Original Article

การประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชผักพื้นบ้าน สำหรับพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันอันตราย จากรังสีในผู้ป่วยรังสีร่วมรักษาระบบประสาท

วรนันท์ ศิรีสัตยกุล[1,2], สุพรรณิการ์ ขาววิเศษ[3], ธวัชชัย ปราบศัตรู[1,2], วรานนท์ มั่นคง[1,2], จิตติพร เขียนประสิทธิ์[1]

[1]ภาควิชารังสีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

[2]กลุ่มวิจัยรังสีวิทยาหลอดเลือดและรังสีร่วมรักษาระบบประสาท

[3]โรงเรียนรังสีเทคนิค คณะเทคโนโลยีวิทยาศาสตร์สุขภาพ วิทยาลัยวิทยาศาสตร์การแพทย์เจ้าฟ้าจุฬาภรณ์ ราชวิทยาลัยจุฬาภรณ์

ผู้รับผิดชอบบทความ: วรนันท์ ศิรีสัตยกุล ภาควิชารังสีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

บทคัดย่อ

อนุมูลอิสระจากรังสีเป็นปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์โดยเฉพาะดีเอ็นเอนำไปสู่การกลายพันธุ์ของเซลล์และเป็นมะเร็งได้ การยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระจากรังสีโดยใช้พืชที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารแอนโทไซยานินสูงน่าจะช่วยลดความเสี่ยงดังกล่าวได้โดยเฉพาะในผู้ป่วยรังสีร่วมรักษาระบบประสาทซึ่งเป็นหัตถการที่ได้รับรังสีปริมาณสูง การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชผักพื้นบ้านและคัดเลือกพืชที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและมีสารแอนโทไซยานินสูงมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันอันตรายจากรังสีให้แก่ผู้ป่วยรังสีร่วมรักษาระบบประสาท โดยนำข้าวโพดม่วง (เมล็ดและซัง) ข้าวเหนียวดำลืมผัว (เมล็ดข้าวและรำ) มะเขือเทศ ผักแพว ใบหม่อน ย่านาง และผักชีลาว มาสกัดด้วยน้ำแล้วนำไปประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพ ประกอบด้วยปริมาณสารประกอบฟีโนลิก ปริมาณสารแอนโธไซยานิน และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay และ FRAP assay โดยผลการประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพที่กล่าวมาจะมีน้ำหนักคะแนนร้อยละ 10, 30, 40 และ 20 ตามลำดับ จากนั้นนำสารสกัดพืชที่ได้คะแนนประเมินดีที่สุด 2 ชนิดมาผสมกันในอัตราส่วนต่างๆ 5 อัตราส่วน (100:0, 75:25, 50:50, 25:75, 0:100) แล้วประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพดังที่ได้กล่าวมาเพื่อเลือกอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุด ผลการทดลองและเลือกสารสกัดพืชโดยวิธีให้น้ำหนักคะแนนพบว่า ผักแพวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH IC_{50} = 49.09 ± 0.98 µg

รับต้นฉบับ 23 พฤษภาคม 2563, ปรับปรุงต้นฉบับ 6 มิถุนายน 2563, ตอบรับต้นฉบับตีพิมพ์ 8 มิถุนายน 2563

dry powder/ml; FRAP assay = 47.30 ± 0.39 µM Fe(II)/mg dry powder) และปริมาณสารประกอบฟีโนลิก (2.836 ± 0.005 mg/ml Gallic acid equivalent/100 mg dry powder) ดีที่สุด รองลงมาคือรำข้าวเหนียวดำลืมผัวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH IC_{50} = 510.26 ± 1.72 µg dry powder/ml; FRAP assay= 27.92 ± 0.31 µM Fe(II)/mg dry powder) และปริมาณสารแอนโทไซยานิน (1.058 ± 0.008 mg Cyanidin-3-glucoside equivalent/100 mg dry powder) เมื่อนำสารสกัดรำข้าวเหนียวดำลืมผัว (OSBE) และสารสกัดผักแพว (POE) ซึ่งให้ฤทธิ์ทางชีวภาพดีที่สุดมาผสมกันเพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสม ผลการทดลองพบว่า OSBE:POE ในอัตราส่วน 25:75 และ 0:100 นั้นให้ฤทธิ์ทางชีวภาพรวมถึงความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวหนูเหมาะสมที่สุด ดังนั้น OSBE:POE ในอัตราส่วนดังกล่าวน่าจะมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันรังสีได้ แต่อย่างไรก็ตามยังต้องมีการทดสอบฤทธิ์ป้องกันอันตรายจากรังสีในเซลล์ต้นกำเนิดและเลือดของผู้ป่วยรวมถึงทดสอบความเป็นพิษทั้งชนิดเฉียบพลันและเรื้อรังในสัตว์ทดลองก่อนจะนำมาใช้ในทางคลินิก

คำสำคัญ : อนุมูลอิสระ รังสี แอนโทไซยานิน สารต้านอนุมูลอิสระ รังสีร่วมรักษาระบบประสาท

บทนำ

ปัจจุบันเทคโนโลยีการแพทย์ด้านรังสีวิทยาพัฒนาขึ้นเป็นอย่างมากทำให้มีการนำรังสีมาใช้ในการวินิจฉัยและรักษาโรคเพิ่มมากขึ้นทำให้มีผู้ป่วยที่ได้รับรังสีเพิ่มมากขึ้นตาม โดยเฉพาะผู้ป่วยที่ได้รับการตรวจวินิจฉัยและรักษาโรคของหลอดเลือดสมองด้วยเครื่องเอกซเรย์ระบบหลอดเลือดหรือ digital subtraction angiography (DSA) จากการศึกษาระบาดวิทยาและแนวโน้มของโรคของหลอดเลือดสมองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบว่าหน่วยรังสีร่วมรักษาระบบประสาทมีผู้ป่วยที่มารับบริการตรวจวินิจฉัยและรักษาโรคดังกล่าวเพิ่มขึ้นจาก 191 รายต่อปี เป็น 292 รายต่อปี เพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 52.08[1] และมีรายงานว่าผู้ป่วยที่ได้รับการตรวจวินิจฉัยโรคของหลอดเลือดสมองด้วยเครื่อง DSA ได้รับรังสีในปริมาณที่สูงและมากกว่าการตรวจด้วยเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์หรือ CT ถึง 5 เท่า[2] แม้ว่ารังสีจะมีประโยชน์ด้านการแพทย์เป็นอย่างมาก แต่การได้รับรังสีปริมาณสูงจากการทำหัตถการด้านรังสีร่วมรักษาสามารถก่อให้เกิดผลข้างเคียงที่เกิดจากรังสี (deterministic effect) ได้ เช่น ผิวหนังแดง (skin erythema) ผิวหนังหลุดลอก ผมร่วง ต้อกระจก[3] และเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งได้ โดยมีรายงานว่ารังสีที่ใช้ในการวินิจฉัยโรคเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดมะเร็ง ร้อยละ 0.6-3[4] แม้ว่าการสั่งตรวจวินิจฉัยทางรังสีนั้น แพทย์จะคำนึงถึงการประเมินคุณประโยชน์และความเสี่ยงของผู้ป่วยเป็นสำคัญก่อนส่งตรวจ แต่อย่างไรก็ตามหากผู้ป่วยได้รับรังสีเพื่อประโยชน์ในการวินิจฉัยหรือรักษาโรคและได้ลดความเสี่ยงในการเกิดผลข้างเคียงจากรังสีรวมถึงมะเร็งด้วยน่าจะเป็นเรื่องที่ดีกว่า

