการใช้เป็นอายุวัฒนะมาแต่โบราณ และมีสรรพคุณต่าง ๆ เป็นที่ร่ำลือในกลุ่มผู้บริโภค แต่งานวิจัยที่มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับสารพฤกษเคมี และสรรพคุณทางเภสัชวิทยา ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน โครงการวิจัยนี้จึงศึกษาสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของว่านชันหมาท โดยใช้ *in vitro* model อันได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และ ฤทธิ์ต้านการหลั่งสารก่อภูมิแพ้ของว่านชันหมาท รวมทั้งประเมินพิษเรื้อรังเบื้องต้นโดยใช้ Ames test ซึ่งเป็นการทดสอบที่นิยมใช้เพื่อการคัดกรองสารก่อกลายพันธุ์ และสารก่อมะเร็งเบื้องต้น งานวิจัยนี้เลือกศึกษาสารสกัดจากส่วนที่เป็นผลของว่านชันหมาท เพราะเป็นส่วนของว่านชันหมาทที่ใช้ในการบริโภคและซื้อขายกัน โดยคัดเลือกเฉพาะผลสุก (สีแดง หรือ ส้ม) มาศึกษา เพื่อเลียนแบบวิธีการบริโภคที่ต้องรอให้ผลสุกก่อน จึงเก็บมาขาย หรือนำมาบริโภค สำหรับผลว่านชันหมาทที่นำมาสกัดเก็บจากเนินเขาในแถบอำเภอ ปักธงชัย จังหวัดนครราชสีมา ในระหว่างเดือนพฤศจิกายน ถึงเดือน ธันวาคม เพราะเป็นช่วงเดียวที่ต้นว่านออกผลสูงสุด และผลสุกพร้อมเก็บ ถ้าเลยช่วงเวลานี้ ผลว่านจะมีปริมาณน้อย เพราะมีสัตว์อื่นมากัดกิน การสกัดในงานวิจัยนี้ใช้วิธีการหมัก โดยใช้ 95% เอทานอล ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่สามารถสกัดสารจากพืชสมุนไพร ได้หลากหลายชนิด 95% เอทานอลจัดเป็น “ตัวทำละลายสากล (universal solvent)” เพราะสามารถละลายสารได้หลากหลายชนิด ทั้งสารที่มีขั้ว (polar) และ ไม่มีขั้ว (non-polar) โดยเฉพาะกลุ่มสารที่มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี มี polar สูง (very polar) polar ปานกลาง (neutral) สารที่มีฤทธิ์เป็นกรด เป็นด่าง กรดอะมิโน nucleotides น้ำตาล และ polysaccharides ต่าง ๆ ทั้งนี้เนื่องจากโครงสร้างของ ethanol มีทั้งหมู่ polar และ non-polar หมู่ polar hydroxyl ในโมเลกุลของ ethanol สามารถสร้างพันธะ hydrogen (hydrogen bond) ในขณะที่มีหมู่ alkyl ซึ่งเป็นส่วนที่เป็น non-polar ช่วยในการดึงสารที่มีลักษณะเป็นหยดน้ำมัน (grease) และกลุ่มสารอื่นที่เป็น non-polar ออกจากพืชสมุนไพรได้ (http://www.researchgate.net/profile/ying_li58; <http://www.easychem.com.au/production.of.materials/renewable.ethanol/ethanol.as.a.solvent>; <http://community.baredofstudies.org/870/chemistry/228126/why.do.some.chemicals-dissolve-ethanol.html>) ผลจากการสกัดผลอบแห้งของว่านชันหมาทด้วย 95% ethanol ได้ปริมาณสารสกัดหยาบ 12.65% ของน้ำหนักสารสกัดแห้ง

ผลจากการส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์เคมีแบบประมาณ พบว่า ผงแห้งของผลวุ้นชันหมากมีความชื้นประมาณ 12% และกลุ่มสารที่พบมากที่สุดคือ โปรตีน ที่มีค่าประมาณ 71% รองลงไป คือ กลุ่ม carbohydrate (nitrogen free extract) มีประมาณ 11% ส่วนไขมัน พบประมาณ 1% ส่วนกากหยาบ หรือ เส้นใย พบในปริมาณต่ำสุด คือ เพียง 0.1 %

จากการตรวจสอบสารพฤกษเคมีในสารสกัด ethanol จากผลวุ้นชันหมาก พบว่า สารสกัดวุ้นชันหมากมีทั้งกลุ่มสาร phenolics, flavonoids และ proanthocyanidins เมื่อตรวจวัดโดย Folin-Ciocalteu, aluminium trichloride และ vanillin assay ตามลำดับ และปริมาณของกลุ่มสาร phenolics, flavonoids และ proanthocyanidins ของสารสกัดวุ้นชันหมากมีค่าต่ำกว่าสารมาตรฐานที่นำมาเปรียบเทียบ ผลจากการทดสอบ พบว่าสารสกัดวุ้นชันหมากมีปริมาณ phenolics รวม 56.75 ± 0.37 mg GAE/g dry extract หมายความว่า ถ้าเปรียบเทียบปริมาณรวมของกลุ่ม phenolics ในสารสกัดวุ้นชันหมากกับสารมาตรฐาน quercetin บริสุทธิ์ น้ำหนักแห้งของสารสกัดวุ้นชันหมาก 1 กรัมมีปริมาณ phenolics รวม เทียบเท่า 0.057 กรัมของ gallic acid ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ flavonoid พบว่าสารสกัดวุ้นชันหมากมีปริมาณรวมของ flavonoid 5.03 ± 0.03 mg CE/g dry extract แสดงว่า สารสกัดแห้งวุ้นชันหมาก 1 กรัมมีปริมาณรวมของ flavonoid เทียบเท่า catechin บริสุทธิ์ 0.005 กรัม ส่วนปริมาณ proanthocyanidins ของสารสกัดวุ้นชันหมากคือ 7.02 ± 0.12 mg CE/g dry extract หมายความว่า proanthocyanidins ของสารสกัดวุ้นชันหมากในน้ำหนักแห้ง 1 กรัมมีปริมาณเทียบเท่าปริมาณของ catechin บริสุทธิ์ 0.007 กรัม อย่างไรก็ตาม เนื่องจาก สารสกัดวุ้นชันหมากที่ศึกษาในโครงการวิจัยนี้เป็นเพียงสารสกัดหยาบ ไม่ได้ทำการแยกส่วนเป็นกลุ่มสารต่าง ๆ ให้บริสุทธิ์ จึงเป็นเรื่องไม่เหนือความคาดหมายที่ปริมาณรวมของ phenolics, flavonoids และ proanthocyanidin จะไม่มีค่าสูงนัก โดยเฉพาะเมื่อเทียบตามน้ำหนักกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ซึ่งเป็นสารบริสุทธิ์ จากการสืบค้นฐานข้อมูลต่าง ๆ ผู้วิจัยยังไม่พบรายงานพฤกษเคมีในผลวุ้นชันหมาก ข้อมูลเกี่ยวกับพฤกษเคมีของวุ้นชันหมากเฉพาะสายพันธุ์ที่ศึกษา คือ *Aglaonema simplex* (Blume) Blume ที่พบมีเพียงรายงานการศึกษารวมกับพืชบูกอบอนบนดินอื่น ๆ ในเขตวนอุทยานแห่งชาติ ไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี ซึ่งเลือกศึกษาเฉพาะส่วนลำต้นใต้ดิน โดยวิธีสกัดสด (maceration) ด้วยเมทานอล และนำสารสกัดหยาบแยกเฉพาะส่วนที่เป็นไขมัน (lipophilic extract) ที่ละลายใน chloroform มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Thin layer chromatography และใช้วิธีการตรวจสอบปฏิกิริยาการเกิดสีด้วยน้ำยาฟันทแบบเฉพาะเจาะจง พบ สารสำคัญในกลุ่ม terpenoids, phenolic compounds, coumarin และ alkaloids และรายงานผลในเชิงคุณภาพ (qualitative) ว่า พบ หรือ ไม่พบ กลุ่มสาร โดยไม่มีการรายงานค่าของกลุ่มสารในเชิงปริมาณ (quantitative) (ทิวรัช ณาพิรุณ และ คณะ, 2556) ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยนี้ ที่ศึกษาพฤกษเคมีในส่วนผลของวุ้นชันหมากที่เป็นสารสกัดหยาบทั้งหมดจาก 95% ethanol

โดยไม่มี การแยกส่วน (fractionate) และ โครงการวิจัยนี้ เน้นหาเฉพาะกลุ่มสารที่เกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยรายงานค่าในเชิงปริมาณ อย่างไรก็ตาม อย่างไรก็ดี แม้ข้อมูลจะแตกต่างกันในธรรมชาติของงานที่ศึกษา แต่พอสรุปได้ว่า วานชันหมาก ไม่ว่าจะเป็นส่วนผล หรือ ลำต้น ก็มีกลุ่มสาร phenolic เป็นองค์ประกอบหนึ่งที่สำคัญ

เป็นที่ทราบกันดีว่าในบรรดากลุ่มพฤกษเคมีสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในพืชสมุนไพร คือ กลุ่ม phenolic compound ที่รวมทั้งกลุ่มที่ให้สารสีซึ่งได้แก่กลุ่ม flavonoids และ proanthocyanidin ต่าง ๆ สารสกัดวานชันหมากที่มีสารประกอบ phenolic ทั้งกลุ่ม flavonoid และ proanthocyanidin จึงควรมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ งานวิจัยนี้เลือกศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด 3 วิธี คือ ใช้ DPPH assay, FRAP assay และ DCFH-DA assay ซึ่งมีกลไกการกำจัดอนุมูลอิสระแตกต่างกัน เนื่องจากในร่างกายมีอนุมูลอิสระหลากหลายชนิด และร่างกายมีกลไกแตกต่างกันในการกำจัดสาร oxidant และอนุมูลอิสระต่าง ๆ ภายใต้สภาวะเครียดออกซิเดชัน การศึกษาเพื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในพืชสมุนไพร จึงไม่ควรใช้การตรวจสอบเพียงวิธีเดียว และนอกจากแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลองแล้ว ควรตรวจสอบด้วยว่า พืชสมุนไพรสามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระภายในร่างกายสิ่งมีชีวิต หรืออย่างน้อยก็แสดงความสามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ภายในเซลล์ งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ DCFH-DA assay ซึ่งเป็นวิธีทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันภายในเซลล์ควบคู่กับ DPPH และ FRAP assay ซึ่งเป็นวิธีทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเคมีในหลอดทดลอง ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ นิยมใช้สารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ในพืช เช่น ไวตามินซี catechin, quercetin หรือแม้แต่ว่า Trolox สารสังเคราะห์ของไวตามินอีที่ละลายน้ำได้ เป็นต้น เพื่อเป็น antioxidant positive control และโดยปกติ สารเหล่านี้ได้ถูกใช้เพื่อเปรียบเทียบความสามารถต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์ทางอาหารต่าง ๆ อยู่แล้ว โครงการวิจัยนี้ จึงใช้ catechin, quercetin และ trolox เป็น antioxidant positive control ใน DPPH assay ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดวานชันหมากในตารางที่ 4.2 พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้ โดยมีค่า IC_{50} ประมาณ 400 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งมีค่าน้อยกว่าสารมาตรฐาน quercetin และ catechin เกือบ 200 เท่า และ น้อยกว่า trolox ประมาณ 100 เท่า ส่วนค่า FRAP (Ferric reducing power) ของสารสกัดมีค่าประมาณ 44 mg AEAC/g ซึ่งหมายถึงสารสกัดน้ำหนักแห้ง 1 กรัมมีความสามารถในการรีดิวซ์ TPTZ-Fe (III) ไปเป็น TPTZ-Fe(II) เทียบเท่าไวตามินซีบริสุทธิ์หนัก 0.044 กรัม หรือมีความสามารถน้อยกว่าไวตามินซีประมาณ 23 เท่า อย่างไรก็ตาม ผลทดสอบเป็นความสามารถต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเทียบเคียงกับความสามารถของปริมาณสารมาตรฐาน ซึ่งเป็นสารบริสุทธิ์ ทั้งนี้ไม่ได้หมายความว่าผลวานชันหมากจะมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระได้น้อยกว่าสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานที่ใช้เป็น positive control เนื่องจากการเปรียบเทียบระหว่างสาร

สกัดหยาบ และสารบริสุทธิ์ จะเปรียบเทียบโดยตรงไม่ได้ อย่างไรก็ตาม ข้อมูลจากการทดลองชี้ชัดว่าสารสกัดหยาบชันหามากสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ทั้งใน DPPH assay และ FRAP assay ซึ่งมีกลไกต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน แม้การทดสอบทั้ง DPPH และ FRAP จะเกี่ยวข้องกับการส่งผ่าน electron เพียงตัวเดียว (Bunea et al., 2011) แต่คุณลักษณะ ความไว และ กลไกของปฏิกิริยา และ ผลลัพธ์ (endpoints) มีความแตกต่างกัน วิธี DPPH ขึ้นกับความสามารถในการกำจัด (scavenging) activity อนุมูลอิสระ DPPH (DPPH•) ในขณะที่ FRAP วัดกำลังความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{+3} เป็น Fe^{+2} (Benzie และ Strain, 1996) นอกจากนี้ FRAP assay ยังสามารถทดสอบศักยภาพของการทำลายปฏิกิริยาลูกโซ่ของปฏิกิริยาการเกิดออกซิเดชัน (chain-breaking antioxidant potential) (Ghiselli et al., 1995) ดังนั้น ชันหามากจึงสามารถต้านออกซิเดชันได้อย่างน้อย 2 กลไก แต่อย่างไรก็ดี ทั้ง DPPH assay และ FRAP assay แม้จะเป็นวิธีการวัดความสามารถต้านอนุมูลอิสระที่เป็นที่นิยม และเป็นวิธีทดสอบที่กระทำได้ง่าย แต่ก็มีข้อจำกัดคือ อนุมูลอิสระ DPPH• ไม่ได้เกิดขึ้นจริงในร่างกายของสิ่งมีชีวิต ส่วน FRAP assay แม้สารที่มีศักยภาพต่ำในการรีดิวซ์ (low redox potential) ก็สามารถรีดิวซ์ Fe^{+3} เป็น Fe^{+2} ได้ และวิธีการทดสอบ FRAP ไม่ได้กระทำใน pH ที่ใกล้เคียงกับสภาวะของร่างกาย (physiological pH) นอกจากนี้ ทั้ง 2 วิธีทดสอบอาจจะมีการรบกวนจากสารอื่นที่สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเดียวกันที่ใช้ในการทดสอบ ทำให้ผลการทดลองคลาดเคลื่อน และข้อจำกัดที่สำคัญมากอีกข้อหนึ่ง คือ พืชสมุนไพรหลายชนิดที่ให้ผลบวก หรือมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระในวิธีทดสอบ DPPH และ FRAP แต่กลับไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย (Pérez-Jiménez et al., 2008) ดังนั้น โครงการวิจัยนี้ จึงเพิ่มวิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบชันหามากภายในเซลล์ (cell-based assay) ด้วยโดยใช้สาร DCFH-DA ที่สามารถตรวจวัดการเรืองแสงของสารภายในเซลล์ได้ (intracellular fluorescent probe) เมื่อสารถูก oxidize ภายในเซลล์ โดยทั่วไป การศึกษาเกี่ยวกับอนุมูลอิสระ หรือ ROSs ต่าง ๆ ภายในเซลล์ มักนิยมใช้เซลล์ macrophage เป็นโมเดล เนื่องจากเมื่อเซลล์ macrophage ถูกกระตุ้น จะมีการสร้าง ROSs เกิดขึ้นมากมาย เนื่องจากโดยธรรมชาติของเซลล์ macrophage เมื่อกินกิน (phagocytize) จุลินทรีย์ หรือสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่เซลล์ จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน สร้างสารอนุมูลอิสระต่าง ๆ เพื่อทำลายจุลินทรีย์ที่กินกินเข้าไป ผลการทดลองในโครงการวิจัยนี้ (รูปที่ 4.2) แสดงว่า 10 μ M quercetin สามารถยับยั้งการออกซิไดซ์ DCFH หรือลดการเกิด ROS ซึ่งในงานวิจัยนี้คือ DCF ได้ประมาณ 47% และสารสกัดหยาบชันหามากก็สามารถลดการเกิด ROS ภายใน RAW264.7 เซลล์ได้เช่นกัน โดยการลดลงของ DCF แปรผันตามความเข้มข้นของสารสกัดหยาบชันหามากที่เพิ่มขึ้น ความเข้มข้นของสารสกัดที่ 250 และ 500 μ g/ml สามารถลดการเกิด ROS ได้ประมาณ 41% และ 64% ตามลำดับ และการลดต่ำของปริมาณ DCF ไม่ได้

เป็นผลทางอ้อม ที่เกิดจากความเป็นพิษของสารสกัดว่านขันหมากต่อ RAW264.7 เซลล์ ส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ และการลดลงของ DCF ตามลำดับ ทั้งนี้ เพราะความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในการทดลอง ได้จากการศึกษาเบื้องต้นที่แสดงว่าความเข้มข้นในช่วงนี้ไม่มีผลกระทบต่อ % การอยู่รอดของ RAW264.7 เซลล์ (รูปที่ 4.3-4.4) ดังนั้น สารสกัดว่านขันหมากนอกจากสามารถต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบด้วยวิธีทางเคมีได้แล้ว ยังสามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ และออกฤทธิ์ด้านการเกิดอนุมูลอิสระที่เกิดภายในเซลล์ได้ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยอื่น ๆ ที่รายงานว่าสารสกัดน้ำ หรือ สารสกัด ethanol ของพืชและผลไม้หลากหลายชนิดที่มีสารประกอบ phenolic สามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เกิดภายในเซลล์โดยใช้ DCFH-DA assay (Aiyegoro และ Okoh, 2009, 2010; Shi, et al., 2011; Shukla et al., 2012; Serra et al., 2011) ดังนั้น ความสามารถต้านอนุมูลอิสระของว่านขันหมาก น่าจะเกี่ยวข้องกับสารประกอบ phenolic กลุ่ม flavonoid และ proanthocyanidin ที่พบในสารสกัดว่านขันหมาก เป็นที่น่าสังเกตว่า แม้ผลการทดสอบจาก DPPH assay (ตารางที่ 4.2) ชี้แนะว่า สารสกัดว่านขันหมากที่มีความเข้มข้นสูงถึง 625 $\mu\text{g/ml}$ มีความสามารถ scavenge DPPH \bullet ได้ต่ำกว่าสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน 10 μM quercetin แต่ใน DCFH-DA assay สารสกัดที่มีความเข้มข้นที่ 500 $\mu\text{g/ml}$ กลับสามารถลดการสร้าง ROS ได้สูงกว่า 10 μM quercetin อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (รูปที่ 4.2) นั่นอาจเป็นเพราะว่ากลไกของการต้านอนุมูลอิสระใน DPPH assay และ DCFH-DA assay นั้นแตกต่างกัน ในวิธีทดสอบ DPPH การออกฤทธิ์ของสารขึ้นกับความสามารถในการรีดิวซ์อนุมูลไนโตรเจนของ DPPH ที่เสถียร (stable DPPH nitrogen radical) ส่วนกรณี DCFH-DA assay นั้น DCFH-DA ต้องผ่านเข้าสู่เซลล์ก่อนหมู่ diacetate ถูกตัดออกโดย esterase ภายใน RAW264.7 เซลล์ ได้ DCFH ซึ่งถูกออกซิไดซ์ต่อภายในเซลล์โดย tBuOOH ที่ใช้เพื่อกระตุ้นให้เกิดสถานะเรียดออกซิเดชันภายในเซลล์ คือให้เกิดสารเรืองแสง DCF ซึ่งความเข้มของสารเรืองแสงเป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับปริมาณของ ROS (DCF) ที่ถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์ (Yen et al., 2003) สารที่ออกฤทธิ์ใน DCFH-DA assay ต้องสามารถผ่านเข้าสู่เซลล์และสามารถยับยั้งการทำงานของสารกลุ่ม peroxide ในการ oxidize DCFH ได้ ดังนั้น กลไกของการลดปริมาณ DCF ที่ถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์น่าจะแตกต่างจากกลไกที่เกิดใน DPPH assay และสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดว่านขันหมากใน DPPH assay และ DCFH-DA assay อาจจะแตกต่างกันได้ อันที่จริง มีรายงานวิจัยว่าสารต้านอนุมูลอิสระในพฤษเคมีมีอยู่หลายกลุ่ม รวมทั้ง flavonoid หนึ่งในองค์ประกอบของสารพฤษเคมีที่พบในสารสกัดว่านขันหมาก Kumar และ Pandey (2013) ได้รายงานว่า flavonoid ประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติมากมายหลายกลุ่ม ที่มีโครงสร้างทางเคมี และมีกลไกในการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่แตกต่างกัน อาทิ เช่น หมู่ hydroxyl หลายหมู่ใน flavan nucleus ของ flavonoid ช่วยต้านออกซิเดชัน และช่วยในการ chelate สารออกซิแดนท์ หมู่ methoxy ครอบคลุมการออกฤทธิ์และเพิ่มการอยู่

