KKU Journal for Public Health Research
Vol.15 No.4 October – December 2022

วารสารวิจัยสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ปีที่ 15 ฉบับที่ 4 เดือน ตุลาคม – ธันวาคม 2565

นิพนธ์ต้นฉบับ

ฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากลูกหม่อนและเยื่อหุ้มเมล็ดของฟักข้าวในการยับยั้งการสร้างโปรตีน Interleukin 1β และ Interleukin 6

*กฤษดา นิลวดี[1], สุกัญญา ศรีจำปา[2], พัชราภรณ์ ทิพยวัฒน์[2], รัฐพล ไกรกลาง[3]**

วันที่ได้รับต้นฉบับ: 11 กันยายน 2565
วันที่ตอบรับการตีพิมพ์: 17 ตุลาคม 2565

** ผู้รับผิดชอบบทความ*
(1) นักศึกษาหลักสูตรสาธารณสุขศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโภชนศาสตร์เพื่อสุขภาพ คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
(2) สาขาวิชาเทคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
(3) สาขาวิชาการบริหารสาธารณสุข การส่งเสริมสุขภาพโภชนาการ คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทคัดย่อ

การอักเสบเป็นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่ถูกกระตุ้นด้วยสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ เช่น เชื้อแบคทีเรีย หรือไวรัส เป็นต้น เมื่อเกิดการอักเสบ ร่างกายจะเกิดการตอบโดยการหลั่งสารไซโตไคน์ (cytokine) ได้แก่ tumor necrosis factor α (TNFα), Interleukine 6 (IL6), Interleukine1 β (IL1β) และ Interleukine 8 (IL8) เป็นต้น จากเซลล์ต่าง ๆ ของระบบภูมิภูมิคุ้มกัน และกระตุ้นให้เซลล์เกิดการตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบ ผ่านการทำงานของ NF-κB ซึ่งเป็น nuclear transcription factor ที่สามารถควบคุมการแสดงออกของยีนหลายชนิดซึ่งล้วนก่อให้เกิดกระบวนการอักเสบทั้งสิ้น การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของสารสกัดจากลูกหม่อนและเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว ได้แก่ สารฟีนอลิกทั้งหมด และสารฟลาโวนอยด์ โดยใช้วิธี folin-ciocalteu spectrometric method และ aluminium chloride colorimetry และศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการหลั่งโปรตีน interleukin 1β (IL1β) และ interleukin 6 (IL6) ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U9T7 ผลการทดลองพบว่า สารสกัดที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และสารประกอบฟลาโวนอยด์ สูงสุดคือ สารสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวสกัดที่ด้วย แอบโซลูทเอทานอลต่อเอทิลอะซิเตทในอัตราส่วน 6:4 (300.11±610.65 ไมโครกรัมสมมูลกรดแกลิกต่อสารสกัดหยาบ 1 มิลลิกรัม และ 4.68±0.62 ไมโครกรัมเควอร์ซิตินต่อสารสกัด 1 มิลลิกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ) ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบด้วยวิธี DPPH พบว่า สารสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิด มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกันคือ มีค่า IC50 เท่ากับ 0.32±0.02 และ 0.37±0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่การทดสอบด้วยวิธี FRAP พบว่า สารสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวสกัดด้วยแอบโซลูทเอทานอลต่อเอทิลอะซิเตท มีค่าที่ดีที่สุดคือ 333.39±6.123 ไมโครกรัมสมมูลกรดแอสคอร์บิคต่อสารสกัด 1 มิลลิกรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อทำการทดสอบกับเซลล์เพาะเลี้ยง U9T7 ที่ถูกกระตุ้นให้ตอบสนองต่อการอักเสบ พบว่าทั้งสารสกัดจากฟักข้าวและลูกหม่อน มีแนวโน้มในการยับยั้งการหลั่งของโปรตีน IL1β อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p value>0.05) แต่พบว่าสารสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวทั้ง 2 ตัวทำละลายสามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน IL6 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p value<0.05) จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดทั้งจากฟักข้าวและลูกหม่อนสามารถช่วยยับยั้งกระบวนการอักเสบได้ ซึ่งอาจจะมีประโยชน์ในการช่วยชะลอการอักเสบในผู้ป่วยโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง เช่น โรคเบาหวาน ซึ่งจะช่วยลดความรุนแรงของโรคได้

คำสำคัญ: *ลูกหม่อน, ฟักข้าว, สารพฤกษเคมี, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, Interleukin 1β, Interleukin 6*

KKU Journal for Public Health Research
Vol.15 No.4 October – December 2022

วารสารวิจัยสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ปีที่ 15 ฉบับที่ 4 เดือน ตุลาคม – ธันวาคม 2565

Original Article

Effect of Crude Extracts from Mulberry and Gac Fruit Aril to Inhibiting of Interleukin 1β and Interleukin 6 Secretion

*Kritsada Ninwadee[(1)], Sukanya Srijumpa[(2)], Patcharaporn Tippayawat[(2)], Ratthaphol kraiklang[(3)]**

Received Date: September 11, 2022
Accepted Date: October 17, 2022

** Corresponding author*
(1) Master of Public Health Student in Nutrition for Health, Faculty of Public Health, Khon Kaen University
(2) Department of Associated Medical Science, Faculty of Associated Medical Science, Khon Kaen University
(3) Department of Public Health Administration, Health Promotion, and Nutrition, Faculty of Public Health, Khon Kaen University

Abstract

Inflammation is caused by a triggered immune response by various kinds of stimulator. such as bacteria, viruses, etc. During inflammatory process occurred, cytokines are secreted from immune cells (tumor necrosis factor α (TNFα), Interleukine 6 (IL6), Interleukine1β (IL1β), Interleukine 8 (IL8)) and stimulate cells to respond to the inflammatory process through the action of NF-κB, a nuclear transcription factor that can regulate the expression of various kind of genes which involved in inflammatory processes. The study is aimed to investigate the phytochemical composition from mulberry extracts and gac fruit aril are total phenolic and total flavonoid by folin-ciocalteu spectrometric method and aluminium chloride colorimetry. And the effect to of interleukin 1β (IL1β) and interleukin 6 (IL6) protein secretion inhibiting in leukemia (U9T7) cell cultures. From the study found that the total phenolic and flavonoid contents were highest in gac fruit aril extracts with absolute ethanol and ethyl acetate in a ratio of 6:4 (300.11±610.65 μg equivalent of gallic acid/1 mg crude extract dried weight and 4.68±0.62 μg quercetin/1 mg crude extract dried weight), respectively. For the antioxidant activity, DPPH assay, found that the gac fruit aril extract with distilled water and absolute ethanol and ethyl acetate had similar efficacy, with IC50 values as 0.32±0.02 and 0.37±0.01 mg/mL, respectively, while the FRAP assay showed that the gac fruit aril extract with absolute ethanol and ethyl acetate (6:4) had the highest value as 333.39±6.123 μg equivalent to ascorbic acid per 1 mg crude extract dried weight. The extracts were tested with U9T7 cell line that stimulated to respond to inflammation. The extracts from both mulberry and gac fruit aril showed the inhibition effect of IL1B secretion by non-significantly (P value>0.05). However, the inhibition effect of IL6 secretion was observed in both gac fruit aril extraction solvents by significantly (P value < 0.05). This study shows that both mulberry and gac fruit aril extracts can suppress inflammatory processes. This may be useful in to slow down inflammation in people with non-communicable diseases such as diabetes, which can reduce the severity of the disease.

