



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการตรวจสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของน้ำผึ้งชันโรง Determination of pharmacological activity of honey from stingless bees

ภัทรวดี ศรีคุณ

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล)
ภายใต้โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 258346
สัญญาเลขที่ 172/2560

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการตรวจสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของน้ำผึ้งชันโรง
Determination of pharmacological activity of honey
from stingless bees

ภัทรวดี ศรีคุณ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ภายใต้โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 172/2560

คณะผู้วิจัย

11 มีนาคม 2562

บทคัดย่อ

บทนำ ผึ้งชันโรงเป็นผึ้งที่มีขนาดเล็ก และไม่มีเหล็กใน ที่เกษตรกรในเขตภาคตะวันออกของประเทศไทยนิยมเลี้ยงเพื่อประโยชน์ในการผสมเกสรช่วยขยายพันธุ์พืชผล น้ำผึ้งนั้นได้มีรายงานการใช้ทางยามาเป็นเวลานาน เช่น ใช้เพื่อสมานแผล มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น การศึกษาในประเทศไทยรวมทั้งต่างประเทศส่วนมากเป็นการศึกษาจากผึ้งสายพันธุ์ที่มีเหล็กใน ดังนั้น การวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของน้ำผึ้งจากผึ้งชันโรง สายพันธุ์ชนเงิน

วิธีการและผลการทดลอง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าน้ำผึ้งที่ได้จากป่าชายเลนนั้น มีฤทธิ์สูงกว่าน้ำผึ้งที่ได้จากสวนผลไม้และน้ำผึ้งจิตรลดา มีค่าค่า IC_{50} เท่ากับ 19.82 ± 1.82 , 62.27 ± 3.95 % (w/v) และไม่สามารถหาค่าได้ ตามลำดับ โดย DPPH assay และน้ำผึ้งจากทุกแหล่งมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ ด้วยวิธี Proteinase inhibitory assay และ มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของต่อเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก และยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอนดีโปรตีน โดยน้ำผึ้งจิตรลดามีความสามารถในการได้สูงกว่าน้ำผึ้งจากอีก 2 แหล่ง

สรุปและอภิปราย พบฤทธิ์ของการต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และฤทธิ์ยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอนดีโปรตีนของน้ำผึ้งจากสวนผลไม้ ป่าชายเลนและน้ำผึ้งจิตรลดา โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะพบสูงสุดในน้ำผึ้งจากชันโรงที่ได้จากป่าชายเลน ส่วนฤทธิ์อื่นๆ พบว่าน้ำผึ้งจิตรลดา มีแนวโน้มของฤทธิ์สูงกว่า

Abstract

Introduction Stingless has been known to use in agriculture, especially in Eastern Thailand, for a long time. They are used to fertilize plants including fruit trees. Moreover, honey has been used in Ayurvedic for thousand years such as wound healing, anti-inflammation, anti-oxidant and anti-bacterium. However, most of studies investigated the honey from sting-available bee species, not stingless bees. Therefore, this study aims to study bioactivities of honey from stingless bees.

Methods Anti-oxidant activity was found in honey from mangrove forest higher than in fruit orchard or Jitralada honey at IC_{50} 19.82 ± 1.82 , 62.27 ± 3.95 % (w/v) which Jitralada honey could not be determined by DPPH assay. All kinds of honey showed activity of anti-inflammation, anti-bacterium (gram positive bacilli) and anti-AGEs formation whereas the honey of Jitralada brand showed the highest potency than other 2 honey samples from mangrove forest and fruit orchard.

Results and Conclusion Anti-oxidant, anti-inflammatory, anti-bacterial activities and anti-AGEs formation were found in honey samples from fruit orchard, mangrove forest and Jitralada brand. The anti-oxidant effect showed the highest potency in honey from mangrove forest whereas the anti-inflammation, anti-bacterium and anti-AGEs formation tend to be found the highest potency in Jitralada honey.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
Abstract	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 ทบทวนวรรณกรรม	1
1.2.1 คุณสมบัติและองค์ประกอบทางเคมีของน้ำผึ้ง	1
1.2.2 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของน้ำผึ้ง	2
1.2.3 การทดสอบฤทธิ์ทางงานวิจัยและความสำคัญ	4
1.2.3.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	4
1.2.3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ	5
1.2.3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย	9
1.2.3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านแอดวานซ์ไกลเคชันเอนด์โทเรลล์	9
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	18
1.4 ขอบเขตของการวิจัย	18
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	18
บทที่ 2 วิธีการดำเนินการวิจัย	19
2.1 การเก็บตัวอย่าง	19
2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	19
2.2.1 DPPH assay	19
2.2.2 FRAP assay	20
2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ	20
2.3.1 การยับยั้งการเสียสภาพของโปรตีน (Protein denaturation)	20
2.3.2 การยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนส (Proteinase inhibitory assay)	21

2.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย	21
	หน้า
2.4.1 Disc-agar diffusion method	21
2.4.2 Broth micro dilution method	22
2.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านแอดวานซ์ไกลเคชันเอนดีพอร์ดัคท์	22
2.6 สถิติที่ใช้ทดสอบ	22
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปราย	24
3.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	24
3.1.1 DPPH assay	24
3.1.2 FRAP assay	26
3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ	28
3.2.1 การยับยั้งการเสียสภาพของโปรตีน (Protein denaturation)	28
3.2.2 การยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนส (Proteinase inhibitory assay)	29
3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย	31
3.3.1 Disc-agar diffusion method	31
3.3.2 Broth micro dilution method	32
3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านแอดวานซ์ไกลเคชันเอนดีพอร์ดัคท์	33
บทที่ 4 สรุปและข้อเสนอแนะ	35
บทที่ 5 ผลผลิต	36
บรรณานุกรม	37
ภาคผนวก	40
ประวัตินักวิจัยและคณะ	51
รายงานสรุปการเงิน	59
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	60

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	Physicochemical properties of honey bee (Tualang and Manuka honey) and stingless bee honey	4
ตารางที่ 2	การจำแนกชนิดของการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตาม	5
ตารางที่ 3	แสดงรายละเอียดของสารสื่อกลางในการอักเสบ	7
ตารางที่ 4	แสดงค่า Excitation และ Emission ของ AGEs ที่มีคุณสมบัติ fluorescent ใน Neutral aqueous media	13
ตารางที่ 5	แสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของน้ำผึ้งจากสวนผลไม้ ป่าชายเลน เทียบกับน้ำผึ้งจิตรลดาด้วยวิธีวิเคราะห์ DPPH assay	25
ตารางที่ 6	แสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของน้ำผึ้งจากสวนผลไม้ ป่าชายเลน เทียบกับน้ำผึ้งจิตรลดาด้วยวิธีวิเคราะห์ DPPH assay	27
ตารางที่ 7	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของน้ำผึ้งจากสวนผลไม้ ป่าชายเลน เทียบกับน้ำผึ้งจิตรลดา ด้วยวิธี Protein denaturation assay	28
ตารางที่ 8	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของน้ำผึ้งจากสวนผลไม้ ป่าชายเลน เทียบกับน้ำผึ้งจิตรลดา ด้วยวิธี Proteinase inhibitory assay	30
ตารางที่ 9	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของน้ำผึ้งจากสวนผลไม้ ป่าชายเลน เทียบกับน้ำผึ้งจิตรลดา	31
ตารางที่ 10	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแอดวานซ์ไกลเคชันเอนด์โปรดักต์ของน้ำผึ้งจากสวนผลไม้ ป่าชายเลน เทียบกับน้ำผึ้งจิตรลดา	34

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของน้ำผึ้ง	3
ภาพที่ 2	แสดงกระบวนการเกิด AGEs ผ่านปฏิกิริยา millard reaction	10
ภาพที่ 3	แสดงวัฏจักรของ endogenous และ exogenous	14
ภาพที่ 4	แสดงผลของ AGEs ต่อ RAGE ที่มีผลทำให้กระบวนการทำงานของเซลล์ผิดปกติและเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเรื้อรัง	15
ภาพที่ 5	รูปภาพแสดงกลไกการยับยั้งการสร้าง AGEs ของ Aminoguanidine	16
ภาพที่ 6	โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์	18
ภาพที่ 7	แสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของน้ำผึ้งจากสวนผลไม้ ป่าชายเลน เทียบกับน้ำผึ้งจิตรลดา ด้วยวิธีวิเคราะห์ DPPH assay (* <i>p-value</i> <0.05, ANOVA test)	24
ภาพที่ 8	แสดงกราฟมาตรฐานของ trolox ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP assay	26
ภาพที่ 9	แสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของน้ำผึ้งจากสวนผลไม้ ป่าชายเลน เทียบกับน้ำผึ้งจิตรลดา ด้วยวิธีวิเคราะห์ FRAP assay (* <i>p-value</i> <0.05, ANOVA test)	26
ภาพที่ 10	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของน้ำผึ้งจากสวนผลไม้ ป่าชายเลน เทียบกับน้ำผึ้งจิตรลดา ด้วยวิธี Proteinase inhibitory assay	29
ภาพที่ 11	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของน้ำผึ้งจากสวนผลไม้ ป่าชายเลน เทียบกับน้ำผึ้งจิตรลดา	32
ภาพที่ 12	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแอดวานซ์ไกลเคชันเอนดีโทเรติกต์ของน้ำผึ้งจากสวนผลไม้ ป่าชายเลน เทียบกับน้ำผึ้งจิตรลดา (* <i>p-value</i> <0.05, ANOVA test)	33

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ผึ้งชันโรง (stingless bee) เป็นผึ้งที่มีขนาดเล็กและไม่มีเหล็กไน ที่เกษตรกรในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยนิยมเลี้ยงเพื่อประโยชน์ในการผสมเกสรช่วยขยายพันธุ์พืชผล รวมทั้งผลผลิตที่ได้จากการเลี้ยงผึ้งชันโรง อาทิ เช่น น้ำผึ้ง (honey) ชันผึ้ง (propolis) ไขผึ้ง (wax) ยังสามารถสร้างรายได้เพิ่มเติมแก่เกษตรกรได้ ราคาผลิตภัณฑ์จากผึ้งชันโรงในท้องตลาดเมื่อเทียบกับผึ้งสายพันธุ์ที่มีเหล็กไน พบว่ามีราคาสูงกว่ามาก ส่วนหนึ่งสืบเนื่องมาจากผลผลิตที่มีน้อยกว่าของผึ้งชันโรงและมีความเชื่อบางส่วนว่าน้ำผึ้งและชันผึ้งของผึ้งชันโรงนั้นมีฤทธิ์ทางยามากกว่าผึ้งสายพันธุ์ที่มีเหล็กไนอื่นๆ น้ำผึ้งนั้นได้มีการรายงานการใช้ทางยามาเป็นเป็นเวลานาน เช่น ใช้เพื่อสมานแผล มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น การศึกษาในประเทศไทยพบฤทธิ์ของน้ำผึ้งสายพันธุ์ *Apis florea* และ *Apis andreniformis* ก็เป็นไปในทิศทางเดียวกัน การศึกษาของประเทศมาเลเซียซึ่งมีน้ำผึ้งหลากหลายชนิด เช่น Tualang, Nenas, , Gelam เป็นต้น พบว่าน้ำผึ้ง Tualang และ Gelam มีคุณฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุด โดยเฉพาะฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านการอักเสบ

สำหรับรายงานการศึกษาในผึ้งชันโรงนั้นยังพบการศึกษาน้อย โดยพบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียจากผึ้งชันโรงสายพันธุ์ *Trigona laeviceps* (พันธุ์กล้วยดำ) ซึ่งพบได้ทั่วไปในประเทศไทยในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบผึ้งชันโรงสายพันธุ์อื่นๆ ได้แก่ *Trigona pagdeni* Seh. (พันธุ์ขนเงิน) *Trigona terminata* Smith (พันธุ์ปากแตรแดง) และ *Trigona ventralis* Smith (พันธุ์ปากแตรขาว) เป็นต้น โดยเฉพาะพันธุ์ขนเงินซึ่งให้น้ำผึ้งที่มีรสชาติเป็นที่ชื่นชอบของเกษตรกรชาวสวนผลไม้ ทางทีมนักวิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำผึ้งจากผึ้งชันโรงดังกล่าวนี้ ที่ได้จากแหล่งเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน เพื่อใช้เป็นข้อมูลทางวิชาการในการสนับสนุนการพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อเพิ่มมูลค่าของน้ำผึ้งจากผึ้งชันโรงที่ผลิตได้ในท้องถิ่นเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยต่อไป

1.2 ทบทวนวรรณกรรม

1.2.1 คุณสมบัติและองค์ประกอบทางเคมีของน้ำผึ้ง

ผึ้ง (Bees) มีหลากหลายสายพันธุ์ มากกว่า 6-11 สายพันธุ์จากกว่า 20,000 สายพันธุ์ สามารถสร้างน้ำผึ้งได้จากการทบทวนวรรณกรรมของ Ball DW. (2007) โดยมีทั้งชนิดที่มีเหล็กไน เช่น *Apis florea* และ *Apis andreniformis* และไม่มีเหล็กไน ที่เรียกว่าชันโรง (stingless bees) เช่น สายพันธุ์ *Trigona laeviceps* (พันธุ์กล้วยดำ) *Trigona pagdeni* Seh. (พันธุ์ขนเงิน) *Trigona terminata* Smith (พันธุ์ปากแตรแดง) และ

