



ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ในเซลล์ ATDC-5  
ของส่วนสกัดกระชายดำ



วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม  
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการแพทย์แผนตะวันออก  
วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยรังสิต  
ปีการศึกษา 2563



**ANTIOXIDANT AND NITRIC OXIDE PRODUCTION-INHIBITORY  
ACTIVITIES IN ATDC-5 CELLS OF *KAEMPFERIA PARVIFLORA* EXTRACT**

**BY  
SULAIMAN MANO**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN ORIENTAL MEDICINE  
COLLEGE OF ORIENTAL MEDICINE**

**GRADUATE SCHOOL, RANGSIT UNIVERSITY**

**ACADEMIC YEAR 2020**

วิทยานิพนธ์เรื่อง  
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ในเซลล์ ATDC-5  
ของส่วนสกัดกระชายดำ

โดย  
สุไลมาน มะนอ

ได้รับการพิจารณาให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการแพทย์แผนตะวันออก

มหาวิทยาลัยรังสิต  
ปีการศึกษา 2563

---

ดร.มลฤดี สุขประสารทรัพย์  
ประธานกรรมการสอบ

ดร.นันทพงศ์ จำทอง  
กรรมการ

---

ดร.วาลูกา พलयงาม  
กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(ผศ. ร.ต. หญิง ดร. วรณีย์ สุขสาตร)  
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย  
20 สิงหาคม 2563

Thesis entitled

**ANTIOXIDANT AND NITRIC OXIDE PRODUCTION-INHIBITORY ACTIVITIES  
IN ATDC-5 CELLS OF *KAEMPFERIA PARVIFLORA* EXTRACT**

by

SULAIMAN MANO

was submitted in partial fulfillment of the requirements  
for the degree of Master of Science in Oriental Medicine

Rangsit University  
Academic Year 2020

---

Monruedee Aukprasansap, Ph.D.  
Examination Committee Chairperson

Nanthaphong Khamthong, Ph.D.  
Member

---

Waluga Plaingam, Ph.D.  
Member and Advisor

Approved by Graduate School

(Asst.Prof.Plt.Off. Vanee Sooksatra, D.Eng.)

Dean of Graduate School

August 20, 2020

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณวิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต ที่ได้มอบทุนการศึกษาต่อในระดับมหาบัณฑิต และรวมถึงทุนสำหรับงานวิจัยในครั้งนี้ วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะสำเร็จไม่ได้ หากปราศจากบุคคลซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ดร. วาลูกา พลาขงาม และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร. นันทพงศ์ ขำทอง ที่คอยให้คำปรึกษา คำแนะ และตลอดให้ความช่วยเหลือ จนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ลุล่วง

ขอขอบคุณวิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่านที่อำนวยความสะดวกเอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือสำหรับการทำงานวิจัยในครั้งนี้ นอกจากนี้ขอขอบคุณทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้องที่คอยให้ความช่วยเหลือ แนะนำ แลกเปลี่ยนความคิดเห็นและให้กำลังใจตลอดมา ขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณสมาชิกในครอบครัวผู้ที่อยู่เบื้องหลังของความสำเร็จทุก ๆ ก้าว ที่คอยสนับสนุนและคอยเป็นกำลังใจเสมอมา

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สุไลมาน มะนอ  
ผู้วิจัย

6106045 : สุไลมาน มะนอ  
 ชื่อวิทยานิพนธ์ : ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ในเซลล์  
 ATDC-5 ของส่วนสกัดกระชายดำ  
 หลักสูตร : วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาการแพทย์แผนตะวันออก  
 อาจารย์ที่ปรึกษา : ดร. วาตุกา พลายงาม

### บทคัดย่อ

การเสื่อมของกระดูกข้อเข่าเป็นปัญหาหนึ่งที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของผู้สูงอายุในประเทศไทย จากรายงานก่อนหน้าพบว่าสารสกัดกระชายดำ (*Kaempferia parviflora*) มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบได้ แต่ยังไม่พบรายงานการศึกษาในเซลล์ข้อเข่า ATDC-5 ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ของสารสกัดเหง้ากระชายดำ จากการศึกษา พบว่าสารสกัดเหง้ากระชายดำด้วย 95% เอทานอล มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS<sup>+</sup> (IC<sub>50</sub> เท่ากับ 33.74 µg/ml) ได้ดีกว่าอนุมูลอิสระ DPPH (IC<sub>50</sub> เท่ากับ 288.43 µg/ml) โดยเทียบกับสารมาตรฐาน เมื่อนำส่วนที่แยกได้จากเฮกเซน ไคคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และน้ำ มาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS<sup>+</sup> และ DPPH ดีที่สุด มีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 3.11 และ 19.6 µg/ml ตามลำดับ รองลงมาคือ ส่วนสกัดน้ำ ไคคลอโรมีเทน และเฮกเซน ตามลำดับ สอดคล้องกับปริมาณฟีนอลิกรวมที่พบในส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทมากที่สุด เท่ากับ 585.55 mg GEA/g extract แต่พบว่าส่วนสกัดเฮกเซนมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด เท่ากับ 689.19 mg QE/g extract เมื่อนำสารสกัดและส่วนสกัดทั้งหมดไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ในเซลล์ ATDC-5 พบว่าสารสกัด 95% เอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้ดี ด้วยค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 24.97 µg/ml เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน L-NA (IC<sub>50</sub> เท่ากับ 20.90 µg/ml) และพบว่าส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ดีที่ที่สุด (IC<sub>50</sub> เท่ากับ 30.55 µg/ml) รองลงมาคือ เฮกเซน ไคคลอโรมีเทน และน้ำ ตามลำดับ สำหรับการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ พบว่าสารสกัดและส่วนสกัดเหง้ากระชายดำที่ความเข้มข้นสูงสุด 50 µg/ml ไม่เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานที่ดีสำหรับการวิจัยและพัฒนากระชายดำเป็นสมุนไพรรักษาการเสื่อมของกระดูกข้อเข่าในอนาคต

(วิทยานิพนธ์มีจำนวนทั้งสิ้น 82 หน้า)

คำสำคัญ: กระชายดำ, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์, เซลล์ ADTC-5

ลายมือชื่อนักศึกษา ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

6106045 : Sulaiman Mano  
 Thesis Title : Antioxidant and Nitric Oxide Production-Inhibitory Activities in Atdc-5  
 Cells of *Kaempferia Parviflora* Extract.  
 Program : Master of Science in Oriental Medicine  
 Thesis Advisor : Waluga Plaingam, Ph.D.

### Abstract

Osteoarthritis of the knee is one of the major problems that affects the quality of life in Thailand. It was previously found that *Kaempferia parviflora* had antioxidant and anti-inflammatory activities, but there has been no report on those activities in ATDC-5 cells. Therefore, we investigated the effect of *K. parviflora* on antioxidant and the inhibitory of nitric oxide. From the results, it was found that the ethanolic extract was more active against ABTS<sup>++</sup> (IC<sub>50</sub> 33.74 µg/ml) than DPPH (IC<sub>50</sub> 288.43 µg/ml) by using standard compounds. We found that the ethyl acetate fraction was the best antioxidant activity against ABTS<sup>++</sup> and DPPH with IC<sub>50</sub> values of 3.11 and 19.6 µg/ml., followed by the water, dichloromethane and hexane fractions respectively. This result was in agreement with the total phenolic contents of the four fractions, of which the content of ethyl acetate fraction gave the highest value of 585.55 mg GEA/g extract. However, the hexane fraction had the highest total flavonoid content of 689.19 mg QE/g extract. The ethanolic extract and all the four fractions were further tested for the inhibition of nitric oxide production in the ATDC-5 cells. The ethanolic extract had a good inhibitory effect with an IC<sub>50</sub> value of 24.97 µg/ml compared with the standard L-NA (IC<sub>50</sub> 20.90 µg/ml). Among the four fractions, the ethyl acetate one exhibited the best inhibitory effect (IC<sub>50</sub> 30.55 µg/ml), followed by the hexane, dichloromethane and water fractions, respectively. For the cytotoxicity test in the ATDC-5 cells, the extract and all the four fractions at a maximum concentration of 50 µg/ml were not toxic to the cells. Consequently, the obtained results would be used in further research and development of *K. parviflora* into herbal medicine for the treatment of knee osteoarthritis in the future.

(Total 82 pages)

Keywords: *Kaempferia Parviflora*, Antioxidant Activity, Nitric Oxide Production-Inhibitory Activity, Adtc-5 Cells

ลายมือชื่อนักศึกษา ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

6106045 : สุไลมาน มะนอ  
 ชื่อวิทยานิพนธ์ : ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ในเซลล์  
 ATDC-5 ของส่วนสกัดกระชายดำ  
 หลักสูตร : วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาการแพทย์แผนตะวันออก  
 อาจารย์ที่ปรึกษา : ดร. วาลูกา พลายงาม

### บทคัดย่อ

การเสื่อมของกระดูกข้อเข่าเป็นปัญหาหนึ่งที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของผู้สูงอายุในประเทศไทย จากรายงานก่อนหน้าพบว่าสารสกัดกระชายดำ (*Kaempferia parviflora*) มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบได้ แต่ยังไม่พบรายงานการศึกษาในเซลล์ข้อเข่า ATDC-5 ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ของสารสกัดเหง้ากระชายดำ จากการศึกษา พบว่าสารสกัดเหง้ากระชายดำด้วย 95% เอทานอล มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS<sup>+</sup> (IC<sub>50</sub> เท่ากับ 33.74 µg/ml) ได้ดีกว่าอนุมูลอิสระ DPPH (IC<sub>50</sub> เท่ากับ 288.43 µg/ml) โดยเทียบกับสารมาตรฐาน เมื่อนำส่วนที่แยกได้จากเฮกเซน ไคคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และน้ำ มาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS<sup>+</sup> และ DPPH ดีที่สุด มีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 3.11 และ 19.6 µg/ml ตามลำดับ รองลงมาคือ ส่วนสกัดน้ำ ไคคลอโรมีเทน และเฮกเซน ตามลำดับ สอดคล้องกับปริมาณฟีนอลิกรวมที่พบในส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทมากที่สุด เท่ากับ 585.55 mg GEA/g extract แต่พบว่าส่วนสกัดเฮกเซนมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด เท่ากับ 689.19 mg QE/g extract เมื่อนำสารสกัดและส่วนสกัดทั้งหมดไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ในเซลล์ ATDC-5 พบว่าสารสกัด 95% เอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้ดี ด้วยค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 24.97 µg/ml เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน L-NA (IC<sub>50</sub> เท่ากับ 20.90 µg/ml) และพบว่าส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ดีที่ที่สุด (IC<sub>50</sub> เท่ากับ 30.55 µg/ml) รองลงมาคือ เฮกเซน ไคคลอโรมีเทน และน้ำ ตามลำดับ สำหรับการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ พบว่าสารสกัดและส่วนสกัดเหง้ากระชายดำที่ความเข้มข้นสูงสุด 50 µg/ml ไม่เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานที่ดีสำหรับการวิจัยและพัฒนากระชายดำเป็นสมุนไพรรักษาการเสื่อมของกระดูกข้อเข่าในอนาคต

(วิทยานิพนธ์มีจำนวนทั้งสิ้น 82 หน้า)

คำสำคัญ: กระชายดำ, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์, เซลล์ ADTC-5

ลายมือชื่อนักศึกษา ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....



6106045 : Sulaiman Mano  
 Thesis Title : Antioxidant and Nitric Oxide Production-Inhibitory Activities in Atdc-5  
 Cells of *Kaempferia Parviflora* Extract.  
 Program : Master of Science in Oriental Medicine  
 Thesis Advisor : Waluga Plaingam, Ph.D.

### Abstract

Osteoarthritis of the knee is one of the major problems that affects the quality of life in Thailand. It was previously found that *Kaempferia parviflora* had antioxidant and anti-inflammatory activities, but there has been no report on those activities in ATDC-5 cells. Therefore, we investigated the effect of *K. parviflora* on antioxidant and the inhibitory of nitric oxide. From the results, it was found that the ethanolic extract was more active against ABTS<sup>++</sup> (IC50 33.74 µg/ml) than DPPH (IC50 288.43 µg/ml) by using standard compounds. We found that the ethyl acetate fraction was the best antioxidant activity against ABTS<sup>++</sup> and DPPH with IC50 values of 3.11 and 19.6 µg/ml., followed by the water, dichloromethane and hexane fractions respectively. This result was in agreement with the total phenolic contents of the four fractions, of which the content of ethyl acetate fraction gave the highest value of 585.55 mg GEA/g extract. However, the hexane fraction had the highest total flavonoid content of 689.19 mg QE/g extract. The ethanolic extract and all the four fractions were further tested for the inhibition of nitric oxide production in the ATDC-5 cells. The ethanolic extract had a good inhibitory effect with an IC50 value of 24.97 µg/ml compared with the standard L-NA (IC50 20.90 µg/ml). Among the four fractions, the ethyl acetate one exhibited the best inhibitory effect (IC50 30.55 µg/ml), followed by the hexane, dichloromethane and water fractions, respectively. For the cytotoxicity test in the ATDC-5 cells, the extract and all the four fractions at a maximum concentration of 50 µg/ml were not toxic to the cells. Consequently, the obtained results would be used in further research and development of *K. parviflora* into herbal medicine for the treatment of knee osteoarthritis in the future.

(Total 82 pages)

Keywords: *Kaempferia Parviflora*, Antioxidant Activity, Nitric Oxide Production-Inhibitory Activity, Adtc-5 Cells

ลายมือชื่อนักศึกษา ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ซ
สัญลักษณ์และคำย่อ	ณ
<b>บทที่ 1</b>	
<b>บทนำ</b>	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย	3
1.3 สมมติฐานการวิจัย	3
1.4 กรอบแนวคิดการวิจัย	4
1.5 นิยามศัพท์	5
<b>บทที่ 2</b>	
<b>ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง</b>	<b>6</b>
2.1 กระชายดำ	6
2.2 ATDC-5 Cell Line	8
2.3 โรคข้อเข่าเสื่อม	9
2.4 โรคที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม	10
2.5 สารสื่อการอักเสบ	11
2.6 กระบวนการอักเสบและระบบภูมิคุ้มกัน	13
2.7 อนุมูลอิสระที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบและสารต้านอนุมูลอิสระ	16
2.8 สารประกอบฟีนอลิก	19
2.9 ตัวทำละลายอินทรีย์	24

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า	
<b>บทที่ 3</b>	<b>ระเบียบวิธีการวิจัย</b>	<b>27</b>
	3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	27
	3.2 ระเบียบวิธีวิจัย	29
	3.2.1 การเตรียมสารสกัดและการสกัดแยกสาร	29
	3.2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	30
	3.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์	35
	3.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิก	36
	3.2.5 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์	37
	3.2.6 การทดสอบความเป็นพิษ	39
<b>บทที่ 4</b>	<b>ผลการวิจัย</b>	<b>41</b>
	4.1 การสกัดสารออกฤทธิ์จากเหง้ากระชายดำ	41
	4.2 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ของสารสกัดและส่วนสกัดกระชายดำ	42
	4.3 ผลการศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ของสารสกัดและส่วนสกัดกระชายดำ	44
	4.4 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดและส่วนสกัด กระชายดำ	45
	4.5 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS <sup>•+</sup> ของสารสกัดและส่วนสกัด กระชายดำ	47
	4.6 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ของสารสกัดและ ส่วนสกัดกระชายดำ	49
	4.7 ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ ATDC-5 โดย MTT assay	50
<b>บทที่ 5</b>	<b>สรุปผลและข้อเสนอแนะ</b>	<b>53</b>
	5.1 สรุปผลการวิจัย	53
	5.2 ข้อเสนอแนะ	54

**สารบัญ (ต่อ)**

	<b>หน้า</b>
<b>บรรณานุกรม</b>	<b>55</b>
<b>ภาคผนวก</b>	<b>66</b>
<b>ภาคผนวก ก</b> กราฟแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH	67
<b>ภาคผนวก ข</b> กราฟแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS <sup>+</sup>	72
<b>ภาคผนวก ค</b> ลักษณะของสารสกัดและส่วนสกัดในแต่ละตัวทำละลาย	77
<b>ประวัติผู้วิจัย</b>	<b>82</b>



## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1	27
3.2	32
3.3	35
3.4	36
3.5	37
4.1	41
4.2	43
4.3	45
4.4	46
4.5	48
4.6	51
4.7	52

## สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	กรอบแนวคิดการวิจัย	4
2.1	เหง้ากระชายดำ	6
2.2	สูตรโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกแบบง่ายบางชนิด	20
2.3	สูตรโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลและกรดฟีนอลิก	20
2.4	สูตรโครงสร้างของสารประกอบฟีนิลโพรพานอยด์	21
2.5	สูตรโครงสร้างของสารประกอบฟีนิลโพรพานอยด์	21
2.6	สูตรโครงสร้างของสารประกอบฟลาโวนอยด์	22
3.1	แผนผังแสดงการสกัดและแยกสารสกัดของเหง้ากระชายดำ	30
3.2	แสดงปฏิกิริยาของ DPPH	33
3.3	โครงสร้าง ABTS <sup>•+</sup>	34
3.4	แสดงสมการปฏิกิริยาของ NO ในการสลายตัวได้เป็น NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> และ NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> และปฏิกิริยาในการวัดปริมาณของ NO โดยใช้ Griess Reaction	39
3.5	แสดงโครงสร้างของ MTT และหลักการของ MTT Colorimetric Assay	40
4.1	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Gallic Acid	43
4.2	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Quercetin	44

## สัญลักษณ์และคำย่อ

สัญลักษณ์	ความหมาย
,	Comma
:	Colon
;	Semicolon
/	Per
=	Equals
>	Greater than
<	Less than
±	Plus-minus
%	Percent
%w/w	Percent Weight by Weight
°C	Degree Celsius
N	Number
µg, mg, g	Microgram, Milligram, Gram
µL, mL	Microliter, Milliliter
Nm	Nanometer
ABTS	2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
BHT	Butylated Hydroxytoluene
BMP-2	Bone Morphogenetic Protein-2
BMP-4	Bone Morphogenetic Protein-4
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
COX-1	Cyclooxygenase-1
COX-2	Cyclooxygenase-2
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
ERK	Extracellular Signal-regulated Kinases
EP Receptor	Prostaglandin EP Receptor

### สัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

GAE	Galic acid/mg Extract
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
IC50	The Half Maximal Inhibitory Concentration
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
LPS	Lipopolysaccharide
L-NA	L-Nitro Arginine
MSU	Monosodium Urate
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
MMPs	Matrix Metalloproteinase
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor Kappa B
NSAIDs	Non-steroid Anti-inflammatory Agent)
NOS2	Nitric Oxide Synthase 2
NO	Nitric Oxide
OCN	Osteocalcin
PGH2	Prostaglandins-H2
PGI2	Prostacyclin
PGD2	Prostaglandin D2
PGF2a	Prostaglandin F2 alpha
RA	Rheumatoid Arthritis
Runx2	Runt-related Transcription Factor 2
PGE2	Prostaglandins-E2
PGE2	Prostaglandin E2
PGs	Prostaglandins



# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ที่มาและความสำคัญของการวิจัย

ข้อมูลจาก United Nations รายงานว่าประเทศไทยกำลังอยู่ในช่วงการเปลี่ยนผ่านเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุโดยสมบูรณ์ (Aged Society) คือ มีสัดส่วนประชากรที่มีอายุ 60 ปีขึ้นไปเกินร้อยละ 20 ของประชากรในประเทศ จากข้อมูลประชากรของประเทศไทยปี พ.ศ. 2558 มีจำนวนประชากร 65,203,979 คน เป็นผู้ที่มีอายุ 60 ปีขึ้นไป 10,569,021 คน หรือคิดเป็นร้อยละ 16.2 ของประชากรทั้งหมด แปลว่าประเทศไทยนั้นกำลังก้าวเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุแล้ว และคาดการณ์ว่าในปี พ.ศ. 2564 ประเทศไทยจะเข้าสู่สังคมประชากรสูงอายุแบบสมบูรณ์ (United Nations, 2017) หนึ่งในปัญหาด้านสาธารณสุขที่สำคัญ โดยเฉพาะในผู้สูงอายุ คือ โรคข้อเสื่อม (Osteoarthritis) ซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง (Tangtrakulwanich & Suwanno, 2012) ผู้ที่มีภาวะข้อเข่าเสื่อมมาก หากไม่ได้รับการรักษาหรือปฏิบัติตัวอย่างเหมาะสม อาจทำให้มีความเจ็บปวด ข้อเข่าผิดรูป เดินไม่ปกติ ปฏิบัติกิจวัตรประจำวันต่าง ๆ ไม่สะดวก มีความทุกข์ทรมานทั้งทางด้านร่างกายและจิตใจ โรคข้อเข่าเสื่อมเป็นการเสื่อมของข้อเข่า โดยพบตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนในโรคนี้ ได้แก่ กระดูกอ่อนผิวข้อ (Articular Cartilage) ในข้อชนิดมีเยื่อข้อ (Synovial Joint) จะมีการทำลายกระดูกอ่อนผิวข้อ ซึ่งเกิดขึ้นช้า ๆ อย่างต่อเนื่องตามเวลาผ่านไป มีการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของกระดูกอ่อนผิวข้อ รวมถึงผิวกระดูกต้นขา และกระดูกหน้าแข้ง เช่น กระดูกใต้กระดูกอ่อน (Subchondral Bone) หนาตัวขึ้น มีการลดลงของน้ำไขข้อ ทำให้คุณสมบัติการหล่อลื่นลดลง (แสงอรุณ ดังก้อง, 2560; Pai, Rymer, Chang, & Sharma, 1997; Arden & Nevitt, 2006) สาเหตุของโรคข้อเสื่อมมาจากหลายปัจจัย ถึงแม้ว่าจะไม่ได้จัดอยู่ในการอักเสบในรูปของการฝ่อ (Inflammatory Arthropathy) แต่การดำเนินไปของโรคมีความสัมพันธ์กับเซลล์กระดูกอ่อน (Chondrocyte Cells) ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีลักษณะเฉพาะที่

เป็นส่วนประกอบของกระดูกอ่อนผิวข้อที่ฝังตัวอยู่นอกเยื่อหุ้มเซลล์ (Extracellular Matrix) (Scotece et al., 2012) เกิดการแสดงออกของสารตั้งต้นชักนำการอักเสบ (Pro-Inflammatory Mediator) ต่าง ๆ เช่น Interleukin-1 (IL-1), Tumor necrosis Factor (TNF- $\alpha$ ) และไนตริกออกไซด์ (Nitric Oxide; NO) เป็นสาเหตุให้เกิดความเสื่อมของกระดูก (Cartilage Degeneration) (Scotece et al., 2018) สำหรับยาที่ใช้ในการรักษาโรคข้อเสื่อม ปัจจุบันจะเป็นยาในกลุ่มยาแก้อักเสบชนิดที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs; NSAIDs) และพบผลข้างเคียงไม่พึงประสงค์ (Fendrick & Greenberg, 2009) จึงทำให้ปัจจุบันมีการหาทางเลือกใหม่ของยาที่มีประสิทธิภาพและความปลอดภัย เพื่อเป็นทางเลือกของการบำบัดรักษา โดยสมุนไพรและสารจากสมุนไพรได้ถูกนำมาใช้อย่างมากขึ้น ในงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของส่วนสกัดที่แยกได้จากเหง้ากระชายดำต่อการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์และความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยกระชายดำมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Kaempferia parviflora* Wall Ex. Baker อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae โดยส่วนที่นำมาใช้เป็นส่วนของเหง้า (Rhizome) จากรายงานข้อมูลทางพิษเคมีพบสารสำคัญหลายชนิด เช่น น้ำมันหอมระเหย (Volatile Oil) (Wongsinkongman, Mongkolchaipak, Chansuvanich, Techadumrongsin, & Boonruad, 2012) Chalcone, Phenolic Glycoside (Azuma, Tanaka, & Kikuzaki, 2008) และพบ Flavonoid หลายชนิด เช่น 5-Hydroxy-7-methoxyflavanone, 5,7-Dimethoxyflavone และ 3,5,7-Trimethoxyflavone (Yenjai, Prasanphen, Daodee, Wongpanich, & Kittakoop, 2004; Sutthanut, Sripanidkulchai, Yenjai, & Jay, 2007) ซึ่งในทางการแพทย์ทางเลือกใช้กระชายดำในการส่งเสริมสุขภาพ ทั้งยังมีการใช้ในภาวะระดูขาว (Leucorrhoea) โรคในช่องปาก อาการปวดท้องและกระตุ้นกำหนัด (Aphrodisiac) (Wutythamawech, 1997) งานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าสารสกัดเหง้ากระชายดำด้วยเอทานอล มีสาร 5-Hydroxy-3,7,3',4',-tetramethoxyflavone ที่สามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ และ PGE2 ใน Murine Macrophage Cells ได้ (Tewtrakul & Subhadhirasakul, 2008) แต่ยังไม่พบรายงานการทดสอบในเซลล์ ATDC-5 ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยจึงสนใจ ATDC-5 Mouse Chondrogenic Cell Line ที่ใช้ในการศึกษาในหลอดทดลอง (In Vitro Model) ที่ดีต่อการยับยั้งการอักเสบแบบเหนี่ยวนำให้เกิดไนตริกออกไซด์ (Santoro et al., 2015) โดยส่วนสกัดเหง้ากระชายดำ ซึ่งสัมพันธ์กับการลดการอักเสบได้

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ของสารสกัดและส่วนสกัดแห้งกระชายดำ

1.2.2 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดและส่วนสกัดแห้งกระชายดำ

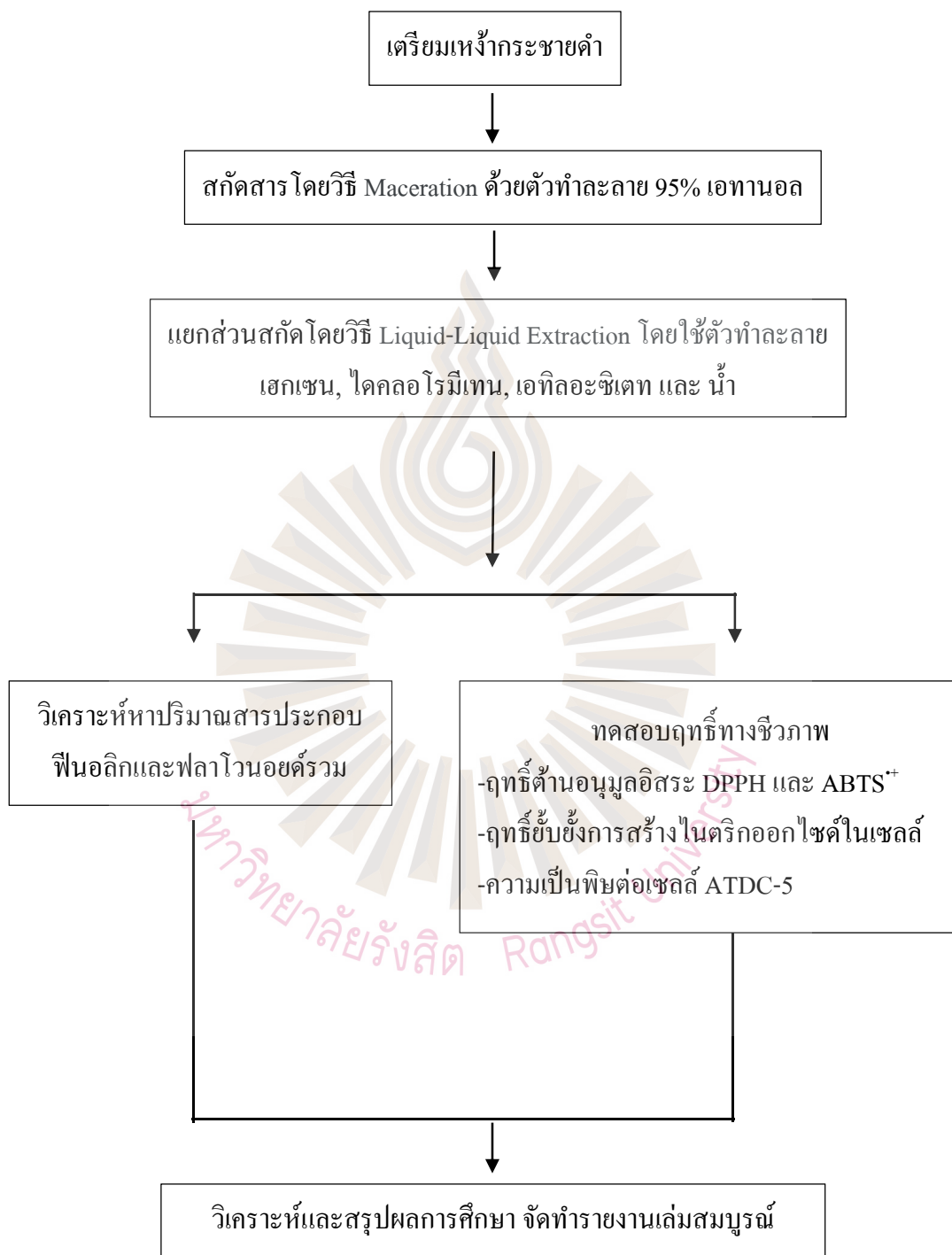
1.2.3 ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ในเซลล์ ATDC-5 ของสารสกัดและส่วนสกัดแห้งกระชายดำ

1.2.4 ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ATDC-5 ของสารสกัดและส่วนสกัดแห้งกระชายดำ

## 1.3 สมมติฐานการวิจัย

สารสกัดแห้งกระชายด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ต่างชนิดกัน มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ และความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ต่างกัน การสกัดสารสำคัญจากกระชายดำด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมจะนำไปสู่ฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษา วิจัย และพัฒนากระชายดำได้อย่างมีประสิทธิภาพในอนาคต

