รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและฤทธิ์ยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ของน้ำชาขลู่

Inhibitory effect on lipid peroxidation and antimutagenicity of the herbal tea from *Pluchea indica* Less.

โดย

ดร.ชัชวิน เพชรเลิศ

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๗
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2557A10802141

สัญญาเลขที่ 50/2557

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและฤทธิ์ยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ของน้ำชาขลู่

Inhibitory effect on lipid peroxidation and antimutagenicity of the herbal tea from *Pluchea indica* Less.

โดย

ดร.ชัชวิน เพชรเลิศ

กันยายน พ.ศ. ๒๕๕๘

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยการได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก ทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๗

ผู้วิจัยต้องขอขอบคุณ ผศ.ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข จากภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาที่ได้ให้คำปรึกษาในการทำวิจัยมาตั้งแต่ต้นจนทำให้งานวิจัยเรื่องนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

นอกจากนี้ยังต้องขอบคุณนิสิตชั้นปีที่ ๔ ของภาควิชาชีวเคมี และนิสิตระดับบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ ทุกคนที่ร่วมมือร่วมใจกันในการทำวิจัยจนทำให้ได้ผลการวิจัยอันน่าพึงพอใจ ตลอดจนคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ของภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้คำแนะนำและคอยช่วยเหลือในเรื่องอุปกรณ์และสารเคมีบางส่วนในโครงการวิจัยนี้

ดร.ชัชวิน เพชรเลิศ
หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและฤทธิ์ยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ของน้ำชาขลู่

ชื่อโครงการ (ภาษาอังกฤษ) Inhibitory effect on lipid peroxidation and antimutagenicity of the herbal tea from Pluchea indica Less.

หัวหน้าโครงการวิจัย ดร.ชัชวิน เพชรเลิศ

บทคัดย่อ

ขลู่เป็นพืชในวงศ์ Compositae หรือ Asteraceae มีสรรพคุณทางยาซึ่งใช้กันมาแต่โบราณในแถบภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมทั้งในประเทศไทยด้วย ใบขลู่ถูกใช้บรรเทาอาการทางระบบประสาทและรักษาการอักเสบ ส่วนเปลือกสามารถรักษาโรคริดสีดวงทวาร นอกจากนี้ ใบของขลู่ยังสามารถนำมาเตรียมเป็นชาสำหรับดื่มเพื่อบำรุงสุขภาพ อย่างไรก็ตาม ฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปของชายังไม่มีการศึกษามากนัก การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะศึกษาผลของการเก็บที่อุณหภูมิห้องในที่มืดของชาขลู่ต่อปริมาณฟีนอลรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม การเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันโดยดูจากค่าเปอร์ออกไซด์ ค่าคอนจูเกตไดอีน ค่า TBARS อีกทั้งยังทำการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของชาขลู่ด้วยวิธีเอมส์ต่ออะมิโนไพรีน-ไนไตรท์ในแบคทีเรีย *Samonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ปริมาณฟีนอลรวมของชาขลู่หลังจากเก็บไว้นาน 3 เดือนเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเป็น 992.251±0.005 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/กรัมของส่วนสกัด และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมก็เพิ่มขึ้นเช่นกัน (482.76±0.001 มิลลิกรัมสมมูลของเควอร์เซติน/กรัมของส่วนสกัด) ค่าเปอร์ออกไซด์ (PV) ณ ตอนเริ่มทำการทดลองเพิ่มขึ้นเป็น 91.11% และ 98.52% หลังจากบ่ม 48 ชั่วโมง แต่หลังจากเก็บไว้นาน 3 เดือน ค่า PV กลับลดลงอย่างเห็นได้ชัดเหลือ 83.22% ที่ความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดใบชาขลู่ที่ใช้ในการทดลอง ยิ่งไปกว่านั้น ค่าคอนจูเกตไดอีน (CD) และ TBARS ถูกทำให้ลดลงอย่างมากเมื่อมีสารสกัดจากใบชาขลู่ โดยความสามารถนี้เพิ่มขึ้นตามปริมาณของสารสกัด ค่า CD ระหว่างการเก็บเป็นเวลา 3 เดือนลดลงอย่างมีนัยสำคัญจาก 60.31% เหลือเพียง 25.78% เมื่อบ่มทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ค่า IC_{50} ของสารสกัดต่อค่า TBARS ระหว่างการเก็บเป็นเวลา 3 เดือนเพิ่มขึ้นจาก 0.487±0.001 เป็น 0.497±0.000 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สำหรับการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ด้วยวิธีเอมส์ จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ชาขลู่ไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในระบบที่ใช้ในการทดลอง นอกจากนี้ชาขลู่ที่ความเข้มข้น 0.625 มิลลิกรัมต่อเพลทยังแสดงฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์สูงสุด (ยับยั้งได้ 62.5% ในสายพันธุ์ TA98 และ 55.2% ในสายพันธุ์ TA100 ด้วยวิธีทดสอบเอมส์

Abstract

Pluchea indica Less. (Khlu in Thai) is taxonomically classified in family Compositae (Asteraceae). Its common name is Indian marsh fleabane. *P. indica* has been used in folk medicine in Southeast Asia including Thailand. Its leaves are used as a nerve tonic and for treating inflammation and the bark in decoction form against hemorrhoids. Additionally, *P. indica* leaves are used in the preparation of a herbal tea consumed for promoting good health. However, the characteristics of herbal tea are undescribed. This study aimed to elucidate the storage effect at room temperature in darkness of *P. indica* leaf tea extract on the total phenolic and total flavonoid contents, the lipid peroxidation with three indicators including the conjugated diene (CD), peroxide value (PV) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARs). Additionally, the mutagenicity and antimutagenicity of *P. indica* tea were also determined by Ames test against aminopyrene-nitriteutilising the mutant *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 strains. The results showed that the total phenolic content of tea extract at 3 months storage time significantly raised to 992.251±0.005 mg gallic acid equivalent/g extract and the increase of total flavonoid content of tea extract during 2 months was also observed (482.76±0.001 mg quercetin equivalent/g extract). PV values at 0h typically increased to 91.11% and this value 98.52% at 48h were effectively diminished to 83.22% when incubated with the highest concentration of extracts after 3 months. Moreover, CD values and TBARS could be strongly attenuated by P. indica Less. leaves extracts in dose-dependent manner. CD during storage time for 3 months significantly decreased from 60.31% to 25.78% when incubated with 72h. IC_{50} of extracts against TBARS during storage were observed with the increased significant values by 0.487±0.001 to 0.497±0.000 mg/ml at 3 months. For the Ames assay, no mutagenic activity for both tester strains was observed. In addition, *P. indica* tea at 0.625 mg/plate also showed the moderate antimutagenic property (62.9% of inhibition in TA98 and 55.2% of inhibition in TA100) by Ames test. In conclusion, *P. indica* tea could efficiently inhibit the lipid peroxidation and mutagenicity. It may be used to consume as a healthy food.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
สารบัญ	จ
สารบัญภาพ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	8
บทที่ 3 ผลการวิจัย	13
บทที่ 4 อภิปราย และสรุปผลการทดลอง	20
รายงานสรุปการเงิน	29
บรรณานุกรม	30
ประวัตินักวิจัย	48

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 3-1 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดคอนจูเกตไดอีนของสารสกัดชาขลู่ตามระยะเวลาการเก็บในช่วง 2 เดือน 14

ภาพที่ 3-2 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดเปอร์ออกไซด์ของสารสกัดชาขลู่ตามระยะเวลาการเก็บในช่วง 2 เดือน 15

ภาพที่ 3-3 ผลของสารสกัดชาขลู่ที่ความเข้มข้นต่างๆ ระหว่างการเก็บที่ 60^{0}C ต่อปริมาณ TBARS ตามระยะเวลาที่เก็บ (ก) ผลต่อปริมาณ TBARS ที่เวลาเริ่มต้นของการทดลอง; (ข) ผลต่อปริมาณ TBARS เมื่อเวลาของการทดลองผ่านไป 2 เดือน 15-16

ภาพที่ 3-4 จำนวนโคโลนี Histidine revertants ที่เกิดขึ้นในการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดชาขลูในแบคทีเรีย *S. typhimurium* ก) สายพันธุ์ TA98 ข) สายพันธุ์ TA100 17

ภาพที่ 3-5 จำนวนโคโลนี Histidine revertants ที่เกิดขึ้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ของสารสกัดชาขลูในแบคทีเรีย *S. typhimurium* ก) สายพันธุ์ TA98 ข) สายพันธุ์ TA100 18-19

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 3-1	ปริมาณสารสกัดและ %yield ของการสกัดชาขลู่แต่ละครั้ง	13
ตารางที่ 3-2	ฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดชาขลู่ที่ทดสอบในแบคทีเรีย *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA 100	16
ตารางที่ 3-3	ฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของชาขลู่ ในแบคทีเรีย *S. typhimurium* TA98 และ TA100 ที่บ่มกับสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน	18
ตารางที่ 5-1	สารประกอบฟีนอลและสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่พบในขลู่	22

บทที่ 1

บทนำ

1.1 เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน

ขลู่ (*Pluchea indica* Less.) เป็นพืชในวงศ์ Compositae (Asteraceae) เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก ขึ้นอยู่รวมกันเป็นกอ มีกิ่งก้านสาขามาก สูง 1-1.5 เมตร มักชอบขึ้นริมน้ำตอนบนป่าชายเลน เติบโตได้รวดเร็วในทุกฤดูกาล แตกกิ่งก้านใหม่ได้มากขึ้นเมื่อมีการหักกิ่งก้านไปใช้ มีประโยชน์ทางด้านสมุนไพรในทุกส่วนของต้น โดยเฉพาะใบมีฤทธิ์แก้อักเสบ แก้แผลอักเสบ แก้โรคริดสีดวงทวาร แก้โรคบิด ขับเหงื่อ แก้เบาหวาน (Yuniarti, 2008)

ใบขลู่ประกอบด้วยสารพฤกษเคมีชนิดต่างๆ ได้แก่ สเตอรอล (sterols) เทอร์ปีน (terpenes) และลิกแนน ไกลโคไซด์ (lignan glycosides) (Biswas et al., 2005; Uchiyama et al., 1989; Uchiyama et al., 1991; Mukhopadhyay et al., 1983) และจากรายงานของ Andarwulan และคณะ (2010) พบว่าในขลู่มีฟลาโวนอยด์อยู่เป็นจำนวนมากซึ่งมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์แอนติออกซิแดนท์ Biswas และคณะ (2006) รายงานผลของสารบริสุทธิ์ R/J/3 ที่แยกได้จากส่วนสกัดเมทานอลของรากขลู่ พบว่าสารบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากส่วนสกัดเมทานอลของรากขลู่ คือ β-sitosterol และ stigmasterol สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ phospholipase A2 ในพิษงูแมวเซา สาร β-sitosterol และ stigmasterol ยังแสดงฤทธิ์ต้านพิษงูโดยยับยั้งอัตราการตายจากพิษงูเห่า ยับยั้งพิษต่อระบบประสาท และกล้ามเนื้อหัวใจ รวมทั้งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ phospholipase A2 ในพิษงูเห่า Ohtsuki และคณะ (2008) สกัดสาร quinic acid ester และ quercetin จากใบของต้นขลู่ และพบว่าสารทั้งสองมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ collagenase ในขณะที่สาร quinic acid ester ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ matrix metalloproteinase-2 และ matrix metalloproteinase-9

ปัจจุบันมะเร็งยังเป็นสาเหตุการตายอันดับต้นๆ ของมนุษย์ ด้วยเหตุนี้จึงมีความพยายามสืบค้นศึกษา และวิจัยหาสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งพร้อมๆ กับการค้นคว้าหาสารที่จะนำมาต้านมะเร็ง สาเหตุหลักประการหนึ่งอันจะนำมาซึ่งการเกิดมะเร็งคือ การก่อกลายพันธุ์ (Mutagenesis) ซึ่งเป็นกลไกที่เกิดกับ

ดีเอ็นเอหรือโครโมโซม โดยเป็นการเปลี่ยนแปลงที่โครงสร้างปฐมภูมิของดีเอ็นเอหรือที่ตัวโครโมโซม ทำให้หน่วยพันธุกรรมมีข้อมูลผิดไปจากเดิม การที่ทราบว่าสารใดสามารถต้านกระบวนการก่อกลายพันธุ์ได้ก็น่าจะเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการป้องกันหรือรักษาโรคมะเร็งต่อไปในอนาคต การทดสอบด้วยวิธีของเอมส์ (Ames test) เป็นการทดสอบโดยใช้แบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* เป็นตัวบ่งชี้ฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ เป็นวิธีการที่รวดเร็ว สะดวก ขั้นตอนง่าย ไม่ซับซ้อน ใช้เวลาไม่นานมากก็สามารถรู้ผลเพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานขั้นต้นก่อนจะทำการศึกษาโดยวิธีที่ซับซ้อนมากขึ้น (กัลยารัตน์ และคณะ, 2004)

มีการค้นพบสารพฤกษเคมีในขลู่ เช่น สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) ที่มีฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชัน ลดความเสี่ยงจากอนุมูลอิสระที่เข้าไปทำลายเซลล์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดต่างๆ มีความสำคัญในการยับยั้งการเกิดมะเร็ง และมีคุณสมบัติต้านหรือยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ของสารก่อกลายพันธุ์ได้ในปริมาณที่เหมาะสม Traithip (2548) ศึกษาสารพฤกษเคมีของส่วนสกัดเอทานอลจากใบขลู่ และศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging assay พบว่าสารสกัดของใบขลู่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีโดยมีค่า EC_{50} = 6.92 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ Sen และคณะ (2002) นำส่วนสกัดเมทานอลของรากขลู่มาทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันที่เกิดจากการเหนี่ยวนำโดยคาร์บอนเตตระคลอไรด์ (CCl_4) พบว่า สารสกัดจากขลู่มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลไฮดรอกซีอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยมีค่า IC_{50} = 10.77, 165.62 และ 61.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้นจึงน่าสนใจเป็นอย่างยิ่งที่จะศึกษาเพื่อให้เข้าใจกลไกในการต้านการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดและส่วนสกัดต่างๆ ของใบขลู่โดยใช้การทดสอบเอมส์

1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

การศึกษาวิจัยเพื่อค้นหาสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ เป็นสิ่งที่สำคัญ หากแต่การศึกษาหาสิ่งที่จะนำมารักษาหรือลดความเสี่ยงของการเกิดโรคโดยเฉพาะสารที่ได้รับจากธรรมชาตินั้นน่าจะยิ่งมีความสำคัญมากกว่า ภายใต้ภาวะของอุบัติการณ์ของโรคร้ายต่างๆ ที่มีอยู่ในปัจจุบันโดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคเรื้อรังอันเกิดจากความไม่สมดุลของสารต่างๆ ภายในร่างกาย รูปแบบการดำรงชีวิตที่เปลี่ยนไป รูปแบบการบริโภคอาหารที่ล้วนเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคเหล่านี้แทบทั้งสิ้น