รังสีเอกซ์สามารถก่อให้เกิดผลโดยตรงต่อดีเอ็นเอซึ่งพบได้ ร้อยละ 30 โดยทำให้พันธะเคมีของสายดีเอ็นเอทั้งสองเส้นได้รับความเสียหายขาดออกจากกัน หากไม่ได้รับการซ่อมแซมจะเป็นสาเหตุนำไปสู่การตายหรือการกลายพันธ์ของเซลล์นั้นๆ ได้ ส่วนผลโดยอ้อมต่อดีเอ็นเอซึ่งพบได้ร้อยละ 70 โดยรังสีจะก่อให้เกิดกระบวนการไอออไนเซชั่น (inoization) และเอกซ์ไซเทชั่น (excitation) ทำให้เกิดสารอนุมูลอิสระ Hydroxyl radical (•OH) Hydrogen radical (H•) Hydroperoxyl free radical (HO_2•) และสารที่ไม่ใช่สารอนุมูลอิสระเช่น H_2O_2 ในเซลล์ของร่างกาย และสารอนุมูลอิสระเหล่านั้นจะเป็นตัวทำให้เกิดความเสียหายต่อดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ โปรตีนและไขมันต่อไป[5] ซึ่งผลโดยตรงและโดยอ้อมนี้สามารถนำไปสู่การตายของเซลล์ การกลายพันธุ์และการเป็นมะเร็งได้ ดังนั้นจะพบว่าหากมีกระบวนการในการยับยั้งผลของรังสีโดยอ้อมน่าจะสามารถลดการตายของเซลล์ซึ่งทำให้เกิดผลข้างเคียงจากรังสี และลดความเสี่ยงในการกลายพันธุ์และการเป็นมะเร็งของผู้ป่วยที่ได้รับรังสีปริมาณสูง

งานวิจัยหลายฉบับรายงานว่าสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและพืชที่มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงช่วยป้องกันความเสียหายของเซลล์จากรังสีได้[6-9] ประเทศไทยอุดมไปด้วยพืชผักพื้นบ้านที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและมีสารแอนโทไซยานินสูง เช่น ใบหม่อน ผักแพว ย่านาง ข้าวโพดสีม่วง ข้าวเหนียวดำ มะเขือเทศและผักชีลาว เป็นต้น สารสกัดจากพืชผักเหล่านี้สามารถช่วยลดความเสียหายของร่างกายจากสารอนุมูลอิสระในภาวะต่างๆ ได้เป็นอย่างดี[10-15] แต่ยังไม่เคยมีการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติด้านการต้านอนุมูลอิสระของพืชเหล่านี้ และยังไม่เคยมีการศึกษาศักยภาพในการป้องกันอันตรายจากรังสีของพืชเหล่านี้มาก่อน นอกจากนี้หลักการแพทย์แผนโบราณมักนิยมนำสมุนไพรหลายตัวมารวมกันเพื่อให้เสริมฤทธิ์กันหรือทำงานร่วมกันของสารสำคัญในสมุนไพรแต่ละชนิด ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชผักพื้นบ้านไทยและคัดเลือกพืชที่มีศักยภาพและศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของพืชผักพื้นบ้านไทยดังกล่าวสำหรับนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันอันตรายจากรังสีในผู้ป่วยรังสีร่วมรักษาระบบประสาท

วัสดุและวิธีการศึกษา

การเตรียมพืช

นำเมล็ดและซังข้าวโพดม่วง (*Zea mays* Lin) เมล็ดข้าวและรำข้าวเหนียวดำลืมผัว (*Oryza sativa* Linn.) มะเขือเทศ (*Solanum lycopersicum*) ผักแพว (*Polygonum odoratum* Lour.) ใบหม่อน (*Morus alba* Linn.) ย่านาง (*Tiliacora triandra* Diels) และ ผักชีลาว (*Anethum graveolens*) อย่างละ 1 กิโลกรัม มาอบให้แห้งด้วยเตาอบ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นให้ละเอียดเป็นผง เก็บใส่ถุงพลาสติดปิดปากถุงให้สนิท เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะนำมาใช้

การเตรียมสารสกัดพืชสำหรับคัดเลือกพืชที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันอันตรายจากรังสี

ชั่งน้ำหนักผงพืชแต่ละชนิดปริมาณ 1 กรัม ผสมน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร (มล.) ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 40 มล.จากนั้นนำไปต้มบนเครื่องกวนสารให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที[16] ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วกรองด้วยผ้าขาวบางและกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman®) น้ำสารสกัดที่ได้จะมีความเข้มข้นเท่ากับ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (มก./มล.)

การเตรียมสารสกัดพืชเพื่อศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของพืชสมุนไพรในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันอันตรายจากรังสี

ผักแพวและรำข้าวเหนียวดำลืมผัวเป็นพืชที่มีศักยภาพดีที่สุด 2 อันดับแรก ถูกคัดเลือกมาเพื่อศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันรังสี นำผงพืชทั้ง 2 ชนิดๆ ละ 500 กรัม สกัดด้วยน้ำกลั่นโดยวิธี decoction ในอัตราส่วน 1:10 ต้มเป็นเวลา 30 นาที หลังจากทิ้งไว้ให้เย็นนำมากรองด้วยผ้าขาวบางและกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1[16] จากนั้นนำสารสกัดน้ำไปทำให้เป็นผงแห้งด้วยเครื่อง mini spray drier (BUCHI/B-290) เก็บผงสารสกัดไว้ในขวดพลาสติกปิดฝาสนิทและเก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยได้สารสกัดผักแพวและสารสกัดรำข้าวเหนียวดำลืมผัวน้ำหนัก 31.05 และ 19.65 กรัมตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 6.21 และ 3.93 จากน้ำหนักแห้งก่อนสกัดตามลำดับ นำสารสกัดรำข้าวเหนียวดำลืมผัว (OSBE) และสารสกัดผักแพว (POE) มาผสมกันในอัตราส่วน 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 และ 0:100 เติมน้ำกลั่นให้สารสกัดแต่ละอัตราส่วนให้มีความเข้มข้น 5 มก./มล. แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวหนู และฤทธิ์ทางชีวภาพทันที