## 1.4 กรอบแนวคิดการวิจัย



รูปที่ 1.1 กรอบแนวคิดการวิจัย

## 1.5 นิยามศัพท์

**ไนตริกออกไซด์ (Nitric Oxide, NO)** เป็นสารอนุมูลอิสระที่ถูกผลิตจาก Inducible Isoform ของ Nitric Oxide Synthase (iNOS) พบได้ในเซลล์หลายชนิด เป็นสารอนุมูลอิสระที่มีพิษต่อเซลล์ สร้างมาจากกรดอะมิโนแอล-อาร์จินีน (L-arginine) เป็นตัวทำให้เกิดปฏิกิริยาคายเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเทส (Nitric Oxide Synthase, NOS) ให้เป็นสารซิทรูลีน (Citrulline) และปลดปล่อยอินดิซิเบิลไนตริกออกไซด์ซินเทส (Inducible Nitric Oxide Synthase, iNOS) โดยพบว่าระดับของไนตริกออกไซด์หรือ iNOS ที่สูงขึ้นในเซลล์กระดูกอ่อนส่งผลให้เกิดการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนผิวข้อ ในโรคข้อเสื่อม (Hauselmann et al., 1998; Boileau et al., 2002)

**การอักเสบ (Inflammation)** เป็นกระบวนการหรือปฏิกิริยาการตอบสนองของร่างกายเมื่อร่างกายได้รับการกระตุ้นจากสิ่งแปลกปลอม เชื้อโรค การเกิดอุบัติเหตุต่าง ๆ จะมีการส่งสัญญาณอันตรายต่อระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อให้เกิดการตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบต่อไป (Mogensen, 2009)

**อนุมูลอิสระ (Free Radical)** คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนโคเวเลนต์อยู่รอบนอกวงโคจรของโมเลกุล ทำให้โมเลกุลนั้นเกิดความไม่เสถียรและมีความว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่น ๆ โดยอนุมูลอิสระจะไปแย่งจับหรือดึงเอาอิเล็กตรอนจากโมเลกุลหรืออะตอมที่อยู่ข้างเคียงเพื่อให้เกิดความเสถียร ส่งผลให้อะตอมหรือโมเลกุลที่ถูกหรือดึงอิเล็กตรอนไปทำให้เกิดความไม่เสถียรขึ้น และเกิดเป็นปฏิกิริยาออกซิเดชันแบบนี้อย่างต่อเนื่อง (Aruoma, Kaur, & Halliwell, 1991)

**สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)** คือ สารที่ทำหน้าที่ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทำลายหรือยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นและทำให้อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นสิ้นสุดลง (Aruoma et al., 1991)

## บทที่ 2

### ทบทวนวรรณกรรม

#### 2.1 กระชายดำ

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Kaempferia parviflora* Wall Ex. Baker

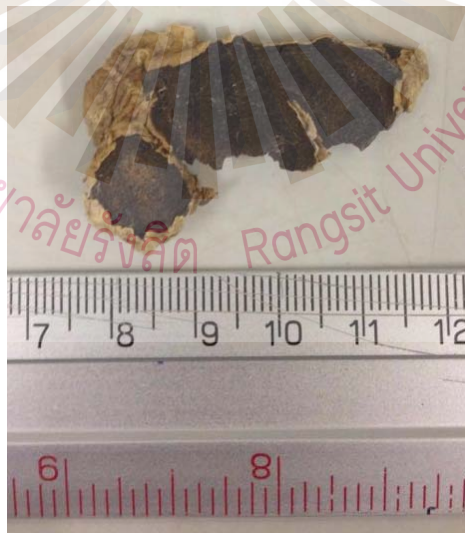
ชื่อพื้นเมือง *Kaempferia Rubromarginata* (S.Q. Tong) R.J. Searle และ *Stahlianthus*

*Rubromarginatus* S.Q. Tong

วงศ์ Zingiberaceae

ชื่อท้องถิ่นอื่น ๆ ว่านจิ้งจก ว่านพญาขลุ่ย ว่านกั้นบัง ว่ากำบัง ว่านกำบังภัยกะแอน ระแอน (ภาคเหนือ) จิงทราย (มหาสารคาม)

ส่วนที่ใช้ เหง้า (Rhizome) หรือบางครั้งเรียกว่าหัว (รูปที่ 2.1)



รูปที่ 2.1 เหง้ากระชายดำ

ที่มา : ผู้วิจัย, 2563

กระชายดำเป็นสมุนไพรที่ใช้รับประทานเป็นยาอายุวัฒนะ บำรุงกำลัง บำรุงทางเพศ ขับลม แก้ปวดท้อง นอกจากนี้ยังมีความเชื่อว่า หากรับประทานทุกวันจะทำให้ฟันแข็งแรง ผมดำสนิท ผิวเต่งตึง นัยน์ตาแจ่มใสขึ้น กระชุ่มกระชวย จากการศึกษาทางพิษเคมีพบว่ากระชายดำประกอบด้วยสารสำคัญในกลุ่มน้ำมันหอมระเหย (Wongsinkongman et al., 2004), Chalcone, Phenolic (Azuma et al., 2008) และ Flavonoid หลายชนิด โดยเฉพาะ Bioflavonoid ที่มี Methoxy Group โดยสารสำคัญหลักในกระชายดำได้แก่ 5,7-Dimethoxyflavanone และ 5,7,4'-Trimethoxyflavanone (Sutthanut et al., 2007) นอกจากนี้ยังพบสารอื่น ๆ เช่น 5-Hydroxy-7-methoxyflavanone, 5,7-Dimethoxyflavone และ 3,5,7-Trimethoxyflavone (Yenjai et al., 2004; Sutthanut et al., 2007) รวมถึงสารกลุ่มไกลโคไซด์ เช่น Kaempferiosides A-F (Chaipech et al., 2012) ในปี ค.ศ. 2008 Tewtrakul และคณะ พบว่า 5-Hydroxy 3,7,3',4',-tetramethoxyflavone สามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ และ PGE2 ซึ่งเป็นสารชักนำการอักเสบใน Murine Macrophage สอดคล้องกับการรายงานว่ากระชายดำสามารถต้านการอักเสบโดยไปลดการแสดงออกของ Nuclear Factor Kappa B (NF-KB), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) และ Cyclooxygenase-2 (COX-2) (Park et al., 2014) ในปี ค.ศ. 2012 มีการศึกษาพบฤทธิ์คล้ายกลุ้มเนื้อ Caverosum ของอวัยวะสืบพันธุ์เพศชาย (Jansakul, Tachanaparuksa, Mulvany, & Sukpondma, 2012) ยังพบฤทธิ์ต้านเชื้อรา ต้านเชื้อโปรโตซัวในกลุ่มราเมือกชนิดพลาสโมเดียม (Antiplasmodial) ต้านเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มไมโคแบคทีเรีย (Antimycobacterial) (Yenjai et al., 2004) ป้องกันโรคภูมิแพ้ (Anti-Allergic) (Tewtrakul, Subhadhirasakul & Kummee, 2008) และป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร (Anti-Gastric Ulcer) (Rujjanawate, Kanjanapothi, Amornlerdpison, & Pojanagaroon, 2005) ช่วยในการสร้างหลอดเลือดใหม่ (Angiogenic) (Chin et al., 2018) และฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Hung et al., 2017) นอกจากนี้ยังพบว่า 5,7-Dimethoxyflavone มีฤทธิ์ต้านการอักเสบเทียบได้กับยามาตรฐาน เช่น แอสไพริน อินโดเมทาซิน ไฮโดรคอร์ติโซน โดยมีคุณสมบัติต้านการอักเสบแบบเฉียบพลันได้ดีกว่าแบบเรื้อรัง มีกลไกการออกฤทธิ์ไปยับยั้งการสร้างพรอสตาแกลนดิน และพบว่า 5-Hydroxy-3,7,3',4'-tetramethoxyflavone มีฤทธิ์สูงในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ ที่ทดสอบใน RAW264.7 Macrophage Cells เมื่อกระตุ้นด้วย Lipopolysaccharide (LPS) แต่ไม่มีผลต่อการสร้าง TNF- $\alpha$  (Tewtrakul & Subhadhirasakul, 2008) สำหรับฤทธิ์ต่อระบบประสาทและสมองนั้น พบว่าสารสกัดกระชายดำ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ความสามารถในการปกป้องเซลล์ประสาท (Neuro-protective) และฤทธิ์ในการส่งเสริมความจำ (Cognitive Enhancing Effect) (Sutthanut et al., 2007; Welbat et al., 2016) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากเอทานอลสามารถลดภาวะซึมเศร้า (Depression-Like Behavior) ในหนูแรดไต (Wattanathorn, Pangpookiew, Sripanidkulchai, Muchimapura, & Sripanidkuchai, 2007) ที่ผ่านมาก็ได้มีการศึกษาตรวจสอบผลของ

การเจริญเติบโตโดยถูกกระตุ้น (Chondrogenic-Stimulatory) จากกระชายดำต่อเซลล์ ATDC-5 ในหลอดทดลองพบว่ากระชายดำสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสังเคราะห์ Matrix Protein Glycan และช่วยในการเพิ่มจำนวนคอลลาเจนชนิด II (Collgen II), คอลลาเจนชนิด X (Collgen X), โปรตีน Osteocalcin (OCN), Runt-related Transcription Factor 2 (Runx2) และ Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) และ Bone Morphogenetic Protein-4 (BMP-4) การสร้างกระดูกอ่อน (Chondrogenesis) ถูกกระตุ้นผ่านเส้นทาง BMP-2 และ Extracellular Signal-regulated Kinases (ERK) ในการทดลองในหลอดทดลอง ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากระชายดำมีความสามารถในการรักษาความผิดปกติของโครงกระดูก นอกจากนี้การบริโภคอาหารที่มีแคมเฟอร์อล (Kaempferol) ในปริมาณที่เหมาะสมในแต่ละวันในระยะยาว สามารถช่วยป้องกันการพัฒนาของโรคไขข้ออักเสบรูมาตอยด์ (Lee et al., 2018) กระชายดำถือเป็นพืชที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่น่าสนใจหลายด้าน รวมทั้งพบว่าไม่ก่อให้เกิดพิษทั้งเฉียบพลันและเรื้อรัง ทำให้เป็นสมุนไพรชนิดนี้อยู่ในการสนับสนุนนำมาเป็นผลิตภัณฑ์ตามแผนพัฒนาชาติด้านสมุนไพร

## 2.2 ATDC-5 Cell Line

ATDC-5 เป็นสายพันธุ์ของเซลล์ Chondrogenic จากหนูที่ยอมรับอย่างกว้างขวางว่าเป็นรูปแบบสำหรับการศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสร้างกระดูก (Endochondral) ซึ่งเซลล์ ATDC-5 จะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีอินซูลิน (Insulin) เป็นส่วนประกอบ โดยที่อินซูลินจะเปลี่ยนเซลล์ ATDC-5 ที่เป็นเซลล์คอนโดโรเจนิค (Chondrogenic Cell) ไปเป็นเซลล์กระดูกอ่อน (Shukunami et al., 1996) ที่ผ่านมาได้มีการใช้ประโยชน์เซลล์ ATDC-5 มากมาย เพื่อการศึกษาที่เกี่ยวข้อง เช่น แคมเฟอร์อล (Kaempferol) เป็นสารธรรมชาติชนิดหนึ่งที่จัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ที่สามารถปกป้องเซลล์ ATDC-5 จากการตายที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และการอักเสบผ่าน miR-146a (Fan et al., 2019) อีกทั้งยังมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งการเกิดสารก่อมะเร็งเม็ดเลือด มะเร็งเต้านมและอาการแพ้ต่าง ๆ (เอมอร์ โสมนะพันธุ์, 2543) ในปี ค.ศ. 2018 ได้มีการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารไพเพอรินที่สกัดจากดอกดีปลี โดยใช้เซลล์ ATDC-5 ที่กระตุ้นด้วย LPS (Ren & Liang, 2018) และต่อมาในปี ค.ศ. 2019 ได้มีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่า lncRNA-ATB ปกป้องเซลล์ ATDC-5 จากการอักเสบที่เกิดจาก LPS โดยการกดเส้นทาง MyD88 / NF-KB และ p38 Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) เป็นต้น (Ying, Wang, Gao, & Zhang, 2019)



## 2.3 โรคข้อเข่าเสื่อม

โรคที่เกิดจากการเสื่อมสภาพของข้อ (Degenerative Joint Disease) โดยมีการเกิดพยาธิสภาพอย่างเรื้อรังและถาวรที่กระดูกอ่อนผิวข้อ การทำลายกระดูกอ่อนผิวข้อเกิดขึ้นอย่างช้า ๆ และต่อเนื่องตามเวลาที่ผ่านไป (Hochberg et al., 2012) ซึ่งกระบวนการเสื่อมนี้เริ่มเกิดขึ้นตั้งแต่อายุประมาณ 20-30 ปี โดยเริ่มมีอาการทางคลินิกคือ อาการปวด ข้อฝืดแข็ง มีความลำบากในการเคลื่อนไหว และอาการเหล่านี้ค่อย ๆ เพิ่มมากขึ้น จนพบได้มากกว่าร้อยละ 90 เมื่ออายุ 40 ปีขึ้นไป (สุริสุทศน์ ณ อยุรยา และวัชระ รุจิเวชพงศธร, 2539) ซึ่งปัจจัยนำไปสู่ความเสื่อมของข้อเข่านั้นสามารถจำแนกประเภทตามสาเหตุของการเกิดโรคได้ 2 ประเภท ได้แก่

1) ปฐมภูมิ (Primary หรือ Idiopathic Osteoarthritis) เป็นภาวะความเสื่อมที่ไม่สามารถอธิบายสาเหตุการเกิดโรคที่ชัดเจนได้ มักเกิดขึ้นตามธรรมชาติของอายุ และลักษณะการใช้งานของข้อนั้น ๆ ทั้งนี้ผู้ป่วยไม่เคยมีประวัติของโรคหรือการเจ็บป่วยที่เกิดกับข้อเข่าโดยตรงมาก่อน

2) ทุติยภูมิ (Secondary Osteoarthritis) เป็นภาวะข้อเข่าเสื่อมที่เกิดจากความผิดปกติที่สามารถระบุหรืออธิบายสาเหตุที่ชัดเจนได้ อาทิ การหักของกระดูกที่มีรอยผ่านผิวข้อ ทำให้กระดูกอ่อนผิวข้อเรียงตัวไม่เรียบเหมือนเดิม การติดเชื้อมาในข้อ พันธกรรม โรคบางชนิด อย่างเช่น โรค รูมาตอยด์ เกาต์ โรคข้ออักเสบ หรือโรคอื่น ๆ ที่เกี่ยวกับข้อเข่าและความผิดปกติของข้อมาแต่กำเนิด (วรวิทย์ เล้าห์เรณู, 2546) ข้อเข่าประกอบด้วย กระดูกต้นขา (Femur Bone), กระดูกหน้าแข้ง (Tibia Bone), กระดูกสะบ้า (Patella Bone), กระดูกอ่อน (Cartilage) ที่ช่วยลดการเสียดสี, ข้อเป่ากระดูก (Capsule) และเอ็น (Ligament) ช่วยเพิ่มความมั่นคงให้แก่ข้อ, หมอนรองกระดูก (Meniscus) ช่วยลดแรงกระแทก, Synovial Fluid ช่วยหล่อลื่นไม่ให้ข้อฝืดขัด Quadriceps Group Muscle และ Hamstring Group Muscle ทำให้เกิดการเคลื่อนไหว ในทิศทางที่ต้องการเสริมสร้างความมั่นคง ลดแรงกระแทกที่ข้อได้เมื่อมัดกล้ามเนื้อรอบข้อแข็งแรง และพบว่าความเสื่อมเกิดขึ้นที่กระดูกอ่อนมากที่สุด บริเวณ Medial Femorotibial พบร้อยละ 75 Lateral Femorotibial ร้อยละ 26 และ Patellofemoral ร้อยละ 48 ซึ่งเกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีดังนี้ ปริมาณคอลลาเจนทั้งหมดลดลง เส้นใยเล็กลง มีการจับตัวกันหลวมขึ้น ทำให้เกิดการผิดรูปและการบวมของกระดูกได้ง่าย ปริมาณ Proteoglycan ลดลงร้อยละ 50 ทำให้คุณสมบัติของกระดูกอ่อนผิวข้อในการต้านทานแรงกดและความยืดหยุ่นลดลง นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงทางเมตาบอลิซึม (Metabolism) ดังนี้ ได้แก่ การสร้างทดแทนเซลล์กระดูกอ่อนไม่ทันการกับการถูกทำลาย มีการลดลงของความเข้มข้นของ Proteoglycan นอกจากนี้ยังพบว่าไมเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการทำลายมากกว่าเอนไซม์ที่เป็นตัวยับยั้ง ซึ่งเป็นกลไกสำคัญในการทำลายกระดูกอ่อน (วิชัย อิงพิณิจพงศ์, กานดาชัยภิญโญ, และสมรรถชัย

งานศักดิ์กิจ, 2558) หากกระดูกอ่อนผิวข้อเหล่านี้ถูกทำลายด้วยสาเหตุใดก็ตาม จะส่งผลให้กระดูกแข็งได้ข้อกระดูกอ่อนผิวข้อมีการสัมผัสกัน และเกิดการอักเสบของเยื่อข้อบริเวณรอบข้อ ส่งผลทำให้เกิดอาการปวดข้อตามมาในที่สุด (Hough, 1997; Taylor, Kee, King, & Ford, 2004))

## 2.4 โรคที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม

2.4.1 โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (Rheumatoid Arthritis; RA) เป็นโรคอักเสบเรื้อรังที่ทำลายข้อต่อ ชนิดที่พบได้บ่อยที่สุด ที่เกิดจากความผิดปกติของภูมิคุ้มตนเองโดยไม่ทราบสาเหตุ (มนาริชิ โอศิริ, 2554) โดยจะมีลักษณะอาการที่สำคัญ คือ ที่มีการอักเสบเรื้อรังของเยื่อหุ้มข้อ (Synovitis) ร่วมกับการอักเสบของอวัยวะอื่น ๆ ในร่างกาย การอักเสบนี้ก่อให้เกิดการทำลายของกระดูกอ่อน กระดูกรอบข้อ และเนื้อเยื่อรอบข้อ เช่น ถุงน้ำ (Bursa) และเส้นเอ็น (Tendon) เป็นต้น (Scott, Coulton, Symmons, & Popert, 1987)

2.4.2 โรคเกาต์ (Gout) คือ โรคข้ออักเสบที่พบบ่อยมาก มีอุบัติการณ์ร้อยละ 1-2 ในช่วง 10 ปี ที่ผ่านมามีอัตราการของโรคเกาต์เพิ่มขึ้นถึง 2 เท่า (Wallace, Riedel, Joseph-Ridge, & Wortmann, 2004) โรคเกาต์เป็นการเกิดข้ออักเสบเฉียบพลัน มีอาการบวม แดง ร้อน กดเจ็บ และปวดแบบรุนแรงทันที (Intense Pain) ซึ่งอาจหายเองได้ ในระยะแรกมักพบอาการอักเสบบริเวณข้อ เช่น ข้อนิ้วเท้า ข้อเท้า และข้อเข่า โดยเฉพาะข้อโคนนิ้วหัวแม่เท้าแรก พบว่าผู้ป่วยโรคเกาต์ร้อยละ 80-90 มีการอักเสบเป็นข้อแรก ภายหลังจากการเกิดภาวะข้ออักเสบเฉียบพลัน ผู้ป่วยอาจมีอาการดีขึ้นได้เองหรือดีขึ้นหลังจากได้รับการรักษา และจะเข้าสู่ระยะสงบหรือระยะปลอดอาการ ซึ่งเป็นช่วงระหว่างการเกิดภาวะข้ออักเสบเฉียบพลันแต่ละครั้ง (Fravel, Ernst, & Clark, 2014) การเกิดภาวะข้ออักเสบเฉียบพลันของโรคเกาต์มักมีอาการเป็นครั้งคราวและกลับมาเป็นซ้ำ เนื่องจากการเกิดกระบวนการอักเสบของข้อหรือเนื้อเยื่อรอบข้อซ้ำ ๆ จากการสะสมของเกลือโมโนโซเดียมยูเรต (Monosodium Urate; MSU) ในเนื้อเยื่อ โดยเฉพาะบริเวณรอบ ๆ ข้อ ทำให้เกิดปุ่มไตผิวน้ำ หรือปุ่มโทฟัส (Tophus) ตามมา (กนกกรัตน์ นันทิรุจ และคณะ, 2555) ลักษณะของปุ่มโทฟัสเป็นปุ่มนูนขึ้นได้ผิวน้ำ ด้านบนของปุ่มเป็นผิวน้ำลักษณะใส ด้านในมีสีขาวคล้ายขอลูก ด้านล่างหรือรอบฐานปุ่มมีสีแดง หากเจาะระบายน้ำในปุ่มพบว่าน้ำมีสีขาวคล้ายขอลูก หากทำการเจาะน้ำไขข้อ หรือปุ่มโทฟัสในระยะที่มีภาวะข้ออักเสบเฉียบพลันจะพบผลึกดั่งกล่าวอยู่ในเซลล์เม็ดเลือดขาว (Neogi et al., 2015)

## 2.5 สารสื่อการอักเสบ

2.5.1 พรอสตาแกลนดิน (Prostaglandins; PGs) เป็นไขมันที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่อยู่ในสารประกอบอีโคซานอยด์ (Eicosanoids) พรอสตาแกลนดินมีกลไกทางสรีรวิทยาและพยาธิวิทยาที่หลากหลายและเป็นที่ยอมรับมากที่สุดสำหรับควบคุมการอักเสบพร้อมกับการขยายตัวของหลอดเลือดและการรวมตัวของเกล็ดเลือด (Schumacher et al. 2016) ซึ่งได้มาจากแคทาบอลิซึม (Catabolism) ของเอนไซม์ Arachidonic Acid ที่ถูกเผาผลาญโดย Cyclooxygenases (COX) ที่มีการแสดงออกอย่างชัดเจน (COX-1 หรือ COX-2) ปฏิกริยานี้สร้าง PGH<sub>2</sub> ซึ่งเป็นสารตั้งต้นหลักสำหรับการสร้าง PGI<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2a</sub> และ PGE<sub>2</sub> (Wang & DuBois, 2006)

2.5.2 ไซโตไคน์ (Cytokines) เป็นสารที่ถูกหลั่งจากเซลล์ชนิดต่าง ๆ ในร่างกายเพื่อทำหน้าที่ในการสื่อสารระหว่างเซลล์ โดยไซโตไคน์ที่สำคัญต่อกระบวนการอักเสบในโรคข้อเสื่อมคือ IL-1 $\beta$  ซึ่งพบว่า IL-1 $\beta$  ในน้ำไขข้อของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมมีปริมาณมากกว่าคนปกติ โดยเซลล์กระดูกอ่อนจะสร้าง IL-1 $\beta$  ขึ้นมาในระดับที่สามารถกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายองค์ประกอบของกระดูกอ่อน ได้แก่ Matrix Metalloproteinase (MMPs) และ Aggrecan Degrading Enzymes (Aggrecanases หรือ ADAMTS) ได้ (Kirkham, 1991; Pelletier et al., 1997) รวมทั้งสารที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสลายอื่น ๆ ผ่านโปรตีนส่งสัญญาณ (Signaling Protein) ต่าง ๆ เช่น NF-KB และ MAPK เป็นต้น (Mengshol, Vincenti, Coon, Barchowsky, & Brinckerhoff, 2000) และลดการสังเคราะห์สารองค์ประกอบของกระดูกอ่อน เช่น คอลลาเจนชนิดที่ 2 และแอกกรีแคน (Aggrecan) ทั้งยังสามารถกระตุ้นไซโตไคน์อื่นเช่น IL-6, Leukemia Inhibitory Factor (LIF), IL-17, IL-18 และเคโมไคน์ เช่น IL-8 ได้อีกด้วย โดย IL-1 $\beta$  จะทำงานร่วมกับ TNF- $\alpha$  ในการกระตุ้นการแสดงออกของเอนไซม์ MMPs ที่สำคัญในโรคข้อเสื่อม ได้แก่ MMP-1, MMP-3, MMP-8 และ MMP-13 (Fuchs, Skwara, Bloch, & Dankbar, 2004) นอกจากนี้ในเยื่อหุ้มข้อของโรคข้อเสื่อมยังพบไซโตไคน์อื่น ๆ เช่น Interferon Gamma (IFN- $\gamma$ ), IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-18 และ IL-10 เป็นต้น โดย IL-4 และ IL-10 สามารถควบคุมไซโตไคน์ที่กระตุ้นการอักเสบได้ในเซลล์บางชนิดและ IL-4 สามารถยับยั้งการแสดงออกของ MMPs และ ADAMTS-4 ได้ (Yorimitsu et al., 2008) เนื่องจากโรคอ้วนเป็นปัจจัยสำคัญหนึ่งต่อการเกิดโรคข้อเสื่อมทำให้อดิโปไคน์ (Adipokine) ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่ถูกหลั่งออกมาจากเซลล์ไขมัน (White Adipocytes) เช่น Leptin, Adiponectin, Resistin, Visfatin และอื่น ๆ (Conde et al., 2011) มีบทบาทสำคัญต่อการเป็นโรคข้อเสื่อม นอกจากนี้อดิโปไคน์เหล่านี้สามารถผลิตออกมาจากเซลล์กระดูกอ่อนและกระตุ้นให้เกิดการเสื่อมสลายของเนื้อกระดูกอ่อนในโรคข้อเสื่อมได้ (Goldring & Otero, 2011) เช่น Leptin สามารถกระตุ้น MMPs,

ADAMTs และสารไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนอื่น ๆ รวมทั้งลดสารที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้าง (Anabolic Factor) เช่น Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) (Bao et al., 2010) อีกด้วย เช่นเดียวกับ Adiponectin, Visfatin และ Resistin ที่สามารถกระตุ้นการผลิต Nitric Oxide Synthase 2 (NOS2), MMPs, ADAMTs และ IL-6 แต่ลดการผลิตโปรตีนโอโกลแคน (Gosset et al., 2008; Lago et al., 2008; Lee et al., 2009; Kang et al., 2010)

2.5.3 อีโคซานอยด์ (Eicosanoids) เป็นโมเลกุลส่งสัญญาณชนิดหนึ่งที่มีสารตั้งต้นเป็นกรดไขมันจำเป็น ในการอักเสบในโรคข้อเสื่อมมีอีโคซานอยด์ที่สำคัญคือ พรอสตาแกลนดินอีทู (PGE2) ซึ่งเป็นสารเป้าหมายสำคัญในการต่อต้านกระบวนการอักเสบที่ได้รับการศึกษามากกว่า 100 ปี (Vane & Botting, 2003) โดยมี IL 18 และ TNF- $\alpha$  เป็นไซโตไคน์หลักที่กระตุ้นให้ส่งสัญญาณผ่าน NF- $\kappa$ B ให้เพิ่มระดับการแสดงออกของเอนไซม์ไซโคลออกซีจีเนส (COX-2) และ Microsomal Prostaglandin E Synthase-1 (mPGES-1) ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการสังเคราะห์ PGE2 (Park et al., 2006) ทำให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์สารองค์ประกอบของเนื้อกระดูกอ่อนและเกิดการสึกกร่อนของกระดูกอ่อน (Hardy et al., 2002) นอกจากนี้แรงกดเชิงกล (Mechanical Stress) ก็สามารถกระตุ้นการสังเคราะห์ PGE2 โดยเพิ่มระดับการแสดงออกของ mPGES-1 ด้วย (Gosset et al., 2006) และเมื่อยับยั้งการสร้าง PGE2 โดยใช้ยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (NSAIDs) ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-2 ก็ช่วยบรรเทาความเจ็บปวดและการอักเสบในผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมได้ (Rao & Khaus, 2008) แม้จะไม่สามารถยับยั้งการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนได้ก็ตาม ในเซลล์กระดูกอ่อน PGE2 ทำงานโดยจับกับ Prostaglandin EP Receptor (EP Receptor) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง EP2 และ EP4 Receptor ที่ส่งเสริม Metabolism (Attur et al., 2008; Li et al., 2009) นอกจากนี้ยังมีพรอสตาแกลนดินอื่น ๆ ได้แก่ PGD2 และ 15-Deoxy-A12, 14-Prostaglandin J2 (15d-PG J2) ที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (Apoptosis) ของเซลล์กระดูกอ่อนอีกด้วย (Shan et al., 2004; Zhu et al., 2008)

2.5.4 ไนตริกออกไซด์ เป็นสารอนุมูลอิสระที่ถูกผลิตจาก Inducible Isoform ของ Nitric Oxide Synthase (iNOS) พบได้ในเซลล์หลายชนิด เป็นสารชักนำการอักเสบชนิดหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนในโรคข้อเสื่อมโดยพบว่าระดับของไนตริกออกไซด์หรือ iNOS ที่สูงขึ้นในเซลล์กระดูกอ่อนส่งผลให้เกิดการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนผิวข้อในโรคข้อเสื่อม (Hauselmann et al., 1998; Boileau et al., 2002) ทั้งยังกระตุ้นการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์กระดูกอ่อนอีกด้วย (Whiteman et al., 2004; Wu et al., 2007) จากกลไกของโรคข้อเสื่อมทำให้พบว่า IL-18, TNF- $\alpha$  และแรงกดเชิงกลสามารถกระตุ้นการแสดงออกของ iNOS ได้และไนตริกออกไซด์ยังควบคุมให้ NF- $\kappa$ B แสดงออกมากขึ้นอีกด้วย (Abramson, 2008) แม้จะมีรายงานจำนวนมากค้น