จากการศึกษาทางด้านระบาดวิทยาพบว่า สารอาหารที่ได้รับความสนใจมากที่สุดและเป็นที่ยอมรับว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับการก่อมะเร็ง คือ ไขมัน ซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มอัตราเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็ง ไขมันไม่เพียงแต่จะทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญแก่ร่างกายเท่านั้น แต่ยังรวมอยู่เป็นองค์ประกอบในเมมเบรน และทำหน้าที่ควบคุมของเหลวในเมมเบรน ลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน เป็นกระบวนการที่กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวและฟอสโฟลิพิดเกิดการเสื่อมสภาพหรือเสียสภาพจากการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ ทำให้เกิดลิพิดเปอร์ออกไซด์ขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์หรือ ลิพิดในเลือด และในของเหลวในร่างกายอื่นๆ เป็นต้น อนุมูลอิสระเพียง 1 อนุมูลสามารถทำให้เกิดลิพิดเปอร์ออกไซด์เป็นจำนวนหลายร้อยโมเลกุลก่อนที่จะสิ้นสุดปฏิกิริยา ดังนั้นความเสียหายจะไม่ได้เกิดขึ้นเฉพาะกับเยื่อหุ้มเซลล์เท่านั้น แต่จะขยายวงกว้างไปยังองค์ประกอบอื่นๆ ภายในเซลล์ ซึ่งกระบวนการเหล่านี้อาจทำให้เกิดการตายของเซลล์ การอักเสบ อันจะก่อให้เกิดพยาธิสภาพของโรคความเสื่อมต่างๆ ตามมา เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน (Atherosclerosis) โรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน โรคมะเร็ง โรคอัลไซเมอร์ โรคต้อกระจก เป็นต้น ดังนั้นการศึกษาหาสารออกฤทธิ์จากพืชสมุนไพรที่จะมีผลต่อการลดความเสี่ยงอันอาจจะเกิดขึ้นจากไขมันจึงเป็นแนวทางที่น่าสนใจ เนื่องจากกระบวนการที่จะนำมาอธิบายให้ชัดเจนนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด มีเพียงสมมติฐานที่ตั้งขึ้นมาเป็นแนวทางเพื่อรอการพิสูจน์ต่อไป

นอกจากลิพิดเปอร์ออกซิเดชันแล้ว ในการวิจัยนี้ผู้วิจัยยังสนใจที่จะทำการศึกษาผลของสารสกัดจากขลู่ต่อการกลายพันธุ์ของสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐานซึ่งสามารถกระตุ้นให้เกิดความเสียหายที่ดีเอ็นเอและการเปลี่ยนแปลงที่รหัสพันธุกรรมทั้งในแบบเล็กน้อยไม่กี่เบสซึ่งเป็นการกลายพันธุ์ระดับยีน หรืออาจก่อให้เกิดความผิดปกติที่โครโมโซม การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับโมเลกุลขอลงกรดนิวคลีอิก จะสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมไปยังเซลล์ที่เกิดใหม่ บางครั้งอาจแสดงออกมาให้เห็นที่รูปร่างของสิ่งมีชีวิต หรืออาจเปลี่ยนแปลงจนถึงขั้นกลายเป็นมะเร็งในที่สุด ดังนั้นการค้นหาสารที่จะมายับยั้งกระบวนการก่อกลายพันธุ์รวมถึงกลไกการต่อต้านกระบวนการดังกล่าวจึงเป็นจุดเริ่มต้นที่น่าสนใจสำหรับการหยุดยั้งการพัฒนาไปเป็นมะเร็งอันเป็นสาเหตุการตายลำดับต้นๆ ในปัจจุบัน

ประเทศไทยเป็นประเทศในเขตร้อนชื้นซึ่งมีความหลากหลายของพืชสมุนไพรมากที่สุดแห่งหนึ่งของโลก โดยเฉพาะในเขตภาคตะวันออกของประเทศไทยที่เป็นเขตป่าดิบชื้นและป่าชายเลนที่มีความหลากหลายของระบบนิเวศน์และพันธุ์ไม้ต่างๆ อย่างอุดมสมบูรณ์ เป็นแหล่งสำคัญของสมุนไพรมาโดยตลอด นอกจากนี้ยังมีหมอยาพื้นบ้านและองค์ความรู้ที่ใช้สมุนไพรในการรักษาโรคต่างๆ จนถึงปัจจุบัน

ขลู่ (*Pluchea indica* Less.) เป็นพืชในวงศ์ Compositae (Asteraceae) ลักษณะเป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก ขึ้นอยู่รวมกันเป็นกอ มีกิ่งก้านสาขามาก สูง 1-1.5 เมตร มักชอบขึ้นริมน้ำตอนบนป่าชายเลน มีมากในจังหวัดจันทบุรี เติบโตได้รวดเร็วในทุกฤดูกาล แตกกิ่งก้านใหม่ได้มากขึ้นเมื่อมีการหักกิ่งก้านไปใช้ มีประโยชน์ทางด้วยสมุนไพรในทุกส่วนของต้น โดยเฉพาะใบมีฤทธิ์แก้อักเสบ แก้แผลอักเสบ แก้โรคริดสีดวงทวาร แก้โรคบิด ขับเหงื่อ แก้เบาหวาน จากการศึกษาเก็บข้อมูลเบื้องต้นจากกลุ่มวิสาหกิจชุมชน ที่เกิดการรวมตัวจากเวทีประชาพิจารณ์โครงการส่งเสริมจัดทำแผนการจัดการทรัพยากรชีวภาพระดับสถาบันและท้องถิ่น เทศบาลตำบลบ่อ อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี ได้พบว่าชาวบ้านรวมตัวกันทำผลิตภัณฑ์สบู่เหลว ผง สปาขัดผิว ครีมขัดผิวหน้าจากใบขลู่ รวมทั้งมีการทำชาใบขลู่ออกจำหน่าย แต่มีปัญหาในเรื่องการขาดหลักฐานทางวิทยาศาสตร์มารองรับการนำไปใช้ จึงทำให้คณะผู้วิจัยสนใจที่จะการศึกษาผลของส่วนสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์ที่ได้จากใบขลู่ที่มีฤทธิ์ต้านการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันและฤทธิ์ยับยั้งการก่อกลายพันธุ์เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่ช่วยสนับสนุนการใช้สมุนไพรพื้นบ้านจากขลู่ และเพื่อลดการนำเข้ายาและอาหารเสริมสุขภาพจากต่างประเทศ นอกจากนี้อาจได้สารที่จะนำพัฒนาเป็นยาต้นแบบรักษาโรคต่างๆ ต่อไป

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อหาปริมาณฟลาโวนอยด์จากสารสกัดขลู่และในแต่ละ subfraction จากจันทบุรี
2. เพื่อวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชันของไขมันจากน้ำชาใบขลู่และสารบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากน้ำชาใบขลู่จาก จ.จันทบุรี
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์จากน้ำชาใบขลู่และสารบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากน้ำชาใบขลู่จาก จ.จันทบุรี

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

นำใบขลู่จากกลุ่มวิสาหกิจชุมชน โครงการส่งเสริมจัดทำแผนการจัดการทรัพยากรชีวภาพระดับสถาบันและท้องถิ่น เทศบาลตำบลบ่อ อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี มาสกัดโดยนำใบขลู่คั่วแห้งมาสกัดด้วยน้ำร้อนแบบการชงชา ทำการหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจากส่วนสกัด จากนั้นนำสารที่สกัดได้ทดสอบฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชันของไขมันและฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ซึ่งเป็นการทำในหลอดทดลอง จากนั้นนำน้ำชาไปแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชันของไขมันและฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ แล้วศึกษากลไกการออก

ฤทธิ์ของส่วนสกัดย่อยนั้นและสารบริสุทธิ์ในการออกฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชันของไขมันและฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ต่อสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน

1.5 วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุป ทฤษฎี และ/หรือ แนวทางความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย

ขลู่ (*Pluchea indica* Less.) เป็นพืชในวงศ์ Compositae เป็นสมุนไพรที่ใช้ในงานสาธารณสุขมูลฐานของประเทศไทย มีสรรพคุณทางยาหลายด้าน เช่น รักษาผดผื่นคัน ลดระดับน้ำตาลในเลือด ความดัน และโรคหัวใจ รักษาอาการ ขัดเบา ปัสสาวะพิการ ขับปัสสาวะ ริดสีดวงทวาร แก้กระษัย ขับนิ่ว ขับปัสสาวะ ใช้เป็นยาอายุวัฒนะ แก้ไข้ขับเหงื่อ และแก้เบาหวาน รักษาอาการเส้นตึง หรือนำมาทำเป็นขี้ผึ้งรักษาแผลเรื้อรัง ใบสดตำพอกบริเวณที่เป็นแผล แก้อักเสบ แก้ริดสีดวงจมูก ขับนิ่วในทางเดินปัสสาวะ ใบและราก แก้โรคบิด ขับเหงื่อ แก้แผลอักเสบ รากสดตำพอกบริเวณแผล (มาโนช วามานนท์, เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ, 2540) ในมาเลเซีย หมอยาสมุนไพรเชื่อว่าใบขลู่ (*Pluchea indica* (L.) Less) ใช้รักษาโรคบิด ไขข้ออักเสบ ระงับกลิ่นปากและลมหายใจ ระงับกลิ่นตัว แผลพุพองและแผลเปื่อย ส่วนของรากใช้รักษาอาการไข้ อาหารไม่ย่อย และปวดศีรษะ (Ong, 2004) ปัจจุบันจึงมีการนำขลู่มาทำเป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพ เช่น ชาขลู่ ผงขัดผิวเพื่อใช้ทำสปาผิว สบู่ ยาสระผม กันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในท้องถิ่นที่มีพื้นที่ป่าชายเลน ซึ่งเป็นพื้นที่ที่เหมาะสำหรับการเจริญของต้นขลู่ ถึงแม้ว่าจะเป็นที่ทราบกันดีในกลุ่มหมอยาและแพทย์แผนไทยว่าขลู่มีสรรพคุณต่างๆ มากมาย แต่หลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่มีรายงานส่วนใหญ่มักจะเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติในการลดน้ำตาล ลดความดัน และการขับปัสสาวะ และรายงานจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ว่าน้ำยาชงขลู่ไม่มีความเป็นพิษเฉียบพลันในหนูถีบจักร (มาโนช วามานนท์, เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ, 2540) แต่ข้อมูลเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชันและฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ยังมีค่อนข้างจำกัด ซึ่งทำให้เกิดข้อกังขาได้ว่าการรับประทานผลิตภัณฑ์จากขลู่เป็นประจำเพื่อใช้เป็นยาอายุวัฒนะจะมีผลต่อกระบวนการต่างๆ เหล่านี้หรือไม่ และในกรณีของผู้ป่วยโรคมะเร็งหรือโรคที่เกิดจากความเสื่อมของเซลล์ ผลของขลู่จะมีประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดกระบวนการดังกล่าวหรือไม่ นอกจากนี้ยังมีคำถามต่อไปว่าสารที่พบในขลู่จะมีฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์หรือไม่เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีซึ่งสารดังกล่าวอาจมีฤทธิ์ในการก่อมะเร็งได้เช่นกัน หรือถ้าสารในขลู่ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์แล้ว สารดังกล่าวจะมีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นด้วยสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐานต่างๆ หรือไม่ ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะทดสอบสมมติฐานดังกล่าวซึ่งข้อมูลที่ได้จะ

นำมาใช้เพื่อเป็นหลักฐานสนับสนุนถึงความปลอดภัยและเห็นคุณค่าของการใช้ขลู่เป็นยาสมุนไพรในงานสาธารณสุขมูลฐานและส่งเสริมคุณค่าของผลิตภัณฑ์เพื่อเป็นสินค้าเพื่อสุขภาพในลำดับต่อไป

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป

องค์ความรู้ใหม่ที่ได้จากการสกัดสารที่มีฤทธิ์การยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและฤทธิ์ยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ของส่วนสกัดจากใบขลู่จะสามารถนำไปเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่สนับสนุนคุณค่าทางยาของใบขลู่ หรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่ได้จากใบขลู่ และนำข้อมูลที่ได้จดองค์ความรู้ที่ได้ในรูปสิทธิบัตรได้ ทำให้องค์ความรู้นี้เป็นของประเทศไทย และยังสามารถตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานทางวารสารวิชาการเป็นการสร้างชื่อเสียงให้แก่ประเทศไทย นอกจากนี้สามารถใช้ข้อมูลที่ได้รับจากงานวิจัยไปเป็นพื้นฐานและองค์ความรู้ที่สามารถนำไปต่อยอด และผลิตเป็นยาชนิดใหม่ได้

1.6.2 บริการความรู้แก่ประชาชน

องค์ความรู้ใหม่ที่ได้จากการสกัดสารที่มีฤทธิ์การต้านยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและฤทธิ์ยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ของส่วนสกัดจากขลู่ของใบขลู่ จะสามารถนำไปเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่สนับสนุนคุณค่าทางยาของใบขลู่ เพื่อส่งเสริมให้มีการเพาะปลูกและอนุรักษ์ต้นขลู่มากขึ้น โดยทำการเผยแพร่ผ่านสื่อต่างๆ เช่นรายการวิทยุเพื่อประชาชน และวารสารต่างๆ รวมทั้งข้อมูลที่ได้จะถูกนำเผยแพร่โดยศูนย์การเรียนรู้และท่องเที่ยวเชิงนิเวศป่าชายเลนลุ่มแม่น้ำเวฬุ สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสอน จันทบุรี) อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

1.6.3 บริการความรู้แก่ภาคธุรกิจ และนำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์

ต้นขลู่เป็นพืชที่ศักยภาพต่อการพัฒนาในเชิงพาณิชย์ได้ เพราะมีการเจริญเติบโตได้เร็วเมื่อมีการเก็บเกี่ยว ขึ้นได้ทั่วไปในเขตป่าชายเลนและใกล้เคียง ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่ได้จะเป็นสิ่งยืนยันของประสิทธิภาพของใบขลู่ในการนำมาใช้เป็นชา หรือเป็นสมุนไพรในเครื่องสำอาง ส่งเสริมการขายให้กลุ่มวิสาหกิจชุมชน ทำให้ผู้ซื้อมีความมั่นใจในผลิตภัณฑ์มากขึ้น และผู้ผลิตสามารถขยายตลาดออกไปสู่วงกว้างมากขึ้น รวมทั้งการนำความรู้นี้ไปประยุกต์ใช้ทำยา เครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารอย่างอื่นได้อีก

นอกจากนี้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและฤทธิ์ยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ของส่วนสกัดจากขลู่ที่แยกได้อาจเป็นสารชนิดใหม่และมีประสิทธิภาพดีกว่าสารแอนติออกซิแดนท์เดิมในอุตสาหกรรมอาหารและยา หลังจากจดสิทธิบัตรแล้วสามารถให้ข้อมูลแก่ภาคธุรกิจได้แก่ องค์การเภสัชกรรม หรือ บริษัทยา เป็นต้น เพื่อนำไปผลิตเป็นสูตรยาในเชิงพาณิชย์ต่อไป

1.6.4 เป็นประโยชน์ต่อประชากรกลุ่มเป้าหมาย

ประชากรทั่วไปของประเทศไทยโดยเฉพาะผู้สูงอายุที่มีความเสี่ยงที่จะเกิดโรคที่เกิดจากความเสื่อมและโรคที่เกิดจากอนุมูลอิสระกันมาก จะสามารถได้ใช้ยาที่มีคุณภาพมากกว่าเดิม และผลข้างเคียงน้อยลง นอกจากนี้ในโครงการวิจัยนี้เมื่อแล้วเสร็จ คาดว่าจะสามารถผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่ภายใต้การศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จำนวนไม่น้อยกว่า 2 คน และเป็นโครงงานวิจัยย่อยแก่นิสิตระดับปริญญาตรีประมาณ 3-4 โครงงาน

หน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ได้แก่ สถาบันการศึกษาวิจัย ทั้งในด้านชีวเคมี เภสัชเคมี เช่น คณะวิทยาศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ ในการนำผลการศึกษาไปศึกษาต่อยอด และองค์การเภสัชกรรม หรือหน่วยงาน บริษัทอุตสาหกรรมยา ในการนำไปพัฒนาเป็นสูตรยา และชุมชน และประชาชนมีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์รองรับการใช้สมุนไพรใบขลู่