ร่วมกับไขมัน (lipophilicity) พันธะคู่ (double bond) และ หมู่ carbonyl ในวงแหวนหลาย ๆ วง ของ โครงสร้างหลัก (heterocycle of the nuclear ring) ใน flavonoid เกี่ยวข้องกับความเสถียรของอนุมูลอิสระ และเพิ่มความสามารถในการออกฤทธิ์ ส่วนสารประกอบ phenolics มีทั้งหมู่ hydroxyl หรือ methoxyl ในขณะที่ flavones มีหมู่ hydroxyl, keto, และ carboxylic อิสระ และ flavonoids มี flavan nucleus ซึ่งมี หลาย อนุพันธ์ (different types of substitution) โครงสร้างที่แตกต่างกันตามธรรมชาติของสารพฤกษเคมี เหล่านี้ในสารสกัดมีคุณสมบัติที่แตกต่าง และ กลไกที่ต่างกันในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Heim et al., 2002)

แม้ว่า NO เป็นสารสื่อกลาง (mediator) สำคัญซึ่งเซลล์ macrophage ใช้ในการกำจัดเซลล์เนื้องอก (Manthey et al., 1994) แต่การสร้าง NO ในปริมาณที่สูงเกินไปก่อให้เกิดการตายของเซลล์ หรือความเสียหายของเนื้อเยื่อ (Mineo et al., 1997) การสร้าง NO ของเซลล์ macrophage สามารถถูกกระตุ้นโดย endotoxin จากแบคทีเรีย หรือ จาก cytokine ที่เกี่ยวกับการอักเสบ ซึ่งไปชักนำให้เกิดการเพิ่มของ เอนไซม์ iNOS isoform (Alessandro et al., 1994) RAW264.7 เป็นเซลล์สายพันธุ์ของหนูเม้าส์ ซึ่ง สังเคราะห์ NO ในปริมาณสูงเมื่อถูกกระตุ้นโดย LPS และ IFN- γ การสังเคราะห์ NO อาศัย 2 สัญญาณ (signal) คือ สัญญาณแรกโดย IFN- γ เป็น priming signal ช่วยเตรียมเซลล์ เบื้องต้น (prime) เพื่อให้ ตอบสนองต่อสัญญาณที่ 2 จาก LPS ที่เป็น triggering signal ได้ดีขึ้น การใช้ทั้ง IFN- γ และ LPS จึง กระตุ้น RAW264.7 เซลล์ดีกว่าการใช้สารใดสารหนึ่งเพียงสารเดียว งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ทั้ง LPS และ IFN- γ ในการกระตุ้น RAW264.7 เซลล์ เป็นเวลา 24 ชม. เพื่อชักนำให้สร้าง NO และเนื่องจากการวัด ปริมาณ NO โดยตรงกระทำได้ยาก เพราะความไม่เสถียรของ NO และปริมาณ NO ที่เกิดขึ้นไม่สูงนัก ใน ปัจจุบัน การวัดปริมาณ NO จึงมักนิยมใช้วิธีทาง spectroscopic เช่น ultraviolet visible spectroscopic method ที่ใช้ Griess reagent ที่เป็นส่วนผสมของ sulfanilamide, HCl, และ N-(1-naphthyl)-ethylenediamine (NED) ในการวัด nitrite ที่เป็น metabolite product ของ NO ที่มีค่าการดูดกลืนแสง สูงสุดที่ 548 nm ปริมาณของ nitrite เป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับปริมาณของ NO ที่สร้างขึ้น (Kelm and Schauer, 1997) อีกวิธีทาง UV visible spectroscopic ใช้ปฏิกิริยาระหว่าง oxyhemoglobin กับ NO ได้ methemoglobin และ nitrate เพื่อวัดอัตราการสังเคราะห์ NO ในสารละลาย ที่เป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับการ เปลี่ยนแปลง absorption spectrum ของ HbO₂ (Gow et al., 1999) สำหรับงานวิจัยนี้เลือกใช้ Griess reagent ในการวัดปริมาณของการสังเคราะห์ NO ใน RAW264.7 เซลล์เมื่อถูกกระตุ้นโดย LPS และ IFN- γ ผลการทดลองในรูปที่ แสดงว่าสารสกัดเข้มข้นมากกว่า 0.125-500 mg/ml สามารถยับยั้งการสร้าง NO ใน RAW264.7 เซลล์ เมื่อถูกกระตุ้นโดย LPS และ IFN- γ โดยการยับยั้งเป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับความ เข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น และการยับยั้งการสร้าง NO ไม่ได้เกิดเนื่องจากความเป็นพิษของสารสกัด

เพราะความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในการทดลองไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ RAW264.7 (รูปที่ 4.3-4.4) จากการศึกษาพบว่า ในสภาวะเดียวกันที่สารสกัดยับยั้งการสังเคราะห์ NO ปริมาณการแสดงออกของโปรตีน iNOS ก็ถูกยับยั้งเช่นเดียวกัน โดยการแสดงออกของ iNOS ลดลงเป็นปกติโดยตรงกับความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.9) และเป็นไปตามทิศทางเดียวกันกับผลการศึกษาใน NO ดังนั้นกลไกหนึ่งของสารสกัดว่าเข้มข้นมากที่ยับยั้งการสังเคราะห์ NO ใน RAW264.6 เซลล์เมื่อถูกกระตุ้นโดย LPS และ IFN- γ เกิดผ่านการลดลงของโปรตีน iNOS ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่รับผิดชอบในการสังเคราะห์ NO ที่ถูกชักนำให้สร้างขึ้น (induced NO) เมื่อถูกกระตุ้นโดย proinflammatory cytokine หรือสารอื่นที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ดังเช่น LPS และ IFN- γ เป็นต้น นอกจากการกระตุ้น RAW264.7 เซลล์ให้สร้าง NO สาร LPS และ IFN- γ ยังสามารถชักนำการแสดงออกของโปรตีน COX-2 ในเซลล์ RAW264.7 (Jang *et al.*, 2005; Karpuzoglu and Ahmed, 2006) เป็นที่ทราบกันว่าเมื่อ COX-2 เพิ่มขึ้น ปริมาณของ PGE₂ มักจะเพิ่มตาม นอกจากนั้น การเพิ่มของ COX-2 มักพบในเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่อักเสบ (Subbaramaiah and Dannenberg, 2003) ดังนั้น งานวิจัยนี้ได้แสดงว่าสารสกัดว่านขันหมากมีศักยภาพในการยับยั้งการอักเสบด้วยการไปลดการแสดงออกของ COX-2 และการยับยั้งการแสดงออกของ COX-2 แปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของ ว่านขันหมากที่เพิ่มขึ้นเฉกเช่นเดียวกันกับการยับยั้งการสังเคราะห์ NO และ iNOS protein มีข้อควรสังเกตว่า สารสกัดว่านขันหมากสามารถลด iNOS ได้ดีกว่า COX-2 ผลงานวิจัยนี้สอดคล้องกับรายงานวิจัยที่แสดงว่าสารสกัดจากพืชหลากหลายชนิดที่มีคุณสมบัติเป็น antioxidant สามารถมีฤทธิ์ยับยั้ง NO, iNOS หรือ COX-2 ในเซลล์ RAW264.7 และมีฤทธิ์ทางด้านชีวภาพอื่นๆ รวมทั้งฤทธิ์ต้านการอักเสบร่วมด้วย ตัวอย่างเช่น curcumin จากขมิ้น (*Curcuma longa* L.), resveratrol จากเปลือกองุ่น, ไวน์แดง และสารสกัดจากพืชอื่นๆ อีกมากมาย เป็นต้น (Surh *et al.*, 2001; Calixto *et al.*, 2003) นอกจากนี้ phenolic compounds โดยเฉพาะกลุ่ม flavonoids อาทิเช่น apigenin, genistein และ kaempferol เมื่อบ่มล่วงหน้ากับเซลล์ RAW264.7 สามารถยับยั้งการแสดงออกของ NO, iNOS และ COX-2 protein ที่กระตุ้นด้วย LPS (Kobuchi *et al.*, 1997; Liang *et al.*, 1999; Raso *et al.*, 2001; Sakata *et al.*, 2003) ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงแสดงว่าสารสกัดว่านขันหมากซึ่งประกอบด้วย phenolic และ flavonoid นอกจากมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ยังมีฤทธิ์ต้านการอักเสบร่วมด้วย

การยับยั้ง transcription factors อาทิเช่น NF- κ B และ activator protein-1 (AP-1) เป็นอีกหนึ่งกลไกของการยับยั้ง iNOS (Bourke and Moynagh, 1999) ดังนั้นกลไกที่สารสกัดว่านขันหมากลดปริมาณ iNOS และ COX-2 protein จะเกิดผ่านการยับยั้ง NF- κ B หรือ AP-1 หรือไม่ควรต้องมีการตรวจสอบต่อไปในอนาคต นอกจากการยับยั้ง NO, iNOS และ COX-2 โดย flavonoids แล้ว สารประกอบ flavonoids อาทิเช่น rutin, quercetin, luteolin, hesperidin และ bioflavonoids ยังมีฤทธิ์ต้านการเจ็บปวดและต้านการ

อีกเสบ (Ramesh *et al.*, 1998; Bittar *et al.*, 2000; Calixto *et al.*, 2000) การศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดว่านขันหมากที่ประกอบไปด้วย flavonoid มีฤทธิ์ลดการสังเคราะห์ NO และ COX-2 ใน *in vitro* ส่วนความสามารถของสารสกัดว่านขันหมาก ในการต้านความเจ็บปวด หรือการอักเสบใน *in vivo* ด้วยหรือไม่ จำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไปในอนาคต

ในปัจจุบัน โรคภูมิแพ้เป็นปัญหาหนึ่งที่สำคัญทั่วโลก โดยเฉพาะในประเทศที่พัฒนาแล้ว สารที่ก่อภูมิแพ้เรียก allergen และมักเป็นสารในสิ่งแวดล้อมที่พบในชีวิตประจำวัน เช่น เกสรดอกไม้ เครื่องสำอาง อาหาร ฝุ่น เชื้อรา และ สะเก็ดผิวหนังสัตว์ (animal danders) เป็นต้น เมื่อได้รับสารก่อภูมิแพ้ หนแรก ยังไม่เกิดอาการแพ้ แต่ผู้ป่วยจะมีการสร้าง IgE ที่จำเพาะต่อสารก่อภูมิแพ้จับที่ผิวของ mast cell เมื่อได้รับสารก่อภูมิแพ้ครั้งต่อไป สารก่อภูมิแพ้จะ cross-link IgE ที่จับอยู่ที่ผิวของ mast cell กระตุ้นให้ mast cell หลั่งสารตัวกลาง (mediator) ก่อภูมิแพ้ต่าง ๆ เช่น histamine, serotonin, prostaglandin, leukotrienes และ proinflammatory cytokines โดยเฉพาะ IL-4 และ TNF- α จาก vesicles ใน mast cell และ basophils สารตัวกลางเหล่านี้ ทำให้กล้ามเนื้อเรียบหดตัว เพิ่มการขยายของหลอดเลือด (vasodilation) และเพิ่มสภาพการซึมผ่านของหลอดเลือด (vascular permeability) (Janeway *et al.*, 2006; Holgate, 1999) ดังนั้น การหลั่งสารก่อภูมิแพ้จึงเป็นขั้นตอนสำคัญที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบของอาการภูมิแพ้ (allergic inflammation) (Theoharides *et al.*, 2010) และการยับยั้งการหลั่งสารก่อภูมิแพ้จึงเป็นวิธีหนึ่งในการตัดรอนสารที่สามารถบรรเทาหรือยับยั้งการตอบสนองต่ออาการอักเสบอันมีสาเหตุจากการหลั่งสารก่อภูมิแพ้ของ mast cell ในงานวิจัยนี้ จึงศึกษาฤทธิ์ต้านภูมิแพ้ของสารสกัดว่านขันหมากโดยตรวจสอบความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งการหลั่งเอนไซม์ β -hexosaminidase จาก RBL-2H3 เซลล์แทนการวัดสารสื่อกลางโรคภูมิแพ้ เช่น histamine โดยตรง เนื่องจาก β -hexosaminidase เป็นเอนไซม์ exoglycosidase ที่อยู่ใน granule ที่จัดเป็น preformed inflammatory mediator ที่หลั่งออกมาพร้อมกับสารสื่อกลางของโรคภูมิแพ้อื่น ๆ รวมทั้ง histamine และ serotonin เมื่อเกิดการ cross link ของ Fc ϵ RI บนผิวของ RBL-2H3 เซลล์ และเนื่องจากการวิเคราะห์หาปริมาณของ β -hexosaminidase กระทำได้สะดวกและง่ายกว่าการวัดปริมาณของ histamine หรือ serotonin โดยตรง โดยเฉพาะ histamine ที่หลั่งออกมามี half life ภายนอกเซลล์ประมาณ 1 นาที เพราะถูกสลายอย่างรวดเร็วด้วย histamine N-methyltransferase หรือ diamine oxidase ในปัจจุบัน มีการศึกษาจำนวนมากที่นิยมใช้ปริมาณของ β -hexosaminidase เป็นดัชนีบ่งชี้การหลั่งสารก่อภูมิแพ้ต่าง ๆ จาก mast cell เมื่อเกิดการกระตุ้น (Abramson *et al.*, 2006; Pecht และ Corcia, 1987) เพราะอัตราการหลั่งของ β -hexosaminidase ช้าและอยู่ได้นานกว่า histamine บางรายงานจัด β -hexosaminidase เป็นตัวบ่งชี้ของ mast cell degranulation ที่ดีกว่า histamine (Huang *et al.*, 2016)งานวิจัยนี้เลือกใช้ RBL-2H3 ซึ่งเป็นเซลล์สายพันธุ์ที่มีการทำหน้าที่ใกล้เคียงกับ

primary mast cell และ normal basophils ของหนูแรท และเป็นเซลล์สายพันธุ์ที่นิยมใช้เป็นโมเดลมากที่สุดในการศึกษาการหลั่งของสารก่อภูมิแพ้ผ่านการกระตุ้นด้วย IgE และใช้เซลล์นี้คัดกรองสารที่มีฤทธิ์ต้านภูมิแพ้แบบ type I hypersensitivity หรือ immediate hypersensitivity reaction (Cheong et al., 1998; Han et al., 2012) ที่กลไกการหลั่งสารก่อภูมิแพ้เกิดเมื่อถูก allergen cross-link ผ่าน IgE ที่จับกับ FcεRI บนผิวของ mast cell เนื่องจาก RBL-2H3 เซลล์มี Fc epsilon receptor I (FcεRI) ที่ผิวเซลล์ และมี granule เกี่ยวกับการเกิดภูมิแพ้คล้าย mast cell FcεRI จัดเป็น high-affinity IgE receptor เพราะเป็น tetrameric receptor complex ที่สามารถจับกับส่วนที่เป็น Fc ของ IgE isotype ซึ่งเป็น antibody ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคภูมิแพ้โดยตรง) (Benhamar et al., 1999; Kinet, 1999; Li et al., 1992) .ผลการศึกษาจากโครงการนี้พบว่า สารสกัดว่านขันหมากสามารถยับยั้งการหลั่ง β-hexosaminidase เมื่อเกิดการ cross link ของ FcεRI บนผิวของ RBL-2H3 เซลล์โดยใช้ allergen DNP-BSA และการยับยั้งการหลั่งของ β hexosaminidase เป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับความเข้มข้นของสารสกัดว่านขันหมากที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.11) การลดลงของการหลั่ง β hexosaminidase ไม่เกี่ยวข้องกับความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ เพราะช่วงความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ (รูปที่ 4.5-4.6) งานวิจัยนี้ จึงสนับสนุนสรรพคุณการต้านโรคภูมิแพ้ของว่านขันหมากที่เลื่องลือกันในกลุ่มผู้บริโภคที่เป็น โรคภูมิแพ้ และเป็นงานวิจัยชิ้นแรกที่แสดงหลักฐานทางวิทยาศาสตร์สนับสนุนสรรพคุณดังกล่าว อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้ไม่ได้ศึกษาในเชิงลึกว่า ส่วนประกอบใดในสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง β hexosaminidase Cheong et al (1998) ศึกษาสารกว่า 20 ชนิดจาก flavonoids พบว่าการยับยั้งการหลั่งของ β hexosaminidase จาก RBL-2H3 ที่กระตุ้นด้วย antigen มีความสัมพันธ์กับโครงสร้างของ flavonoids Yun et al. (2010) ได้แสดงว่า quercetin ที่มีฤทธิ์ต้านภูมิแพ้สามารถลดการหลั่งของเอนไซม์ β hexosaminidase จาก RBL-2H3 ได้เช่นกัน โดย Mastuda (2002) ได้รายงานว่ามีหมู่ hydroxyl group ของ quercetin มีบทบาทสำคัญในการออกฤทธิ์ยับยั้งการเกิดภูมิแพ้ ดังนั้น สารในกลุ่ม flavonoids ในสารสกัดว่านขันหมากอาจมีฤทธิ์ต้านภูมิแพ้ได้เช่นกัน แต่จะเป็นสารใดในกลุ่ม flavonoids หรือสารกลุ่มอื่นใดร่วมด้วย จำเป็นต้องมีการศึกษาต่อ

ในการศึกษาเกี่ยวกับความเป็นพิษของสารสกัดว่านขันหมากต่อเซลล์สายพันธุ์ RAW264.7 และเซลล์สายพันธุ์ RBL-2H3 ประเมินความอยู่รอดของเซลล์ (cell viability) โดยใช้วิธี MTT ควบคู่กับ trypan blue exclusion method ผลปรากฏว่า ทั้ง 2 วิธีให้ผลไปในทิศทางเดียวกัน แม้หลักการของวิธีการทดสอบทั้ง 2 วิธีจะแตกต่างกัน การใช้ trypan blue จะย้อมสีน้ำเงินติดเฉพาะเซลล์ที่ตาย เมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ส่วนวิธีการใช้ tetrazolium salt MTT เป็นการประเมินเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ทางอ้อม เฉพาะเซลล์ที่มีชีวิต หรือที่มี metabolically active เท่านั้น ที่สามารถใช้เอนไซม์ succinate dehydrogenase ใน mitochondria เปลี่ยน MTT ให้เป็น formazan product โดยปฏิกิริยา reduction ได้ ในปัจจุบัน การ