Keywords: *Mulberry, Gac Fruit, Phytochemicals, Antioxidant Activity, Interleukin 1β, Interleukin 6*

บทนำ

กระบวนการอักเสบเป็นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่ถูกกระตุ้นด้วยสิ่งแปลกปลอมต่างๆ เช่น เชื้อแบคทีเรีย หรือ เชื้อไวรัส เป็นต้น โดยการตอบสนองดังกล่าวก่อให้เกิดการหลั่งสารไซโตไคน์ (cytokine) จากเซลล์ในระบบภูมิภูมิคุ้มกัน (ประเวท เกษกัน, สุภาภรณ์ ศิลาเลิศเดชกุล, และฐาปนีย์ หงส์รัตนาวรกิจ, 2019) โดยเฉพาะไซโตไคน์กลุ่มที่ส่งผลในเกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อ ได้แก่ tumor necrosis factor α (TNFα), Interleukine 6 (IL6), Interleukine1β (IL1β), Interleukine 8 (IL8) ซึ่งหากการอักเสบเกิดขึ้นในระดับสูงโดยเฉพาะอย่างยิ่งหากกระบวนการอักเสบดังกล่าวเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องจะส่งผลเสียต่อร่างกายจนก่อให้เกิดโรคต่างๆ ตามมา (ภัทธิยากร เทสันตะ และคณะ, 2563)

IL1β และ IL6 เป็นไซโตไคน์ที่หลั่งจากเซลล์แมคโครฟาจ ออกฤทธิ์กระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในบีเซลล์ (B cell) และการพัฒนาของทีเซลล์ (T cell) ในระบบภูมิคุ้มกัน และส่งผลให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่ออีกด้วย นอกจากนี้ ภาวะเครียดออกซิเดชั่น (oxidative stress) ที่สูงจะกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีนหลายชนิด ที่สำคัญคือ nuclear factor κB (NFκB) ซึ่งจะกระตุ้นให้เกิดกระบวนการอักเสบ (ชุษณา เมฆโหรา, 2563; งามตา หมื่นยา & สุรพล ตั้งวรสิทธิชัย, 2558) หากมีปริมาณที่สูง จะส่งผลให้ร่างกายเกิดกระบวน การอักเสบอย่างต่อเนื่อง เกิดการกระตุ้นการแสดงออกของยีนอื่นๆ ที่เกี่ยวกับกระบวนการการอักเสบ เช่น nitric oxide (NO), C-reactive protein หรือ acute-phase protein (CRP), tumor necrosis factor α (TNFα), Interleukine 8 (IL8) รวมทั้ง IL1β และ IL6 เป็นต้น (ชุษณา เมฆโหรา, ศิริพร ตันจอ และเนตรนภิส วัฒนสุชาติ, 2561) นอกจากนี้ ยังพบว่าในผู้ป่วยโรคไม่ติดต่อเรื้อรังต่าง ๆ ร่างกายจะมีการหลั่ง IL1β และ IL6 จากเม็ดเลือดขาวในปริมาณที่สูง ก่อให้เกิดการสร้างสารอนุมูลอิสระ ซึ่งจะก่อให้เกิดการอักเสบของ เซลล์ เนื้อเยื่อ ตลอดจนอวัยวะต่างๆ ได้ ฉะนั้นการลดการอักเสบของเซลล์ด้วยการหาสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการหลั่ง IL1β และ IL6 จึงเป็นแนวทางที่มีความเป็นไปได้ในการช่วยลดความรุนแรง และอาการแทรกซ้อนในผู้ป่วยลง จากการศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดจากธรรมชาติโดยเฉพาะในกลุ่มของสารพฤกษเคมี (phytochemical) เช่น อัลคาลอยด์ (alkaloids) เทอปีนอยด์ (terpenoids) ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ซาโปนิน (saponins) แทนนิน (tannins) และ ฟีนอลิก (phenolics) พบว่ามีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคที่เกิดจากการอักเสบเรื้อรัง เช่น โรคเบาหวาน โรคหัวใจ และโรคมะเร็ง เป็นต้น (Mamta et al., 2013) และจากการวิจัยในหลอดทดลองโดยใช้สารฟีนอลิกที่ได้จากการสกัดจากถั่วแดงเพาะงอกเพื่อทดสอบการผลิต NO, TNFα และสารอนุมูลอิสระ ภายใน เซลล์แมคโครฟาจ พบว่าเซลล์ที่เลี้ยงในสารสกัดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สามารถยับยั้งการผลิตสารกลุ่มดังกล่าวภายในเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ชุษณา เมฆโหรา และคณะ, 2561) และจากงานวิจัยการใช้สารสกัดมะรุมในการต้านการทำงานของเซลล์แมคโครฟาจทำให้ผลิตสารก่อการอักเสบ IL1, IL6, TNFα และ NF-κB ลดลง โดยการยับยั้งการแสดงออกของ mRNA ในเซลล์แมคโครฟาจ (Luetragoon et al., 2020)

สารพฤกษเคมี เป็นสารรงควัตถุที่พบได้ทั่วไปในพืช ส่งผลให้พืชเกิดเป็นสีต่างกันออกไป สารเหล่านี้มีฤทธิ์ที่ต่างกัน อาจกล่าวได้ว่าพืชที่มีสีต่างกันย่อมมีปริมาณสารพฤกษเคมี และมีฤทธิ์แตกต่างกันด้วย ผลการศึกษาพบว่าในพืชตระกูลเบอรี่ซึ่งมีสีม่วง ม่วงดำ และสีแดง พืชกลุ่มนี้จะมีสารกลุ่ม ฟลาโวนอยด์ แอนโธไซยานินส์ แคโรทีนอยด์ และฟีนอลิกสูง ซึ่งพืชตระกูลเบอรี่ที่พบในไทย ได้แก่ ตะขบ มะเม่า มะยม ลูกหว้า และลูกหม่อน เป็นต้น (เนตรนภา อุ่นทิ & ฉัตรภา หัตถโกศล, 2562)

ในภูมิภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยเฉพาะจังหวัดขอนแก่น ประชาชนนิยมปลูกต้นหม่อนไว้ตามครัวเรือน และมีการปลูกกันมาหลายชั่วอายุคนทั้งนี้เพื่อเป็นอาหารของตัวไหม จากการศึกษาวิจัยพบว่าทั้งส่วนของใบหม่อน และลูกหม่อนนั้นคุณสมบัติทางด้านการต้านอนุมูลอิสระโดยเฉพาะลูกหม่อน พบว่ามีสารพฤกษเคมีหลายชนิดด้วยกัน เช่น ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) แอนโทรไซยานิน (anthocyanin)

และ สติลบีนอยด์ รวมถึง วิตามินบี และวิตามินซี เป็นต้น (ธิติพันธ์ จันทพิมพ์, 2549) ซึ่งสารดังกล่าวสามารถต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ต้านอนุมูลอิสระช่วยลดภาวะเครียดออกซิเดชั่น และลดกระบวนการอักเสบได้ (ยลดา ศรีเศรษฐ์, กนกวรรณ จารุกำจร, & วรัญญา จตุพรประเสริฐ, 2559; ลือชัย บุตคุป, 2555)

นอกจากต้นหม่อนที่ประชาชนปลูกตามครัวเรือนแล้ว จากรายงานวิจัยการสำรวจเชิงพื้นที่พบว่า ฟักข้าว เป็นพืชเถาชนิดหนึ่งที่มีการปลูกในหลายๆ พื้นที่ ประชาชนนิยมนำเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวมาทำเป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ ทั้งนี้จากการศึกษาวิจัยพบว่า เยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวอุดมไปด้วยสาร สารพฤกษเคมีที่สำคัญได้แก่ เบต้าแคโรทีน และไลโคปีน ซึ่งมีปริมาณที่สูงมากกว่าผักและผลไม้หลายชนิด (ชัชวาล หิงหพล และคณะ, 2560) ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มีฤทธิ์ต่อการต้านอนุมูลอิสระ ต้านเชื้อแบคทีเรีย และ ลดระดับน้ำตาลและไขมันในเลือด (วิภัทรา ศุภะจินดา, 2550; ปวิณา อภิบูลย์ และคณะ, 2560; Chantarangsee, 2015)

จากข้อมูลดังกล่าว ชี้ให้เห็นว่าสารพฤกษเคมีที่พบในลูกหม่อนและเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวนั้นมีฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระและกระบวนการอักเสบ อย่างไรก็ตามจากการทบทวนวรรณกรรมยังไม่พบหลักฐานเชิงประจักษ์ที่ทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากลูกหม่อนและเยื่อหุ้มเมล็ดของผลฟักข้าวในการยับยั้งการสร้างโปรตีน IL1β และ IL6 ผู้วิจัยจึงสนใจในการศึกษาผลของสารสกัดจากพืชต่อการต้านการแสดงออกของ IL1β และ IL6 ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้จะชี้ให้เห็นถึงประโยชน์ของพืชทั้ง 2 ชนิดในแง่ของการลดกระบวนการอักเสบโดยพุ่งเป้าไปยังการยับยั้งการแสดงออกของ IL1β และ IL6 ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ก่อให้เกิดกระบวนการอักเสบอย่างต่อเนื่อง และเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดภาวะแทรกซ้อนในผู้ป่วยเบาหวาน ทั้งนี้ประโยชน์ที่ได้รับจากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ก็เพื่อการต่อยอดองค์ความรู้ของพืชพื้นบ้าน และเป็นแหล่งอาหารป้องกันโรคของคนในชุมชนต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อหาปริมาณของสารพฤกษเคมี ได้แก่ ฟีนอลิก และ ฟลาโวนอยด์ จากลูกหม่อนและเยื่อหุ้มเมล็ดของผลฟักข้าว และศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากลูกหม่อน และ เยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวในการยับยั้งการสร้างโปรตีน IL1β และ IL6 ของเซลล์เพาะเลี้ยงเม็ดเลือดขาวชนิด U9T7 ในภาวะเกิดการอักเสบ

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเชิงทดลอง (*in vitro* experimental study) ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากลูกหม่อน และส่วนเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว ในการยับยั้ง IL1β และ IL6

1) การเตรียมสารสกัด

ทำการเก็บตัวอย่าง ได้แก่ ลูกหม่อนพันธุ์เชียงใหม่ และผลฟักข้าว ในบริเวณจังหวัดขอนแก่น และนำวัตถุดิบเหล่านี้มาทำความสะอาดและเก็บไว้ในที่แห้ง จากนั้นนำหม่อนไปปั่นแยกกาก แล้วเอาส่วนน้ำหม่อนไประเหยแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (lyophilizer) และนำฟักข้าวไปทำการแยกเยื่อออกจากเมล็ด แล้วนำไปอบที่ตู้อบความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนแห้ง จากนั้นนำมาบดละเอียด เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ทำการสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดผลฟักข้าว ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10 โดยใช้พืช 5 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 10 นาที หลังจากนั้นนำไปตั้งพักไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองเอาส่วนสารละลายและนำไประเหยแห้ง (lyophilization) แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทำการสกัดซ้ำ 3 ครั้ง และทำการสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดผลฟักข้าวด้วยแอบโซลูทเอทานอลต่อเอทิลอซิเตทสัดส่วน 6:4 ในอัตราส่วน 1: 10 โดยการนำพืชมา 5 กรัม แช่ในแอบโซลูทเอทานอลต่อเอทิลอะซีเตท สัดส่วน 6:4 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 10 นาที หลังจากนั้นนำไปตั้งพักไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บสารละลายที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

และทำการสกัดซ้ำอีก 1 รอบ กรองเอาส่วนสารละลายและนำไประเหย โดยใช้ rotary evaporator แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทำการสกัดซ้ำ 3 ครั้ง (ดัดแปลงจาก สุภร สุขจำนงค์, 2554)

2) การหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด ด้วยวิธี folin-ciocalteu spectrometric method

วิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด โดยใช้กรดแกลลิก (gallic acid) เป็นสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เริ่มการทดลองจากการนำสารสกัดตัวอย่างที่ได้ 20 ไมโครลิตร เติมสารละลาย 10% folin-ciocalteu reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลาย 7% โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง โดยแต่ละครั้งทำการทดสอบ 3 ซ้ำ แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดจากสมการของกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก แสดงปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิก/มิลลิกรัมสารสกัดแห้ง ของสารสกัดตัวอย่าง (ดัดแปลงจาก Daduang et al., 2011)

3) การหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ด้วยวิธี aluminium chloride colorimetry

การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด โดยใช้เควอซิทิน (quercetin) เป็นสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เริ่มการทดลองจากการนำสารสกัดตัวอย่าง ที่เตรียมไว้มา 30 ไมโครลิตร เติม 99.9% แอบโซลูทเอทานอลปริมาตร 170 ไมโครลิตร เติม 10% อลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3$) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เติม 1 โมลาร์ โพแทสเซียมอะซิเตท (CH_3CO_2K) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง โดยแต่ละครั้งทำการทดสอบ 3 ซ้ำ แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด จากสมการของกราฟมาตรฐานของเควอซิทินในหน่วยในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลเควอซิทินต่อมิลลิกรัมสารสกัดตัวแห้ง (สุธิรา มณีฉาย & ประสบอร รินทอง, 2017)

4) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ใช้ 2 วิธีคือ

4.1) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhy-drazyl)

วิเคราะห์หาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยนำสาร DPPH มา 0.001 กรัม ละลายด้วยร้อยละ 99.9 แอบโซลูทเอทานอล ปริมาตร 25 มิลลิลิตร โดยมีกรดแอสคอร์บิคเป็นสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เริ่มการทดลองจากการนำสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตรที่ความเข้มข้น 40, 80, 120, 160 และ 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ของสารสกัดตัวอย่าง เติมสารละลาย DPPH ปริมาตร 180 ไมโครลิตร แล้วนำไปไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง โดยแต่ละครั้งทำการทดสอบ 3 ซ้ำ แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระ ค่า 50% inhibitory concentration หรือ IC50 ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลกรดแอสคอร์บิคต่อมิลลิลิตร

4.2) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ferric reducing/antioxidant power assay (FRAP)

โดยการเตรียมสารละลาย FRAP reagent โดยเตรียมสารละลาย 0.25 โมลาร์ acetate buffer (pH 3.6), 10 มิลลิโมลาร์ 2,4,6-Tripyridyltriazine (TPTZ) และ 20 มิลลิโมลาร์ Ferric chloride ในอัตราส่วน 10:1:1 โดยมีกรดแอสคอร์บิคเป็นสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 และ 0.06 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เริ่มการทดลองจากการนำสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 90 ไมโครลิตรที่ความเข้มข้น 20%, 40%, 60%, 80% และ 100% ของสารสกัดตัวอย่าง เติมสารละลาย FRAP reagent ปริมาตร 182 ไมโครลิตร

แล้วตั้งไว้ 30 นาทีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร (ดัดแปลงจาก Tinrat et al., 2014) แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลกรดแอสคอร์บิคต่อมิลลิกรัมของสารสกัดแห้ง

4.3) วัดการมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability)

การทดสอบหาฤทธิ์ของสารสกัดจากลูกหม่อนและฟักข้าวต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability) ของเซลล์ U9T7 โดยใช้หลักการของ MTT assay เป็นการใช้ succinate dehydrogenase ในไมโตรคอนเดรียของเซลล์มีชีวิตจะสามารถรีดิวซ์ 3-(4,5-dimethyl-traizolyl-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) ให้กลายเป็นตะกอนสีม่วงของ formazan สามารถละลายด้วย dimethylsulfoxide (DMSO) นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 500-600 นาโนเมตร (ดัดแปลงจาก สุภร สุขจำนงค์, 2554) คำนวณเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ จากนั้นการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์เพื่อวัดการหลั่งไซโตไคน์ โดยนับจำนวนเซลล์ ใส่เซลล์ในจานเพาะเลี้ยงชนิด 24 หลุม (24 Well plate) โดยในแต่ละหลุมเซลล์มีจำนวน 500,000 เซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร เติม phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เลี้ยงเซลล์ในตู้อบเพาะเลี้ยง CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมสารสกัดลูกหม่อน และ สารสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว ที่เจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ ให้ได้ความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเลี้ยงเซลล์ในตู้อบเพาะเลี้ยง CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เติม ไลโพโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide: LPS) ให้ได้ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเลี้ยงเซลล์ในตู้อบเพาะเลี้ยง CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่น supernatant ด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 13,200 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

4.4) วัดปริมาณ IL1β และ IL6

ทำการตรวจวัดปริมาณ IL1β ด้วยวิธี ELISA เป็นการตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์โดยอาศัย หลักการของแอนติเจน-แอนติบอดี โดยติดไว้บริเวณก้นหลุม ด้วย capture antibody และจึงเติม supernatant เพื่อให้แอนติบอดีจับกับแอนติเจน ซึ่งก็คือ ไซโตไคน์ที่อยู่ใน supernatant แล้วเติม detection antibody ที่มีการติดฉลากด้วยไบโอตีน เพื่อให้จับกับไซโตไคน์ที่ต้องการวัดปริมาณ จากนั้นเติม streptavidin ที่ conjugated กับ horseradish peroxidase (HRP) เพื่อให้ Streptavidin จับกับไบโอติน เติม ซับสเตรต เพื่อให้ horseradish peroxidase ทำปฏิกิริยาและเกิดสีขึ้น และจึงนำไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง ELISA plate reader (ดัดแปลงจาก สุภร สุขจำนงค์, 2554)

5) การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูล ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้สถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ ค่าเฉลี่ยกับส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SD) และวิเคราะห์ข้อมูลการยับยั้งการหลั่ง IL1β และ IL6 โดยใช้สถิติเชิงอนุมาณ คือ Mann Whitney U test กำหนดความเชื่อมั่นที่ 95% ด้วยโปรแกรม SPSS v.27

ผลการวิจัย

จากการหาปริมาณสารฟีนอลิกรวมในสารสกัดสกัดจากลูกหม่อน และเยื่อหุ้มเมล็ดลูกฟักข้าวที่ใช้ตัวทำละลายในการสกัดที่ต่างกันคือ ลูกหม่อนใช้น้ำกลั่นเป็นตัวสกัด ในส่วนของฟักข้าวนั้นมีการใช้ตัวทำละลายที่ต่างกันคือ สกัดด้วยน้ำกลั่น และสกัดด้วยแอบโซลูทเอทานอลต่อเอทิลอะซิเตทในอัตรส่วน 6:4 จากผลการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่า สารสกัดที่มีสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงสุดคือ สาร

สกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดลูกฟักข้าวที่สกัดด้วยแอบโซลูทเอทานอลต่อเอทิลอะซิเตทให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุดคือ 300.11±610.65 ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/มิลลิกรัมน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือ สารสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดลูกฟักข้าวสกัดด้วยน้ำกลั่นพบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 244.247±15.08 ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/มิลลิกรัมน้ำหนักแห้ง และลูกหม่อนสกัดด้วยน้ำกลั่นพบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 135.190±6.27 ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/มิลลิกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

การวิเคราะห์สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ในสารสกัดจากหม่อนที่สกัดด้วยน้ำ และเยื่อหุ้มเมล็ดของผลฟักข้าวที่สกัดด้วยน้ำและสกัดด้วยแอบโซลูทเอทานอลต่อเอทิลอะซิเตท ในสัดส่วน 6:4 โดยการคำนวณจากกราฟมาตรฐานของ เควอร์เซติน (quercetin) ได้จากสมการ y = 146.01 + 5.3634 ซึ่งมีค่า R^2=0.9914 ได้ผลดังนี้ จากการวิเคราะห์หาปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 1 คือ สารสกัดที่มีปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุด คือ สารสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดลูกฟักข้าวสกัดด้วยแอบโซลูทเอทานอลต่อเอทิลอะซิเตรท พบสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด คือ 4.68±0.62 ไมโครกรัมสมมูลของเควอร์ซิติน/มิลลิกรัมน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือ สารสกัดจากลูกหม่อนที่สกัดด้วยน้ำกลั่นพบสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด 1.78±0.09 ไมโครกรัมสมมูลของเควอร์ซิติน/มิลลิกรัมน้ำหนักแห้ง และสารสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดลูกฟักข้าวที่สกัดด้วยน้ำกลั่น พบสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด 0.77±0.37 ไมโครกรัมสมมูลของเควอร์ซิติน/มิลลิกรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ

การทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสสระด้วยวิธี DPPH เป็นการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารละลายจากรวมตัวกับ DPPH ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่เสถียร และสามารถรับอิเล็กตรอนได้ เมื่อได้รับอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลอื่นจะทำให้เปลี่ยนเป็นโมเลกุลไม่มีคุณสมบัติที่เป็นอนุมูลอิสระ ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ผลดังนี้ จากการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิระของสารสกัดโดยการทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลงร้อยละ 50 หรือ IC50 (50% inhibitory concentration) โดยการใช้วิตามินซีเป็นสารมาตรฐาน ซึ่งผลแสดงในตารางที่ 2 จากตารางพบว่า สารสกัดที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้สูงสุด คือ สารสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดลูกฟักข้าวที่สกัดด้วยน้ำกลั่น (0.32±0.02 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) รองลงมาคือ สารสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดลูกฟักข้าวที่สกัดด้วยแอบโซลูทเอทานอลต่อเอทิลอะซิเตรท (6:4) (0.37±0.10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และ สารสกัดจากลูกหม่อนที่สกัดด้วยน้ำกลั่น (1.40±0.89 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ตามลำดับ

การทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay เป็นการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด โดยกระบวนการรีดิวซ์ สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) กับ TPTZ (ferric tripyltriazine) ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอรัส (Fe^{2+}) และ TPTZ โดยใช้วิตามินซีเป็นสารควบคุมในการสร้างกราฟมาตรฐานซึ่งมีสมการคือ y=56.154x + 3.631 ซึ่งมีค่า R^2= 0.9984 และเมื่อคำนวณหาค่าของสารสกัดจากกราฟแล้วได้ผลดังนี้ จากการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิระด้วยวิธี FRAP assay ผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 3 ซึ่งจากตารางพบว่า สารสกัดที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้สูงสุด คือ สารสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดลูกฟักข้าวสกัดด้วยแอบโซลูทเอทานอลต่อเอทิลอะซิเตท คือ 333.39±6.123 ไมโครกรัมสมมูลของวิตามินซี /มิลลิกรัมของสารสกัดแห้ง รองลงมาคือ สารสกัดจากลูกหม่อนที่สกัดด้วยน้ำกลั่น คือ 311.97±38.77 ไมโครกรัมสมมูลของวิตามินซี / มิลลิกรัมของสารสกัดแห้ง และ สารสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดลูกฟักข้าวที่สกัดด้วยน้ำกลั่น คือ 256.96±3.01 ไมโครกรัมสมมูลของวิตามินซี /มิลลิกรัมของสารสกัดแห้ง ตามลำดับ

ในการทดสอบหาปริมาณของโปรตีน IL1β จากเซลล์เพาะเลี้ยง ซึ่งผ่านการทดสอบหาปริมาณของสารสกัดสูงสุดที่ทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงมีชีวิตรอดมากกว่า 80% ซึ่งเมื่อทดสอบแล้วได้ปริมาณของสารสกัดที่ต้องใช้ในการศึกษาครั้งนี้เท่ากับ

1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อทำการกระตุ้นเซลล์ให้หลั่งโปรตีน IL1β และทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการหลั่งโปรตีน IL1β ทำการวัดปริมาณโปรตีน IL1β ด้วยวิธี ELISA เมื่อทำการทดสอบความแตกต่างในการยับยั้งการหลั่งโปรตีน IL1β ของสารสกัดจากลูกหม่อนสกัดด้วยน้ำ เยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวสกัดด้วยน้ำ และ เยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวสกัดด้วยแอบโซลูทเอทานอลต่อเอทิลอซิเตท เทียบกับ control cell พบว่าระดับ IL1β มีระดับแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value=0.1375, p-value=0.2565 และ p-value= 0.2565)

การทดสอบการยับยั้งการหลั่งโปรตีน IL6 (interleukin 6) เมื่อทำการวัดการยับยั้งการหลั่งโปรตีน IL6 หลังจากเติมสารสกัดจากลูกหม่อนสกัดด้วยน้ำ เยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวสกัดด้วยน้ำ และ เยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวสกัดด้วยแอบโซลูทเอทานอลต่อเอทิลอซิเตท ให้ผลดังนี้ เมื่อทำการเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการหลั่งโปรตีน IL6 ของสารสกัดจากลูกหม่อนสกัดด้วยน้ำ เยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวสกัดด้วยน้ำ และ เยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวสกัดด้วยแอบโซลูทเอทานอลต่อเอทิลอซิเตท สัดส่วน 6 ต่อ 4 เมื่อเทียบกับ control cell พบว่า เซลล์แมคโครฟาจที่เติมสารสกัดทั้งสามมีระดับโปรตีน IL6 ต่ำกว่า control cell อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value=0.025, p-value=0.025 และ p-value= 0.025)