การประเมินปริมาณสารประกอบฟีโนลิก

การวิจัยนี้ประเมินปริมาณสารฟีโนลิกในสารสกัดพืชสมุนไพรด้วยวิธี Folin Ciocalteau[17] โดยหยอดสารสกัดแต่ละชนิดปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองแล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1.58 มล. และสารละลาย 50% (v/v) Folin-Ciocalteu phenol (Sigma-Aldrich) ปริมาตร 0.1 มล. ลงในหลอดทดลอง นำไปเขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ 8 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมสารละลาย 20% sodium carbonate ปริมาตร 0.3 มล. ลงไป แล้วเขย่าให้เข้ากัน เก็บไว้ในห้องมืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-spectrophotometer (Pharmacia LKB-Biochrom 4060) ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร (nm) ในการทดลองนี้ใช้สาร Gallic acid ความเข้มข้นระหว่าง 0-250 มก./มล. เป็นสารมาตรฐาน และนำมาสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับคำนวนปริมาณสารประกอบฟีโนลิกในสารสกัดพืช โดยนำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดพืชที่วัดได้มาคำนวนปริมาณสารประกอบฟีโนลิกจากสมการของกราฟมาตรฐาน $Y= 0.085x+0.0577$ $R^2= 0.9964$ ค่าที่ได้แสดงออกมาเป็นหน่วย mg/ml Gallic acid equivalent/mg dry powder (mg/ml GAE/mg dry powder) สำหรับสารสกัดพืชทั้ง 9

ชนิด และเป็นหน่วย mg/ml GAE/mg extract สำหรับสารสกัดรำข้าวเหนียวดำลืมผัวและสารสกัดผักแพว 5 อัตราส่วน

การประเมินปริมาณสารแอนโทไซยานิน

ประเมินปริมาณสารแอนโทไซยานินในสารสกัดพืชสมุนไพรด้วยวิธีของ AOAC (Associated of Official Analytical Chemists) ที่ 2005.02[16] โดยหยอดสารสกัดแต่ละชนิดปริมาตร 0.5 มล. ลงในหลอดทดลอง จำนวน 2 ชุด หลอดทดลองชุดแรกหยอดสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ (Potassium chloride) ความเข้มข้น 0.025 โมลาร์ pH 1.0 ปริมาตร 1 มล. หลอดทดลองชุดที่ 2 หยอดสารละลายโซเดียมอะซีเตท (Sodium acetate) ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ pH 4.5 ปริมาตร 1 มล. เขย่าหลอดทดลองให้สารละลายเข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำมาอ่านค่าการดูดกลืนแสง (absorbance: A) ด้วยเครื่อง UV-spectrophotometer (Pharmacia LKB-Biochrom 4060) ที่ความยาวคลื่น 520 nm และ 700 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวนปริมาณสารแอนโทไซยานินจากสูตร

Anthocyanin content (cyanindin-3-glucoside equivalent, mg/L) = (A x MW x DF x 10^3)/(εx1)

A = (A 520 nm-A 700 nm ของสารละลาย pH 1.0)-(A 520 nm - A 700 nm ของสารละลาย pH 4.5);

MW = มวลโมเลกุลของสาร cyanidin-3-glucoside = 449.2 g/mol;

DF = ค่า dilution factor จากการทดลอง = 2;

ε = ค่าสัมประสิทธิ์เฉพาะของ cyanidin-3-glucoside=26,900

ปริมาณสารแอนโทไซยานินของสารสกัดแสดงออกมาเป็นหน่วย mg/L cyaniding-3-glucoside equivalent/100 mg dry powder (mg/L CGE/mg dry powder) สำหรับสารสกัดพืชทั้ง 9 ชนิด และเป็นหน่วย mg/L CGE/mg extract สำหรับสารสกัดรำข้าวเหนียวดำลืมผัวและสารสกัดผักแพว 5 อัตราส่วน

การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay

สาร DPPH เป็นสารอนุมูลอิสระที่มีความเสถียร นิยมนำมาใช้ทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพืช[16] โดยหยอดสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ (ความเข้มข้น 25-2,000 ไมโครกรัม/มล. สำหรับการประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพื่อคัดเลือกพืช และความเข้มข้น 5-250 ไมโครกรัม/มล. สำหรับการประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสม) ปริมาตร 0.8 มล. ลงในหลอดทดลอง จากนั้นหยอดสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.15 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.4 มล. ลงไป เขย่าสารให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มไว้ 30 นาทีในห้องมืด จากนั้นนำมาวัดการดูดกลืนแสดงด้วยเครื่อง UV-spectrophotometer (Pharmacia LKB-Biochrom 4060) ที่ความยาวคลื่น 517 nm นำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดแต่ละความเข้มข้นมาคำนวณความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%Inhibition) ด้วยสูตร

%Inhibition of DPPH = [(A control-A extract)/A control]x100

โดย A control คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ Methanol 0.8 มล. และสารละลาย DPPH 0.4 มล. ในขณะที่ A extract คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดแต่ละความเข้มข้น จากนั้นนำค่า %Inhibition ที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานและคำนวนค่า IC_{50} หรือค่าความเข้มข้นที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ครึ่งหนึ่งจากกราฟดังกล่าว และแสดงออกมาเป็นหน่วย µg dry powder/ml สำหรับสารสกัดพืชทั้ง 9 ชนิด และ µg/ml สำหรับสารสกัดรำข้าวเหนียวดำลืมผัวและสารสกัดผักแพว 5 อัตราส่วน โดยที่ค่า IC_{50} น้อยแสดงว่าพืชนั้นมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี

การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power assay

Ferric reducing antioxidant power หรือ FRAP เป็นวิธีที่ใช้ประเมินความสามารถของสารสกัดในการให้อิเล็กตรอนแก่สารประกอบ Fe^{3+} (ferric ion) ให้มาเป็น Fe^{2+} (ferrous ion) โดยจะเปลี่ยนสีจากน้ำตาลอ่อน มาเป็นสีน้ำเงินเข้มในภาวะเป็นกรด ทำการทดลองตามวิธีของ Kirisattayakul และคณะ[17] โดยเตรียมสารละลาย FRAP ซึ่งประกอบด้วยสารละลาย Acetate buffer pH 3.6 ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ สารละลาย 2,4,6-tripyridyl-striazine (TPTZ) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ในกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ และ สารละลายเฟอริคคลอไรด์ (Ferric chloride) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วน 10:1:1 วางไว้ในอ่างน้ำอุ่น 37 องศาเซลเซียสคนให้ละลายจนได้สารละลายสีน้ำตาลใส นำมาหยอดใส่หลอดทดลองปริมาตร 1.45 มล. เติมสารสกัดปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงไป เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำอุ่น 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที นำมาวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-spectrophotometer (Pharmacia LKB-Biochrom 4060) ที่ความยาวคลื่น 593 nm ในการทดลองนี้ใช้สารเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต (Ferrous ammonium sulphate) ความเข้มข้น 0-250 ไมโครโมลาร์ (µM) มาสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณค่า FRAP activity ของสารสกัดแต่ละชนิดด้วยสมการจากกราฟ y=0.005x+0.0893 ค่าที่ได้แสดงออกมาเป็นหน่วย µM Fe(II)/mg dry powder สำหรับสารสกัดพืชทั้ง 9 ชนิด และ µM Fe(II)/mg extract สำหรับสารสกัดรำข้าวเหนียวดำลืมผัวและสารสกัดผักแพว 5 อัตราส่วน

การประเมินความเป็นพิษของสารสกัดรำข้าวเหนียวดำลืมผัวและสารสกัดผักแพว 5 อัตราส่วนต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวหนูด้วยวิธี MTT assay

ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวหนู (RAW 264.7 cell) ด้วยวิธี MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) การทดสอบนี้ได้ดัดแปลงตามงานวิจัยของ Poulsen และคณะ[18] และ Wattanathorn และคณะ[19] ขั้นตอนเริ่มจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในฟลาสก์ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM) ที่ผสม 10% Fetal Bovine Serum หรือ FBS (Gibco⁻) และ

ยาปฏิชีวนะเพนนิซิลิน 100 ยูนิต/มล. และสเตรปโตมัยซิน 100 ไมโครกรัม/มล. นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี 5% คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) เป็นเวลา 3-5 วัน จากนั้นทำให้เซลล์หลุดออกจากผิวของฟลาสก์ ด้วย 0.25% Trypsin-EDTA (trypsinization) เติมเซลล์ปริมาณ 10^4 เซลล์/หลุม ลงในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม และเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มี 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะบนผิวของเพลต จากนั้นทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดทั้ง 5 อัตราส่วน โดยทำการเจือจางความเข้มข้นลงทีละครึ่งหนึ่งจาก 5 มก./มล. เจือจางจนถึง 0.156 มก./มล. ตัวอย่างควบคุมผลลบ คือ เซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ ตัวอย่างควบคุมผลบวก คือ เซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการเติม 1%Tween20 ทำการทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง (duplicate) เมื่อเติมสารทดสอบแล้วนำไมโครเพลตบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา เซลล์ที่ตายหรือเศษเซลล์ที่ลอยในอาหารจะถูกล้างด้วย Phosphate buffer saline pH 7.2 จากนั้นเติมสารละลายสีเหลือง MTT (0.5 มก./มล.) ในทุกหลุม แล้วนำไปบ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมทาบอไลต์เอนไซม์ (mitochondrial dehydrogenase) ของเซลล์ที่ยังมีชีวิตจะเปลี่ยนสารละลาย MTT ให้เป็นผลึกฟอร์มาแซน (Formazan crystals) ซึ่งมีสีม่วง จากนั้นละลายผลึกโดยการเติม dimethyl sulfoxide (DMSO) 100 ไมโครลิตร/หลุม แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (A) ที่ความยาวคลื่น 540 nm ด้วยเครื่อง microplate reader ซึ่งค่า A จะแปรตามปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต คำนวณเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษจากสูตร; %Cytotoxicity = (1- (A ทดสอบ/A ควบคุมผลลบ)) x 100 โดยที่ค่า %cytotoxicity ยิ่งสูงยิ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์

เกณฑ์การคัดเลือกพืชและสารสกัดสำหรับพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันรังสี

ในการทดลองนี้ได้กำหนดเกณฑ์สำหรับคัดเลือกพืชและสารสกัดที่มีคุณสมบัติเหมาะสมสำหรับพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันรังสี โดยให้น้ำหนักคะแนนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay ร้อยละ 40 ปริมาณสารแอนโทไซยานินให้น้ำหนักคะแนนร้อยละ 30 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay ให้น้ำหนักคะแนนร้อยละ 20 และปริมาณสารประกอบฟีโนลิกให้น้ำหนักคะแนนร้อยละ 10 โดยพืชที่มีฤทธิ์ดีที่สุดเป็นลำดับที่ 1 ในแต่ละการประเมินจะได้คะแนน 40, 30, 20 และ 10 ส่วนลำดับอื่นๆ จะได้คะแนนลดลงไปตามลำดับ พืชและสารสกัดที่มีคะแนนสูงที่สุด 2 อันดับแรกจะได้รับการคัดเลือกสำหรับทดสอบและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันรังสีต่อไป

ผลการศึกษา

ผลการประเมินปริมาณสารประกอบฟีโนลิกและแอนโทไซยานินของพืชทั้ง 9 ชนิด

ปริมาณสารประกอบฟีโนลิกและปริมาณสารแอนโทไซยานินของพืชทั้ง 9 ชนิดแสดงในตารางที่ 1 จากผลการทดลองพบว่าผักแพวมีปริมาณสารประกอบฟีโนลิกสูงที่สุด (2.836 ± 0.005 mg/ml GAE/100mg dry powder) รองลงมา คือ

ผักชีลาว (2.243 ± 0.002 mg/ml GAE/100mg dry powder) ส่วนใบหม่อน ใบย่านาง รำข้าวเหนียวดำลืมผัว มะเขือเทศ ซังข้าวโพดม่วง ข้าวเหนียวดำลืมผัว และ เมล็ดข้าวโพด (1.310 ± 0.001, 1.230 ± 0.013, 1.089 ± 0.001, 1.060 ± 0.014, 0.569 ± 0.006, 0.498 ± 0.001 และ 0.164 ± 0.001 mg/ml GAE/100 mg dry powder ตามลำดับ) มีปริมาณสารประกอบฟีโนลิกรองลงมาตามลำดับ

รำข้าวเหนียวดำลืมผัวมีปริมาณสารแอนโทไซยานินสูงที่สุด (1.058 ± 0.005 mg CGE/100 mg dry powder) รองลงมาคือข้าวเหนียวดำลืมผัว (0.778 ± 0.002 mg CGE/100 mg dry powder) ส่วนซังข้าวโพดม่วงและเมล็ดข้าวโพดม่วง (0.258 ± 0.001 และ 0.041 ± 0.001 mg CGE/100 mg dry powder) มีปริมาณสารแอนโทไซยานินรองลงมาตามลำดับ พืชอีก 5 ชนิดไม่ได้ตรวจประเมินในส่วนนี้เนื่องจากไม่มีแอนโทไซยานินเป็นองค์ประกอบของสารพฤกษเคมีในพืชดังกล่าว

ตารางที่ 1 ปริมาณสารประกอบฟีโนลิกและปริมาณสารแอนโทไซยานินของพืชทั้ง 9 ชนิด

พืชทั้ง 9 ชนิด	ปริมาณสารประกอบฟีโนลิก (mg/ml GAE/100 mg dry powder)	ปริมาณสารแอนโทไซยานิน (mg CGE/100 mg dry powder)
ซังข้าวโพดม่วง	0.569 ± 0.006	0.258 ± 0.001
เมล็ดข้าวโพดม่วง	0.164 ± 0.001	0.041 ± 0.001
ข้าวเหนียวดำลืมผัว	0.498 ± 0.001	0.778 ± 0.002
รำข้าวเหนียวดำลืมผัว	1.089 ± 0.001	1.058 ± 0.005
มะเขือเทศ	1.060 ± 0.014	-
ผักแพว	2.836 ± 0.005	-
ใบหม่อน	1.310 ± 0.001	-
ใบย่านาง	1.230 ± 0.013	-
ผักชีลาว	2.243 ± 0.002	-

ผลการประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชทั้ง 9 ชนิดด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay และ FRAP assay

ผลการประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชทั้ง 9 ชนิดด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay และ FRAP assay แสดงในตารางที่ 2 ผลการทดลองพบว่าผักแพวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay สูงที่สุด (49.09 ± 0.98 μg dry powder/ml) รองลงมาคือผักชีลาว (337.88 ± 1.65 μg dry powder/ml) ส่วนรำข้าวเหนียวดำลืมผัว ใบหม่อน ใบย่านาง ข้าวเหนียวดำลืมผัว มะเขือเทศ ซังข้าวโพดและเมล็ดข้าวโพด (510.26 ± 1.72, 584.76 ± 2.74, 628.13 ± 1.71, 833.47 ± 0.12,