พบว่าไนตริกออกไซด์เกี่ยวข้องกับโรคข้อเสื่อมแต่ก็ยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่าไนตริกออกไซด์มีประโยชน์หรือก่อให้เกิดความเสียหายในโรคข้อเสื่อมเนื่องจากกลไกการทำงานที่แท้จริงของไนตริกออกไซด์รวมถึงกลไกในการเคลื่อนที่ (Translocation) ของสารในเซลล์ชนิดต่าง ๆ ในข้อยังไม่ชัดเจน (Feelisch, 2008) ทำให้บทบาทของไนตริกออกไซด์ต่อโรคข้อเสื่อมยังต้องได้รับการศึกษาต่อไป

## 2.6 กระบวนการอักเสบและระบบภูมิคุ้มกัน

กระบวนการอักเสบเป็นกระบวนการหรือปฏิกิริยาการตอบสนองเมื่อมีตัวกระตุ้น ส่งผลให้เกิดพยาธิสภาพได้ โดยที่ตัวกระตุ้นอาจมาจากสิ่งแวดล้อมภายนอกในร่างกายและภายในร่างกาย ตัวอย่างของตัวกระตุ้น ได้แก่ การติดเชื้อและการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ เป็นต้น ในกระบวนการอักเสบนั้น พบว่าระบบภูมิคุ้มกันมีบทบาทสำคัญในการรักษาสมดุลของร่างกาย โดยตัวกระตุ้นต่าง ๆ จะส่งสัญญาณอันตรายต่อระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อให้เกิดการตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบต่อไป (Mogensen, 2009)

แม้ว่ากระบวนการอักเสบจะก่อให้เกิดประโยชน์ เช่น การเกิด Phagocytosis ต่อ Debris หรือ Apoptotic Cells และสัมพันธ์กับกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ แต่หากการเกิดกระบวนการอักเสบไม่สามารถควบคุมได้ อาจส่งผลทำให้มีการผลิต Neurotoxic Factors ซึ่งทำให้เกิดโรคต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อกระบวนการอักเสบเกิดขึ้น (Mrak, & Griffin, 2005)

องค์ประกอบของการเกิดกระบวนการอักเสบอาจแบ่งได้ 5 องค์ประกอบ ดังต่อไปนี้

1) ตัวเหนี่ยวนำ (Inducers) และตัวรับสัญญาณ (Sensors) การตอบสนองของกระบวนการอักเสบ ถูกควบคุมด้วยกระบวนการทางชีวภาพซึ่งต้องอาศัยระบบภูมิคุ้มกันทั้งชนิดไม่จำเพาะต่อเชื้อโรคชนิดใดชนิดหนึ่งและภูมิคุ้มกันที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อชนิดของเชื้อโรคเพื่อให้มีประสิทธิภาพในการต่อต้านจุลชีพก่อโรค เมื่อเซลล์เกิดการติดเชื้อและบาดเจ็บ อาจมีผลรบกวนปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อได้ โดยส่งผลให้มีการกระตุ้น Effectors หรือยีนที่ทำหน้าที่เป็นส่งสัญญาณ ซึ่งกระบวนการตอบสนองการอักเสบโดยทั่วไปจะเริ่มต้นเมื่อ Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs) ซึ่งเป็น Stranger Signals ทำหน้าที่เสมือนเป็น Inducers จับกับ Pattern Recognition Receptors (PRRs) ซึ่งทำหน้าที่เสมือนเป็น Sensors ดังตัวอย่างต่อไปนี้

Toll-Like Receptors (TLRs) จัดเป็น PRRs ชนิดหนึ่ง ที่สามารถจดจำรูปแบบของ PAMPs ได้ ยกตัวอย่างเช่น TLR4 จะตอบสนองต่อ LPS จากแบคทีเรียแกรมลบ ในขณะที่ TLR3 จะตอบสนองต่อ Viral Double-Stranded RNA เป็นต้น โดยตัวรับสัญญาณ (Receptors) เหล่านี้

จะอยู่บนเซลล์หลายชนิด แต่จะพบได้มากในเซลล์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับ Innate Immune Responses ได้แก่ Macrophages และ Microglia นอกจากนี้ยังมีการรายงานถึงบทบาทของ TLR2 และ TLR4 ต่อการเกิดพยาธิสภาพของ Chronic Inflammatory Diseases ต่าง ๆ และพบว่า Specific TLR4 Polymorphisms สัมพันธ์กับการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับผู้สูงอายุหลายชนิด อาทิเช่น ภาวะหลอดเลือดแข็ง (Atherosclerosis), เบาหวานประเภทที่ 2 (Type 2 Diabetes) และ โรครูมาตอยด์ (Glass, Saijo, Winner, Marchetto, & Gage, 2010)

2) Transduction Systems การที่ PAMPs จับกับ PRRs จะนำไปสู่การกระตุ้น Signal Transduction Pathways ที่ควบคุมกระบวนการ Transcription และ Post-Transcription ยกตัวอย่างเช่น TLRs เข้าคู่กับ MyD88 และ TRIF Signal Adaptor Proteins ซึ่งเป็น Signaling Adaptor Systems จะส่งผลกระตุ้น Downstream Kinases (I $\kappa$ B kinases และ MAP kinase) ที่ทำหน้าที่ควบคุม Signal-Dependent Transcription Factors ต่าง ๆ เช่น NF- $\kappa$ B, AP-1 และ Interferon Regulator Factor (IRF) Families เป็นต้น ซึ่ง Transcription Factors เหล่านี้จะทำหน้าที่ร่วมกันในการควบคุมการแสดงออกของยีนหลายชนิด โดยจะควบคุมยีนใดนั้นขึ้นอยู่กับ Target Cells ที่ถูกกระตุ้น (Glass et al., 2010)

3) Amplifiers และ Effectors เมื่อมีการตรวจพบจุลชีพก่อโรคในชั้นเริ่มต้นจะมีการส่งสัญญาณเพื่อเรียก Additional Cells ไปยังตำแหน่งที่มีการติดเชื้อและเพื่อให้เกิดการพัฒนาสู่กระบวนการ Adaptive Immunity ต้องอาศัยตัวส่งสัญญาณ ซึ่งตัวส่งสัญญาณที่สำคัญในกระบวนการอักเสบ ได้แก่ Cytokines (เช่น TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) ทำหน้าที่เป็นสารสื่อกลางการอักเสบและ Chemokines (เช่น MCP-1) ทำหน้าที่เรียก Additional Immune cells มารวมตัวกัน นอกจากนั้นส่งสัญญาณเหล่านี้ยังมีผลต่อยีนที่ถอดรหัสโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการต่อต้านการติดเชื้อ การสังเคราะห์โปรตีน การเคลื่อนที่ของเซลล์และการนำเสนอแอนติเจน (Antigen Presentation) อีกด้วย ซึ่งกลไกของ Cytokines ที่ทำหน้าที่เป็น Amplifier ต่อกระบวนการอักเสบนั้น อธิบายได้ดังต่อไปนี้

3.1) กลไกของ TNF- $\alpha$  เมื่อมีการหลั่ง TNF- $\alpha$  ออกมาจะมีการจับกับ Receptors ที่แตกต่างกัน 2 ชนิด คือ Type I (TNFR I หรือ p55) และ Type II (TNFR II หรือ p75) โดยมีการศึกษาว่า TNFR I เป็น Receptor ที่มีความสำคัญต่อ Cytolytic Activity ของ TNF- $\alpha$  ส่วน TNFR II จัดเป็นสารสื่อกลางต่อสัญญาณ Proliferative Regulatory Signals (Viviani, Bartesaghi, Corsini Galli, & Marinovich, 2004)

เมื่อ TNF- $\alpha$  จับกับ TNFR I ทำให้เกิดการเหนี่ยวนำ Caspase 8 โดยผ่าน FADD (Fas-Associated Death Domain) ซึ่งจะนำไปสู่กระบวนการ Apoptosis ได้ นอกจากนี้การจับกับ Receptor นี้ยังสามารถเหนี่ยวนำ Transcription Factors ได้แก่ NF- $\kappa$ B และ AP-1 (โดยผ่าน

TRAF2/5 และ RIP1) เหนี่ยวนำ Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs) และยังสามารถกระตุ้น Intracellular  $Ca^{2+}$  ให้เพิ่มมากขึ้น โดยผ่านทาง Ceramide อีกด้วย (Viviani et al., 2004)

3.2) กลไกของ IL-1 $\beta$  สามารถจับกับ Receptors ที่แตกต่างกัน 2 ชนิด คือ Type I Receptor (IL-1RI) และ Type II Receptor (IL-1RII) เมื่อ IL-1 $\beta$  จับกับ IL-1RI จะเกิดการรวมตัวกับ IL-1R Accessory Protein (IL-1RAcP) เป็น Complex ที่มีคุณสมบัติเป็น High-Affinity Receptor Complex เพื่อให้เกิด Signal Transduction โดยการรวมตัวเป็น Complex นั้นจะอาศัย Adaptor Molecule คือ MyD88 ซึ่งจะส่งผลให้เหนี่ยวนำ Kinases ต่าง ๆ (IL-1R Kinases; IRAK, Transforming Growth Factor- $\beta$  Activated Kinase; TAK) ทำให้เกิดการกระตุ้น NF- $\kappa$ B, AP-1 และ MAPKs ต่อไป โดย Type I Receptor มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ทางชีวภาพของ IL-1 $\beta$  มากกว่า Type II Receptor ซึ่ง IL-1RII จะไม่มีการเหนี่ยวนำสัญญาณใด ๆ จึงเรียก Receptor นี้ว่า ‘Decoy Receptor’ (Viviani et al., 2004)

4) Cellular และ Tissue Context การตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบ โดยทั่วไปจะเกี่ยวข้องกับการทำงานที่สัมพันธ์กันระหว่างเซลล์ภูมิคุ้มกัน หลอดเลือด และ Parenchymal cells ซึ่งในเนื้อเยื่อนั้น Macrophage จะทำหน้าที่เสมือนยามรักษาการต่อภาวะติดเชื้อและภาวะบาดเจ็บ และมีหน้าที่รักษาสมดุลของเนื้อเยื่อในสภาวะปกติ Macrophage ที่อยู่ในสภาวะ ‘Activated’ ได้แก่ M1 และ M2 โดยที่ M1 (หรือเรียกว่า Classical Activation) จะสัมพันธ์กับการตอบสนองของ Proinflammatory ต่อ IFN- $\gamma$  ที่สร้างมาจาก Th1 T-Lymphocytes หรือจากการส่งสัญญาณผ่าน TLRs ส่วน M2 (หรือเรียกว่า Alternative activation) จะสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อ Cytokines เช่น IL-4 และ IL-13 ที่สร้างมาจาก Th2 T-Lymphocytes หรือจากเซลล์อื่น ๆ ซึ่งการเปลี่ยนจาก M2 ไปเป็น M1 Phenotype จะเกี่ยวข้องกับโรคที่เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ (Viviani et al., 2004)

5) Counter-Regulation Negative Feedback Mechanisms สามารถลดการตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบจากการเหนี่ยวนำและส่งสัญญาณได้ ซึ่งรวมถึงทำให้เกิดการเหนี่ยวนำโปรตีนที่ทำหน้าที่ยับยั้ง Signal Transduction Pathways (เช่น SOCS Proteins) และเหนี่ยวนำ Transcriptional Repressors หรือ Transrepressors (เช่น ATF3, Nurr1) นอกจากนี้ยังกระตุ้นให้มีการสร้าง Soluble หรือ Cell-Surface Mediators โดย Anti-inflammatory Activities (เช่น IL-10, TGF- $\beta$ , และ Resolvins) อีกด้วย (Glass et al., 2010)

## 2.7 อนุมูลอิสระที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบและสารต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (Free Radical) เกิดขึ้นได้จากภายในร่างกาย เช่น เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมตามปกติในร่างกาย หรือเกิดจากการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายที่มีการสร้างอนุมูลอิสระเพื่อสู้กับเชื้อโรค และเกิดได้จากสิ่งแวดล้อมภายนอก ได้แก่ การได้รับสารเคมี สิ่งปนเปื้อนที่มากับอากาศ สารเคมีแต่งอาหาร สีผสมอาหาร สารเคมีปนเปื้อนในอาหาร สารกันบูด หรือสารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในการเกษตร ลักษณะทั่วไปของอนุมูลอิสระ คืออะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวอยู่รอบนอกซึ่งมีช่วงอายุสั้น การมีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวอยู่ในวงโคจรของโมเลกุลทำให้ไม่เสถียรและมีความว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่น โดยอนุมูลอิสระจะไปแย่งจับหรือดึงเอาอิเล็กตรอนจากโมเลกุลหรืออะตอมที่อยู่ข้างเคียงเพื่อให้เกิดความเสถียร โมเลกุลข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระชนิดใหม่ ซึ่งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นใหม่นี้จะไปทำปฏิกิริยากับสารโมเลกุลอื่นต่อไป ซึ่งทำให้เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ อนุมูลอิสระที่มีความสำคัญในทางชีวภาพ ได้แก่ Hydroxyl ( $\text{HO}^\bullet$ ) และ Superoxide Anion ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) เป็นต้น (Aruoma et al., 1991)

อนุมูลอิสระสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ กลุ่มแรก อนุมูลอิสระออกซิเจน (Reactive Oxygen Species; ROS) เป็นกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ สร้างมาจากการสร้างพลังงานในไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) โดยกระบวนการเมแทบอลิซึมในร่างกาย ซึ่งโมเลกุลชนิดนี้มีความว่องไวต่อการทำปฏิกิริยาอาจเป็นอนุมูลอิสระ เช่น Superoxide ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), Hydroxyl ( $\text{HO}^\bullet$ ), Hydroperoxyl ( $\text{OOH}^\bullet$ ), Peroxy ( $\text{ROO}^\bullet$ ) และ Alkoxy ( $\text{RO}^\bullet$ ) ส่วนกลุ่มที่สอง คือ อนุมูลอิสระไนโตรเจน (Reactive Nitrogen Species; RNS) เป็นกลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ เช่น Nitric Oxide ( $\text{NO}^\bullet$ ), Peroxynitrite ( $\text{ONOO}^\bullet$ ) และ Nitrogen Dioxide ( $\text{NO}_2^\bullet$ )

การกำจัดอนุมูลอิสระ (Radical Scavenging) คำว่า Scavenge หมายถึงการกำจัดเอาขยะและสิ่งที่ไม่ต้องการออกไป ซึ่งในกรณีนี้เปรียบอนุมูลอิสระเป็นสิ่งที่ไม่ต้องการ วิธีการกำจัดออกจะกระทำโดยสารกลุ่มหนึ่งที่เรียกว่า Scavenger ซึ่งเป็นตัวจับอนุมูลอิสระ เช่น สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic Compounds) ที่พบได้ในพืช สมุนไพร ผัก และผลไม้ จัดเป็น Radical Scavenger ที่มีประสิทธิภาพรวมทั้งสารอาหาร เช่น วิตามินเอ วิตามินซี และวิตามินอี เป็นต้น นอกจากนี้การถ่ายทอดอิเล็กตรอน เป็นการถ่ายทอดอิเล็กตรอนที่ไม่ได้จับคู่ของอนุมูลอิสระออกจากโมเลกุล หรือเป็นการรับเอาอิเล็กตรอน 1 ตัวจากภายนอกมาเข้าคู่กับอิเล็กตรอนเดิมที่ยังมีที่ว่างอยู่ในโมเลกุล ทำให้สถานะการเป็นอนุมูลอิสระหมดไป เช่น อนุมูล  $\text{O}_2^{\bullet-}$  เกิดการถ่ายทอดอิเล็กตรอนกลายเป็นโมเลกุลออกซิเจนปกติ เป็นต้น



สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) คือ สารที่ทำหน้าที่ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกายหรือสารที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่าง ๆ ของมนุษย์ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่เป็นสาเหตุหลักของการเสื่อมคุณภาพในอาหาร สารต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งตามกลไกการยับยั้งได้เป็น 3 ชนิด คือ ป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระทำลายหรือยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นและทำให้ลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระสิ้นสุดลง (Aruoma et al., 1991)

แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระสารต้านอนุมูลอิสระพบได้ 2 แหล่ง คือ สารต้านอนุมูลอิสระที่เกิดจากการสร้างขึ้นภายในร่างกายเพื่อป้องกันการสะสมอนุมูลอิสระ โดยการสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในภาวะที่สมดุลได้แก่ เอนไซม์คะตะเลส (Catalase), กลูตาไธโอนเพอรอกซิเดส (Glutathione Peroxidase) และซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส (Superoxide Dismutase) หรือสารประกอบโปรตีนอัลบูมิน (Albumin), บิลิรูบิน (Bilirubin), เซอรูโลพลาสมิน (Ceruloplasmin), กลูตาไธโอน (Glutathione), ทรานสเฟอริน (Transferrin), ยูบิควินอล (Ubiquinol) และยูเรต (Urate) เป็นต้น (Shapoval & Gromovaia, 2003) สารต้านอนุมูลอิสระที่เกิดจากภายนอกในร่างกาย ได้จากการรับประทานพืชผักและผลไม้ เพื่อเข้าไปช่วยเสริมสร้างระบบการต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกายให้มีประสิทธิภาพในการทำลายอนุมูลอิสระได้ดียิ่งขึ้น เป็นสารต้านออกซิเดชันในกลุ่มที่ทำลายปฏิกิริยาลูกโซ่ ได้แก่ วิตามินอี เบต้า-แคโรทีน วิตามินซี Ubiquinone, Uric Acid, Bilirubin, Albumin, Sulfhydryl Groups ในกรดอะมิโน Cysteine ซึ่งมีอยู่ในโปรตีนของเนื้อสัตว์ สารประกอบฟีนอลิก และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์

สารต้านอนุมูลอิสระที่มีในธรรมชาติ ที่ได้มาจากการบริโภคผัก ผลไม้ ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลของสารประเภทวิตามินซี เบต้า-แคโรทีน แคโรทีนอยด์ สารประกอบกลุ่มโพลีฟีนอลิก เช่น ฟลาโวนอยด์ ฟีนิลโพรพานอยด์ เป็นต้น ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระในธรรมชาติได้แก่

1) วิตามินเอ เป็นวิตามินที่ละลายในไขมัน เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการมองเห็นและการบำรุงรักษาเยื่อผิวและภูมิคุ้มกัน จะพบวิตามินเอเฉพาะในสัตว์เท่านั้น แต่ในพืชจะมีสารประกอบแคโรทีนอยด์ที่สามารถเปลี่ยนเป็นวิตามินเอได้ แม้ว่าวิตามินเอของแคโรทีนจะมีค่าต่ำมาก จัดเป็นตัวตั้งต้นของวิตามินเอ เรียกว่า โปรวิตามินเอ มักพบในพืชผักใบเขียว ผักและผลไม้ที่มีสีเหลือง หรือสีส้มแดง (Edem, 2009)

2) วิตามินซี หรือกรดแอสคอร์บิก (Ascorbic Acid) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระจัดอยู่ในกลุ่มวิตามินร่างกายไม่สามารถสร้างวิตามินซีขึ้นได้เองจึงจำเป็นต้องได้รับจากภายนอกเท่านั้น มีคุณสมบัติละลายได้ดีมากในน้ำ มีสูตรโมเลกุลคือ  $C_6H_8O_6$  มวลโมเลกุลเท่ากับ 176.124 กรัมต่อ

โมล เมื่อถูกออกซิไดซ์จะกลายเป็นกรดดีไฮโดรแอสคอร์บิก (Dehydroascorbic Acid) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีความไวในการทำปฏิกิริยาเคมีในร่างกาย วิตามินซีมีความสำคัญอย่างยิ่งในปฏิกิริยาเผาผลาญไขมันและสามารถป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดี (Padayatty et al., 2003) โดยจะเข้าทำปฏิกิริยากับไฮดรอกซิลเปอร์ออกไซด์อนุมูล Hydroxyl และอนุมูล Peroxyl นอกจากนี้ วิตามินซีสามารถยังทำหน้าที่เป็นตัวส่งเสริมประสิทธิภาพของสารต้านออกซิเดชันของวิตามินอีด้วย โดยทำให้อนุมูล  $\alpha$ -tocopherol $\cdot$  (TO $\cdot$ ) เปลี่ยนกลับไปเป็น  $\alpha$ -tocopherol (TOH) ดังเดิม ดังสมการที่ 2.1



สมการที่ 2.1

3) วิตามินอี หรืออัลฟาโทโคเฟอรอล (Alpha-Tocopherol) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นกลุ่มวิตามินเช่นเดียวกับวิตามินซี มีคุณสมบัติละลายได้ในน้ำมัน มีสูตรโมเลกุลคือ  $\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{O}_2$  มวลโมเลกุลเท่ากับ 430.72 กรัมต่อโมล วิตามินอีสามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลกลุ่มออกซิเจน มีผลเปลี่ยนแปลงกระบวนการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลและไกลโคไลซิโนไลด์ในผิวหนังได้ (Keen & Hassan, 2016; Mitsuishi et al., 2004) โดยวิตามินอีทำงานร่วมกับสารต้านออกซิเดชันตัวอื่น ๆ เช่น วิตามินซีและซีลีเนียม เป็นต้น วิตามินอีช่วยปรับให้ร่างกายสามารถนำวิตามินเอมาใช้ในการป้องกันสารที่เป็นพิษจากโลหะ เช่น ตะกั่ว ในธรรมชาติมีวิตามินอีอยู่หลายชนิด ปัจจุบันแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ โทโคฟีรอล และ โทโคโทอินอล แต่ละกลุ่มยังแยกเป็นวิตามินย่อย ๆ อีก 4 ชนิด ได้แก่ อัลฟา ( $\alpha$ -) เบต้า ( $\beta$ -) แกมมา ( $\gamma$ -) และเดลต้า ( $\delta$ -) วิตามินอีทำหน้าที่เป็นตัวให้ไฮดรอกซิลแก่อนุมูล Peroxyl ดังสมการที่ 2.2



สมการที่ 2.2

อนุมูล  $\alpha$ -tocopherol $\cdot$  ที่เกิดขึ้น สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูล Peroxyl ตัวอื่น ทำให้ได้สารที่มีความเสถียร (LOO- $\alpha$ -tocopherol) ดังสมการที่ 2.3 เป็นผลให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันหยุดลง (Basu et al., 1999)



สมการที่ 2.3

4) ซิลิเนียม ทองแดง และสังกะสี เป็นสารต้านออกซิเดชันทางอ้อม เนื่องจากเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชัน มีการศึกษาวิจัยที่แสดงว่าการใช้ซิลิเนียมและวิตามินอีร่วมกันช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการป้องกันการเกิดโรคมะเร็งบางชนิด ซึ่งพบได้ในอาหารตามธรรมชาติ เนื่องจากสารต้านออกซิเดชันมีหน้าที่หลายอย่าง เช่น ทำหน้าที่เป็นสารรีดิวซ์ (Reducing Agent) เป็นตัวขจัดอนุมูลอิสระจับกับไอออนโลหะที่เร่งให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ด้วยหน้าที่ต่าง ๆ เหล่านี้ จึงทำให้มีผลต่อการชะลอ หรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน หรือสามารถหยุดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และทำให้เป็น สารที่มีความเสถียรหรือเป็นสารที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกซิเดชันอีกต่อไป หรือเป็นสารที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระ (Non-Radical Product)

5) แคโรทีนอยด์ เป็นรงควัตถุที่พบทั่วไปในธรรมชาติ จะถูกสังเคราะห์ขึ้นในคลอโรพลาสต์ของพืช และพบมากในผักและผลไม้สุก โครงสร้างพื้นฐานของแคโรทีนอยด์ประกอบด้วย โครงสร้างหลักที่เรียกว่า Tetraterpene Skeleton ซึ่งอาจมีวงแหวนห้าหรือหกเหลี่ยมก็ได้ ที่บริเวณปลายด้านใดด้านหนึ่งหรือทั้งสองด้านของโมเลกุล แคโรทีนอยด์สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ตามองค์ประกอบของโครงสร้างในโมเลกุล ดังนี้

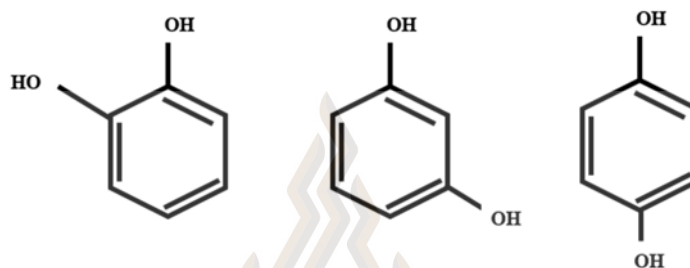
5.1) แคโรทีน (Carotene) เป็นแคโรทีนอยด์ที่โครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยคาร์บอนและไฮโดรเจนเท่านั้น เช่น เบต้าแคโรทีน อัลฟาแคโรทีน แกมมาแคโรทีน ไโคปีน (Lycopene) เป็นต้น ซึ่งเบต้าแคโรทีนเป็นสารตั้งต้นของวิตามินเอ การเปลี่ยนรูปจากเบต้าแคโรทีนไปเป็นวิตามินเอ โดยการแตกพันธะคู่ที่ตำแหน่งกึ่งกลางของโมเลกุลโดยเอนไซม์ Carotene Deoxygenase เมื่อเบต้าแคโรทีนสามารถดักจับอนุมูลอิสระเข้าไปในโมเลกุลแล้ว โมเลกุลของเบต้าแคโรทีนจะอยู่ในลักษณะที่มีความเสถียร

5.2) ออกโซแคโรทีนอยด์ หรือ แซนโทฟิล เป็นแคโรทีนอยด์ที่มีโครงสร้างโมเลกุลบริเวณวงแหวนประกอบด้วยกลุ่มอื่นนอกเหนือจากคาร์บอนและไฮโดรเจน เช่น เบต้าคริบโทแซนทิน ( $\beta$ -Cryptoxanthin) และลูทีน (Lutein)

## 2.8 สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic Compounds)

สารประกอบจำพวกฟีนอลิกเป็นสารกลุ่มใหญ่ที่พบมากในพืช ซึ่งโครงสร้างหลักประกอบด้วย Aromatic Ring แทนที่ด้วย Hydroxy Group (แสดงในรูปที่ 2.2) โดยมากเป็นสารที่มีขี้ว ละลายในตัวทำละลายจำพวกแอลกอฮอล์ได้ดี โครงสร้างพื้นฐานของสารประกอบฟีนอลิกจะเกิดจากการรวมตัวของโมเลกุลน้ำตาลตั้งแต่ 1 โมเลกุลขึ้นไปรวมกับหมู่ไฮดรอกซิล (OH Group) น้ำตาลชนิดที่พบมากที่สุด ในโมเลกุลของสารประกอบฟีนอลิก คือ กลูโคส (Glucose) นอกจากนี้ยัง

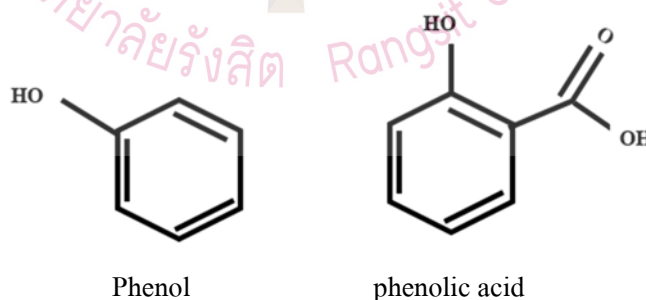
พบว่าอาจมีการรวมตัวกันระหว่างสารประกอบฟีนอลิกด้วยกันเองหรือสารประกอบฟีนอลิกกับสารประกอบอื่น ๆ เช่น กรดคาร์บอกซิลิก (Carboxylic Acid) กรดอินทรีย์ (Organic Acid) อะมีน (Amine) และไขมัน ตัวอย่างสูตร โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกแบบง่ายบางชนิด



รูปที่ 2.2 สูตร โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกแบบง่ายบางชนิด

ที่มา : ผู้วิจัย, 2563

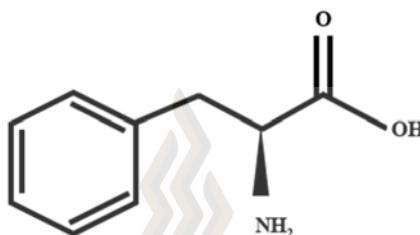
1) สารประกอบฟีนอลิกแบบง่าย (Simple Phenolic Compound) เป็นสารที่พบทั่วไปในธรรมชาติโดยมีวงแหวนเบนซีนเพียง 1 วงเท่านั้น (แสดงในรูปที่ 2.3) พบเฉพาะพืชกลุ่มแองจิโอสเปิร์ม ได้แก่ กลุ่มฟีนอล (phenols) เช่น Catechol, Resorcinol, Orcinol และ Hydroquinone เป็นต้น กลุ่มกรดฟีนอลิก (Phenolic Acids) เช่น Salicylic Acid, Syringic Acid, Vanillic Acid และ *p*-Hydroxybenzoic Acid เป็นต้น



รูปที่ 2.3 สูตร โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลและกรดฟีนอลิก

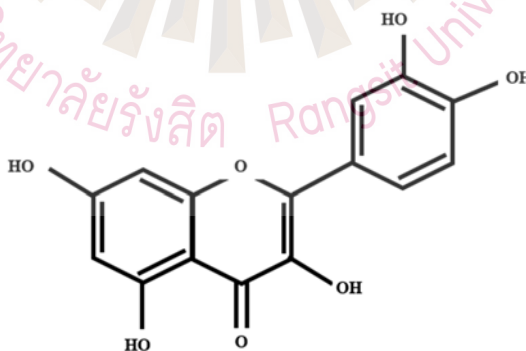
ที่มา : ผู้วิจัย, 2563

2) ฟีนิลโพรพานอยด์ (Phenylpropanoid) เป็นสารที่มีองค์ประกอบของวงแหวนเบนซีนต่อกับสายของคาร์บอนอีก 3 อะตอม (แสดงในรูปที่ 2.4) ช่วยควบคุมการเจริญเติบโตและการต้านทานโรค พบมากในผักกาด ข้าว ธัญพืช องุ่น และแอปเปิ้ล เป็นต้น สารในกลุ่มนี้ ได้แก่ *p*-Coumaric Acid, Caffeic Acid, Ferulic Acid, Sinapic Acid, Umbelliferone, Sesamin, Eugenol และ Isoeugenol