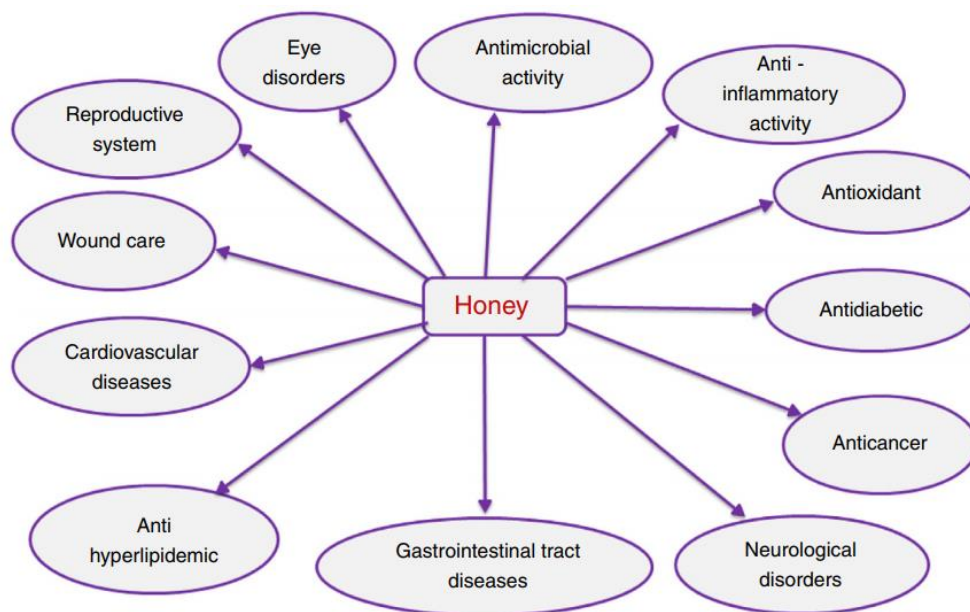
Trigona ventralis Smith (พันธุ์ปากแตรขาว) ซึ่งพบได้ทั่วไปในประเทศไทย ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย เช่น ที่จังหวัดจันทบุรี เกษตรกรใช้ในการช่วยผสมเกสรต้นผลไม้ในสวนผลไม้ เป็นต้น น้ำผึ้ง เป็นสารให้ความหวานจากธรรมชาติ ที่ถูกนำมาใช้ประโยชน์มากกว่า 6,000 ปีแล้ว โดยน้ำผึ้งที่ได้ จะขึ้นอยู่กับว่าผึ้งนั้นเติบโตและหาอาหารอยู่ในเขตพื้นที่ใด (Ball DW, 2007) ซึ่งส่งผลต่อส่วนประกอบที่พบในน้ำผึ้ง โดยมีส่วนประกอบที่หลากหลาย ได้แก่ sugars (80-89%), proteins, amino acids (0.1-0.4%), enzymes, organic acids, vitamins, minerals, phenolic, volatile compounds และ น้ำ (15-17%) อย่างไรก็ตามพบว่า น้ำผึ้งจากทั่วโลกมีองค์ประกอบที่คล้ายกัน ได้แก่ กลุ่มสารประกอบ phenolic เช่น caffeic, ellagic, ferulic and p-coumaric acids, กลุ่มสารประกอบ flavonoid เช่น apigenin, chrysin, galangin, hesperetin, kaempferol, pinocembrin และ quercetin; กลุ่มสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ tocopherols, ascorbic acid, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) และ reduced glutathione (GSH)

นอกจากนั้น ยังพบวิตามินหลากหลายชนิด ได้แก่ ascorbic acid (Vitamin C), thiamine (Vitamin B1), pantothenic acid (Vitamin B5), riboflavin (Vitamin B2), nicotinic acid (Vitamin B3), pyridoxine (Vitamin B6), biotin (Vitamin B8), folic acid (Vitamin B9) และ cyanocobalamin (Vitamin B12) (Ciulu M, 2011)

โดยที่สารแต่ละตัวนั้น พบรายงานฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่ชัดเจน รวมทั้งคุณสมบัติทางโภชนาการด้วย ทั้งยังสามารถเสริมฤทธิ์สารแต่ละตัวให้มากยิ่งขึ้น ซึ่งนำไปสู่การใช้ที่หลากหลาย (Patricia V, 2015) และสัมพันธ์กับความคงตัวของน้ำผึ้งนั้นๆ ในการเก็บรักษา หรือความร้อนที่สามารถทนได้ โดยที่คุณค่าทางโภชนาการและส่วนประกอบไม่เปลี่ยนแปลง (da Silva PM, 2015) ทั้งนี้ อาจรวมถึงกระบวนการเมตาบอลิซึมในผึ้งแต่ละชนิดด้วย

1.2.2 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของน้ำผึ้ง

น้ำผึ้ง ได้ถูกนำมาใช้ทางยาอย่างยาวนาน ดังนั้น การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำผึ้งจึงสามารถพบเห็นได้โดยทั่วไป ได้แก่ ฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (antimicrobial effect) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (anticancer) ฤทธิ์ลดระดับไขมันในเลือด (antihyperlipidemic) ฤทธิ์ในการทำหน้าที่ป้องกันภาวะทางหลอดเลือดหัวใจ (cardioprotective properties) ใช้ในการรักษาอาการตาผิดปกติ โรคทางเดินอาหาร โรคทางระบบประสาทและความบกพร่องในการสืบพันธุ์ รวมทั้งความสามารถในการรักษาแผลด้วย (Raoa PV, 2016) ดังแสดงในภาพที่ 1 และตารางที่ 1



ภาพที่ 1 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของน้ำผึ้ง (Raoa PV, 2016)

ตารางที่ 1 Physicochemical properties of honey bee (Tualang and Manuka honey) and stingless bee honey (Raoa PV, 2016)

Physicochemical properties of honey bee (Tualang and Manuka honey) and stingless bee honey.

Physico-chemical properties	TH (Erejuwa et al., 2010)	MH (Stephens et al., 2010)	Stingless bee honey (Souza et al., 2006)	IHC guideline (Bogdanov et al., 1999)
Appearance	Dark brown	Light-dark brown	Amber brown	Colorless to dark brown
Moisture content	23.30% (Ahmed and Othman, 2013)	18.70%	25.02	<20.00
pH	3.55–4.00	3.20–4.20	3.05–4.55	3.40–6.00
Total reducing sugars	67.50%	76.00%	55.00–86.00%	>60.00
Glucose	30.00%	36.20%	8.20–30.98	23.00–32.00
Fructose	29.60%	40.00%	31.11–40.20	31.20–42.40
Sucrose	0.60%	2.80%	0.31–1.26%	0.00–2.80
Maltose	7.90%	1.20%	NA	NA
Calcium	0.18%	1.00%	NA	NA
Potassium	0.51%	1.00%	NA	NA
Sodium	0.26%	0.0008%	NA	NA
Magnesium	0.11%	1.00%	NA	NA
Specific gravity	1.34	1.39	NA	NA
Electrical conductivity (mS/cm)	0.75–1.37	0.53	0.49–8.77	0.80–4.40
HMF (mg/kg)	46.17	40.00	8.80–69.00	<80
Ash content (g/100 g)	0.19	0.03	0.01–0.12	<0.6

TH, Tualang honey; MH, Manuka honey; HMF, hydroxymethylfurfural; IHC, International Honey Commission; NA, not available.

จากข้อมูลเบื้องต้น จะเห็นว่ามีการศึกษาส่วนใหญ่ในผึ้งสายพันธุ์ที่มีเหล็กไน แต่ในสายพันธุ์ที่ไม่มีเหล็กไนนั้น ยังมีการศึกษาที่จำกัด ดังนั้น ในงานวิจัยนี้ จึงต้องการศึกษาฤทธิ์ต่างๆในน้ำผึ้งจากชันโรงที่ได้จากหลายแหล่ง

1.2.3 การทดสอบฤทธิ์ทางงานวิจัยและความสำคัญ

1.2.3.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาร ได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง เทคนิคและวิธีการที่ใช้วิเคราะห์ก็ได้รับการคิดค้นและพัฒนาอย่างต่อเนื่องเช่นกัน โดยแนวทางในการวิเคราะห์นั้น จะประเมินในแง่ของความสามารถของสารที่สนใจ ในการกำจัดสารอนุมูลอิสระหรือการลดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) โดยแบ่งออกได้เป็น 2 รูปแบบ ขึ้นกับปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ กลไกโดยหลักการถ่ายเทไฮโดรเจนอะตอม (hydrogen atom transfer, HAT) เช่น Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) หรือ Total radical trapping antioxidant parameter (TRAP) เป็นต้น และอีกกลไก คือ อาศัยหลักการถ่ายเทอิเล็กตรอน (electron transfer, ET) เช่น FRAP assay, DPPH assay เป็นต้น (สุพัตรา ปรศุพัฒนา, 2555)

ตารางที่ 2 การจำแนกชนิดของการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตามกลไก (สุพัตรา ปรศุพัฒนา, 2555)

Assays involveing hydrogen atom transfer reactions $ROO^\circ + AH \rightarrow ROOH + A^\circ$ $ROO^\circ + LH \rightarrow ROOH + L^\circ$	ORAC (Oxygen radical absorbance capacity) TRAP (total radical trapping antioxidant parameter) Crocin bleaching assay IOU (Inhibited oxygen uptake) Inhibition of linoleic acid oxidation Inhibition of LDL oxidation
Assays by electron-transfer reaction $M(n) + e \text{ (from AH)} \rightarrow AH^{\circ+} + M(n-1)$	TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) FRAP (ferric ion reducing antioxidant parameter) DPPH (diphenyl-1-picrylhydrazy) Copper(II) reduction capacity Total phenolic assays by Folin-Cicalateu reagent
Other assays	TOSC (total oxidant scavenging capacity) Inhibition of Briggs-Rauscher oscillation reaction Chemiluminescent Electrochemiluminescence

AH, antioxidant

1.2.3.2 การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ

การอักเสบ (Inflammation) เป็นปฏิกิริยาการตอบสนองของร่างกายต่อสิ่งแปลกปลอมที่มากระตุ้นเซลล์หรือเนื้อเยื่อให้เกิดความเสียหาย โดยลักษณะสำคัญที่สามารถสังเกตได้ 5 อย่างหลักๆ คือ อาการปวดบริเวณที่อักเสบ (pain), บวมบริเวณที่อักเสบ (swelling), บริเวณที่อักเสบมีลักษณะแดงขึ้น (redness), บริเวณที่อักเสบมีอุณหภูมิที่สูงขึ้น (heat), และมีการเสียหายที่การทำงานของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่เกิดการอักเสบ (loss of function) หรือที่มักนิยามให้เข้าใจง่ายถึงพยาธิสภาพว่าเกิดการอักเสบ ประกอบด้วย ปวด บวม แดง ร้อน นั้นเอง การเปลี่ยนแปลงที่สำคัญ ประกอบไปด้วย 3 กระบวนการหลัก ได้แก่ 1) การขยายหลอดเลือดขนาดเล็กทำให้การเพิ่มขึ้นของการไหลเวียนเลือด 2) การเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของหลอดเลือด ทำให้เพิ่มการซึมผ่านของผนังหลอดเลือด โปรตีน และ เซลล์เม็ดเลือดขาวไหลออกจากการไหลเวียนเลือดได้ และ 3) การเคลื่อนตัวของ เม็ดเลือดขาวออกจากหลอดเลือดสู่บริเวณที่ได้รับบาดเจ็บและเริ่มกำจัดสิ่งแปลกปลอม

การตอบสนองของหลอดเลือดต่อภาวะการเกิดการอักเสบแบบเฉียบพลัน จะทำให้เกิดการรั่วออกมาของโปรตีนและสารน้ำจากหลอดเลือด เนื่องจากการขยายตัวของหลอดเลือดและเพิ่มการซึมผ่านของผนังหลอดเลือดมากขึ้นเกิดได้จากการหลั่งของสารตัวกลางการอักเสบต่างๆเช่น histamine ทำให้กล้ามเนื้อเรียบบริเวณหลอดเลือดขยายส่งผลให้การไหลเวียนของเลือดเพิ่มมากขึ้นซึ่งเป็นสาเหตุของความร้อนและแดง บริเวณที่เกิดการอักเสบ การเพิ่มการซึมผ่านของผิวเซลล์บริเวณผนังของหลอดเลือด (endothelial cells) ช่วยให้ neutrophils ออกจากหลอดเลือดมาได้จากการที่ neutrophils สะสมอยู่ กล่าวคือการรั่วผ่านออกมาเกิดจาก vascular endothelial growth factor (VEGF) เพิ่มขึ้น การเพิ่มขึ้น hydrostatic pressure และการลดลงของ colloid osmotic pressure (Kumar JM, 2015)

การตอบสนองของเม็ดเลือดขาวที่สำคัญที่สุดในปฏิกิริยาการอักเสบโดยทั่วไปคือ การการเกิดภาวะ phagocytosis ได้แก่ neutrophils และ macrophage การตอบสนองจะให้เกิดการเคลื่อนตัวของ เม็ดเลือดขาว จากภายในหลอดเลือดออกไปยังเนื้อเยื่อที่มีการอักเสบ โดยจะถูกควบคุมโดย adhesion molecules และ cytokines ซึ่งเรียกว่า chemokines โดยจะมีกระบวนการหลายขั้นตอน เริ่มจากการที่ เม็ดเลือดขาว เคลื่อนที่มาบริเวณผิวเซลล์ มีการหมุนไปบนผนังหลอดเลือด endothelium cell เพื่อให้ได้ตำแหน่งที่เหมาะสมของการยึดเกาะ โดยการใช้การจับกันของ integrin บน เม็ดเลือดขาว

จับกับ selectin บน endothelium cell และ adhesion molecules ตัวต่างๆ เช่น CD31 (PECAM-1), ICAM-1 หลังจากเม็ดเลือดขาวออกมาจะทำการจับกินสิ่งแปลกปลอมแล้วหลัง cytokines เช่น TNF, IL-1 leukocytes ส่วนใหญ่ของการอักเสบเฉียบพลัน neutrophils จะตอบสนองต่อการอักเสบก่อนและออกไปก่อน ในช่วง 6 ถึง 24 ชั่วโมงแรกและในขณะที่ monocytes มาถึงใน 24 ถึง 48 ชั่วโมง การเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาวไปยังเนื้อเยื่อบริเวณที่เกิดการบาดเจ็บด้วยการบวมที่เรียกว่า chemotaxis โดยอาศัยสารสื่อกลางในการอักเสบที่สร้างขึ้นในพลาสมา ได้แก่ cytokines ,complement system โดยเฉพาะ C5a และ arachidonic acid (AA) metabolites การตอบสนองของเม็ดเลือดขาว เช่น neutrophils และ monocytes เหล่านี้ประกอบด้วย การรับรู้ของสิ่งแปลกปลอม โดย TLRs และตัวรับอื่นๆ การเกิด phagocytosis ของเม็ดเลือดขาว ทำลายสิ่งแปลกปลอม โดย lysosomal enzymes และ reactive oxygen, nitrogen species (ROS, NOS) เช่น superoxide (O_2^-) คือ hypochlorite ($HOCl^-$) , hydroxyl radical ($^{\cdot}OH$) และจาก nitric oxide (NO) เป็น peroxynitrite ($OONO^-$) เป็นต้น Reactive Oxygen Species มีการผลิต ROS ภายใน lysosome และ phagolysosome ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับอนุภาคที่เม็ดเลือดขาวกินเข้าไปได้โดยไม่ทำลายเซลล์ หลังจากนั้น superoxide (O_2^-) จะถูกเปลี่ยนเป็น hydrogen peroxide (H_2O_2) โดย เม็ดเลือดขาว จะมีเอนไซม์ myeloperoxidase (MPO) เปลี่ยน H_2O_2 เป็น hypochlorite (OCl_2^-) ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องในการเกิดความเสียหายของเนื้อเยื่อที่เกิดจากการอักเสบ Nitric Oxide (NO) สร้างจาก arginine โดยใช้ nitric oxide synthase (NOS) ซึ่งมา 3 ชนิดคือ NOS: endothelial (eNOS), neuronal (nNOS) และ inducible (iNOS) eNOS และ nNOS โดยใช้ iNOS ในการกำจัดเชื้อ จุลินทรีย์ซึ่งจะถูกกระตุ้นโดย cytokines (เช่น $IFN-\gamma$) หรือผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ ภายใน macrophages NO จะทำปฏิกิริยากับ O_2^- ได้ peroxynitrite ($ONOO^-$) โดยจะงานเหมือน ROS ทำให้เกิดการโจมตีไขมัน lipids โปรตีนและกรดนิวคลีอิกของจุลินทรีย์และเซลล์สารสื่อกลางการอักเสบ ที่สำคัญที่สุดในการอักเสบเฉียบพลัน ได้แก่ amyloid vasoactive ผลิตภัณฑ์ lipid (prostaglandins และ leukotrienes), cytokines (รวม chemokines) และ comple-ment activation