1176.60 ± 3.82, 1222.85 ± 1.03 และ 1702.69 ± 4.52 µg/ml) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay รองลงมาตามลำดับ ส่วนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay ผักแพวมีค่าที่ดีที่สุด (47.30 ± 0.39 µM Fe(II)/mg dry powder) รองลงมาคือผักชีลาว (39.06 ± 1.31 µM Fe(II)/mg dry powder) ส่วนรำข้าวเหนียวดำลืมผัว ใบหม่อน ใบย่านาง มะเขือเทศ ข้าวเหนียวดำลืมผัว ซังข้าวโพดม่วง และเมล็ดข้าวโพดม่วง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay รองลงมาตามลำดับ (27.92 ± 0.31, 22.84 ± 1.17, 17.57 ± 0.86, 9.55 ± 0.01, 8.24 ± 0.13, 7.61 ± 0.22 และ 3.75 ± 0.09 µM Fe(II)/mg dry powder ตามลำดับ)

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชทั้ง 9 ชนิด ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay และ FRAP assay

พืชทั้ง 9 ชนิด	DPPH radical scavenging assay (IC_{50} µg dry powder/ml)	FRAP assay (µM Fe(II)/mg dry powder)
ซังข้าวโพดม่วง	1222.85 ± 1.03	7.61 ± 0.22
เมล็ดข้าวโพดม่วง	1702.69 ± 4.52	3.75 ± 0.09
ข้าวเหนียวดำลืมผัว	833.47 ± 0.12	8.24 ± 0.13
รำข้าวเหนียวดำลืมผัว	510.26 ± 1.72	27.92 ± 0.31
มะเขือเทศ	1176.60 ± 3.82	9.55 ± 0.01
ผักแพว	49.09 ± 0.98	47.30 ± 0.39
ใบหม่อน	584.76 ± 2.74	22.84 ± 1.17
ใบย่านาง	628.13 ± 1.71	17.57 ± 0.86
ผักชีลาว	337.88 ± 1.65	39.06 ± 1.31

ผลคะแนนการตรวจประเมินและการคัดเลือกพืชสำหรับพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันรังสี

ผลการคัดเลือกและคะแนนการตรวจประเมินพืชทั้ง 9 ชนิดแสดงในตารางที่ 3 ผลการประเมินพบว่าผักแพวมีคะแนนรวมการตรวจประเมินสูงสุด (86.67 คะแนน) รองลงมาคือรำข้าวเหนียวดำลืมผัว (82.22 คะแนน) ส่วนผักชีลาว ใบหม่อน ย่านาง ข้าวเหนียวดำลืมผัว มะเขือเทศ ซังข้าวโพดม่วง และข้าวโพดม่วง มีคะแนนรองลงมาตามลำดับ ในการทดลองนี้ผักแพวและรำข้าวเหนียวดำลืมผัวได้รับการคัดเลือกสำหรับนำไปทดสอบเพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันรังสีต่อไป

ตารางที่ 3 ค่าน้ำหนักคะแนนของแต่ละการตรวจประเมินและคะแนนรวมการตรวจประเมินของพืชทั้ง 9 ชนิด

พืชทั้ง 9 ชนิด	DPPH radical scavenging assay	ปริมาณสารแอนโทไซยานิน	FRAP assay	ปริมาณสารประกอบฟีโนลิก	คะแนนรวม
	ค่าน้ำหนัก ร้อยละ 40	ค่าน้ำหนัก ร้อยละ 30	ค่าน้ำหนัก ร้อยละ 20	ค่าน้ำหนัก ร้อยละ 10	ร้อยละ 100
ซังข้าวโพดสีม่วง	8.89	23.33	4.44	3.33	40.00
ข้าวโพดม่วง	4.44	20.00	2.22	1.11	27.78
ข้าวเหนียวดำลืมผัว	17.78	26.67	6.67	2.22	53.33
รำข้าวเหนียวดำลืมผัว	31.11	30.00	15.56	5.56	82.22
มะเขือเทศ	13.33	16.67	8.89	4.44	43.33
ผักแพว	40.00	16.67	20.00	10.00	86.67
ใบหม่อน	26.67	16.67	13.33	7.78	64.44
ย่านาง	22.22	16.67	11.11	6.67	56.67
ผักชีลาว	35.56	16.67	17.78	8.89	78.89

ผลการประเมินปริมาณสารประกอบฟีโนลิกและแอนโทไซยานินของสารสกัดรำข้าวเหนียวดำลืมผัวและสารสกัดผักแพว 5 อัตราส่วน

ผลการประเมินปริมาณสารประกอบฟีโนลิกและแอนโทไซยานินของสารสกัดรำข้าวเหนียวดำลืมผัวและสารสกัดผักแพวทั้ง 5 อัตราส่วนแสดงในตารางที่ 4 พบว่าอัตราส่วน 0:100 มีปริมาณสารประกอบฟีโนลิกสูงที่สุด (223.00 ± 9.70 mg/ml GAE/mg extract) รองลงมาคืออัตราส่วน 25:75 (204.00 ± 1.94 mg/ml GAE/mg extract) และลดลงตามลำดับในอัตราส่วน 50:50 75:25 และ 100:0 (129.19 ± 0.97, 79.71 ± 0.79 และ 37.75 ± 1.94 mg/ml GAE/mg extract ตามลำดับ) ส่วนปริมาณสารแอนโทไซยานินนั้น อัตราส่วน 100:0 มีปริมาณสารแอนโทไซยานินสูงสุด (6.36 ± 0.05 mg/ml CGE/mg extract) ตามมาด้วยอัตราส่วน 75:25 (4.86 ± 0.14 mg/ml CGE/mg extract) 50:50 และ 25:75 (3.58 ± 0.23, 1.97 ± 0.14 mg/ml CGE/mg extract ตามลำดับ) ส่วนอัตราส่วน 0:100 นั้น ไม่ได้ตรวจปริมาณสารแอนโทไซยานินเนื่องจากเป็นพืชที่ไม่มีสารดังกล่าว

ตารางที่ 4 ปริมาณสารประกอบฟีโนลิกและปริมาณสารแอนโทไซยานินของสารสกัดรำข้าวเหนียวดำลืมผัวและสารสกัดผักแพว 5 อัตราส่วน

อัตราส่วน OSBE:POE	ปริมาณสารประกอบฟีโนลิก (mg/ml GAE/mg extract)	ปริมาณสารแอนโทไซยานิน (mg/ml CGE/mg extract)
100:0	37.75 ± 1.94	6.36 ± 0.05
75:25	79.71 ± 0.79	4.86 ± 0.14
50:50	129.19 ± 0.97	3.58 ± 0.23
25:75	204.00 ± 1.94	1.97 ± 0.14
0:100	223.00 ± 9.70	-

ผลการประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay และ FRAP assay ของสารสกัดรำข้าวเหนียวดำลืมผัวและสารสกัดผักแพว 5 อัตราส่วน

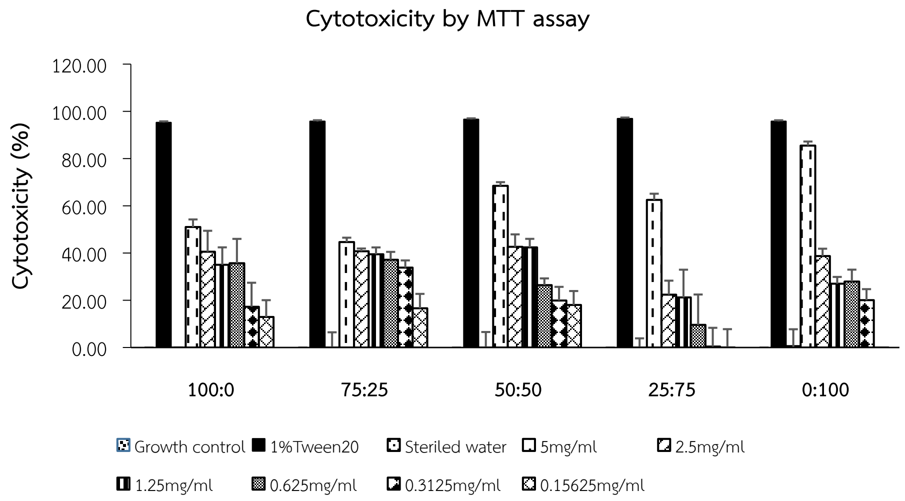
ผลการประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay และ FRAP assay แสดงในตารางที่ 5 และพบว่าอัตราส่วน 0:100 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay และ FRAP assay ดีที่สุดด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 11.51 ± 0.15 µg/ml และ FRAP เท่ากับ 279.18 ± 2.49 µM Fe(II)/mg extract รองลงมาคืออัตราส่วน 25:75 (21.41 ± 0.08 µg/ml, 237.82 ± 4.07 µM Fe(II)/mg extract) และลดลงตามลำดับในอัตราส่วน 50:50 75:25 และ 100:0 (26.91 ± 0.07, 38.95 ± 0.90, 140.85 ± 4.26 µg/ml และ 203.79 ± 4.62, 125.53 ± 2.11, 71.57 ± 0.92 µM Fe(II)/mg extract ตามลำดับ)

ตารางที่ 5 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรำข้าวเหนียวดำลืมผัวและสารสกัดผักแพวทั้ง 5 อัตราส่วน ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay และ FRAP assay

อัตราส่วน OSBE:POE	DPPH radical scavenging assay (IC_{50} µg/ml)	FRAP assay (µM Fe(II)/mg extract)
100:0	140.85 ± 4.26	71.57 ± 0.92
75:25	38.95 ± 0.90	125.53 ± 2.11
50:50	26.91 ± 0.07	203.79 ± 4.62
25:75	21.41 ± 0.08	237.82 ± 4.07
0:100	11.51 ± 0.15	279.18 ± 2.49

ผลการประเมินความเป็นพิษของสารสกัดรำข้าวเหนียวดำลืมผัวและสารสกัดผักแพว 5 อัตราส่วนในเซลล์เม็ดเลือดขาวหนูด้วยวิธี MTT assay

ผลการประเมินความเป็นพิษของสารสกัดรำข้าวเหนียวดำลืมผัวและสารสกัดผักแพว 5 อัตราส่วนในเซลล์เม็ดเลือดขาวหนูแสดงในรูปที่ 1 ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าสารสกัดทั้ง 5 อัตราส่วน ได้แก่ 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 และ 0:100 ที่ความเข้มข้น 5.0 มก./มล. มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวหนู ร้อยละ 51.02, 44.64, 68.45 62.50, และ 85.48 ตามลำดับ เมื่อเจือจางความเข้มข้นลดลงครึ่งหนึ่งจาก 5.0 มก./มล. จนถึง 0.156 มก./มล. พบว่าสารสกัดทั้ง 5 อัตราส่วนมีความเป็นพิษลดลงตามสัดส่วนความเข้มข้นของสารสกัด (dose dependent manner) และพบว่าที่ความเข้มข้น 0.156 มก./มล. อัตราส่วน 100:0, 75:25 และ 50:50 มีความเป็นพิษร้อยละ 12.93, 16.61, 18.02 ตามลำดับ ในขณะที่อัตราส่วน 25:75 และ 0:100 ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์



รูปที่ 1 การประเมินความเป็นพิษของสารสกัดผักแพวและสารสกัดรำข้าวเหนียวดำลืมผัวต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวหนูด้วยวิธี MTT assay

ผลคะแนนการตรวจประเมินและการคัดเลือกสูตรสำหรับพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันรังสี

ผลคะแนนการตรวจประเมินของสารสกัดอัตราส่วนต่างๆ แสดงในตารางที่ 6 พบว่าสารสกัดอัตราส่วน 0:100 มีผลคะแนนการตรวจประเมินสูงที่สุด (76 คะแนน) ตามมาด้วยอัตราส่วน 25:75 (68 คะแนน) 50:50 (60 คะแนน) 75:25 (52 คะแนน) และ 100:0 (44 คะแนน) เมื่อประเมินคะแนนการตรวจประเมินร่วมกับความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวหนู อัตราส่วน 25:75 และ 0:100 ถูกคัดเลือกเพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ป้องกันรังสีในเซลล์เม็ดเลือดขาวหนูและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันรังสีสำหรับผู้ป่วยรังสีร่วมรักษาระบบประสาทต่อไป

ตารางที่ 6 ค่าน้ำหนักคะแนนของแต่ละการตรวจประเมินและคะแนนรวมการตรวจประเมินของสารสกัดรำข้าวเหนียวดำลืมผัวและสารสกัดผักแพวที่อัตราส่วนต่างๆ

อัตราส่วน OSBE:POE	DPPH radical scavenging assay	ปริมาณสารแอนโทไซยานิน	FRAP assay	ปริมาณสารประกอบฟีโนลิก	คะแนนรวม
	ค่าน้ำหนัก ร้อยละ 40	ค่าน้ำหนัก ร้อยละ 30	ค่าน้ำหนัก ร้อยละ 20	ค่าน้ำหนัก ร้อยละ 10	ร้อยละ 100
100:0	30	8	4	2	44
75:25	24	16	8	4	52
50:50	18	24	12	6	60
25:75	12	32	16	8	68
0:100	6	40	20	10	76