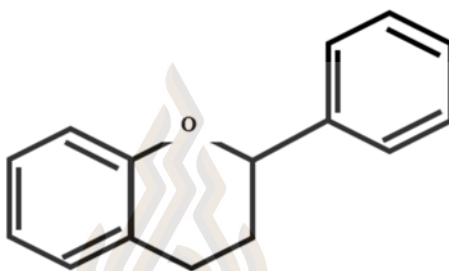
รูปที่ 2.4 สูตร โครงสร้างของสารประกอบฟีนิลโพรพานอยด์  
ที่มา : ผู้วิจัย, 2563

3) โพลีฟีนอล (Polyphenol) เป็นสารที่มีโครงสร้างของฟีนอลหรือฟีนิลโพรพานอยด์หลาย ๆ วงมาต่อกัน สูตรโครงสร้างคือ  $(-C_6-C_3-C_6-)_n$  และ  $(-C_6-C_3-)_n$  ตามลำดับ (แสดงในรูปที่ 2.5) สามารถยับยั้งโลหะซึ่งเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระโดยเป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่โลหะ มีความสำคัญในการเป็นตัวยารักษาโรคต่าง ๆ พบมากในชาเขียว ชาดำ กาแฟ โกโก้ กีวี เป็นต้น สารในกลุ่มนี้ ได้แก่ ลิกนินและแทนนิน



รูปที่ 2.5 สูตร โครงสร้างของสารประกอบโพลีฟีนอล  
ที่มา : ผู้วิจัย, 2563

4) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) เป็นสารประกอบกลุ่มใหญ่ มีสูตรโครงสร้างคือ -C6-C3-C6- หรือ -C6-C1-C6- หรือ -C6-C2-C6- (C6 คือ หมู่ฟีนอล) (แสดงในรูปที่ 2.6) พบมากในชา มะนาว ไวน์ เปลือกของผลไม้ต่าง ๆ ผักใบเขียว สารในกลุ่มนี้ ได้แก่ Flavanes, Flavanones, Flavanols, Flavones, Flavonols, Anthocyanidins, Isoflavanes, Isoflavanones, Isoflavanols, Isoflavones, Isoflavonols, Chalcones, Aurones, Coumarins และ Dihydrochalcones



รูปที่ 2.6 สูตร โครงสร้างของสารประกอบฟลาโวนอยด์  
ที่มา : ผู้วิจัย, 2563

ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิก และคุณสมบัติที่ได้รับความสนใจมากในปัจจุบัน คือ การเป็นสารต้านออกซิเดชันหรือสารต้านอนุมูลอิสระ และการใช้สารประกอบฟีนอลิกในการป้องกันโรคต่าง ๆ โดยสารประกอบฟีนอลิกจะทำหน้าที่กำจัด อนุมูลอิสระและไอออนของโลหะที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและโมเลกุลอื่น ๆ ด้วยการให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระอย่างรวดเร็วดังสมการที่ 2.4 และ 2.5 ต่อไปนี้



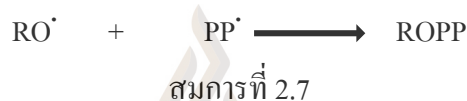
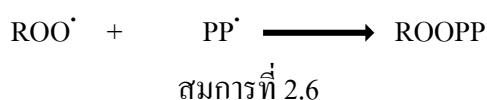
สมการที่ 2.4



สมการที่ 2.5

เมื่อสารประกอบฟีนอลิกให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระไปแล้ว อนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกจะค่อนข้างมีเสถียรภาพ ดังนั้นจึงไม่ทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นต่อไป

ยิ่งไปกว่านั้นอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกบางชนิดยังคงสามารถรวมตัวกับอนุมูลอิสระอื่นได้อีกด้วยจึงทำให้สารประกอบฟีนอลิกสามารถลดจำนวนอนุมูลอิสระได้ถึงสองเท่า ดังสมการที่ 2.6 และ 2.7



สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่พบได้ในพืชทั่วไป มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อยหนึ่งหมู่หรือมากกว่านั้น สามารถละลายน้ำได้ในพืชมักพบอยู่ในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ (Glycosides) และพบได้ในส่วนของช่องว่างภายในเซลล์ สารประกอบฟีนอลิกที่พบในธรรมชาติมีมากมายหลายชนิด มีลักษณะสูตรโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน ซึ่งกลุ่มใหญ่ที่สุดที่พบจะเป็นสารประกอบพอลิฟลาโวนอยด์ นอกจากนั้นยังมีสารประกอบต่าง ๆ เช่น Simple Monocyclic Phenol, Phenyl Propanoid, Phenolic Quinine และ Polyphenolic ได้แก่ Lignin, Tannin เป็นต้น รวมทั้งยังพบว่ามีการประกอบที่มีกลุ่มฟีนอลิกรวมอยู่ในโมเลกุลของโปรตีนอัลคาลอยด์และเทอร์ปีนอยด์ เป็นต้น พบว่าสารประกอบฟีนอลิกหลายชนิดมีสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน เช่น ฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิก และแทนนิน เป็นต้น โดยสารประกอบฟีนอลิกทำหน้าที่เป็นตัวจับไล่อนุมูลอิสระที่สำคัญคือ อนุมูล Peroxyl โดยมีกลไก 2 แบบ คือ เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นต่ำเมื่อเทียบกับสารออกซิไดซ์ สารประกอบฟีนอลิกจะป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน นอกจากนี้อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาจะถูกทำให้เป็นสารที่มีความเสถียร ดังนั้นจึงสามารถป้องกันการเกิดพหุออกซัน (Propagation) และสารประกอบฟีนอลิกบางชนิดยังทำหน้าที่เป็นสารคีเลต ดักจับไอออนของโลหะเข้าไปในโมเลกุล เช่น เควอร์ซีทิน (Quercetin) แต่ถ้าร่างกายมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในปริมาณมากเกินไปที่ระบบป้องกันจะยับยั้งได้จะทำให้เกิดสภาวะที่เรียกว่า Oxidative Stress ขึ้น สภาวะดังกล่าวอนุมูลอิสระจะทำอันตรายต่ออวัยวะและเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของร่างกายซึ่งถ้าสะสมมาก ๆ นำไปสู่ความผิดปกติหรือพยาธิสภาพหลายอย่าง (Packer, Rimbach, & Virgili, 1999)

สารประกอบฟีนอลิกยังทำหน้าที่ทั้งเป็นสารให้อิเล็กตรอน หรือเป็นตัวให้ไฮโดรเจน และกำจัดออกซิเจนที่อยู่ในรูปแอกทีฟ ด้วยหน้าที่ต่าง ๆ ดังกล่าวจึงทำให้สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารต้านออกซิเดชัน ที่สำคัญชนิดหนึ่งในพืชทั่วไป

ความสัมพันธ์ระหว่างการอักเสบกับอนุมูลอิสระนั้น กล่าวคือ กระบวนการอักเสบเกิดขึ้นเมื่อแมคโครฟาจและนิวโทรฟิลถูกกระตุ้นจะเปลี่ยนโมเลกุลของออกซิเจนไปเป็น Reactive Oxygen Intermediates (ROIs) ซึ่งเป็นสารออกซิไดซ์ที่รุนแรงสามารถที่จะทำลายจุลชีพและเซลล์อื่น ๆ ได้ ระบบที่ก่อให้เกิด Primary Free Radical คือระบบ Phagocyte Oxidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีหลายหน่วยย่อยรวมกัน เอนไซม์ Phagocyte Oxidase ส่วนมากอยู่ใน Phagolysosomal Membrane ถูกเหนี่ยวนำและถูกกระตุ้นโดยสิ่งกระตุ้นต่าง ๆ รวมถึงสารพิษเอนโดทอกซิน หรือ LPS จากแบคทีเรีย การทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้จะรีดิวซ์โมเลกุลของออกซิเจนไปเป็น ROIs เช่น ซุปเปอร์ออกไซด์แรดิคัล (Superoxide Radical) นอกจากนี้แมคโครฟาจยังสามารถผลิต Reactive Nitrogen Intermediates (RNIs) โดยส่วนมากคือ NO ในระบบภูมิคุ้มกันที่ภาวะปกติเซลล์แมคโครฟาจจะมีการสร้าง NO ในปริมาณน้อยมาก และเมื่อถูกกระตุ้นด้วยเอนโดทอกซิน หรือ Cytokine จากการอักเสบจะเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ iNOS และสามารถเพิ่มการสร้าง NO ออกมาในปริมาณมากซึ่งสูงกว่าปกติ 100-1000 เท่า เพื่อทำลายเชื้อจุลชีพที่แปลกปลอมเข้ามา โดย NO ที่สร้างออกมาอย่างต่อเนื่องทำให้มีปริมาณ NO เพิ่มขึ้น ซึ่ง NO ที่เพิ่มขึ้นระดับนี้จะสามารถทำปฏิกิริยากับโมเลกุลปกติภายในเซลล์ ส่งผลให้เกิดการทำลายเซลล์และเกิดพิษ ส่งเสริมการอักเสบให้อย่างรุนแรงขึ้น (Abbas & Lichtman, 2003)

## 2.9 ตัวทำละลายอินทรีย์ (Organic Solvent)

ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นสารเคมีที่ใช้กันมากในอุตสาหกรรม จัดเป็นวัตถุอันตรายที่ใช้ในกระบวนการผลิต หรือใช้เป็นสารประกอบในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ รวมถึงใช้ในห้องปฏิบัติการ ตัวทำละลายอินทรีย์แบ่งออกได้หลายชนิดตามองค์ประกอบทางเคมี แต่ละชนิดมีสมบัติทางกายภาพแตกต่างกันและให้ประโยชน์ที่แตกต่างกันอีกด้วย ถึงแม้ตัวทำละลายอินทรีย์มีประโยชน์มาก แต่ก็ยังเป็นพิษภัยต่อร่างกายและสิ่งแวดล้อมได้เช่นกัน หากนำไปใช้ไม่ถูกวิธี ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นสารประกอบที่มีธาตุคาร์บอน และไฮโดรเจน เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งมีธาตุอื่น ๆ เป็นองค์ประกอบรอง เช่น ออกซิเจน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส คลอรีน โบรมีน เป็นต้น



ประเภทของตัวทำละลายอินทรีย์แบ่งออกตามโครงสร้างทางเคมีเป็น 9 ประเภท ได้แก่

1) อะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน (Aliphatic Hydrocarbons) เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว (Non-Polar) ประกอบด้วยธาตุคาร์บอนและไฮโดรเจนที่จัดเรียงตัวแบบเส้นตรงหรือแขนง โดยไม่มีหมู่ฟังก์ชัน (Function Group) ตัวอย่าง เฮกเซน (Hexane) เพนเทน (Pentane) ปีโตรเลียม อีเทอร์ (Petroleum Ether) เป็นต้น เป็นตัวทำละลายที่ดีสำหรับไขมัน (Fatty) น้ำมัน (Oil) ไข (Wax) แต่ไม่ละลายสารพอลิเมอร์ (Polymer) อนุพันธ์ของเซลลูโลส (Cellulose Derivative) เป็นต้น

2) ไซโคลอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน (Cycloaliphatic Hydrocarbons) เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว ประกอบด้วยธาตุคาร์บอนและไฮโดรเจนที่จัดเรียงตัวแบบวงแหวน (Ring) โดยไม่มีหมู่ฟังก์ชันในโมเลกุล ได้แก่ เมทิลไซโคลเฮกเซน (Methyl Cyclohexane) เอทิลไซโคลเฮกเซน (Ethyl Cyclohexane) เป็นต้น เป็นตัวทำละลายที่มีความสามารถในการละลายอยู่ระหว่าง Aliphatic Hydrocarbons และอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Aromatic Hydrocarbons) เป็นตัวทำละลายที่ดีสำหรับไขมัน น้ำมัน แต่ไม่ละลายสารพอลิเมอร์เรซิน เช่น ยูเรียฟอรัมาลดีไฮด์ (Urea Formaldehyde) ฟีนอลิกฟอรัมาลดีไฮด์ (Phenolic Formaldehyde) และสารพอลิเมอร์เซลลูโลสเอสเตอร์ (Cellulose Ester)

3) อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Aromatic Hydrocarbons) เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีธาตุคาร์บอนและไฮโดรเจนเป็นองค์ประกอบ โดยมีกลุ่มอะโรมาติก หรือฟีนิล (Phenyl Group) อยู่ในโครงสร้าง เป็นสารที่มีขั้วเล็กน้อยทำให้ประสิทธิภาพการละลายดีกว่า Aliphatic Hydrocarbons คือสามารถละลายสารพอลิเมอร์ Oil, Castor oil, Oil Modified Alkyl Resin และเรซินที่มีขั้วเล็กน้อย (Low Polarity Resin) ตัวทำละลายในกลุ่มนี้มักใช้ในการเจือจางสำหรับสารละลายของเซลลูโลสไนเตรต (Cellulose Nitrate) เซลลูโลสเอสเตอร์ (Cellulose Esters) โพลีเอไมด์ (Poly Amide) เป็นต้น

4) คลอรีเนตไฮโดรคาร์บอน (Chlorinated Hydrocarbons) เป็นตัวทำละลายที่มีธาตุคาร์บอนและไฮโดรเจนเป็นองค์ประกอบ โดยมีกลุ่มคลอรีนอยู่ในโครงสร้าง ซึ่งเป็นสารที่มีขั้ว (Polar) ดังนั้นจึงมีความสามารถในการละลายดีกว่ากลุ่มที่ไม่มีคลอรีนผสมอยู่ ตัวทำละลายในกลุ่มนี้ใช้ในการละลายพอลิเมอร์ ไข และบิทูเมน ตัวทำละลายในกลุ่มนี้คือ ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) เมทิลดีคลอไรด์ (Methylene Dichloride) เป็นต้น

5) แอลกอฮอล์ (Alcohols) เป็นตัวทำละลายที่มีธาตุคาร์บอนและไฮโดรเจนเป็นองค์ประกอบ โดยมีกลุ่มไฮดรอกซิล (Hydroxyl Group; -OH) อยู่ในโครงสร้าง เป็นสารที่มีขั้วที่แรง เช่น เมทานอล (Methanol) หรือ เมทิลแอลกอฮอล์ (Methyl Alcohol) เป็นสารที่มีขั้วสูงจึงสามารถ

ละลายน้ำได้ทุกอัตราส่วน และสารที่มีขั้วอื่น ๆ เซลลูโลส ไนเตรท เอทิลเซลลูโลส แต่ไม่สามารถละลาย ไขมัน น้ำมัน เป็นต้น เอทานอล (Ethanol) หรือ Ethyl Alcohol เป็นสารที่มีขั้วสูงจึงสามารถละลายน้ำได้ทุกอัตราส่วน สามารถผสมกับรวมกับตัวทำละลายอินทรีย์อื่น ๆ ได้ดี เช่น Ether, Hydrocarbon Acids, Ketone และแอลกอฮอล์ตัวอื่น ๆ มักใช้ในการละลาย Castor Oil, Cellulose Nitrate เป็นต้น

6) คีโตน (Ketone) เป็นตัวทำละลายที่มีธาตุคาร์บอนและไฮโดรเจนเป็นองค์ประกอบ โดยมีกลุ่มคาร์บอนิล (Carbonyl Group) อยู่ในโมเลกุล จึงเป็นตัวรับไฮโดรเจนที่ดี ตัวอย่างสารในกลุ่มนี้ ได้แก่ เมทิลโพรพิลคีโตน (Methyl Propyl Ketone) เมทิลเอทิลคีโตน (Methyl Ethyl Ketone) สารเหล่านี้เป็นตัวทำละลายที่ให้กับสารที่ไม่มีขั้วประเภทเรซิน โพลีเมอร์และ โลโพลิเมอร์ เป็นต้น

7) เอสเทอร์ (Ester) เป็นตัวทำละลายที่มีธาตุคาร์บอนและไฮโดรเจนเป็นองค์ประกอบ โดยมีกลุ่มเอสเทอร์ (Ester Group;  $-OC-R$ ) อยู่ในโมเลกุล เป็นสารประกอบที่เป็นกลาง และมีความเสถียร แต่ไม่สามารถ Hydrolysis ด้วยกรดหรือด่างเข้มข้นขณะร้อนได้ มีค่าความเป็นขั้วน้อยกว่าแอลกอฮอล์ Ester จึงเป็นตัวทำละลายที่ดีสำหรับสารที่มีขั้ว ตัวอย่างสารในกลุ่มนี้ ได้แก่ บิวทิลอะซิเตท (Butyl Acetate) เอทิลอะซิเตท (Ethyl Acetate) เป็นต้น

8) อีเทอร์ (Ethers) เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีธาตุคาร์บอนและไฮโดรเจนเป็นองค์ประกอบ โดยมีกลุ่มแอลคอกซิล (Alkoxy Group;  $-OR$ ) อยู่ในโมเลกุล Ethers เป็นตัวทำละลายที่ดีสำหรับไบน์เดอร์ (Binder) นิยมใช้ในอุตสาหกรรมสี ได้แก่ ไดบิวทิลอีเทอร์ (Dibutyl Ether) ไดไอโซโพลโพรพิลอีเทอร์ (Diisopropyl Ether) เป็นต้น

9) ไกลคอลอีเทอร์ (Glycol Ethers) เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีธาตุคาร์บอนและไฮโดรเจนเป็นองค์ประกอบ โดยมีกลุ่มไฮดรอกซิล (Hydroxyl Group;  $-OH$ ) และกลุ่มแอลคอกซิล (Alkoxy group;  $-OR$ ) ได้แก่ ไกลคอลอีเทอร์ (Glycol Ether) เอทิลไกลคอล (Ethyl Glycol) บิวทิลไกลคอล (Butyl Glycol) เป็นต้น (คมสัน ดั่งยืนยงค์, 2543)

### บทที่ 3

#### ระเบียบวิธีวิจัย

การศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาผลของสารสกัดจากเหง้ากระชายดำ โดยขั้นตอนการวิจัยเริ่มด้วยการสกัดสารจากกระชายดำด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ จากนั้นนำส่วนสกัดแต่ละส่วนมาวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Aluminum Chloride Colorimetric Assay และสารฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Folin-Ciocateu Assay แล้วทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS<sup>•+</sup> Assays และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ในเซลล์ ATDC-5 พร้อมทั้งทดสอบความเป็นพิษของส่วนสกัดที่แยกได้จากกระชายดำต่อเซลล์ ATDC-5 โดยใช้วิธี MTT Assay

#### 3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

##### ตารางที่ 3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์	ข้อมูลจำเพาะ บริษัทและประเทศที่ผลิต
2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid)	Sigma, สหรัฐอเมริกา
2,2-Diphenyl-Picrylhydrazyl (DPPH)	Sigma, สหรัฐอเมริกา
3(4,5-dimethyl-thiazole-2-yl)2,5-Diphenyl tetrazolium bromide	Sigma, สหรัฐอเมริกา
Absolute ethanol	Merck, เยอรมัน
Analytical Balance	4 ตำแหน่ง Satorius, เยอรมัน
Alpha tocopherol	Sigma, สหรัฐอเมริกา
Ascorbic Acid	RCl-Labscan, ไทย
Autoclave	Tomy SX-700, ญี่ปุ่น

ตารางที่ 3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

วัสดุอุปกรณ์	ข้อมูลจำเพาะ บริษัทและประเทศที่ผลิต
Aluminum Chloride	Ajax Finechem, ไทย
Auto Multimicropipette	Schott Duran, เยอรมัน
Beaker	Schott Duran, เยอรมัน
Butylated hydroxytoluene (BHT)	Sigma, สหรัฐอเมริกา
Centrifuge	Labortechnik, เยอรมัน
Cylinder	Schott Duran, เยอรมัน
Co <sub>2</sub> Incubator	Gibthai, ไทย
Dichloromethane	Merck, เยอรมัน
Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12)	Sigma-Aldrich, เยอรมัน
Erlenmeyer Flask	Schott Duran, เยอรมัน
Ethyl Acetate	Merck, เยอรมัน
Filter Papers	Whatman, สหรัฐอเมริกา
Fetal Bovine Serum	Sigma, สหรัฐอเมริกา
Folin-Ciocalteu	Merck, เยอรมัน
Hexane	Merck, เยอรมัน
Hot Air Oven	Memmert, เยอรมัน
Gallic Acid	Sigma, สหรัฐอเมริกา
Laminar Air flow	Faster, อิตาลี
L-nitroarginine (L-NA)	Sigma, สหรัฐอเมริกา
Micro Pipette	Gilson, ฝรั่งเศส
Microplate Reader	Bio-TEK, สหรัฐอเมริกา
Penicillin Streptomycin	Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
Quercetin	Sigma, สหรัฐอเมริกา
Rotary Evaporator	Buchi, สวิตเซอร์แลนด์

### ตารางที่ 3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

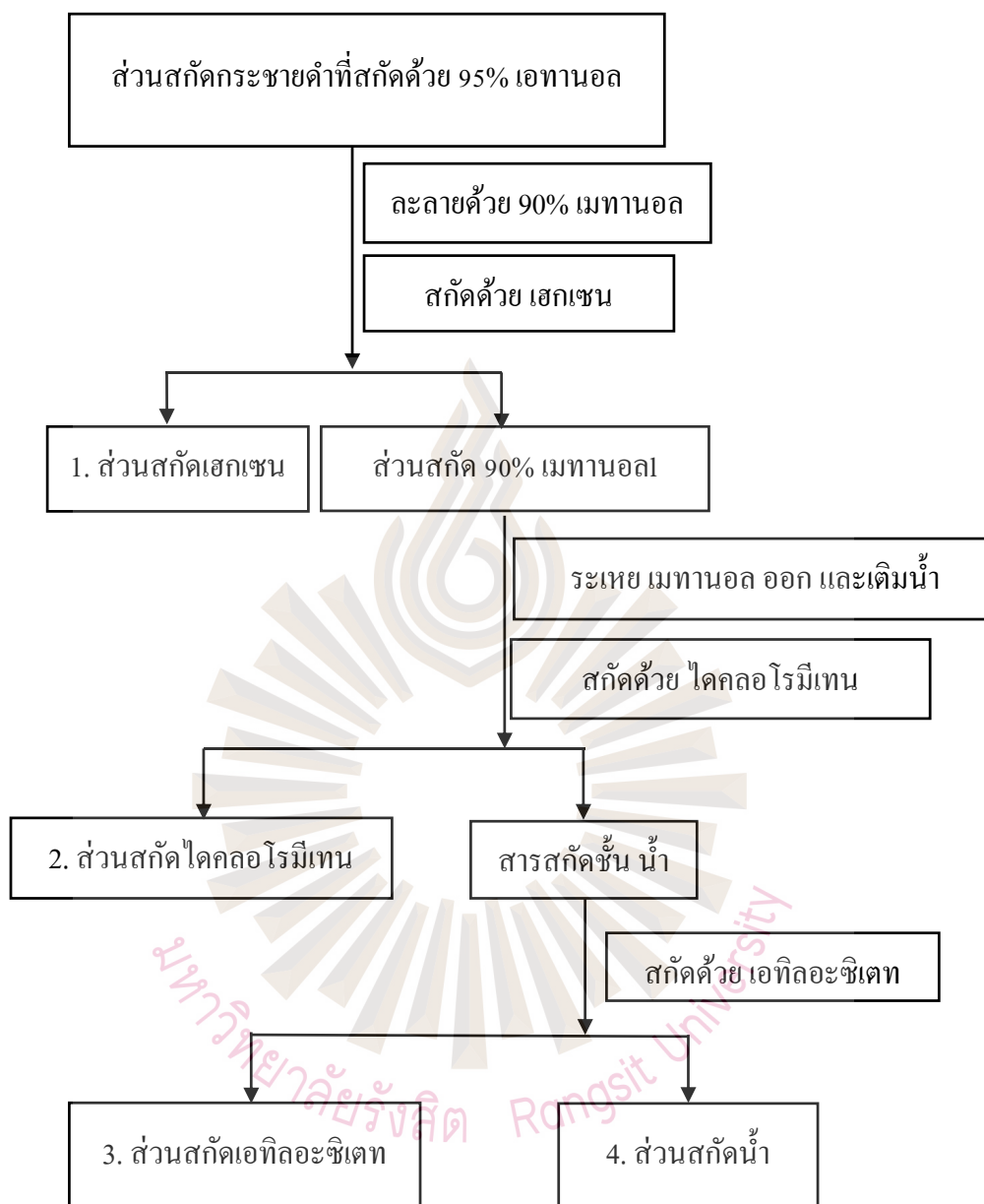
วัสดุอุปกรณ์	ข้อมูลจำเพาะ บริษัทและประเทศที่ผลิต
Round Bottom Flask	Schott Duran, เยอรมัน
Sodium Acetate	Ajax Finechem, ไทย
Sodium Carbonate	Ajax Finechem, ไทย
Water Bath	BEC THAI, WNB45, ไทย
96 Well Plate	Nunc, เดนมาร์ก

## 3.2 ระเบียบวิธีวิจัย

### 3.2.1 การเตรียมสารสกัดและการสกัดแยกสาร

นำเหง้ากระชายดำมาล้างทำความสะอาดและหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปอบที่อุณหภูมิ 50-60 °C จนแห้งสนิท นำมาบดเป็นผงหยาบด้วยเครื่องบดไฟฟ้า เก็บผงหยาบที่ได้ในภาชนะปิดสนิทเก็บในที่แห้งและเย็นเพื่อใช้ในการสกัดต่อไป

การสกัดสารและการแยกสารจะทำโดยนำผงบดหยาบมาสกัดด้วยวิธีการหมัก (Maceration) โดยนำผงกระชายดำที่ผ่านการบดหยาบแล้วใส่ไว้ในภาชนะปิด เช่น ขวดปากกว้าง ขวดรูปชมพู่หรือโอ แล้วเติม 95.0 เปอร์เซ็นต์เอทานอล (Ethanol; EtOH) อัตราส่วน 1 กิโลกรัมต่อตัวทำลาย 3 ลิตร เขย่าแล้วแช่ไว้เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำมากรองเอาสารสกัดออกมาจากกากสมุนไพรให้ได้มากที่สุด นำสารละลายสมุนไพรที่ได้ไปกรองเอาเศษสมุนไพรที่ติดออกให้หมดด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 สกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง และนำสารสกัดที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้ง (Rotary Evaporator) ที่อุณหภูมิ 45 °C จากนั้นชั่งน้ำหนักสารสกัด แล้วจึงนำสารที่ได้ไปใช้ประโยชน์ต่อไป วิธีนี้มีข้อดีคือ สารสกัดจะไม่ถูกความร้อน ทำให้โอกาสในการสลายตัวของสารสกัดลดลง ข้อเสียของวิธีนี้คือ จะสิ้นเปลืองตัวทำลาย (รัตนิน อินทรานุปกรณ์, 2547) นำสารสกัดหยาบ 95% เอทานอลมาสกัดแยกส่วนโดยวิธีการสกัดของเหลวด้วยของเหลว (Liquid-Liquid Extraction) ตัวทำลายที่ใช้คือ เฮกเซน (Hexane) ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) เอทิลอะซิเตท (Ethyl Acetate) และน้ำ (H<sub>2</sub>O) (ดังแสดงในรูปที่ 3.1)



รูปที่ 3.1 แผนผังแสดงการสกัดและแยกสารสกัดของเหง้ากระชายดำ

ที่มา : ผู้วิจัย, 2563

### 3.2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.2.2.1 การทดสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-Diphenyl-Picrylhydrazyl (DPPH) เป็นหนึ่งในวิธีการที่ใช้กันอย่างกว้างขวางสำหรับการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพืชเนื่องจากเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวกและรวดเร็ว มากกว่านั้นยังเป็นวิธีที่มี

ความเสถียรสูงมาก ซึ่งวิธีนี้เป็นการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารทดสอบในการกำจัดอนุมูล DPPH ซึ่ง DPPH เป็นอนุมูลอิสระไนโตรเจนที่มีความคงตัวมากและมีสีม่วงเมื่อละลายอยู่ในเอทานอล โดย DPPH จะทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระในระยะเวลาที่กำหนดและทำให้สีม่วงจางลงจนเป็นสีเหลือง (แสดงดังรูปที่ 3.2) สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ซึ่งจะแปรผันกับความเข้มข้นของ DPPH ดังนั้นการลดลงของความเข้มข้นของ DPPH บ่งบอกถึงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระ การแสดงผลการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารทดสอบนิยมนำเป็นค่า  $IC_{50}$  ซึ่งหมายถึง ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลง 50% โดยสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารทดสอบกับค่าการดูดกลืนแสงแล้วหาค่า  $IC_{50}$  ในการคำนวณความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระจะเปรียบเทียบค่าของสารทดสอบกับสารมาตรฐาน (Kopjar, Pilizota, Hribar, & Simcic, 2009)

การทดสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ด้วย DPPH โดยเตรียมอนุมูลอิสระ DPPH ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ด้วยตัวทำละลายเอทานอล ทำการเจือจางอนุมูลอิสระ DPPH ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ  $0.7 \pm 0.03$  นาโนเมตร จากนั้นจึงเตรียมสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ใช้ Butylated Hydroxytoluene (BHT) วิตามินซี หรือ แอสคอร์บิก เอซิด (Ascorbic Acid) วิตามินอี หรือ อัลฟาโทโคฟีรอล ที่ความเข้มข้น 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 และ 1.5625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งละลายอยู่ในเอทานอล และเตรียมสารสกัดกระชายดำส่วน เฮกเซน ไคคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท เอทานอล และน้ำ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งปริมาตรที่ใช้ในแต่ละกลุ่มทดสอบ (แสดงดังตารางที่ 3.2)