บทสรุปและอภิปรายผล

จากการคำนึงถึงการนำสารสกัดไปใช้ประโยชน์การลดปริมาณสารที่เป็นพิษในขั้นตอนการสกัดซึ่งต้องคำนึงถึงการนำพิษออกจากสารสกัดหากนำไปใช้ในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้ตัวทำละลายที่ไม่มีความเป็นพิษ ได้แก่ น้ำกลั่น และตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพในการสกัดแต่มีความเป็นพิษ ได้แก่ แอบโซลูทเอทานอลต่อเอทิลอะซิเตท จากการศึกษาพบว่าสารสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดลูกฟักข้าวที่สกัดด้วยแอบโซลูทเอทานอลต่อเอทิลอะซิเตทในอัตราส่วน 6:4 ให้ปริมาณฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด ซึ่งเป็นผลมาจากความมีขั้วของสารละลาย ซึ่งพืชที่ใช้ในการวิจัยเป็นสารอินทรีย์โมเลกุลประกอบด้วยส่วนที่มีขั้วและไม่มีขั้ว สารกลุ่มนี้จึงสามารถละลายได้ดีในเอทานอล รวมถึงเอทานอลฤทธิ์ในการทำลายผนังของเซลล์ที่เก็บสารที่ให้เม็ดสีต่างๆ ของพืชจึงทำให้ได้สารสำคัญได้มากว่าน้ำ และพืชสามารถละลายน้ำได้ปานกลาง เนื่องจากโมเลกุลของน้ำมีขั้วสูง น้ำจึงเหมาะใช้เป็นตัวทำละลายในสารสกัดที่มีขั้วสูง (ภาเกล้า ภูมิใหญ่ & ชญาณิศา สุพา, 2558) สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าที่ทำการศึกษา พบว่าการสกัดกากหม่อนด้วยเอทิลอะซิเตท ได้สารแอนโธไซยานินส์มากกว่าการใช้น้ำ แสดงให้เห็นว่า แอบโซลูทเอทานอลกับเอทิลอะซิเตทสามารถสกัดสารประกอบกลุ่ม ฟีนอลิก และ ฟลาโวนอยด์ ได้ดีกว่าน้ำ (ศุทธินี ลีลาเหมรัตน์, 2556)

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิระของสารสกัดโดยการทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลงร้อยละ 50 หรือ IC50 (50% inhibitory concentration) พบว่า สารสกัดที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้สูงสุด คือ สารสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดลูกฟักข้าวที่สกัดด้วยน้ำกลั่นมีค่าสูงสุด (0.32±0.02 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ สารสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดลูกฟักข้าวที่สกัดด้วยแอบโซลูทเอทานอลต่อเอทิลอะซิเตรท (0.37±0.10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และเมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay พบว่า สารสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดลูกฟักข้าวสกัดด้วยแอบโซลูทเอทานอลต่อเอทิลอะซิเตทมีค่าสูงสุด (333.39± 6.12 ไมโครกรัมสมมูลของวิตามินซี /มิลลิกรัมของสารสกัดแห้ง) การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระทั้ง 2 วิธีได้แก่ DPPH และ FRAP assay แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดลูกฟักข้าว โดยเฉพาะที่สกัดด้วยแอบโซลูทเอทานอลต่อเอทิลอะซิเตทมีค่าที่ดีที่สุด ซึ่งให้ผลในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดจากผลหม่อน อาจจะมีสาเหตุมาจากสารสกัดจากเยื่อหุ้มฟักข้าวมีสารฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าเยื่อฟักข้าวยังมีสารในกลุ่มมีสารในกลุ่ม แคโรทีนอยด์สูง ซึ่งเป็นสารรงควัตถุสีส้มแดง ในฟักข้าว (หยาดฝน ทนงการกิจ และคณะ, 2559) โดยสารกลุ่มแคโรที

นอยด์จะไปหยุดยั้งการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระโดยใช้กลไกลทางฟิสิกส์ โดยเฉพาะเบต้าแคโรทีน มีอิเล็กตรอนในโครงสร้างโมเลกุลสูง จะทำการรับพลังงานจากอนุมูลอิสระได้ดี ได้ผลิตภัณฑ์ออกซิเจนที่มีพลังงานต่ำ และเบต้าแคโรทีนที่มีพลังงานสูง และปล่อยพลังงานออกมาในรูปของความร้อนแทน ด้วยเหตุนี้เองโครงสร้างของเบต้าโรทีนจะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง ทำให้ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดี (อัจฉรา นิยมเดชา & มงคล คงเสน,2556) นอกจากนี้โครงสร้างของแคโรทีนอยด์ที่เป็นสายโซ่ตรงมีพันธะเดี่ยวสลับกับพันธะคู่ ทำให้เกิดระบบคอนจูเกต มีการเคลื่อนย้ายของพายอิเล็กตรอน ทำให้เกิดความเสถียรสูงของโครงสร้าง และยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระได้ดี (ปิยาภัทร ไตรสนธิ, 2560)