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

จากผลการทดลองพบว่าผักแพว ผักชีลาว และรำข้าวเหนียวดำลืมผัวเป็นพืชที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay และ FRAP assay ดีที่สุด 3 อันดับแรก ส่วนปริมาณสารประกอบฟีโนลิกนั้นผักแพว ผักชีลาว และใบหม่อนมีปริมาณมากที่สุด 3 อันดับแรก ในขณะที่รำข้าวเหนียวดำมีปริมาณสารประกอบฟีโนลิกไม่สูงมากแต่มีปริมาณสารแอนโทไซยานินสูงที่สุด ทั้งนี้ปริมาณสารประกอบฟีโนลิกและสารแอนโทไซยานินในพืชแต่ละชนิดนั้นมีความสัมพันธ์กับความสามารถของพืชในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นไปในทางเดียวกันกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่แสดงให้เห็นว่าสารประกอบฟีโนลิกในพืชนั้นสามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้โดยการให้ไฮโดรเจนไอออนให้แก่สารอนุมูลอิสระหรือดึงอิเล็กตรอนจากสารอนุมูลอิสระ[20] ซึ่งความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารแต่ละตัวนั้นขึ้นอยู่กับจำนวนและตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิล (OH) และจำนวนพันธะคู่ของ C2-C3 บนวงแหวนฟีนอลของสารนั้นๆ[21] ในการทดลองนี้รำข้าวเหนียวดำลืมผัวมีปริมาณสารประกอบฟีโนลิกต่ำกว่าใบหม่อนและใบย่านางแต่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่า น่าจะเป็นผลมาจากโครงสร้างของสารสำคัญของรำข้าวเหนียวดำลืมผัวคือกลุ่มของสารแอนโทไซยานินที่มีวงแหวนฟีนอลและจำนวน OH บนวงแหวนจำนวนมากกว่าสารสำคัญของใบหม่อนและใบย่านางคือ Chlorogenic acid และ α-Tocopherol ตามลำดับ[22,23] ซึ่งมีวงแหวนฟีนอลวงเดียวและจำนวน OH น้อย

สืบเนื่องจากการที่รังสีสามารถก่อความเสียหายแก่เซลล์ได้หลายรูปแบบ การป้องกันเซลล์จากรังสีในหลายๆ เป้าหมายจึงมีความสำคัญ ในการวิจัยนี้จึงใช้การประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดพืชด้วยหลายวิธี ได้แก่ การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay และ FRAP assay ปริมาณสารประกอบฟีโนลิกและสารแอนโทไซยานินของสารสกัดพืชจากผลโดยอ้อมของรังสีที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระหลักประเภท Hydroxyl radical (•OH)

Hydrogen radical (H•) Hydroperoxyl free radical (HO_2•)[5] ซึ่งมีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวอยู่ทำให้เกิดความเสียหายแก่เซลล์ในร่างกายได้โดยเฉพาะสายดีเอ็นเอ การศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดพืชในการให้ไฮโดรเจนไอออนหรือดึงอิเล็กตรอนจากอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay จึงมีความสำคัญมากในการป้องกันผลจากรังสีและในงานวิจัยนี้ให้ค่าคะแนนถ่วงน้ำหนักร้อยละ 40 นอกจากนี้มีรายงานว่าสารแอนโทไซยานินช่วยทำให้สายดีเอ็นเอมีความเสถียรมากขึ้น ทำให้สามารถป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอซึ่งเป็นเป้าหมายสำคัญของสารอนุมูลอิสระที่เกิดจากรังสี[24,25] และสามารถป้องกันความเสียหายจากรังสีให้แก่เซลล์ได้ดี[6,9] จึงมีความสำคัญในการป้องกันผลจากรังสีและให้ค่าคะแนนถ่วงน้ำหนักร้อยละ 30 ส่วน FRAP assay นั้นเป็นการดูความสามารถของสารสกัดในการให้อิเล็กตรอน[26] ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งในการช่วยทำให้สารอนุมูลอิสระเป็นกลาง ให้ค่าคะแนนถ่วงน้ำหนักร้อยละ 20 และจากที่ได้กล่าวมาข้างต้นว่าปริมาณสารประกอบฟีโนลิกนั้นมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของพืชจึงให้ค่าคะแนนถ่วงน้ำหนักร้อยละ 10 สำหรับประเมินและคัดเลือกพืชที่มีศักยภาพมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับป้องกันรังสีสำหรับผู้ป่วยรังสีร่วมรักษาระบบประสาท

จากเกณฑ์การประเมินและให้คะแนนดังกล่าวพบว่าผักแพวและรำข้าวเหนียวดำลืมผัวถูกคัดเลือกมาศึกษาตำรับหรืออัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันรังสี ซึ่งผลการประเมินพบว่าอัตราส่วนของสารสกัดรำข้าวเหนียวดำลืมผัวและสารสกัดผักแพวที่อัตราส่วน 25:75 และ 0:100 นั้นมีคะแนนการประเมินดีที่สุด 2 อันดับแรก และผลการศึกษาในหลอดแก้วนั้นแสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีโนลิกเป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังพบว่า 2 อัตราส่วนนี้ในความเข้มข้นสูงนั้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์สูงกว่าความเข้มข้นต่ำมากและสูงกว่าอัตราส่วนอื่น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดผักแพวต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และเซลล์มะเร็งตับชนิดเซลล์ต้นกำเนิด[27] แต่เมื่อลดความเข้มข้นลงพบว่ามีความเป็นพิษน้อยกว่าอัตราส่วนอื่นๆ และไม่พบความเป็นพิษเมื่อมีความเข้มข้น 0.156 มก./มล. ในขณะที่อัตราส่วนที่มีสารสกัดรำข้าวเหนียวดำลืมผัวนั้นมีค่า %cytotoxicity ค่อนข้างสูง ซึ่งมีงานวิจัยก่อนหน้านี้รายงานถึงศักยภาพของสารสกัดจากข้าวสีม่วงในการทำลายเซลล์มะเร็งพบว่าความเข้มข้น 0.2 มก./มล. สามารถทำให้เซลล์มะเร็งตายได้ร้อยละ 20-60[28] ในการทดลองนี้จึงพบความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวหนูของสารสกัดที่มีอัตราส่วนของรำข้าวเหนียวดำลืมผัวและผักแพว 100:0, 75:25 และ 50:50 สูงกว่าอัตราส่วน 25:75 และ 0:100 และเมื่อเปรียบเทียบที่ความเข้มข้นเดียวกันพบว่าอัตราส่วน 25:75 มีค่า %cytotoxicity ต่ำกว่า 0:100 ทั้งนี้อาจจะเป็นผลมาจากสารประกอบที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดทั้ง 2 ชนิดถูกยับยั้ง จากสารประกอบของสารสกัดอีกชนิดหนึ่ง (masking effect) ส่งผลให้สารสกัดอัตราส่วน 25:75 มีความเป็นพิษน้อยลง

เมื่อพิจารณาจากคะแนนประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพและความเป็นพิษต่อเซลล์ สกัดรำ

ข้าวเหนียวดำลืมผัวและผักแพวอัตราส่วน 25:75 และ 0:100 มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่เหมาะสมที่สุด น่าจะมีศักยภาพในการป้องกันรังสีได้ จึงถูกคัดเลือกเพื่อประเมินฤทธิ์ป้องกันอันตรายจากรังสีในเซลล์เม็ดเลือดขาวหนูชนิดเซลล์ต้นกำเนิดและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันอันตรายจากรังสีสำหรับผู้ป่วยรังสีร่วมรักษาระบบประสาทต่อไป อย่างไรก็ตามการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพนี้เป็นเพียงการประเมินศักยภาพของสารสกัดขั้นต้นเท่านั้น ยังต้องมีการทดสอบศักยภาพของสารสกัดในการป้องกันรังสีให้แก่เซลล์ทั้งเซลล์เม็ดเลือดขาวหนูและเซลล์เม็ดเลือดขาวคนรวมถึงทดสอบความเป็นพิษทั้งชนิดเฉียบพลันและเรื้อรังในสัตว์ทดลองก่อนจะนำมาใช้ในทางคลินิก