ตารางที่ 3.2 แสดงปริมาณที่ใช้ในแต่ละกลุ่มทดสอบเพื่อศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Assay

	Control ( $\mu\text{L}$ )	Positive control ( $\mu\text{L}$ )	Sample Blank ( $\mu\text{L}$ )	Sample ( $\mu\text{L}$ )	Positive Control Blank ( $\mu\text{L}$ )
สารสกัด สมุนไพร	-	-	100	100	-
BHT, Vitamin C, Vitamin E	-	100	-	-	100
DPPH	100	100	-	100	-
Absolute Ethanol	100	-	100	-	100

บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ด้วย Microplate Reader จากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาค่าการยับยั้งการต้านอนุมูลอิสระและสร้างกราฟระหว่างค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระกับความเข้มข้นของตัวอย่างเพื่อหาค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) โดยการทดลองครั้งนี้จะทำการทดลองซ้ำจำนวน 3 ครั้งต่อ 1 ตัวอย่าง การคำนวณ % การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH Radical มีดังนี้ (สมการที่ 3.1)

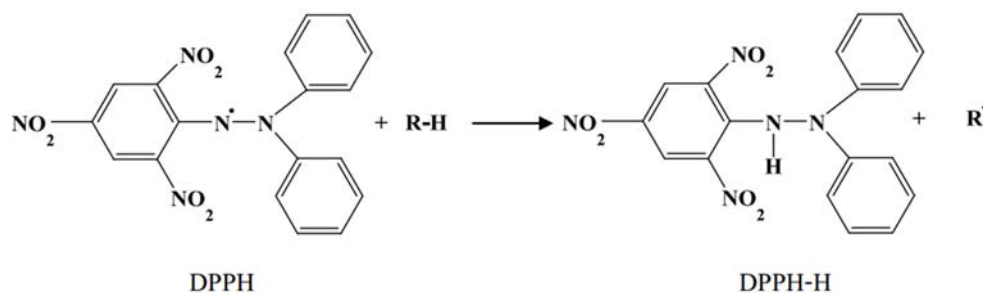
$$\% \text{Inhibition} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

โดยที่  $A_{\text{control}}$  = Absorbance of Control - Absorbance of Control Blank

$A_{\text{sample}}$  = Absorbance of Sample - Absorbance of Sample Blank

(สมการที่ 3.1)



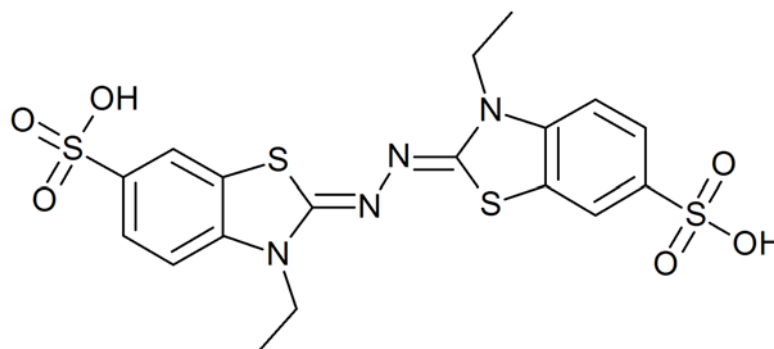


รูปที่ 3.2 แสดงปฏิกิริยาของ DPPH

ที่มา : ผู้วิจัย, 2563

3.2.2.2 การทดสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid) หรือ ABTS<sup>•+</sup> Assay

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS Radical Cation Decolorization Assay) เป็นวิธีการวัดความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS<sup>•+</sup>, 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid) Radical) (แสดงดังรูปที่ 3.3) เป็นสารสังเคราะห์ที่มีสีเขียวปนน้ำเงินสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เนื่องจากสีของ ABTS<sup>•+</sup> ปกติจะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงจึงต้องทำการเจือจาง ABTS<sup>•+</sup> ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์จากนั้นนำ ABTS<sup>•+</sup> ไปทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่ละลายด้วยเอทานอลเจือจางซึ่งจะทำให้สีจางลง (ดังสมการที่ 3.2) และตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาจึงสามารถหาความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้ จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup> ซึ่งวิธีการคำนวณและการเทียบกับสารมาตรฐาน BHT, Vitamin C, Vitamin E เช่นเดียวกับวิธี DPPH ข้อดีของวิธีการนี้คือ ABTS<sup>•+</sup> ละลายได้ดีในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์จึงทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็วและทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH กว้าง ส่วนข้อเสียคือ ABTS<sup>•+</sup> ไม่เป็นสารธรรมชาติที่พบในร่างกายหรือในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตและต้องมีการทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อนถึงจะเกิดเป็นอนุมูลอิสระ (Javanmardi, Stushnoff, Locke, & Vivaco, 2003)

รูปที่ 3.3 โครงสร้างของ ABTS<sup>•+</sup>

ที่มา : ผู้วิจัย, 2563



(สมการที่ 3.2)

การเตรียมอนุมูล ABTS<sup>•+</sup> ที่ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ในน้ำ 10 มิลลิลิตร นำมาทำปฏิกิริยากับโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต 2.45 มิลลิโมลาร์ ในน้ำ 12.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มีคเป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup> จากนั้นนำไปเจือจางด้วยเอทานอล เพื่อให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่  $0.7 \pm 0.03$  นาโนเมตร เตรียมสารมาตรฐาน Ascorbic Acid, BHT และ  $\alpha$ -tocopherol ที่ความเข้มข้น 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 และ 1.5625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งละลายอยู่ใน เอทานอล และเตรียมสารสกัดกระชายดำส่วน เฮกเซน ไคคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท เอทานอล และน้ำ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งปริมาตรที่ใช้ในแต่ละกลุ่มทดสอบ (แสดงดังตารางที่ 3.3)

ตารางที่ 3.3 แสดงปริมาณที่ใช้ในแต่ละกลุ่มทดสอบเพื่อทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS Assay

	Control ( $\mu\text{L}$ )	Positive Control ( $\mu\text{L}$ )	Sample Blank ( $\mu\text{L}$ )	Sample ( $\mu\text{L}$ )	Positive Control Blank ( $\mu\text{L}$ )
สารสกัด สมุนไพรมะขาม	-	-	100	100	-
BHT, Vitamin C, Vitamin E	-	100	-	-	100
ABTS <sup>•+</sup>	100	100	-	100	-
Absolute Ethanol	100	-	100	-	100

บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 45 นาที จากนั้นจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ Scavenging Activity และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรมะขาม เพื่อหาค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup> ที่ 50% (IC<sub>50</sub>) โดยการทดลองครั้งนี้จะทำการทดลองซ้ำจำนวน 3 ครั้งต่อ 1 ตัวอย่าง การคำนวณ % การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup> Radical ดังนี้ (สมการที่ 3.3)

$$\% \text{Inhibition} = [(A \text{ control} - A \text{ sample}) / A \text{ control}] \times 100$$

โดยที่ A control= Absorbance of control - Absorbance of control blank

A sample= Absorbance of sample - Absorbance of sample blank

(สมการที่ 3.3)

### 3.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminum Chloride Colorimetric Assay

การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัด (TFC) โดยใช้วิธี Aluminum Chloride Colorimetric Method อาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง Aluminum Chloride (AlCl<sub>3</sub>) จับกับหมู่ Ketone และ Hydroxyl ของสารฟลาโวนอยด์ ทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีเหลืองในสถานะที่เป็นกรด การศึกษาครั้งนี้ใช้ Quercetin เตรียมเป็นสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 50-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียมสารตัวอย่างที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดูดสารตัวอย่างจำนวน 200 ไมโครลิตร เติมน้ำละลาย 10% AlCl<sub>3</sub> จำนวน 40 ไมโครลิตร ตามด้วย

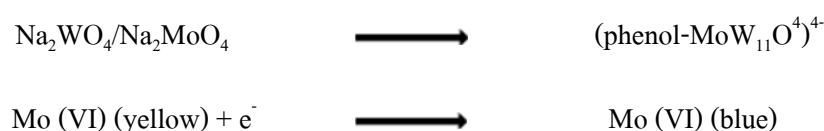
95% Ethanol จำนวน 600 ไมโครลิตร และสารละลาย 1M Sodium Acetate จำนวน 40 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 40 นาที นำค่าไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader คำนวณหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม (TFC) เทียบกับ กราฟมาตรฐาน Quercetin รายงานผลในหน่วย mgE ของ Quercetin ต่อ g ของสารสกัดหยาบ (mg Quercetin Equivalent (QE)/g of Crude Extract) ซึ่งปริมาณที่ใช้ในแต่ละกลุ่มทดสอบ (แสดงดัง ตารางที่ 3.4)

ตารางที่ 3.4 แสดงปริมาณที่ใช้ในแต่ละกลุ่มทดสอบเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบ ฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminum Chloride Colorimetric Assay

	Positive Control ( $\mu\text{L}$ )	Sample Blank ( $\mu\text{L}$ )	Sample ( $\mu\text{L}$ )
สารสกัดสมุนไพร	-	-	200
Quercetin	200	-	-
10% $\text{AlCl}_3$	40	40	40
95% Ethanol	600	800	600
1M Sodium Acetate	40	40	40

### 3.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu Assay

การหาปริมาณฟีนอลิกรวม (PTC) ด้วยวิธี Folin Ciocalteu อาศัยการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของสารประกอบฟีนอลิกในการเปลี่ยนแปลงสารละลาย Folin-Ciocalteu ที่มีสีเหลืองในสถานะที่เป็นค่าให้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน ซึ่งจะสามารถวิเคราะห์ปริมาณได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของสีเกิดจากปฏิกิริยาของไอออน Mo (VI) สีเหลือง เมื่อมีการรับอิเล็กตรอนจากสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็น Mo (VI) จากสีเหลือง กลายเป็นสีน้ำเงินดังสมการปฏิกิริยาต่อไปนี้ (สมการที่ 3.4)



(สมการที่ 3.4)

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสามารถทำได้โดยใช้กรดแกลลิก (Gallic Acid) เป็นสารมาตรฐานที่ช่วงความเข้มข้น 50-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมสารตัวอย่างที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คูดสารตัวอย่างจำนวน 100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย 10% v/v Folin-Ciocalteu จำนวน 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลาย 0.7 M Sodium Carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) จำนวน 800 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มีอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader คำนวณหาปริมาณสารฟีนอลิกรวม (TPC) เทียบกับกราฟมาตรฐาน Gallic Acid รายงานผลในหน่วย mgE ของ Gallic Acid ต่อ g ของสารสกัดหยาบ (mg Gallic Acid Equivalent (GAE)/g of Crude Extract) ซึ่งปริมาตรที่ใช้ในแต่ละกลุ่มทดสอบ (แสดงดังตารางที่ 3.5)

ตารางที่ 3.5 แสดงปริมาตรที่ใช้ในแต่ละกลุ่มทดสอบเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิก ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu Assay

	Positive Control ( $\mu\text{L}$ )	Sample Blank ( $\mu\text{L}$ )	Sample ( $\mu\text{L}$ )
สารสกัดสมุนไพร	-	100	-
Gallic Acid	100	-	-
95% EtOH	-	-	100
Folin-Ciocalteu	200	200	200
0.1 M $\text{Na}_2\text{CO}_3$	800	800	800

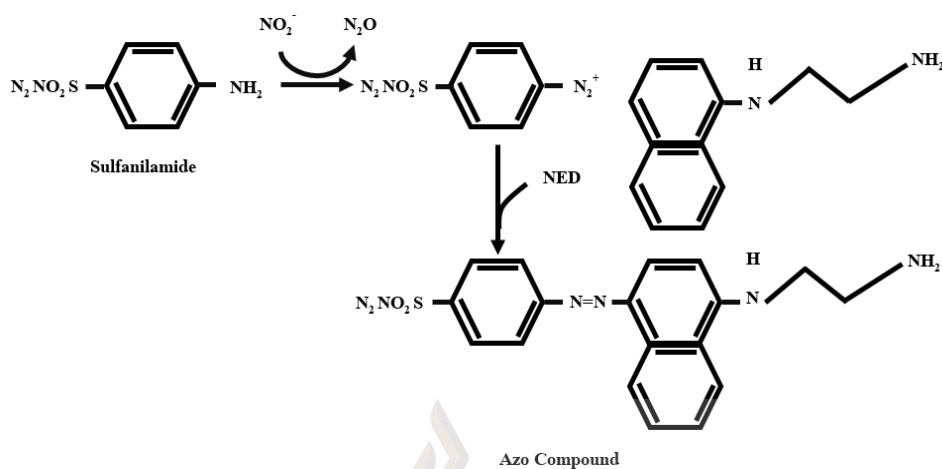
### 3.2.5 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์

ATDC-5 Mouse Chondrogenic Cell จะถูกเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ  $-80^\circ\text{C}$  เมื่อนำเซลล์มาทดสอบจะละลายที่อุณหภูมิ  $37^\circ\text{C}$  จากนั้นนำเซลล์ไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ 1,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที และคูดสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์ที่แยกออกทิ้งแล้วนำไปเลี้ยงใน Culture Flask โดยเฉพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงชนิด DMEM/Ham's F-12 ซึ่งในอาหารจะมีส่วนประกอบของ 5% Fetal Bovine Serum, Human Transferrin  $3 \times 10^{-8}$  M, Penicillin 50 unit/ml และ Streptomycin 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร Human Transferrin,  $3 \times 10^{-8}$  Sodium Selenite จากนั้นนำไปเก็บไว้ในตู้  $\text{CO}_2$  Incubator ที่มีปริมาณ  $\text{CO}_2$  อยู่ที่ 5% อุณหภูมิ  $37^\circ\text{C}$  และ Subcultured ทุก 2 วัน รอจนได้ปริมาณเซลล์หนาแน่นเต็มที่ เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนสกัด การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยยับยั้งการสร้าง NO ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย LPS ที่ได้มาจาก

ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย *Escherichia coli* (055: B5) ให้เกิดการสร้าง NO โดยมีขั้นตอนการศึกษา โดยย่อ ดังนี้ เลี้ยงเซลล์ความเข้มข้น 80,000 cells/well ในอาหาร DMEM/Ham's F-12 ที่ไม่มี FBS 500 มิลลิลิตร ใน 24 Well Plate แล้วบ่มเซลล์ในตู้ CO<sub>2</sub> Incubator ที่มีปริมาณ CO<sub>2</sub> อยู่ 5% อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ว Pretreat เซลล์ด้วยสารสกัดและส่วนสกัดเป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วกระตุ้นด้วย 250 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร LPS ในอาหารปกติปริมาณ 500 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม จากนั้นเติมตัวอย่างทดสอบลงไป 500 ไมโครลิตร และบ่มเซลล์ในตู้ CO<sub>2</sub> Incubator ที่มีปริมาณ CO<sub>2</sub> อยู่ 5% อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายแต่ละหลุมมา 100 ไมโครลิตร ใส่ใน 96 Well Plate แล้วเติม Griess Reagent ลงในแต่ละหลุมอีก 100 ไมโครลิตร จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยา Griess Reaction ตรวจวัดปริมาณ NO ที่เซลล์สร้างขึ้นที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณค่ายับยั้งการสร้าง NO และสร้างกราฟระหว่างค่ายับยั้งการสร้าง NO กับความเข้มข้นของตัวอย่าง เพื่อหาค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถยับยั้ง NO ที่ 50% (IC<sub>50</sub>) โดยการทดลองนี้จะทำการทดลองซ้ำจำนวน 3 ครั้งต่อ 1 ตัวอย่าง โดยสารมาตรฐานที่ใช้ คือ L-NA การคำนวณ % การยับยั้งการสร้าง NO

\*หมายเหตุ ปฏิกิริยา Griess เป็นวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของปริมาณไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ไนไตรท์เป็นผลผลิตที่เกิดจากการออกซิเดชันของไนตริกออกไซด์ ซึ่งถูกผลิตขึ้นมาจากเอนไซม์ iNOS

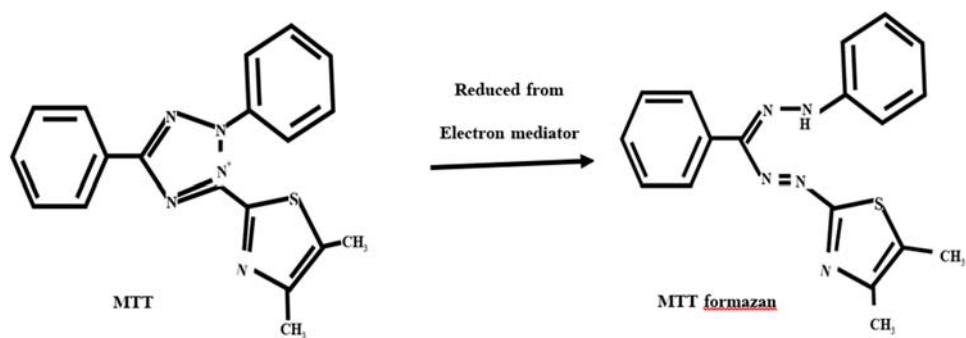
การวัดปริมาณของไนตริกออกไซด์ ที่หลั่งออกมาโดยจะวัดในรูปของไนไตรท์ (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) เนื่องจาก ไนตริกออกไซด์ ที่หลั่งออกมาจะทำปฏิกิริยากับออกซิเจน ได้เป็น Dinitrogen tetraoxide และเมื่อปฏิกิริยาต่อกับน้ำจะได้ผลิตภัณฑ์คือ ไนเตรท (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) และไนไตรท์ (แสดงดังรูปที่ 3.4) และในการทดลองเพื่อวัดปริมาณไนตริกออกไซด์ จะวัดในรูปของไนไตรท์ ซึ่งไนไตรท์ จะทำปฏิกิริยากับ Sulfanilamide ในสารละลายที่เป็นกรดได้เป็นสารตัวกลางที่เป็นเกลือ Diazonium ซึ่งสารตัวกลางนี้จะทำปฏิกิริยา N-(1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (NED) ได้ผลิตภัณฑ์เป็น Azo Compound ที่มีสีทำให้สามารถวัดปริมาณไนไตรท์ที่มีอยู่ โดยวัดการดูดกลืนของแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm (TIAWTRAGUL & Choosakoonkriang, 2019)



รูปที่ 3.4 แสดงสมการปฏิกิริยาของ NO ในการสลายตัวได้เป็น NO-3 และ NO-2 และปฏิกิริยาในการวัดปริมาณของ NO โดยใช้ Griess Reaction  
ที่มา : ผู้วิจัย, 2563

### 3.2.6 การทดสอบความเป็นพิษ

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ATDC-5 Mouse Chondrogenic Cell โดยใช้วิธี 3-(4,5-Dimethyl thiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Assay ซึ่งหลักการศึกษาคือจะอาศัยเอนไซม์ภายในไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) ของเซลล์ที่มีชีวิตวัด MTT ที่เป็นสารสีเหลืองให้เป็นผลึก Formazan สีม่วง (ดังแสดงในรูปที่ 3.5) หลังจากทดสอบสารตัวอย่างกับเซลล์ในตู้ CO<sub>2</sub> Incubator ที่มีปริมาณ CO<sub>2</sub> อยู่ 5% อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย MTT (10 ไมโครลิตร, 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ลงไปในแต่ละหลุมแล้วบ่มต่อใน CO<sub>2</sub> Incubator ที่มีปริมาณ CO<sub>2</sub> อยู่ 5% ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายทิ้งไป แล้วเติมตัวทำละลายผลึก 100 ไมโครลิตร (เตรียมจาก 10g SDS+83.7 ไมโครลิตร HCl ปรับปริมาตรเป็น 100 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่น) เพื่อละลายผลึก Formazan แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ด้วย Microplate Reader โดยสารที่ทดสอบจะถือว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อค่าร้อยละการรอดชีวิตน้อยกว่า 80% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม)



รูปที่ 3.5 แสดงโครงสร้างของ MTT และหลักการของ MTT Colorimetric Assay

ที่มา : ผู้วิจัย, 2563





## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### 4.1 การสกัดสารออกฤทธิ์จากเหง้ากระชายดำ

เหง้ากระชายดำน้ำหนัก 1011.84 g ทำการสกัดโดยวิธีการหมักด้วยตัวทำละลาย 95% เอทานอล แล้วนำไปกรองและระเหยตัวทำละลายออกจนแห้ง ได้น้ำหนักสารสกัดหยาบเท่ากับ 72.83 g ซึ่งคิดเป็นร้อยละผลผลิตเท่ากับ 7.20 และนำสารที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 95% เอทานอล ปริมาณ 50.27 g มาสกัดแยกโดยวิธีของเหลวสกัดด้วยของเหลวด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไคคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และน้ำ จะได้น้ำหนักส่วนสกัดในแต่ละส่วนคิดเป็นร้อยละผลผลิตเท่ากับ 0.4, 4.16, 0.07 และ 0.32 ตามลำดับ

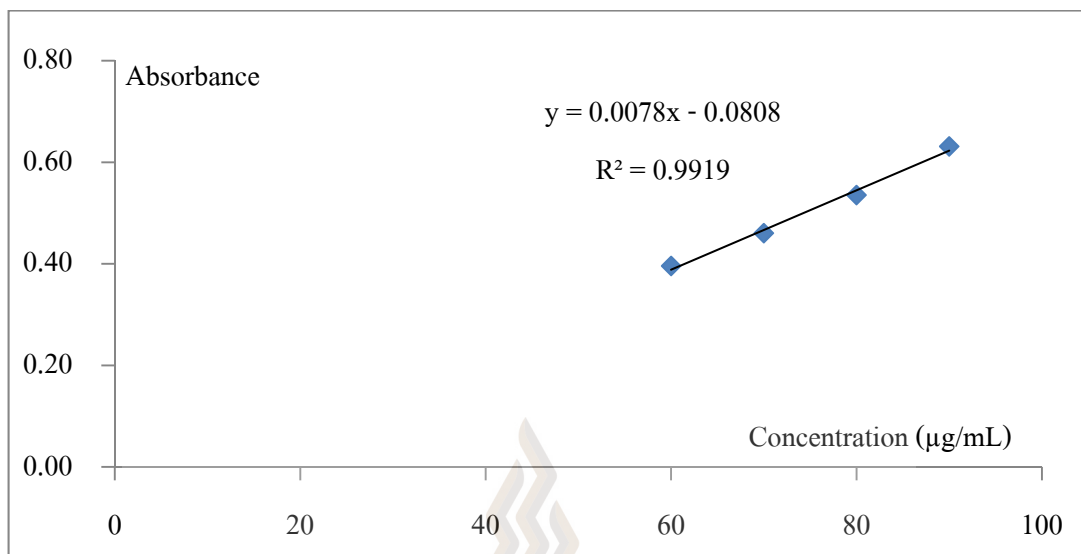
ตารางที่ 4.1 ปริมาณสารสกัดและส่วนสกัดเหง้ากระชายดำแต่ละตัวทำละลาย

ตัวทำละลาย	น้ำหนักสารสกัด (g)	% yield
สารสกัด 95% เอทานอล	22.56	2.22
ส่วนสกัด เฮกเซน	4.1	0.4
ส่วนสกัด ไคคลอโรมีเทน	42.19	4.16
ส่วนสกัด เอทิลอะซิเตท	0.71	0.07
ส่วนสกัด น้ำ	3.27	0.32

## 4.2 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content) ของ สารสกัดและส่วนสกัดกระชายดำ

ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดที่ได้จากพืชจำเป็นต้องมีการตรวจสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เพื่อยืนยันว่าสารสกัดที่นำมาทำการทดสอบฤทธิ์นั้น มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงที่สุด เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกที่พบในธรรมชาตินั้นมีหลายชนิด และแต่ละชนิดมีสูตรโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน ตั้งแต่กลุ่มที่มีโครงสร้างอย่างง่าย เช่น กรดฟีนอลิก รวมไปจนถึงกลุ่มที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ เช่น ลิกนิน (Lignin) และที่พบกลุ่มใหญ่ที่สุดคือ สารประกอบฟลาโวนอยด์ ซึ่งพืชชนิดใดก็ตามที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงก็จะแสดงความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดี (Saenthaweesuk et al., 2012) จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ในส่วนสกัดของแต่ละตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ โดยวิธี Folin-Ciocateu Reagent และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (Standard Curve) กรดแกลลิก (Gallic Acid, GAE) จากสมการถดถอยเชิงเส้น (Linear Regression) ของกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก สามารถคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกรวมสมมูลกับกรดแกลลิกได้จากกราฟสมการสมการความชันคือ  $y = 0.008x - 0.0287$  มีค่า  $R^2 = 0.9919$  (รูปที่ 4.1)

จากตารางที่ 4.1 พบว่าส่วนสกัดเอทิลอะซิเตท มีปริมาณฟีนอลิกสูงสุด เท่ากับ 585.55 mg GEA/g ext รองลงมาคือส่วนสกัด น้ำ 95% เอทานอล ไดคลอโรมีเทน และเฮกเซน ซึ่งมีปริมาณฟีนอลิกรวม เท่ากับ 516.11, 256.06, 188.54 และ 97.62 mg GEA/g ext ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2) ทั้งนี้ เนื่องจาก เอทิลอะซิเตท เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ขั้วสูงจึงสามารถสกัดหรือละลายสารสำคัญกลุ่ม Phenolic ได้ดี



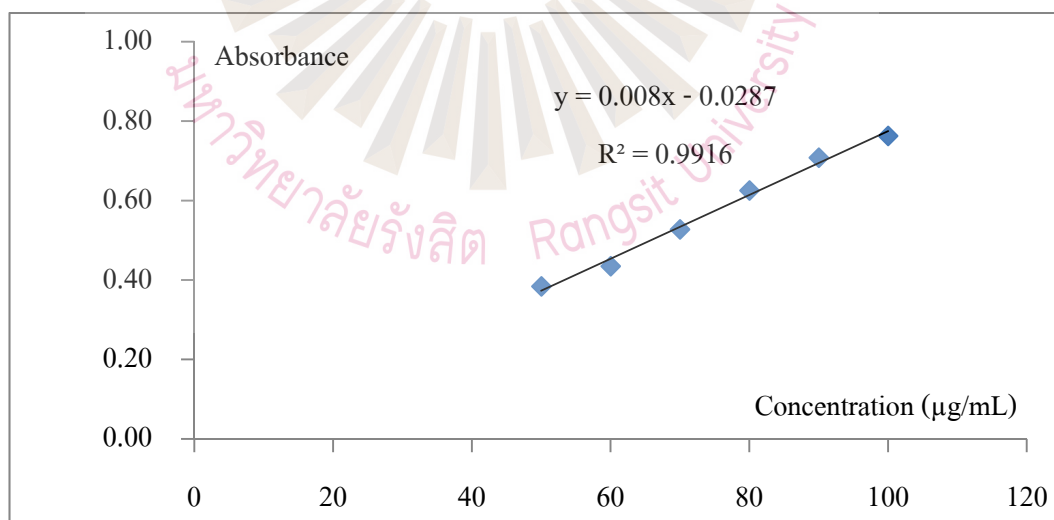
รูปที่ 4.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Gallic Acid

ตารางที่ 4.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content) ของสารสกัดและส่วนสกัดกระชายดำ

ตัวอย่างทดสอบ	ปริมาณฟีนอลิกรวม (mg GEA/g ext)
สารสกัด 95% เอทานอล	256.06
ส่วนสกัด เฮกเซน	97.62
ส่วนสกัด ไดคลอโรมีเทน	188.54
ส่วนสกัด เอทิลอะซิเตท	585.55
ส่วนสกัด น้ำ	516.11

#### 4.3 ผลการศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoid Content) ของสารสกัดและ ส่วนสกัดกระชายดำ

จากการวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ในส่วนสกัดกระชายดำด้วยตัวทำละลาย อินทรีย์ชนิดต่าง ๆ โดยคำนวณจากสมการถดถอยเชิงเส้นของกราฟมาตรฐาน Quercetin จะได้กราฟ ที่มีสมการความชัน  $y = 0.008x - 0.0287$  ที่มีค่า  $R^2 = 0.9916$  (รูปที่ 4.2) พบว่าส่วนสกัดเฮกเซน มี Total Flavonoid Content สูงที่สุดเท่ากับ 689.19 mg QE/g ext รองลงมาคือส่วนสกัด 95% เอทานอล ไคคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และน้ำ ซึ่งมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวม เท่ากับ 527.94, 520.85, 410.02 และ 169.81 mg QE/g ext ตามลำดับ(ตารางที่ 4.3) สอดคล้องกับการจากศึกษาของ บังอร ศรีพานิช กุลชัย และคณะ (2548) ได้ศึกษาการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ปริมาณสารสำคัญ โดยเทคนิคโครมาโทกราฟี และการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนสกัดกระชายดำ โดยสกัดสาร จากกระชายดำ ด้วยวิธีกลั่นอย่างต่อเนื่อง พบว่าในส่วนสกัดเฮกเซนมีปริมาณ ฟลาโวนอยด์มากที่สุด คือ 467.65 มิลลิกรัมต่อกรัม รองลงมาคือ สารสกัดด้วยเอทานอลและน้ำ เท่ากับ 303.40 และ 7.85 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ



รูปที่ 4.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและ

ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Quercetin

ตารางที่ 4.3 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoid Content) ของสารสกัดและส่วนสกัด  
กระชายดำ

ตัวอย่างทดสอบ	ปริมาณ Flavonoids รวม (mg QE/g ext)
สารสกัด 95% เอทานอล	527.94
ส่วนสกัด เฮกเซน	689.19
ส่วนสกัด ไดคลอโรมีเทน	520.85
ส่วนสกัด เอทิลอะซิเตท	410.02
ส่วนสกัด น้ำ	169.81