ประเมินการมีชีวิตอยู่ของเซลล์มักนิยมใช้วิธี MTT เพราะกระทำได้ง่ายและสะดวกกว่าการนับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเฉพาะถ้ามีตัวอย่างจำนวนมากที่ต้องนับ ต้องใช้เวลานาน และเกิดความผิดพลาดได้ง่าย และนักวิจัยมีความเหนื่อยล้าจากการใช้สายตาคำนับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นระยะเวลานาน นอกจากนี้ยังมีความคลาดเคลื่อนจากปัจจัยของบุคคลมากกว่า เช่น ตัวอย่างเดียวกัน นับโดยคน 2 คน อาจได้จำนวนเซลล์ที่แตกต่างกัน หรือแม้แต่ในคนเดียวกัน นับจำนวนเซลล์ของตัวอย่างเดียวกัน 2 ครั้ง อาจได้ค่าที่ไม่เท่ากันนัก เป็นต้น ในขณะที่ วิธี MTT เป็นการวัดผลด้วยการใช้ spectrophotometer กระทำได้ง่ายและสะดวกกว่ามาก มีความคลาดเคลื่อนระหว่างบุคคลน้อยกว่า แต่อย่างไรก็ดี วิธี MTT ก็มีข้อเสียเปรียบบางประการ เช่น metabolic activity ของเซลล์อาจเปลี่ยนแปลงเนื่องจากสารที่ใช้ทดสอบ หรือเปลี่ยนแปลงตามสภาวะของการทดสอบ เช่น สาร polyphenol ใน green tea หรือ pH ของสภาวะทดสอบ นอกจากนี้ ยังอาจมีปัญหาารบกวนจากสีของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ (Wang et al., 2010; Plumb et al., 1989; Hsu et al., 2003) เป็นต้น อันเป็นปัญหาทั่วไปทาง colorimetric method Maioli et al. (2009) รายงานว่ายา และ สารประกอบบางชนิดสามารถเปลี่ยนแปลง mitochondrial activity ใน MTT assay ได้ ดังนั้น การประเมินการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ด้วยการใช้วิธี MTT จึงต้องระมัดระวังเป็นพิเศษ ควรตระหนักถึงปัญหาที่อาจเกิดขึ้นได้ และที่สำคัญต้องเพิ่มกลุ่มควบคุมเพื่อตรวจสอบการรบกวนของสีจากสารสกัดร่วมด้วยทุกครั้ง ซึ่งสามารถกระทำได้ด้วยการมี culture ที่มีแต่สารสกัดบ่มร่วมกับ MTT โดยไม่มีเซลล์ เป็น “blank sample” เพื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm ที่ได้ไปลบออกจากค่าดูดกลืนแสงของสารทดสอบ (culture ที่มีเซลล์บ่มร่วมกับสารสกัด และ MTT) โครงการวิจัยนี้ ได้ตรวจสอบการรบกวนของสีจากสารสกัดในวิธี MTT และไม่พบว่าสารสกัดว่านขันหมากมีผลรบกวนแต่อย่างใด นอกจากนี้ งานวิจัยนี้ ยังใช้วิธี trypan blue exclusion method ประเมินการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ควบคู่ไปกับวิธี MTT ด้วย ผลการทดลองสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกันคือสารสกัดว่านขันหมากที่ความเข้มข้นระหว่าง 125-500 $\mu\text{g/ml}$ ไม่เปลี่ยนแปลง % เซลล์ที่มีชีวิตอยู่เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมของเซลล์ที่ไม่ได้บ่มร่วมกับสารสกัด (รูปที่ 4.3-4.6) ไม่ว่าจะเป็นเซลล์ RA264.7 หรือเซลล์ RBL-2H3 ดังนั้น จึงเลือกใช้ช่วง ความเข้มข้น 125-500 $\mu\text{g/ml}$ ในการทดลองที่ต้องบ่มสารสกัดร่วมกับเซลล์สายพันธุ์ทั้ง 2 ชนิด

ปัญหาหนึ่งสำหรับผู้ให้สมุนไพร คือความกังวลเกี่ยวกับความปลอดภัยของการใช้พืชสมุนไพรต่อเนื่องเป็นระยะยาว ปัจจุบันเป็นที่ทราบแล้วว่า อาหารที่บริโภคในชีวิตประจำวันเป็นปัจจัยหลักที่ชักนำให้เกิดโรคมะเร็งได้ เนื่องจากว่านขันหมากมีการซื้อขายและบริโภคมาช้านาน และยังไม่เคยมีรายงานเกี่ยวกับพิษเฉียบพลันของว่านขันหมาก โครงการวิจัยนี้จึงไม่ได้ศึกษาเกี่ยวกับพิษเฉียบพลันของสารสกัดว่านขันหมาก แต่ตรวจสอบเบื้องต้นเกี่ยวกับความเป็นพิษระยะยาวของสารสกัดว่านขันหมาก โดยเลือก

การคัดกรองเบื้องต้นว่าสารสกัดสามารถจะชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้หรือไม่ โดยใช้ Ames assay ทั้งนี้ เพราะสารมะเร็งส่วนใหญ่มักเป็นสารก่อกลายพันธุ์ร่วมด้วย และเนื่องจากสารมีพิษหลายชนิดที่ออกฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ได้ จะต้องถูก metabolize โดยเอนไซม์ในตับให้เปลี่ยนเป็นสารก่อกลายพันธุ์ โครงการนี้จึงตรวจสอบคุณสมบัติการเป็นสารก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดว่านชันหมาก เมื่อมีและไม่มี S9 mix ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เตรียมจากตับหนูแรท ที่สามารถ metabolize สารพิษต่างๆ ได้ ผลการวิจัยในตารางที่ 4.4 ซึ่งชี้ชัดว่าสารสกัดว่านชันหมากที่ปริมาณ 250, 500 และ 1000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ ไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ของทั้ง TA 98 และ TA100 ในการทดสอบไม่ว่าจะมี หรือ ไม่มี S9 mix ร่วมด้วย แสดงว่าว่านชันหมาก และ metabolize product ของว่านชันหมากที่ปริมาณ 250-1,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ ไม่เป็นสารก่อกลายพันธุ์ และจากการสังเกตลักษณะการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ สารสกัดในช่วงความเข้มข้นดังกล่าวไม่มีความเป็นพิษ โดยตรงต่อทั้ง *S. typhimurium* strain TA100 ซึ่งมีการกลายพันธุ์แบบ base-pair substitution และ *S. typhimurium* strain TA 98 ที่มีการกลายพันธุ์แบบ frameshift mutation และมีค่า MI ต่ำกว่า 2 ทั้งในสายพันธุ์ TA98 และ TA 100 ในขณะที่สารก่อกลายพันธุ์ทั้งหมดที่ใช้เป็น positive control ให้ค่า MI สูงมากอย่างที่ควรจะเป็น คือ MI มีค่าตั้งแต่ 12.65-66.66 ซึ่งบ่งบอกคุณสมบัติที่เป็นสารก่อกลายพันธุ์ของสารอย่างชัดเจน และสารที่เป็น positive control 2-NF และ sodium azide เป็นสารก่อกลายพันธุ์ได้โดยไม่มี S9 mix ส่วนสาร 2 AA เป็น indirect-mutagen ต้องผ่าน N-oxidation โดย CYP1A2 ใน S9 mix จึงกลายเป็นสารก่อกลายพันธุ์ (Carriere et al., 1992) ซึ่งถูกต้องตรงกับที่เคยมีการรายงานมา (Hemanth kumar and Ramesh, 2014; Mortelmans and Zeiger, 2000) ดังนั้น ผลการทดลองชี้ชัดว่าความเข้มข้นของสารสกัดว่านชันหมากที่ใช้ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์เมื่อทดสอบด้วย Ames test และชี้แนะว่าไม่มีความผิดปกติแต่อย่างใดในขั้นตอนของวิธีการทดสอบ รวมทั้ง *S. typhimurium* strain TA 98 และ *S. typhimurium* strain TA100 ที่ใช้ในการทดลองก็ไม่มีความผิดปกติ ไม่เกิดการกลายพันธุ์แบบธรรมชาติ (spontaneous mutation) ที่ผิดปกติ และมีการกลายพันธุ์อย่างี่ควรจะเป็นกับสารที่ใช้เป็น positive control ซึ่งสามารถยืนยันความถูกต้องของวิธีทดสอบได้

บทที่ 6

สรุป

สรุปผลการวิจัย

1. การสกัดผลอบแห้งว่านขันหมากด้วย 95% ethanol ได้ปริมาณสารสกัดหยาบ ร้อยละ 12.65 ของน้ำหนักแห้ง โดยมีปริมาณสารต่อกรัมสารสกัดแห้งดังนี้ สารประกอบ phenolics เทียบเท่าน้ำหนัก gallic acid 56.73 ± 0.37 mg สารประกอบ flavonoid เทียบเท่าน้ำหนัก catechin 5.03 ± 0.03 mg และสาร proanthocyanidin เทียบเท่าน้ำหนัก catechin 7.02 ± 0.12 mg

2. สารสกัดหยาบว่านขันหมากมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ทั้งภายในและภายนอกเซลล์ เมื่อประเมินความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระภายนอกเซลล์ด้วย DPPH และ FRAP assay ค่า IC_{50} ของสารสกัดในการกำจัด DPPH• เท่ากับ 399.77 ± 15.33 μ g/ml ซึ่งมีประสิทธิภาพต่ำกว่า trolox ประมาณ 100 เท่า และต่ำกว่า quercetin และ catechin ประมาณ 200 เท่า ส่วนศักยภาพในการ reduce ferric เป็น ferrous ของสารใน FRAP assay มีค่าเทียบเท่าน้ำหนัก vitamin C 44.07 ± 0.59 μ g ต่อกรัมสารสกัดแห้ง แม้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระภายนอกเซลล์ของสารสกัดมาอาจไม่สูงนักเมื่อเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานต่าง ๆ แต่สารสกัดสามารถการสร้างอนุมูลอิสระภายในเซลล์ macrophage RAW264.7 ที่ถูกชักนำให้เกิดสภาวะเครียดออกซิเดชันด้วย *t*-BuOOH เมื่อวิเคราะห์โดยใช้ DCFH-DA assay โดยที่ความเข้มข้น 500 μ g/ml ของสารสกัด สามารถลดการสร้าง ROS ได้ประมาณ 64% ในขณะที่ positive control 10 μ M quercetin สามารถลด ROS ได้ประมาณ 48%

3. สารสกัดว่านขันหมากมีฤทธิ์ด้านการอักเสบ *in vitro* ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (0.125-0.500 mg/ml) สารสกัดสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ NO และการแสดงออกของโปรตีน COX-2 ในเซลล์ RAW264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS (1 μ g/ml) ร่วมกับ IFN- γ (25 U/mL) โดยการยับยั้งเป็นปฏิภาคโดยตรงกับความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น กลไกการยับยั้งการ

สังเคราะห์ NO ของสารสกัดว่านขันหมากเกิดผ่านการยับยั้ง iNOS ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ NO ภายใต้สภาวะการชักนำโดยกระบวนการอักเสบหรือเชื้อโรคต่าง ๆ

4. สารสกัดว่านขันหมากมีศักยภาพในการต้านอาการภูมิแพ้ ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (0.125-0.500 mg/ml) สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งของเอนไซม์ β -hexosaminidase ที่หลั่งพร้อมสารก่อภูมิแพ้ของเซลล์ RBL-2H3 เมื่อถูกกระตุ้นด้วย allergen

5. เมื่อทดสอบด้วย Ames assay สารสกัดว่านขันหมากที่ปริมาณ 250, 500 และ 1000 μ g/plate ที่บ่มร่วมกับแบคทีเรีย *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 และ สายพันธุ์ TA100 ในสภาวะทั้งที่มีและไม่มี S9 mix ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่าผลอบแห้งของว่านขันหมากอุดมด้วยสารที่มีฤทธิ์ชีวภาพมากมาย คือสารสกัดขยายอบแห้งจากผลว่านขันหมากมีคุณสมบัติด้านอนุมูลอิสระทั้งภายในและภายนอกเซลล์ ด้านการอักเสบ และด้านภูมิแพ้ด้วยการทดสอบแบบ *in vitro* การศึกษาในงานวิจัยนี้ชี้แนะถึงศักยภาพของผลว่านขันหมากว่าควรค่าต่อการได้รับการพัฒนาและศึกษาต่อยอดงานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ด้านการอักเสบ และฤทธิ์ด้านภูมิแพ้เพิ่มเติม รวมทั้งการศึกษารูปแบบอื่น ๆ ของว่านขันหมากเพิ่มเติม

สำหรับข้อเสนอแนะของงานวิจัยที่สามารถกระทำต่อขอยอดจากโครงการวิจัยนี้มีดังนี้คือ

1. ศึกษาฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระของว่านขันหมากเพิ่มเติมใน *in vivo* โดยใช้โมเดลของสัตว์ทดลอง

2. การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบ นอกจากการยับยั้ง COX-2 แล้ว ควรยืนยันการลดระดับของ prostaglandins และศึกษาผลกระทบของสารสกัดว่านขันหมากต่อ proinflammatory cytokines ต่าง ๆ เช่น IL-1, IL-6 และ TNF เป็นต้น และในการวิจัย ควรศึกษาผลของสารสกัดต่อ COX-1 ร่วมด้วย เนื่องจาก COX-1 เป็น mediator ที่มีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานของสรีรวิทยา ดังนั้นหากสารสกัดว่านขันหมาก ไปลดระดับ COX-1 ย่อมมีผลข้างเคียง เพราะจะกระทบต่อกระบวนการทำงานปกติของร่างกาย ซึ่งคล้ายกับยาแผนปัจจุบันหลายชนิดที่สามารถลดอาการอักเสบโดยลดระดับ

COX-2 แต่ในขณะเดียวกันส่งผลกระทบต่อการทำงานของ COX-1 ด้วย ดังนั้นถ้าสารว่านขันหมาก มีฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะ COX-2 แต่ไม่มีผลต่อ COX-1 สารสกัดว่านขันหมากก็ควรค่าอย่างยิ่งต่อการต่อยอดงานวิจัยและพัฒนาเพื่อเป็นยาต้านอักเสบได้ในอนาคต

3. ในกรณีที่สารสกัดสามารถยับยั้ง COX-2 และไม่มีผลต่อ COX-1 ใน *in vitro* ควรศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดว่านขันหมากในสัตว์ทดลองว่าสามารถต้านการอักเสบได้มากน้อยเพียงใด โมเดลสัตว์ทดลองที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบมีอยู่มากมาย เช่น carrageenan-induced paw edema, acetic acid-induced vascular permeability หรือ arachidonic-acid-induced ear edema เป็นต้น

4. สำหรับงานวิจัยที่เกี่ยวกับกลไกต้านการอักเสบ ควรศึกษากลไกการยับยั้ง iNOS และ COX-2 ในเชิงลึกว่าเกิดผ่านการยับยั้ง transcription factors ที่เกี่ยวข้อง เช่น NF- κ B และ AP-1 หรือไม่ เป็นต้น

5. ควรยืนยันฤทธิ์ต้านภูมิแพ้เพิ่มเติม โดยศึกษาการยับยั้งของสารสกัดต่อการหลั่งสารก่อภูมิแพ้โดยตรง เช่น ระดับของ histamine, leukotrienes เป็นต้น และขยายไปทดสอบฤทธิ์ต้านภูมิแพ้ในสัตว์ทดลอง

6. เนื่องจากการแสดงออกที่มากเกินไป (overexpression) ของ COX-2 เกี่ยวข้องกับพัฒนาการของมะเร็ง และการเกิดมะเร็ง รวมทั้งการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของมะเร็ง (metastatic mutations) (Timothy et al., 2015) สารซึ่งสามารถยับยั้ง COX-2 ได้ จึงมีแนวโน้มที่จะป้องกันการเกิดมะเร็งได้ จึงควรศึกษาฤทธิ์การป้องกันการเกิดมะเร็งของสารสกัดว่านขันหมาก โดยเลือกโมเดลการทดลองที่การชักนำให้เกิดมะเร็งเกี่ยวข้องกับการแสดงออกที่มากเกินไปของ COX-2

7. ยืนยันว่าสารสกัดไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ โดยใช้ *in vivo* model

8. ควรทำการแยกส่วน (fractionate) สารสกัดให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยวิธีทางเคมี เพื่อศึกษาว่ากลุ่มสารใดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และต้านภูมิแพ้ พร้อมทั้งทดลองการสกัดด้วยการใช้ตัวทำละลายอื่นเพิ่มเติม เพื่อปรับปรุงวิธีสกัดสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น และเพิ่มประสิทธิภาพของปริมาณสุทธของการสกัด (recovery yield)

9. ควรเปรียบเทียบสารสกัดจากผลสดของว่านขันหมากว่าจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ ที่ได้ศึกษาในโครงการวิจัยนี้ สูงกว่าผลอบแห้งหรือไม่ เนื่องจากผู้บริโภครายบางส่วนมักนิยมบริโภคผลสดของว่านขันหมาก

10. ควรศึกษาส่วนอื่น ๆ ของว่านขันหมาก เช่น ใบ ลำต้น ราก เพื่อคัดกรองว่าจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพเหมือนส่วนที่เป็นผลหรือไม่ ถึงแม้ในตำราแพทย์แผนไทยจะระบุสรรพคุณเฉพาะผลว่านขันหมากว่าเป็นอายุวัฒนะก็ตาม

11. ควรขยายการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดว่านขันหมากในสกุลอื่นที่มีในประเทศไทยเพิ่มเติม เช่น *Aglaonema tenuipes* Eng เป็นต้น



บรรณานุกรม

- Abramson, J., and Pecht, I. 2007. Regulation of the mast cell response to the type I Fc ϵ receptor. *Immunological Reviews* 217:231-254.
- Abramson, J., Lieht, A., and Pecht, I. 2006. Selective inhibition of the Fc ϵ R I-induced de novo synthesis of mediators by an inhibitory receptor. *EMBO Journal* 25(2): 323-334.
- Abramson, J., Lieht, A., and Pecht, I. 2006. Selective inhibition of the Fc ϵ R1-induced de novo synthesis of mediators by an inhibitory receptor. *European Molecular Biology Organization Journal* 25(2):323-334.
- Aiyegoro, O.A., and Okoh, A.I. 2009. Phytochemical screening and polyphenolic antioxidant activity of aqueous crude leaf extract of *Helichrysum pedunculatum*. *International Journal of Molecular Sciences* 10: 4990-5001.
- Alessandro, W., Shinobu, O., Cicatiello, L., and Esumi, H. 1994. Dual mechanism for the control of inducible-type NO synthase gene expression in macrophages during activation by interferon- γ and bacterial lipopolysaccharide. *Journal of Biological Chemistry* 269(11): 8324-8333.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K., and Hagen, T. M. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceeding of National Academy of Science USA* 90: 7915-7922.
- Ames, B.N., McCann, J., Yamasaki, E. 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-mirosome mutagenicity test. *Mutation Research* 31: 347-364.
- AOAC (1997). Association of Official Analytical Chemists International Official Methods of Analysis. 16th Edition, AOAC, Arlington.
- Aruoma, O. I. 2003. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation Research* 523-524: 9-20.
- Asano, N., Nash, R. J., Molyneux, R. J., and Fleet, G. W. J. 2000. Sugar-mimic glycosidase inhibitors:

natural occurrence, biological activity and prospects for therapeutic application.

Tetrahedron:Asymmetry 11(8): 1645-1680

Atalay, M., and Laaksonen, D. E. 2002. Diabetes, oxidative stress and physical exercise. *Journal of Sports Science and Medicine* 1: 1-14.

Bagchi, D., Bagchi, M., Stohs, S. J., Das, D.K., Ray, S. D., Kuszynski, C.A., Joshi, S.S. and Pruess, H. G. 2000. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology* 148(2-3): 187-197..

Benzie, I.F.F., and Strain, J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239: 70-76.

Berlett, B.S., and Stadtman, E. 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* 272 (33): 20313-20316

Bittar, M., de Souza, M. M., Yunes, R. A., Lento, R., Delle Monache, F. and Cechinel Filho, V. (2000). Antinociceptive activity of I3, II8-binarigenin, a biflavonoid present in plants of the guttiferae. *Planta Medica* 66(01): 84-86.

Block, G., Patterson, B., and Subar, A. 1992. Fruit, vegetables and cancer prevention: A review of the epidemiologic evidence. *Nutrition and Cancer* 18:1-29.

Bourke, E. and Moynagh, P. N. (1999). Antiinflammatory effects of glucocorticoids in brain cells, independent of NF- κ B. *The Journal of Immunology* 163(4): 2113-2119.

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

Byun, J. W., Choo, S.H., Kim, H.H., Kim, Y.J., Hwang, Y.J., and Kim, D.Y. 2008. Evaluation of board sperm viability by MTT reduction assay in Beltsville thawing solution extender. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 21(4): 494-498.

Calixto, J. B., Beirith, A., Ferreira, J., Santos, A. R., Filho, V. C. and Yunes, R. A. (2000). Naturally occurring antinociceptive substances from plants. *Phytotherapy Research* 14(6): 401-418.