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสถาบันวิจัยเพื่อพัฒนาสมรรถนะมนุษย์และการสร้างเสริมสุขภาพ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 ขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาการแพทย์ทางเลือกแบบบูรณาการ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ในการทำวิจัย และรองศาสตราจารย์ ดร. พลัง สุริหาร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์ข้าวโพดม่วงสำหรับทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. Rerksoontree T, Munkong W, Somboon-nithiphol K, Takong W. Epidemiology and trends of neurovascular disease, in Northeast of Thailand; Angiographic base [Diploma of Thai Board of Diagnostic Radiology of The Medical Council of Thailand 2018]. Khon Kaen: Faculty of Medicine, Khon Kaen University; 2018.
2. Manninen AL, Isokangas JM, Karttunen A, Siniluoto T, Nieminen MT. A comparison of radiation exposure between diagnostic CTA and DSA examinations of cerebral and cervicocerebral vessels. AJNR Am J Neuroradiol 2012;33:2038-42.
3. Faulkner K, Vano E. Deterministic effects in interventional radiology. Radiat Prot Dosimetry 2001;94:95-8.
4. Berrington de Gonzâlez A, Darby S. Risk of cancer from diagnostic X-rays: estimates for the UK and 14 other countries. Lancet 2004;363:345-51.
5. ณรงชัย อัศวพรหมพร. ความรู้พื้นฐานทางชีววิทยารังสีทางการแพทย์. กรุงเทพฯ: แดแน็กซ์ อินเตอร์คอร์ปอเรชั่น, 2562.
6. Fan ZL, Wang ZY, Zuo LL, Tian SQ. Protective effect of anthocyanins from lingonberry on radiation-induced damages. Int J Environ Res Public Health 2012;9:4732-43.
7. Kuefner MA, Brand M, Ehrlich J, Braga L, Uder M, Semelka RC. Effect of antioxidants on X-ray-induced γ-H2AX foci in human blood lymphocytes: preliminary observations. Radiology 2012;264:59-67.

8. Brand M, Sommer M, Ellmann S, Wuest W, May MS, Eller A, et al. Influence of different antioxidants on x-ray induced DNA double-strand breaks (DSBs) using γ-H2AX immunofluorescence microscopy in a preliminary study. PLoS One 2015; 10: e0127142.
9. Ghasemnezhad R, Homayoun M, Mansouri S, Soukhtanloo M, Soleymanifard S, Seghatoleslam M. Radio protective effect of black mulberry extract on radiation- induced damage in bone marrow cells and liver in rat. Radiation Physics and Chemistry 2016;130.
10. Junsathian P, Yordtong K, Corpuz HM, Katayama S, Nakamura S, Rawdkuen S. Biological and neuroprotective activity of Thai edible plant extracts. Industrial Crops & Products 2018;124:548-54.
11. สุวรรณาจันคนา. การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของใบย่านาง. วารสารวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์, 2556:77-83.
12. อฑิตยา โรจนสโรช. สารต้านอนุมูลอิสระในข้าวดำข้าวเหนียวดำและข้าวแดง : การป้องกันการเป็นพิษต่อเซลล์และสารพันธุกรรมจากอนุมูลอิสระและการแสดงออกของยีนสะสมไขมันในเซลล์เพาะเลี้ยง [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิตสาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์]. กรุงเทพ:คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2551.
13. Ramos-Escudero F, Munoz AM, Alvarado-Ortiz C, Alvarado A, Yanez JA. Purple corn (*Zea mays* L.) phenolic compounds profile and it's assessment as an agent against oxidative stress in isolated mouse organs. J Med Food 2012;15:206-15.
14. Selen Isbilir S, Sagiroglu A. Antioxidant potential of different dill (*Anethum Graveolens* L.) leaf extracts. International Journal of Food Properties 2011;14:894-902.
15. Silaste ML, Kesaniemi YA, Horkko S, Alfthan G, Aro A. Tomato juice decreases LDL cholesterol levels and increases LDL resistance to oxidation. British Journal of Nutrition 2019;98:1251-8.
16. Kirisattayakul W. Development and evaluation of cognitive enhancement product made from selected Thai herbs for postmenopausal women [PhD Dissertation in Neuroscience]. Khon Kaen: The Graduate School, Khon Kaen University; 2017.
17. Kirisattayakul W, Tong-Un, T, Wattanathorn, J, Muchimapura, S, Wannanon, P, Jittiwat, J. Evaluation of total phenolic compound, antioxidant effect and neuropharmacological

activities of *Moringa oleifera* Lam. leaves extract. วารสารประสาทวิทยาศาสตร์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 2554;6:80-92.

18. Poulsen KA, Andersen EC, Hansen CF, Klausen TK, Hougaard C, Lambert IH, et al. Deregulation of apoptotic volume decrease and ionic movements in multidrug-resistant tumor cells: role of chloride channels. Am J Physiol Cell Physiol 2010;298:C14-25.
19. Wattanathorn J, Wannanon P, Muchimapura S, Thukham-Mee W, Tong-Un T, Polyiam P. Toxicity Evaluation of Anacardium occidentale, the Potential Aphrodisiac Herb. Biomed Res Int 2019;2019:1459141
20. Nimse SB, Pal D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms.RSC Advances 2015;35: 27986-8006.
21. Seyoum A, Asres K, El-Fiky FK. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. Phytochemistry 2006;67:2058-70.
22. Yu Y, Li H, Zhang B, Wang J, Shi X, Huang J, et al. Nutritional and functional components of mulberry leaves from different varieties: Evaluation of their potential as food materials. Int J Food Prop 2018:21:1495-507.
23. Chaveerach A, Lertsatitthanakorn P, Tanee T, Puangjit N, Patarapadungkit N, Sudmoon R. Chemical constituents, antioxidant property, cytotoxicity and genotoxicity of *Tiliacora Triandra.* International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research 2016;8: 722-9.
24. Kong JM, Chia LS, Goh NK, Chia TF, Brouillard R. Analysis and biological activities of anthocyanins. Phytochemistry 2003;64:923-33.
25. Webb MR, Min K, Ebeler SE. Anthocyanin Interactions with DNA: Intercalation, Topoisomerase I Inhibition and Oxidative Reactions. J Food Biochem 2008;32:576-96.
26. Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. J Agric Food Chem 2005;53:1841-56.
27. Putthawan P, Poeaim S, Areekul V. Cytotoxic activity and apoptotic induction of some edible Thai local plant extracts against colon and liver cancer cell lines. Trop J Pharm Res 2017;16:2927-33.
28. Banjerdpongchai R, Wudtiwai B, Sringarm K. Cytotoxic and apoptotic-inducing effects of purple rice extracts and chemotherapeutic drugs on human cancer cell lines. Asian Pac J Cancer Prev 2018;14:6541-8.