#### 4.4 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดและส่วนสกัดกระชายดำ

การทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในครั้งนี้ ได้เลือกวิธีการทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ด้วย 2 วิธี คือ การต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS<sup>•+</sup> ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก และ รวดเร็ว เนื่องจากเป็นอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างเสถียร ซึ่งผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดกระชายดำที่สกัดด้วย 95% เอทานอล พบว่ามีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 288.43 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มากกว่านั้นส่วนที่สกัดแยกจากสารสกัดกระชายดำ 95% เอทานอล พบว่าส่วนสกัด เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และน้ำ มีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ >2500, 476.8, 19.6, 62.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งสารสกัดและส่วนสกัดกระชายดำนี้มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ดีเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน คือ Ascorbic Acid, BHT และ  $\alpha$ -tocopherol ซึ่งมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 8.74, 30.75 และ 16.06 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าส่วนสกัด เอทิลอะซิเตท ที่แยกสกัดได้ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีกว่าสารมาตรฐาน BHT แต่มีฤทธิ์น้อยกว่าสารมาตรฐาน Ascorbic Acid และ  $\alpha$ -tocopherol ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกของส่วนสกัดกระชายดำที่พบว่า ในส่วนสกัด เอทิลอะซิเตท มีปริมาณกลุ่มฟีนอลิกสูงสุด

ตารางที่ 4.4 แสดงผลฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดและส่วนสกัดกระชายดำ

ตัวอย่างทดสอบ	ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ( $\mu\text{g/mL}$ )						IC 50 ( $\mu\text{g/mL}$ )
สารสกัด 95% เอทานอล	15.62	31.25	62.5	125	250	500	
	11.2 $\pm$ 1.2	14.3 $\pm$ 1.8	20.0 $\pm$ 1.9	34.0 $\pm$ 3.3	47.8 $\pm$ 2.9	75.1 $\pm$ 2.0	288.4
ส่วนสกัด เสกเซน	78.12	156.25	312.5	625	1250	2500	
	9.5 $\pm$ 3.2	8.8 $\pm$ 4.9	11.6 $\pm$ 1.1	19.9 $\pm$ 1.9	26.3 $\pm$ 4.9	46.4 $\pm$ 0.8	>2500
ส่วนสกัด ไคคโลโรมีเทน	15.62	31.25	62.5	125	250	500	
	10.2 $\pm$ 0.6	10.5 $\pm$ 0.5	13.7 $\pm$ 0.8	19.0 $\pm$ 1.3	32.6 $\pm$ 0.5	51.0 $\pm$ 2.7	476.8
ส่วนสกัด เอทิลอะซิเตท	1.56	3.12	6.25	12.5	25	50	
	14.12 $\pm$ 4.2	18.01 $\pm$ 4.3	28.78 $\pm$ 2.2	46.70 $\pm$ 4.2	72.40 $\pm$ 7.4	89.50 $\pm$ 1.4	19.6*
ส่วนสกัด น้ำ	3.12	6.25	12.5	25	50	100	
	12.67 $\pm$ 1.6	13.67 $\pm$ 0.6	18.91 $\pm$ 0.4	31.58 $\pm$ 3.4	46.97 $\pm$ 3.3	70.05 $\pm$ 1.7	62.1
BHT	3.12	6.25	12.5	25	50	100	
	16.47 $\pm$ 4.8	23.35 $\pm$ 6.2	34.48 $\pm$ 6.3	48.69 $\pm$ 5.1	66.06 $\pm$ 5.7	79.91 $\pm$ 3.8	30.7
Ascorbic Acid	3.12	6.25	12.5	25	50	100	
	21.99 $\pm$ 6.5	41.72 $\pm$ 13.1	81.63 $\pm$ 10.6	90.95 $\pm$ 3.2	94.93 $\pm$ 0.9	94.75 $\pm$ 2.6	8.74
$\alpha$ -tocopherol	3.12	6.25	12.5	25	50	100	
	16.83 $\pm$ 0.7	22.35 $\pm$ 0.3	39.37 $\pm$ 2.9	74.66 $\pm$ 3.7	85.52 $\pm$ 1.6	83.89 $\pm$ 4.9	16.07

ค่า% การยับยั้งของตัวอย่างทดสอบแสดงในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  S.E.M. (n เท่ากับ 4)

#### 4.5 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS<sup>+</sup> ของสารสกัดและส่วนสกัดกระชายดำ

การทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยใช้อนุมูลอิสระ ABTS<sup>+</sup> ผลการทดสอบของสารสกัดกระชายดำที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 95% เอทานอล พบว่ามีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 33.740 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มากกว่านั้นส่วนที่สกัดแยกจากสารสกัดกระชายดำ 95% เอทานอล พบว่าส่วนสกัด เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และน้ำ ซึ่งมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 108.93, 44.20, 3.11, 8.54 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งพบว่าส่วนสกัดเอทิลอะซิเตท จากกระชายดำ นี้ มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS<sup>+</sup> ที่ดีเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน คือ Ascorbic Acid, BHT และ  $\alpha$ -tocopherol พบว่ามีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 5.65, 6.87 และ 12.88 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทที่แยกสกัดได้ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS<sup>+</sup> ดีกว่าสารมาตรฐาน BHT, Ascorbic Acid และ  $\alpha$ -tocopherol ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลปริมาณ สารกลุ่มฟีนอลิกของส่วนสกัดกระชายดำที่พบว่าในส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทมีปริมาณกลุ่มฟีนอลิก สูงสุด สันนิษฐานได้ว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ DPPH และ ABTS<sup>+</sup> น่าเกิดจากสารประกอบกลุ่ม ฟีนอลิก การศึกษาในครั้งนี้มีความสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ ปริญญา 2551 พบว่าสารสกัด เร่วหอม ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับกระชาย ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และน้ำ ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดแต่ละตัวทำละลายดังกล่าว พบว่าส่วนสกัด เอทิลอะซิเตท มีค่า IC<sub>50</sub> ดีที่สุด เท่ากับ 53.30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือส่วนสกัดน้ำ มีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 353.54 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และส่วนสกัดเฮกเซนมีค่า IC<sub>50</sub> > 800 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร

ตารางที่ 4.5 แสดงผลฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup> ของสารสกัดและส่วนสกัดกระชายดำ

ตัวอย่างทดสอบ	ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS <sup>•+</sup> ของตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (µg/mL)						IC 50 (µg/mL)
สารสกัด 95% เอทานอล	1.56	3.13	6.25	12.50	25.00	50.00	
	32.89±3.7	20.79±4.7	19.67±3.6	29.94±3.9	39.91±4.6	67.16±3.4	33.74
ส่วนสกัด เฮกเซน	7.81	15.63	31.25	62.50	125	250	
	26.89±1.97	25.78±9.51	28.62±5.19	38.79±5.53	53.94±4.68	62.48±14.13	108.93
ส่วนสกัด ไดคลอโรมีเทน	3.13	6.25	12.50	25	50	100	
	31.47±2.61	21.71±3.99	23.84±5.59	35.54±2.82	54.55±8.88	79.05±8.53	44.20
ส่วนสกัด เอทิลอะซิเตท	0.16	0.31	0.63	1.25	2.5	5	
	26.79±0.94	21.20±4.15	18.66±7.56	30.45±6.86	51.09±0.49	66.95±5.07	3.11*
ส่วนสกัด น้ำ	0.16	0.31	0.63	1.25	2.5	5	
	23.34±1.63	18.96±1.05	15.40±4.60	18.76±6.32	24.35±4.66	34.52±4.62	8.54
BHT	0.94	1.88	3.75	7.50	15.00	30.00	
	14.59±6.0	18.45±5.9	29.13±2.4	54.65±5.2	77.02±4.4	92.48±19.9	6.87
Ascorbic Acid	1.25	2.5	5	10	20	40	
	16.32±2.3	35.33±6.2	46.21±1.0	77.12±14.0	93.70±25.5	98.78±8.2	5.65
α-tocopherol	1.25	2.5	5	10	20	40	
	15.71±5.6	16.73±4.5	25.57±7.3	44.69±8.9	70.11±13.8	87.60±4.4	12.88

ค่า% การยับยั้งของตัวอย่างทดสอบแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± S.E.M. (n เท่ากับ 4)



#### 4.6 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง NO ของสารสกัดและส่วนสกัดกระชายดำ

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง NO ของส่วนสกัดเหง้ากระชายดำ แสดงให้เห็นว่าสารสกัด 95% เอทานอล มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง NO ได้ค่อนข้างดี โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 24.97 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อสกัดแยกส่วนจากสารสกัด 95% เอทานอลของเหง้ากระชายดำด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และน้ำ พบว่าส่วนสกัดเฮกเซน มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 38.32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ >50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตท มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 30.55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และส่วนสกัดน้ำ มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ >50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัด 95% เอทานอล และส่วนสกัดต่าง ๆ พบว่าสารสกัด 95% เอทานอล มีฤทธิ์มากกว่าเมื่อเทียบกับ L-NA (ตารางที่ 4.6) ซึ่งเป็นสารมาตรฐานที่มีกลไกยับยั้งกระบวนการอักเสบภายในเซลล์โดยการยับยั้ง iNOS ทำให้การหลั่ง NO ลดลง ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าสารสกัดและส่วนสกัดอาจมีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบโดยผ่านกลไกการแสดงออกของยีน iNOS หรืออาจมีผลยับยั้งกลไกอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดการอักเสบภายในเซลล์ ซึ่งจำเป็นต้องศึกษาต่อไปในอนาคต ถึงแม้ว่าผลการทดสอบในครั้งนี้จะให้ผลยับยั้งการสร้าง NO ใน ATDC-5 mouse Chondrogenic Cell ซึ่งเป็นเซลล์จากหนู แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงผลต่อ Chondrogenic Cell ที่แยกได้จากกระดูกข้อเข่าของมนุษย์ซึ่งอาจให้ผลที่เหมือนหรือแตกต่างออกไป จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจในการศึกษาในอนาคต งานวิจัยนี้มีความสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Tewtrakul and Subhadhirasakul ในปี 2008 และ 2009 ที่ศึกษาฤทธิ์ของสารสำคัญ 5-hydroxy-3, 7, 3', 4' tetramethoxyflavone จากกระชายดำ พบว่าสามารถยับยั้งการสร้าง PGE2 และ TNF- $\alpha$  ในเซลล์ RAW264.7 ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 16.3 และ > 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่าสารสกัดจากกระชายดำสกัดด้วย 95% เอทานอล สามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ ได้สูงที่สุดมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 7.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีรายงานถึงฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบของกระชายดำในปี 2014 โดย Horigome และคณะ ได้ทำการแยกสาร 5,7-Dimethoxyflavone (DMF), 5-Hydroxy-3,7,3',4'-tetramethoxyflavone (TMF), 3,5,7-Trimethoxyflavone, 5-Hydroxy-7,4'-dimethoxyflavone, 3,5,7,4'-tetramethoxyflavone พบว่ามีฤทธิ์ด้านการอักเสบใน Rat Basophilic Leukemia (RBL-2H3) Cells ผ่านการกระตุ้น IgE antigen หรือผ่านทาง Calcium Ionophore นอกจากนี้มีข้อมูลการวิจัยทางคลินิกของ สุภรัตน์ ชาลี และคณะในปี 2553 พบว่าครีมที่เตรียมจากกระชายดำสามารถลดอาการอักเสบใน

อาสาสมัครได้ ผู้วิจัยจึงสรุปว่ากระชายดำเป็นสมุนไพรตัวหนึ่งที่มีศักยภาพในการต้านการอักเสบจึงควรพัฒนาต่อยอดเพื่อใช้เป็นยาต่อไปในอนาคต

#### 4.7 ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ ATDC-5 โดย MTT assay

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ATDC-5 โดย MTT assay เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability) ของสารสกัดกระชายดำด้วย 95% เอทานอล และส่วนที่แยกได้จากตัวทำละลาย เฮกเซน ไคคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และน้ำ ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15, 25, 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น 48 ชั่วโมง พบว่าที่ความเข้มข้นสูงสุด 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความปลอดภัยต่อเซลล์คือไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตไม่น้อยกว่า 80) ที่ใช้ทดสอบ แต่อย่างไรก็ตามการใช้สารสกัดหรือส่วนสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบที่สูงกว่าความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบอาจก่อให้เกิดความเป็นพิษหรือไม่ก็ได้ ดังนั้นจึงควรทำการศึกษาถึงความปลอดภัยที่ความเข้มข้นสูงขึ้น (แสดงผลดังตารางที่ 4.7)



ตารางที่ 4.6 แสดงผลการยับยั้งการสร้าง NO ใน ATDC-5 cells ของสารสกัดและส่วนสกัดกระชายดำ

ตัวอย่างทดสอบ	% การยับยั้งการสร้าง NO ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>a</sup>					IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
	5	10	15	25	50	
สารสกัด 95% เอทานอล	-	24.67 $\pm$ 0.046	56.21 $\pm$ 1.155	59.21 $\pm$ 1.689	79.35 $\pm$ 1.484	24.97*
ส่วนสกัด เฮกเซน	-	-	22.75 $\pm$ 0.037	46.08 $\pm$ 0.019	58.32 $\pm$ 0.039	38.32
ส่วนสกัด ไดคลอโรมีเทน	-	-	21.41 $\pm$ 0.032	36.14 $\pm$ 0.027	40.53 $\pm$ 0.125	>50
ส่วนสกัด เอทิลอะซิเตท	-	-	24.47 $\pm$ 0.013	45.89 $\pm$ 0.019	77.25 $\pm$ 0.050	30.55*
ส่วนสกัด น้ำ	-	-	18.16 $\pm$ 0.046	24.67 $\pm$ 0.251	40.73 $\pm$ 0.032	>50
L-NA	18.16 $\pm$ 0.046	35.56 $\pm$ 0.889	54.30 $\pm$ 0.165	60.23 $\pm$ 1.649	82.41 $\pm$ 0.165	20.90

<sup>a</sup> แสดงค่าเฉลี่ย  $\pm$  SD (n เท่ากับ 6)

<sup>b</sup> มีความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์น้อยกว่า 80%

\*ค่า IC<sub>50</sub> ของตัวอย่างทดสอบน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ L-NA ที่  $p < 0.05$

ตารางที่ 4.7 ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ ATDC-5 โดย MTT assay

สารสกัดหรือส่วนสกัด	ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, $\mu\text{g/mL}$ )	เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของ เซลล์ (% cell viability) (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)
สารสกัด 95% เอทานอล	5	112.48 $\pm$ 0.069
	10	100.82 $\pm$ 0.049
	15	96.21 $\pm$ 0.046
	25	85.78 $\pm$ 0.090
	50	84.83 $\pm$ 0.042
ส่วนสกัด เฮกเซน	5	115.62 $\pm$ 0.096
	10	95.55 $\pm$ 0.032
	15	93.34 $\pm$ 0.027
	25	86.49 $\pm$ 0.075
	50	88.44 $\pm$ 0.026
ส่วนสกัด ไคคลอโรมีเทน	5	96.66 $\pm$ 0.025
	10	97.16 $\pm$ 0.046
	15	96.98 $\pm$ 0.039
	25	90.95 $\pm$ 0.500
	50	88.29 $\pm$ 0.032
ส่วนสกัด เอทิลอะซิเตท	5	104.06 $\pm$ 0.019
	10	94.26 $\pm$ 0.044
	15	85.56 $\pm$ 0.021
	25	81.28 $\pm$ 0.028
	50	80.60 $\pm$ 0.020
ส่วนสกัด น้ำ	5	116.65 $\pm$ 0.048
	10	114.53 $\pm$ 0.096
	15	99.98 $\pm$ 0.090
	25	98.43 $\pm$ 0.069
	50	97.09 $\pm$ 0.049

## บทที่ 5

### สรุปผลและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาวิจัยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ในเซลล์ ATDC-5 ของส่วนสกัดกระชายดำ ครั้งนี้พบว่า

สารสกัดแห้งกระชายดำที่สกัดโดยวิธีการหมักด้วยตัวทำละลาย 95% เอทานอล และสกัดแยกด้วยวิธีสกัดของเหลวด้วยของเหลวด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และน้ำ พบว่าส่วนสกัดที่สกัดแยกด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงสุด เท่ากับ 585.55 mg GEA/g ext รองลงมาคือส่วนสกัดน้ำ เท่ากับ 516.11 mg GEA/g ext ส่วนสกัด 95% เอทานอล เท่ากับ 256.06 mg GEA/g ext ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน เท่ากับ 188.54 mg GEA/g ext และส่วนสกัดเฮกเซน 97.62 mg GEA/g ext ในส่วนของสารประกอบฟลาโวนอยด์พบว่าส่วนสกัดเฮกเซนมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมสูงสุด เท่ากับ 689.19 mg QE/g ext รองลงมาคือ ส่วนสกัด 95% เอทานอล เท่ากับ 527.94 mg QE/g ext ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน เท่ากับ 520.85 mg QE/g ext ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตท เท่ากับ 410.02 mg QE/g ext และส่วนสกัดน้ำ เท่ากับ 169.81 mg QE/g ext ตามลำดับ

สารสกัดและส่วนสกัดแห้งกระชายดำที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 95% เอทานอล มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้ดี ( $IC_{50}$  เท่ากับ 24.97 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เมื่อนำสารสกัด 95% เอทานอล มาสกัดแยกด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และน้ำ พบว่าส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ดีที่สุด มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 30.55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามด้วยส่วนสกัดเฮกเซน  $IC_{50}$  เท่ากับ 38.32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน และน้ำ มีค่า  $IC_{50} > 50$  และ  $> 50$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อนำสารสกัดและส่วนสกัดมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS<sup>+</sup> พบว่าส่วนที่สกัดแยกด้วยตัว

ทำละลายเอทิลอะซิเตท มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ  $IC_{50}$  19.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ ABTS<sup>+</sup> เท่ากับ  $IC_{50}$  3.11 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ATDC-5 พบว่า ที่ความเข้มข้นสูงสุด 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ใช้ในการศึกษามีความปลอดภัยต่อเซลล์ คือไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ใช้ทดสอบ

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

การศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นการเริ่มต้นของการศึกษาคุณฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดและ ส่วนสกัดที่ได้จากเหง้ากระชายดำต่อ ATDC-5 Mouse Chondrogenic Cell ซึ่งชี้ให้เห็นว่าส่วนสกัด เอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี ดังนั้นควรนำส่วนสกัดดังกล่าวไปศึกษาต่อ Chondrogenic Cell ที่แยกได้จากกระดูกข้อเข่าของมนุษย์ซึ่งอาจให้ผลที่เหมือนหรือแตกต่างออกไปจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ ในการศึกษาต่อในอนาคต

## บรรณานุกรม

- กนกรัตน์ นันทิรุจ, กุลศิริ ธรรมโชติ, เกียรติ ภาสภิญโญ, ขวัญฤทัย ศรีพวาทกุล, จินตาหรา มังคะละ, ชยวี เมืองจันทร์, และคณะ. (2555) *แนวทางเวชปฏิบัติการดูแลรักษาโรคเกาต์ (Guideline for management of gout)*. สมาคมรูมาติสซั่มแห่งประเทศไทย
- คมสัน ตั้งยืนยงค์. (2543). เรื่องน่ารู้เกี่ยวกับตัวทำละลายอินทรีย์. *วารสารวิทยาศาสตร์บริการ*, 49(152), 12-15
- บังอร ศรีพานิชกุลชัย, วรณา ศิริแสงตระกูล, อรุณศรี ปรีเปรม, จินดา หวังบุญสกุล, อัญชลี ตัดตะวะ ศาสตร์ และประนอม จันทร์โนนท์. (2546). *ฤทธิ์ด้านออกซิเดชันที่พบในพืชจากโคกภูตาคา อำเภอภูเวียง จังหวัดขอนแก่น*. การประชุมวิชาการเรื่องมาตรฐานผลิตภัณฑ์สมุนไพร เพื่อสุขภาพ. *ขอนแก่น*
- ปริยานุช อินทร์รอด. (2551). *ฤทธิ์ด้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของส่วนสกัดจากต้นเร่วหอมและว่านสาวหลง* (Unpublished Master's thesis). มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี.
- มนาริป โอศิริ. (2554). *โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์*. กรุงเทพมหานคร: อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง.
- วัชรวิ เลอमानกุล และปารณีย์ มีแต่้ม. (2548). การทดสอบคุณภาพของแบบสอบถาม SF-36 ภาษาไทย ฉบับแปลใหม่. *ไทยเภสัชสาร*, 29(1-2), 69-88
- รัตนา อินทรานุปกรณ์. (2547). *การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- วิชัย อิงพิณิจพงศ์, กานดาชัยภิญโญ, สมรรถชัย จำนงค์กิจ. (2558). *คู่มือการฟื้นฟูผู้สูงอายุหลังการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่า*. กรุงเทพฯ: สمانมิตรการพิมพ์
- วรวิทย์ เล่าห์เรณู. (2546). *โรคข้อเข่าเสื่อม*. เชียงใหม่: ธนบรรการพิมพ์
- ศุภรัตน์ ชาลี. (2553). *การศึกษาประสิทธิภาพและผลลดการอักเสบของครีมจากสารสกัดกระชายดำในผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อม* (Unpublished Master's thesis). มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น
- สุธี สุทัศน์ ณ อยุธยา, และ วัชรระ รุจิเวชพงศธร. (2539). *โรคข้อเข่าเสื่อมและการใช้งานเกิน*. ใน: วิรุฬห์ เหล่าภัทรเกษม. บรรณาธิการ. *ตำราออร์โธปิดิกส์*. กรุงเทพมหานคร: สมาคมออร์โธปิดิกส์แห่งประเทศไทย โรงพิมพ์ศิริกัญท์ ออฟเซ็ท.
- แสงอรุณ ดังก้อง. (2560). การกายภาพบำบัดในผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อม. *Siriraj Medical Bulletin*, 10(2), 115-121.

### บรรณานุกรม (ต่อ)

- เอมอร โสมนะพันธุ์. (2543). หม่อน (White Mulberry). *จุดสารข้อมูลสมุนไพร*, 17(3), 12-19.
- Abbas, A., Lichtman, A., & Pillai, S. (2003). Immunity to tumors. *Cellular and molecular immunology*, 6, 397-418.
- Abramson, S. B. (2008). Osteoarthritis and nitric oxide. *Osteoarthritis and Cartilage*, 16, S15-S20.
- Arden, N., & Nevitt, M. C. (2006). Osteoarthritis: epidemiology. *Best practice & research Clinical rheumatology*, 20(1), 3-25.
- Aruoma, O. I., Kaur, H., & Halliwell, B. (1991). Oxygen free radicals and human diseases. *Journal of the Royal Society of Health*, 111(5), 172-177.
- Attur, M., Al-Mussawir, H. E., Patel, J., Kitay, A., Dave, M., Palmer, G., . . . Abramson, S. B. (2008). Prostaglandin E2 exerts catabolic effects in osteoarthritis cartilage: evidence for signaling via the EP4 receptor. *The Journal of Immunology*, 181(7), 5082-5088.
- Azuma, T., Tanaka, Y., & Kikuzaki, H. (2008). Phenolic glycosides from *Kaempferia parviflora*. *Phytochemistry*, 69(15), 2743-2748.
- Bao, J.-p., Chen, W.-p., Feng, J., Hu, P.-f., Shi, Z.-l., & Wu, L.-d. (2010). Leptin plays a catabolic role on articular cartilage. *Molecular biology reports*, 37(7), 3265-3272.
- Basu, T.K., Temple, N.J., & Garg, M.L. (1999). *Handbook of antioxidants*. USA: Mercal Dakker.
- Boileau, C., Martel-Pelletier, J., Moldovan, F., Jouzeau, J. Y., Netter, P., Manning, P. T., & Pelletier, J. P. (2002). The in situ up-regulation of chondrocyte interleukin-1-converting enzyme and interleukin-18 levels in experimental osteoarthritis is mediated by nitric oxide. *Arthritis & Rheumatism*, 46(10), 2637-2647.
- Chaipech, S., Morikawa, T., Ninomiya, K., Yoshikawa, M., Pongpiriyadacha, Y., Hayakawa, T., & Muraoka, O. (2012). New flav-3-en-3-ol glycosides, kaempferiaosides C and D, and acetophenone glycosides, kaempferiaosides E and F, from the rhizomes of *Kaempferia parviflora*. *Journal of natural medicines*, 66(3), 486-492.
- Chin, H. K., Horng, C. T., Liu, Y. S., Lu, C. C., Su, C. Y., Chen, P. S., . . . Yang, J. S. (2018). Kaempferol inhibits angiogenic ability by targeting VEGF receptor-2 and downregulating the PI3K/AKT, MEK and ERK pathways in VEGF-stimulated human umbilical vein endothelial cells. *Oncology reports*, 39(5), 2351-2357.



## บรรณานุกรม (ต่อ)

- Conde, J., Scotece, M., Gomez, R., Lopez, V., Gomez-Reino, J. J., & Gualillo, O. (2011). Adipokines and osteoarthritis: novel molecules involved in the pathogenesis and progression of disease. *Arthritis*, 11(6), 2.
- Edem, D.O. (2009). Vitamin A: a review. *Asian J. Clin. Nutr*, 1(1), 65-82.
- Feelisch, M. (2008). The chemical biology of nitric oxide-an outsider's reflections about its role in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 16, S3-S13.
- Fan, L., Li, M., Cao, F.-y., Zeng, Z.-w., Li, X.-b., Ma, C., . . . Wu, X.-j. (2019). Astragalus polysaccharide ameliorates lipopolysaccharide-induced cell injury in ATDC5 cells via miR-92a/KLF4 mediation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 118, 109-180.
- Fendrick, A. M., & Greenberg, B. P. (2009). A review of the benefits and risks of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the management of mild-to-moderate osteoarthritis. *Osteopathic medicine and primary care*, 3(1), 1.
- Fravel, M., Ernst, M., & Clark, E. (2014). Gout and hyperuricemia. *DiPiro JT, Talbert RL, Yee GC, et al. Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach (9th ed). New York, NY: McGraw Hill*, 1505-1523.
- Fuchs, S., Skwara, A., Bloch, M., & Dankbar, B. (2004). Differential induction and regulation of matrix metalloproteinases in osteoarthritic tissue and fluid synovial fibroblasts. *Osteoarthritis and Cartilage*, 12(5), 409-418.
- Glass, CK., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, MC., & Gage, FH. (2010). Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*, 140(6), 918-34
- Goldring, M. B., & Otero, M. (2011). Inflammation in Osteoarthritis. *Current opinion in rheumatology*, 23(5), 471-478. doi: 10.1097 / BOR. Ob013e328349c2b1
- Gosset, M., Berenbaum, F., Levy, A., Pigenet, A., Thirion, S., Saffar, J.-L., & Jacques, C. (2006). Prostaglandin E2 synthesis in cartilage explants under compression: mPGES-1 is a mechanosensitive gene. *Arthritis research & therapy*, 8(4), 1-14.

### บรรณานุกรม (ต่อ)

- Gosset, M., Berenbaum, F., Salvat, C., Sautet, A., Pigenet, A., Tahiri, K., & Jacques, C. (2008). Crucial role of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in matrix degradation and prostaglandin E2 synthesis in chondrocytes: Possible influence on osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 58(5), 1399-1409.
- Hardy, M. M., Seibert, K., Manning, P. T., Currie, M. G., Woerner, B. M., Edwards, D.,-Tripp, C. S. (2002). Cyclooxygenase 2 - dependent prostaglandin E2 modulates cartilage proteoglycan degradation in human osteoarthritis explants. *Arthritis and rheumatism*, 46(7), 1789-1803. doi: 10.1002 / art. 10356
- Hauselmann, H. J., Stefanovic-Racic, M., Michel, B. A., & Evans, C. H. (1998). Differences in nitric oxide production by Superficial and deep human articular chondrocytes: implications for proteoglycan turnover in inflammatory joint diseases. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 160(3), 1444-1448.
- Hochberg, M.C., Roy D. Altman., Karine Toupin April., Maria Benkhalti., Gordon Guyatt., Jessie McGowan.,...Peter Tugwell. (2012). American College of Rheumatology (ACR) 2012: Recommendations for the use of non-pharmacologic and pharmacologic therapies in Osteoarthritis of the hand, hip, and knee. *Arthritis Care & Research*, 64(4), 465-474.
- Horigome, S., Yoshida, I., Tsuda, A., Harada, T., Yamaguchi, A., Yamazaki, K., Inohana, S., Isagawa, S., Kibune, N., Satoyama, T., Katsuda, S., Suzuki, S., Watai, M., Hirose, N., Mitsue, T., Shirakawa, H., & Komai, M. (2014). Identification and evaluation of anti-inflammatory compounds from *Kaempferia parviflora*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 78(5), 851-860.
- Hough, A.J. (1997). Pathology in osteoarthritis. In Koopman WJ. Editor. *Arthritis and Allied conditions: A textbook of Rheumatology Volume 2*. 13rd Editions. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Hung, T.-W., Chen, P.-N., Wu, H.-C., Wu, S.-W., Tsai, P.-Y., Hsieh, Y.-S., & Chang, H.-R. (2017). Kaempferol inhibits the invasion and migration of renal cancer cells through the downregulation of AKT and FAK pathways. *International Journal of Medical Sciences*, 14(10), 984.