- Calixto, J. B., Otuki, M. F. and Santos, A. R. S. (2003). Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor KappaB (NF- κ B). *Planta Medica* 69: 973-983.
- Carriere, V., De Waziers, I., Courtois, Y.A., Leroux, J..P., Beaune, P.H. 1992. Cytochrome P450 induction and mutagenicity of 2-aminoanthracene (2AA) in rat liver and gut. *Mutation Research* 268: 11-12.
- Chan, M. M., Fong, D., Ho, C., and Huang, H. 1997. Inhibition of inducible nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity by epigallocatechin gallate, a natural product from green tea. *Biochemical Pharmacology* 54: 1281-1286.
- Chen, J., Devanand, P. S., Norman, D. J., Henny, R. J. and Chao, C. C. 2004. Genetic relationships of *Aglaonema* species and cultivars inferred from AFLP markers. *Annals of Botany (Lond)*. 93(2):157-166.
- Chen, S., Yang, D., Lin, T, Shaw, F., Liou, C., and Chuang, Y. 2011. Roles of oxidative stress, apoptosis, PGC-1 and mitochondrial biogenesis in cerebral ischemia. *International Journal of Molecular Sciences* 12: 7199-7215.
- Cheong, H., Choi, E. J., Yoo, G. S., Kim, K. M., Ryu, S.Y. and Ho, C. 1998. Desacetylmaticarin, an allergic component from *Taraxacum platycarpum*. *Planta Medica* 64(6):577-578.
- Cheong, R. Glynn,S., Flores-Santana, W., Switzer, C., Ridnour, L., and Wink, D.A. 2010. Nitric oxide and redox inflammation in cancer. *Advances in Molecular Toxicology* 4: 157-182.
- Chevion, M., Berenshtein, E., Stadtman, E.R. 2000. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as marker of damage. *Free Radical Research* 33: S99-108.
- Choi, O.H., Kim, J-H., and Kinet, J.P. 1996. Calcium mobilization via the sphingosine kinase in signaling by the FceRI antigen receptor. *Nature* 380: 634-636.
- Clemons, N.J., Shannon, N.B., Abeyratne, L. R., Walker, C.E., Saadi, A., O'Donovan, M.L., Lao-Sirieix, P., and Fitzgerald, R.C. 2010. Nitric oxide-mediated invasion in Barrett's high-grade dysplasia and adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 31(9):.1669–1675.

- Constanta, S., and Rodica, S. 2010. Analytical study of the determination of flavonoids in Black Sea algae. *Ovidus University Annals of Chemistry* 21(1): 29-34.
- Culotta E and Koshland DE Jr. NO news is good news. *Science* 1992. Dec 18;258(5090):1862-5.
- deRojas-Walker, T., Tamir, S., Ji, H., Wishnok, J. S. and Tannenbaum, S. R. 1995. *Chemical Research in Toxicology* 8:473-477.
- Denizot F, Lang R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods** 89: 271-277.
- Dhanalakshmi, S., Agarwal, R., and Agarwal, C. 2003. Inhibition of NF-kappa B pathway in grape seed extract-induced apoptotic death of human prostate carcinoma DU145 cells. *International Journal of Oncology* 23(3):721-727.
- Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., Rodriguez, H. 2002. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radical Biology and Medicine* 32(11): 1102-1115.
- Duke, J. 2005. Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases. [Online Database] http://sun.ars-grin.gov:8080/npgspub/xsql/duke/pl_act.xsql?taxon=1290.
- Fang, J., Seki, T. and Maeda, H. (2009). Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61(4): 290-302.
- Fernandez, A.P., Pozo-Rodrigalvarez, A., Serrano, J. Martinez-Murillo R. 2010. Nitric oxide: target for therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Current Pharmaceutical Design* 16(25): 2837-2850.
- Fine, A. M., 2000. Oligomeric proanthocyanidin complexes: history, structure, and phytopharmaceutical applications. *Alternative Medicine Review* 5(2): 144-151.
- Fischer, M.J.E., Paulussen, J.J.C., Horbach, D.A., Roelofsen, E.P.W., Miltenburg, J.C., Mol, N.J., and Janssen, L.H.M. 1995. Inhibition of mediator release in RBL-2H3 cells by some H1-antagonist

- derived anti-allergic drugs: Relation to lipophilicity and membrane effects. *Inflammation Research* 44:92-97.
- Ghasemi, A., Hedayatill, M., and Biabani, H. 2007. Protein precipitation methods evaluated for determination of serum nitric oxide end products by the Griess assay. *Journal of Medical Sciences Research* 2: 43-46.
- Ghiselli, A., Serafi ni M., Maiani, G., Azzini, E., and Ferro-Luzzi, A. 1995. A fluorescence-based method fr measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radical Biology and Medicine* 18: 29-36.
- Gow, A.J., Luchsinger, B.P., Pawloski, J.R., Singel, D.J., and Stamler, J.S. 1999. The oxyhemoglobin reaction of nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96:9027-9032.
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J. S., and Tannenbaum, S.R. 1982. Analysis of nitrate, nitrite and (¹⁵N) nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry* 126:131-138.
- Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C., and Gelbart, W.M. 2000. An introduction to genetic analysis, 7th edition. New York: W.H. Freeman.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford.
- Han, Y.S., Kim, M.S. and Hwang, J.K. 2012. Macelignan inhibits histamine release and inflammatory mediator production in activated rat basophilic leukemia mast cells. *Inflammation* 35(5): 1723-1731.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A.R., and Bobilya, D.J. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13: 572-584.
- Hemanth kumar, H. and Ramesh, C. 2014. Antimutagenic activity of root extract of *Picrorhiza kurroa* using Ames test in both dose dependant cytotoxic assay and mugagenicity study. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2 (6): 48-52.
- Holgate, S.T. 1999. The epidemic of allergy and asthma. *Nature* 402: B2-4.

- Hsu, S., Bollag, W.B., Lewis, J., Huang, Q., Singh B., Sharawy, M., Yamamoto, T., and Schuster, G. 2003. Green tea polyphenols induce differentiation and proliferation in epidermal keratinocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 306: 29–34.
- Huang, L., Pi, J., Wu, J., Zhou, H., Cai, J., Li, T., Liu, L. 2016. A rapid and sensitive assay based on particle analysis for celldegranulation detection in basophils and mast cells. *Pharmacological Research* 111:374-383.
- Jacob, G. S. 1995. Glycosylation inhibitors in biology and medicine. *Current Opinion in Structural Biology*. 5(5): 605-611.
- Janeway, C.A. 2005. Immunobiology: The immune system in health and disease. New York: Garland Science.
- Jang, S. I., Kim, Y. J., Lee, W. Y., Kwak, K. C., Baek, S. H., Kwak, G. B., Yun, Y. G., Kwon, T. O., Chung, H. T. and Chai, K. Y. (2005). Scoparone from *Artemisia capillaris* inhibits the release of inflammatory mediators in RAW 264.7 cells upon stimulation cells by interferon-gamma plus LPS. *Archives of Pharmacal Research* 28(2): 203-208.
- Kang, J. S., Jeon, Y. J., Kim, H. M., Han, S. H., and Yang, K. 2002. Inhibition of inducible nitric-oxide synthase expression by silymarin in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 302:138-144
- Karpuzoglu, E. and Ahmed, S. A. (2006). Estrogen regulation of nitric oxide and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in immune cells: Implications for immunity, autoimmune diseases, and apoptosis. *Nitric Oxide* 15(3): 177-186.
- Katsube, T., Tabata, H., Ohta, Y., Yamasaki, Y., Anuurad, E., Shiwaku, K., and Yamane, Y. 2004. Screening for antioxidant activity in edible plant products: Comparison of low-density lipoprotein oxidation assay, DPPH radical scavenging assay, and Folin-Ciocalteu assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 2391-2396.

- Kelm, S. and Schauer, R. 1997. Sialic acids in molecular and cellular interactions. *International Review of Cytology* 175: 137-240.
- Khazan, M., and Hdayati, M. 2015. The role of nitric oxide in health and diseases. *Scimetr* 3(1): e20987.
- Kim, G.N., Kwon, Y.I., Jang, H.D. 2011. Protective mechanism of quercetin and rutin on 2,2' azobis (2-amidinopropane)dihydrochloride or Ca^{+2} -induced oxidative stress in HepG2 cells. *Toxicology in vitro* 25(1):138-144.
- Kim, H. K., Cheon, B. S., Kim, Y. H., Kim, S.Y., and Kim, H. P. 1999. Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships. *Biochemical Pharmacology* 58: 759-765.
- Kinet, J. P. 1999. The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology. *Annual Review of Immunology* 17:931-972.
- Kite, G.C., Sharp, H. J., Hill, P.S., and Boyce, P. C. 1997. Polyhydroxyalkaloids in the Aroid tribes Nephthytideae and Aglaonemateae: Phytochemical support for an intertribal relationship. *Biochemical Systematics and Ecology* 25(8): 757-766.
- Klaassen, C.D. 2008. Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons. 7th ed. McGraw-Hill, New York.
- Kobuchi, H., Kroy-Lefaix, M. T., Christen, Y., and Packer, L. 1997. Ginkgo biloba extract (Egb 761): Inhibitory effect on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW254.7. *Biochemical Pharmacology* 53:897-903..
- Kolb, H., and Kolb-Bachofen, V. 1992. Nitric oxide: A pathogenic factor in autoimmunity. *Immunology Today* 13: 157-160.
- Komutarin, S., Butterworth, A. L., Keil, D., Chitsomboon, B., Suttajit, M., and Meade, B. J. 2004. Extract of the seed coat of *Tamarindus indica* inhibits nitric oxide production by murine macrophages *in vitro* and *in vivo*. *Food and Chemical Toxicology* 42(4):649-658.

- Kumar, S., and Pandey, A.K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Scientific World Journal*: Article ID 162750
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lander, H. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction (1997). *FASEB Journal* 11: 118-124.
- Landis-Piwowar and Lyer, N.R. 2014. Cancer chemoprevention: Current state of the art. *Cancer Growth and Metastasis* 7: 19-25.
- Leiper, J. and Nandi, M. 2011. The therapeutic potential of targeting endogenous inhibitors of nitric oxide synthesis. *Nature Reviews Drug Discovery* 10: 277-291.
- Leiper, J., Nandi, M., Torondel, B., Murray-Rust, J., Malaki, M., O'Hara, B., Rossiter, S., Anthony, S., Madhani, M., Selwood, D., Smith, C., Wojciak-Stothard, B., Rudiger, A., Stidwill, R., McDonald, N.Q., Vallance, P. 2007. Disruption of methylarginine metabolism impairs vascular homeostasis. *Nature Medicine* 13: 198 – 203.
- Li, W., Deanin, G.G., Margolis, B., Schlessinger, J., and Oliver, J.M. 1992. Fc ϵ RI-mediated tyrosine phosphorylation of multiple proteins, including phospholipase C- γ 1 and the receptor W1Y2 complex, in RBL-2H3 rat basophilic leukemia cells. *Molecular and Cellular Biology* 12(7): 3176-3182.
- Liang, Y.-C., Huang, Y.-T., Tsai, S.-H., Lin-Shiau, S.-Y., Chen, C.-F. and Lin, J.-K. (1999). Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis* 20(10): 1945-1952.
- Liu, M., Li, X.Q., Weber, C., Lee, C.Y., Brown, J., and Liu, R.H. 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(10): 2926-2930.

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193(1): 265-275.
- Maioli, E., Torricelli, C., and Pacini, A. 2009. Critical appraisal of the MTT assay in the presence of rottlerin and uncouplers. *Biological Procedures* 11: 227-240.
- Malinski, T. 2000. The Vital Role of Nitric Oxide. *The Oakland University Journal*: 47-57
(https://www2.oakland.edu/oujournal/files/1_Malinski.pdf)
- Manthey, J.A., McCoy, D. L., and Crowley, D. E. (1994). Stimulation of rhizosphere iron reduction and uptake in response to iron deficiency in citrus rootstocks. *Plant Physiology and Biochemistry* 32: 211-215.
- Mariod, A.A., Matthä us, B., Hussein, I.H. 2008. Antioxidant properties of methanolic extracts from different parts of *Sclerocarya birrea*. *International Journal of Food Science and Technology* 43: 921-926.
- Maron, D.M., and Ames, B.N. 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research* 113: 173-215
- Martin, A., and Claynes, M. 1993. Comparison of 5 microplate colorimetric assays for in vitro cytotoxicity testing and cell proliferation assays. *Cytotechnology* 11: 49-58.
- Martin, O. R., Compain, P., Kizu, H. and Asano, N. 1999. Revised structure of α - homojojirimycin isomer from *Aglaonema treubii*: First example of a naturally occurring α -homoallonojirimycin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 9(21):3171-3174.
- Mastuda, H., Morikawa, T., Kazuho, U., Hiromi, M., and Masayuki, Y. 2002. Structural requirements of flavonoids for inhibition of antigen-induced degranulation, TNF- α and IL-4 production from RBL-2H3 cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 10:3123-3128.
- Matés, J. M., and Sánchez-Jiménez, F. 1999. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Frontier in Bioscience* 4: d339-345.

Medical Research Council, 2014. Nitric oxide as a signaling molecule.

(<https://www.mrc.ac.uk/documents/pdf/nitric-oxide>)

Mineo, M., Nakamura, N., Kitajima, K., Ueda, M., Tsutsishita, Y., Futakis, S and Takaishi, Y. 1997.

Benzoquinones inhibit the expression of inducible nitric oxide synthase gene. *Biochemical Biophysical Research Communication* 239: 367-371.

Monthakantirat, O., De-Eknamkul, W., Umehara, K., Yoshinaga, Y., Miyase, T., Warashina, T., and

Noguchi, H. 2005. Phenolic constituents of the rhizomes of the Thai medicinal plant *Belamcanda chinensis* with proliferative activity for two breast cancer cell lines. *Journal of Natural Products* 68(3):361-364.

Morgan, L., and Dabco, D.C. 2000. Nitric oxide: A challenge to chiropractic. *Journal of the Canadian Chiropractic Association* 44(1):40-48.

Mortelmans, K., and Zeiger, E. 2000. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research* 455:29-60.

Mosmon, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63.

Nahrevanian, H. 2009. Involvement of nitric oxide and its up/down stream molecules in the immunity against parasitic infections. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 13(6): 440-448.

Nathan, C. and Xie, Q. 1994. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry* 269(19):13725-13728.

Nojima, H., Kimura, I., Chen, F. J., Sugihara, Y., Haruno, M., Kato, A., and Asano, N. 1998.

antihyperglycemic effects of N-containing sugars from *Xanthocercis zambesiaca*, *Morus bombycis*, *Aglanoema treubii*, and *Castanospermum australe* in streptozotocin-diabetic mice. *Journal of Natural Products* 61(3): 397-400.

Park, Y. C., Rimbach, G., Saliou, C., Valacchi, G., and Packer, L. 2000. Activity of monomeric, dimeric, and trimeric flavonoids on NO production, TNF- α secretion, and NF- κ B –dependent gene expression in

- RAW 264.7 macrophages *FEBS Letter* 465: 93-97.
- Pecht, I., and Corcia, A. 1987. Stimulus-secretion coupling mechanisms in mast cells. *Biophysical Chemistry* 26(2-3): 291-301.
- Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Tabernero, M., Diaz-Rubio, M.E., Serano, J., Goñi, I., and Saura-Calixto, F. 2008. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results. *Food Research International* 41: 274-285.
- Pham-Huy, I. a., he, h., pham-huy, c. 2008. free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science* 4(2): 89-96.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., and Periyasamy, L. 2015. Free radicals: Properties, sources, targets and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 30(1): 11-26.
- Plumb, J. A., Milroy, R., and Kkaye, S. B. 1989. Effects of the pH dependence of 3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide-formazan absorption on chemo-sensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. *Cancer Research* 49: 4435-4440.
- Powers, S.K. and Jackson, M. J. 2008. Exercise-induced oxidative stress: Cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological Reviews* 88 (4): 1243-1276.
- Prychid, C.J., and Rudall, P. J. 1999. Calcium oxalate crystals in monocotyledons: A review of their structure and systematics. *Annals of Botany* 84: 725-739.
- Ramesh, M., Nageshwar Rao, Y., Appa Rao, A. V. N., Prabhakar, M. C., Seshagiri Rao, C., Muralidhar, N. and Madahava Reddy, B. (1998). Antinociceptive and anti-inflammatory activity of a flavonoid isolated from *Caralluma attenuata*. *Journal of Ethnopharmacology* 62(1): 63-66.
- Raso, G. M., Meli, R., Carlo, G.D., Pacilio, M., and Carlo, R.D. 2001. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. *Life Science* 68: 921-931.
- Ray, S. D., Kumar, M. A. and Bagchi, D. 1999. A novel proanthocyanidin IH636 grape seed extract

- increases in vivo Bcl-XL expression and prevents acetaminophen-induced programmed and unprogrammed cell death in mouse liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 369(1): 42-58.
- Robbin, R. A., and Sisson, J. H. 1996. Nitric oxide. In: Immunopharmacology of allergic disease. R. G. Townley, and D. K. Agrawal (eds.). pp. 415-431. New York: Marcel Dekker.
- Romitelli, F., Santini, S. A., Chierici, E., Pitocco, D., Tavazzi, B., Amorini, A. M., Lazzarino, G., and Stasio, E.D. 2077. Comparison of nitrite/nitrate concentration in human plasma and serum samples measured by the enzymatic batch Griess assay, ion-pairing HPLC and ion-trap GC-MS: The importance of a correct removal of proteins in the Griess assay. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 851 (1-2): 257-267.
- Ryu, J., Aus, H., Lee, H., Feng, L., Qun, W., Han, Y., and Han, B. 2001. Inhibitory activity of Chinese medicinal plants on nitric oxide synthesis in lipopolysaccharide-activated macrophages. *The journal of Applied Pharmacology* 9: 183-187.
- Saadi, S.M.A.I., and Mondal, A.K. 2012. Distribution of calcium oxalate crystal containing idioblasts in the leaves of *Aglaonema commutatum* Schott. *International Journal of Science and Nature* 3(2): 286-292.
- Sakata, K., Hirose, Y., Qiao, Z., Tanaka, T., and Mori, H. 2003. Inhibition of inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase by flavonoid hesperidin in mouse macrophage cell line. *Cancer Letters* 199: 139-145.
- Sandoval, M., Zhang, X., Liu, X., Mannick, E. E., Clark, D. A. and Miller, M. J. S. 1997. Peroxynitrite-induced apoptosis in T84 and RAW 264.7 cells : Attenuation by L-ascorbic acid. *Free Radical Biology and Medicine* 22(3): 489-495.
- Sathisha, A.D., Lingaraju, H. B., Prasad, S. 2011. Evaluation of antioxidant activity of medicinal plant extracts produced for commercial purpose. *E-Journal of Chemistry* 8(2): 882-886.
- Serra, A. T., Duarte, R., O., Bronze, M.R. and Duarte, C.M.M. 2011. Identification of bioactive response in traditional cherries from Portugal. *Food Chemistry* 125: 318-325.

- Shafiee, M., Carbonneau, M.A., Urban, N., Descomps, B., Legar, C.L. 2003. Grape and grape seed extract capacities at protection LDL against oxidation generated by Cu^{+2} , AAPH or SIN-1 and at decreasing superoxide THP-1 cell production. A comparison to other extracts or compounds. *Free Radical Research* 37(5):573-584.
- Sharma, J. N., Al-Omran, A., and Parvathy, S.S. 2007. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology* 15: 252-259.
- Shi, Y-X., Xu, Y-K., Hu, H-B., Na, Z., and Wang, W-H. 2011. Preliminary assessment of antioxidant activity of young edible leaves of seven Ficus species in the ethnic diet in Xishuangbanna, Southwest China. *Food Chemistry* 128: 889-894.
- Shigenaga, M. K., Hagen, T. M., and Ames, B. N. 1994. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proceeding of National Academy of Science USA* 91:10771-10778.
- Shukla, R. 2007. Nitric oxide in neurodegeneration. *Annals of Neurosciences* 14 (1): 13-20.
- Shukla, S., Mehta, A., Mehta, P., and Bajpai, V.K. 2012. Antioxidant ability and total phenolic content of aqueous leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. *Experimental and Toxicologic Pathology* 64: 807-811.
- Siervo, M. and Bluck L.J. 2012. In vivo nitric oxide synthesis, insulin sensitivity and asymmetric dimethylarginine in obese subjects without and with metabolic syndrome. *Metabolism: Clinical and Experimental* 61(5): 680-688.
- Siervo, M., Jackson, S.J., and Bluck, L. J.2011. In-vivo nitric oxide synthesis is reduced in obese patients with metabolic syndrome: application of a novel stable isotopic method. *Journal Hypertension* 29(8): 1515-1527.
- Siervo, M., Tomatis, V., Stephan, B.C.M., Feelisch, M and Bluck, L.J.C. 2012. VEGF is indirectly associated with NO production and acutely increases in response to hyperglycaemia. *European Journal of Clinical Investigation* 42 (9): 967-973.