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 วัสดุและอุปกรณ์

2.1.1 ชุดเครื่องแก้วและเครื่องมือมาตรฐาน

1. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง บริษัท METTLER TOLEDO ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
2. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง บริษัท METTLER TOLEDO ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
3. เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dry)
4. เครื่องนับจำนวนโคโลนี (colony counter)
5. เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) บริษัท IKA work ประเทศมาเลเซีย
6. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) บริษัท Thermo Spectronic
7. เครื่องระเหยตัวทำละลาย (evaporator) บริษัท BUCHI ประเทศไทย
8. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บริษัท Memmert ประเทศเยอรมนี
9. ตู้อบเครื่องแก้วอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส (hot air oven) บริษัท BINDER ประเทศเยอรมนี
10. พาราฟิล์ม (parafilm) บริษัท National Can ประเทศสหรัฐอเมริกา
11. อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
12. Autoclave บริษัท HIRAYAMA ประเทศญี่ปุ่น
13. Eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
14. Micropipette ขนาด20, 200, 1000 ไมโครลิตร บริษัท Nichiyo ประเทศญี่ปุ่น
15. Pipette ขนาด1, 5, 10 มิลลิลิตร

2.2 สารเคมี

1. Agar บริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
2. Ammonium sulfamate ($H_6N_2O_2S$) บริษัท Fluka AG ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

3. 1-Aminopyrene บริษัท Aldrich chemical ประเทศเยอรมนี
4. Citric acid monohydrate บริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
5. Dimethyl sulfoxide (DMSO) บริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
6. Dipotassium hydrogen phosphate, dibasic (anhydrous) (K_2HPO_4) บริษัท BDH
7. D-Biotin บริษัท Sigma chemical ประเทศสหรัฐอเมริกา
8. D(+)-Glucose monohydrate($C_6H_{12}O_6$) บริษัท Fluka AG ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
9. Hydrochloric acid (HCl) บริษัท CARLO ERBA ประเทศเยอรมนี
10. L-Histidine monohydrochloride บริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
11. Magnesium sulfate (Mg SO_4.7H_2O) บริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
12. Magnesium sulphate heptahydrate ($MgSO_4.7H_2O$) บริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
13. Nutrient broth no.2 บริษัท Oxoid ประเทศอังกฤษ
14. Potassium Chloride (KCl) บริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
15. Sodium ammonium hydrogen phosphate tetrahydrate GR ($NaNH_4HPO_4$ .4H_2O) บริษัท Fluka AG ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
16. Sodium Chloride (NaCl) บริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
17. Sodium nitrite ($NaNO_2$) บริษัท BDH chemical ประเทศอังกฤษ

2.2 การเตรียมตัวอย่างพืชที่นำมาใช้ในการศึกษา

การเตรียมตัวอย่างชาขลู่ คือ นำใบชาขลู่ *(Pluchea indica* Less.) ที่ซื้อมาจากวิสาหกิจชุมชนบ้านท่าสอน อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี บดให้เป็นผงละเอียดแบ่งมา 100 กรัม นำไปต้มในน้ำเดือด 1 ลิตร เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นสารสกัดถูกกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1 ที่อุณหภูมิห้องและนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 3000 xg เป็นเวลา 10 นาที ส่วนตะกอนที่เหลือจะถูกนำมาสกัดซ้ำอีกรอบ หลังจากนั้นนำส่วนสกัดที่ได้ทั้งหมดเข้าเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) เพื่อให้สารสกัดเข้มข้นมากขึ้น และนำไปเข้าเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilizer) สารสกัดทั้งหมดจะถูกเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทดสอบ

2.3 การหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Bozin และคณะ, 2008)

นำสารสกัดจากใบขลู่มาเจือจาง ผสมกับ 2% $AlCl_3$ 1ml x $6H_2O$ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 430 นาโนเมตร ปริมาณฟลาโวนอยด์แสดงเป็นไมโครกรัมของ quercetin equivalent (QE) ต่อสารสกัด 1 กรัม

2.4 การศึกษาฤทธิ์ต้านการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน

2.4.1 การทดสอบ TBARS Assay

นำส่วนสกัดมาโฮโมจีไนส์กับ 10% (w/w) trichloroacetic acid (TCA) จากนั้นนำไปใส่ลงในขวดวัดปริมาตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 50 ml กรองผ่านกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 150 mm ผสมสารที่กรองได้กับ 2-thiobarbituric acid 5 ml แล้วต้มในอ่างน้ำ 10 นาที จนเกิดเป็นสีชมพู แล้วทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 nm โดยใช้น้ำกลั่น 5 ml และสารละลาย TBA-reagent 5 ml เป็น blank นำค่า TBARS ที่ได้ไปคำนวณจากกราฟมาตรฐานของ malondialdehyde (MDA) แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

2.4.2 การทดสอบหา Conjugated diene

นำสารสกัดมาผสมกับน้ำกลั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นแบ่งสารสกัดที่ผสมแล้วมาเติม extracting solution (3:1 hexane : isopropanol) 5 ml เป็นเวลา 1 นาที เซ็นตริฟิวจ์ที่ 2000g เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 233 nm คำนวณหาค่าความเข้มข้นของ conjugated diene (CD) เป็น μmol/mg สารสกัด

2.4.3 การวิเคราะห์ค่าเปอร์ออกไซด์

นำส่วนสกัดมาเติมกรดอะซิติก:คลอโรฟอร์ม (3:2) ปริมาตร 3.75 ml เขย่าให้ตัวอย่างเข้ากันดี แล้วตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมง (เขย่าเป็นครั้งคราว) เติมสารละลาย KI อิ่มตัว ปริมาตร 0.0625 ml ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที (เขย่าเป็นครั้งคราว) เติมน้ำกลั่น 3.75 ml แล้วเติม 1% น้ำแป้ง ประมาณ 2 หยด สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีม่วง จากนั้นไทเทรตกับ 0.01N sodium thiosulfate จนสารละลายเปลี่ยนจากสีม่วงกลายเป็นใสไม่มีสี คำนวณหาค่าเปอร์ออกไซด์ แสดงผลเป็น mg เปอร์ออกไซด์/mg สารสกัด

2.5 การศึกษาฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์

2.5.1 แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 และ TA100 ซึ่งใช้ชี้วัดการกลายพันธุ์แบบ frameshift mutation และ base-pair substitution mutation ตามลำดับ แบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ถูกเก็บไว้ที่ -80^{0}C จนกว่าจะนำมาใช้ การเตรียมแบคทีเรียทดสอบ ทำได้โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียใน Oxoid nutrient broth No. 2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชม. จนกระทั่งวัดค่าความขุ่นของเชื้อที่ความยาวคลื่น 620 nm ได้ 0.3-0.4

2.5.2 การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดเมื่อทำปฏิกิริยากับไนไตรท์ในสภาวะที่ไม่มีเอ็นไซม์ S-9 mix โดยผสมส่วนสกัดของขลู่ (2, 8 or 24 mg) กับ 0.2N hydrochloric acid (เพื่อให้มี pH 3.0-3.5) และเติม 2M sodium nitrite ปริมาตร 250 µl ในหลอดทดสอบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชม. จากนั้นนำไปวางในอ่างน้ำแข็งเพื่อหยุดปฏิกิริยาและเพื่อเป็นการกำจัด nitrite ออกจากปฏิกิริยาให้เติม 2M หรือ 4M ammonium sulfamate ปริมาตร 250 µl ลงในหลอดทอสอบ แล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ในอ่างน้ำแข็ง ต่อมานำส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ได้ปริมาตร 100 µl ผสมกับ 0.5M sodium phosphate-potassium chloride buffer (pH 7.4) 500 µl นำเชื้อทดสอบที่เพาะไว้ในอาหารเหลวปริมาตร 100µl ไปบ่มที่อุณหูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำเป็นเวลา 20 นาที เติม molten top agar (45 องศาเซลเซียส) ที่มีส่วนผสมของ 5 mM L-histidine and 5 mM D-biotin ปริมาตร 2 ml ผสมให้เข้ากัน และเทลงจานอาหาร minimal agar นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชม. นับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญซึ่งเป็นกลุ่มที่ถูกกลายพันธุ์เป็น Histidine independence (His$^+$) เปรียบเทียบกับจำนวนแบคทีเรียในชุดควบคุมที่ไม่ใส่สารสกัดจากขลู่ จำนวนแบคทีเรียที่กลายพันธุ์ในชุดทดสอบต้องมีปริมาณมากกว่าแบคทีเรียที่กลายพันธุ์ในชุดควบคุม 2 เท่าโดยประเมินจาก dose response relationship

2.5.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดจากใบขลู่ต่อสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน ตามวิธีของ Peryt และคณะ (1992) โดยนำสารสกัดมาเจือจางให้มีปริมาณต่อเพลทที่เหมาะสม แล้วเติมลงไปในหลอดทดลอง 0.1 ml พร้อมทั้งแบคทีเรีย 0.1 ml โซเดียม-โพแทสเซียมคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 7.4 ปริมาตร 0.5 ml และสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่ 37^{0}C ในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิโดยใช้ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติม top agar 2 ml ผสมให้เข้ากัน เทลงบนจานเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้สักครู่ นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ 37^{0}C เป็นเวลา 48 ชม. จากนั้นนับจำนวนโคโลนี

เปรียบเทียบกับจำนวนโคโลนีที่เกิดจากการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งซึ่งหาได้จากสูตร % Inhibition = [A-B]/A ×100 โดยที่

A = จำนวนโคโลนีที่กลายพันธุ์ (หลังลบด้วยจำนวนโคโลนีที่กลายพันธุ์ตามธรรมชาติ) ในหลอดที่มีแต่สารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน (Standard mutagen)

B = จำนวนโคโลนีที่กลายพันธุ์ (หลังลบด้วยจำนวนโคโลนีที่กลายพันธุ์ตามธรรมชาติ) ในหลอดที่มีสารสกัดกับสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน

2.6 การวิเคราะห์ผล

แสดงข้อมูลที่ได้ในรูปค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน และการทดลองแต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ คำนวณหา IC_{50} ของการยับยั้งโดยการวิเคราะห์แบบถดถอย วิเคราะห์ข้อมูลการทดลองที่ได้ โดยค่าเฉลี่ยของข้อมูลจากแต่ละสภาวะ โดยเปรียบเทียบแบบ Student‘s t-test หรือ one way ANOVA ($P<0.05$) โดยใช้โปรแกรม StatView เวอร์ชัน 5.0

บทที่ 3

ผลการวิจัย

3.1 การเตรียมสารสกัดจากชาขลู่

จากการเตรียมชาใบขลู่อบแห้งซึ่งทำการสกัด 3 ครั้ง แต่ละครั้งเว้นระยะ 1 เดือน ทำให้ได้ yield เท่ากับ 71.70, 68.40 และ 70.10 กรัม หรือเท่ากับร้อยละ 35.85, 34.20 และ 35.05 ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

ตารางที่ 3-1 ปริมาณสารสกัดและ %yield ของการสกัดชาขลู่แต่ละครั้ง

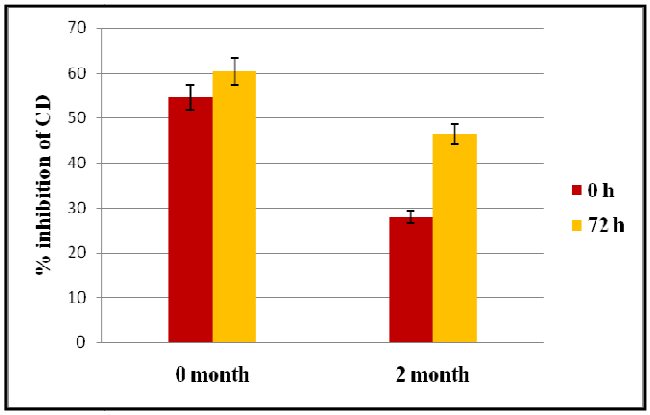
ครั้งที่	น้ำหนักก่อนสกัด (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	% yield
1	200	71.70	35.85
2	200	68.40	34.20
3	200	70.10	35.05

3.2 ปริมาณฟีนอลรวมและฟลาโวนอยด์รวม (Total phenolic and total flavonoid contents)

เป็นที่รู้กันโดยทั่วไปว่าสารประกอบฟีนอลเป็นสารประกอบหลักที่มีอยู่ในพืชโดยทั่วไปที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ในบรรดาสารประกอบฟีนอลต่างๆ นั้น สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบฟีนอลที่มีมากที่สุดและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างดี ที่สำคัญคือสารประกอบเหล่านี้สามารถหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ที่แป็นผลมาจากอนุมูลอิสระได้ (free radical chain reaction) สารสกัดจากชาขลู่มีปริมาณฟีนอลรวมในระหว่างการเก็บเป็นระยะ 2 เดือนเท่ากับ 781.5±0.57 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อตัวอย่าง 1 กรัม ซึ่งเพิ่มขึ้นจากปริมาณตอนเริ่มทำการทดลอง (544.28±0.01 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อตัวอย่าง 1 กรัม) นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณฟลาโวนอยด์รวมหลังจากที่เก็บไว้เป็นระยะเวลา 2 เดือนมีค่าเป็น 188.75±0.002 มิลลิกรัมสมมูลของเควอร์เซตินต่อตัวอย่าง 1 กรัม ซึ่งลดลงจากตอนเริ่มทำการทดลองที่มีค่าเท่ากับ 482.76±0.001 มิลลิกรัมสมมูลของเควอร์เซตินต่อตัวอย่าง 1 กรัม จากผลดังกล่าวพบว่าระยะเวลาการเก็บมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารออกฤทธิ์อย่างมีนัยสำคัญ

3.3 การหาปริมาณคอนจูเกตไดอีน (conjugated diene)

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันของชาขลู่ที่เก็บไว้ในที่มืดนาน 1-2 เดือน ซึ่งดูจากค่าการเกิดคอนจูเกตไดอีน ค่าเปอร์ออกไซด์ และการเกิด TBARS จากการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของคอนจูเกตไดอีนเพิ่มขึ้นตามช่วงเวลาการเก็บที่นานขึ้น และเมื่อใส่สารสกัดชาขลู่ลงไปพบว่าปริมาณคอนจูเกตไดอีนลดลงอย่างชัดเจน โดยจะเห็นได้ว่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดคอนจูเกตไดอีน ณ ตอนเริ่มต้นทำการทดลองที่ความเข้มข้น 0.0625 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เท่ากับ 54.59% และเพิ่มเป็น 60.31% หลังจากบ่มไปแล้ว 72 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม หลังจากที่เก็บชาไว้เป็นเวลา 2 เดือน เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดคอนจูเกตไดอีนกลับลดลงเหลือเพียง 27.93% และ 46.38% เมื่อทำปฏิกิริยาที่ 0 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 3-1) ดังนั้น สารสกัดจากชาขลู่จึงยังพอที่จะลดการยับยั้งการเกิดคอนจูเกตไดอีนในระหว่างการเก็บที่นานขึ้น แม้ว่าฤทธิ์การยับยั้งจะน้อยลงก็ตาม