### บรรณานุกรม (ต่อ)

- Jansakul, C., Tachanaparuksa, K., Mulvany, M. J., & Sukpondma, Y. (2012). Relaxant mechanisms of 3, 5, 7, 3', 4'pentamethoxyflavone on isolated human cavernosum. *European journal of pharmacology*, 691(1-3), 235-244.
- Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke, E., & Vivanco, J. (2003). Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian Ocimum accessions. *Food chemistry*, 83(4), 547-550.
- Kang, E. H., Lee, Y. J., Kim, T. K., Chang, C. B., Chung, J.-H., Shin, K., . . . Song, Y. W. (2010). Adiponectin is a potential catabolic mediator in osteoarthritis cartilage. *Arthritis research & therapy*, 12(6), 1-11.
- Keen, M. A., & Hassan, I. (2016). Vitamin E in dermatology. *Indian dermatology online journal*, 7(4), 311.
- Kirkham, B. (1991). Interleukin-1, immune activation pathways, and different mechanisms in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, 50(6), 395.
- Kopjar, M., Pilizota, V., Hribar, J., & Simcic, M. (2009). Total phenol content and antioxidant activity of water solutions of plant extracts. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 1(1), 1-7.
- Liu, C.-C., Kanekiyo, T., Xu, H., & Bu, G. (2013). Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nature Reviews Neurology*, 9(2), 106.
- Lago, R., Gomez, R., Otero, M., Lago, F., Gallego, R., Dieguez, C., . . . Gualillo, O. (2008). A new player in cartilage homeostasis: adiponectin induces nitric oxide synthase type II and pro-inflammatory cytokines in chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage*, 16(9), 1101-1109.
- Lee, C.-J., Moon, S.-J., Jeong, J.-H., Lee, S., Lee, M.-H., Yoo, S.-M., . . . Lee, W. S. (2018). Kaempferol targeting on the fibroblast growth factor receptor 3-ribosomal S6 kinase 2 signaling axis prevents the development of rheumatoid arthritis. *Cell death & disease*, 9(3), 1-21.

### บรรณานุกรม (ต่อ)

- Lee, J. H., Ort, T., Ma, K., Picha, K., Carton, J., Marsters, P. A.,-Blake, S. (2009). Resistin is elevated following traumatic joint injury and causes matrix degradation and release of inflammatory cytokines from articular cartilage in vitro, *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*, 17 (5), 613-620. doi: 10. 1016 / j. joca. 2008. 08. 007
- Li, X., Elman, M., Muddasani, P., Wang, J. H.-C., CS-Szabo, G., van Wijnen, A. J., & Im, H.-J. (2009). Prostaglandin E2 and its Cognate EP receptors Control human adult articular cartilage homeostasis and are linked to the pathophysiology of Osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism*, 60(2), 513-523. doi: 10. 1002 / art. 24258
- Mengshol, J. A., Vincenti, M. P., Coon, C. I., Barchowsky, A., & Brinckerhoff, C. E. (2000). Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor KB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 43(4), 801-811.
- Mitsui, T., Shimoda, T., Mitsui, Y., Kuriyama, Y., & Kawana, S. (2004). The effects of topical application of phytonadione, retinol and vitamins C and E on infraorbital dark circles and wrinkles of the lower eyelids. *Journal of cosmetic dermatology*, 3(2), 73-75.
- Mogensen, T. H. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical microbiology reviews*, 22(2), 240-273.
- Mrak, R. E., & Griffin, W. S. T. (2005). Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration. *Neurobiology of aging*, 26(3), 349-354.
- Neogi, T., Jansen, T. L. T. A., Dalbeth, N., Fransen, J., Schumacher, H. R., Berendsen, D., . . . Janssens, H. J. (2015). 2015 gout classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis & rheumatology*, 67(10), 2557-2568.
- Packer, L., Rimbach, G., & Virgili, F. (1999). Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, pycnogenol. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(5-6), 704-724.

### บรรณานุกรม (ต่อ)

- Padayatty, S. J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.-H., . . . Dutta, S. K. (2003). Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *Journal of the American college of Nutrition*, 22(1), 18-35.
- Pai, Y. C., Rymer, W. Z., Chang, R. W., & Sharma, L. (1997). Effect of age and osteoarthritis on knee proprioception. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 40(12), 2260-2265.
- Park, J. E., Pyun, H. B., Woo, S. W., Jeong, J. H., & Hwang, J. K. (2014). The protective effect of *Kaempferia parviflora* extract on UVB-induced skin photoaging in hairless mice. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 30(5), 237-245.
- Park, J. Y., Pillinger, M. H., & Abramson, S. B. (2006). Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. *Clinical immunology*, 119(3), 229-240.
- Ren, C., & Liang, Z. (2018). Piperine alleviates lipopolysaccharide-induced inflammatory injury by down-regulating microRNA-127 in murine chondrogenic ATDC5 cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 103, 947-954.
- Pelletier, J. P., Caron, J. P., Evans, C., Robbins, P. D., Georgescu, H. I., Jovanovic, D., . . . Martel-Pelletier, J. (1997). In vivo suppression of early experimental osteoarthritis by interleukin-1 receptor antagonist using gene therapy. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 40(6), 1012-1019.
- Rao, P., & Knaus, E. E. (2008). Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 11(2), 81s-110s.
- Risdian, C., Windowati, W., Mozef, T., Wargasetia, T. L., & Khile Khiong, K. (2011). Free Radical Scavenging Activity of Ethanolic Leaves Extract and Its Different Solvent Fractions of *Piper betle* L. *in vitro*. *Indonessian journal of cancer chemoprevention*, 2(1), 141-145.
- Rujjanawate, C., Kanjanapothi, D., Amornlerdpison, D., & Pojanagaroon, S. (2005). Anti-gastric ulcer effect of *Kaempferia parviflora*. *Journal of ethnopharmacology*, 102, 120-122.

### บรรณานุกรม (ต่อ)

- Saenthaweesuk, S., Jongtamklang, J., Somchan, T. & Thobunluepop, P. (2012). Total phenolics content, antioxidant and antimicrobial activities of some herbs, *Khon Kaen Agriculture Journal*, 2(suppl.), 480–483.
- Santoro, A., Conde, J., Scotece, M., Abella, V., López, V., Pino, J.,... Gualillo, O. (2015). Choosing the right chondrocyte cell line: Focus on nitric oxide. *Journal of Orthopaedic Research*, 33(12), 1784-1788.
- Schumacher, Y., Aparicio, T., Ourabah, S., Baraille, F., Martin, A., Wind, P., . . . Guilmeau, S. (2016). Dysregulated CRTCL activity is a novel component of PGE2 signaling that contributes to colon cancer growth. *Oncogene*, 35(20), 2602-2614.
- Scotece, M., Conde, J., Abella, V., López, V., Francisco, V., Ruiz, C.,... Gualillo, O. (2018). Oleocanthal inhibits catabolic and inflammatory mediators in lps-activated human primary osteoarthritis (OA) chondrocytes through mapks/nf- $\kappa$ b pathways. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 49(6), 2414-2426.
- Scotece, M., Gómez, R., Conde, J., Lopez, V., Gómez-Reino, J. J., Lago, F., . . . Gualillo, O. (2012). Further evidence for the anti-inflammatory activity of oleocanthal: Inhibition of MIP-1 $\alpha$  and IL-6 in J774 macrophages and in ATDC5 chondrocytes. *Life sciences*, 91(23-24), 1229-1235.
- Scott, D., Coulton, B., Symmons, D., & Popert, A. (1987). Long-term outcome of treating rheumatoid arthritis: results after 20 years. *The Lancet*, 329(8542), 1108-1111.
- Shan, Z.-Z., Masuko-Hongo, K., Dai, S.-M., Nakamura, H., Kato, T., & Nishioka, K. (2004). A potential role of 15-deoxy- $\Delta$ 12, 14-prostaglandin J2 for induction of human articular chondrocyte apoptosis in arthritis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(36), 37939-37950.
- Shapoval, G., & Gromovaia, V. (2003). Mechanism of antioxidant protection of an organism from oxidative stress. *Ukrains' kyi biokhimichnyi zhurnal*, (1999), 75(2), 5.

### บรรณานุกรม (ต่อ)

- Shukunami, C., Shigeno, C., Atsumi, T., Ishizeki, K., Suzuki, F., & Hiraki, Y. (1996). Chondrogenic differentiation of clonal mouse embryonic cell line ATDC5 in vitro: differentiation-dependent gene expression of parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor. *The Journal of cell biology*, 133(2), 457-468.
- Sutthanut, K., Sripanidkulchai, B., Yenjai, C., & Jay, M. (2007). Simultaneous identification and quantitation of 11 flavonoid constituents in *Kaempferia parviflora* by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1143(1-2), 227-233.
- Tangtrakulwanich, B., & Suwanno, P. (2012). Epidemiology and risk factors of patellofemoral osteoarthritis in adults: a population-based study in southern Thailand. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 95(8), 1048.
- Taylor, L. F., Kee, C. C., King, S. V., & Ford, T. A. L. (2004). Evaluating the effects of an educational symposium on knowledge, impact, and self-management of older African Americans living with osteoarthritis. *Journal of Community Health Nursing*, 21(4), 229-238.
- Tewtrakul, S., Subhadhirasakul, S., Karalai, C., Ponglimanont, C., & Cheenpracha, S. (2009). Anti-inflammatory effects of compounds from *Kaempferia parviflora* and *Boesenbergia pandurata*. *Food chemistry*, 115(2), 534-538.
- Tewtrakul, S., Subhadhirasakul, S., Kummee, S. (2008). Anti-allergic activity of compounds from *Kaempferia parviflora*. *Journal of ethnopharmacology*, 116, 191-193.
- Tewtrakul, S., & Subhadhirasakul, S. (2008). Effects of compounds from *Kaempferia parviflora* on nitric oxide, prostaglandin E2 and tumor necrosis factor-alpha productions in RAW264.7 macrophage cells. *Journal of ethnopharmacology*, 120(1), 81-84.
- Tiawtragul, O., & Choosakoonkriang, S. (2019). *Determination of Nitrites and Nitrates in Gunshot Residues by a Paper-Based Device*. Silpakorn University.
- United Nations. (2017). *Report of The World population ageing*. Retrieved from [https://www.un.org/en/development/desa/population/publications/pdf/ageing/WPA2017\\_Report.pdf](https://www.un.org/en/development/desa/population/publications/pdf/ageing/WPA2017_Report.pdf)

### บรรณานุกรม (ต่อ)

- Vane, J. R., & Botting, R. M. (2003). The mechanism of action of aspirin. *Thrombosis research*, 5(6), 255-258.
- Viviani, B., Bartesaghi, S., Corsini, E., Galli, C. L., & Marinovich, M. (2004). Cytokines role in neurodegenerative events. *Toxicology letters*, 149(1-3), 85-89.
- Wallace, K. L., Riedel, A. A., Joseph-Ridge, N., & Wortmann, R. (2004). Increasing prevalence of gout and hyperuricemia over 10 years among older adults in a managed care population. *The Journal of rheumatology*, 31(8), 1582-1587.
- Wang, D., & DuBois, R. N. (2006). Prostaglandins and cancer. *Gut*, 55(1), 115-122.
- Wattanathorn, J., Pangpookiew, P., Sripanidkulchai, K., Muchimapura, S., & Sripanidkuchai, B. (2007). Evaluation of the anxiolytic and antidepressant effects of alcoholic extract of *Kaempferia parviflora* in aged rats. *American Journal of Agricultural and Biological Science*, 2(2), 94-98.
- Welbat, J. U., Chaisawang, P., Chaijaroonkhanarak, W., Prachaney, P., Pannangrong, W., Sripanidkulchai, B., & Wigmore, P. (2016). *Kaempferia parviflora* extract ameliorates the cognitive impairments and the reduction in cell proliferation induced by valproic acid treatment in rats. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 206, 7-13.
- Whiteman, M., Armstrong, J. S., Cheung, N. S., Siau, J. L., Rose, P., Schantz, J. T., . . . Halliwell, B. (2004). Peroxynitrite mediates calcium-dependent mitochondrial dysfunction and cell death via activation of calpains. *The FASEB Journal*, 18(12), 1395-1397.
- Wongsinkongman, P., Boonruad, T., Techadamrongsin, Y., Bansiddhi, J., and Chavalittumrong, P. (2004). Chemical and physical specifications of *Derris scandens* (Roxb.) Benth. *Journal of Thai Traditional & Alternative Medicine*, 2, 18-34.
- Wongsinkongman P, Mongkolchaipak N, Chansuvanich N, Techadumrongsin Y, Boonruad T (2012) Quality evaluation of crude drugs and volatile oil of Krachai-dam rhizomes. *Bulletin of the Department of Medical Sciences*, 45, 1-16.



### บรรณานุกรม (ต่อ)

- Wu, G. J., Chen, T. G., Chang, H. C., Chiu, W. T., Chang, C. C., & Chen, R. M. (2007). Nitric oxide from both exogenous and endogenous sources activates mitochondria-dependent events and induces insults to human chondrocytes. *Journal of cellular biochemistry*, 101(6), 1520-1531.
- Wutythamawech, W. (1997). *Encyclopedia of Thai herbs*. Bangkok: OS Printing 365.
- Yenjai, C., Prasanphen, K., Daodee, S., Wongpanich, V., & Kittakoop, P. (2004). Bioactive flavonoids from *Kaempferia parviflora*. *Fitoterapia*, 75(1), 89-92.
- Yorimitsu, M., Nishida, K., Shimizu, A., Doi, H., Miyazawa, S., Komiyama, T., . . . Ozaki, T. (2008). Intra-articular injection of interleukin-4 decreases nitric oxide production by chondrocytes and ameliorates subsequent destruction of cartilage in instability-induced osteoarthritis in rat knee joints. *Osteoarthritis and Cartilage*, 16(7), 764-771.
- Zhu, M., Chen, M., Zuscik, M., Wu, Q., Wang, Y. J., Rosier, R. N., . . . Chen, D. (2008). Inhibition of  $\beta$ -catenin signaling in articular chondrocytes results in articular cartilage destruction. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 58(7), 2053-2064.

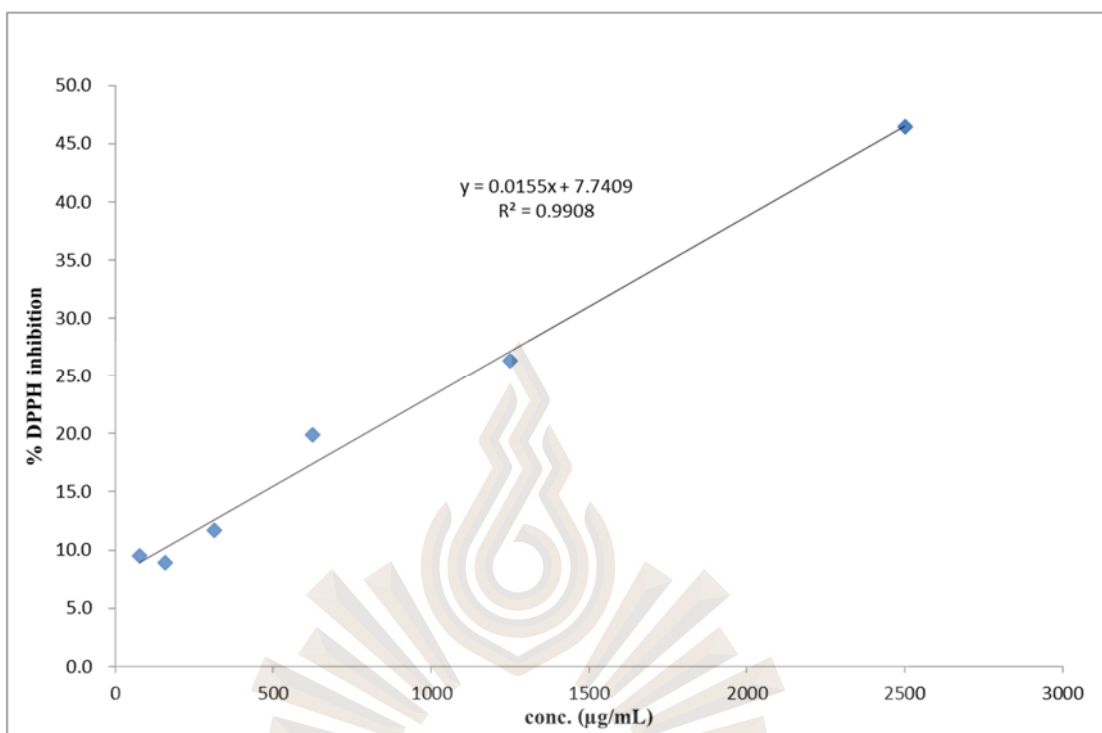




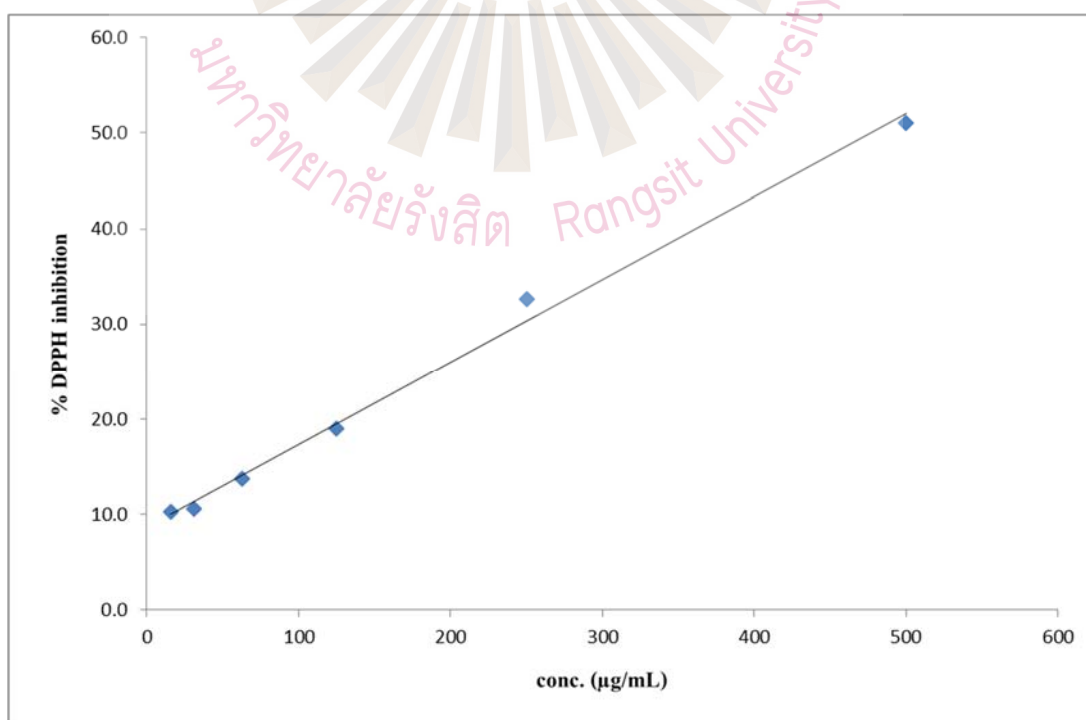
ภาคผนวก ก

กราฟแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

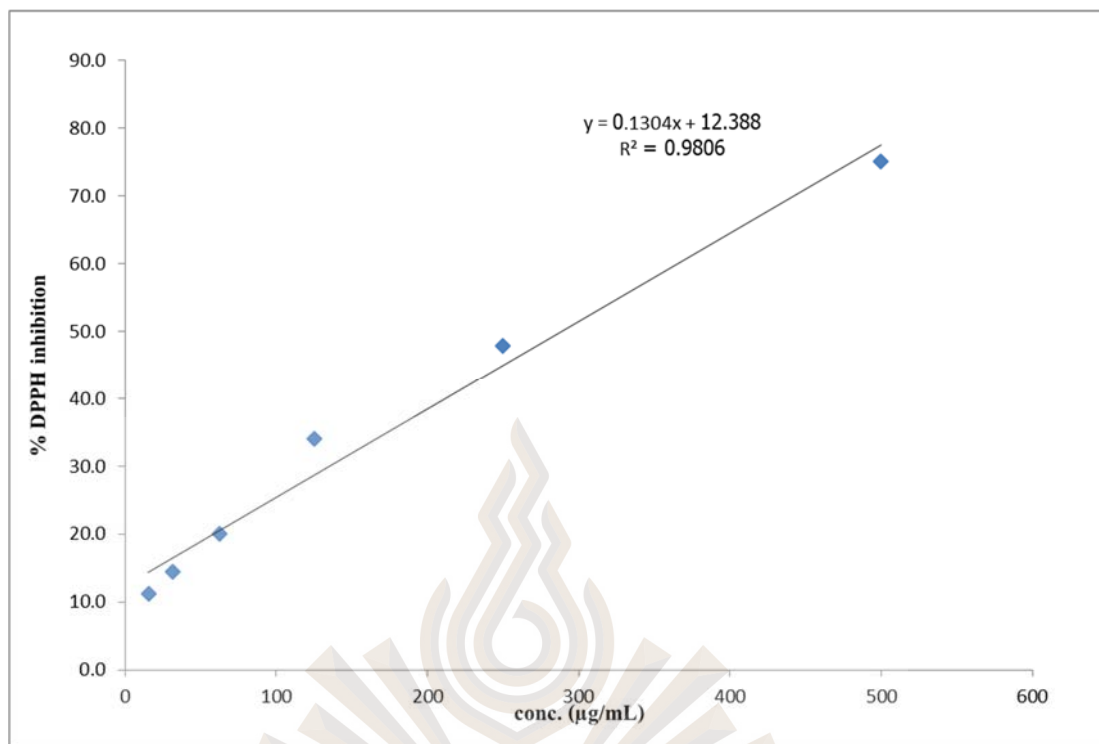
มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



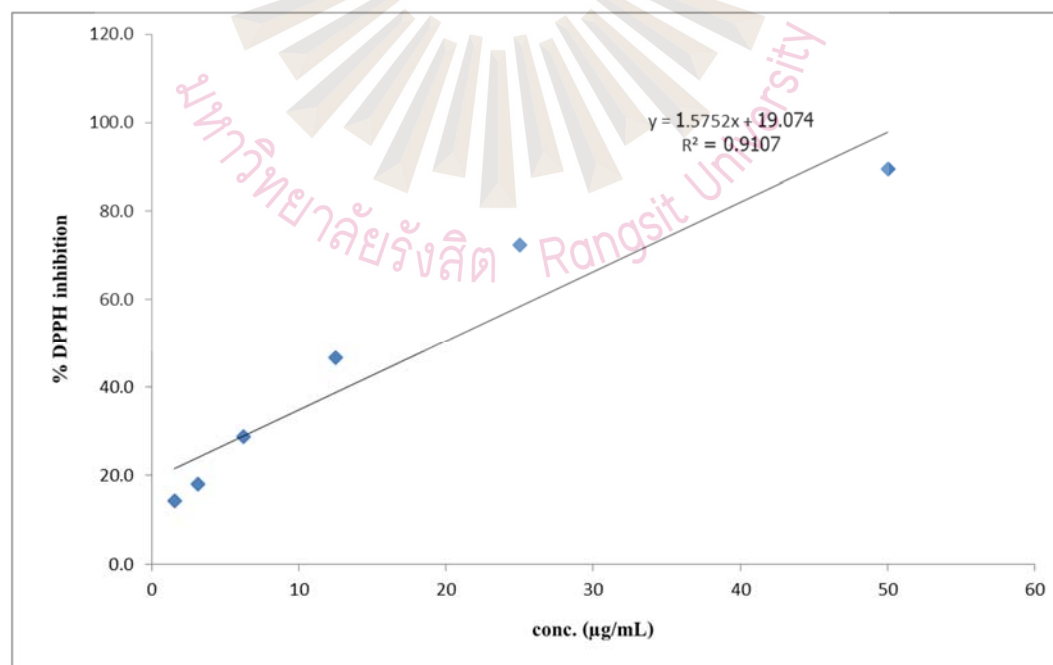
รูปที่ ก-1.1 กราฟฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของส่วนสกัดเสกเซน



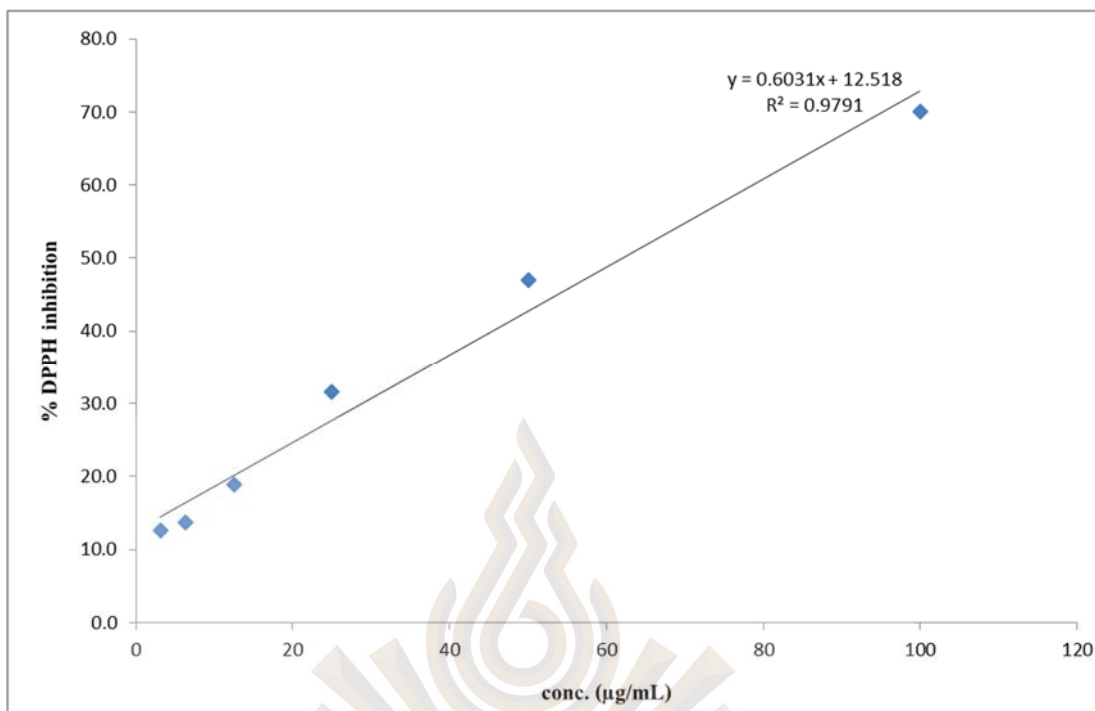
รูปที่ ก-1.2 กราฟฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของส่วนสกัดไคคอสโรมีเทน



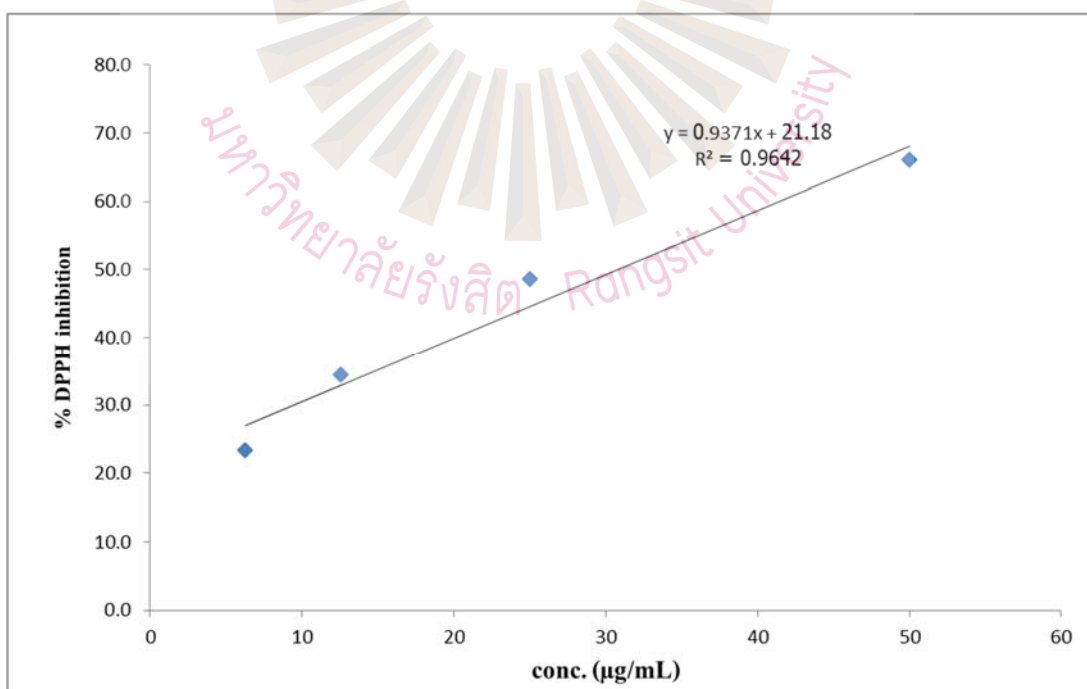
รูปที่ ก-1.3 กราฟฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัด 95% เอทานอล



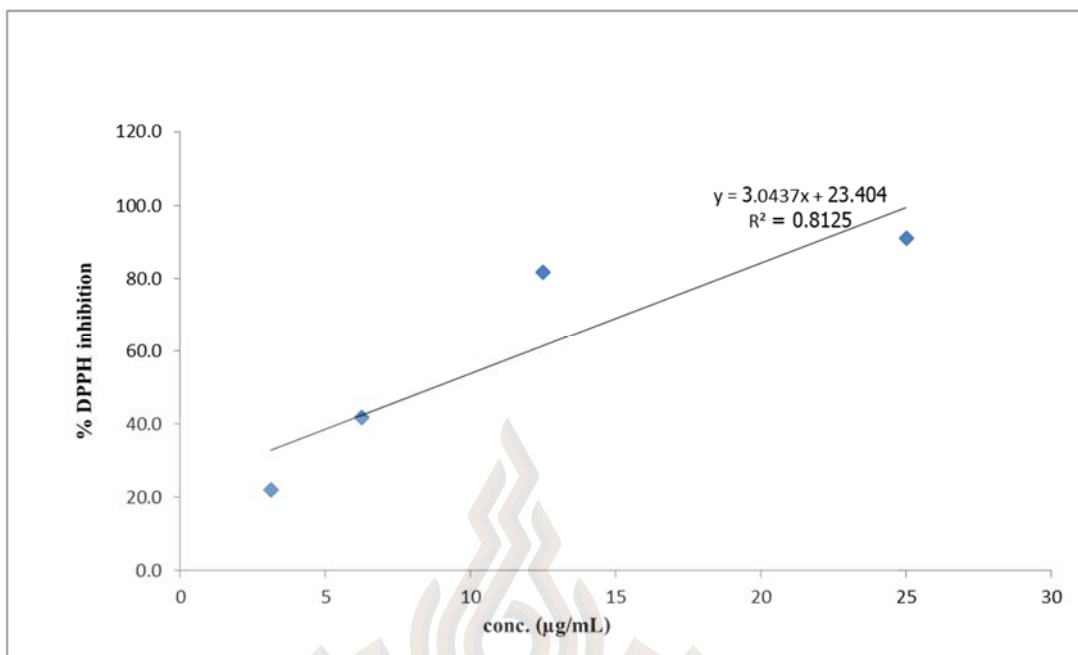
รูปที่ ก-1.4 กราฟฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของส่วนสกัดเอทิลอะซิเตท