- Singleton, V. L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299: 152-178.
- Su, B. N., Pawlus, A. D., Jung, H. A., Keller, W. J., McLaughlin, J. L., and Kinghorn, A.D. 2005. Chemical constituents of the fruits of *Morinda citrifolia* (Noni) and their antioxidant activity. *Journal of Natural Products* 68(4):592-595.
- Subapriya, R., and Nagini, S. 2005. Medicinal properties of neem leaves: a review. *Current Medicinal Chemistry: Anti-Cancer Agents* 5(2):149-156.
- Subbaramaiah, K. and Dannenberg, A. J. (2003). Cyclooxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatment. *Trends in Pharmacological Sciences* 24(2): 96-102.
- Sun, B., Ricardo da Silva, J. and Spranger, I. 1998. Critical factors in the vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 4267-4274.
- Surh, Y. 2003. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Review* 3(10):768-780.
- Surh, Y.-J., Chun, K.-S., Cha, H.-H., Han, S. S., Keum, Y.-S., Park, K.-K. and Lee, S. S. (2001). Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 480: 243-268.
- Tennant, R.W. 2014. Mutagens and Carcinogens. *AccessScience* (McGraw-Hill Education) <https://doi.org/10.1036/1097-8542.441100>.
- Theoharides, T.C., Alysandratos, K. D., Angelidou, A., Delivanis, D.A., Sismanopoulos, N., Zhang, B., Asadi, S., Vasiadi, M., Weng, Z., Miniati, A., and Kalogeromitros, D. 2012. Mast cell and inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1822(1): 21-33.
- Timothy, A., Giridhar, M.N.V., Ghazaleh Shoja, E.R. 2015. COX-2 inhibitors and their role in cancer prevention and treatment. *Jacobs Journal of Cancer Science and Research* 1(3):016.

- Ullah, A., Khan, A., and Khan, I. 2016. Diabetes mellitus and oxidative stress: A concise review. *Saudi Pharmaceutical Journal* 24: 547-553.
- Wang, P., Henning, S.M., and Heber, D. 2010. Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. *PLoS One* 5: e10202.
- Wang, R.F., Xie, W.D., Zhang, Z., Xing, D.M., Ding, Y., Wang, W., Ma, C., and Du, L.J. 2004. Bioactive compounds from the seeds of *Punica granatum* (pomegranate). *Journal of Natural Products* 67(12):2096.
- Winchester, B. and Fleet, G. W. J. 1992. Amino-sugar glycosidase inhibitors: versatile tools for glycobiochemists. *Glycobiology* 2:199-210.
- Wolfe, K.L., and Liu, R.H. 2007. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(22): 8896-8907.
- Xu, W.M., and Liu, L.Z. 1998. Nitric oxide: from a mysterious labile factor to the molecule of the nobel prize. Recent progress in nitric oxide research. *Cell Research* 8:251-258.
- Yen, G.C., Chiang, H.C., Wu, C.H. and Yeh, C.T. (2003). The protective effects of *Aspergillus candida* metabolites against hydrogen peroxide-induced oxidative damage to Int 407 cells. *Food Chemical Toxicology* 41(11): 1561-1567.
- Yun, S., Kang, M., Park, J., and Nam, S. 2010. Comparison of anti-allergic activities of various polyphenols in cell assays. *Applied Biological Chemistry* 53: 139-146.
- เต็ม สมิตินันท์. 2544. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. สำนักวิชาการป่าไม้: กรมป่าไม้.
- ทิชววัฒน์ นาพิรุณ ดวงใจ สุขเฉลิม สรัญญา วัชรโรทัย ทศเนศวร์ เพชรคง 2556. อนุกรมวิธานและพฤกษเคมีของพืชบุกบอนบนดินในอุทยานแห่งชาติไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี วารสารวนศาสตร์ (ฉบับพิเศษ) 32: 71-74
- ฝ่ายสารนิเทศพิเศษ สำนักวิทยบริการ สถาบันราชภัฏ 2004. ฐานข้อมูล ยาและสมุนไพรพื้นบ้าน [ออนไลน์] ได้จาก <http://203.170.173.156/rLocal/stories.php?topic=4>
- พิทักษ์ แสงเนียม 2558 [ออนไลน์] ได้จาก <http://prangpitak.blogspot.com>

วิทย์ เทียงบูรณธรรม 2542. พรหมดินสูง ใน พจนานุกรมสมุนไพรไทย หน้า 531-532. รวมสาราน:

กรุงเทพ ฯ

วีรพล คู่คงวิริยพันธุ์. 2548. บทบาทสารเคมีด้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติและการป้องกันมะเร็ง. เอกสาร
ประกอบการประชุมวิชาการเรื่อง Impact of environmental toxins and oxidative stress on human health.
(หน้า 1-6) พิษณุโลก:บัณฑิตวิทยาลัย และคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์มหาวิทยาลัยนเรศวร.

สวนพฤกษศาสตร์ โรงเรียนอุดมศึกษา 2548. ว่าน ไม้ประดับนามมงคล. [ออนไลน์] ได้จาก

<http://www.udomsuksa.ac.th/Latphrao/botanic24.asp>.

สหพัฒน์ บัณฑิตวิทยาลัย 2548 จากอนุมูลอิสระสู่อะพอพโตโทซิส. คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

อภิญา สันยาสิ. 2548. ว่านชั้นหมาก อัจฉริยะเฟื่องพานพบ. [ออนไลน์] ได้จาก

<http://www.mahamdo.com/job/apinya/index.asp>.

อานนท์ แก้วมัน 2559 [ออนไลน์] ได้จาก http://keomanarnon.blogspot.com/2012/08blog-post_7.html

อุดมกัณฑ์ ขาลสุวรรณ. 2548. ประโยชน์ด้านสุขภาพของสารโพลีฟีนอลในชา. เอกสารประกอบการประชุม
เรื่องบทบาทสารต้านออกซิเดชันในด้านสุขภาพและโรคต่าง ๆ. หน้า 16-17. ขอนแก่น: คณะ
แพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

1. Folin-Ciocalteu micro method

Gallic acid stock solution

Gallic acid 0.500 g

Ethanol 10 mL

เจือจางความเข้มข้นตามต้องการด้วยน้ำ (เก็บที่ 4° C)

Sodium carbonate solution

Anhydrous sodium carbonate 200 g

DI water 800 mL

นำไปต้ม ที่อุณหภูมิร้อน เดิมผลึกของ sodium carbonate

ลงไปเล็กน้อย ที่อุณหภูมิเป็นเวลา 24 ชม. นำไปกรองและเติม DI water

จนมีปริมาตร 1 L (เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง)

2. Aluminium chloride colorimetric method

5% sodium nitrite

Sodium nitrite 5 g

Distilled water 100 ml

10% aluminium chloride

Aluminium chloride 10 g

Distilled water 100 ml

3. Vanillin assay

4% vanillin-methanol

Vanillic acid 4 g

Methanol 100 ml

4% HCl-methanol

HCl	4	ml
Methanol	96	ml

4. DPPH assay**Stock DPPH solution (1 mM)**

DPPH	0.0985	g
Methanol	250	mL
(กรอง และเก็บไว้ใน freezer)		

Working DPPH (0.2 mM)

Stock DPPH solution (1 mM)	10	mL
Methanol	40	mL

5. FRAP assay**Acetate buffer (300 mM, pH 3.6)**

Sodium acetate.3H ₂ O	3.1	g
Glacial acetic acid	16	mL
เติม DI water ไปจนกระทั่งมีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 L (เก็บไว้ที่ 4° C)		

HCl: 40 mM

Conc. HCl (1 M)	1.46	mL
เติม DI water ไปจนกระทั่งมีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 L (เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง)		

TPTZ (10 mM)

TPTZ	0.062	g
HCl (40 mM)	20	mL
(เตรียมทุกครั้งก่อนทำการทดลอง)		

Ferric chloride (20 mM)

FeCl ₃ .6H ₂ O	0.108	g
DI water	20	mL

(เตรียมทุกครั้งก่อนทำการทดลอง)

Working FRAP reagent

Acetate buffer (300 mM, pH 3.6)	200	mL
TPTZ (10 mM)	20	mL
Ferric chloride (20 mM)	20	mL
DI water	24	mL

(เตรียมทุกครั้งก่อนทำการทดลอง)

6. Nitrite assay**Griess reagent**

Phosphoric acid	3.5	mL
Sulfanilamide	1	g
N-(1-naphthyl)-ethylenediamine (NED)	0.1	g

เติม DI water ไปจนกระทั่งมีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 mL
(กรอง และเก็บไว้ที่ 4° C)

7. Western blot**RIPA buffer**

PBS 1X	100	mL
NP-40	1	mL
SDS	0.1	g

(เก็บไว้ที่ 4° C)

Lysis buffer

RIPA buffer	1	mL
PMSF (200 mM)	10	μL
Leupeptin (2 mM)	1	μL

E-64 (1 mM)	1	μL
(เตรียมทุกครั้งก่อนทำการทดลอง)		

6X Sample Buffer

Tris-base	0.59	g
DI water	8.5	mL
SDS	1.5	g
2ME	0.6	mL
Glycerol	7.5	mL
Bromophenol blue	7.5	mg
(เก็บไว้ที่ 4° C)		

10% SDS-polyacrylamide gel

SDS	10	g
DI water	100	mL
(เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง)		

10% AP solution

Ammonium persulfate	0.1	g
DI water	1	mL
(เตรียมทุกครั้งก่อนทำการทดลอง)		

30% acrylamide

Acrylamide	30	g
bis- acrylamide	0.8	g
DI water	100	mL
(กรอง และเก็บไว้ที่ 4° C)		

1.5 M Tris Cl, pH 8.8

Tris-base	18.165	g
DI water	80	mL
ปรับด้วยกรด HCL ไปที่ pH 8.8 จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้าย		

ด้วย DI water ไปที่ 100 mL (กรอง และเก็บไว้ที่ 4° C)

5 M TrisCl, pH 6.8

Tris-base	6	g
DI water	80	mL
ปรับด้วยกรด HCL ไปที่ pH 6.8 จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้าย		
ด้วย DI water ไปที่ 100 mL (กรอง และเก็บไว้ที่ 4° C)		

Running buffer (10 X)

Tris-base	30	g
Glycine	14.4	g
SDS	10	g
ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย DI water ไปที่ 1 L		
(กรอง และเก็บไว้ที่ 4° C)		

Running buffer (1X)

Running buffer (10 X)	100	mL
DI water	900	mL
กรอง (เก็บไว้ที่ 4° C)		

Blotting buffer (1X)

Tris-base	3.03	g
Glycine	14.4	g
Methanol	200	mL
ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย DI water ไปที่ 1 L (กรอง และเก็บไว้ที่ 4° C)		

TPBS 0.1% Tween 20

PBS 1X	1,000	mL
Tween 20	1	mL
กรอง (เก็บไว้ที่ 4° C)		

5% skim milk

Skim milk	0.75	g
-----------	------	---

TPBS 0.1% Tween 20	15	mL
(เตรียมทุกครั้งก่อนการทดลอง)		

Coomassie stain solution

Coomassie blue	0.05	g
Methanol	80	mL
Glacial acetic acid	14	mL
ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย DI water ไปที่ 100 mL		
(เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง)		

Destaining solution

Methanol	5	mL
Glacial acetic acid	7	mL
ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย DI water ไปที่ 100 mL		
(เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง)		

10% Resolving gel (12.05 mL สำหรับ 2 gel)

30% acrylamide	3.984	mL
1.5 M Tris/SDS pH 8.8	2.988	mL
DI water	4.98	mL
10% AP	84	μ L
TEMED	15	μ L
(เตรียมทุกครั้งก่อนการทดลอง)		

Stacking gel (4.99 mL สำหรับ 2 gel)

30% acrylamide	0.65	mL
0.5 M Tris/SDS pH 6.8	1.25	mL
DI water	3.05	mL
10% AP	34	μ L
TEMED	5	μ L

(เตรียมทุกครั้งก่อนการทดลอง)

Lowry reagent

Reagent A (2% Na_2CO_3 in 0.1 N NaOH)

Na_2CO_3	5	g
NaOH (0.1 N)	250	mL
(เก็บไว้ที่ 4° C)		

Reagent B (0.5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ in 1% sodium citrate)

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.05	g
Sodium citrate	0.1	g
DI water	10	mL

Reagent C (1 N Folin phenol reagent)

2 N Folin phenol reagent เจือจางด้วย DI water (1:1, v/v)
(เตรียมทุกครั้งก่อนการทดลอง)

Reagent D

Reagent A : Reagent B (50 : 1)
(เตรียมทุกครั้งก่อนการทดลอง)

Primary antibodies iNOS หรือ COX-2 (1:500)

Primary antibodies (iNOS or COX-2) (200 μg / mL)	20	μL
Skim milk	0.1	g
TPBS	10	mL
(เตรียมทุกครั้งก่อนการทดลอง)		

Secondary antibody HRP-conjugated rabbit-anti-mouse-IgG (1:10,000)

Secondary antibody HRP (200 μg / 0.5 mL)	1	μL
Skim milk	0.1	g
TPBS	10	mL
(เตรียมทุกครั้งก่อนการทดลอง)		

Tubulin antibody (1:1,000)

Tubulin antibody (200 μg / mL)	10	μL
---	----	---------------

Skim milk	0.1	g
TPBS	10	mL
(เตรียมทุกครั้งก่อนการทดลอง)		

8. β -hexosaminidase assay

PIPES buffer 1X 100 ml

NaCl (119 mM)	6.954	g
KCl (5mM)	0.373	g
Glucose (5.6 mM)	1.008	g
MgCl ₂ .6H ₂ O (0.4 mM)	0.081	g
PIPES (25 mM)	7.560	g
NaOH (40 mM)	0.160	g
CaCl ₂ (anhydrous) (1 mM)	0.011	g
BSA (0.1% W/V)	0.100	g
ปรับด้วยน้ำเป็น	100	ml

Anti-DNP IgE (50 ng/ml) 50 ml

Anti-DNP IgE	2.5	μ l
MEM complete media	50	ml
(เตรียมสดก่อนการทดลอง)		

DNP-BSA 100 ml

DNP-BSA	0.010	g
PBS	100	ml

0.1 M citrate buffer pH 4.5, 50 ml

Citric acid (monohydrate)	1.05	g
Sodium citrate (dihydrate)	1.47	g
Adjusted pH to 4.5 and final volume to 50 ml		

1mM p-NAG (substrate) 50 ml

p-NAG	0.0173	g
citrate buffer	50	ml

0.1 M Na₂CO₃/NaHCO₃ (stop solution) pH 10.0, 100 ml

Na ₂ CO ₃ (119 mM)	1.06	g
NaHCO ₃	0.84	g
ปรับ pH เป็น 10		

9. Ames test**Vogel-Bonner medium E stock salt solution (VB salt)**

MgSO ₄ ·7H ₂ O	10	g
C ₆ H ₁₀ O ₈	100	g
K ₂ HPO ₄	500	g
NaNH ₄ HPO ₄ ·4H ₂ O	175	g

ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 ml ด้วย DI water และ autoclave 20 นาทีที่ 121 °C.

40% glucose

C ₆ H ₁₂ O ₆	40	g
---	----	---

ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ml ด้วย DI water และ autoclave 20 นาทีที่ 121 °C.

Minimal glucose agar plate

Bacto agar	5.25	g
VB salt	7	ml
40% glucose	17.5	ml

นำ Bacto agar 5.25 g เติม 350 ml ด้วย DI water และ autoclave 20 นาทีที่อุณหภูมิ 121 °C แล้ว หลัง autoclave เติม 7 ml sterile VB salts และ 17.5 ml sterile 40% สารละลาย glucose ผสมให้เข้ากัน เท agar medium ที่เตรียมไว้ใส่ 100 mm petri dishes

Oxid nutrient broth no.2

Nutrient broth no.2	2.5	ml
---------------------	-----	----

ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ml ด้วย DI water แบ่งสารละลายใส่หลอดละ 12 ml ก่อน autoclave 20 นาที ที่อุณหภูมิ 121 °C.

0.1 M L-histidine HCl stock

L-histidine HCl	2.096	g
-----------------	-------	---

ปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วย DI water และ autoclave 20 min ที่อุณหภูมิ 121 °C

1 mM L-histidine HCl

0.1 M L-histidine HCl 1 ml
 ปรับปริมาณเป็น 100 ml ด้วย DI water และ autoclave 20 min ที่อุณหภูมิ 121 °C

1 mM biotin stock

0.1 M L-histidine HCl 0.024 g
 ปรับปริมาณเป็น 100 ml ด้วย DI water และ autoclave 20 min ที่อุณหภูมิ 121 °C

0.5 mM L-histidine HCl-0.5 mM biotin

1 mM L-histidine HCl 100 ml
 1 mM biotin stock 100 ml

Top agar

Agar 0.6 g
 NaCl 0.5 g

ปรับปริมาณเป็น 100 ml ด้วย DI water และ autoclave 20 นาทีที่อุณหภูมิ 121 °C
 หลังจากนั้นเติม 0.5 mM L-histidine HCl-0.5 mM biotin และเขย่าจนเข้ากัน

0.2 M NaH₂PO₄

NaH₂PO₄·2H₂O 14.2 g
 ปรับปริมาณเป็น 500 ml ด้วย DI water

0.2 M Na₂HPO₄

Na₂HPO₄·2H₂O 13.8 g
 ปรับปริมาณเป็น 500 ml ด้วย DI water

0.2 M NaPO₄, pH 7.4 (Use: for S9 mutagenic assay)

0.2 M NaH₂PO₄ 60 ml
 0.2 M Na₂HPO₄ 440 ml

ผสมสารละลายทั้งสองให้เข้ากัน ปรับ pH เป็น 7.4 ด้วย 0.1 M NaH₂PO₄ หลังจากนั้น autoclave สารละลายเป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิ 121 °C

1 M KCl

KCl 7.5 g
 ปรับปริมาณเป็น 100 ml ด้วย DI water และ autoclave 20 นาทีที่อุณหภูมิ 121 °C

NaPO₄-KCl buffer

0.5 M NaPO ₄ , pH 7.4	100	ml
----------------------------------	-----	----

1 M KCl	16.5	ml
---------	------	----

ปรับปริมาตรเป็น 330 ml ด้วย DI water และ autoclave 20 นาทีที่อุณหภูมิ 121 °C

MgCl₂-KCl salts (Use: for S9 mutagenic assay)

MgCl ₂ .6H ₂ O	61.5	g
--------------------------------------	------	---

KCl	40.7	g
-----	------	---

ปรับปริมาตรเป็น 500 ml ด้วย DI water และ autoclave 20 นาทีที่อุณหภูมิ 121 °C

1 M glucose-6-phosphate (Use: for S9 mutagenic assay)

Glucose-6-phosphate	2.82	g
---------------------	------	---

Distilled water	10	ml
-----------------	----	----

0.1 Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) (Use: for S9 mutagenic assay)

NADP	0.383	g
------	-------	---

Distilled water	5	ml
-----------------	---	----

Co-factors for standard S-9 mix, total volume 50 ml (Use: to provide the NADH regenerating system)

S9 (4%)	2	ml
---------	---	----

MgCl ₂ -KCl salts	1	ml
------------------------------	---	----

1 M glucose-6-phosphate	0.25	ml
-------------------------	------	----

0.1 NADP	2	ml
----------	---	----

0.2 M NaPO ₄ , pH 7.4	25	ml
----------------------------------	----	----

Distilled water	19.75	ml
-----------------	-------	----

(เตรียมสารละลายสดทุกครั้งก่อนการทดลองและเก็บที่ 4°C).