การทดสอบการยับยั้งการหลั่งโปรตีน IL1β และ IL6 จากการกระตุ้นเซลล์ด้วย ไลโพโพลีแซคคาไรด์ พบว่าสารสกัดจากฟักข้าวทั้ง 2 ตัวทำละลาย และสารสกัดจากน้ำหม่อน มีแนวโน้มที่จะยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนทั้ง 2 ชนิด โดยเฉพาะโปรตีน IL6 ซึ่งสามารถยับยั้งได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value<0.05) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าในหลอดทดลองจากการนำเอาสารสกัดเบต้าแคโรทีน และไลโคปีน จากเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งสารอักเสบ พบว่าสารสกัดดังกล่าวสามารถยับยั้งการหลั่งของ IL1β IL6 และ TNFα ได้โดยผ่านการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน NFκB (พรพรรณ สุขบุญ, สริพร ตันติโพธิ์พิพัฒน์, & เกมิกา แพรงาม, 2562) นอกจากนี้ยังมีการควบคุมการหลั่งโปรตีน IL6 คือ JAK/STAT signaling pathway กล่าวคือ ไลโปโพลีแซคคาร์ไรด์ ไปกระตุ้น gp130 ซึ่งเป็น IL6 receptor นำไปสู่การกระตุ้นเอนไซม์ JAK tyrosine kinase เกิดกระบวนการ tyrosine phosphorylation ในนิวเคลียสและส่งผลให้เกิดการแสดงออกของยีนและเกิดกระบวนการสร้าง IL6 ขึ้นนั่นเอง (Kishimoto, 2006) ดังนั้นการยับยั้งการสร้างโปรตีน IL1β และ IL6 อาจเกิดจากการที่สารสกัดจากหม่อน และเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวไปกดการสังเคราะห์ยีนที่แสดงออกของ IL1β และ IL6 ใน NFκB pathway หรือ JAK/STAT signaling pathway นั่นเอง กล่าวคือจากข้อมูลการวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากลูกหม่อน สารสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวสามารถยับยั้งการหลั่งโปรตีน IL1β และ IL6 ได้ แสดงให้เห็นว่าพืชทั้งสองชนิดนี้ได้แก่ ลูกหม่อน และเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวมีคุณประโยชน์อย่างยิ่งในการพัฒนาใช้เป็นสารต้านการอักเสบและสารต้านอนุมูลอิสระต่อไป

ข้อเสนอแนะหรือการนำไปใช้ประโยชน์

หากมีการวิจัยเพิ่มเติมในเรื่องนี้ ควรทำการศึกษาสารสกัดหม่อนด้วยแอบโซลูทเอทานอล/เอทิลอะซิเตท และหาปริมาณแคโรทีนอยด์ เพิ่มเติม รวมถึง การพัฒนาใช้เป็นสารต้านการอักเสบ ควรศึกษาความคงตัวของสารฟีนอลิกทั้งหมด และฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และทดสอบความเป็นพิษในสารสกัดร่วมด้วย

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชฎามาศ สกลศิลป์ศิริ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ผู้ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่อง rotary evaporator และขอขอบพระคุณ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และห้องปฏิบัติการคณะเทคนิคการแพทย์สำหรับสถานที่ และครุภัณฑ์ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

งามตา หมื่นยา, & สุรพล ตั้งวรสิทธิชัย. (2558). ภาวะเครียดทางออกซิเดชันเพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ที่มีภาวะแทรกซ้อนทางไต. **วารสารเทคนิคการแพทย์; 43**(1), 61-70.

ชัชวาล หิงหพล. (2560). **ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดจากผลฟักข้าวและใบชะมวงต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ ROS production, MAPK/ERK pathway และไมโตคอนเดรียในเซลล์ neuronal-like neuroblastoma และเซลล์ primary fibroblast ภายใต้สภาวะที่ถูกกดดันด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์.** กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ.

ชุษณา เมฆโหรา. (2563). อนุมูลอิสระ การอักเสบ และเบาหวาน. **วารสารอาหาร, 50**(2), 24-32.

ชุษณา เมฆโหรา, ศิริพร ตันจอ, & เนตรนภิส วัฒนสุชาติ. (2561). คุณสมบัติต้านการอักเสบและอนุมูลอิสระจากภาวะน้ำตาลสูงของสารสกัดถั่วแดงเม็ดเล็กเพาะงอกในเซลล์เม็ดเลือดขาวหนู. **วารสารโภชนาการ, 53**(2), 84-97.

ธิติพันธ์ จันทพิมพ์. (2549). **การเก็บรักษาหม่อนสดพันธุ์เชียงใหม่ (*Morus alba* var. Chaingmai).** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

เนตรนภา อุ่นทิ, & ฉัตรภา หัตถโกศล. (2562). ประโยชน์ต่อสุขภาพของผลไม้ตระกูลเบอรี่ที่ปลูกในประเทศไทย. **วารสารโภชนาการ, 54**(2), 94-105.

ประเวท เกษกัน, สุภาภรณ์ ศิลาเลิศเดชกุล, & ฐาปนีย์ หงส์รัตนาวรกิจ. (2019). การศึกษาระดับความเข้มข้น อินเตอร์ลิวคิน-6 และ ครีเอทีนไคเนส ในนักมวยไทยอาชีพ. **ธรรมศาสตร์เวชสาร, 19**, 38-47.

ปวิณา อภิบูลย์, ลัดดาวัลย์ เส็งกันไพร, ปาริฉัตร ประจะเนย์, บุญเกิด คงยิ่งยศ, & พัชรีวัลย์ ปั้นเหน่งเพชร์. (2560). ผลของสารสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว (*Momordica cochinchinensis* Spreng.) ต่อเมแทบอลิซึมของน้ำตาลและไขมัน ในหนูแรทที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะดื้ออินซูลินด้วยการเลี้ยงอาหารไขมันและฟรุกโตสสูง. **วารสารเภสัชวิทยา, 39**(1), 39-47.

ปิยาภัทร ไตรสนธิ. (2560). แคโรทีนอยด์: ความสัมพันธ์ของโครงสร้างทางเคมีกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ. **วารสารอาหาร, 47**(2), 29-36.

พรพรรณ สุขบุญ, สริพร ตันติโพธิ์พิพัฒน์, & เกมิกา แพรงาม. (2562). ผลของสารสกัดเอทานอลจากเนื้อและเยื่อหุ้มเมล็ดของผลฟักข้าว ต่อภาวะต้านการอักเสบในเซลล์ไลน์แมคโคฟาจของหนูชนิด RAW264.7 ที่เหนี่ยวนำด้วยไลโปโปลีแซคคาร์ไรด์. **วารสารพิษวิทยาไทย, 34**(2), 71-90.

ภาเกล้า ภูมิใหญ่, & ชญาณิศา สุพา.(2558). ตัวทำละลายที่มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากพืชสมุนไพร. ใน **รายงานสืบเนื่องการประชุมวิชาการระดับชาติ สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร ครั้งที่ 2.** (หน้า 627-635). กำแพงเพชร: มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร.

ภัทธิยากร เทสันตะ, จิราพร ละภิล้า, ฐิติยา ลือตระกูล, กาญจนา อู่สุวรรณทิม, ยอดหทัย ทองศร, & พาชื่น โพทัพ. (2563). ผลของสารสกัดจากใบมะรุมต่อ Interleukin-6 ในเซลล์แมคโครฟาจที่กระตุ้นการอักเสบด้วยลิโปโพลีแซคคาไรด์. **วารสารวิชาการสาธารณสุข, 29**(6), 1114-1124

ยลดา ศรีเศรษฐ์, กนกวรรณ จารุกำจร, & วรัญญา จตุพรประเสริฐ. (2559). ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของหม่อน. **วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน, 12**(4), 14-27.