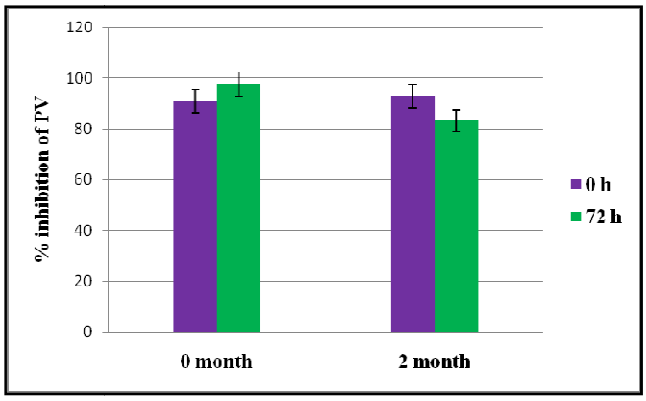


ภาพที่ 3-1 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดคอนจูเกตไดอีนของสารสกัดชาขลู่ตามระยะเวลาการเก็บในช่วง 2 เดือน

3.4 ปริมาณเปอร์ออกไซด์

ในกรณีของการเกิดเปอร์ออกไซด์ในระบบอิมัลชันของน้ำมัน การเติมสารสกัดชาขลู่ลงไปมีผลค่อนข้างมากต่อปริมาณการเกิดเปอร์ออกไซด์ในระหว่างการทดลอง ภาพที่ 3-2 แสดงให้เห็นว่า ระยะเวลาการเก็บที่นานขึ้นไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดเปอร์ออกไซด์ โดยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเปอร์ออกไซด์ที่วัดได้ตอนเริ่มต้นทำการศึกษามีค่าเท่ากับ 91.11% และ 97.65% ที่เวลาเริ่มต้น และเมื่อบ่มทำปฏิกิริยา 72

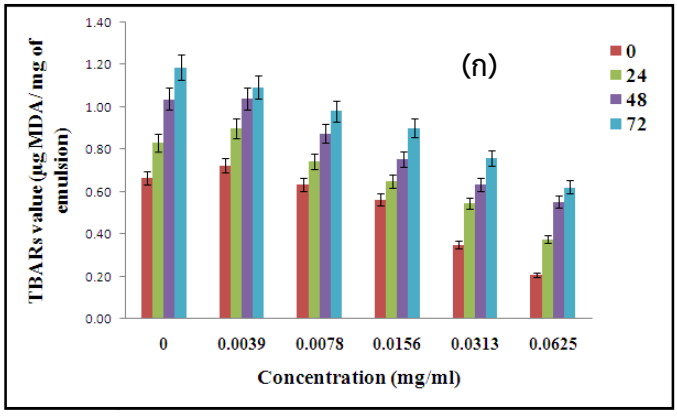
ชั่วโมง ตามลำดับ หลังจากผ่านไป 2 เดือน ค่านี้เปลี่ยนแปลงไปเล็กน้อยเป็น 92.88% และ 83.22% ที่เวลาเริ่มต้น และเมื่อบ่มทำปฏิกิริยา 72 ชั่วโมง ตามลำดับ

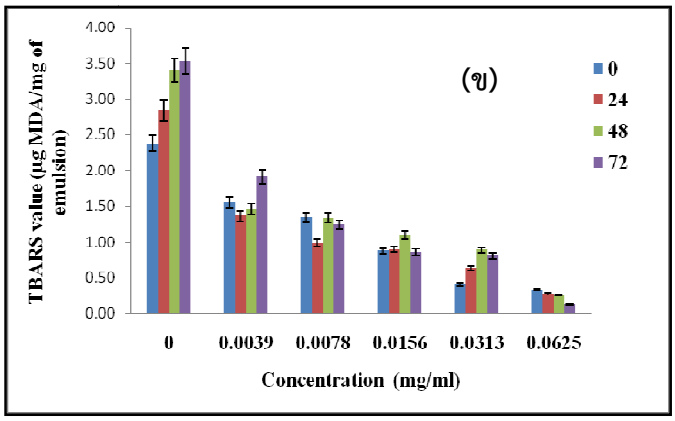


ภาพที่ 3-2 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดเปอร์ออกไซด์ของสารสกัดชาขลู่ตามระยะเวลาการเก็บในช่วง 2 เดือน

3.5 การหาปริมาณ TBARS

การวิเคราะห์ปริมาณ TBARS เป็นการทดสอบการเกิดผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิของการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง malondialdehyde ซึ่งอาจจะก่อให้เกิดกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์จากน้ำมันที่ถูกออกซิไดส์ การวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลจากค่า TBARS แสดงให้เห็นว่า สารสกัดชาขลู่มีผลต่อค่า TBARS ในช่วงระยะเวลาการเก็บอย่างเห็นได้ชัด (ภาพที่ 3-3) ผลการทดลองพบว่า การเก็บน้ำมันเป็นระยะเวลานานๆ ทำให้ลิพิดถูกออกซิไดส์เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตาม สารสกัดจากชาขลู่สามารถทำให้ค่า TBARS ลดลงได้ตามความเข้มข้นที่เพิ่มมากขึ้น โดยมีค่า IC_{50} ต่อการเกิด TBARS เท่ากับ 0.0427 และ 0.0111 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ณ ตอนเริ่มการทดลอง และเมื่อผ่านไป 2 เดือน ตามลำดับ





ภาพที่ 3-3 ผลของสารสกัดชาขลู่ที่ความเข้มข้นต่างๆ ระหว่างการเก็บที่ 60^0C ต่อปริมาณ TBARS ตามระยะเวลาที่เก็บ (ก) ผลต่อปริมาณ TBARS ที่เวลาเริ่มต้นของการทดลอง; (ข) ผลต่อปริมาณ TBARS เมื่อเวลาของการทดลองผ่านไป 2 เดือน

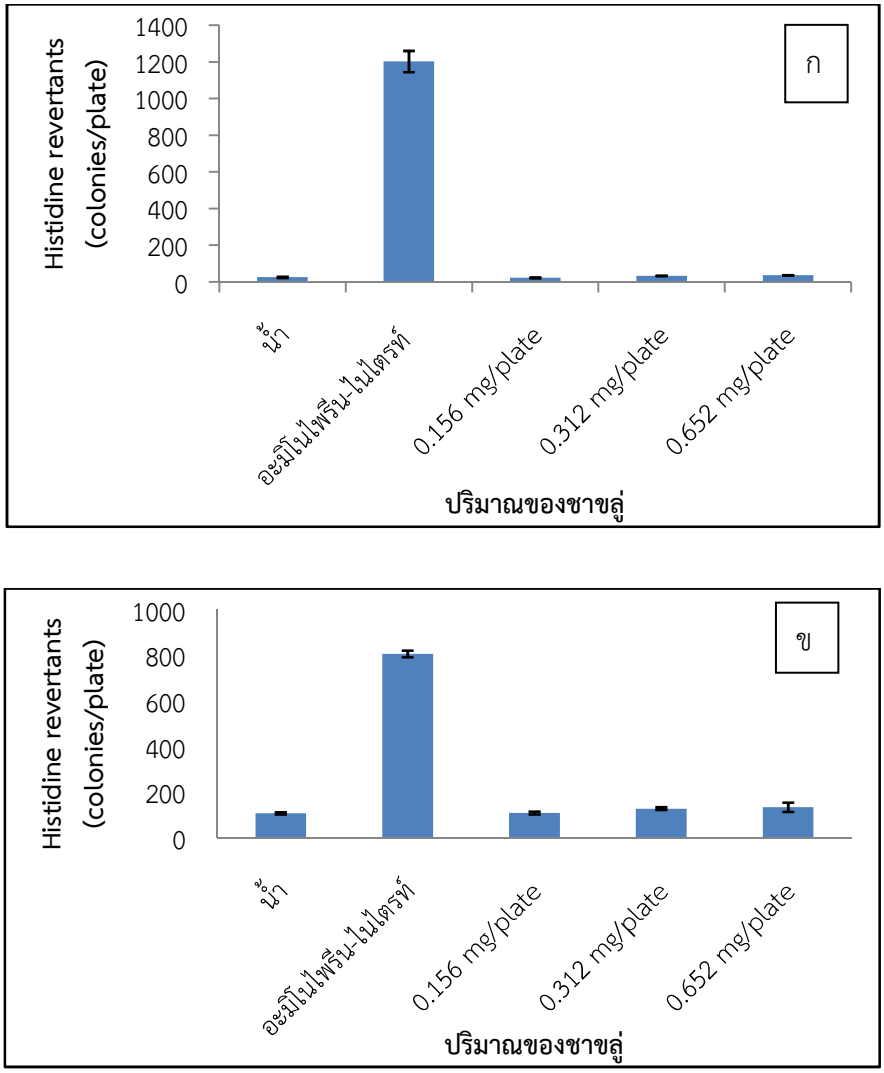
3.5 การตรวจสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของชาขลู่

ฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดชาขลู่ถูกนำมาทดสอบในแบคทีเรีย *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ด้วยการทดสอบเอมส์ พบว่าสารสกัดชาขลู่ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ทั้งแบบการเลื่อนของเบส (frameshift mutation; TA98) และแบบการแทนที่ของเบส (base-pair substitution; TA100) (ตารางที่ 3-2)

ตารางที่ 3-2 ฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดชาขลู่ที่ทดสอบในแบคทีเรีย *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA 100

ตัวอย่าง	Histidine revertants (โคโลนี/เพลท)	
	TA 98	TA 100
น้ำ	25.5±3.5	109.0±4.6
อะมิโนไพรีน-ไนไตรท์	1202.3±58.1[a]	806.3±14.7[b]
ขลู่ 0.156 mg/plate	22.7±2.1	110.0±6.2
ขลู่ 0.312 mg/plate	33.3±0.6	129.3±6.1
ขลู่ 0.625 mg/plate	36.5±0.7	135.3±20.2

[a, b] แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$



ภาพที่ 3-4 จำนวนโคโลนี Histidine revertants ที่เกิดขึ้นในการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดชาขลู่ในแบคทีเรีย *S. typhimurium* ก) สายพันธุ์ TA98 ข) สายพันธุ์ TA100

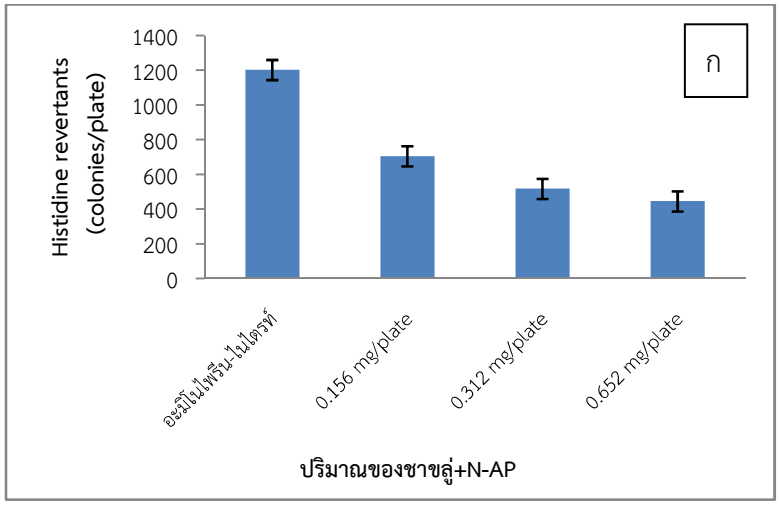
3.6 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ของชาขลู่ต่อผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างอะมิโนไพรีน-ไนไตรท์

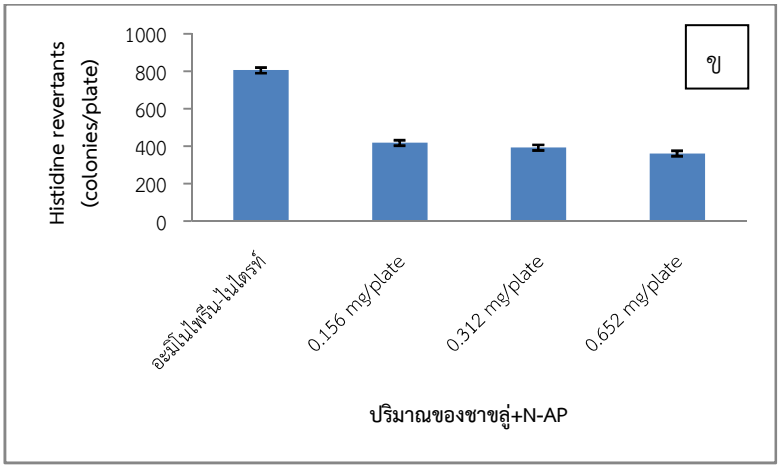
ไนไตรท์เป็นสารเคมีที่ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์แต่สามารถทำปฏิกิริยากับ 1-อะมิโนไพรีน แล้วได้เป็นสารก่อกลายพันธุ์ โดยไม่ต้องเติมระบบกระตุ้นสารพิษจากตับหนูลงไป (แก้ว กังสดาลอำไพ, 2546) ในการศึกษาฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ของสารสกัดชาขลู่ต่อผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง 1-อะมิโนไพรีนกับโซเดียมไนไตรท์โดยใช้แบคทีเรีย *S. typhimurium* TA98 และ TA100 เป็นตัวทดสอบ พบว่า ในแบคทีเรียสายพันธุ์ TA98 และ TA100 สารสกัดชาขลู่ทุกความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบสามารถยับยั้งการกลายพันธุ์ได้

ในระดับที่สูง (ตารางที่ 3-3) โดยสารสกัดชาขลู่ที่ความเข้มข้น 0.625 mg/plate สามารถยับยั้งการกลายพันธุ์ใน *S. typhimurium* TA98 ได้ถึง 62.9% ส่วนในสายพันธุ์ TA100 สามารถยับยั้งการกลายพันธุ์ได้ 55.2% จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดชาขลู่สามารถต้านการกลายพันธุ์แบบการเลื่อนของเบสได้ดีกว่าการกลายพันธุ์แบบการแทนที่ของเบส

ตารางที่ 3-3 ฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของชาขลู่ ในแบคทีเรีย *S. typhimurium* TA98 และ TA100 ที่บ่มกับสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน

ตัวอย่าง	Histidine revertants (โคโลนี/เพลท)			
	TA 98	% Antimutagenicity	TA 100	%Antimutagenicity
อะมิโนไพรีน-ไนไตรท์ +ขลู่ 0.156 mg/plate	704.5±29	41.4	418.0±50.9	48.20
อะมิโนไพรีน-ไนไตรท์ +ขลู่ 0.312 mg/plate	517.5±16.3	57.0	392.5±16.3	51.30
อะมิโนไพรีน-ไนไตรท์ +ขลู่ 0.625 mg/plate	445.5±34.6	62.9	361.5±24.7	55.2





ภาพที่ 3-5 จำนวนโคโลนี Histidine revertants ที่เกิดขึ้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ของสารสกัดชาขลู่ในแบคทีเรีย *S. typhimurium* ก) สายพันธุ์ TA98 ข) สายพันธุ์ TA100