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีสำหรับการเลี้ยงเซลล์

1. สารเคมีสำหรับการเลี้ยงเซลล์

FBS/FCS (inactivated, Hyclone)

ละลาย FBS ที่แช่แข็งใน -20°C ด้วยการนำไปแช่ใน breaker ที่เปิดน้ำไหลผ่าน

วางขวด serum ไว้ใน water bath ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ 37°C

สังเกตให้ละลายเป็นของเหลวจนเป็นเนื้อเดียวกัน

Heat inactivate ที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 20 นาที

เขย่าเบา ๆ โดยการหมุนเป็นวงกลมในน้ำทุก 5-10 นาที

Aliquot ใน 50 mL conical tube (เก็บไว้ที่ -20°C)

RPMI 1640 1X

RPMI-1640 1X ด้วย L-glutamine และ phenol red 1 ชอง

NaHCO_3 2 g

ปรับปริมาตรด้วย MQ water ไปที่ 1000 mL

ปรับ pH ไปที่ 7.4 ตามด้วยการกรอง และเก็บไว้ที่ 4°C

RPMI 1640 1X (complete media)

FBS (inactivated, Hyclone) 20 mL

HEPES buffer 1 M 3.75 mL

Penicillin+Streptomycin (100 X) 2 mL

RPMI-1640 1X ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 200 mL

(เก็บไว้ที่ 4°C)

PBS 10X

KH_2PO_4 0.288 g

NaCl	18	g
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	1.5	g
MQ.water	200	mL
(Autoclave ที่ 121°C, 15 นาที, และเก็บไว้ที่ 4°C)		

PBS 1X

PBS 10X	20	mL
MQ.water	180	mL
(เก็บไว้ที่ 4°C)		

Hepes buffer (1M)

Hepes	23.83	g
MQ.water	100	mL
(เก็บไว้ที่ 4°C)		

Penicillin/Streptomycin (100X)

Penicillin	0.6	g
Streptomycin	1.34	g
PBS 1X	100	mL
(Aliquot และเก็บไว้ที่ -20°C)		

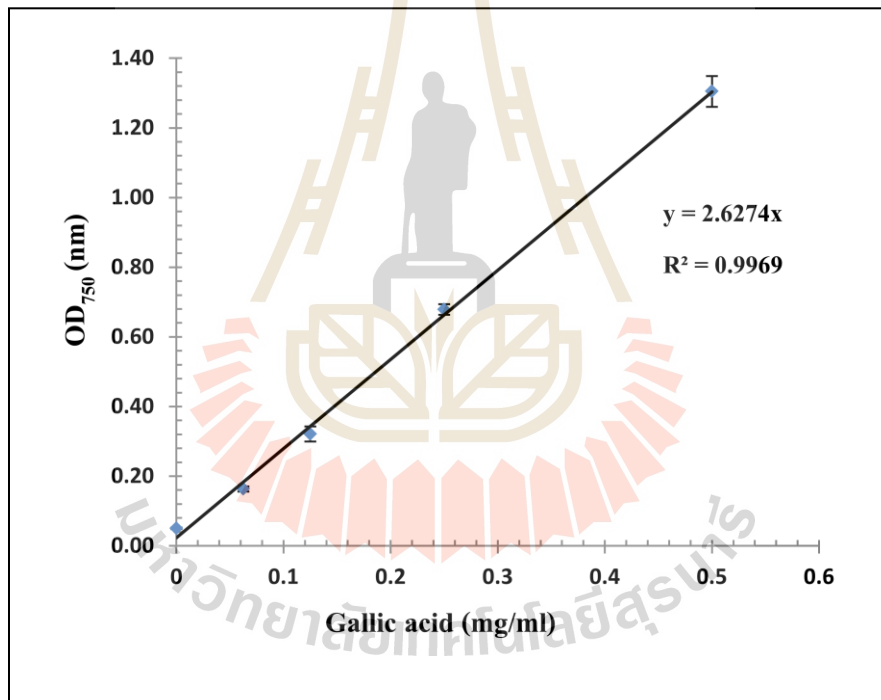
Trysin/EDTA

Trysin	0.25	g
EDTA	0.04	g
PBS 1X	100	mL
(Aliquot และเก็บไว้ที่ -20°C)		

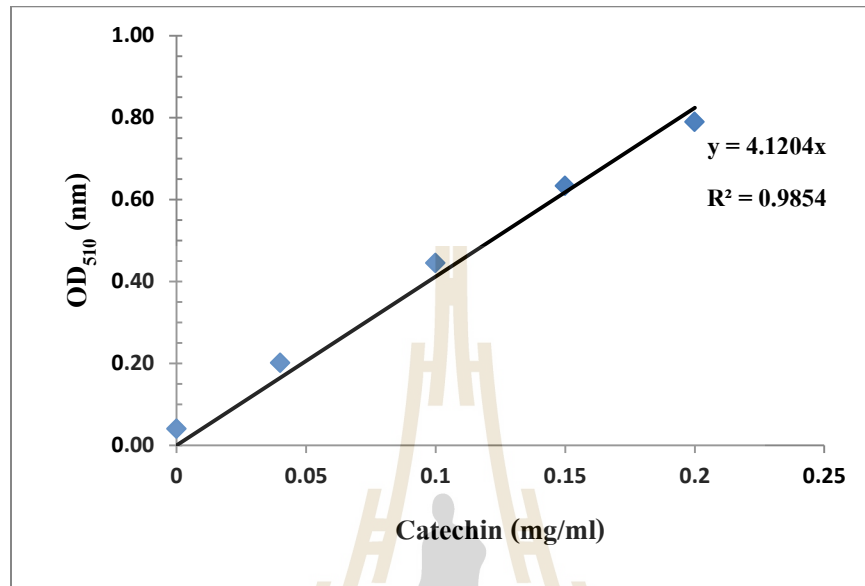
ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐานของการหาสารพฤกษเคมีและ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบว่านชั้นหยาบ

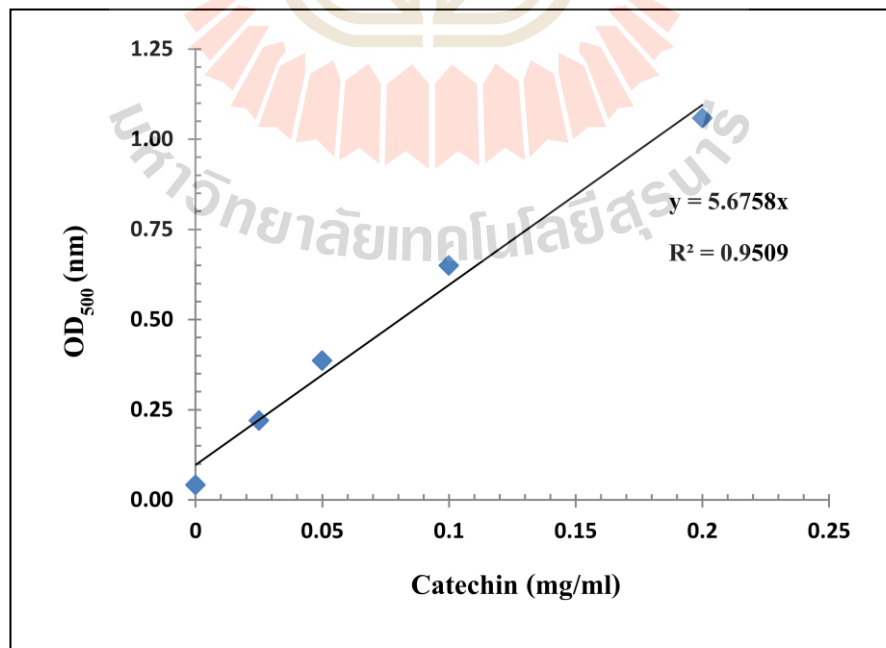
1. กราฟมาตรฐานของ gallic acid ในการวิเคราะห์หา total phenolic content



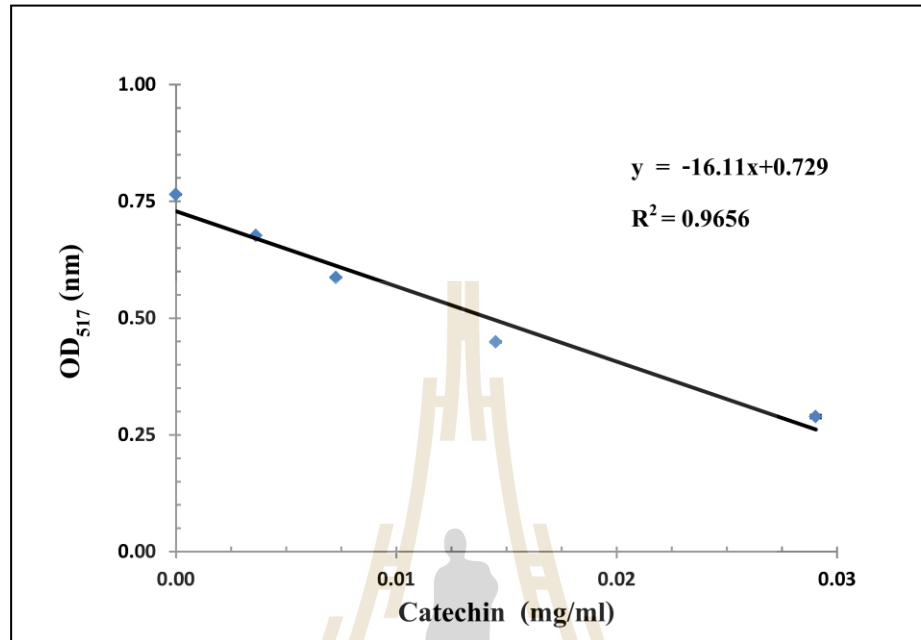
2. กราฟมาตรฐานของ catechin ในการวิเคราะห์ปริมาณ total flavonoids



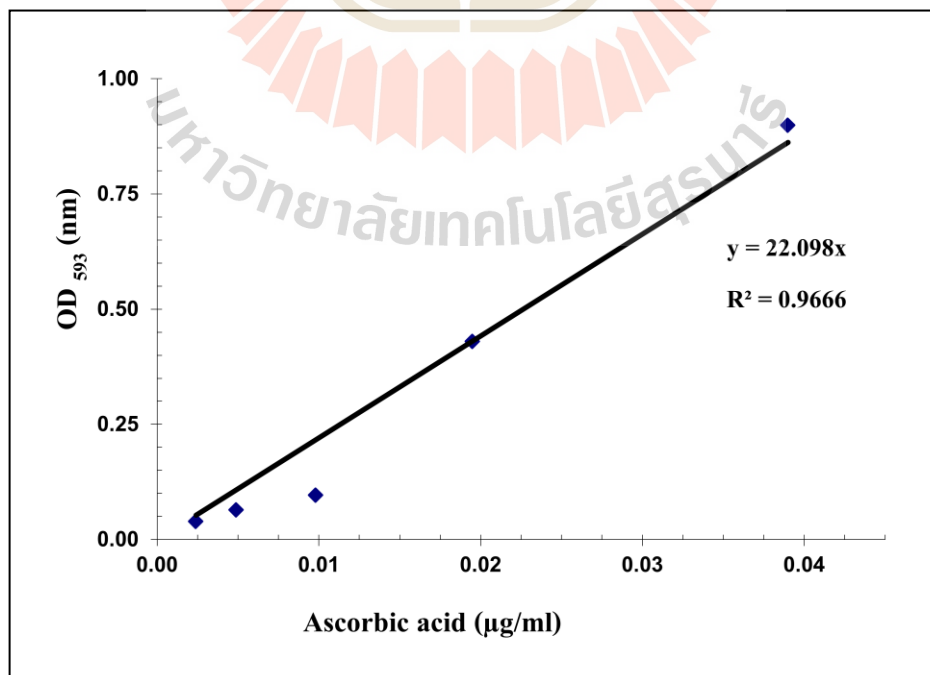
3. กราฟมาตรฐานของ catechin ในการวิเคราะห์ปริมาณ total proanthocyanidin

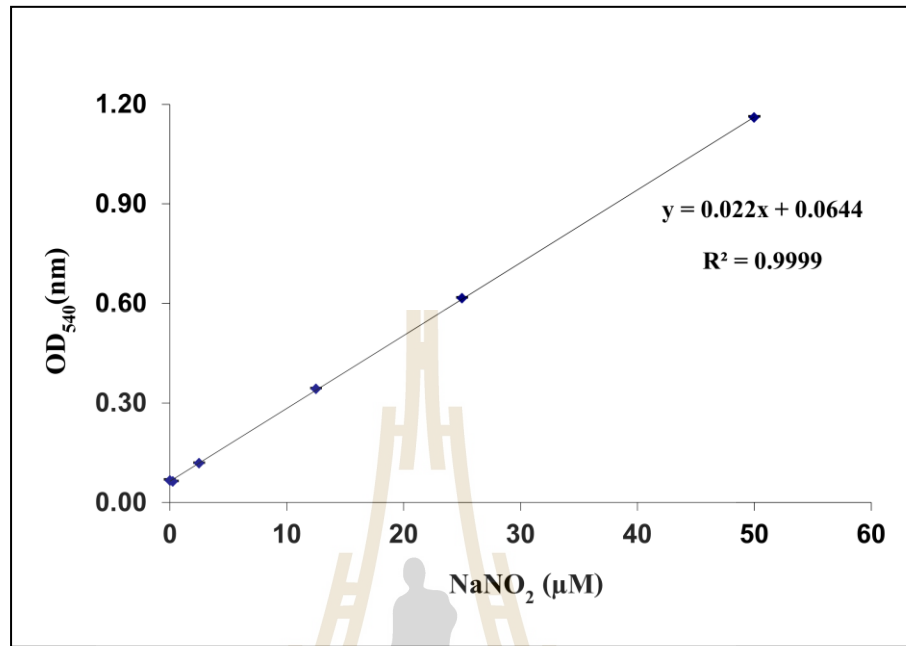


4. กราฟมาตรฐานของ catechin ใน DPPH Assay

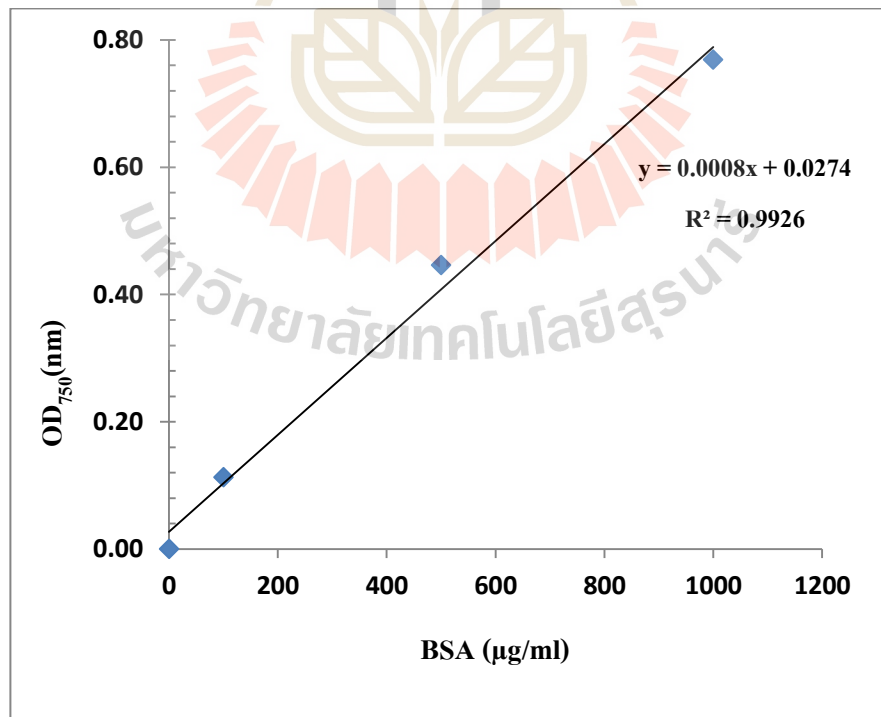


5. กราฟมาตรฐานของ Ascorbic acid ใน FRAP assay



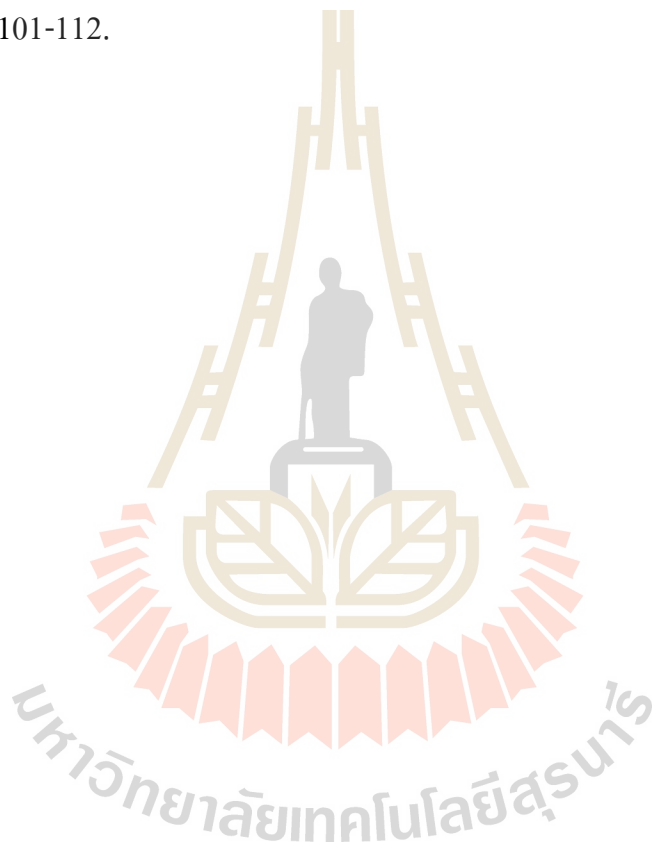
6. กราฟมาตรฐานของ NaNO_2 ใน Nitrite assay

7. กราฟมาตรฐานการหาปริมาณโปรตีน



ภาคผนวก ง
การเผยแพร่ผลการวิจัย

Kiatsongchai, R. and Chitsomboon, B. 2019. Phytochemicals and antioxidant properties of *Wan Khan Mak (Aglaonema simplex BL.)* fruit extract. **Suranaree Journal of Science and Technology** 26(1): 101-112.



PHYTOCHEMICALS AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OF WAN KHAN MAK (*Aglaonema simplex* BL.) FRUIT EXTRACT

Ratana Kiatsongchai¹ and Benjamart Chitsomboon^{2*}

Received: July 06, 2018; Revised: January 06, 2019; Accepted: January 10, 2019

Abstract

Aglaonema simplex Bl. (also called *wan khan mak* (WKM) in Thai), a plant in the family Araceae, has long been claimed in Thai traditional medicine to possess several ethnopharmacologic properties. Nevertheless, research into its claimed biological activities has never been explored. The present study aimed to investigate the proximate composition, the phytochemicals, and the chemical and intracellular antioxidant activities of 95% ethanol crude extract of the dried fruits of WKM. The results showed that the yield of WKM crude extract was 12.65% of the dry weight, and the contents of total phenolics and flavonoids in the extract contributed to the antioxidant capacities as demonstrated by DPPH and FRAP assays. The WKM extract could also effectively attenuate intracellular reactive oxygen species (ROS) generation in *t*BuOOH-induced oxidative stress in macrophage RAW264.7 cells, as monitored by using a DCFH-DA fluorescent probe. Overall, the present data suggest that WKM could be a potential source of natural antioxidants and merits further investigation for its possible roles in prevention and/or alleviation of ROS-mediated diseases.

Keywords: *Aglaonema simplex* Bl., phytochemicals composition, DPPH assay, FRAP assay, DCFH-DA, RAW264.7 cells

¹ School of Biology, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand.

² School of Preclinic, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 30000, Thailand. Tel. 0-4422-3307; Fax. 0-4422-3599; E-mail: Benja@sut.ac.th

* Corresponding author

Introduction

Despite a bloom in research of Thai herbs in recent years, there is little research into *Wan*, the general name for sedges or orchids, compared with other herbs. Traditional Thai medicine textbooks have mentioned that most, if not all, of *Wan* are herbs which possess many medicinal and superstitious effects, including relief from the poisonous stings of insects and a disease cure, drug detoxification, general healing, warding off snakes, protecting against enemies, scaring away the devil, and for use in amulets for good luck in commerce (Sanyasee, 2018). *Wan* has been categorized into 34 families, 512 genera, and over 1,700 species. There are many interesting species of *Wan* and 1 of those is *Aglaonema simplex* or *wan khan mak* (WKM) (Figure 1). Thai-traditional medicine has cited WKM as a miracle plant that possesses many ethno-medical properties such as anti-aging, firming the skin, strengthening teeth, grey hair prevention, and as an energy booster (Sanyasee, 2018).