ลือชัย บุตคุป. (2555). **การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นในผลหม่อนสายพันธุ์ต่างๆ**. กรุงเทพฯ: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.

วิภัทรา ศุภะจินดา. (2550). **การพัฒนาและประเมินผลทางคลินิกของสารสกัดมาตรฐานของผลฟักข้าว**. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง.

ศุทธินี ลีลาเหมรัตน์. (2556). **การศึกษาสารประกอบฟีนอลิก คุณสมบัติการต้านออกซิเดชัน และความคงตัวของแอนโธไซยานินส์ในสารสกัดกากลูกหม่อน.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุธิรา มณีฉาย, & ประสบอร รินทอง. (2017). ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลจากดอกชงโค อัญชัน เข็มฝรั่งและพู่จอมพล. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม, 36**(2), 148-153.

สุภร สุขจำนงค์. (2554). **ผลของสารสกัดจากหญ้าแส้ม้าต่อการส่งสัญญาณของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิดโมโนไซต์และเซลล์สมองเพาะเลี้ยงชนิดเอนโดธีเลียล.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

หยาดฝน ทนงการกิจ, กาญจนา นาคประสม, & นักรบ นาคประสม. (2559). ผลของกระบวนการต่อสมบัติทางกายภาพและปริมาณแคโรทีนอยด์ในสีผสมอาหารจากเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว. **วารสารเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม, 11**(1), 47-57.

อัจฉรา นิยมเดชา, & มงคล คงเสน. (2556). เมทาบอลิซึมและคุณประโยชน์ของแคโรทีนอยด์ในการเพิ่มความเข้มของสีไข่. **วารสารมหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์, 5**(4), 112-121.

Chantarangsee, M. (2015). Antioxidant and antibacterial activities of ethanolic extracts from different parts of gac fruit. **KKU Science Journal, 4**3(3), 490-502.

Daduang, J., Vichitphan, S., Daduang, S., Hongsprabhas, P. & Boonsiri, P. (2011). High phenolics and antioxidants of some tropical vegetables related to antibacterial and anticancer activities. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 5**(5), 608-615.

Kishimoto T. (2006). Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. **Arthritis Research & Therapy, 8**(Suppl 2), S2.

Luetragoon, T., Pankla Sranujit, R., Noysang, C., Thongsri, Y., Potup, P., Suphrom, N., et al. (2020). Bioactive compounds in moringa oleifera lam. leaves inhibit the pro-inflammatory mediators in lipopolysaccharide-induced human monocyte-derived macrophages. **Molecules, 25**(1), 191.

Mamta, S., Jyoti, S., Rajeev, N., Singh, D., & Gupta, A. (2013). Phytochemistry of medicinal plants. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 1**(6), 168-182.

Tinrat, S. (2014). Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of unripe and ripe fruit extracts of *Momordica cochinchinensis* Spreng (Gac fruit). **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 28**(1), 75-82.

ตารางที่ 1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดจากลูกหม่อน และเยื่อหุ้มเมล็ดลูกฟักข้าว

ชนิดสารสกัด	ปริมาสารประกอบฟีนอลิกรวม (mean±SD) (ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/มิลลิกรัมน้ำหนักแห้ง)	ปริมาสารฟลาโวนอยด์ (meam±SD) (ไมโครกรัมสมมูลของเควอร์ซิติน/มิลลิกรัมน้ำหนักแห้ง)
ลูกหม่อนสกัดด้วยน้ำกลั่น	135.190±6.27	1.78±0.09
เยื่อหุ้มเมล็ดลูกฟักข้าวสกัดด้วยน้ำกลั่น	244.247±15.08	0.77±0.37
เยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวสกัดด้วย Et:EA*	300.11±610.65	4.68±0.62

* แอบโซลูทเอทนอล:เอทิลอะซิเตท (6:4)

ตารางที่ 2 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากลูกหม่อน และเยื่อหุ้มเมล็ดของลูกฟักข้าว ด้วยวิธี DPPH

ชนิดสารสกัด	DPPH (MEAN±SD) IC50 (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
เยื่อหุ้มเมล็ดลูกฟักข้าวสกัดด้วยน้ำกลั่น	0.32±0.02
เยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวสกัดด้วย Et:EA*	0.37±0.10
ลูกหม่อนสกัดด้วยน้ำกลั่น	1.40±0.89

* แอบโซลูทเอทนอล:เอทิลอะซิเตท (6:4)

ตารางที่ 3 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากลูกหม่อน และเยื่อหุ้มเมล็ดของลูกฟักข้าว ด้วยวิธี FRAB

ชนิดสารสกัด	FRAP (MEAN±SD) (ไมโครกรัมสมมูลของวิตามินซี /มิลลิกรัมของสารสกัดแห้ง)
เยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวสกัดด้วย Et:EA*	333.39±6.12
ลูกหม่อนสกัดด้วยน้ำกลั่น	311.97±38.77
เยื่อหุ้มเมล็ดลูกฟักข้าวสกัดด้วยน้ำกลั่น	256.96±3.01

* แอบโซลูทเอทนอล:เอทิลอะซิเตท (6:4)

ตารางที่ 4 ผลการยับยั้งการหลั่งโปรตีน IL1β ของสารสกัดหยาบ

สารสกัด	Min	Max	Mean	S.D.	p-value
Control cell	562.02	2,239.53	1,403.36	838.77	1.00
ลูกหม่อนสกัดด้วยน้ำ	543.33	1,089.38	901.06	309.94	0.1375
เยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวสกัดด้วยน้ำ	917.95	1,006.44	963.33	44.29	0.2565
เยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวสกัดด้วย Et:EA*	970.55	985.07	976.94	7.41	0.2565

* แอบโซลูทเอทนอล:เอทิลอะซิเตท (6:4)

ตารางที่ 5 ผลการยับยั้งการหลั่งโปรตีน IL6 ของสารสกัดหยาบ

สารสกัด	Min	Max	Mean	S.D.	p-value
Control cell	1,638.46	6,195.38	3,947.16	2,279.06	1.00
ลูกหม่อนสกัดด้วยน้ำ	1,059.23	1,116.46	1,084.36	29.25	0.025
เยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวสกัดด้วยน้ำ	280.00	959.52	644.46	342.44	0.025
เยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวสกัดด้วย Et:EA*	351.08	543.25	462.13	99.52	0.025

* แอบโซลูทเอทนอล:เอทิลอะซิเตท (6:4)