บทที่ 4

อภิปราย และสรุปผลการทดลอง

4.1 อภิปรายผลการทดลอง

ขลู่ (*Pluchea indica* Less.) เป็นพืชในวงศ์ Asteraceae ซึ่งมีอยู่มากในหลายทวีปทั้งอเมริกาเหนือ อเมริกาใต้ แอฟริกา เอเชีย และออสเตรเลีย มักมีถิ่นกำเนิดในบริเวณพื้นที่เขตร้อนหรือเขตอบอุ่น (Sharma & Goyal, 2011) โดยมีรายงานว่า ขลู่มีฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Sen & Chaudhuri, 1991; Sen et al., 1993) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Sen et al., 2002) ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท ฤทธิ์ต้านจุลชีพ มีฤทธิ์ฝาดสมาน (Sen, Ghosh & Chauhuri, 1993) แก้ไข้ เป็นยาระบายอ่อนๆ รักษาอาการริดสีดวงทวาร ปัสสาวะกะปริดกะปรอย (Sharma & Goyal, 2011) สารเคมีที่พบในพืชตระกูลนี้ คือ สารในกลุ่ม eudesmane-type sesquiterpenoids, monoterpenes, lignan glycosides, triterpenoids และ flavonoids ซึ่งมีการศึกษาก่อนหน้านี้ถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดที่ได้จากลำต้นและรากของขลู่ (Noridayu et al., 2011; Sen et al., 1991; Sen et al., 1993; Gomes et al., 2007; Sen et al., 2002). แม้ว่าใบของขลู่จะถูกนำมาทำเป็นชาและยาพื้นบ้านแต่การศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพในใบชาขลู่ยังค่อนข้างน้อยมาก มีบางการศึกษาที่รายงานถึงการนำไปรักษาอาการอักเสบและบรรเทาอาการปวด นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Traithip (2005) ที่พบว่าขลู่ยังสามารถใช้เป็นยารักษาอาการความดันโลหิตสูง เบาหวาน โรคหัวใจ ยาขับปัสสาวะ

จากการศึกษาในปัจจุบันพบว่า %yield ที่ได้หลังจากการสกัดแล้วของน้ำชาใบขลู่ในช่วงระหว่างการเก็บ 0-3 เดือน เท่ากับ 34.8 35.85 34.2 และ 35.05% ตามลำดับ โดยน้ำหนักของสารสกัดที่ได้ขึ้นอยู่กับตัวทำละลาย เวลาที่ใช้ในการสกัด อุณหภูมิของการสกัด และคุณสมบัติทางเคมีของสารออกฤทธิ์ที่มีอยู่ในตัวอย่าง (Kaneria, Kanani & Chanda, 2012)

สารประกอบฟีนอลเป็นกลุ่มของสารทุติยภูมิที่มีอยู่มากที่สุดในพืช มีองค์ประกอบที่เป็นวงอะโรมาติกที่มีหมู่ไฮดรอกซิลหนึ่งหมู่หรือมากกว่านั้น ในธรรมชาติมักจะพบสารประกอบฟีนอลจับอยู่กับน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ทำให้มีแนวโน้มที่จะละลายน้ำได้ดีขึ้น สารประกอบฟีนอลมีหลายชนิด หนึ่งในนั้นได้แก่ สารประกอบฟลาโวนอยด์ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีการศึกษามากที่สุด สารประกอบฟลาโวนอยด์มีคาร์บอน 15 คาร์บอน

ประกอบด้วยวงฟีนอล 2 วงที่ถูกเชื่อมกันด้วยคาร์บอน 3 ตัว (Manyadele & Ann, 1999) ปริมาณฟีนอลรวมของส่วนสกัดจะถูกทดสอบด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method (Simrany, 2003) โดยตัวอย่างที่มีสารประกอบฟีนอลจะถูกรีดิวซ์โดยสาร Folin-Ciocalteu เกิดผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน จากหลักการดังกล่าวถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดจากใบชาขลู่โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน มีหลายการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์น่าจะมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Rice-Evans et al., 1996; Manyadele & Ann, 1999) ดังนั้นเพื่อที่จะหาปริมาณฟีนอลและฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดจากชาใบขลู่ (ที่ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ในขณะที่เก็บชาไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดในช่วงระยะเวลาการเก็บ 0-3 เดือน ได้ผลดังตารางที่ 4-2 โดยสารประกอบฟีนอลรวมหลังจากที่เก็บไว้นาน 3 เดือนมีปริมาณที่สูงขึ้นกว่าตอนเริ่มการทดลอง (992.25±0.05 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/กรัมของส่วนสกัด) และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมหลังจากเก็บไว้ 2 เดือนก็พบว่าเพิ่มขึ้น (482.76±0.001 มิลลิกรัมสมมูลของเควอร์เซติน/กรัมของส่วนสกัด) มากกว่าตอนเริ่มการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการเพิ่มขึ้นนี้ทั้งของปริมาณฟีนอลและฟลาโวนอยด์รวมก็เพิ่มตามความเข้มข้นของสารสกัดด้วย ซึ่งการเพิ่มขึ้นของสารออกฤทธิ์นี้อาจจะเป็นผลมาจากการระเหยของน้ำในใบชาในระหว่างการเก็บเป็นเวลานานๆ อุณหภูมิ แสงแดด และสภาพอากาศ นอกจากนี้ยังมีปัจจัยต่างๆ เป็นจำนวนมากที่ส่งผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลในพืช เช่น ระยะเวลาการเก็บ สภาพของสิ่งแวดล้อมที่ปลูก กระบวนการแปรรูป และการเก็บเป็นเวลานานซึ่งอาจจะส่งผลต่อการสลายตัวของสารประกอบในกลุ่มนี้ อย่างไรก็ตาม จากตารางที่ 5-1 จะเห็นได้ว่าสารประกอบต่างๆ เหล่านี้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพดีซึ่งสัมพันธ์กับการศึกษาของ Pinitsoontorn et al. (2012) ที่แสดงให้เห็นว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างสูงถูกพบได้ในขลู่เช่นกัน โดยการศึกษาปัจจุบันพบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดจากใบชาขลู่ (R^2 = 0.92) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารประกอบดังกล่าวเป็นสารที่ส่งผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของชาขลู่ Pajaree (2006) พบว่า สภาวะของการเก็บอาจส่งผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลซึ่งถูกออกซิไดส์ได้ค่อนข้างง่าย ปฏิกิริยาออกซิเดชันส่งผลต่อการเกิดสารพอลิเมอร์ต่างๆ อันจะนำมาซึ่งการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของอาหารและเครื่องดื่มโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเรื่องสีและรสชาติ การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจส่งผลทั้งในแง่บวก (ในกรณีของชาดำ) และในแง่ลบที่จะเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลของใบชาซึ่งมีผลต่อการยอมรับของผู้บริโภค จากการศึกษาของ Siriporn (2006) แสดง

ให้เห็นว่า ปัจจัยในเรื่องสายพันธุ์และระยะเวลาการเก็บส่งผลต่อปริมาณฟีนอลรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่างๆ ของเหง้ากระชายดำ (*Kaempferia parviflora*) เช่นกัน ยิ่งไปกว่านั้น ยังพบว่าระยะเวลาการเก็บยิ่งนานยิ่งทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลของเหง้ากระชายดำเพิ่มมากขึ้นรวมทั้งทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นเช่นกัน การศึกษาของ Jamalomidi and Gholami (2013) ก็พบว่าปัจจัยเกี่ยวกับสิ่งแวดล้อมในช่วงการเก็บรักษามีผลทางอ้อมต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดพืชซึ่งเป็นผลมาจากปริมาณความชื้นของเมล็ด ดังนั้น วิธีบรรจุชาน่าจะสามารถลดความเสี่ยงต่อความชื้นที่จะเกิดขึ้นในขณะที่เก็บชาไว้เป็นเวลานานๆ จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการเก็บชาไว้กับทรายละเอียด (5% โดยน้ำหนัก) ในที่มืดโดยมีความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 95% และอุณหภูมิต่ำกว่า 10°C ตลอดระยะเวลาการเก็บ 6 เดือนก็ยังสามารถคงความสารถทางชีวภาพของชาเอาไว้ได้

ตารางที่ 5-1 สารประกอบฟีนอลและสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่พบในขลู่

Research	Phenolic and flavonoid compounds
Kattisri (2002)	β-thujene, α-copaene, β-cubebene, β-caryophyllene, caryophyllene oxide, sabinene, limonene, δ-carene, azulene, cis-caryophyllene, α-humulene, isopropyl myristate and δ-cadinene
Andarwulan et al. (2010)	quercetin, kaempferol, myricetin, luteolin and apigenin
Shaida et al. (2011)	caffeoyl quinic acid, caffeoylquinic acid and quercetin
Jonathan et al. (2012)	tannins, saponins, flavonoids and proanthocyanidins

ลิพิดเปอร์ออกซิเดชันเป็นผลจากการเสื่อมสภาพของไขมันประเภทไม่อิ่มตัว กรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นสารชีวโมเลกุลที่สำคัญต่อโครงสร้างและกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ กรดไขมันประเภทนี้มีทั้งที่อยู่ในรูปกรดไขมันอิสระ เช่น กรดอะราชิโดนิกซึ่งเป็นสารต้นตอของการสังเคราะห์สารในกลุ่ม prostanoid (prostaglandin leukotrienes และ prostacyclins) ในรูป thioester (acetyl-SCoA) และในรูป esters (triglycerides phospholipids sphingolipids และ cholesteryl-esters) กรดไขมันไม่อิ่มตัวในธรรมชาติจะมีพันธะคู่ในรูป cis 1 พันธะหรือมากกว่านั้น โดยที่พันธะคู่แต่ละพันธะจะถูกแยกห่างกันด้วยหมู่ allylic methylene (CH_2) ด้วยลักษณะของโครงสร้างทางเคมีดังกล่าว ทำให้กรดไขมันไม่อิ่มตัวสามารถที่จะทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระและเกิดการออกซิไดส์ (Tappel, 1984) การออกซิไดส์ไขมันและปฏิกิริยา auto-

oxidation ของไขมันเป็นปัญหาหลักที่ทำให้คุณภาพของอาหารเกิดการเสียสภาพและนำไปสู่การทำให้คุณค่าทางโภชนาการลดลงตามไปด้วย นอกจากนี้ Fernandez et al. (1997) ยังพบว่าการออกซิเดชันกรดไขมันไม่อิ่มตัวจะนำไปสู่โรคความเสื่อมต่างๆ เช่น ภาวะหลอดเลือดแดงแข็งตัว (coronary atherosclerosis) มะเร็ง (cancer) และโรคตับแข็ง (cirrhosis) ลิพิดเปอร์ออกซิเดชันเป็นกระบวนการที่ซับซ้อนเกิดขึ้นมากในสภาวะที่มีออกซิเจน โลหะหนัก และเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาต่างๆ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่ ขั้นเริ่มต้น (initiation) ขั้นลุกลาม (propagation) และขั้นสิ้นสุดปฏิกิริยา (Jadhav et al., 1996)

ขั้นตอนต่างๆ เหล่านี้จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องหลังจากเริ่มเกิดปฏิกิริยา เกิดผลิตภัณฑ์เป็น lipid peroxide lipid alcohol และ aldehyde ฉะนั้น เพื่อที่จะศึกษาผลของการเก็บรักษาในช่วงเวลาต่างๆ (0-3 เดือน) ที่อุณหภูมิในที่มืดต่อความสามารถในการยับยั้งการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันของสารออกฤทธิ์ของใบชาขลู่ จึงทำการศึกษาตัวบ่งชี้ต่างๆ คือ ผลต่อการเกิด conjugated dienes (CD) ค่า peroxide value (PV) และ การเกิด thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) ซึ่งเป็นดัชนีที่ใช่บ่งชี้ถึงการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันในขั้นต่างๆ

การวัดปริมาณ CD ถูกใช้เพื่อที่จะศึกษาปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันต่างๆ รวมทั้งการเกิดออกซิเดชันของไลโพโปรตีนชนิดความหนาแน่นน้อย (low density lipoprotein; LDL) (Gordon et al., 2001) โครงสร้างของ CD จะมีการจัดเรียงพันธะเป็น -C=C-C=C- ซึ่งดูดกลืนแสงในช่วง UV (ความยาวคลื่นในช่วง 230–235 nm) จึงต้องตรวจสอบด้วยวิธี UV absorption spectrophotometry (Wanasundara et al., 1995) ในปี 1933 มีการรายงานว่า การเกิด CD ในไขมันและน้ำมันจะตรวจสอบได้จากพีคของกราฟที่ 230–235 nm ในช่วง UV ต่อมาในปี 1960s จึงมีการใช้ CD เป็นตัวติดตามการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (Antolovich et al., 2002) การเพิ่มขึ้นของการดูดกลืนแสง UV จะสะท้อนถึงการเกิดผลิตภัณฑ์ปฐมภูมิ (primary oxidation products) ในไขมันและน้ำมัน การดูดกลืนแสง UV ของ CD ตรวจวัดได้ค่อนข้างง่าย รวดเร็ว และไม่ต้องการสารเคมีเพื่อทำปฏิกิริยา นอกจากนี้ยังใช้ปริมาณสารตัวอย่างที่ไม่มากนัก อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีความจำเพาะและความไวค่อนข้างน้อยกว่าการวัดค่า PV (Gordon et al., 2001) จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากใบชาขลู่สามารถยับยั้งการเกิด CD ได้ ภาพที่ 3-1 แสดงถึงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิด CD ของสารสกัดชาขลู่ที่เวลาเริ่มต้น (เดือนที่ 0) เมื่อทำการบ่มที่ 0-72 ชั่วโมง ผลจากการเก็บนานๆ ทำให้สารต้านอนุมูลอิสระในใบชาลดลง อย่างไรก็ตาม สารสกัดชาขลู่ยังคงแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเกิด CD

สารสำคัญในใบชาขลู่ (ตารางที่ 5-1) สามารถจับกับ lipid radicals และสามารถยับยั้งการเกิด CD ได้ Lee et al. (2004) รายงานว่า กลไกในการต้านอนุมูลอิสระของสารในธรรมชาติมักอยู่ในรูป β เช่น β-cubebene, β-caryophyllene ซึ่งสามารถให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่ lipid radicals หรือกำจัดอนุมูล singlet oxygen และการกำจัดโมเลกุลของออกซิเจน ยิ่งไปกว่านั้น ความสามารถดังกล่าวอาจเกี่ยวข้องกับการเกิดสารในกลุ่ม tocopherols และ flavonoids นอกจากนี้ยังอาจเกี่ยวข้องกับการคีเลทโลหะและการกำจัดออกซิเจนซึ่งจะทำให้ลิพิดเปอร์ออกซิเดชันเกิดได้ช้าลง (Kanatt et al., 1998)

ลิพิดเปอร์ออกซิเดชันยังเกี่ยวข้องกับการเกิด hydroperoxides ซึ่งจะสามารถถูกสลายไปเป็นผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิอื่นๆ ทั้งที่ระเหยได้และระเหยไม่ได้ (Melton, 1983) อัตราการเกิด hydroperoxides จะสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงในช่วงเริ่มต้นของการเกิดออกซิเดชันแต่จะลดลงในช่วงต่อมา การเปลี่ยนแปลงนี้สามารถวัดได้จากค่า peroxide value (PV) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ปฐมภูมิของการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (Teets & Were, 2008; Riuz, 2001) อย่างไรก็ตาม สารเปอร์ออกไซด์เหล่านี้ค่อนข้างจะมีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยา แต่อาจจะลดลงบ้างระหว่างการเก็บเป็นเวลานานๆ (Juntachote et al., 2007) ค่า PV สะท้อนถึงปริมาณ hydroperoxide ทั้งหมด และเป็นตัวบ่งชี้ตัวหนึ่งที่บอกถึงคุณภาพของไขมันและน้ำมันในระหว่างการผลิตและการเก็บ (Riuz, 2001) ผลการศึกษาปัจจุบันแสดงให้เห็นว่า สารสกัดใบชาขลู่สามารถยับยั้งการเกิดเปอร์ออกไซด์ในระบบอิมัลชันของน้ำมันที่ใช้ในการศึกษา การออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวจะทำให้ไขมันเปลี่ยนไปอยู่ในรูปอนุมูล fatty acid radical (R•) ซึ่งจะถูกเติมออกซิเจนแล้วเปลี่ยนไปเป็น fatty acid peroxyl radical (ROO•) (Halliwell & Chirico, 1993) ดังนั้น สารออกฤทธิ์ที่อยู่ในใบชาอาจจะจับกับอนุมูลอิสระแล้วหยุดการเกิดปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน ภาพที่ 3-2 แสดงถึงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งลิพิดเปอร์ออกซิเดชันโดยใช้ค่า PV เป็นตัวบ่งชี้ของสารสกัดจากใบชาขลู่ระหว่างการเก็บเมื่อถูกบ่มที่ 0-48 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดชาขลู่สามารถลดการเกิดเปอร์ออกไซด์ได้ โดยค่า PV เพิ่มขึ้นกว่าตอนเริ่มต้นของการทดลอง (91.11%) หลังจากบ่มไปแล้ว 48 ชั่วโมง (98.52%) แต่หลังจากบ่มน้ำมันพร้อมกับสารสกัดชาขลู่ค่า PV ลดลงเหลือ 83.22% ที่ความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดที่ใช้ในการทดลอง ในขั้นต่อมาของการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน lipid peroxyl radicals (ROO•) จะเริ่มทำให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่กับโมเลกุลอื่นส่งผลให้เกิดการสร้างสาร lipid hydroperoxides และ lipid free radicals ปฏิกิริยาเหล่านี้จะเกิดซ้ำหลายรอบส่งผลให้เกิดการสะสมของสาร hydroperoxide เป็นจำนวนมาก สารออกฤทธิ์ที่มีอยู่ในใบชาขลู่สามารถจับ

อนุมูลของไขมันได้ทำให้ค่า PV ลดน้อยลง Juhui et al. (2011) ประเมินความคงตัวของสีและการเกิดออกซิเดชันของหมูบดปรุงสุกที่มีผงใบบัวผสมในปริมาณ 0.1 (LP1) และ 0.5% (LP2) เปรียบเทียบกับที่ผสมผงใบข้าวบาร์เลย์ในปริมาณเดียวกัน (0.1 (BP1) - 0.5% (BP2)) ระหว่างการเก็บในตู้เย็นเป็นเวลา 10 วัน ความคงตัวของการเกิดออกซิเดชันของผงเหล่านี้ถูกเปรียบเทียบกับ butylhydroxytoluene (BHT) ค่า pH ของตัวอย่างหมูบดที่ผสมกับ LP และ BHT ลดลงจนกระทั่งวันที่ 4 ของการทดลองแล้วเพิ่มขึ้น หมูบดที่มี LP และ BP ผสมอยู่จะลดค่า PV ผลการทดลองแสดงว่าการเติม LP และ BP จะทำให้ความคงตัวในเรื่องสีดีขึ้น และทำให้การเกิดออกซิเดชันของเนื้อหมูบดที่เก็บไว้ในตู้เย็นเป็นเวลา 10 วันลดน้อยลง ดังนั้น ผงใบบัวและผงใบข้าวบาร์เลย์จึงถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในหลายประเทศในเอเชียเพื่อผสมกับเนื้อสัตว์บดเพื่อใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากธรรมชาติที่มีความปลอดภัยและยังช่วยให้เนื้อสัตว์มีความต้านทานต่อการเกิดออกซิเดชันได้ดีขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Wanasundara และ Shahidi (1998) ที่รายงานถึงผลของสารสกัดชาเขียวที่สามารถยับยั้งการเกิดเปอร์ออกไซด์ในน้ำมันปลาทะเลได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยมีฤทธิ์เพิ่มขึ้นตามปริมาณของสาร

ระหว่างการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันจะมีสาร malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นสารที่เกิดจากแตกตัวของกรดไขมันที่มีพันธะคู่ 3 พันธะหรือมากกว่านั้นเกิดขึ้น โดยปกติ MDA จะถูกใช้เป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญชนิดหนึ่งของการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (Shahidi et al., 1991) วิธี thiobarbituric acid (TBA) ใช้หลักการของการสลายตัวของลิพิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์ในแบบ acid-catalyzed decomposition ได้เป็น MDA ซึ่งทำปฏิกิริยากับ thiobarbituric acid แล้วเกิดเป็น chromogen สีแดงของ thiobarbituric reactive substances (TBARS) (Shahidi et al., 1991) ในการวิเคราะห์นี้ MDA จะทำปฏิกิริยากับ thiobarbituric acid (TBA) เกิดเป็น MDA-TBA complex ซึ่งมีสีชมพูที่สามารถตรวจวัดได้โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงความยาวคลื่น 530–535 นาโนเมตร ปริมาณการเกิดออกซิเดชันถูกรายงานเป็นค่า TBA value แสดงหน่วยเป็นมิลลิกรัมสมมูลของ MDA ต่อกิโลกรัมของสารตัวอย่าง หรือ ไมโครโมลาร์สมมูลของ MDA ต่อกรัมของสารตัวอย่าง อย่างไรก็ตาม alkenals และ alkadienals ยังสามารถทำปฏิกิริยากับ TBA reagent และเกิดผลิตภัณฑ์ที่ให้สีชมพูเช่นกัน ดังนั้น thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) จึงถูกใช้แทน MDA จากการศึกษาของ Tarladgis et al. (1960) พบว่าการบ่มตัวอย่างในสภาวะที่เป็นกรดมีความจำเป็นที่จะทำให้ MDA หลุดเป็นอิสระจากสารต้นตอเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่ให้สีเข้มมากที่สุด

โดยเฉพาะอย่างยิ่งการจะทำให้ TBARS แยกออกมาจากองค์ประกอบของอาหาร ผลการศึกษาในปัจจุบันพบว่า สารสกัดจากใบชาขลู่สามารถยับยั้ง thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) ได้ จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า TBARS แสดงให้เห็นว่าค่า TBARS มีความสัมพันธ์ทั้งต่อกลุ่มควบคุมและกลุ่มตัวอย่างที่มีสารสกัดในปริมาณต่างๆ ตลอดช่วงการเก็บนานๆ ค่า TBARS จะสะท้อนถึง end-products ของการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน จากผลการทดลองในภาพที่ 3-3 การวิเคราะห์ค่า TBARS สามารถถูกนำมาประเมินได้โดยการใช้ MDA เป็นสารมาตรฐาน ผลการทดลองพบว่า ผลของบ่มสารสกัดใบชาขลู่ร่วมกับน้ำมันเมื่อทำการเก็บเป็นเวลานานๆ ส่งผลให้ลิพิดเปอร์ออกซิเดชันลดลง ค่า TBARS ลดลงตามควมเข้มข้นสารสกัดชาขลู่ที่เพิ่มมากขึ้น การศึกษาของ Stoilova et al. (2007) รายงานว่า ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่เกิดในระบบอิมัลชันของกรดไลโนเลอิกและน้ำของสารสกัดขิงโดยดูจากค่า TBARS เพิ่มสูงขึ้นที่ 37 °C โดยทำให้ค่า TBARS ลดลงถึง 68.2% และการศึกษาของ Ahn et al. (2002) ยังพบว่า ค่า TBARS เพิ่มขึ้นเมื่อเก็บไว้นานขึ้นเช่นกัน ในวันแรกของการศึกษาพบว่า สารสกัดจากเมล็ดองุ่น (ActiVin™) BHA/BHT โรสแมร์รี และวิตามินอี (α-tocopherol) ทำให้ค่า TBARS ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้สามารถลดการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันระหว่างการเก็บในตู้เย็นเป็นเวลา 3 วัน

นอกจากการศึกษาผลต่อการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันแล้ว การศึกษานี้ยังได้ทำการตรวจสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ และฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ในสารสกัดชาใบขลู่ โดยใช้การทดสอบด้วยวิธีของเอมส์ ในแบคทีเรีย *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ขั้นแรกทำการตรวจสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดชาขลู่ว่ามีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์หรือไม่ด้วยวิธีทดสอบเอมส์ เมื่อพิจารณาจากหลักเกณฑ์ที่ใช้พบว่าสารสกัดชาขลู่ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ นั่นคือจำนวนโคโลนีของ Histidine revertants ไม่เพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณตัวอย่างทดสอบสูงขึ้น และที่ปริมาณใดๆ ของตัวอย่าง ก็ไม่ทำให้จำนวนโคโลนีสูงกว่า 2 เท่าของจำนวนโคโลนีที่เกิดจากการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติในทุกปริมาณที่ทดสอบ และเมื่อทดสอบด้วยการใส่สารสกัดชาขลู่ไปพร้อมกับใส่ฮีสทิดีน พบว่า แบคทีเรีย *S. typhimurium* ทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถเจริญได้เป็นการยืนยันว่าสารสกัดชาขลู่ไม่มีผลต่อการไปฆ่าหรือยับยั้งแบคทีเรีย ด้วยเหตุนี้จึงอธิบายได้ว่าสารสกัดชาขลู่ที่ทำการศึกษาไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ทั้งแบบการเลื่อนของเบส (frameshift mutation) ในแบคทีเรีย *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และแบบการแทนที่ของเบส (base-pair substitution) *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA100

เมื่อการทดสอบข้างต้นไม่พบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในสารสกัดชาใบขลู่แล้ว ต่อมาจึงได้มีการตรวจสอบฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ของสารสกัดชาขลู่ต่อสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐานในวิธีของเอมส์ตามกลไกการทำงานแบบ Desmutagen ซึ่งออกฤทธิ์โดยการยับยั้งด้วยการจับสารก่อกลายพันธุ์ไว้ไม่ให้เข้าสู่เซลล์ หรือทำปฏิกิริยาโดยตรงกับสารก่อกลายพันธุ์โดยอาศัยกระบวนการทางเคมีหรือเอนไซม์ต่างๆ เพื่อยับยั้งไม่ให้สารก่อกลายพันธุ์นั้นจับกับ DNA และถ้าสารสกัดชาขลู่มีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์แล้ว จำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นจะน้อยกว่าโคโลนีที่เกิดจากการชักนำของสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน (วราภรณ์ บูรณานนท์, 2545) จากผลการทดสอบ พบว่าสารสกัดชาขลู่สามารถต้านการกลายพันธุ์แบบการเลื่อนของเบสต่อผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างอะมิโนไพรีน-ไนไตรท์ที่เป็นสารก่อกลายพันธุ์โดยตรง (direct mutagens) โดยที่ไม่ต้องใช้การกระตุ้นด้วยเอนไซม์ได้ดีกว่าแบบแทนที่เบส ในงานวิจัยของ Srisook et al. (2012) พบ quercetin และ chlorogenic acid ในชาขลู่ และ Noridayu et al. (2011) พบว่าส่วนสกัดของใบขลู่ยังมีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุดอีกด้วย ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกส่วนใหญ่เป็นนิวคลีโอไฟล์ (nucleophile) ที่สามารถไปจับกับสารก่อกลายพันธุ์ที่มักจะเป็นพวกอิเล็กโทรไฟล์ (electrophile) ไม่ให้ออกฤทธิ์ อีกทั้งยังมีผลไปช่วยลดความเป็นพิษของสารเคมี และยังมีการศึกษาที่บอกว่าสารประกอบฟีนอลิกมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 ที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นให้เกิดพิษของสารเคมี (แสงเทียน อำภาพันธุ์, 2546) อย่างเช่นในงานวิจัยของ Geetha et al. (2005) พบว่า quercetin ที่เป็นสารประกอบฟีนอลิกแสดงฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ต่อ oxidative mutagen ในวิธีการทดสอบเอมส์และยังแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระซึ่งมีฤทธิ์ป้องกันอนุมูลออกซิเจน ยับยั้ง xanthine oxidase ป้องกันปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน และมีความสามารถในการคีเลตเหล็กได้ นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Tieppo et al. (2007) พบว่า quercetin มีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ต่อ *t*-butylhydroperoxide (*t*-BOOH) โดยวิธีเอมส์เมื่อใช้ *S. typhimurium* TA102 ในการทดสอบ และในงานวิจัยของ Yamada และ Tomita (1996) พบว่า chlorogenic acid มีฤทธิ์ในการยับยั้งสารก่อกลายพันธุ์ 3-Amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-1) ที่ศึกษาในแบคทีเรีย *S. typhimurium* TA98 และ TA100

4.2 สรุปผลการวิจัย

สารสกัดชาขลู่ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์จากการทดสอบด้วยแบคทีเรีย *S. typhimurium* ทั้งแบบการเลื่อนของเบส และการแทนที่เบส นอกจากนี้ชาขลู่ยังมีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ที่สามารถป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอที่เกิดจากอนุมูลอิสระ และยังคาดว่าสารสกัดชาขลู่มีกลไกต้านสารก่อกลายพันธุ์แบบ desmutagen ซึ่งเป็นไปตามกลไกการยับยั้งด้วยการจับสารก่อกลายพันธุ์ไว้ไม่ให้เข้าสู่เซลล์ ที่ทำการทดสอบในแบคทีเรีย *S. typhimurium* TA98 และTA100 ดังนั้นจะเห็นได้ว่าชาขลู่เป็นเครื่องดื่มที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภค และอาจจะใช้เป็นเครื่องดื่มเพื่อลดความเป็นพิษของสารก่อกลายพันธุ์บางชนิดที่นำไปสู่การเกิดโรคมะเร็ง และโรคอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องได้

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการ 2557A10802141

ทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล)

มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

การยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและฤทธิ์ยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ของน้ำชาขลู่

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน / ผู้วิจัย ดร.ชัชวิน เพชรเลิศ

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 27 กุมภาพันธ์ 2557 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2558

ระยะเวลาดำเนินงาน 1 ปี ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2556 ถึงวันที่ 31 กันยายน 2557

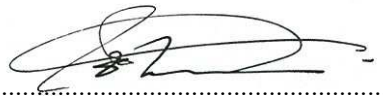
<u>รายจ่าย</u>

หมวด	รายจ่ายสะสมจากรายงานครั้งก่อน	ค่าใช้จ่ายงวดปัจจุบัน	รวมรายจ่ายสะสมจนถึงงวดปัจจุบัน	งบประมาณรวมทั้งโครงการ	คงเหลือ (หรือเกิน)
1. ค่าตอบแทน	73,000.00	78,750.00	151,750.00	151,750.00	0.00
2. ค่าใช้สอย	40,296.00	67,342.55	107,638.55	120,350.00	12,711.45
3. ค่าวัสดุ	56,523.08	288,497.60	345,020.68	330,900.00	-14,120.68
4. ค่าสาธารณูปโภค	33,500.00	33,500.00	67,000.00	67,000.00	0.00
รวม	**203,319.08**	**468,090.15**	**671,409.23**	**670,000.00**	**-1,409.23**

<u>จำนวนเงินที่ได้รับและจำนวนเงินคงเหลือ</u>

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1	301,500 บาท	เมื่อ 27 กุมภาพันธ์ 2557
งวดที่ 2	241,200 บาท	เมื่อ 23 เมษายน 2557
รวม	**542,700 บาท**	



....

หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน เจ้าหน้าที่การเงินโครงงานวิจัย

บรรณานุกรม

กัลยารัตน์ เครือวัลย์ แก้ว กังสดาลอำไพ และ กรชนก ลิมป์ชัยโสภณ. ฤทธิ์ต้านสารก่อการกลายพันธุ์ของผงกล้วยต่างชนิดกันในเอมส์เทสต์และ somatic mutation and recombination test. Thai J. Pharm. Sci. 2004;28 (1-2): 83-94.

พันธุ์ไม้ป่าชายเลนในประเทศไทย. (2549). สำนักงานอนุรักษ์ทรัพยากรป่าชายเลน กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม.

มาโนช วามานนท์ เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ บรรณาธิการ. ยาสมุนไพรสำหรับงานสาธารณสุขมูลฐาน. พิมพ์ครั้งที่ 2. ม.ป.ท., องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก; 2540.

สมพร ภูติยานันต์. ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับการแพทย์แผนไทย. พิมพ์ครั้งที่ 4. เชียงใหม่: ตุลย์การพิมพ์; 2546.

แสงเทียน อำภาพันธุ์. ผลของชาสมุนไพรบางชนิดต่อการก่อกลายพันธุ์ของอะมิโนไพรีน-ไนไตรท์โดยใช้วิธีทดสอบของเอมส์. ปริญญานิพนธ์ วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา. 2546.

Alam, M.I., Auddy, B., & Gomes, A. (1995). Viper venom neutralization by Indian medicinal plant (*Hemidesmus indicus* and *Pluchea indica*) root extracts. *Phytotherapy Research*, *10(1)*, 58-61.

Ali, S.S., Kasoju, N., Luthra, A., Singh, A., Sharanabasava, H., Sahu, A., & Bora, U. (2008). Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International, 41*, 1–15.

Andarwulan, N., Batari, R., Sandrasari, D. A., Bolling, B., & Wijaya, H. (2010). Flavonoid content and antioxidant activity of vegetables from Indonesia. *Food Chemistry*, *121(4)*, 1231-1235.

Andarwulan, N., Ratna, B., Diny, A.S., Bradley, B., & Hanny, W. (2010). Flavonoid content and antioxidant activity of vegetables from Indonesia. *Food Chemistry*, *121*, 1231–1235.

Antolovich, M., Prenzler, D.P., Patsalides, E., Mcdonald, S., & Robards, K. (2002). *Analyst*, *127*, 183–198.

Arabshahi-Delouee, S., & Urooj, A. (2007). Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food Chemistry, 102*, 1233– 1240.

Association of Official Analytical Chemists. (1995). *Official methods of analysis* (16th ed.). Washington DC: Association of Official Analytical Chemists.

Battino, M., Bullon, P., Wilson, M., & Newman, H. (1999). Oxidative injury and inflammatory periodontal diseases: the challenge of anti-oxidants to free radicals and reactive oxygen species. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine, 10*, 458-476.

Berliner, J.A., & Henecke, J.W. (1996). The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. Free Radical *Biology* and *Medicine*, *20*, 707-727.

Berliner, J.A., Navab, M., Fogelman, A.M., Frank, J.S., Demer, L.I., Edwards, P.A., Watson, A.D., & Lusis, A.J. (1995). Atherosclerosis: Basic mechanisms: Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation, 91,* 2488-2496.

Beyhan, O., Elmastas, M., & Gedikili, F. (2010). Total phenolic compounds and antioxidant capacity of leaf, dry fruit and fresh fruit of feijoa (*Acca sellowiana,* Myrtaceae). *Journal of Medicinal Plants Research, 4*, 1065-1072.

Biswas, R., Dasgupta, A., Mitra, A., Roy, S.K., Dutta, P.K., Achari, B., Dastidar, S.G., & Chatterjee, TK. (2005). Isolation, purification and characterization of four pure compounds from the root extract of *Pluchea indica* (L.) Less. And the potentiality of the root extract and the pure compounds for antimicrobial activity. *European Bulletin of Drug Research, 13*, 63-70.

Blois, MS. (2001). Antioxidant activity of grape seed extracts on peroxidation models *in vitro*. *Journal* of *Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 1018.

Blokhina, O., Virolainen, E., & Fagerstedt, K.V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany, 91*, 179-194.

Bozin, B., Mimica, D. N., Samojlik, I., Goran, A., & Igic, R. (2008). Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food Chemistry*, *111*, 925-929.

Brannan, R. G. (2008). Effect of grape seed extract on physicochemical properties of ground, salted, chicken thigh meat during refrigerated storage at different relative humidity levels. *Journal of Food Science*, *73,* C36–C40.

Chakravarty, A. K., & Mukhopadhyay, S. (1994). New thiopene derivatives from *Pluchea indica. Indian Journal of Chemistry*, *33B*, 978-980.

Chanwitheesuk, A., Teerawutgulrag, A., & Rakariyatham, N. (2005). Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. *Food Chemistry, 92*, 491-497.

Chimi, H., Chillard, J., Chillard, P., & Rahmani, M. (1991). Peroxyl and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. *Journal of the American Oil* Chemists' *Society*, *68,* 307-312.

Choi, M.E., & Hwang, K.J. (2005). Screening of Indonesian medicinal plants for inhibitor activity on nitric oxide production of RAW 264.7 cells and antioxidant activity. *Fitoterapia*, *76,* 194-203.

Chu, Y.H., Chang, C.L., & Hsu, H.F. (2000). Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. *Journal of the science of food and agriculture, 80*, 561-566.

Converses, C.A., & Skinner, E.R. (1992). *Lipoprotein analysis a practical approach*. Cambrian typesetters, Frimley, surrey: Information press Ltd, Eynsham, Oxford.

Cotelle, N., Bernier, J.L., Catteau, J.P., Pommery, J., Wallet, J.C., & Gaydou, E. M. (1996). Antioxidant properties of hydroxyl-flavones. *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine*, *20*, 35–43.

Desmarchelier, C., Coussio, J., & Ciccia, G. (1998). Antioxidant and free radical scavenging effects in extracts of the medicinal herb Achyrocline satureoides (Lam.) DC. (‘‘marcela’’). *Braz J Journal of Medicinal Biology Research, 31*(9), 1163–1170.

Duh, P. D., & Yen, G. C. (1997). Antioxidative activity of three herbal water extracts. *Food Chemistry*, *60,* 639-645.

Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., & Jurgens, G. (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radical Biology and Medicine*, *13,* 341-390.

Fernandez, J., Perez-Alvarez, J.A., & Fernandez-Lopez, J.A. (1997) Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chemistry*, *59*(3), 345–353.

Frankel, E. N. (1996). Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. *Food Chemistry*, *57*(1), 51–55.

Frankel, E. N., Hu, M. L., & Tappel, A. L. (1989). Rapid headspace gas chromatography of hexanal as a measure of lipid peroxidation in biological samples. *Lipids*, *24,* 976–981.

Frankel, E. N., Kanner, J., German, J. B., Parks, E., & Kinsella, J. E.(1993). Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet*, *341,* 454–457.

Frankel, E.N., Waterhouse, A.L., & Teisuedre, P.L. (1995). Principle Phenolic phytochemicals in selected Californian wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *Journal* of *Agricultural and Food Chemistry*, *43,* 890-894.

Fridovich, I. (1978). The biology of oxygen radicals. *Science, 201*, 875–880.

Fuhrman, B., Lavy, A., & Aviram, M. (1995). Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *American Journal of Clinical Nutrition*, *61*, 549–554.

Gawlik, D. U., Dziki, D., Baraniak, B., & Lin, R. (2009). The effect of simulated digestion *in vitro* on bioactivity of wheat bread with Taetary buckwheat flavones addition. *LWT – Food Science and Technology*, *42*, 137-143.

Georgantelis, D., Ambrosiadis, I., Katikou, P., Blekas, G., & Georgakis, S. A. (2007). Effect of rosemary extract, chitosan and α-tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 °C. *Meat Science, 76*(1), 172–181.

Gomes, A.; Saha, A.; Chatterjee, I.; Chakravarty, A. K. (2007). Viper and cobra venom neutralization by [beta]-sitosterol and stigmasterol isolated from the root extract of Pluchea indica Less. (Asteraceae). *Phytomedicine*, *14(9)*, 637-643.

Gordon, M., Pokorny, J., Yanishlieva, N., & Gordon, M. (2001). *Antioxidants in food: practical applications*. Cambridge, England: Woodhead.

Gray, J. (1978). Measurement of lipid oxidation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *55,* 539-546.

Gusdinar, T., Herowati, R., Kartasasmita, R.E., & Adnyana, I.K. (2011). Anti-inflammatory and Antioxidant Activity of Quercetin-3, 3', 4'-Triacetate. *Journal of Pharmacological Toxicol*ogy, *6,* 182-188.

Gutteridge, J.M., & Halliwell, B. (1994). *Antioxidants in nutrition, health, and disease*. Oxford: Oxford University Press.

Halliwell, B., & Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American journal of nutrition, 57,* 15-25.

Halliwell, B., & Gutteridge, J.M.C. (2007). *Free radicals in biology and medicine* (3rd ed.). Oxford Clarendon: Oxford University.

Halliwell, B., & Gutteridge, J.M.C. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine* (4th ed.). Oxford University Press, United Kingdom.

Harborne, JB. (1994). *The flavonoids advances in research since 1986*. Chapman & Hall.

Heller, FR., Descamps, O., & Hondekijn, JC. (1998). LDL oxidation: therapeutic perspectives. *Atherosclerosis, 137*, 25–31.

Hertog, MGL., Feskens, EJM., Hollman, PCH., Katan, MB., & Kromhout, D. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease. *The Zutphen elderly study Lancet*, *43,* 890-894.

Hevonoja, T., Pentikainen, M.O., Hyvonen, M.T., Kovanen, P.T., & Ala-Karpela, M. (2000). Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: Basis for understanding molecule change in modified LDL. *Biochimica Biophysica Acta*, *1488,* 189-210.

Huang, X., Yin, Y., Shi, Z., Li, W., Zhou, H., & Lv, W. (2010). Lipid content and fatty acid composition in wild-caught silver pomfret (*Pampus argenteus*) broodstocks: Effects on gonad development. *Aquaculture, 310*, 192-199.

Imida, K., Fukushima, S., Shirai, T., Ohtani, M., Nakanishi, K., & Ito, N. (1983). Promoting activities of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene on 2-stage urinary bladder carcinogenesis and inhibition of γ-glutamyl transpeptidase positive loci development in the liver of rats. *Carcinogenesis*, *4,* 895-899.

Jadhav, S.J., Nimbalkar, S.S., Kulkami, A.D., & Madhavi, D.L. (1996). *Lipid oxidation in biological and food systems.* In food antioxidants. Marcel dekker. New York, USA.

Jamalomidi, M., & Gholami, M. (2013). Effect of packing type and storage time on tea (*Camellia sinensis* L.) seed germination. *Journal of Applied and Basic Sciences*, *4*(5), 1323-1327.

Jonathan, J.C., Chung, L.C., Chiu-Li, K., Chien, M.C., Chao, N.T., Ya, Z.L., Li, J.L., & Yi, R.H. (2012). Crude aqueous extracts of *Pluchea indica* (L.) Less. inhibit proliferation and migration of cancer cells through induction of p53-dependent cell death. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *12,* 265.

Julsrigival, J. (2007). *Chemical constituents and biological activities of the essential oil from Wansaolong*. Thesis in Master of Science (Pharmaceutical Science), Chiang Mai University, Thailand.

Juntachote, T., & Berghofer, E. (2005). Antioxidative properties and stability of ethanolic extracts of holy basil and galangal. *Food chemistry, 92,* 193-202.

Juntachote, T., Berghofer, E., Siebenhandl, S., & Bauer, F. (2007). The effect of dried galangal powder and its ethanolic extracts on oxidative stability in cooked ground pork. *LWT-Food Science and Technology*, *40*(2), 324–330.

Justesen, U., & Knuthsen P. (2001). Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. *Food Chemistry*, *73,* 245–250.

Kaneria, M., Kanani, B., & Chanda, S. (2012). Assessment of effect of hydroalcoholic and decoction methods on extraction of antioxidants from selected Indian medicinal plants. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine,* 195-202.

Karadag, A., Ozcelik, B., & Saner, S. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods, 2,* 41–60.

Khalil, A. H., & Mansour, E. H. (1998). Control of lipid oxidation in cooked and uncooked refrigerated carp fillets by antioxidant and packaging combinations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*(3), 1158–1162.

Khennouf, S., Amira, S., Arrar, L., & Baghiani, A. (2010). Effect of some phenolic compounds and quercus tannins on lipid peroxidation. *Journal of World Applied Science*, *8,* 1144–1149.

Kim, D., Jeond, S., & Lee, C. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*, *81,* 321–326.

Kontush, A., Spranger, T., & Reich, A. (1997). Whole plasma oxidation assay as a measure of lipoprotein oxidizability. *Biofactors*, *6*(2), 99–109.

Lee, J., Koo, N., & Min, D.B. (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *3,* 21-33.

Leon, G., Coleman, J.R., Renata, K., Ploanowska-Grabowska, Marek Marcinkiewicz, & Adrian R.L. Gear. (2004). LDL oxidized by hypochlorous acid causes irreversible platelet aggregation when combined with low levels of ADP, Thrombin, epinephrine, or macrophage-derived chemokine (CCL22). *Blood*, *104*(2), 380-389.

Lin, HY., Juan, SH., Shen, SC., Hsu, FL., & Chen, YC. (2003). Inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by flavonoids in RAW264.7 macrophages involves heme oxygenase-1. *Biochemical Pharmacology*, *66,* 1821-1832.

Lin, JY., & Tang, CY. (2007). Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chemistry*, *101,* 140–147.

Mangiapane, H., Thomson, J., Salter, A., Brown, S., Bell, GD., & White, DA. (1992). The inhibition of the oxidation of low density lipoprotein by (+)- catechin, a naturally occurring flavonoid. *Biochemical Pharmacology*, *43*(3), 445–450.

Mann, J. (1978). *Secondary metabolism*. Oxford chemistry series, Clarendon Press, Oxford.

Manyadele, N.O.J., & Ann, S. (1999). *The Merck index an encyclopedia of chemicals drug and biological* (13th ed.).

Meyer, A. S., Donovan, J. L., Pearson, D. A., Waterhouse, A. I., & Frankel, E. N. (1998). Fruit hydroxycinnamic acids inhibit human low-density lipoprotein oxidation *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46,* 1783-1787.

Meyer, A. S., Yi, O-S., Pearson, D. A., Waterhouse, A. L., & Frankel, E. N. (1997). Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolic

antioxidants in grapes (*Vitis vinifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45,* 1638–1643.

Mi san, A., imurina, S., Psodorov, O., Sakac, M., Sedej, I., Mandic, A., & Kevre san Z . (2009). Evaluation of antioxidant activity of medical plant extracts and their application in biscuits. In D Mihailovi´c, M Vojinovi´c-Miloradov (Eds). Environmental, health and humanity issues in the down Danubian region, multidisciplinary approaches. Singapore. *World Scientific*, 165–171.

Miller, Y., & Shaklai, N. (1999). Kinetic of hemin distribution in plasma reveals its role in lipoprotein oxidation. *Biochimica Biophysica Acta*, *1454,* 153-164.

Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Dominguez, Sineiro, J., Dominguez, H., Nunez, M.Z., & Parojo, J.C. (2001). Natural antioxidants from residue sources. *Food Chemistry*, *71,* 145-171.

Moure, A., Franco, D., Sineiro, J., Dominquez, H., Nunez, M.J., & Lema, J.M. (1999). Antioxidant properties of *Gevuina avellana* hulls. 8th Mediterranean congress on chemical engineering. *Barcelona*, 10-12.

Muangman, V., Thithapandha, A., Yoovathaworn, K., Supavilai, P., Arunnopparat, W., & Sriwatanakul, K. (1998). Study on diuretic effects of *Pluchea indica* in man. *Thai Journal of Urology*, *19*, 116-128.

Mukhopadhyay, S., Cordell, AG., & Ruangrungsi, N. (1983). Traditional medicinal plants of thailand. IV. 3-(2',3'-Diacetoxy-2'-methyl butyryl)-cuauhtehmone from *Pluchea indica*. *Journal of Natural Products*, *46,* 671-674.

Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., & Rodwell, V.W. (2000). *Harper´s Biochemistry* (25th ed.). Stamford, Connecticut: Appleton & Lange.

Nagai, T., Reiji, I., Hachiro, I., & Nobutaka, S. (2003). Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. *Food Chemistry*, *80,* 29–33.

Nair, V., & Turner, G. A. (1984). The thiobarbituric test for lipid peroxidation: structure of the adduct with Malondialdehyde. *Lipids*, *19,* 804-809.

Nakayama, T., Osawa, T., Mendoza, E.N.T., Laurena, A.C., & Kawakishi, S. (1994). Comparative study of antioxidation assays of plant materials. In postharvest biochemistry of plant food-materials in the tropics. *Japan scientific societies press*, 241-251.

Nawar, W.W. (1996). *Lipid in food chemistry*. New York, USA: Marcel deckker. Neuzil, J., Thomas, S. R., & Stocker, R. (1997). Requirement for, promotion, or inhibition by R-tocopherol of radical-induced initiation of plasma lipoprotein lipid peroxidation. *Free Radical biology medicine, 22,* 57-71.

Niki, E. (2000). Lipid peroxidase. *Experimental Protocols for Reactive Oxygen and Nitrogen Species,* 156-157.

Noridayu, A. R., Hii, Y. F., Faridah, A., Khozirah, S., & Lajis, N. (2011). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of *Pluchea indica* Less. *International Food Research Journal*, *18*(3), 925-929.

Normala, H., & Suhaimi, M.I. (2011). Quantification of total phenolics in different parts of *Pluchea indica* Less. ethanolic and water extracts. *Pertanika Journal of Science and Technology*, *19*(1), 19 – 24.

Office of Mangrove Resources Conservation. (2009). *Plants in the Mangrove forest in Thailand.* Bangkok: The Agricultural Co-operative Federation of Thailand.

Ohtsuki, T., Yokosawa, E., Koyano, T., Preeprame, S., Kowithayakorn, T., Sakai, S., Toida, T., & Ishibashi, M. (2008). Quinic Acid Esters from *Pluchea indica* with Collagenase, MMP-2 and MMP-9 Inhibitory Activities. *Phytotherapy research, 22*, 264-266.

Okezie, L.A., & Susan, L.C. (1997). *Antioxidant methodology in vivo and in vitro concepts*. United States: AOCS Press.

Ong, H. C. (2004). Beluntas. In *Tumbuhan liar: khasiat ubatan & kegunaan lain*. Utusan Publications & Distributors Sdn. Bhd, Kuala Lumpur. 54-55.

Pajaree, A. (2006). *Antioxidant capacity, total phenolics and sugar content of selected Thai health beverages*. Master's thesis, Nutrition, Mahidol University.

Panthong, A., Supraditaporn, W., Kanjanapothi, D., Taesotikul, T., & Reutrakul, V. (2007). Analgesic, anti-inflammatory and venotonic effects of *Cissus quadrangularis* Linn. *Journal of Ethnopharmacology*, *110*, 264-270.

Parthasarathy, S., Santanam, N., Ramachandran, S., & Meilhac, O. (1999). Oxidants and antioxidants in atherogenesis: an appraisal. *Journal of Lipid Research*, *40,* 2143-2157.

Peryt, B., Szymczyk, T., & Lesca, P. (1994). Mechanism of antimutagenicity of wheat sprout extracts. *Mutation Research*, *8*, 117-123.

Peungvicha, P., Temsiririrkkul, R., & Thongpraditchote, S. (1999). Hypoglycemic effect of *Pluchea indica* Less. Root in normal and diabetic rats. *Thai Journal of Phytopharmacy*, *6*(2), 18-22.

Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants**.** *Journal of Natural Product, 63,* 1035-1042.

Pikul, J., Leszczynski, D. E., & Kummerow, F. A. J. (1989). Evaluation of three modified TBA methods for measuring lipid oxidation in chicken meat. *Food Chemistry*, *37,* 1309–1313.

Pinitsoontorn, C., Sunthon, S., & Patcharee, B. (2012). Antioxidant activity and oxalate content of selected Thai herbal teas. *Medicine*, *Khon Kaen University*, *Thailand*, *17*(1), 162-168.

Porter, NA. (1984). Chemistry of lipid peroxidation. *Methods in Enzymol*ogy, *105,* 273-305.

Pramanik, K. C., Bhattacharya, P., Biswas, R., Bandyopadhyay, D., Mishra, M., & Chatterjee, T. K. (2006a). Hypoglycemic and antihyperglycemic activity of leaf extract of *Pluchea indica* Less. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, *6*(3), 232-236.

Qayum, M., Nisar, M., Shah, MR., Adhikari, A., Kaleem, WA., Khan, I., Khan, N., Gul, F., Khan, IA., Zia-Ul-Haq, M., & Khan, A. (2012). Analgesic and anti-inflammatory activities of taxoids from *Taxus wallichiana* Zucc. *Phytotherapy Research*, *26*, 552-556.

Rajalakshmi, D., & Narasimhan, S. (1996). *Food antioxidants: Sources and method of evaluation. In food antioxidants*. New York: Marcel dekker.

Ramarathnam, N., Osawa, T., Namiki, M., & Kawakishi, S.(1988). Chemical studies on novel rice hull antioxidants. 1. Isolation, fractionation and partial characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *36,* 719-726.

Ramarathnam, N., Osawa, T., Namiki, M., & Tashiro, T. (1986). Studies on the relationship between antioxidative activity of rice hull and germination ability of rice seeds. Journal *of the Science of Food and Agriculture*, *37*, 719-726.

Rice-Evans, CA., Miller, N., & Paganga, G. (1996). Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical* Biology *and Medicine, 20,* 933–956.

Rice-Evans, CA., Miller, NJ., Bolwell, PG., Bramley, PM., & Pridh, JB. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical*s, *22,* 375-383.

Roberfroid, M., & Calderon, PB. (1995). *Free radical and oxidation phenomena in biological systems*. New York: University of Cathlique de Louvain Brusels.

Roginsky, V., & Lissi, E. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, *92*, 235-254.

Roslida, A. H., Erazuliana, A. K., & Zuraini, A. (2008). Anti-inflammatory and Antinociceptive Activities of The Ethanolic Extract of *Pluchea indica* (L) Less Leaf. *Pharmacology*, *2*, 349-360.

Saha, K., Lajis, N. H., Israf, D. A., Hamzah, A. S., Khozirah, S., Khamis, S., & Syahida, A. (2004). Evaluation of antioxidant and nitric oxide inhibitory activities of selected Malaysian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, *9,* 263-267.

Sarita, S., & Rohit, S. (2006). Effect of iron on lipid peroxidation, and enzymatic and non-enzymatic antioxidants and bacoside-A content in medicinal plant *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere*, *62*, 1340–1350.

Sen, T., Basu, A., Ray, RN, & Nag Chaudhuri, A. K. (1993). Hepatoprotective effects of *Pluchea indica* (Less) extract in experimental acute liver damage in rodents. *Phytotherapy Research*, *7*, 352-355.

Sen, T., Dhara, A. K., Bhattacharjee, S., Pal, S., & Nag Chaudhuri, A. K. (2002). Antioxidant activity of the methanol fraction of *Pluchea indica* root extract. *Phytotherapy Research*, *16*, 331-335.

Sen, T., Ghosh, T. K., Bhattachajee, S., & Nag Chaudhuri, A. K. (1996). Action of *Pluchea indica* methanol extract as a dual inhibitor on PAF-induced paw oedema and gastric damage. *Phytotherapy Research*, *10*, 74-76.

Sen, T., & Nag Chaudhuri, A. K. (1991). Antiinflammatory evaluation of a *Pluchea indica* root extract. *Journal of Ethnopharmacology*, *33*(1-2), 135-141.

Sen, T. (1993). Studies on the mechanism of anti-inflammatory and anti-ulcer activity of *Pluchea indica* - probable involvement of 5-lipooxygenase pathway. *Life Science*, *52*(8), 737-743.

Senevirathne, M., Kim, S. H., Siriwardhana, N., Ha, J. H., Lee, K. W., & Jeon, Y. J. (2006). Antioxidant potential of *Ecklonia cava* on reactive oxygen species scavenging, metal

chelating, reducing power and lipid peroxidation inhibition. *International Journal of Food Science and Technology*, *12*(1), 27-38.

Shahidi, F., Wanasundara, U.N., Akoh, C.C., & Min, D.B. (2002). *Food Lipids*: *Chemistry, Nutrition and Biotechnology*. New York: Marcel Dekker.

Shaida, F.S., Azliana, A.BS., Kheng, K., Supriatno, LO., & Eng, M.S. (2011). Effect of solvents in extracting polyphenols and antioxidants of selected raw vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis, 4-5*, 506-515.

Shaklai, N., Shviro, Y., Rabizadeh, E., & Kirschner-Zilber, I. (1985). Accumulation and drainage of hemin in the red cell membrane. *Biochimica Biophysica. Acta*, *821,* 355-366.

Sharma, J.N., Omran, AA., & Parvathy, S.S. (2007). Role of nitric oxide in inflammatory Disease. *Inflammopharmacology, 15*, 252-259.

Sharma, S.K., & Goyal, N. (2011). Biological Studies of the Plants from Genus *Pluchea*. *Annals of Biological Research*, *2*(3), 25-34.

Shukri, MAM., Alan, C., & Noorzuraini, ARS. (2011). Polyphenols and antioxidant activities of selected traditional vegetables. *Journal of Tropical Agriculture*, *Food Science*, *39*, 1-15.

Simrany, J. (2003). Total Flavonoid Analysis. *Standard methodology for the determination of tea flavonoids, 33*, 63-72.

Singh, N., & Rajini, P.S. (2004). Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato peel. *Food Chemistry, 85,* 611–616.

Siriporn, P., Jomduang, S., Bhuttanont, P., Pankasemsuk, T., Pojanagaroon, S., & Warit, B. (2006). Effect of storage time on qualitative yields of 2 Krachai-Dam (*Kaempferia parviflora*) cultivars. *Journal of Applied Science*, *5,* 1.

Srisook, K., Buapool, D., Boonbai, R., Simmasut, P., Charoensuk, Y., & Srisook, E. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Pluchea indica* Less. Herbal tea. *Journal of Medicinal Plants Research*, *6*(23), 4077-4081.

Stagg, G.V., & Millin, D.J. (1975). The nutritional and therapeutic value of tea a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *21,* 1439-1459.

Steinberg, D. (1997). Low-density lipoprotein and its pathobiological significance. *Journal of Biological Chemistry*, *272,* 20963–20966.

Steinberg, D. (1997). Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Cirulation*, *95*, 1062-1071.

Steninbrecher, U., Parthasrathy, S., Leake, D.S., Witztum, J.L., & Steinberg, D. (1984). Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 81,* 3883-3887.

Surendra, K.R., Sharma, & Naveen Goyal. (2011). Biological Studies of the Plants from Genus *Pluchea*. *Annals of Biological Research*, *2*(3), 25-34.

Takagi, T., & Iida, T. (1980). Antioxidant for fats and oils from canary seed: Sterol and triterpene alcohol esters of caffeic acids. *Journal of America Oil Chemistry Soc*iety, *57,* 326-329.

Tandon, V.R., Verma, S., Singh, J. B., & Mahajan, A. (2005). Antioxidants and cardiovascular health. *JK Science, 7,* 2.

Teets, A. S., & Were, L. M. (2008). Inhibition of lipid oxidation in refrigerated and frozen salted raw minced chicken breasts with electron beam irradiated almond skin powder. *Meat Science*, *80*(4), 1326–1332.

Terao, J. (1999). Dietary flavonoids as plasma antioxidant on lipid peroxidation: significance of metabolic conversion. In antioxidant food supplements in human health. *Academic Press*, 255-268.

Thongpraditchote, S., Matsumoto, K., Temsiririrkkul, R., Tohda, M., Murakami, Y., & Watanabe, H. (1996). Neuropharmacological actions of *Pluchea indica* Less. root extract in socially isolated mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *19,* 379-383.

Traithip, A. (2005). *Phytochemistry and antioxidant activity of Pluchea indica.* Master's thesis, Pharmacognosy, Faculty of Graduate Studies, Mahidol University.

Uchiyama, T., Miyase, T., Ueno, A., & Usmanghani, K. (1991). Terpene and lignan glycosides from *Pluchea indica*. *Phytochemistry*, *30,* 655-657.

Uchiyama, T., Miyase, T., Ueno, A., & Usmanghani, K. (1989). Terpenic glycosides from *Pluchea indica*. *Phytochemistry*, *28,* 3369-3372.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 39,* 44–84.

Vinson, J. A., Dabbagh, Y. A., Serry, M. M., & Jang, J. (1995). Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *43,* 2800–2802.

Wanasundara, U. N., & Shahidi, F. (1998). Antioxidant and prooxidant activity of green extracts in marine oils. *Food Chemistry*, *63*(2), 335–342.

Wanasundara, U.N., Shahidi, F., & Jablonski, C. R. (1995). Comparison of standard and NMR methodologies for assessment of oxidation stability of canola and soybean oils. *Food Chemistry*, *52,* 249–253.

Wang, C., Zhu, L., & Brewer, M. S. (1996). *IFT annual meeting: Book of Abstracts*. 161.

Witztum, J.L., & Steinberg, D. (1991). Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, *88,* 1785-1792.

Yagi, K. (1989). *A simple fluorometric assay for lipid peroxides in blood serum or plasma. In CRC hand book of free radicals and antioxidants in biomedicine (Vol. III) (215).* Boca Raton, FL: CRC Press.

Yamanont. (2006). *Protective effects of curcumin and alpha- tocopherol on hemin induced LDL oxidation*. Master's thesis, Pharmacognosy, Faculty of Graduate Studies, Chulalongkorn University.

Yan, S. W., & Asmah, R. (2010). Comparison of total phenolic contents and antioxidant activities of turmeric leaf, pandan leaf and torch ginger flower. *Journal of Food Research, 17,* 417-423.

Yen, G. C., & Hsieh, C. L. (1998). Antioxidant activity of extracts from Du-zhong (*Eucommia ulmoides*) toward various lipid peroxidation models in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46,* 3952–3957.

Yen, G. C., & Hsieh, C. L. (2002). Inhibitory effects of Du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) against low-density lipoprotein oxidative modification. *Food Chemistry*, *77,* 449-456.

Yen, G.C., & Hsieh, C.L. (2003). Inhibitory effects of Du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) against low-density lipoprotein oxidative modification. *Journal of Food Chemistry*, *77,* 449–456.

Yen, G. C., Wu, S., & Duh, P. (1996). Extraction and identification of antioxidant components from the leaves of mulberry (*Morus alba* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *44,* 1678-1690.

Yokode, & Kita. (2000). LDL isolation and copper-catalysed oxidation. *Experimental Protocols for Reactive Oxygen and Nitrogen Species,* 149-151.

Yokode, & Niki, E. (2000). Lipid peroxidase. *Experimental Protocols for Reactive Oxygen and Nitrogen Species,* 156-157.

Young, I.S., & McEneny, J. (2001). Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochemical Society Transaction, 29,* 358-362.

Yuniarti T. Ensiklopedia tanaman obat tradisional. Yogyakarta: MedPress. 2008.

Zainol, M., Abd-Hamid, A., Yusof, S., & Muse, R. (2003). Antioxidative activity and total phenolic compounds of leaf, root and petiole of four accessions of *Centella asiatica* (L.) urban. *Food Chemistry*, *81,* 575–581.

Zhang, X., Huang, H., Yang, T., Ye, Y., Shan, J., Yin, Z., & Luo, L. (2010). Chlorogenic acid protects mice against lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Journal of Medicinal Plants Research*, *41,* 746-752.