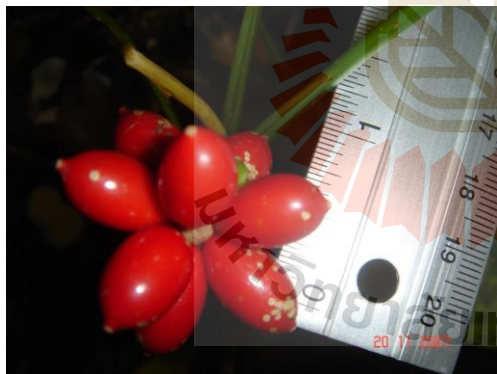


Figure 1. Fruits of *Wan Khan Mak*

At present, most people have not well realized the pharmacological values of WKM. It has been planted only for decoration or as plant for amulets to dispel bad luck, or attract good luck and fortune. So far, the study of WKM's pharmacological properties is still very limited. Panyaphu *et al.* (2011) surveyed 168 species of medicinal plants and reported that a poultice prepared from WKM leaves and

stems, among other preparations of medicinal plants, has anti-pain and anti-inflammation values in primary healthcare of postpartum women. Chee *et al.* (2005) found 5 pheophorbide-related compounds from the leaves and stems of WKM. All of them showed moderate to strong phytotoxicity towards several human cancer cell lines (HL 60, HSC-2, and HSC-3). To the best of our knowledge, the therapeutic properties and toxicity of the WKM fruits have never been reported. Although there is still no scientific information to support the biological activities of WKM fruit, people have recently become increasingly aware of its therapeutic values. Those who have consumed WKM fruit have claimed that it promoted good health, refreshed feelings, relieved an aching body, energized the body and produced a juvenile skin complexion. Nowadays, WKM fruits are being sold expensively on several websites ranging from 800- 1,000 baht per kilogram. Part of the reason for the price might be that the plant is rarely found, and it might not bear fruit every year if grown under inappropriate weather or conditions (Sangneam, 2018).

At present, WKM is a plant that has been selected as an affiliate in the Plant Conservation Project under the Royal Initiation of Her Royal Highness Princess Maha Chari Sirindhon (RSPG) (Soontornyatara *et al.*, 2017). The objective of the project is to collect the genetic analysis and information on the pharmacological activities and bioactive compounds of traditional medicinal plants in Thailand. Although WKM has gained a reputation for its therapeutic values and is 1 of the selected plants under the RSPG project, there is still no research or any scientific evidence to support the claims for WKM's ethno-medical properties.

This research aimed to explore the chemical and phytochemical constituents of the ethanolic fruit extract of WKM and to investigate the antioxidant activities of the extract by using 3 different methods, namely the DPPH, FRAP, and DCFH-DA assays. This study only focuses on the WKM fruit as it is the part used in Thai traditional medicine and

is claimed to possess the most biological activity in the whole plant.

Materials and Methods

Chemicals and Reagents

The 2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH), 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA), and *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BuOOH) used in our research were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Fetal bovine serum (FBS), RPMI medium 1640, MEM medium, and Hank's balanced salt solution (HBSS) were from Gibco Invitrogen (Grand Island, NY, USA).

Cell Lines

The mouse macrophage cell line (RAW264.7) gamma NO(-) (ATCC, CRL-2278) was used for the cellular antioxidant activity assay. RAW264.7 cells were cultured at 37°C, 5% CO₂ in humidified air and maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 10 mM HEPES, 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin. Exponentially growing cells were used for the experiments when they reached approximately 80% confluence.

Plant Materials

The whole ripe fruits of WKM were harvested during December to January, the peak season of ripening, from Amphur Pakthongchai, Nakhon Ratchasima province, Thailand. The plant was identified and authenticated by the Forest Herbarium, Royal Forest Department, Bangkok, Thailand. A voucher specimen (BKF 186333) was deposited at the Forest Herbarium, Royal Forest Department, Bangkok, Thailand.

Plant Extract Preparation

The fruits of WKM were dried at 40°C in a hot-air oven (Mettler GmbH & Co. KG, Schwabach, Germany), ground into powder, and then extracted by maceration in 95% ethanol for 48 h at room temperature, the condition providing the maximum yield from the preliminary study. After centrifugation,

the extract was concentrated by a rotary evaporator (Buchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) and dried by lyophilization (Freeze-Zone 12 plus, Labconco Corporation, Kansas City, MO, USA). Finally, the dried fruit extract was kept at -80°C.

Determination of Chemical Constituents

The chemical constituents of the dried fruits of WKM, including moisture, crude proteins, fats, ash, and fibers were determined according to the standard methods of the AOAC (1997). The moisture and ash were determined using the weight difference method and the fiber content was estimated from the loss in weight of the crucible and its contents on ignition. The Kjeldahl method and Soxhlet extraction method were used for determination of the crude proteins and crude fat, respectively.

Determination of Phytochemical Compounds

Phytochemical screening was performed by determination of the total contents of the phenolics, flavonoids, and proanthocyanidin as they are the 3 most common groups of constituents providing natural antioxidant sources in plants (Lee *et al.*, 2004). Polyphenols, especially flavonoids, are highly effective scavengers of singlet oxygen and various free radicals and are reported to have several beneficial effects on human health (Baba and Malik, 2015, Montoro *et al.*, 2005). Proanthocyanidins, a broad class of polyphenolic compounds polymerized by flavan-3-ol or flavan-3,4-diol (Jing *et al.*, 2015), are well recognized as the most effective antioxidants against free radicals (Lin and Zhang, 2002; Spranger *et al.*, 2008) and also have various strong biological effects (Jing *et al.*, 2015; Cadiz-Gurrea *et al.*, 2017).

Total Phenolic Content

The total phenolic content in the extracts was determined in triplicate using Folin-Ciocalteu reagent (Singleton and Rossi, 1965). Briefly, the extract or gallic acid (100 µL) and 2% sodium carbonate (2 mL) were added in a test tube. After 2 min, the Folin-Ciocalteu reagent (100 µL) was added, vortexed immediately,

and then allowed to stand at room temperature for 30 min. The absorbance of the extracts was measured spectrophotometrically at 750 nm. Gallic acid was used to prepare the standard curve. The concentration of the phenolic compounds of the extracts was expressed as milligrams of gallic acid equivalent (GAE) per gram of dry extract.

Total Flavonoids Content

The total flavonoid content in the crude extracts was measured in triplicate using the aluminum chloride colorimetric method (Liu *et al.*, 2002). The extract or catechin (250 μ L), DI water (1.25 mL), and 5% sodium nitrite (75 μ L) were mixed together in a glass test tube. After 6 min, 10% aluminum chloride (150 μ L) was added and the mixture was allowed to stand at room temperature for 5 min. Finally 1M sodium hydroxide (500 μ L) was mixed with the solution. The absorbance of the extracts was measured spectrophotometrically at 510 nm. The flavonoid content of the extracts was expressed as milligrams of catechin equivalent (CE) per gram of dry extract.

Proanthocyanidins Content

A modified vanillin assay (Sun *et al.*, 1998) was adopted for quantification of the total proanthocyanidins content of the ethanolic plant extract in triplicate. An aliquot of 125 μ L of extract or catechin was added to a solution of 4% vanillin-methanol (750 μ L) and 4% HCl-methanol (375 μ L) in a glass test tube. The red coloration was read spectrophotometrically at 500 nm and catechin was used as the reference standard.

Determination of Antioxidant Properties

DPPH Assay

The antioxidant activity of the extracts was measured with respect to the hydrogen donating capability or radical scavenging activity towards the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). The various concentrations of the extracts (0.2 mL) in ethanol were pipetted into a glass test tube and an ethanol solution of DPPH (3 mL) was added to each tube. The tube was shaken gently and left to stand in the dark at room temperature for

30 min. The absorption was measured at 517 nm by a spectrophotometer (Katsube *et al.*, 2004). The lower absorbance of the reaction mixture indicated higher free-radical scavenging activity. Inhibition of the free-radical DPPH in percentage was calculated as the following equation:

$$\text{Percent Inhibition} = \frac{(A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}})}{A_{\text{blank}}} \times 100 \quad (1)$$

where A_{blank} is the absorbance of the control reaction (containing all reagents except the test compound) and A_{sample} is the absorbance of the reaction with the test compound. Trolox was used as a standard reference. The IC_{50} value, the concentration of the sample required for 50% scavenging of the DPPH free radical, was determined from the curve of percent scavenging plotted against the concentration. Each determination was carried out in quadruplicate.

FRAP Assay

The total antioxidant potential of the extract was determined using a ferric reducing ability of plasma (FRAP) assay (Benzie and Strain, 1996). The freshly prepared FRAP reagent contained 10 mM 2,4,6-tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ) in 40 mM HCl plus 20 mM ferric chloride ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) and 0.3 M acetate buffer; pH 3.6 at the ratio of 1:1:10, respectively. Then various concentrations of the extracts (0.1 mL) were mixed with the FRAP reagent (3 mL). The absorbance was measured at 593 nm after standing for 30 min. The standard curve was prepared using different concentrations of the ascorbic acid standard solution. All determinations were performed in triplicate.

Dose Range-Finding Studies

The *in vitro* cytotoxicity of WKM on RAW264.7 was conducted in order to find the optimum dose-range for subsequent studies. Cells were incubated in the absence or presence of various concentrations of the WKM extract for 24 h. Cell viability was determined by the MTT (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) and trypan blue exclusion methods.

One hundred μL of RAW264.7 cells were seeded in a 96-well plate at the concentration of 1×10^5 cells/well and were incubated at 37°C , 5% CO_2 overnight. The WKM extract was dissolved in DMSO to make a stock solution and diluted to various concentrations in media from 0.125 to 0.5 mg/mL (the final concentration of DMSO was 0.1%). After overnight incubation, the media were removed from the culture and were replaced with the extract or the vehicle control and further incubated for 24 h. Cell viability was determined with the MTT assay and trypan blue exclusion method.

MTT Method

After incubation with the WKM extract (0.125-0.5 mg/mL) for 24 h, the supernatant was removed. One hundred μL of 0.5 mg/mL MTT in PBS was added to each well, and cells were further incubated for another 4 h. The media were removed and formazan product was dissolved with 100 μL DMSO. The inhibition of cell growth induced by the WKM extract was determined using the optical density (OD) at 540 nm by a microplate reader.

The percentage of cell viability was calculated according to the following equation:

$$\text{Percentage of the viable cell} = \frac{\text{Average OD of test group}}{\text{Average OD of control group}} \times 100 \quad (2)$$

Trypan Blue Exclusion Method

After incubation of the WKM extract for 24 h, the supernatant was removed, the cells in each well were trypsinized by adding 20 μL of 0.25% trypsin-EDTA in PBS and then incubated at 37°C for 10 min. Then, the trypsin activity was neutralized by adding 100 μL media plus 10% FBS. The plate was placed on ice, 50 μL of cell suspension was pipetted into a micro centrifuge tube, and an equal volume of 0.4% (w/v) trypan blue was added and mixed thoroughly. A small amount of this mixer was loaded into a chamber of the haemocytometer. Then the viable (bright light) cells and dead (stained blue) cells were counted immediately under a light microscope at low magnification.

The percent viable cells were calculated according to the following equation:

$$\% \text{ Viable cells} = \frac{\text{Total viable cells per ml}}{\text{Total cells per ml}} \times 100 \quad (3)$$

Cellular Antioxidant Activity Assay

Intracellular antioxidant activity was evaluated using the DCFH-DA assay as described by Dufour *et al.* (2007). Briefly, RAW264.7 cells were plated in 96-well black clear-bottom plates at 1×10^6 cells/mL and incubated for 24 h at 37°C and 5% CO_2 . Cells were incubated either with various concentrations of the WKM extract (0.125, 0.25 and 0.5 mg/mL), or 10 μM quercetin. After 24 h, the cells were washed with Hank's balance salt solution (HBSS) and incubated for 30 min with HBSS containing 20 μM DCFH-DA. Cells were then washed again with HBSS 3 times and treated with 500 μM *tert*-butylhydroperoxide (*t*-BuOOH) in HBSS. Fluorescence was measured every 30 min and was followed for 3 h on the automated Gemini EM fluorescence microplate reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) using an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 530 nm.

Statistical Analysis

Homogeneous data were evaluated by using a 1-way analysis of variance (ANOVA), and differences between treatment groups and the vehicle control group were compared by using Tukey's HSD test. Non-homogenous data was evaluated by using a non-parametric analysis of variance. Significant differences were compared between the experimental groups and the vehicle control group. $P < 0.05$ was considered as statistically significant.

Results and Discussion

Proximate Composition of WKM

Proximate analysis of the dried ground fruits of the WKM demonstrated that crude protein was the main constituent ($71.44 \pm 2.25\%$) of the plant, followed by moisture ($11.96 \pm 1.39\%$), available carbohydrate ($10.88 \pm 1.17\%$), crude ash ($4.72 \pm 0.12\%$), crude fiber ($0.11 \pm 0.002\%$), and finally, crude fat ($0.9 \pm 0.08\%$) (Table 1).

The yield of the WKM crude extract was 12.65% of the dry weight.

Phytochemicals Composition of WKM

The total phenolic content of the WKM was analyzed by fitting the calibration curve of gallic acid ($R^2 = 0.997$) and expressed as mg gallic acid equivalent per gram of dry extract (mg GAE/g dry extract). The contents of the total flavonoids and proanthocyanidins were analyzed by fitting the calibration curve of catechin ($R^2 = 0.985$ and 0.951 , respectively) and were expressed as mg catechin equivalent per gram of dry extract (mg CE/g dry extract). The results in Table 2 showed that the total phenolic content of the extract was 56.75 ± 0.37 mg GAE/g dry extract, while the total flavonoid and proanthocyanidin contents were 5.03 ± 0.03 CE/g dry extract and 7.02 ± 0.12 mg CE/g dry extract, respectively. The phenolic content of the ethanolic extract of the WKM fruit is high in comparison with other fruits. The total phenolic content of goji berries (aqueous extract) was 14.13 ± 0.40 mg GAE/g dry extract (Benchenouf *et al.*, 2017), the ethanolic extracts of turkey berries (fruits of *Solanum torvum*) was 16.15 ± 0.23 mg GAE/g dry extract (Abdulkadir *et al.*, 2016), and of *Carissa carandas* was 17.10 ± 0.27 mg GAE/g dry extract (Mishra *et al.*,

2017). Concordantly, the total flavonoid content of the tested WKM was also higher than *C. carandas*. The flavonoid content of *C. carandas* was 2.69 ± 0.09 mg CE/g dry fruits which was almost 2 times less than the WKM. The proanthocyanidin content of the WKM was also higher than red and black rice grains which were found in the range of 0.58 ± 0.04 mg CE/g to 2.55 ± 0.14 mg CE/g.

Antioxidant Properties of Extract from WKM

Several methods have been developed and used to measure the total antioxidant activity of natural medicinal plants *in vitro*. Due to the complex composition of phytochemicals and oxidative process, the antioxidant capacity of medicinal plant extracts should not be investigated by using only 1 method (Bohm *et al.*, 1998). The use of at least 2 methods should be employed in order to evaluate the total antioxidant activity. Therefore, the present study investigates the antioxidant activities of the WKM extract by using both the DPPH and FRAP assays. Though the DPPH and FRAP assays are based on a single electron transfer reaction (Bunea *et al.*, 2011), their characteristics, sensitivities, mechanisms of the reaction, and endpoints are totally different. The DPPH

Table 1. Proximate composition of dried ground fruits of *Wan Khan Mak*

Proximate composition	WKM extract (%)
Moisture	11.96 ± 1.390
Crude protein	71.44 ± 2.250
Crude fat	0.9 ± 0.080
Ash	4.72 ± 0.120
Crude fiber	0.11 ± 0.002
NFE	10.88 ± 1.170

NFE = available carbohydrate. Data were mean \pm SD., $n = 3$.

Table 2. Total phenolics, total flavonoids and proanthocyanidins contents of *Wan Khan Mak* fruit extract

Phytochemical component	WKM extract
Total phenolics (mg GAE/g dry extract)	56.75 ± 0.37
Total flavonoids (mg CE/g dry extract)	5.03 ± 0.03
Proanthocyanidins (mg CE/g dry extract)	7.02 ± 0.12

Data were mean \pm SD., $n = 3$.

assay, 1 of the most frequently used methods to evaluate antioxidant activity, was employed to determine the ability of the samples to scavenge DPPH radicals, whereas the FRAP assay evaluates the antioxidant power of a sample by measuring its ferric reducing capability. The FRAP assays also evaluate the chain-breaking antioxidant potential (Ghiselli *et al.*, 1995; Benzie and Strain, 1996). The secondary metabolites in plants, vitamin C, Trolox, catechin, and quercetin were used as positive antioxidant controls in the present study as they are the most frequently used antioxidant standards for food samples.

The IC₅₀ values of the WKM extract in comparison with other commonly used antioxidants in the DPPH assay are shown in Table 3. The IC₅₀ of the WKM extract was 399.77±15.33 µg/mL, whereas the IC₅₀ of the antioxidant controls, quercetin, catechin, and Trolox were 2.002±0.022, 2.144±0.010, and 4.462±0.015 µg/mL, respectively. The result clearly showed that although the WKM possessed the capability to scavenge DPPH radicals, the extract was about 100-200 fold less efficient than quercetin, catechin, and Trolox. Notably, the scavenging ability of quercetin and catechin were comparable and were higher than Trolox.

In the FRAP assay, the antioxidant potential of the WKM extract was estimated from its ability to reduce TPTZ-Fe (III) complex to TPTZ-Fe (II) complex at low pH causing the formation of a colored ferrous-tripyridyltriazine complex (Gordon, 1990). The reducing properties are related to the ability of the compounds present in the extract to donate a hydrogen atom resulting in breaking the free

radical chain (Rice-Evans *et al.*, 1997; Irshad *et al.*, 2012). The reducing antioxidant power of the WKM extract in the FRAP assay was expressed as µg of ascorbic acid equivalent antioxidant capacity (AEAC) per gram dry weight of the extract and is shown in Table 2. The ferric reducing ability power or the FRAP value of the WKM extract was 44.07±0.51 µg AEAC /g dry wt.

It is well established that the major components of plant extracts that act as antioxidants are phytochemicals such as phenolic compounds, flavonoids, and proanthocyanidin. Saeed *et al.* (2012) found a correlation between the total phenolic and flavonoid contents in *Torilis leptophylla* with free radical scavenging capability. de Oliveira *et al.* (2012) reported a strong correlation between the total phenolic content and antioxidant activity of the crude extracts of *Sidastrum micranthum* and *Wissadula periplocifolia*. Irshad *et al.* (2012) also demonstrated that the antioxidant activity of *Cassia fistula* extracts was directly proportional to the contents of the phenolics and flavonoids. Jing *et al.* (2015) showed that the antioxidant activity and the scavenging capacity of hydroxyl radicals and DPPH• were increased in a concentration-dependent manner of proanthocyanidin in the extract of *Kunlun Chrysanthemum* flowers. The present study showed that phenolics, flavonoids, and proanthocyanidin were present in the WKM extracts when assessed with the Folin-Ciocalteu, aluminum trichloride, and vanillin methods, respectively. The WKM extracts also exhibited antioxidant activities when evaluated with the DPPH and FRAP assays. Notably, the

Table 3. DPPH free radical scavenging activity and ferric reducing ability power (FRAP) values of WKM extracts

Sample	Antioxidant Capacity	
	IC ₅₀ (DPPH) (µg/mL)	FRAP value (µg AEAC /g dry wt.)
WKM extract	399.77 ± 15.33	44.07 ± 0.51
Quercetin	2.002 ± 0.022	-
Catechin	2.144 ± 0.010	-
Trolox	4.462 ± 0.015	-

Data were mean ±SD., n = 3.

higher contents of phenolics and flavonoids in the WKM extracts also exhibited a higher antioxidant capacity in comparison with ethanolic mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) hull extracts (Manasathien, 2017).

Therefore, the presence of phenolics, flavonoids, and proanthocyanidin in the WKM extracts could be associated to the scavenging activity of the DPPH radical and the ferric reducing power displayed in the FRAP assay.