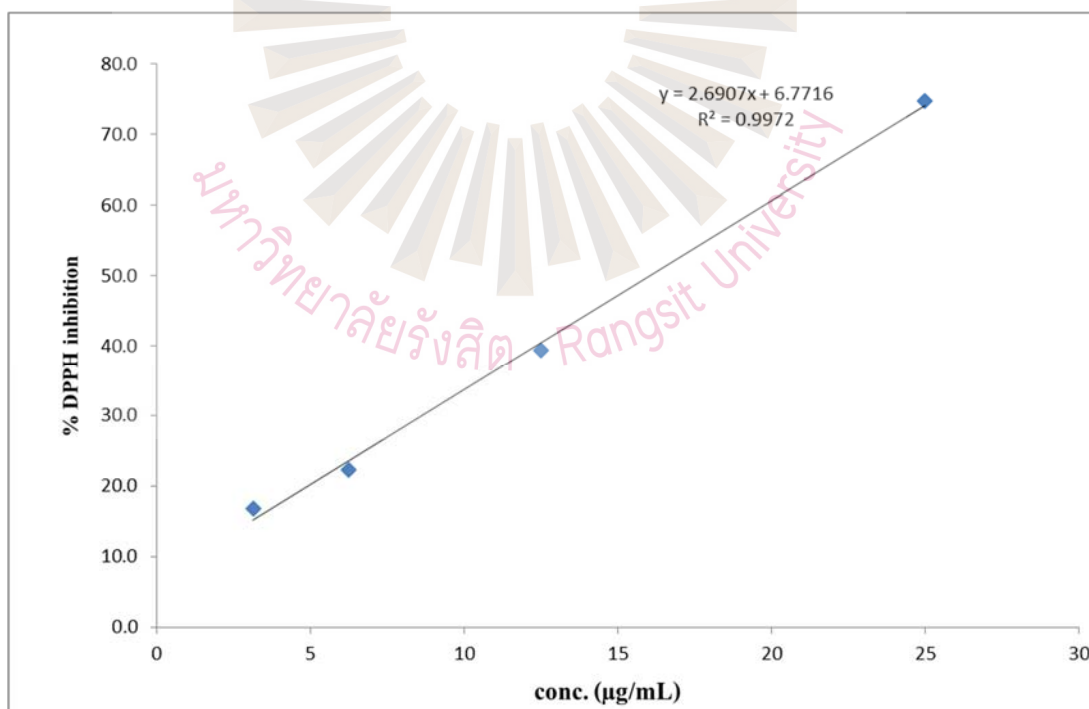
รูปที่ ก-1.5 กราฟฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของส่วนสกัดน้ำ



รูปที่ ก-1.6 กราฟฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารมาตรฐาน BHT



รูปที่ ก-1.7 กราฟฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารมาตรฐาน Ascorbic Acid



รูปที่ ก-1.8 กราฟฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารมาตรฐาน  $\alpha$ -tocopherol

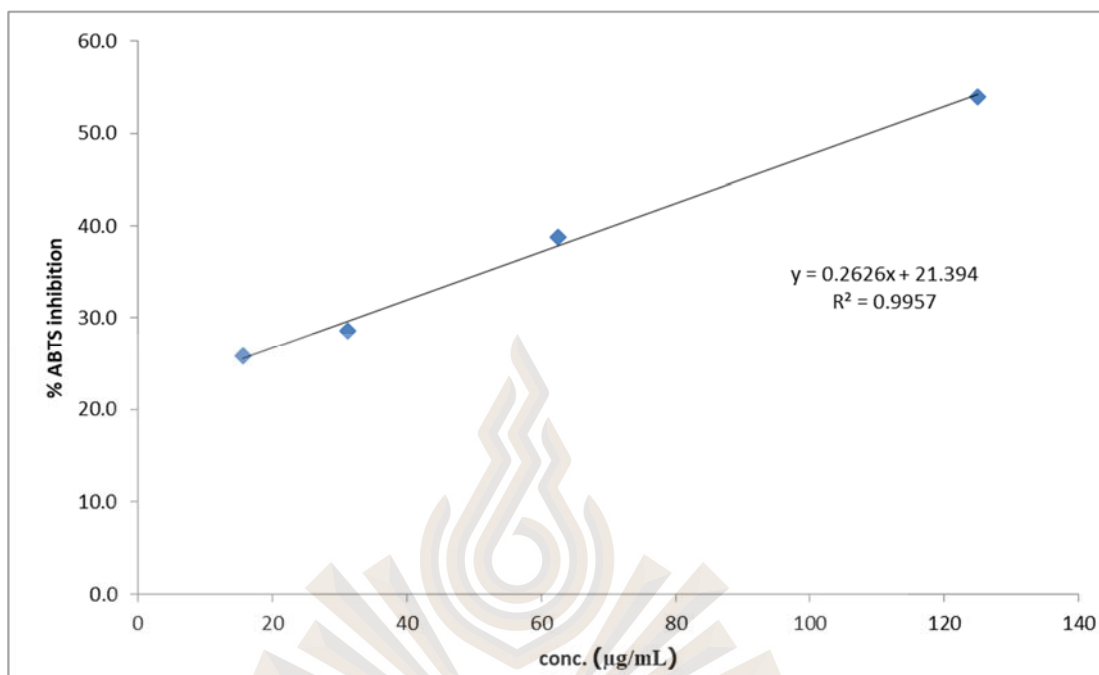


ภาคผนวก ข

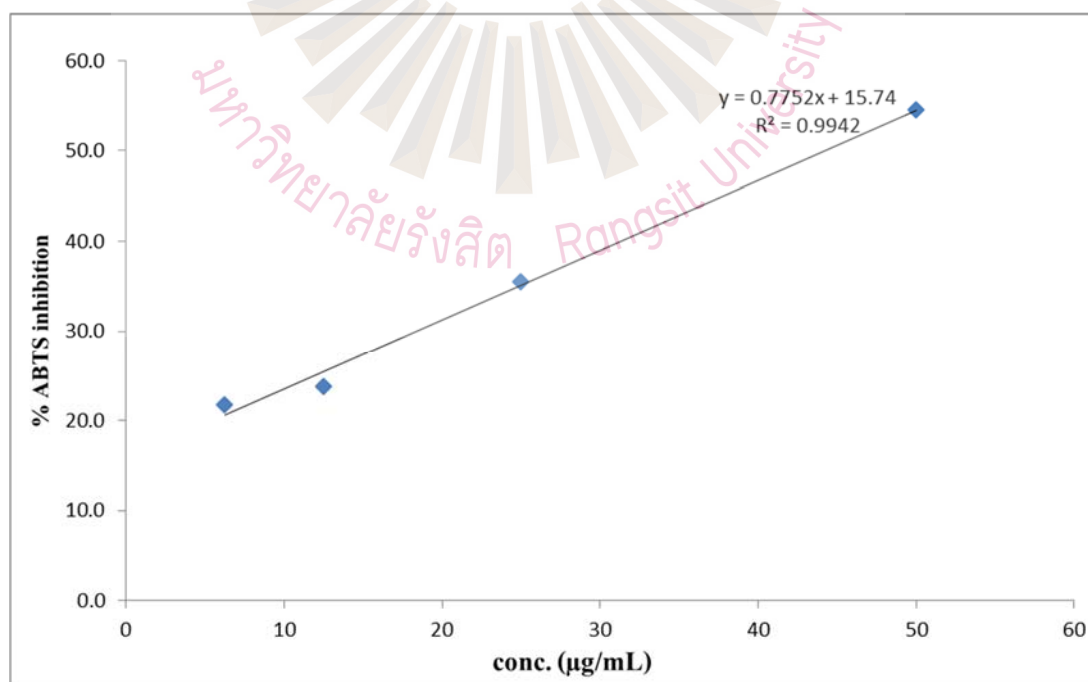
กราฟแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS<sup>+</sup>

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

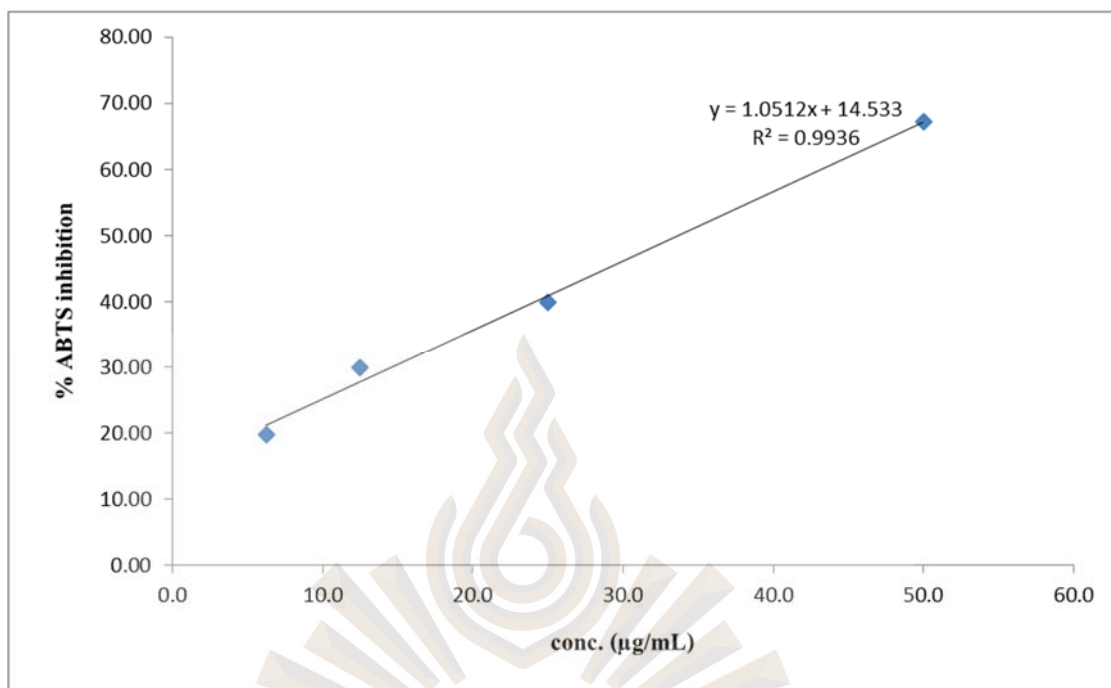




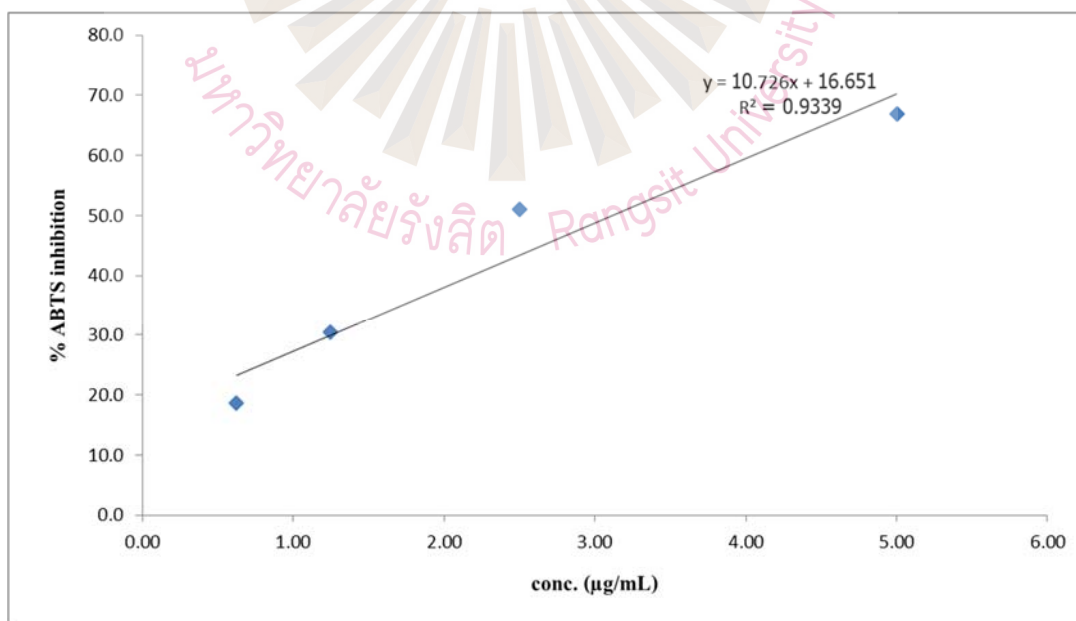
รูปที่ ข-1.1 กราฟฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS<sup>++</sup> ของส่วนสกัดเสกเซน



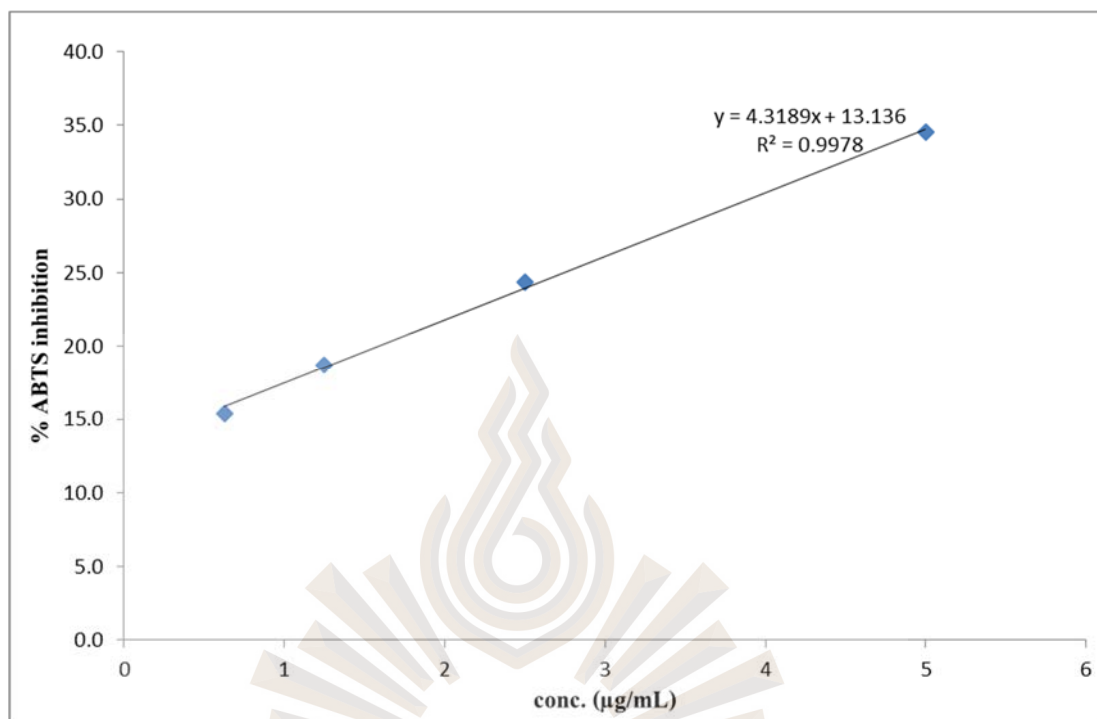
รูปที่ ข-1.2 กราฟฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS<sup>++</sup> ของส่วนสกัดไคคโลโรมีเทน



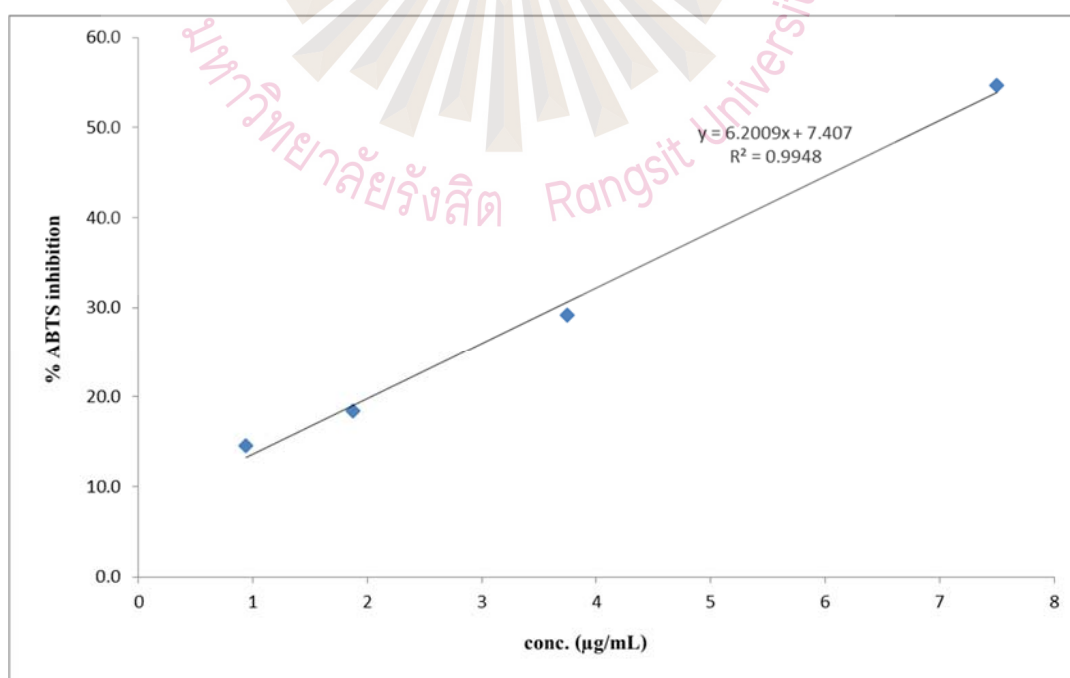
รูปที่ ข-1.3 กราฟฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS<sup>+</sup> ของสารสกัด 95% เอทานอล



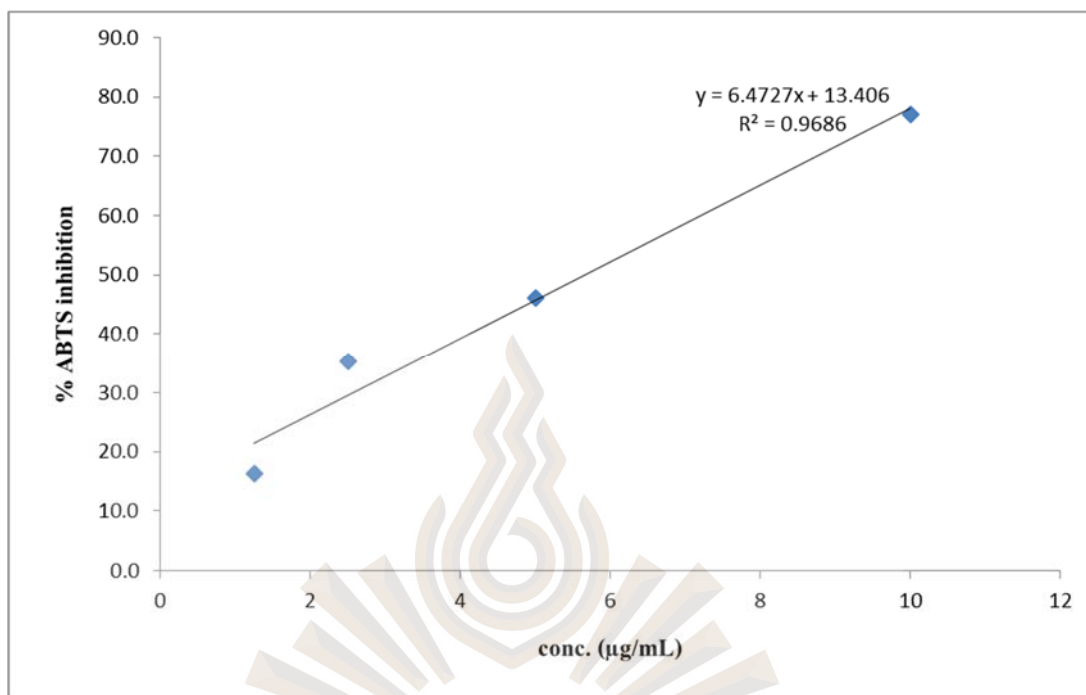
รูปที่ ข-1.4 กราฟฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS<sup>+</sup> ของส่วนสกัดเอทิลอะซิเตท



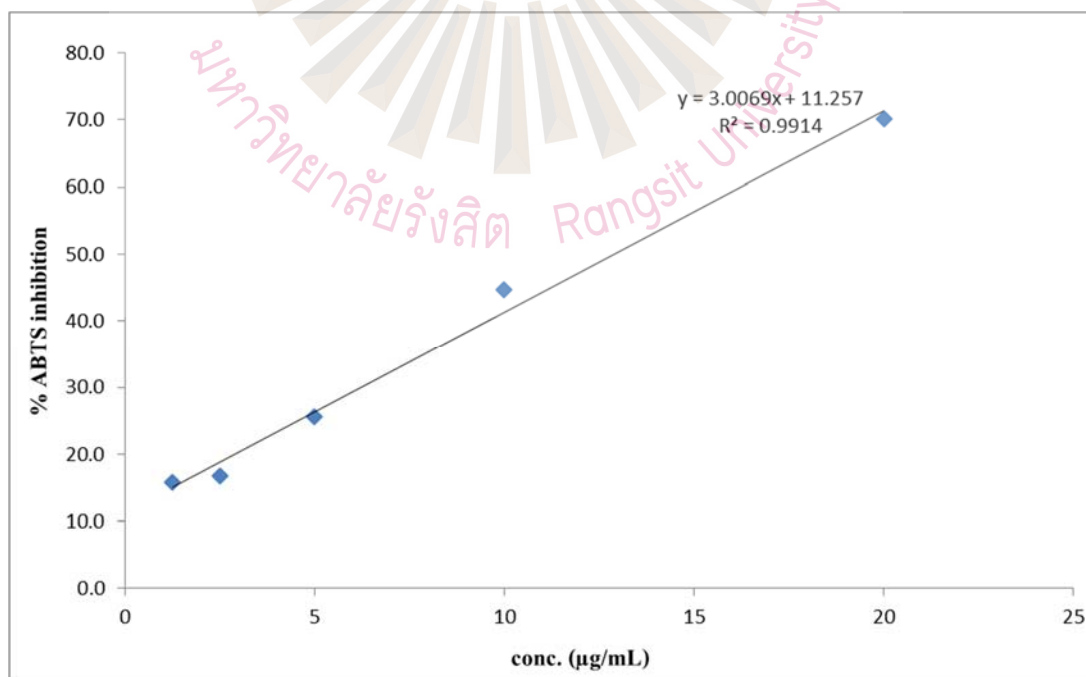
รูปที่ ข-1.5 กราฟฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup> ของส่วนสกัดน้ำ



รูปที่ ข-1.6 กราฟฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup> ของสารมาตรฐาน BHT



รูปที่ ข-1.7 กราฟฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS<sup>+</sup> ของสารมาตรฐาน Ascorbic Acid



รูปที่ ข-1.8 กราฟฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS<sup>+</sup> ของสารมาตรฐาน  $\alpha$ -tocopherol

The logo of Rangsit University is a circular emblem. At the top is a stylized flame or sunburst. Below it, a series of radiating lines form a larger circle. The text 'มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University' is written in a pinkish-red color along the bottom arc of the emblem.

ภาคผนวก ก

ลักษณะของสารสกัดและส่วนสกัดในแต่ละตัวทำละลาย

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



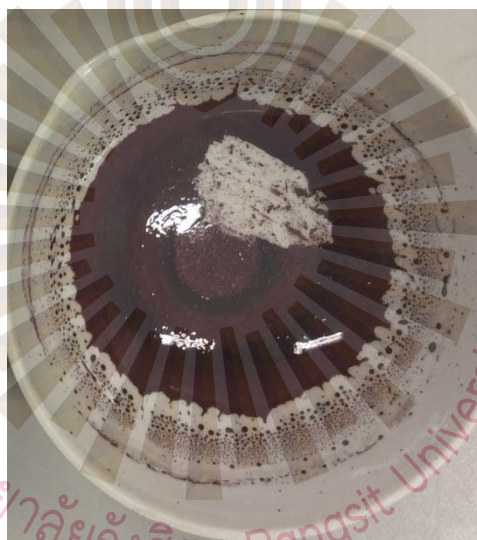
รูปที่ ค-1.1 สารสกัดเหง้ากระชายดำ ด้วย 95% เอทานอล



รูปที่ ค-1.2 ส่วนสกัดเหง้ากระชายดำ ด้วยเฮกเซน



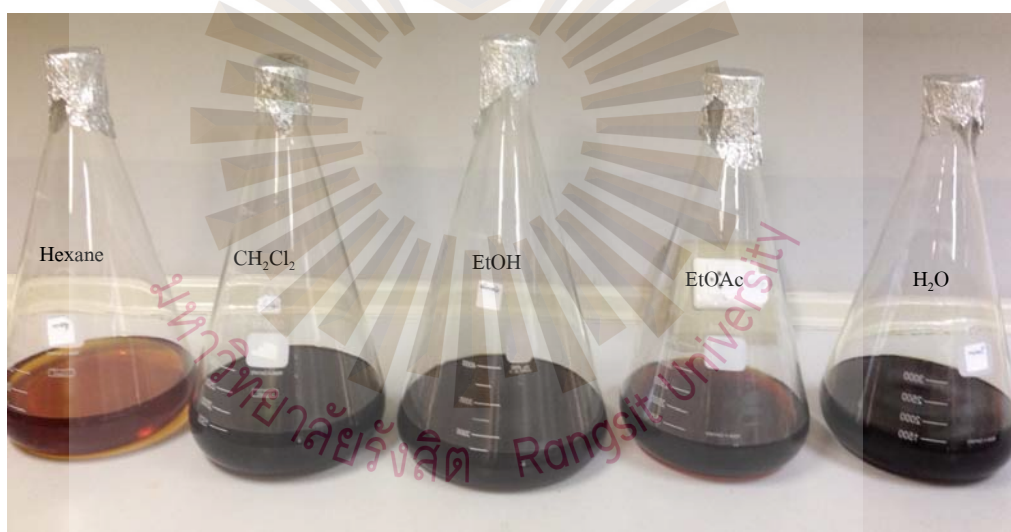
รูปที่ ค-1.3 ส่วนสกัดเหง้ากระชายดำ ด้วยไดคลอโรมีเทน



รูปที่ ค-1.4 ส่วนสกัดเหง้ากระชายดำ ด้วยเอทิลอะซิเตท

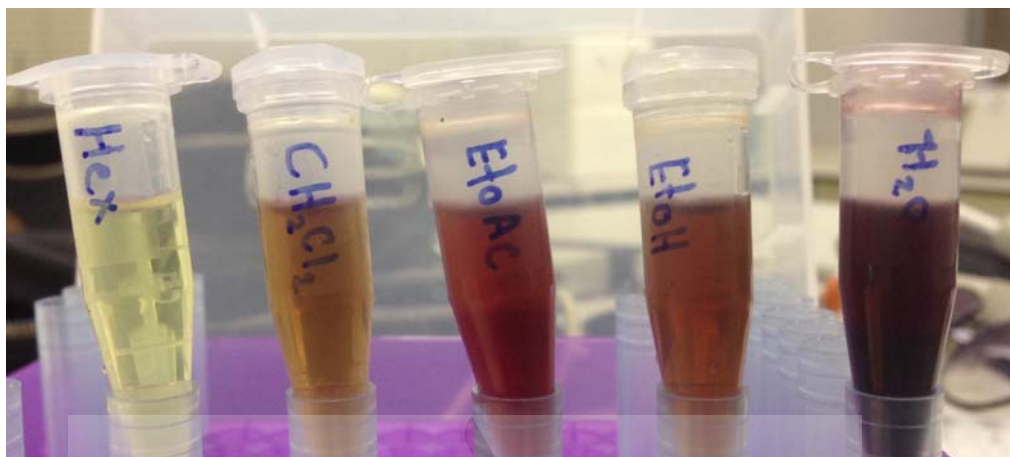


รูปที่ ค-1.5 ส่วนสกัดเหง้ากระชายดำ ด้วยน้ำ



รูปที่ ค-1.6 สารสกัดและส่วนสกัดเหง้ากระชายดำ ด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ





รูปที่ ค-1.7 ลักษณะสารสกัดและส่วนสกัดแห้งกระชายดำ ด้วยตัว 95% เอทานอล



## ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ	สุไลมาน มะนอ
วัน เดือน ปีเกิด	8 ธันวาคม 2537
สถานที่เกิด	จังหวัดนราธิวาส ประเทศไทย
ประวัติการศึกษา	มหาวิทยาลัยรังสิต ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาการแพทย์ แผนตะวันออก, 2561 มหาวิทยาลัยรังสิต ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขา การแพทย์แผนตะวันออก, 2563
ที่อยู่ปัจจุบัน	หอพิมลศิริ เลขที่ 52/672 ซอย เอกทักษิณ 5 ตำบล หลักหก อำเภอ เมือง จังหวัด ปทุมธานี 12000