ตารางที่ 3 แสดงรายละเอียดของสารสื่อกลางในการอักเสบ (Kumar JM, 2015)

ชนิดของสาร	แหล่งที่มา	การเปลี่ยนแปลงที่สำคัญ
Histamine	Mast cells, basophils, platelets	ขยายหลอดเลือด เพิ่มการซึมผ่านของหลอดเลือด
Prostaglandins	Mast cells, leukocytes	ขยายหลอดเลือด อาการปวด ใช้
Leukotrienes	Mast cells, leukocytes	เพิ่มการซึมผ่านของผนังหลอดเลือด การเคลื่อนเข้าหาสิ่งกระตุ้น การเกาะของเม็ดเลือดขาวกับผนังหลอดเลือด
Cytokines (TNF, IL-1, IL-6)	Macrophages, endothelial cells, mast cells	กระตุ้นผนังหลอดเลือดแดง ใช้ ระบบเผาผลาญผิดปกติ ความดันโลหิตต่ำ (shock)
Chemokines	Leukocytes, activated macrophages	การเคลื่อนเข้าหาสิ่งกระตุ้น กระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาว
Platelet-activating factor	Leukocytes, mast cells	หลอดเลือดขยายตัว และเพิ่มการซึมผ่าน การเกาะติดของเม็ดเลือดขาวกับผนังหลอดเลือด การเคลื่อนเข้าหาสิ่งกระตุ้น สลายแกรนูล
Complement	Plasma (สร้างจากตับ)	การกระตุ้นและการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาวหาสิ่งกระตุ้น, ลายสิ่งแปลกปลอมโดยตรง (membrane attack complex), ขยายหลอดเลือด
Kinins	Plasma (สร้างจากตับ)	เพิ่มการซึมผ่านของผนังหลอดเลือด, การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ, หลอดเลือดขยายตัว, อาการปวด

Arachidonic Acid Metabolites เป็น เกิดจาก arachidonic (AA) ใน phospholipids ของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยใช้เอนไซม์ phospholipase A₂ ซึ่งจะถูกเปลี่ยนไปเป็น prostaglandins (สร้างโดย cyclooxygenases: COX) และ

leukotrienes, lipoxins (สร้างโดย lipoygenases) ซึ่งมีส่วนในการเกิดการอักเสบ โดยตัวที่สำคัญที่ทำให้เกิดการอักเสบคือ prostaglandins โดยจะถูกกระตุ้นได้โดย COX-1 และ COX-2 แต่ COX-2 จะสามารถกระตุ้นได้ในช่วงของการอักเสบ

Cytokines เป็น โมเลกุลของ Messenger ของระบบภูมิคุ้มกัน การปฏิสัมพันธ์ของเซลล์และหน้าที่ของ leukocytes เป็นสื่อกลางโดยโปรตีนที่เรียกว่า cytokines จะถูกควบคุมโดย interleukins ซึ่งในการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันที่ได้รับมา (innate immune) จะสร้างขึ้นมากระตุ้นการอักเสบและยับยั้งการจำลองแบบของไวรัส cytokines เหล่านี้ ได้แก่ TNF, IL-1, IL-12, IFN ชนิด I, IFN- γ และ chemokines จะถูกสร้างจาก macrophages Tumor Necrosis Factor (TNF) และ Interleukin-1 (IL-1) เพิ่มการยึดเกาะของเม็ดเลือดขาวกับ endothelium และเคลื่อนตัวออกจากหลอดเลือด TNF เกิดจากสัญญาณผ่าน TLRs และตัวรับสัญญาณอื่นๆ การสังเคราะห์ IL-1 ถูกกระตุ้นโดยสัญญาณเดียวกัน TNF ช่วยเพิ่มการตอบสนองของ neutrophils ต่อสิ่งเร้าอื่น ๆ เช่นแบคทีเรีย endotoxin และกระตุ้นการทำงานของจุลินทรีย์ใน macrophages โดยกระตุ้นการผลิต NO

เซลล์และสารสื่อกลางในกระบวนการอักเสบเรื้อรังที่สำคัญ ได้แก่ Macrophage จะได้รับการกระตุ้นโดยสารหลายชนิดหลังจาก T-lymphocyte ถูกกระตุ้น จะหลั่งสารสื่อกลาง จำพวก cytokines ให้มากระตุ้น Macrophage ให้มีขนาดเซลล์ที่โตขึ้น ซึ่งจะมีความสามารถในการจับกินและทำลายเชื้อโรคเพิ่มสูง Classical macrophage activation จะถูกกระตุ้นโดยสิ่งที่จุลชีพผลิตออกมา เช่น endotoxin ซึ่งจะไปจับกับ Toll-Like Receptors (TLRs) ซึ่งได้รับสัญญาณที่สำคัญจาก T-cell ก็คือ IFN- γ macrophage จะหลั่ง NO, ROS และเอนไซม์ lysosomal ซึ่งทั้งจะสามารถฆ่าเชื้อจุลชีพและหลั่ง cytokine กระตุ้นกระบวนการอักเสบ ส่วน Alternative macrophage activation จะถูกกระตุ้นโดย cytokine นอกเหนือจาก IFN- γ เช่น IL-4 และ IL-13 ซึ่งหลั่งมาจาก T lymphocyte และเซลล์อื่น ๆ ซึ่ง Macrophage เหล่านี้จะยับยั้ง classical activation pathway โดย Macrophage จะหลั่ง growth factors ซึ่งส่งเสริมการสร้างหลอดเลือดใหม่, กระตุ้นเซลล์ fibroblasts รวมถึงกระตุ้นกระบวนการสร้างคอลลาเจน

ในการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบสามารถทำได้ทั้งทางอ้อมและทางตรง ได้แก่

- การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบในหลอดทดลอง (in vitro test) เช่น Anti-denaturation activity ที่วัดความสามารถในการยับยั้งการเสีย

สภาพของโปรตีนในหลอดทดลอง (Williams LA, 2018) หรือ Proteinase inhibitory assay ซึ่งวัดความสามารถในการยับยั้ง เอนไซม์กลุ่ม proteinase ที่ทำหน้าที่หลักระหว่างเกิดการอักเสบ โดยใช้เอนไซม์ trypsin เป็นต้นแบบ (Mallikadevi T, 2012) หรือ β -glucosidase inhibition assay ที่อาศัยหลักการคล้ายกัน (Gacche RN, 2006) และอีกหลายการทดสอบ

- การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยใช้เซลล์เม็ดเลือดแดง เช่น การทดสอบการเหนี่ยวนำให้เม็ดเลือดแดงแตกโดยใช้ความร้อน (Heat induce hemolysis) หรือ การเหนี่ยวนำให้เม็ดเลือดแดงแตกโดยใช้ Hypotonicity (Hypotonic induce- hemolysis)
- การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในการเพาะเลี้ยงเซลล์มาโครฟาจ THP-1 หรือ RAW264.7 (Srisook K, 2005; Dechayont B, 2017)
- การทดสอบสารสื่อการอักเสบ และ cytokines ที่เกี่ยวข้อง (Dong L, 2017)
- การทดลองฤทธิ์ต้านการอักเสบในสัตว์ทดลอง (in-vivo test) เช่น วิธีทดลอง Xylene – Induced Ear Edema (Bagad AS, 2013) หรือ Carragenan-induced paw edema (Costa G, 2016) เป็นต้น

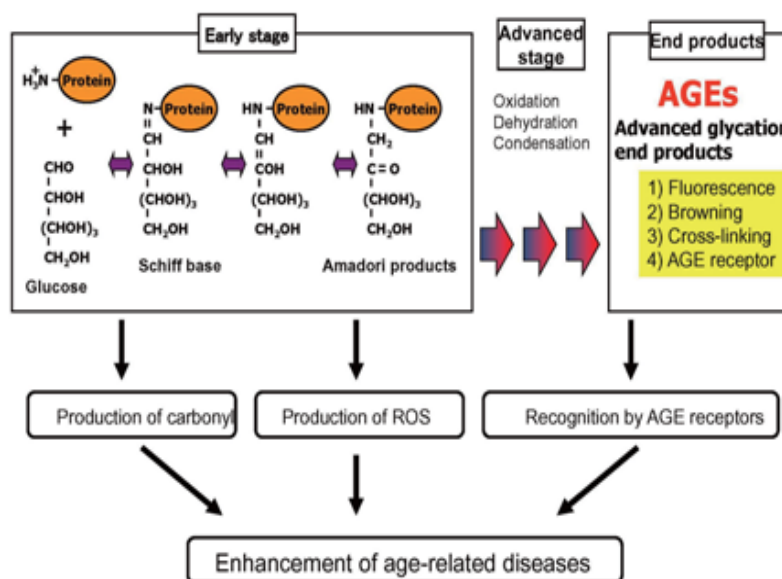
1.2.3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยทั่วไปสามารถการวิเคราะห์ด้วย 2 วิธีหลักๆ ได้แก่ Disc-agar diffusion method และ Broth micro dilution method โดยเชื้อแบคทีเรียทั่วไปที่นิยมนำมาทดสอบ เพื่อเป็นตัวแทนครอบคลุมเชื้อแบคทีเรีย ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ได้แก่ Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Pseudomonas aeruginosa และ Escherichia coli

1.2.3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านแอดวานซ์ไกลเคชันเอนด์โปรดักต์

AGEs เกิดจากปฏิกิริยาเมลลาร์ด (millard reaction) เป็นการจับกันของ หมู่คาร์บอนิลของน้ำตาลรีดิวซ์ กับกรดอะมิโนที่มีหมู่อะมิโนอิสระที่ปลายสาย (N-terminal amino acid) ของโปรตีน ไล-โปโปรตีน หรือกรดอะมิโนด้วยพันธะโควาเลนต์เป็นกระบวนการที่ไม่อาศัยเอนไซม์ในการเกิดปฏิกิริยา(non-enzymatically reaction) ได้เป็นผลิตภัณฑ์ในรูป schiff's base ซึ่งเป็นสารที่ไม่คงตัวและเกิดปฏิกิริยาผันกลับได้ (reversible and unstable N-substituted glycosylamine) โดยผลิตภัณฑ์ในรูป Schiff's base จะเกิดกระบวนการไอโซเมอ

ไรเซชัน (isomerization) และมีการเรียงตัวใหม่เรียกว่ากระบวนการ amadori rearrangement ได้สารที่มีความคงตัวเรียกว่าผลิตภัณฑ์แอมาดอริ (amadori products) (Peng X, 2011) และสามารถพัฒนาต่อไปเป็น AGEs โดยผ่านกระบวนการออกซิเดชันดีไฮเดรชัน (oxidation dehydration) และคอนเดนเซชัน (condensation) ต่อไป (22) ดังแสดงในรูปที่ 3 ระหว่างที่เกิดการเปลี่ยนโครงสร้างของสารประกอบแอมาดอริจะเกิดการสะสมของสารตัวกลางที่มีหมู่คาร์บอนิลที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา (highly reactive intermediate carbonyl groups) คือ สารประเภทแอลฟาไดคาร์บอนิล (α -dicarbonyls) หรือออกโซแอลดีไฮด์ (oxoaldehydes) เช่น 3-deoxyglucosone และ methylglyoxal โดยจะเรียกสารตัวกลางเหล่านี้ว่า “carbonyl stress” โดยแอลฟาไดคาร์บอนิลมีคุณสมบัติในการทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนซัลไฟด์ไรน (amino sulfhydryl) และหมู่กวานิดีน (guanidine functional) ของโปรตีน ส่งผลทำให้เกิดการแปลงสภาพของโปรตีนเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลและสร้างพันธะจับกับโปรตีน (Goldin A, 2006)



ภาพที่ 2 แสดงกระบวนการเกิด AGEs ผ่านปฏิกิริยา millard reaction (Nagai R, 2012)

หมู่คาร์บอนิลที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาไม่ได้มาจากการเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate metabolism) เท่านั้น แต่ยังสามารถเกิดได้จากการสลายของโปรตีนหรือไขมัน โดยเรียกผลิตภัณฑ์จากหมู่คาร์บอนิลที่มาจากกระบวนการสลายของไขมันว่า “advanced lipoxidation end products (ALEs)” แต่อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์ของ AGEs และ ALEs ไม่มีความแตกต่างกันมากนัก ยกตัวอย่างเช่น N^{ϵ} -(carboxymethyl) lysine หรือ CML สามารถเกิดได้

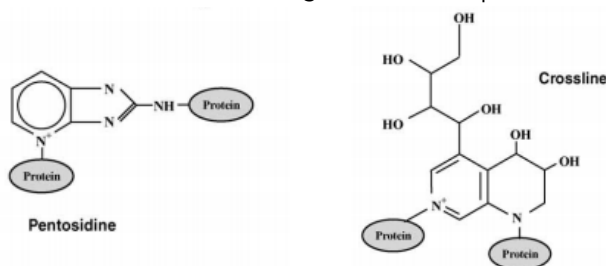
จากหมู่คาร์บอนิลทั้งในส่วนที่มาจาก การสลายของคาร์โบไฮเดรตและไขมัน (Stirban A, 2014)

การเกิดและสะสมของ AGEs ใช้เวลานานเป็นสัปดาห์ถึงหลายปีจึงจะส่งผลกระทบต่อสารประกอบอายุยาว (long-lived substrates) ยกตัวอย่างเช่น คอลลาเจน แต่ในภาวะที่มีระดับน้ำตาลและอนุมูลอิสระที่สูงขึ้น หรือสภาวะเครียดจากออกซิเดชันเกิดมากขึ้น กระบวนการสร้าง AGEs สามารถเกิดได้ภายในเวลาไม่กี่ชั่วโมงมีผลกระทบต่อสารประกอบอายุสั้น (short-lived substrates) ยกตัวอย่างเช่น ฮอริโมน เอนไซม์ กรดอะมิโนหรือไขมัน โดยส่งผลกระทบต่อโครงสร้างหรือหน้าที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม (Stirban A, 2014)

The Receptor for Advanced Glycation End products หรือ RAGE เป็นคำที่ใช้เรียกรีเซปเตอร์ของ AGEs โดย RAGE จัดเป็นรีเซปเตอร์ในกลุ่ม immunoglobulin superfamily (Goldin A, 2006) ที่พบบนผิวเซลล์ของกล้ามเนื้อเรียบ (smooth muscle) แมโครเฟจ (macrophages) เซลล์บุหลอดเลือด (endothelial cell) และแอสโตรไซต์ (astrocyte) (25) RAGE ประกอบด้วย 3 โดเมนหลักที่ยื่นออกนอกเซลล์ ได้แก่ V-type ทำหน้าที่เป็น ligand binding มี 1 โดเมนและ C-type ทำหน้าที่เป็น immunoglobulin มี 2 โดเมน การจับกันระหว่าง AGEs กับรีเซปเตอร์มีผลก่อการเกิดพยาธิสภาพ เนื่องจาก RAGE มีบทบาทและความสัมพันธ์กับภาวะการอักเสบของร่างกาย เช่น โรคหลอดเลือด โรคเบาหวาน โรคที่มีการทำลายของเซลล์ประสาทในสมอง และโรคเบาหวาน

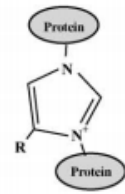
ชนิดของ AGEs สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภทหลัก ดังนี้
Fluorescent cross-linking AGEs, Non-fluorescent cross-linking AGEs และ Non-cross-linking AGEs (Ahmed N, 2005; Peyroux J, 2006)

1) Fluorescent cross-linking AGEs ได้แก่ pentosidine และ crossline

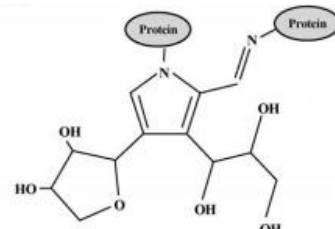


2) Non-fluorescent cross-linking AGEs ได้แก่

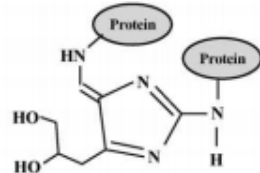
Imidazolium dilycine cross-links, Alkyl formyl glycosyl pyrrole (AFGP) cross-links, Arginine-lysine imidazole (ALI) cross-links, Glucosepane และ Methylglyoxyl lysine dimer



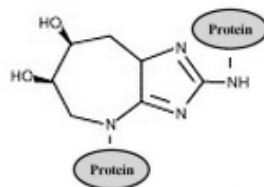
Imidazolium dilycines



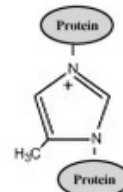
Alkyl formyl glycosyl pyrrole



Arginine-lysine imidazole

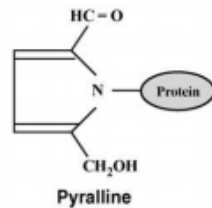


Glucosepane

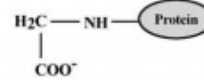


MOLD

3) Non-cross-linking AGEs ได้แก่ pyraline และ N^ε-(carboxymethyl) lysine (CML)



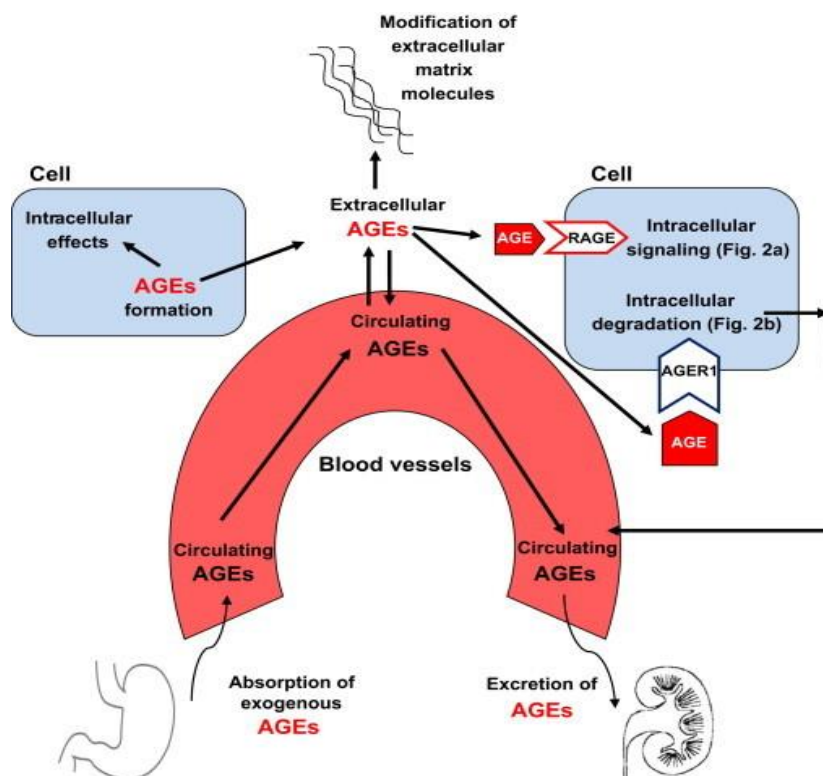
Pyraline



Carboxymethyllysine

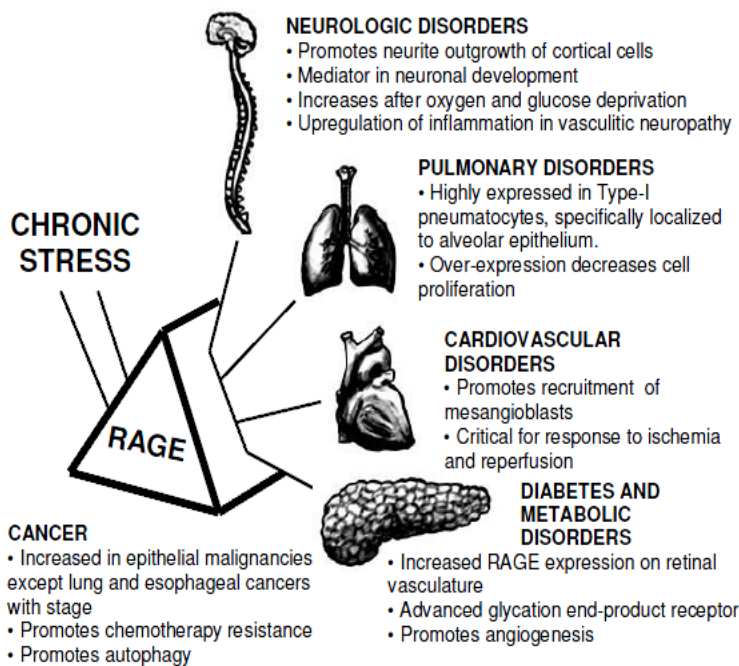
ตารางที่ 4 แสดงค่า Excitation และ Emission ของ AGEs ที่มีคุณสมบัติ fluorescent ใน Neutral aqueous media (Sero L, 2013)

ชนิดของ AGEs	ความยาวคลื่น (wave length)	
	Excitation (nm)	Emission (nm)
1. Vesperlysine A	366	442
2. Vesperlysine B	366	442
3. Vesperlysine C	345	405
4. Pentosidine	335	385
5. Lysyl - pyrrolyridine	370	448
6. FFI	380	440
7. Argpyrimidine	335	400
8. Crossline	379	463
9. Fluorolink	380	480



ภาพที่ 3 แสดงวัฏจักรของ endogenous และ exogenous AGEs (Stirban A, 2014)

AGEs ถูกทำลายจากภายนอกเซลล์ด้วยกระบวนการโปรติโอไลซิส (proteolysis) หรือการที่เข้าไปจับกับรีเซปเตอร์ของ AGEs (AGEs-receptor: AGER-1) ทำให้เกิดการนำกลับ (uptake) เข้าไปทำลายภายในเซลล์แมคโครเฟจ เป็น secondary generation AGEs ซึ่งเป็นสารที่มีมวลโมเลกุลต่ำ และเปปไทด์ที่สามารถละลายน้ำได้ โดยจะถูกขับออกทางไต อีกทั้งตับที่มี kuffer cells และเยื่อบุผนังหลอดเลือด (endothelial cells) พบว่ามีบทบาทสำคัญในทำลายสารประกอบไกลเคชั่น (glycated substrate) (Stirban A, 2014)



ภาพที่ 4 แสดงผลของ AGEs ต่อ RAGE ที่มีผลทำให้กระบวนการทำงานของเซลล์ผิดปกติและเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเรื้อรัง (Sparvero LJ, 2009)

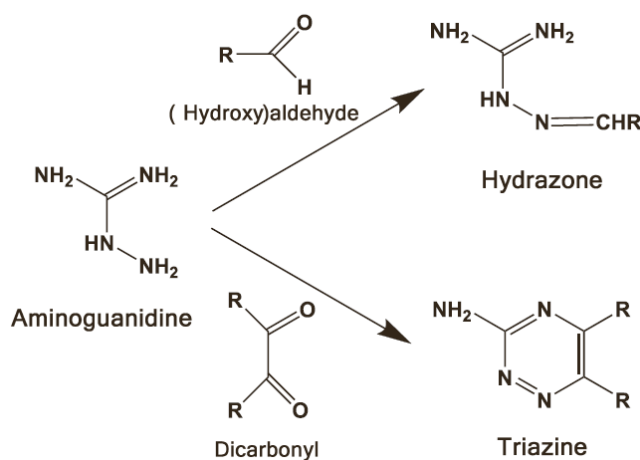
AGEs มีผลต่อการทำงานภายนอกเซลล์โดยอาศัยกระบวนการสร้างพันธะระหว่างโมเลกุลในเนื้อเยื่อรองรับฐาน (basement membrane) ของ extracellular matrix (ECM) ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์อย่างถาวร และมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง AGEs ต่อ RAGE (receptor for advance glycation end products)

การเกิด AGEs ใน ECM เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นอย่างช้าๆระหว่าง AGEs กับโปรตีน ทำให้เกิดการสะสมของ AGEs บนโปรตีนใน ECM ซึ่งAGEsสามารถสร้างพันธะหรือเรียกว่า “Trap” ระหว่าง Macromolecule อื่นในบริเวณนั้น และ AGEs มีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของโปรตีน คอลลาเจน ไวโทเนคติน (vitronectin) และลามินิน (laminin) โดยอาศัยการสร้างพันธะโควาเลนต์ระหว่าง AGEs กับ AGEs (AGE-AGE intermolecular covalent bonds) หรือสร้างพันธะระหว่างAGEs กับโปรตีน เช่น AGEs สร้างพันธะกับคอลลาเจน ชนิดที่1 และอีลาสติน (elastin) เป็นการเพิ่มพื้นที่มากขึ้นใน ECM ทำให้หลอดเลือดแข็งมากขึ้น เป็นต้น (Goldin A, 2006)

การเกิด AGEs ภายในเซลล์จากน้ำตาลกลูโคส (glucose) เกิดซ้ำกว่าน้ำตาลจากธรรมชาติ ได้แก่ fructose, glyceralde-hyde-3-phosphate และ glucose-6-phosphate หลังจากระดับน้ำตาลในเลือดสูงเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ พบว่ามีปริมาณของ AGEs เพิ่มขึ้นในเยื่อบุผนังหลอดเลือดอย่างมีนัยสำคัญทาง

สลิติ โดย AGEs มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดสภาวะความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ภายในเซลล์ (Goldin A, 2006)

อะมิโนกวานิดีน (aminoguanidine) มีเป็นส่วนประกอบของไฮดราซีน (hydrazine) ในการป้องกันปฏิกิริยารวมกันหมู่คาร์บอนิลของน้ำตาลรีดิวซ์กับหมู่อะมิโนในปฏิกิริยาไกลเคชันขั้นเริ่มต้น (early glycation) ซึ่งจะยับยั้งและลดลง การเกิดผลิตภัณฑ์แอมาดอริ นอกจากนี้กลไกการยับยั้งการสร้าง AGEs โดยการเข้าจับกับสารประกอบไดคาร์บอนิลอาศัยกระบวนการไรโบสออกซิเดชัน (ribose oxidation) ผ่านทาง namiki หรือ wolff pathway เปลี่ยนไปอยู่ในอนุพันธ์ไตรอะซีน (1,2,4-triazine derives)



ภาพที่ 5 รูปภาพแสดงกลไกการยับยั้งการสร้าง AGEs ของ Aminoguanidine (Nagai R, 2012)

นอกจากนี้ ยังพบว่าสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สามารถยับยั้งการสร้าง AGEs ได้ (บุริน เลาะห์วัฒน์, 2011) ได้แก่

1) วิตามินอี

เป็นวิตามินที่ละลายได้ในไขมันเป็นสารต้านออกซิเดชันที่สำคัญ โดยวิตามินอีทำงานร่วมกับสารต้านออกซิเดชันตัวอื่นๆ เช่น วิตามินซีและซิลิเนียม เป็นต้น วิตามินอีช่วยปรับให้ร่างกายสามารถนำเอาวิตามินเอมาใช้ซึ่งจะช่วยในการป้องกันสารที่เป็นพิษที่มีผลมาจากโลหะเช่น ตะกั่วในธรรมชาติ มีวิตามินอีอยู่หลายชนิด ปัจจุบันแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่คือโทโคเฟอรอลและโทโคโทอินอลแต่ละกลุ่มยังแยกเป็นวิตามินย่อยๆ อีก 4 ชนิดได้แก่ อัลฟา (α -) เบตา (β -) แกมมา (γ -) และเดลตา (δ -) วิตามินอีทำหน้าที่ให้ไฮโดรเจนกับเปอร์ออกซิล (peroxyl) เพื่อยับยั้งกระบวนการเกิดอนุมูลอิสระ

2) วิตามินซี

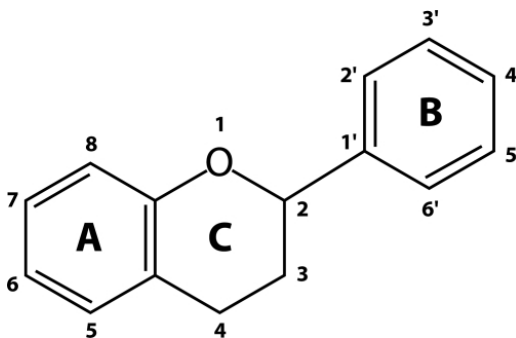
มีชื่อทางเคมีว่ากรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) เป็นวิตามินที่ละลายได้ในน้ำ สลายตัวเมื่อถูกความร้อนหรือทิ้งไว้ในอากาศที่มีความชื้น วิตามินซีมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยเข้าทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อนุมูลอิสระไฮดรอกซิลและเปอร์ออกซิล นอกจากนี้วิตามินซีสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระแล้ว ยังทำหน้าที่เป็นตัวส่งเสริมประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระของวิตามินอีด้วย โดยทำให้อนุมูลอิสระแอลฟาโทโคฟีรอล (alpha-tocopherol• หรือ TO•) เปลี่ยนกลับไปเป็นแอลฟาโทโคฟีรอล (alpha-tocopherol หรือ TOH) เช่นเดิม

3) สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds)

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่พบได้ในพืชทั่วไป มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนเบนซีนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อยหนึ่งหมู่หรือมากกว่านั้น พบในพืชมักจะรวมอยู่ในโมเลกุลของน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ (glycosides) สารประกอบฟีนอลิกที่พบในธรรมชาติมีมากมายหลายชนิด มีลักษณะสูตรโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน ซึ่งกลุ่มใหญ่ที่สุดที่พบจะเป็นสารประกอบพลาโวนอยด์ (flavonoids) คุณสมบัติที่ได้รับความสนใจอย่างมากของสารประกอบฟีนอลิกคือ การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยสารประกอบฟีนอลิกทำหน้าที่เป็นสารรีดิวซ์ โดยเป็นตัวให้ไฮโดรเจน และกำจัดออกซิเจนที่อยู่ในรูปแอกทีฟ (ROS) ด้วย

4) ฟลาโวนอยด์ (ไบโอฟลาโวนอยด์)

ฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบฟีนอลิกที่พบมากชนิดหนึ่ง จะพบมากในพืชผักและผลไม้ ฟลาโวนอยด์มีคุณสมบัติทำให้การไหลเวียนเลือดดี ช่วยลดการอักเสบ และมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging) โดยหมู่ไฮดรอกซิลใน B-ring (รูปภาพที่ 7) มีคุณสมบัติในการดักจับกำจัดออกซิเจนที่อยู่ในรูปแอกทีฟ (superoxide anion; $O_2^{\cdot-}$) นอกจากนี้การที่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง C-3 จะช่วยเพิ่มคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระได้



ภาพที่ 6 โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของน้ำผึ้งจากผึ้งชันโรง ซึ่งได้แก่ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่เกี่ยวข้องอื่นๆ

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

เป็นการศึกษาทดลองในห้องปฏิบัติการวิจัยในหลอดทดลองและในระดับเซลล์ ที่คณะเภสัชศาสตร์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเบื้องต้นของน้ำผึ้งชันโรง

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเบื้องต้นของสารสกัดในการต้านการอักเสบ ต้านแบคทีเรีย และต้านอนุมูลอิสระซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลการใช้ น้ำผึ้งโดยวิถีชาวบ้าน พร้อมทราบความสามารถในการพัฒนาต่อยอดเพื่อศึกษาในระดับกลไกการออกฤทธิ์ และการสร้างผลิตภัณฑ์ที่สอดคล้องกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่พบได้

บทที่ 2

วิธีการดำเนินการวิจัย

2.1 การเก็บตัวอย่าง

น้ำผึ้งชันโรง สายพันธุ์ขนเงิน (*Tetragonula pagdeni* Schwarz) ได้ถูกเก็บจาก 3 แหล่ง ได้แก่

- 1) สวนผลไม้ ใน อ.มะขาม จ.จันทบุรี ในช่วงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2558
 - 2) ป่าชายเลน ในเขตภาคตะวันออก พื้นที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ จ.จันทบุรี ในช่วงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2558
 - 3) น้ำผึ้งจิตรลดา ที่มีจำหน่ายตามท้องตลาด
- โดยตัวอย่างน้ำผึ้งทั้งหมด ถูกเก็บในภาชนะบรรจุปิดมิดชิด เก็บไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตลอดระยะเวลาที่ทำการวิเคราะห์

2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง ได้ใช้การวิเคราะห์ 3 วิธี ได้แก่ FRAP assay, DPPH assay และ ORAC assay ซึ่งมีหลักการวิเคราะห์ที่อาศัยกลไกที่แตกต่างกัน ดังรายละเอียดต่อไปนี้

2.2.1 DPPH assay

ในการวัดคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity assay ดัดแปลงมาจากวิธีของ Chang และ คณะ (2005) ใช้หลักการวัดความสามารถสารต้านอนุมูลอิสระในการให้อิเล็กตรอนแก่สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระ ตรวจวัดการเปลี่ยนสีเมื่อสารอนุมูลอิสระนั้นได้รับอิเล็กตรอน โดยที่มีสารตั้งต้น DPPH เป็นตัวกำเนิดอนุมูลอิสระในปฏิกิริยา ดังรายละเอียดการวิเคราะห์ต่อไปนี้ เติมสารละลายน้ำผึ้งที่เตรียมใน 0.9% steriled normal saline ความเข้มข้นสุทธิ 6.25, 12.5, 25, 50, 75 % (w/v) แต่ละความเข้มข้น ทำ 3 ซ้ำ ปริมาตร 100 μ l ลงใน 96-well plate และเติมสารละลาย DPPH (0.15 mM) ปริมาตร 100 μ l ผสมให้เข้ากัน เก็บในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที จากนั้นนำมาวัดการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader โดยใช้ Ascorbic acid และ Trolox เป็นสารมาตรฐาน ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ คำนวณได้จาก % inhibition

ของสารสกัดเทียบกับตัวควบคุม และคำนวณหาค่า IC_{50} ของสารสกัดชั้นจากชั้นโรงแต่ละสายพันธุ์

2.2.2 FRAP assay

ในการวิเคราะห์ด้วย Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay เป็นการวัดความสามารถสารต้านอนุมูลอิสระในการให้อิเล็กตรอนแก่สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระ ตรวจวัดการเปลี่ยนสีเมื่อสารอนุมูลอิสระนั้นได้รับอิเล็กตรอน ระดับของสีที่เปลี่ยนไปมีความสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ โดยมีวิธีการวัดดังนี้ นำสารละลาย FRAP reagent ซึ่งเตรียมจากส่วนผสม ได้แก่ Acetate buffer (300 mM, pH 3.6) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร, สารละลาย 2,4,6-Tri (2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) (10 mM ใน 40 mM HCl) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และ สารละลาย Ferric chloride (20 mM) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยทำการอุ่นสารละลายก่อนใช้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที ก่อนใช้งาน ทำการวิเคราะห์โดยเติมสารละลายน้ำผึ้งที่เตรียมใน 0.9% steriled normal saline ความเข้มข้นสุทธิ 3.125, 6.25, 12.5, 25, 37.5 % (w/v) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย FRAP reagent ปริมาตร 190 ไมโครลิตร ใน 96-well plate ผสมให้เข้ากัน แต่ละความเข้มข้น ทำ 3 ซ้ำ แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จากนั้นนำมาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader โดยใช้ Ascorbic acid และ Trolox เป็นสารมาตรฐาน (25) ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ เทียบจากสารละลายมาตรฐาน Trolox โดยคำนวณเป็นค่า Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) โดยเทียบเป็นหน่วยความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารทดสอบ ในหน่วย $\mu\text{M Trolox/g}$

2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ

ในการทดสอบฤทธิ์การต้านการอักเสบในหลอดทดลอง ได้ใช้การวิเคราะห์ 2 วิธี ได้แก่ การยับยั้ง Protein denaturation และ Proteinase inhibitory assay ดังรายละเอียดต่อไปนี้

2.3.1 การยับยั้งการเสียสภาพของโปรตีน (Protein denaturation)

ในการตรวจสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยการวัดความสามารถในการยับยั้ง Protein denaturation ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Williams และ คณะ (2008) ดังต่อไปนี้ เติมสารละลายเริ่มต้น BSA (0.2% w/v) ในสารละลาย Tris-acetate buffer (pH 6.8) ปริมาตร 2850 μl และเติมสารสกัดชั้นจากชั้นโรง หรือสารละลายยาสีฟัน หรือน้ำยาบ้วนปากที่ได้จากโครงการย่อยที่ 2 ปริมาตร 150 μl ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที จากนั้นนำมาแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส

นาน 20 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอีก 20 นาทีเพื่อให้เย็นลง จากนั้นนำไปวัดค่าความขุ่น ที่ความยาวคลื่น 660 nm ด้วยเครื่อง UV/Vis Double beam spectrometer (Elico SL-196, Mettler Teledo, Thailand) (28) ค่าที่ได้รายงานเป็น %inhibition ในการยับยั้งการตกตะกอนของโปรตีน เทียบกับตัวควบคุม โดยใช้ Diclofenac sodium เป็นสารมาตรฐาน

2.3.2 การยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเนส (Proteinase inhibitory assay)

ในการตรวจสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยการวัดความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Proteinase ได้แก่เอนไซม์ Trypsin ในการย่อยสารตั้งต้นที่เป็นโปรตีน Casein ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Mallikadevi และ คณะ (2012) โดยมีรายละเอียดคร่าวๆ ดังนี้ ในหลอดทดลอง (2 ml) ประกอบไปด้วย Trypsin ปริมาณ 0.06 mg เตรียมในสารละลาย Tris-HCl (25 mM, pH 7.4) ปริมาตร 1 ml และ สารสกัดชั้นจากชั้นโรงหรือสารละลายยาสีฟัน หรือน้ำยาบ้วนปากที่ได้จากโครงการย่อยที่ 2 ปริมาตร 1 ml ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในอ่างควบคุมอุณหภูมิ นาน 5 นาที แล้วเติมสารละลาย Casein (0.8% w/v) ปริมาตร 1 ml ผสมให้เข้ากันและบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม Perchloric acid (70%) ปริมาตร 2 ml และเขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที และนำสารละลายใสส่วนบนมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm ด้วยเครื่อง UV/Vis Double beam spectrometer (Elico SL-196, Mettler Teledo, Thailand) โดยค่าที่ได้คำนวณเป็นค่า %inhibition จากสมการ
$$\%inhibition = (1 - A_{sample} / A_{control}) \times 100 \quad (29)$$

2.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้ใช้การวิเคราะห์ 2 วิธี ได้แก่ Disc-agar diffusion method และ Broth micro dilution method ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต่อเชื้อ ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Escherichia coli* โดยวิธี Disc diffusion method ดังนี้

2.4.1 Disc-agar diffusion method

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Disc-agar diffusion method มีวิธีการคร่าวๆ ดังนี้ ใน Agar plate จะทำการเลี้ยงเชื้อที่ต้องการศึกษาก่อน จากนั้น นำ Disc ที่

หยดสารละลายน้ำผึ้งที่เตรียมใน 0.9% steriled normal saline ความเข้มข้นสุทธิ 6.25, 12.5, 25, 50, 75 % (w/v) แต่ละความเข้มข้น ทำ 3 ซ้ำ วางลงบน Agar plate แล้วบ่มในตู้เลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียวัดได้จากเส้นผ่าศูนย์กลางคร่อม disc ในหน่วย mm ของบริเวณที่เป็น Clear zone ซึ่งเรียกว่า Zone of inhibition

2.4.2 Broth micro dilution method

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Broth micro dilution method มีวิธีการคร่าวๆ โดยการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อที่ต้องการทดสอบในความเข้มข้นที่พอเหมาะ และเติมลงใน 96-well flat-bottom plate ปริมาตร 150 μ l ในแต่ละหลุม จากนั้นเติมสารละลายน้ำผึ้งที่เตรียมใน 0.9% steriled normal saline ความเข้มข้นสุทธิ 6.25, 12.5, 25, 50, 75 % (w/v) ปริมาตร 50 μ l แต่ละความเข้มข้น ทำ 3 ซ้ำ จากนั้นทำการบ่มในตู้เลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้น นำไปวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 nm ทุกๆ 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

2.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านแอดวานซ์ไกลเคชันเอนด์โปรดักต์

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านแอดวานซ์ไกลเคชันเอนด์โปรดักต์ (Advanced glycation-end products, AGEs) ด้วยการสร้าง AGEs ในหลอดทดลอง โดยการเติมสารละลาย 10 mg/ml bovine serum albumin (BSA) ใน 0.02% (w/v) PBS-azide และน้ำตาลฟรุกโตส ความเข้มข้น 250 mM ปริมาตรสุทธิ 2.9 ml และเติมสารละลายน้ำผึ้งที่เตรียมใน 0.02% (w/v) PBS-azide แต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 0.1 ml แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสในอ่างควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดแสงฟลูออเรสเซนส์ของ AGEs ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น excitation/emission เท่ากับ 335/385 nm เทียบกับสารมาตรฐาน Aminoguanidine ซึ่งเป็น AGEs inhibitor และคำนวณหาค่าการยับยั้งการสร้าง AGEs ได้จากสูตร $\% \text{ inhibition} = 100 \times (\text{Intensity}_{\text{control}} - \text{Intensity}_{\text{sample}}) / \text{Intensity}_{\text{control}}$ (Singh R, 2001)

2.6 สถิติที่ใช้ทดสอบ

ในการทดลองทำการทดสอบ 3 ซ้ำและรายงานเป็น ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานโดยการเปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างกลุ่มทดลองกับตัวควบคุม ใช้สถิติ Student's *t*-test และ

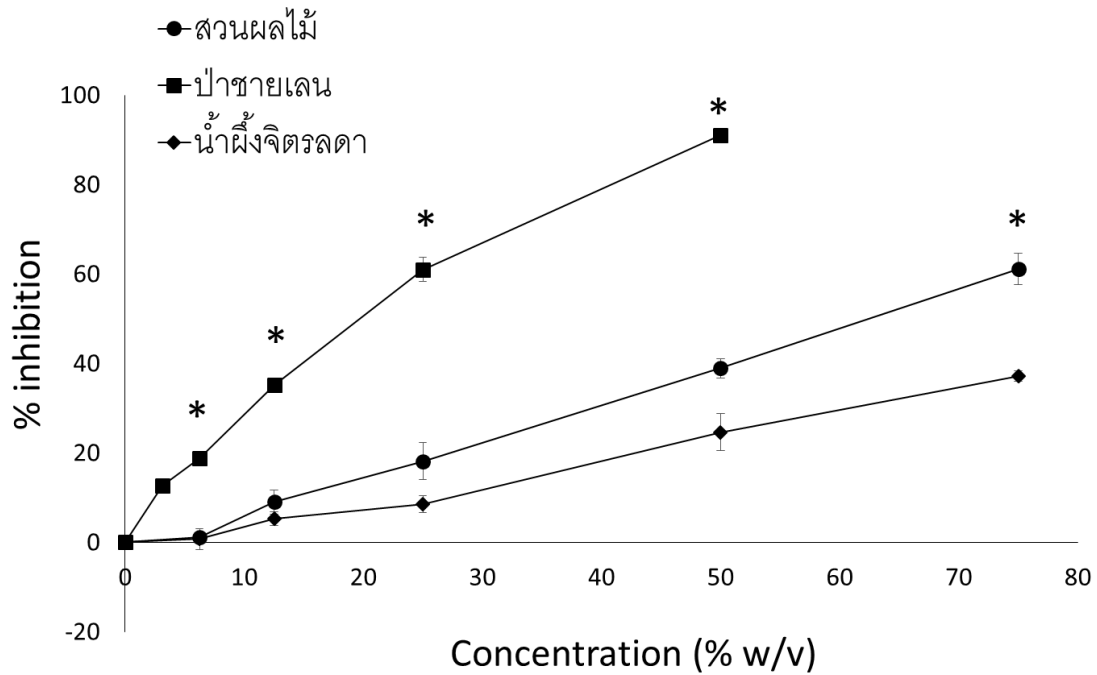
ANOVA โดยใช้เครื่องมือ SPSS version 17.0 software (SPSS Inc., IBM, US) และยอมรับสมมติฐานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า P -value < 0.05

บทที่ 3

ผลการทดลองและอภิปราย

3.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.1.1 DPPH assay



ภาพที่ 7 แสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของน้ำผึ้งจากสวนผลไม้ ป่าชายเลน เทียบกับน้ำผึ้งจิตรลดา ด้วยวิธีวิเคราะห์ DPPH assay (* p -value<0.05, ANOVA test)

ตารางที่ 5 แสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของน้ำผึ้งจากสวนผลไม้ ป่าชายเลน เทียบกับน้ำผึ้ง
จิตรลดาด้วยวิธีวิเคราะห์ DPPH assay

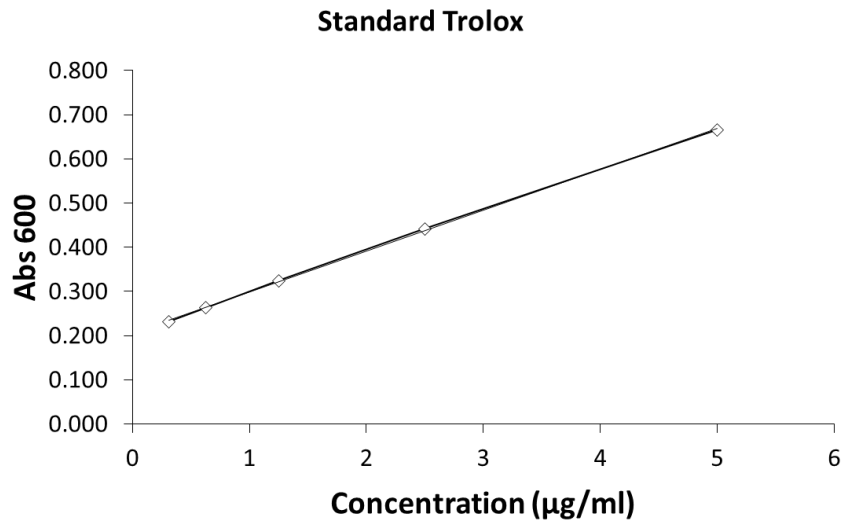
แหล่งที่มา	ความเข้มข้น (% w/v)	% inhibition	IC ₅₀ (% w/v)
สวนผลไม้	6.25	1.25±0.76	62.27±3.95
	12.5	9.00±2.63	
	25	18.16±4.16	
	50	38.90±2.12	
	75	61.14±3.45	
ป่าชายเลน	3.125	12.64±0.67	19.82±1.82
	6.25	18.73±1.29	
	12.5	35.23±0.17	
	25	61.03±2.67	
	50	91.00±0.47	
น้ำผึ้งจิตรลดา	6.25	0.79±2.34	n.d.
	12.5	5.35±1.54	
	25	8.52±1.94	
	50	24.66±4.10	
	75	37.18±1.22	

n.d., not detectable

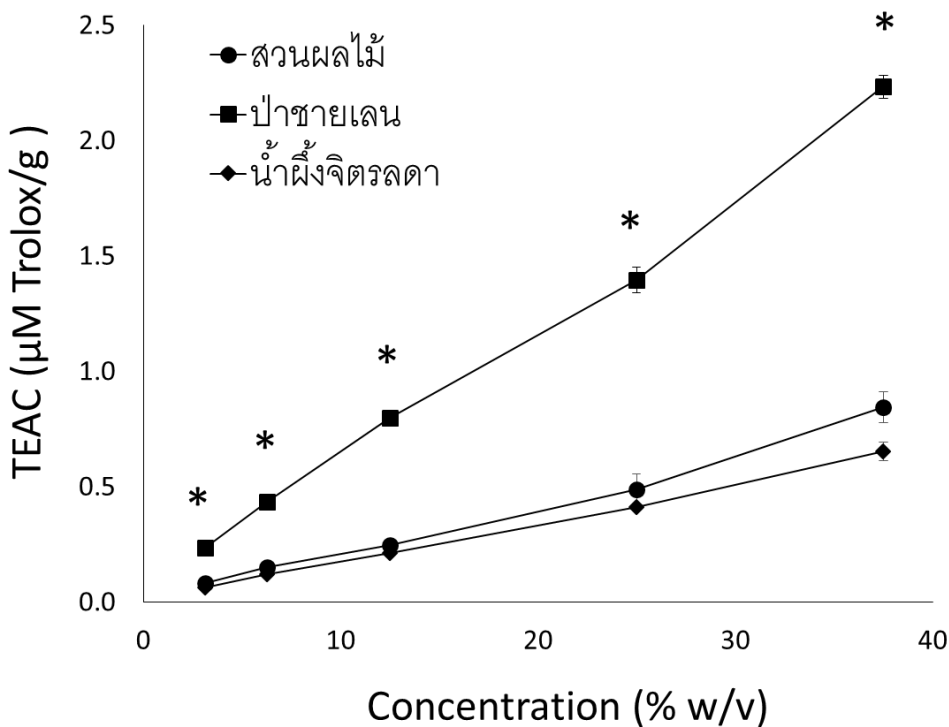
ตัวอย่างน้ำผึ้งจากสวนผลไม้ ป่าชายเลน และน้ำผึ้งจิตรลดาที่มีจำหน่ายใน
ท้องตลาด ถูกวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH assay ที่ความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50, 75 %
(w/v) ยกเว้นตัวอย่างน้ำผึ้งจากป่าชายเลนที่วิเคราะห์ที่ความเข้มข้นที่ 3.125 % (w/v)
ด้วย เนื่องจากสังเกตพบฤทธิ์ที่ค่อนข้างสูงในขั้นตอนทำการทดลองเบื้องต้น จากผลการ
ทดลองในภาพที่ 7 และตารางที่ 5 พบว่า เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำผึ้งที่
ได้จากทั้ง 3 แหล่งแล้วนั้น น้ำผึ้งที่ได้จากป่าชายเลนนั้น มีฤทธิ์สูงกว่าน้ำผึ้งที่ได้จากสวน
ผลไม้และน้ำผึ้งจิตรลดา ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญ ที่ $p\text{-value}<0.05$ โดยมีค่า IC₅₀
เท่ากับ 19.82±1.82, 62.27±3.95 และไม่สามารถหาค่าได้ ตามลำดับ

3.1.2 FRAP assay

ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay นั้น ทำการเทียบค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ได้จากกราฟมาตรฐาน โดยใช้สารมาตรฐาน trolox และคำนวณเป็นค่า trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) โดยแสดงกราฟมาตรฐาน ดังภาพที่ 8



ภาพที่ 8 แสดงกราฟมาตรฐานของ trolox ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP assay



ภาพที่ 9 แสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของน้ำผึ้งจากสวนผลไม้ ป่าชายเลน เทียบกับน้ำผึ้งจิตรลดา ด้วยวิธีวิเคราะห์ FRAP assay (* p -value<0.05, ANOVA test)

ตารางที่ 6 แสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของน้ำผึ้งจากสวนผลไม้ ป่าชายเลน เทียบกับน้ำผึ้ง
จิตรลดาด้วยวิธีวิเคราะห์ DPPH assay

แหล่งที่มา	ความเข้มข้น (% w/v)	TEAE ($\mu\text{g/ml}$)
สวนผลไม้	3.125	0.081 \pm 0.002
	6.25	0.150 \pm 0.007
	12.5	0.247 \pm 0.013
	25	0.487 \pm 0.066
	37.5	0.843 \pm 0.067
ป่าชายเลน	3.125	0.235 \pm 0.005
	6.25	0.434 \pm 0.020
	12.5	0.799 \pm 0.005
	25	1.395 \pm 0.057
	37.5	2.232 \pm 0.050
น้ำผึ้งจิตรลดา	3.125	0.063 \pm 0.002
	6.25	0.118 \pm 0.001
	12.5	0.211 \pm 0.016
	25	0.413 \pm 0.009
	37.5	0.651 \pm 0.040

ตัวอย่างน้ำผึ้งจากสวนผลไม้ ป่าชายเลน และน้ำผึ้งจิตรลดาที่มีจำหน่ายใน
ท้องตลาด ถูกวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH assay ที่ความเข้มข้น 3.125, 6.25, 12.5, 25, 37.5
% (w/v) จากผลการทดลองในภาพที่ 9 และตารางที่ 6 พบว่า เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้าน
อนุมูลอิสระของน้ำผึ้งที่ได้จากทั้ง 3 แหล่งแล้วนั้น น้ำผึ้งที่ได้จากป่าชายเลนนั้น มีฤทธิ์สูง
กว่าน้ำผึ้งที่ได้จากสวนผลไม้และน้ำผึ้งจิตรลดา อย่างมีนัยสำคัญ ที่ $p\text{-value}<0.05$
อย่างไรก็ตาม เมื่อวิเคราะห์ต่อด้วย post hoc analysis แล้ว พบว่า น้ำผึ้งจากสวนผลไม้
และน้ำผึ้งจิตรลดานั้น ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ซึ่งการวิเคราะห์ทั้ง 2 วิธี ให้ผลที่สอดคล้องกัน โดยฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของ
น้ำผึ้งจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ ป่าชายเลน สวนผลไม้ และน้ำผึ้งจิตรลดา เรียงลำดับจากมาก
ไปน้อย ซึ่งฤทธิ์ดังกล่าวสอดคล้องกับการรายงานก่อนหน้าของฤทธิ์น้ำผึ้งอื่นๆ

3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ

3.2.1 การยับยั้งการเสียสภาพของโปรตีน (Protein denaturation)

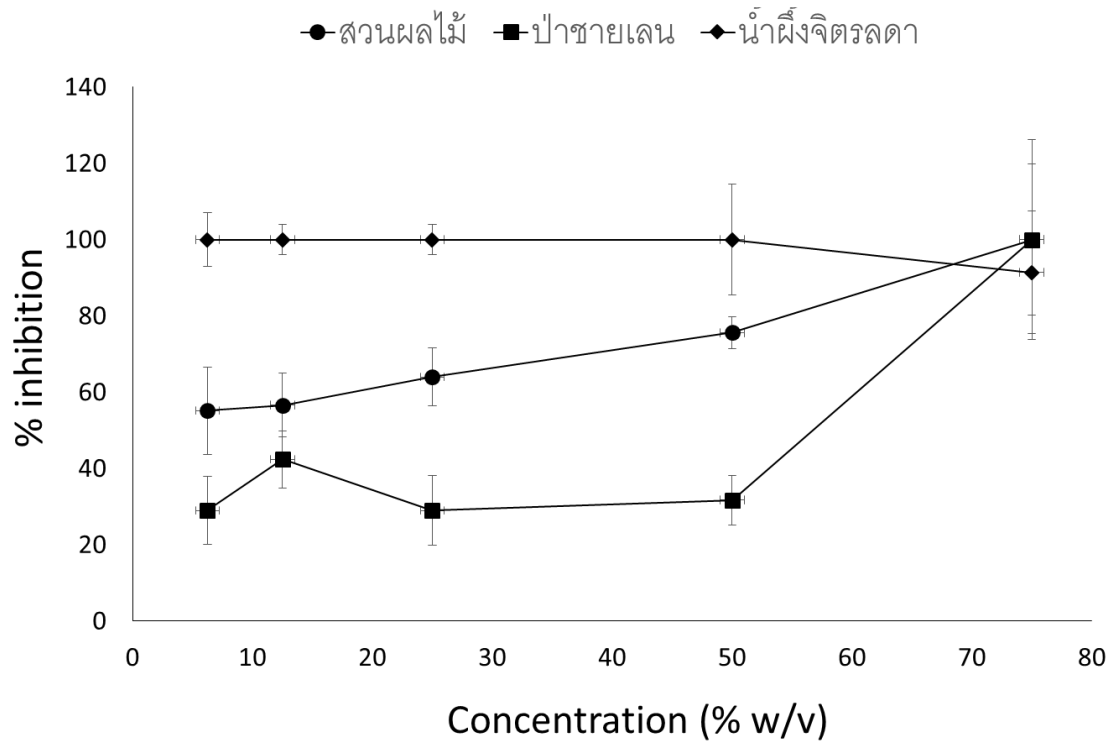
ตารางที่ 7 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของน้ำผึ้งจากสวนผลไม้ ป่าชายเลน เทียบกับ น้ำผึ้งจิตรลดา ด้วยวิธี Protein denaturation assay

Sample	Concentration %w/v	Turbidity		% Inhibition	
		AVERAGE	SD	AVERAGE	SD
Control	0	73.4	2.957	0	0.012
Diclofenac in DI	2.5 (mg/ml)	2.1	0.058	97.09	0.079
สวนผลไม้	6.25	94.9	1.300	n.d.	1.771
	12.50	92.4	0.058	n.d.	0.079
	25.00	86.9	0.000	n.d.	0.000
	50.00	72.2	0.000	1.63	0.000
	75.00	64.4	0.000	12.26	0.000
ป่าชายเลน	6.25	97.1	0.153	n.d.	0.208
	12.50	96.6	0.000	n.d.	0.000
	25.00	94.3	0.000	n.d.	0.000
	50.00	89.7	0.000	n.d.	0.000
	75.00	84.8	0.000	n.d.	0.000
น้ำผึ้งจิตรลดา	6.25	81.0	0.985	n.d.	1.342
	12.50	85.2	0.608	n.d.	0.829
	25.00	88.3	1.150	n.d.	1.567
	50.00	87.3	0.153	n.d.	0.208
	75.00	84.0	0.153	n.d.	0.208

จากผลการทดสอบในตารางที่ 7 พบว่า วิธีวิเคราะห์นี้สามารถตรวจพบความสามารถในการยับยั้งการยับยั้งการเสียสภาพของโปรตีนของน้ำผึ้งจากสวนผลไม้ ได้ที่ความเข้มข้น 50 และ 75 % (w/v) คิดเป็น %inhibition เท่ากับ 1.63 และ 12.26% ตามลำดับ โดยที่ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างอื่นๆได้ และผลการยับยั้งการเสียสภาพของโปรตีนของ diclofenac sodium ที่เป็นยาในกลุ่ม NSAIDs ที่มีข้อบ่งใช้ในเพื่อแก้อักเสบนั้น มีค่า %inhibition ที่ความเข้มข้น 2.5 mg/ml เท่ากับ $97.09 \pm 0.08\%$ ซึ่งได้มี

การวิเคราะห์ยา diclofenac sodium ที่ความเข้มข้นที่ลดลง และพบว่าฤทธิ์สอดคล้องกับความเข้มข้นที่ลดลง

3.2.2 การยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอส (Proteinase inhibitory assay)



ภาพที่ 10 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของน้ำฝิ่งจากสวนผลไม้ ป่าชายเลน เทียบกับน้ำฝิ่งจืดรลดดา ด้วยวิธี Proteinase inhibitory assay

ตารางที่ 8 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของน้ำผึ้งจากสวนผลไม้ ป่าชายเลน เทียบกับ น้ำผึ้งจิตรลดา ด้วยวิธี Proteinase inhibitory assay

Sample	Initial Concentration (%w/v)	%Inhibition	
		AVERAGE	SD
สวนผลไม้	6.25	55	11.4
	12.50	57	8.5
	25.00	64	7.6
	50.00	76	4.2
	75.00	100	26.3
ป่าชายเลน	6.25	29	8.8
	12.50	42	7.5
	25.00	29	9.1
	50.00	32	6.5
	75.00	100	19.9
น้ำผึ้งจิตรลดา	6.25	100	7.1
	12.50	100	4.0
	25.00	100	4.0
	50.00	100	14.6
	75.00	91	16.2

จากผลการทดลองในภาพที่ 10 และตารางที่ 8 แสดงให้เห็นว่า น้ำผึ้งจากทุกแหล่ง มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ ด้วยวิธี Proteinase inhibitory assay ซึ่งพบว่า น้ำผึ้งจิตรลดา มีฤทธิ์สูงสุดใ้ความเข้มข้นที่น้อยกว่า

อย่างไรก็ตาม ความไวในการวิเคราะห์ด้วยวิธีทั้ง 2 นี้ ยังมีข้อจำกัดอยู่มาก จึงควรที่จะทำการยืนยันผลของฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยเทคนิคในระดับที่สูงขึ้น ต่อไป

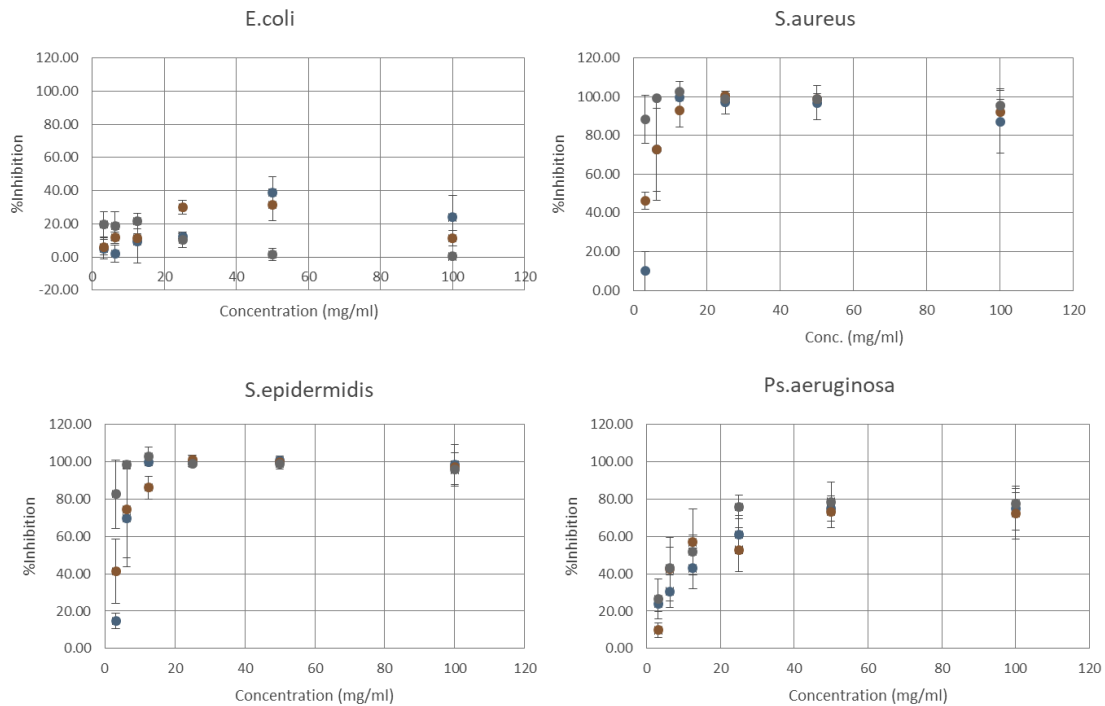
3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

3.3.1 Disc-agar diffusion method

ตารางที่ 9 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของน้ำผึ้งจากสวนผลไม้ ป่าชายเลน เทียบกับน้ำผึ้งจิตรลดา

สารทดสอบ	Conc. (mg/ml)	Inhibition zone (mm.)			
		<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>
สวนผลไม้	1000	-	11.5	11.8	-
	500	-	-	-	-
	250	-	-	-	-
	125	-	-	-	-
ป่าชายเลน	1000	-	15	13.8	-
	500	-	12.2	11.7	-
	250	-	-	-	-
	125	-	-	-	-
น้ำผึ้ง จิตรลดา	1000	-	11.5	13.7	-
	500	-	9.5	12.5	-
	250	-	-	-	-
	125	-	-	-	-

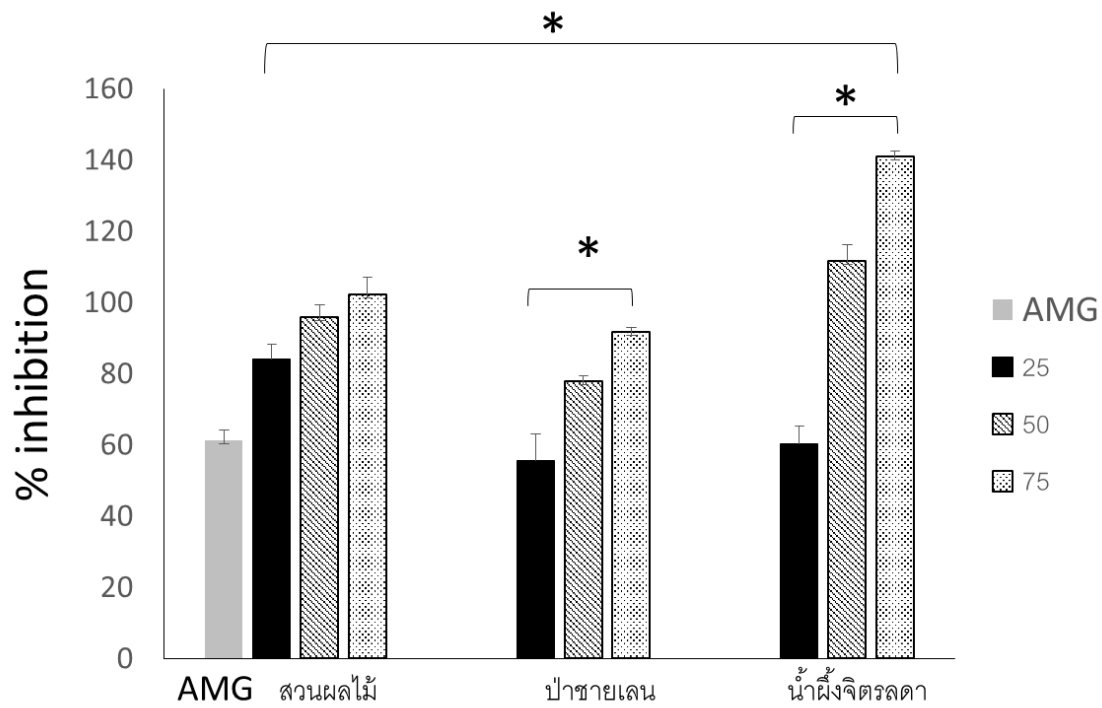
3.3.2 Broth micro dilution method



ภาพที่ 11 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของน้ำฝิ่งจากสวนผลไม้ ป่าชายเลน เทียบกับน้ำฝิ่งจิตรลดา

จากผลการทดสอบทั้ง 2 วิธี พบว่า น้ำฝิ่งตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด มีผลต่อเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก โดยน้ำฝิ่งจากป่าชายเลน มีแนวโน้มมีฤทธิ์ที่สูงกว่าตัวอย่างน้ำฝิ่งจากอีก 2 แหล่ง อย่างไรก็ตาม ผลที่ได้นั้น ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านแอดวานซ์ไกลเคชันเอนดีพอร์ดัคท์



ภาพที่ 12 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแอดวานซ์ไกลเคชันเอนดีพอร์ดัคท์ของน้ำผึ้งจากสวนผลไม้ ป่าชายเลน เทียบกับน้ำผึ้งจิตรลดา (* p -value<0.05, ANOVA test)

ตารางที่ 10 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแอดวานซ์ไกลเคชันเอนดีโทรด์คท์ของน้ำผึ้งจากสวนผลไม้ ป่าชายเลน เทียบกับน้ำผึ้งจิตรลดา

Sample	Concentration % (w/v)	% Inhibition	
		AVERAGE	SD
AMG	0.025	61.26	2.84
สวนผลไม้	25	84.19	3.97
	50	95.79	3.55
	75	102.33	4.75
ป่าชายเลน	25	55.60	7.43
	50	77.98	1.48
	75	91.59	1.21
น้ำผึ้งจิตรลดา	25	60.39	4.97
	50	111.63	4.54
	75	141.02	1.32

จากผลในภาพที่ 12 และตารางที่ 10 แสดงให้เห็นว่า น้ำผึ้งจิตรลดามีความสามารถในการยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอนดีโทรด์คท์ได้สูงกว่าน้ำผึ้งจากอีก 2 แหล่ง และเมื่อทดสอบด้วย post hoc test ที่ความเข้มข้นสูงสุด 75 % (w/v) โดยที่น้ำผึ้งอีก 2 แหล่งนั้น มีฤทธิ์ใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตาม เป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งว่าองค์ประกอบของน้ำผึ้งนั้น ประกอบไปด้วยน้ำตาลรีดิวส์ เช่น ฟรุคโตส ถึง 30-40% (Rao PV, 2016) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสร้าง AGEs แต่กลับพบว่าน้ำผึ้งจากทั้ง 3 แหล่ง สามารถยับยั้งการสร้าง AGEs ได้ เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน aminoguanidine (AMG) ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง 61.26±2.84% ที่ความเข้มข้น 0.025 % (w/v) หรือ 25 µg/ml ซึ่งอาจเกิดสืบเนื่องจากสารประกอบอื่นๆที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้าง AGEs เช่น สารกลุ่มที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ทั้งนี้ทั้งนั้น ยังต้องมีการวิเคราะห์ในขั้นถัดไปเพื่อยืนยันผลดังกล่าวนี้ด้วย รวมถึงการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำผึ้งแต่ละแหล่ง เพื่อเปรียบเทียบและหาความสัมพันธ์ของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง AGEs

บทที่ 4

สรุปและข้อเสนอแนะ

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำผึ้ง เรียงตามลำดับแหล่งของน้ำผึ้งจากฤทธิ์มากไปน้อย ดังนี้ ป่าชายเลน สวนผลไม้ และน้ำผึ้งจิตรลดา ตามลำดับ โดยผลการทดลองสอดคล้องกันทั้ง 2 วิธี วิเคราะห์ คือ DPPH assay และ FRAP assay ซึ่งสัมพันธ์กับงานวิจัยที่เคยมีการศึกษาก่อนหน้า ซึ่งแสดงว่า น้ำผึ้งจากชันโรงนั้น มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าน้ำผึ้งจากผึ้งหลวง ซึ่งเป็นสายพันธุ์ผึ้งที่ใช้ในการผลิตน้ำผึ้งจิตรลดา อย่างไรก็ตาม ควรมีการตรวจสอบโดยการใช้ น้ำผึ้งที่เก็บภายในช่วงระยะเวลาเดียวกัน และไม่ผ่านกรรมวิธีในการบรรจุใดๆ เพื่อเปรียบเทียบให้ชัดเจนยิ่งขึ้น

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยวิธีที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ พบว่า น้ำผึ้งจากทุกแหล่งมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ แต่ฤทธิ์นั้นค่อนข้างต่ำ เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน diclofenac sodium อย่างไรก็ตาม เพียงผลการวิเคราะห์โดยวิธี proteinase inhibitory assay เท่านั้น ที่สามารถบอกได้ว่า น้ำผึ้งจิตรลดา มีฤทธิ์ต้านการอักเสบสูงสุดที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 50 % (w/v) และควรได้รับการยืนยันจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคในระดับเซลล์หรือสูงขึ้นไป

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

จากผลผลการทดสอบทั้ง 2 วิธี พบว่า น้ำผึ้งตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด มีผลต่อเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก โดยน้ำผึ้งจากป่าชายเลน มีแนวโน้มมีฤทธิ์ที่สูงกว่าตัวอย่างน้ำผึ้งจากอีก 2 แหล่ง อย่างไรก็ตาม ผลที่ได้นั้น ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

การทดสอบฤทธิ์ต้านแอดวานซ์ไกลเคชันเอนด์โปรดักต์

น้ำผึ้งจิตรลดา มีความสามารถในการยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอนด์โปรดักต์ได้สูงกว่าน้ำผึ้งจากอีก 2 แหล่ง ซึ่งมีฤทธิ์ใกล้เคียงกัน ต้องมีการวิเคราะห์ในขั้นถัดไปเพื่อยืนยันผลดังกล่าวนี้ด้วย รวมถึงการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำผึ้งแต่ละแหล่ง เพื่อเปรียบเทียบและหาความสัมพันธ์ของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง AGEs

บทที่ 5

ผลผลิต

5.1 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการทั้งในระดับชาติ และนานาชาติ

อยู่ในระหว่างการรอตีพิมพ์แบบ proceeding ในงานประชุมระดับชาติ

5.2 การจดสิทธิบัตร

- ไม่มี -

5.3 ผลงานเชิงพาณิชย์

- ไม่มี -

5.4 ผลงานเชิงสาธารณะ

- 1) มีการเผยแพร่กลับสู่ชุมชน กลุ่มเกษตรกรชาวสวนผลไม้ ในเขตภาคตะวันออกและพื้นที่ใกล้เคียง ในงานมหกรรมคนเลี้ยงผึ้งชั้นโรง เมื่อวันที่ 8 กันยายน 2560 ณ ตำบลมะขาม อำเภอกำแพงแสน จังหวัดจันทบุรี
- 2) มีการเผยแพร่ในโครงการประชุมวิชาการและนิทรรศการทรัพยากรไทย ครั้งที่ 9 : ศักยภาพมากขึ้นมีให้เห็น เมื่อวันที่ 28 พฤศจิกายน - 4 ธันวาคม พ.ศ. 2560 ณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยขสระบุรี ตำบลผักแพว อำเภอกำแพงแสน จังหวัดสระบุรี

บรรณานุกรม

- บุริน เลาะห์วัฒน์นะ, สติระพจน์ บ. New therapeutic agents for diabetic kidney disease beyond RAAS blockades. *Journal of the Nephrology Society of Thailand*. 2011;17(4).
- สุพัตรา ปรศุพัฒนา. บทที่ 6 เทคนิคการตรวจวัดภาวะเครียดออกซิเดชัน. *อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ*. วรพล เองวานิช (บรรณาธิการ). สมาคมเพื่อการวิจัยอนุมูลอิสระไทย. นวัตกรรมสุขภาพสำนักพิมพ์. เชียงใหม่. 2555:หน้า 129-92.
- Ahmed N. Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. *Diabetes research and clinical practice*. 2005;67(1):3-21.
- Bagad AS, Joseph JA, Bhaskaran N, Agarwal A. Comparative Evaluation of Anti-Inflammatory Activity of Curcuminoids, Turmerones, and Aqueous Extract of *Curcuma longa*. *Advances in Pharmacological Sciences*. 2013;2013:805756.
- Ball DW. The chemical composition of honey. *Journal of Chemical Education*. 2007;84(10):1643.
- Chang CH, Lin HY, Chang CY, Liu YC. Comparisons on the antioxidant properties of fresh, freeze-dried and hot-air-dried tomatoes. *Journal of food engineering* 2006; 77:478-485.
- Ciulu M, Solinas S, Floris I, Panzanelli A, Pilo MI, Piu PC, Spano N, Sanna G. RP-HPLC determination of water-soluble vitamins in honey. *Talanta*. 2011;83:924-9.
- Costa G, Ferreira JP, Vitorino C, Pina ME, Sousa JJ, Figueiredo IV, et al. Polyphenols from *Cymbopogon citratus* leaves as topical anti-inflammatory agents. *Journal of Ethnopharmacology*. 2016;178:222-8.
- da Silva, P.M., Gauche, C., Gonzaga, L.V., Oliveira Costa, A.C., Fett, R., Honey: Chemical composition, stability and authenticity, *Food Chemistry*. *Food Chemistry*. 2015;196:309-22.
- Dechayont B, Ruamdee P, Poonnaimuang S, Mokmued K, Chunthong-Orn J. Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. 2017. 1-6 p.
- Gacche RN, Gond DS, Dhole NA, Dawane BS. Coumarin Schiff-bases: As Antioxidant and Possibly Anti-inflammatory Agents. *Journal of Enzyme Inhibition and*

- Medicinal Chemistry. 2006;21(2):157-61.
- Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*. 2006;114(6):597-605.
- Kumar JM, Abbas AK, Aster JC. Inflammation and Repair. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. Ninth Edition ed. Saunders: an imprint of Elsevier Inc.; 2015. p. 69-111.
- Mallikadevi T, Paulsamy S., Karthika, K. and Jamuna, S. . In vitro and in vivo anti-inflammatory activity of whole plant methanolic extract of *Mukia maderaspatana* (L.) M.Roem. (Cucurbitaceae). *International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 2012;4:435-9.
- Nagai R, Jinno M, Ichihashi M, Koyama H, Yamamoto Y, Yonei Y. Advanced glycation end products and their receptors as risk factors for aging. *Journal of Anti Aging Medicines*. 2012;9(4).
- Patricia V, Vargas O, López O, Valle FM. Meliponini biodiversity and medicinal uses of pot-honey from El Oro province in Ecuador Emirates. *Journal of Food and Agriculture*. 2015;27:502-6.
- Peng X, Ma J, Chena F, Wang M. Naturally occurring inhibitors against the formation of advanced glycation end-products: Review. *Food & Function*. 2011(2).
- Peyroux J, Sternberg M. Advanced glycation endproducts (AGEs): Pharmacological inhibition in diabetes. *Pathologie-biologie*. 2006;54(7):405-19.
- Sero L, Sanguinet L, Blanchard P, Dang BT, Morel S, Richomme P, et al. Tuning a 96-well microtiter plate fluorescence-based assay to identify AGE inhibitors in crude plant extracts. *Molecules*. 2013;18(11):14320-39.
- Rao PV, Krish KT, Sallehb N, Gan SH. Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: a comparative review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2016;26(5):657-64.
- Sparvero LJ, Asafu-Adjei D, Kang R, Tang D, Amin N, Im J, et al. RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts), RAGE ligands, and their role in cancer and inflammation. *Journal of translational medicine*. 2009;7:17.

Srisook K, Cha Y-N. Super-induction of HO-1 in macrophages stimulated with lipopolysaccharide by prior depletion of glutathione decreases iNOS expression and NO production. *Nitric Oxide*. 2005;12(2):70-9.

Stirban A, Gawłowski T, Roden M. Vascular effects of advanced glycation endproducts: Clinical effects and molecular mechanisms. *Molecular Metabolism*. 2014;3(2):94-108.

Williams LA, O'Connar A, Latore L, Dennis O, Ringer S, Whittaker JA, et al. The in vitro anti-denaturation effects induced by natural products and non-steroidal compounds in heat treated (immunogenic) bovine serum albumin is proposed as a screening assay for the detection of anti-inflammatory compounds, without the use of animals, in the early stages of the drug discovery process. *West Indian Med J*. 2008;57(4):327-31.

ภาคผนวก

ภาพบรรยากาศ

โครงการประชุมวิชาการและนิทรรศการทรัพยากรไทย ครั้งที่ 9 : ศักยภาพมากล้นมีให้เห็น
เมื่อวันที่ 28 พฤศจิกายน – 4 ธันวาคม พ.ศ. 2560

ณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยสระบุรี ตำบลผักแพว อำเภอแก่งคอย จังหวัดสระบุรี







ชันโรงของไทย Thai stingless bees

- คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา -



บทนำ

ชันโรง (Stingless bee) เป็นผึ้งขนาดเล็กที่มีรูปร่างคล้ายผึ้งรวงแต่ไม่มีเหล็กในและมีบทบาทสำคัญในการช่วยพืชผสมเกสร โดยชาวสวนนิยมเลี้ยงไว้เพื่อช่วยผสมเกสรผลไม้ จากรายงานการวิจัยพบว่าชันโรงช่วยผสมเกสรเพิ่มผลผลิตพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น ทุเรียน ลำไย ทานตะวัน มะม่วง และยังสามารถเก็บน้ำผึ้งและชันซึ่งมีราคาสูงกว่าผึ้งพันธุ์อื่น นอกจากนี้ชันโรงสามารถเลี้ยงและดูแลรักษาได้ง่ายสามารถปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมได้ดีและมีต้นทุนการเลี้ยงที่ต่ำแต่ราคาขายของชันอยู่ในเกณฑ์สูงจากการสัมภาษณ์เกษตรกรผู้เลี้ยงพบว่าขายให้แก่พ่อค้าคนกลางอยู่ที่กิโลกรัมละ 2,000 บาทและน้ำผึ้งอยู่ที่ลิตรละ 700 บาทและเริ่มมีนักลงทุนต่างชาติสนใจเข้ามาขอซื้อชันและน้ำผึ้งจากชันโรง ในปี พ.ศ. 2555 สำนักส่งเสริมและจัดการสินค้าเกษตรรายงานมูลค่าทางการตลาดของชันโรง อยู่ที่ 6.2 ล้านบาท โดยจังหวัดที่มีการเพาะเลี้ยงมากที่สุดคือจังหวัดจันทบุรี อย่างไรก็ตามการเลี้ยงชันโรง เพื่อใช้ประโยชน์ยังคงประสบปัญหาบางประการเช่น การรวมกลุ่มผู้เลี้ยงชันโรงเพื่อจำหน่ายยังมีน้อย และการศึกษาวิจัยการแปรรูปผลิตภัณฑ์จากชันโรงยังอยู่ในวงจำกัดดังนั้นการศึกษาวิจัยชันโรง โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลิตภัณฑ์จากชันโรงเช่น ชันจากชันโรงจึงเป็นสิ่งสำคัญเพื่อช่วยเพิ่มมูลค่าทางการเกษตรให้แก่เกษตรกร

ชัน (Propolis) มีประวัติการใช้มายาวนานและแพร่หลายทั่วโลกทั้งเป็นยาภายในและภายนอก ชันมีลักษณะเป็นสารเหนียวที่มีสีเข้มซึ่งผึ้งจะไปเก็บเกสรดอกไม้แล้วผสมกับสารคัดหลั่งจากตัวผึ้ง โดยสีและสาระสำคัญของชันที่เก็บในภูมิภาคต่างๆของโลกก็จะแตกต่างกันไป เอกสารการศึกษาถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารที่พบในชันจากชันโรงพบว่ามีการศึกษาน้อยกว่าการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของชันจากผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) หรือผึ้งรวง ด้านการใช้ประโยชน์จากชันของชันโรงในปัจจุบันพบว่าชาวบ้าน ใช้ชันรักษาโรคเกี่ยวกับการติดเชื้อและอักเสบ เช่น บรรเทาการปวดเหงือกและฟันการติดเชื้อตามผิวหนังและเริ่มมีการแปรรูปอย่างง่าย ๆ อย่างไรก็ตามการนำชันของชันโรงมาใช้ประโยชน์ดังกล่าวยังไม่เป็นที่แพร่หลายนักเนื่องจากหลักฐานฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของชันพันธุ์นี้ยังจำกัด การแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ยังไม่ได้รับการพัฒนาเท่าที่ควร ดังนั้น การศึกษาเพื่อยืนยันฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของชันจากชันโรงที่มีการใช้ในทางพื้นบ้านและการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพจึงเป็นสิ่งจำเป็น นอกจากนี้การวิเคราะห์สายพันธุ์และองค์ประกอบทางเคมีเพื่อให้ผลิตภัณฑ์ชันจากชันโรงของไทยเป็นที่ยอมรับในคุณภาพของผู้ใช้ผลิตภัณฑ์ ช่วยป้องกันการกีดกันทางการค้าการกลุ่มพ่อค้าคนกลางและสร้างเสริมรายได้ให้แก่เกษตรกรสวนผลไม้ไทยอย่างยั่งยืน



ภาพแสดงลักษณะทั่วไปของชันโรง 3 สายพันธุ์

1. *Lepidotrigona terminata* Smith

2. *Lepidotrigona ventralis* Smith

3. *Tetragonula pagdeni* Schwarz







รัชกาลที่ ๙ ในหลวง ในดวงใจ

BUU NEWS

มหาวิทยาลัยบูรพา สามัคคีเพื่อในหลวง

BUU NEWS

มหาวิทยาลัยบูรพา
BUU NEWS

ศูนย์วิทยุตะวันออก เพื่อนาคของแผ่นดิน
Wisdom of the East for the Future of the Nation.

ฉบับที่ ๕๕๓/๒๕๖๐

วันที่ ๑ ธันวาคม พ.ศ. ๒๕๖๐

มหาวิทยาลัยบูรพา เข้าร่วมโครงการประชุมวิชาการและนิทรรศการ ทรัพยากรไทย ครั้งที่ ๙ : ศักยภาพมากล้นมีให้เห็น



มหาวิทยาลัยบูรพา เข้าร่วมโครงการประชุมวิชาการและนิทรรศการ ทรัพยากรไทย ครั้งที่ ๙ : ศักยภาพมากล้นมีให้เห็น โดย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้รับพระราชทานจากสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ให้เป็นเจ้าภาพในการดำเนินการจัดประชุมร่วมกับโครงการ อพ.สธ. ระหว่างวันที่ ๒๘ พฤศจิกายน – ๔ ธันวาคม พ.ศ. ๒๕๖๐ ณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย-สระบุรี ตำบลชำผักแพว อำเภอแก่งคอย จังหวัดสระบุรี



การประชุมวิชาการและนิทรรศการทรัพยากรไทย เป็นโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (โครงการ อพ.สธ.) โดยดำเนินการร่วมกับหน่วยงานร่วมสนองพระราชดำริ จัดการประชุมวิชาการและนิทรรศการเป็นประจำทุก ๒ ปี มีวัตถุประสงค์เพื่อนำเสนอการดำเนินงานของโครงการ อพ.สธ. และหน่วยงานร่วมสนองพระราชดำริ ตลอดจนการจัดประชุมวิชาการเพื่อนำเสนอผลงานและแลกเปลี่ยนองค์ความรู้ด้านการอนุรักษ์ทรัพยากรไทย เพื่อให้เด็กและเยาวชน ประชาชน ตลอดจนหน่วยงานภาครัฐ ภาคเอกชน ได้ตระหนักถึงคุณค่าและความสำคัญของการอนุรักษ์ทรัพยากร

โดยมหาวิทยาลัยบูรพาได้ร่วมจัดนิทรรศการนำเสนอผลการดำเนินงานวิจัยที่สนองพระราชดำริฯ โครงการ อพ.สธ. แบ่งออกเป็น ๓ เรื่อง ได้แก่ ๑. งานวิจัยทางด้านความหลากหลายของทรัพยากรไทยและระบบนิเวศทางทะเลแถบชายฝั่งภาคตะวันออก โดยคณะวิทยาศาสตร์และสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล ๒. งานวิจัยเกี่ยวกับการเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์จากชันโรงในจังหวัดจันทบุรี โดยคณะเภสัชศาสตร์ ๓. งานวิจัยทางด้านผักกูด โดยวิทยาลัยวิทยาการวิจัยและวิทยาการปัญญา ทั้งนี้ ดร.ขวัญเรือน ศรีนุ้ย สังกัด สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา เป็นผู้ประสานงานหลักในการดำเนินงานในครั้งนี้

ฝ่ายสื่อสารองค์กร มหาวิทยาลัยบูรพา

โทร. ๐ ๓๘๑๐ ๒๑๒๐-๓ แฟกซ์ ๐ ๓๘๓๘ ๐๓๕๓

จัดทำโดย : ไวกิน จิตมั่น
นักประชาสัมพันธ์



www.facebook.com/มหาวิทยาลัยบูรพา



<https://www.youtube.com/BuraphaUniversity>

ตรวจข่าวโดย : นางกรนิษฐ์ อธิจิราวัชร
นักประชาสัมพันธ์ชำนาญการพิเศษ