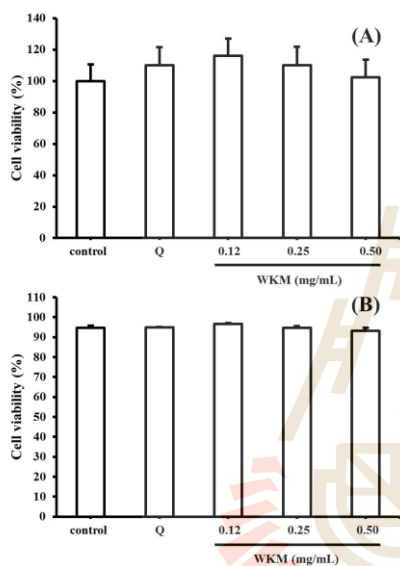


Figure 2. Cytotoxic effect of WKM extract and quercetin on cell viability of RAW264.7 cells as determined by MTT (A) and trypan blue exclusion (B)

Dose Range-Finding Studies

Prior to performing the cellular antioxidant study, a range finding test was performed to find the optimum concentration range of the WKM extract that was not cytotoxic towards RAW263.7. After the RAW264.7 cells were incubated with the VH control, various concentrations of the WKM extract (0.5, 0.25, and 0.125 mg/mL), or 10 µM quercetin for 24 h, the cell viability was determined by the MTT assay and trypan blue exclusion method. The result in Figure 2 suggested that the WKM extract at 0.125-0.5 mg/mL had no cytotoxicity towards the

RAW264.7 cells, either determined by the MTT assay (Figure 2(a)) or trypan blue exclusion method (Figure 2(b)). No significant difference in cell viability was observed in the WKM exposed cultures when compared to the vehicle control group. The antioxidant positive control, 10 µM quercetin, was also not cytotoxic. The cell viability of all groups was comparable and was more than 90%.

Although cell death is 1 of the most common consequences of the toxicity, some chemicals can exhibit a toxic effect by alteration of cellular metabolic activity without necessarily causing cell death. This aspect is called “cell vitality” (the physiological capabilities of cells) which represents a different aspect of cell functions from cell viability (the percentage of live cells in a whole population) (Kwolek-Mirek and Zadrag-Tecza, 2014). The MTT assay is based on the evaluation of the cell mitochondrial enzyme succinate hydrogenase activity in metabolizing MTT and hence the measurement of cell vitality rather than cell viability. Nevertheless, MTT is widely used for indirect determination of cell viability (Wang *et al.*, 2010). However, Maioli *et al.* (2009) reported that certain drugs and/or compounds could cause alterations in mitochondrial activity in the MTT assay. Actually, in the MTT assay, the cellular metabolic activity could be changed and variation of the results could be obtained by different conditions or chemical treatments including pH, green tea polyphenol (Plumb *et al.*, 1989; Hsu *et al.*, 2003), and color interference from media or samples. In the present study, the color interference from the sample and/or media in the MTT assay was minimized by subtracting the sample with a blank sample (extract plus media without cells). In addition, the MTT was prepared in colorless PBS, and the color interference from the extract was minimized by washing the WKM-incubated cells before the MTT addition.

Trypan blue exclusion is a conventional method for determination of cell viability. The method is based on the assumption that cell damage normally leads to cell death. At physiological pH, trypan blue dye is ionic and is excluded by the intact membrane of live

cells. Only dead or damage cells with an alteration in cell membrane integrity and permeability will allow the dye to go through and stain the nucleus and/ or cytoplasm. Therefore, only dead or damaged cells are stained blue (Strober, 2015).

In the present study, the determination of WKM toxicity towards RAW264.7 using both the cell viability and cell vitality approaches clearly indicated that the WKM extract at 0.125-0.5 mg/mL was not toxic to the RAW264.7 cells.

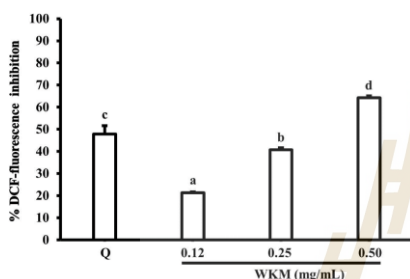


Figure 3. The percentage inhibition of DCF-fluorescence by WKM extract and quercetin in the DCFH-DA assay at 3 h. Q = 10 μ M quercetin, WKM = Wan Khan Mak extract 0.125, 0.25 and 0.5 mg/mL. Means values with different letters are significantly different ($p < 0.05$, one-way analysis of variance)

Cellular Antioxidant Activity

Though both DPPH and FRAP are frequently used assays for antioxidant evaluation, they have some drawbacks for the measurement. In the DPPH assay, there is always a problem of color interference from other constituents in the crude extract, at the same wavelength of 515 nm. In addition, the DPPH radical is absent in living organisms. The drawbacks of the FRAP method are that the compounds with low redox potential (lower than 0.77) still can reduce the Fe^{+3} although they do not behave as antioxidants *in vivo*, some interfering compounds may absorb at the same wavelength, and the assay is also performed at a non-physiological pH (Pérez-Jiménez *et al.*, 2008). Therefore, the

antioxidant activity of the WKM extract was also evaluated by the cell-based assay, using DCF-DA as the intracellular fluorescent probe.

Cellular antioxidant activity assay is based on the ability of compounds to suppress the formation of DCF following *t*-BuOOH-mediated overoxidation of DCFH in the RAW264.7 cells. The increment of DCF fluorescence emission following reactive oxygen species (ROS)-mediated oxidation of DCFH was gradually increased after 30 min and reached a maximum level at about 3 h. Hence, the percentage of DCF scavenging by the WKM extract shown in Figure 3 was determined at 3 h. Preliminary study showed that after the 3 h period of *t*-BuOOH stimulation, the DCF fluorescent intensity gradually decreased (data not shown). The result clearly suggested that the WKM extract could significantly scavenge intracellular ROS induction in a dose-dependent manner. When compared to the vehicle control, the WKM extract at the concentrations of 0.125, 0.25, and 0.5 mg/mL inhibited ROS production in *t*-BuOOH-induced RAW264.7 cells by 21.24 \pm 0.88%, 40.64 \pm 0.86%, and 64.31 \pm 1.59%, respectively, whereas the inhibition of 10 μ M quercetin, the antioxidant positive control, was 47.84 \pm 0.50%. Notably, the decrease of DCF formation was more pronounced in the highest concentration of the WKM (0.5 mg/mL) than the antioxidant positive control quercetin (10 μ M).

Therefore, in addition to its extracellular antioxidant capacity, WKM also possessed a strong intracellular antioxidant activity in scavenging ROS and decreasing the oxidation of DCFH. Similarly, the crude water and ethanol extracts of various plants' leaves and fruits containing phenolic compounds had been shown previously to act as antioxidants in the cell-based assay using a DCFH-DA probe (Aiyegoro and Okoh, 2009; Shi *et al.*, 2011; Shukla *et al.*, 2012; Serra *et al.*, 2011). In addition, polyphenols are known to support bioactive activities in medicinal plants (Bunea *et al.*, 2011; Manasathien, 2017). Therefore, the antioxidant activity of WKM might be attributed to the presence of phenolics and flavonoids in the ethanol crude extract. Interestingly, although

WKM displayed lower DPPH radical scavenging activity than the antioxidant positive controls, quercetin, catechin, and Trolox (Table 2), the extract at 0.5 mg/mL could exhibit a higher potential to reduce ROS-induced oxidative stress in RAW264.7 cells than 10 μ M quercetin (Figure 3). This could be explained by differences in the modes of antioxidant action in both assays. The DPPH method is based on the scavenging activity of stable DPPH nitrogen radicals in the presence of antioxidants (Huang *et al.*, 2005). In a DCFH-DA assay, DCFH-DA readily diffuses through the cell membrane and is enzymatically hydrolyzed by intracellular esterases to form non-fluorescent DCFH, which is then rapidly oxidized to form highly fluorescent dichlorofluorescein (DCF) in the presence of ROS. The DCF fluorescence intensity is proportional to the amount of ROS formed intracellularly (Yen *et al.*, 2003). Therefore, the observed antioxidant potential of the WKM extract in the DPPH and DCFH-DA assays could be mediated by a different mechanism and/or different antioxidant constituents in the extract. In fact, many important classes of antioxidants including flavonoids, 1 of the main chemical constituents in the WKM extract, contain a huge number of natural antioxidant compounds with a diversity of their modes of action (Kumar and Pandey, 2013). Depending on what specific phytochemical constituents present in the extract are providing the antioxidant activity, their discrete chemical structures, positions, numbers, and types of substitutions of features can influence their redox properties and hence their antioxidant potentials. The structure of antioxidant activity relationships of flavonoids have been studied; for example, multiple hydroxyl groups of the flavan nucleus of the flavonoid favor antioxidant and chelating activity, the methoxy group has unfavorable steric effects and an increase of lipophilicity, a double bond and carbonyl group in the heterocycle of the nuclear structure offer a more stable radical and hence increase the activity (Heim *et al.*, 2002). Phenolics may have hydroxyl or methoxyl groups; while flavones possess hydroxyl, keto, and free carboxylic groups and flavonoids have a flavan nucleus with different

types of substitutions. Typically, all of these compounds can provide different reducing properties. From the foregoing discussions, it is clear that not a single method can give a comprehensive prediction of antioxidant efficacy. Therefore, more than 1 method is recommended and there should be greater caution in extrapolating the extracellular data to intracellular-based assay (Aruoma, 2003).

Conclusions

Overall, the present results reveal that the WKM extract has no cytotoxicity towards RAW264.7 at the concentration range of 0.125-0.500 mg/ml and has potential antioxidant activities. However, further investigation in a long term toxicity study and more biological activities of the WKM extract are still required.

Acknowledgment

This work was financially supported by Suranaree University of Technology (SUT). The authors would like to thank Mae Chi Ratre Turongkawat, Mae Chi Kobkae Chaikitti, and all the nuns at Phu-Luang Dharma Retreat Center, Pakthongchai district, Nakhon Ratchasima province for providing help in obtaining fruits of the WKM for the study.

References

- Abdulkadir, A.R., Mat, N., Hasan, M.M., and Jahan, M.S. (2016). In vitro antioxidant activity of the ethanolic extract from fruit, stem, and leaf of *Solanum torvum*. *ScienceAsia*, 42:184-189.
- Aiyegoro, O.A. and Okoh, A.I. (2009). Phytochemical screening and polyphenolic antioxidant activity of aqueous crude leaf extract of *Helichrysum pedunculatum*. *Int. J. Mol. Sci.*, 10:4,990-5,001.
- AOAC. (1997). Official Methods of Analysis of AOAC International. 16th ed. AOAC International, Rockville, MD, USA.
- Aruoma, O.I. (2003). Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutat. Res.*, 523-524:9-20.
- Baba, S.A. and Malik, S.A. (2015). Determination of total phenolic and flavonoid content, antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of *Arisaema*

- jacquemontii* Blume. J. Taibah University for Sci., 9(4):449-454.
- Benchenouf, A., Grigorakis, S., Loupassaki, S., and Kokkalou, E. (2017). Phytochemical analysis and antioxidant activity of *Lycium barbarum* (Goji) cultivated in Greece. Pharm. Biol., 55(1):596-602.
- Benzie, I.F. and Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Anal. Biochem., 239:70-76.
- Bohm, B.A. (1998). Introduction to Flavonoids. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, Netherlands, 503p.
- Bunea, A., Rugina, O.D., Pinte, A.M., Sconta, Z., Bunea, C.I., and Socaciu, C. (2011). Comparative polyphenolic content and antioxidant activities of some wild and cultivated blueberries from Romania. Not. Bot. Horti. Agrobi., 39(2):70-76.
- Cádiz-Gurrea, M.L., Borrás-Linares, I., Lozano-Sánchez, J., Joven, J., Fernández-Arroyo, S., and Segura-Carretero, A. (2017). Cocoa and grape seed byproducts as a source of antioxidant and anti-inflammatory proanthocyanidins. Int. J. Mol. Sci., 18(2):376; doi:10.3390/ijms18020376.
- Chee, C.F., Lee, H.B., Ong, H.C., and Ho, A.S. (2005). Photocytotoxic pheophorbide-related compounds from *Aglaonema simplex*. Chem. Biodivers., 2:1,648-1,655.
- Dufour, D., Pichette, A., Mshvildadze, V., Bradette-Hebert, M.E., Lavoie S., Longtin, A., Laprise, C., and Legault, J. (2007). Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of methanolic extracts from *Ledum groenlandicum* Retzius. J. Ethnopharmacol., 111:22-28.
- de Oliveira, A.M.F., Pinheiro, L.S., Pereira, C.K.S., Matias, W.N., Gomes, R.A., Chaves, O.S., de Souza, M.D.F.V., de Almeida, R.N., and de Assis, T.S. (2012). Total phenolic content and antioxidant activity of some Malvaceae family species. Antioxidants, 1:33-43.
- Ghiselli A., Serafini M., Maiani G., Azzini E., and Ferro-Luzzi A. (1995). A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. Free Radical Bio. Med., 18:29-36.
- Gordon, M.H. (1990). The mechanism of antioxidant action in vitro. In: Food Antioxidants. Hudson, B.J., (ed). Elsevier Applied Science, London, UK, p. 1-18.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., and Bobilya, D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. J. Nutr. Biochem., 13:572-584.
- Hsu, S., Bollag, W.B., Lewis, J., Huang, Q., and Singh, B. (2003). Green tea polyphenols induce differentiation and proliferation in epidermal keratinocytes. J. Pharmacol. Exp. Ther., 306:29-34.
- Huang D., Ou B., and Prior R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays - Reviews. J. Agr. Food Chem., 53:1,841-1,856.
- Irshad, M., Zafaryab, M., Singh, M. and Rizvi, M.M. (2012). Comparative analysis of the antioxidant activity of *Cassia fistula* extracts. International Journal of Medicinal Chemistry, 2012: Article ID 157125.
- Jing, S., Zhang, X., and Yan, L. (2015). Antioxidant activity, antitumor effect, and antiaging property of proanthocyanidins extracted from *kunlun chrysanthemum* flowers. Oxid. Med. Cell. Longev., 2015:Article ID 983484.
- Katsube, T., Tabata, H., Ohta, Y., Yamasaki, Y., Anuurad, E., Shiwaku, K., and Yamane, Y. (2004). Screening for antioxidant activity in edible plant products: Comparison of low-density lipoprotein oxidation assay, DPPH radical scavenging assay, and Folin-Ciocalteu assay. J. Agr. Food Chem., 52:2,391-2,396.
- Kumar, S. and Pandey, A.K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. Science World Journal, 2013:Article ID 162750.
- Kwolek- Mirek, M. and Zadrag- Tecza, R. (2014). Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. FEMS Yeast Res., 14:1,068-1,079.
- Lee, J.Y., Hwang, W.I., and Lim, S.T. (2004). Antioxidant and anticancer activities of organic extracts from *Platycodon grandiflorum* A. De Candolle roots. J. Ethnopharmacol., 93:409-415.
- Lin, Z. and Zhang, X. (2002). The proanthocyanidins pharmacology progress. Chinese Pharmacological Bulletin, 18(1):9-12.
- Liu, M., Li, X. Q., Weber, C., Lee, C. Y., Brown, J., and Liu, R.H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. J. Agr. Food. Chem., 50:2,926-2,930.
- Maioli, E., Torricelli, C., and Pacini, A. (2009). Critical appraisal of the MTT assay in the presence of rottlerin and uncouplers. Biol. Proced. Online, 11:227-240.
- Manasathien, J. (2017). Effects of Mangosteen hull extracts on bioefficacy and antiproliferation of human breast and prostate carcinoma cell lines. Suranaree J. Sci. Technol., 24(4):475-488.
- Mishra, C.K., Sasmal, D., and Kumar, D. (2017). In vitro antioxidant activity of chloroform and ethanolic fruit and root extracts of *Carissa Carandas* Linn. Journal of Innovation in Pharmaceutical Sciences, 1(1):41-45.
- Montoro, P., Braca, A., Pizza, C., and De Tommasi, N. (2005). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. Food Chem., 92:349-355.
- Panyaphu, K., On, T.V., Sirisa-ard, P., Srisa-nga, P., ChansaKaow, S., and Nathakarnkitkul, S. (2011). Medicinal plants of the Mien (Yao) in Northern Thailand and their potential value in the primary healthcare of postpartum women. J. Ethnopharmacol., 135:226-237.
- Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Tabernero, M., Díaz-Rubio, M.E., Serrano, J., Goñi, I., and Saura-Calixto, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results. Food Res. Int., 41:274-285.

- Plumb, J.A., Milroy, R., and Kaye, S.B. (1989). Effects of the pH dependence of 3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2, 5- diphenyl- tetrazolium bromide- formazan absorption on chemo- sensitivity determined by a novel tetrazolium- based assay. *Cancer Res.* , 49:4,435-4,440.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N.J., and Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.*, 4:304-309.
- Saeed, N., Khan, M.R., and Shabbir, M. (2012). Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla*. *BMC Complem. Altern. M.* , 12(1):221-233.
- Sangneam P. (2018). Wan Khan Mak. Samut Sakorn: Pitak Sangneam. Available from: <http://www.wankhanmak.com/index.html>. Accessed date: Jun 27, 2018.
- Sanyasee, A. (2018). Wan Khan Mak the Miracle Plant. Phrae.: Apinya Sanyasee. Available from: <http://sanyasi96.blogspot.com/2014/07/2547-3-2-3-www.html>. Accessed date: Jun 27, 2018.
- Serra, A. T., Duarte, R. O., Bronze, M. R., and Duarte, C.M.M. (2011). Identification of bioactive response in traditional cherries from Portugal. *Food Chem.*, 125:318-325
- Shi, Y-X., Xu, Y-K., Hu, H-B., Na, Z., and Wang, W-H. (2011). Preliminary assessment of antioxidant activity of young edible leaves of seven *Ficus* species in the ethnic diet in Xishuangbanna, Southwest China. *Food Chem.*, 128:889-894.
- Shukla, S., Mehta, A., Mehta, P., and Bajpai, V.K. (2012). Antioxidant ability and total phenolic content of aqueous leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 64:807-811.
- Singleton, V.L. and Rossi, J.A.Jr. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.*, 16:144-158.
- Soontornyatara, S., Taywiya, P., and Wiboonkhiao, M. (2017). Germplasm collection of Wan Khan Mak herb [*Aglaonema simplex* (Blume) Blume] in Thailand. Proceedings of the 8th RSPG Researchers Club Conference “ Thai Resources: Enormous Potential to be Seen”; November 29 - December 1, 2017; Saraburi, Thailand, p. 324-327.
- Spranger, I., Sun, B., Mateus, A.M., Freitas, V.T.D., and Ricardo-da-Silva, J.M. (2008). Chemical characterization and antioxidant activities of oligomeric and polymeric procyanidin fractions from grape seeds. *Food Chem.*, 108(2):519-532.
- Strober, W. (2015). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current Protocols in Immunology*, 111: A3.B.1-A3.B.3.
- Sun, B., Ricardo-da-Silva, J.M., and Spranger, I. (1998). Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J. Ag. Food Chem.* , 46(10): 4,267-4,274.
- Wang, P., Henning, S. M., and Heber, D. (2010). Limitations of MTT and MTS- based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. *PLoS One*, 5:e10202.
- Yen, G.C., Chiang, H.C., Wu, C.H., and Yeh, C.T. (2003). The protective effects of *Aspergillus candida* metabolites against hydrogen peroxide- induced oxidative damage to Int 407 cells. *Food Chem. Toxicol.*, 41(11):1,561-1,567.

ประวัตินักวิจัย

ผศ.ดร.เบญจมาศ จิตรสมบูรณ์ เกิดวันที่ 25 พฤษภาคม จังหวัดกรุงเทพมหานคร จบการศึกษาปริญญาตรีสาขาวิทยาศาสตร์ทั่วไป (เคมี-ชีววิทยา) คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (พ.ศ.2516-2520) ได้รับทุนการศึกษารัฐบาลไทย (กรรมการข้าราชการพลเรือน) ไปศึกษาต่อระดับปริญญาโทสาขาวิชา Environmental Health (Toxicology) ที่ University of Michigan ในประเทศสหรัฐอเมริกา (พ.ศ. 2521-2523) และทุนการศึกษาระดับปริญญาเอกสาขาวิชา Toxicology ของมหาวิทยาลัย Utah State University ในประเทศสหรัฐอเมริกา (พ.ศ. 2525-2629) ก่อนปฏิบัติงานที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เคยเป็นผู้ช่วยวิจัยสาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยมหิดล (พ.ศ. 2525-2529) นักวิจัยสถาบันวิจัยสภาวะแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (พ.ศ. 2523-2525) postdoctoral fellow ที่ Medical College of Virginia (พ.ศ. 2529-2532) special fellow ที่ Cleveland Clinic Foundation (พ.ศ. 2529-2532) และ research associate ที่ Case Western Reserve University (พ.ศ. 2533-2537) ประเทศสหรัฐอเมริกา มีความชำนาญพิเศษทางด้าน Immunology และ immunotoxicology



มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี