# บทที่ 1
# บทนำ

## ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ลำไยเถา (*Dimocarpus longan* var. *obtusus* Leenh.) เป็นพืชท้องถิ่นที่พบได้ทั่วไปในแถบภาคตะวันออกของประเทศไทย โดยเฉพาะในจังหวัดชลบุรี และเกาะแสมสาร ลำไยเถามีลักษณะลำต้นเลื้อยคล้ายเถาวัลย์ ชอบขึ้นตามป่า ผลสุกมีกลิ่นหอมหวานเฉพาะตัว เมล็ดมีขนาดใหญ่ ลำไยเถาเหมาะสำหรับการปลูกเป็นร่มเงาไว้พักอาศัย และไม่เป็นที่นิยมในการบริโภคมากนักเมื่อเทียบกับพันธุ์ลำไยต้น (*Dimocarpus longan* Lour.) เช่น ลำไยกะโหลก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดที่ต้องการนำลำไยเถาไปใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด พร้อมกับเป็นการอนุรักษ์พืชท้องถิ่นในจังหวัดชลบุรี

ปัจจุบันมีงานวิจัยอย่างมากเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การต้านมะเร็ง และต้านการอักเสบจากสารสกัดเมล็ด ดอก และเปลือกจากลำไยต้น (Hsieh et al., 2008; Huang et al., 2012; Panyathep et al., 2013) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับฤทธิ์การต้านการอักเสบจากเมล็ดลำไยเถา งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของจากเมล็ดลำไยเถาเพื่อหาฤทธิ์การต้านการอักเสบในระดับเซลล์ (cell culture) รวมไปถึงการหาปริมาณที่ปลอดภัยของสารสกัดเมล็ดลำไยเถาต่อเซลล์เพื่อนำไปสู่การใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ ผลการวิจัยนี้อาจมีส่วนช่วยส่งเสริมการปลูก การบริโภคและการนำส่วนต่างๆของลำไยเถาไปใช้ประโยชน์

## วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านอักเสบจากสารสกัดเมล็ดลำไยเถา
2. เพื่อศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7

## ขอบเขตของโครงการวิจัย

ใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวแมคโครฟาจ (RAW 264.7) นำมากระตุ้นด้วยสารlipopolysaccharide (LPS) เพื่อเหนี่ยวนำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวนี้เกิดการอักเสบขึ้น และนำสารสกัดจากเมล็ดลำไยเถามาทดสอบในเซลล์แมคโครฟาจเพื่อดูความสามารถในการยับยั้งการอักเสบที่เกิดขึ้นจากสารสกัดเมล็ดลำไยเถา ควบคู่กับการหาปริมาณสารสกัดจากลำไยเถาที่อยู่ในระดับปลอดภัยต่อเซลล์

## ระยะเวลาทำการวิจัย

ตุลาคม 2559 – สิงหาคม 2560

## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.ทำให้ทราบถึงฤทธิ์การต้านอักเสบในสารสกัดจากเมล็ดลำไยเถา

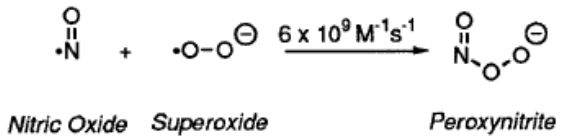
2.สามารถนำผลการวิจัยที่ได้นำมาใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการให้ความรู้กับชุมชนในคุณประโยชน์ของลำไยเถา และอาจนำไปสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ

# บทที่ 2
# การทบทวนวรรณกรรม

**การอักเสบ (Inflammation)**

การอักเสบเป็นกระบวนการที่สำคัญในการระบบภูมิคุ้มกันเพื่อป้องกันร่างกายจากการติดเชื้อโรค โดยสามารถแบ่งชนิดการอักเสบได้ 2 ชนิดคือ 1) การอักเสบเฉียบพลัน (acute inflammation) ซึ่งจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วภายในระยะเวลาเป็นวินาทีหรือนาที หลังจากได้รับสิ่งกระตุ้นและคงอยู่ประมาณ 2 ถึง 3 วัน แต่มักไม่เกินหนึ่งสัปดาห์ การอักเสบแบบเฉียบพลันช่วยในการกำจัดเชื้อโรคซึ่งเป็นผลดีแก่ร่างกายและ 2) การอักเสบเรื้อรัง (chronic inflammation) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ร่างกายมีการอักเสบเป็นระยะเวลาหลายสัปดาห์หรือหลายเดือน ลักษณะสำคัญของการอักเสบเรื้อรัง คือ มีการสร้างเนื้อเยื่อพังผืดขึ้น มีการสร้างหลอดเลือดขึ้นจำนวนมาก และพบเซลล์อักเสบชนิดแมคโครฟาจ (macrophages) และ ลิมโฟไซต์ (lymphocytes) ซึ่งเซลล์เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการกระบวนการอักเสบ และเกี่ยวข้องกับการปล่อยสารสื่อกลางทางเคมี (chemical mediators) ที่สำคัญ ได้แก่ ไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide), prostaglandins และ cytokine (Hseu et al., 2005) ถ้าร่างกายเกิดกระบวนการอักเสบอย่างเรื้อรัง อาจนำไปสู่การเกิดโรคหัวใจ เบาหวาน ภาวะน้ำหนักเกิน หรือมะเร็ง (Mantovani et al., 2008)

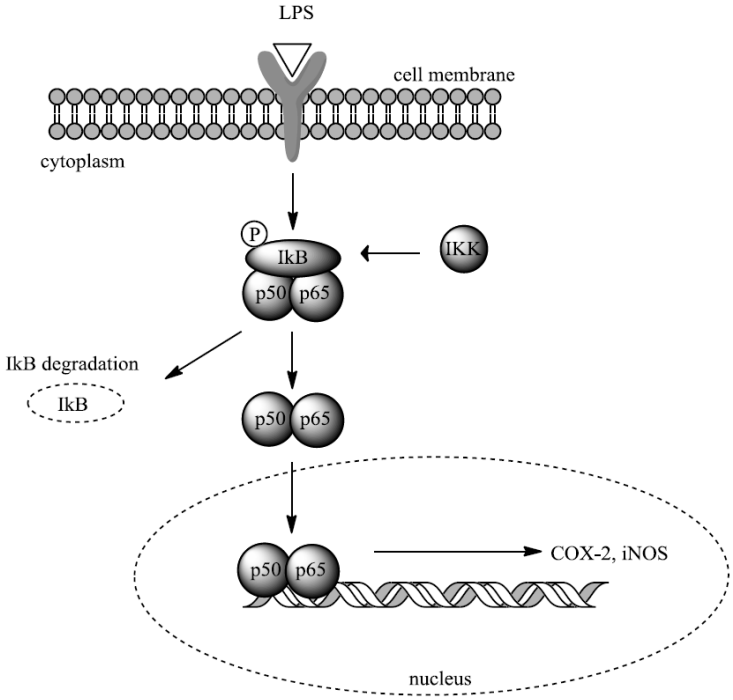
ไนตริกออกไซด์เป็นอนุมูลอิสระที่ถูกผลิตจากกระบวนการเปลี่ยน L-arginine ได้เป็น L-citrulline โดยเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) ซึ่งมีทั้งหมด 3 isoforms ได้แก่ neuronal NOS (nNOS) endothelial NOS (eNOS) และ inducible NOS (iNOS) ในสภาวะปกติ ไนตริกออกไซด์ถูกผลิตจากการทำงานของเอนไซม์ nNOS และ eNOS ซึ่งจะมีปริมาณไม่มาก แต่ระหว่างเกิดการอักเสบจากการกระตุ้นจากสิ่งแปลกปลอม เช่น แบคทีเรีย รา และไวรัส ไนตริกออกไซด์จะถูกผลิตออกมาอย่างมาก โดยการทำงานของเอนไซม์ iNOS ซึ่งอาจก่อให้เกิดโรคต่างๆ เช่น ภาวะการอักเสบเรื้อรัง อัลไซเมอร์ พาร์กินสัน ภาวะหลอดเลือดแข็ง และโรคมะเร็ง นอกจากนี้ปริมาณไนตริกออกไซด์ที่มากขึ้นนี้สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ superoxide anion เกิดเป็น peroxynitrite (ONOO-) (ภาพที่ 1) ที่สามารถก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ได้อย่างรุนแรง โดยทำลายสารพันธุกรรม (DNA) และโปรตีน (Sautebin, 2000)




**ภาพที่** 1 ปฏิกิริยาระหว่างไนตริกออกไซด์ (NO) และอนุมูลอิสระ superoxide anion (Huie and Padmaja, 1993)

Transcription factor ที่สำคัญและทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของ iNOS เมื่อถูกกระตุ้นด้วย cytokines หรือ LPS ในเซลล์ คือ NF-κB (ประกอบด้วยโปรตีน p50 และ p65) ในสภาวะปกติที่เซลล์ไม่ถูกกระตุ้น NF-κB จะถูกจับโดย IκB และอยู่ใน cytosol เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นจะมีการส่ง

สัญญาณให้มีการสลาย IκB ส่งผลให้ NF-κB เกิดกระบวนการ translocation เข้าสู่นิวเคลียสเพื่อกระตุ้นการแสดงออกของยีน iNOS และส่งผลต่อกระบวนการอักเสบในร่างกาย (ภาพที่ 2)




**ภาพที่ 2** NF-κB signaling pathway ดัดแปลงจาก (Pande et al., 2009)

**<u>การอักเสบแบบเรื้อรังและโรคมะเร็ง</u>**

การเกิดโรคมะเร็งมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับการอักเสบ การเกิดเนื้องอกมักจะพบบริเวณเนื้อเยื่อที่เกิดการอักเสบเรื้อรัง นอกจากนี้โรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบเรื้อรังมีความเสี่ยงที่จะพัฒนาไปสู่มะเร็งชนิดต่างๆ (Mantovani et al., 2008) ยกตัวอย่างเช่น ผู้ป่วยที่เป็นโรคลำไส้อักเสบเรื้อรัง (Inflammatory bowel disease) มีโอกาสเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ (colon cancer) เพิ่มขึ้น 10 เท่า (Coussens and Werb, 2002) การสื่อสารของเซลล์ (signaling pathways) ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบยังมีส่วนควบคุมการกลายพันธุ์ของยีนก่อมะเร็ง (oncogenic mutation) นอกจากนี้การทดลองพบว่าการใช้ยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตอรอยด์ (Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs, NSAIDs) เช่น aspirin สามารถลดความเสี่ยงการพัฒนามะเร็งลำไส้ใหญ่และเต้านม (Mantovani et al., 2008)

**<u>การยับยั้งการอักเสบ</u>**

สารต่างๆที่มีฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่มากเกินไปและ prostaglandin สามารถนำมาใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจากการอักเสบได้ เช่น การใช้ตัวยับยั้งเอนไซม์ iNOS (iNOS inhibitor) หรือการยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS โดยทั่วไปการยับยั้งการอักเสบจะใช้ยาต้านการอักเสบชนิดที่ไม่ใช้สเตียรอยด์ (NSAIDs) เช่น aspirin, ibuprofen ซึ่งเป็นยากลุ่มที่ใช้เป็นยาแก้ปวดได้ดีโดยเฉพาะอาการปวดจากการอักเสบ อย่างไรก็ตามการใช้ยากลุ่มนี้ทำให้เกิดผลข้างเคียงตามมา เช่น แผลในกระเพาะอาหาร (Vane and Botting, 1998)

ในปัจจุบันได้มีความพยายามในการค้นหาสารจากธรรมชาติที่สามารถต้านการอักเสบได้ เนื่องมาจากสารธรรมชาติมีความปลอดภัย และมีผลข้างเคียงน้อยกว่าสารสังเคราะห์ นักวิทยาศาสตร์ได้ค้นพบสารพฤกษเคมี (phytochemicals) เช่น สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) สารกลุ่ม iridoids หรือแอนโทไซยานิน (anthocyanin) ในพืช ผัก ผลไม้ และสมุนไพรหลายชนิดที่มีความสามารถในการต้านอักเสบ เช่น ในขมิ้นชันมีสารสำคัญที่ชื่อว่า curcumin และสาร quercetin จากหัวหอมที่สามารถลดการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจด้วยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ iNOS (Cheung et al., 2009; Raso et al., 2001) นอกจากนี้มีการค้นพบสารประกอบสำคัญในฟ้าทะลายโจร ได้แก่ andrographolide และ neoandrographolide ซึ่งสามารถยับยั้งการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจได้ (Chandrasekaran et al., 2011)

**<u>ลำไยเถา (*Dimocarpus longan* var. *obtusus* Leenh.)</u>**

ต้นลำไยเถาเป็นไม้ยืนต้นที่มีทรงพุ่มแผ่กว้าง เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Sapindaceae ขนาดของทรงพุ่มมีตั้งแต่ขนาดกลางจนถึงขนาดใหญ่ขึ้นอยู่กับพันธุ์ เมื่อเจริญเติบโตเต็มที่จะสูงประมาณ 10-12 เมตร ง่ามกิ่งไม่เหนียวพอเมื่อรับน้ำหนักลูกมากๆจะฉีกขาดง่าย (วิรัตน์, 2543) ต้นลำไยเถาสามารถเป็นไม้ประดับได้อย่างดีเพราะมียอดสูง กิ่งก้านแผ่กระจายอย่างสวยงาม และลำต้นที่ตั้งตรงแต่เปลือกของลำไยขรุขระไม่เรียบและมีสีน้ำตาลหรือสีเทากิ่งก้านสาขาแตกออกจากลำต้นและเปราะ เนื้อไม้ไม่แข็งแรงมากนักจึงทำให้กิ่งหักง่าย พบในเขตจังหวัดสุรินทร์และชลบุรี (เกาะแสมสาร) ขึ้นตามป่าละเมาะ ใกล้ฝั่งทะเล และบนพื้นที่โล่งชายป่าดิบแล้ง ระดับความสูง 0-200 เมตร ออกดอกเดือนเมษายน-มิถุนายน ออกผลเดือน พฤษภาคม-กันยายน (พิชัย, 2531)

ใบของลำไยเถาเป็นแบบ ใบย่อยแต่ละใบแยกออกจากก้าน 2 ข้างของแกนกลาง คล้ายขนนกเป็นก้านของใบรวมยาวประมาณ 20-30 เซนติเมตร ใบยอดมี 2-3 คู่ แตกออกตรงข้ามหรือสลับกับใบย่อย รูปร่างลักษณะของใบต่างกันตั้งแต่รูปวงรีจนถึงรูปหอกบริเวณที่ปลายใบและฐานใบค่อนข้างป้าน ใบไม่มีขน สีเขียวเข้ม ด้านหลังใบมีสีเขียวเข้มกว่าด้านท้องของใบผิวใบด้านหลังเรียบ ส่วนด้านท้องสากเล็กน้อย (วิรัตน์, 2543) ขอบใบเป็นคลื่นมีเส้นแตกออกจากเส้นกลางใบจำนวนมาก (พิชัย, 2531)

ช่อ มีการแตกก้านดอกออกเป็นแขนงจากก้านที่แตก และแต่ละก้านก็จะแตกแขนงออกมาอีก ช่อดอกเกิดจากตาดอกที่บริเวณปลายกิ่งแต่บางครั้งก็เจริญจากตาข้างของกิ่งได้ ดอกของลำไยเถามีสีขาวนวลแบ่งได้ 3 ชนิดคือ ดอกตัวผู้ ดอกตัวเมียและดอกกระเทย ซึ่งทั้ง 3 ชนิดจะอยู่ในช่อเดียวกันในแต่ละช่อจะมีดอกจำนวนมากโดยดอกตัวผู้จะมีมากกกว่าดอกตัวเมียหลายเท่าตัว ส่วนดอกกระเทยนั้นพบค่อนข้างน้อยดอกลำไยเถามีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 6-8 มิลลิเมตร มีกลีบดอกสีขาวหม่นจำนวน 5 กลีบ กลีบดอกเหล่านี้จะบางเรียบเล็ก (วิรัตน์, 2543)

ผลของลำไยเถาจะเกิดจากช่อที่อยู่ตรงปลายกิ่งที่ได้รับแสงและอากาศเพียงพอเพื่อการเจริญเติบโต ผลค่อนข้างกลมหรือรูปไข่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 นิ้วหรือน้อยกว่า เปลือกของผลบางและมีสีน้ำตาลอ่อน ลักษณะของเปลือกจะเป็นตุ่มแบนๆ (พิชัย, 2531)

เนื้อของลำไยเถามีสีขาวขุ่นๆ คล้ายวุ้นและมีรสหวาน เนื้อจะเจริญรอบเมล็ดและอยู่ระหว่างเปลือกและเมล็ดเกิดจากเนื้อเยื่อบริเวณฐานของเมล็ด

เมล็ดของลำไยเถา ลักษณะกลมมีเมล็ดอยู่เมล็ดเดียว สีดำเข้ม และมันสวย เมล็ดโตสม่ำเสมอ ด้านบนของเมล็ดมีบริเวณที่เป็นวงกลมสีขาวที่มีลักษณะเหมือนตา (พาวินและคณะ, 2547) เมล็ดโตกว่าลำไยต้น เนื้อผลบางมีกลิ่นคล้ายกำมะถัน นิยมปลูกไว้สำหรับเป็นไม้ประดับมากกว่าปลูกไว้รับประทาน อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อมูลการออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดของเมล็ดในลำไยเถา (ภาพที่ 3)

**ภาพที่ 3** ลักษณะต้น และผลลำไยเถา

**องค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดลำไย**

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดลำไย (Wisitsak et al., 2012) พบว่าเมล็ดลำไยมีปริมาณความชื้น เถ้า โปรตีน ไขมัน กากใย และคาร์โบไฮเดรต ดังแสดงในตารางที่ 1

**ตารางที่ 1** ส่วนประกอบทางเคมีของเมล็ดลำไย

| องค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดลำไย | เมล็ดลำไย (ร้อยละ) |
|---|---|
| ปริมาณความชื้น | 7.40±0.27 |
| เถ้า | 1.73±0.02 |
| โปรตีน | 7.17±0.12 |
| ไขมัน | 0.23±0.04 |
| กากใย | 7.89±0.09 |
| คาร์โบไฮเดรต | 75.57±0.28 |

ที่มา : (Wisitsak et al., 2012)

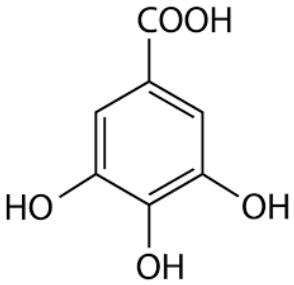
**สารประกอบที่สำคัญในลำไย**

ในสมัยก่อนในการแพทย์แผนโบราณของจีน (Traditional Chinese Medicine) มีการใช้ลำไยอบแห้งเพื่อลดอาการบวม และใช้ในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ บำรุงเลือด หรือบำรุงร่างกาย ปัจจุบันมีงานวิจัยอย่างมากเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดจากเมล็ด ดอก และเปลือกจากลำไยต้น (*Dimocarpus longan* Lour.) (Hsieh et al., 2008; Huang et al., 2012; Panyathep et al., 2013) ได้มีการค้นพบสารประกอบฟีนอลิกในเมล็ดลำไยต้น ยกตัวอย่างเช่น กรดแกลลิก (gallic acid), กรดแอลลาจิก (ellagic acid) และโคริลาจิน (corilagin) (Rangkadilok et al., 2005) ซึ่งปริมาณที่พบจะแตกต่างกันในส่วนเนื้อ เปลือก และเมล็ด และขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ในส่วนของเมล็ด ทั้งเมล็ดลำไยสด และเมล็ดลำไยที่ผ่านการอบแห้งจะพบปริมาณสารประกอบฟีนอลิคมากที่สุด โดยจะพบสารโคริลาจิน (corilagin) มากที่สุดในเมล็ดสดและเมล็ดแห้ง ตามลำดับ ส่วนลำไยพันธุ์ใบดำ แดงกลม และแห้วมีปริมาณ gallic acid และ ellagic acid สูงที่สุด (Rangkadilok et al., 2005) นอกจากนี้สารสกัดจากเมล็ดในลำไยต้นยังสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตาย (apoptosis) ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Chung et al., 2010) ในส่วนอื่นๆของต้นลำไยยังออกฤทธิ์ทางชีวภาพเช่นกัน เช่น เปลือกลำไยต้นมีปริมาณสารพฤกษเคมีสูง เช่น สารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และมีการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและไวรัส ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และต้านโรคมะเร็ง (Huang et al., 2012)

การศึกษาของ (Kunworarath et al., 2016) ต่อฤทธิ์การต้านการอักเสบ (anti-inflammation) ในลำไยต้นพันธุ์อีดอพบว่า สารสกัดด้วยน้ำร้อนจากส่วนของดอก (flower) เมล็ด (seed) และเนื้อ (pulp) มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดไนตริกออกไซด์ในเซลล์ RAW 264.7 โดยสารสกัดจากดอกมีความสามารถในการยับยั้งสูงสุด รองลงมาคือสารสกัดจากเมล็ด และเนื้อมีความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์น้อยที่สุด ซึ่งสารสกัดเหล่านี้มีความสามารถในการลดการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS และยังพบว่าส่วนของดอกลำไยประกอบไปด้วยสารประกอบฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ corilagin และ ellagic acid สูงที่สุด เมื่อเทียบกับส่วนอื่น

**กรดแกลลิก (Gallic acid)**

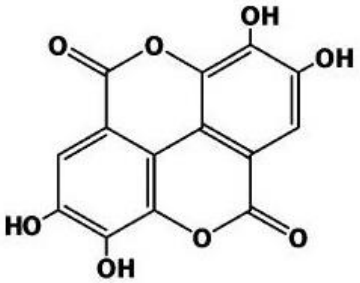
กรดแกลลิกเป็นกรดอินทรีย์ ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยป้องกันเซลล์จากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation reaction) ช่วยป้องกันเซลล์จากความเครียด เมื่ออายุมากขึ้นจะช่วยลดโรคหัวใจและโรคมะเร็งในผู้สูงอายุ สามารถพบได้ในอาหาร เช่น บลูเบอร์รี่ แอปเปิ้ล ใบชา วอลนัท และผลไม้ตระกูลเบอร์รี่นั้นจัดว่ามีปริมาณกรดแกลลิกมากโดยเฉพาะอย่างยิ่ง ผลราสเบอร์รี่สีแดง




**ภาพที่ 4** โครงสร้างทางเคมีของกรดแกลลิก

**กรดแอลลาจิก (Ellagic acid)**

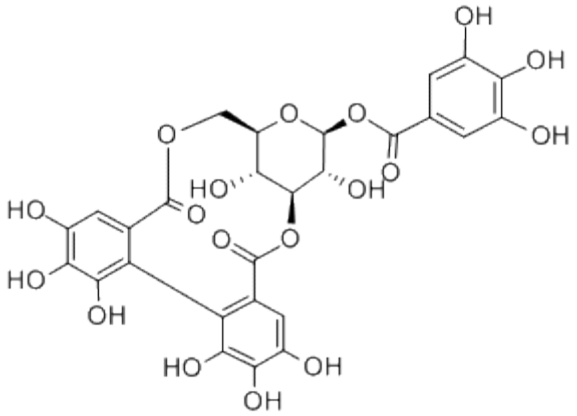
กรดแอลลาจิกเป็นสารประกอบประเภทโพลิฟีนอล (polyphenol) โดยในผลไม้จะไม่พบกรดแอลลาจิกได้โดยตรงแต่จะพบสารที่เรียกว่า แอลลาจิแทนนิน (ellagitannins) ซึ่งจะถูกย่อยแปลงไปเป็นกรดแอลลาจิกในระบบย่อยอาหาร กรดแอลลาจิกสามารถต้านฤทธิ์ของสารก่อมะเร็งได้และเป็นสารยับยั้งมะเร็งที่ทำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซีส (apoptosis) โดยพบว่าปริมาณกรดเอลลาจิกที่มีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีกรดแอลลาจิกที่มีความเข้มข้น 12.5 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในช่องปากได้ (Srivastava et al., 2015)




**ภาพที่ 5** โครงสร้างทางเคมีของกรดแอลลาจิก

**กรดโคริลาจิน (Corilagin)**

กรดโคริลาจิน (Corilagin) (ß-1-0-galloyl-3,6-(R)-hexahydroxydiphenoyl-D-glucose) เป็นสารแทนนินชนิดหนึ่ง พบในพืชหลายชนิด เช่น ลำไย มะขามป้อม หูกวาง เป็นต้น โคริลาจินมีสารต้านอนุมูลอิสระที่ช่วยป้องกันไวรัสตับอักเสบ (Kinoshita et al., 2007) ยาต้านจุลชีพ (Fogliani et al., 2005) ลดความดันโลหิต และต้านการอักเสบ (Jin et al., 2013)



**ภาพที่ 6** โครงสร้างทางเคมีของกรดโคริลาจิน

**ความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity)**

ภาวะความเป็นพิษต่อเซลล์ เป็นการทดสอบความเป็นพิษของสารเคมี สารสกัดพืชสมุนไพร หรือยาที่มีผลต่อการเจริญเติบโตเซลล์ เป็นกระบวนการทดสอบในเบื้องต้น (primary screening) สารที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ MTT (3-(4,5-dimethythiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetra sodium bromide), cystal violet หรือการใช้ trypan blue

หลักการของวิธีการ MTT assay คือ การวัดสภาวะ reduction environment (mitochondria reductase) ของไมโทคอนเดรียในเซลล์ คือการวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่โดยวัดจากกิจกรรมของ mitochondrial succinic dehydrogenase ซึ่งเซลล์ที่มีชีวิตจะมี mitochondrial function ในเซลล์ Krebs cycle ที่เกิดในไมโทคอนเดรีย เป็นวิถีเมทาบอลิซึม (metabolic pathway) ที่สำคัญในการสังเคราะห์ adenosine triphosphate จากคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน โดยขั้นตอนต้นคือ การเปลี่ยนจาก succinate ไปเป็น fumarate โดย succinic dehydrogenase ส่วน FAD เป็นตัวที่ทำให้ปฏิกิริยารีดักชันสมบูรณ์โดยผ่าน $FADH_2$ และ $FADH_2$ สามารถเปลี่ยน tetrazolium salt ไปเป็น formazan ที่มีสีม่วงตกตะกอนในไมโทคอนเดรีย โดยการทดสอบนี้ต้องการ disodium succinate เป็นตัวตั้งต้น เมื่อปฏิกิริยาสมบูรณ์มีผลทำให้มีการเปลี่ยนจากสีเหลืองไปเป็นสีม่วง และระดับการเปลี่ยนสีเป็นสัดส่วนโดยตรงกับ enzymatic reduction ของ tetrazolium salt ผลึกของ MTT formazan สามารถละลายใน DMSO ก่อนที่จะนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ค่าที่อ่านได้จะบอก mitochondrial activity และเซลล์ที่มีชีวิต (Levitz and Diamond, 1985)

การคำนวณอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ (% cell viability)

$$\text{\% cell viability} = \frac{\text{Absorbance of treated cell}}{\text{Absorbance of control cell}} \times 100$$

**บทที่ 3**

**เนื้อหาการวิจัย**

**อุปกรณ์และวิธีการ**

**อุปกรณ์**

**1. วัตถุดิบ**

เมล็ดลำไยเถา จากชุมชนตลาดล่างบางพระ หมู่ที่ 3 ต.บางพระ อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี

**2. อุปกรณ์และสารเคมีในการเตรียมสารสกัดเมล็ดลำไยเถา**

2.1 เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (รุ่น CP 224S, ยี่ห้อ Sartorius)
2.2 ตู้อบลมร้อน (รุ่น TD5A, ยี่ห้อ Since OFM 1997)
2.3 เครื่องปั่นละเอียด (รุ่น GE872 ยี่ห้อ Samsung)
2.4 เครื่องเซนตริฟิวจ์ (รุ่น Biofuge primao R, ยี่ห้อ Sorvall)
2.5 ไมโครปิเปต (micropipettes)
2.6 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
2.7 เครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator)
2.8 เครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์
2.9 เครื่องบดแป้ง (รุ่น AZ 15 zvk, ยี่ห้อ SCHMERSAL)
2.10 เครื่องทำแห้งภายใต้ความเย็นและสุญญากาศ (รุ่น ALPHA 1-4 LSC, ยี่ห้อ CHRIST)
2.11เอทิลอะซิเตท
2.12 เอทานอล
2.13 น้ำกลั่น

**3. อุปกรณ์และอาหารสำหรับการเซลล์เพาะเลี้ยง (Cell line)**

3.1 เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในหนู ชนิด RAW 264.7 (ATCC, Virginia, USA)
3.2 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Gibco)
3.3 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) w/o phenol red (Gibco)
3.4 ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์พลาสติกขนาด 75 $cm^3$ (75 $cm^3$ Cell culture flask)
3.5 ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์พลาสติกขนาด 25 $cm^3$ (25 $cm^3$ Cell culture flask)
3.6 Fetal bovine serum (FBS)
3.7 Streptomycin/Penicillin (Gibco)
3.8 L-Glutamine (Gibco)
3.9 Phosphate buffer saline (PBS)
3.10 Cell scraper blade
3.11 Inverted microscope (Nikon)
3.12 Hemocytometer
3.13 ตู้บ่มเพาะเชื้อภายใต้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Thermo Fisher Scientific)
3.14 ตู้ปลอดเชื้อ (ESCO, Singapore)
3.15 ขวดกรองสาร (Millipore)

3.15 10 ml-pipettes
3.16 Micropipettes
3.17 Trypan blue
3.18 เครื่องนับเซลล์

**4. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับวิเคราะห์การต้านการอักเสบในเซลล์เพาะเลี้ยง**

4.1 เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท
4.2 12-channel micropipette
4.3 จานเพาะเลี้ยง 96 หลุม
4.4 15 ml centrifuge tube
4.5 Lipopolysaccharide (LPS)
4.6 กรดฟอสฟอริก
4.7 N-(1-naphathyl) ethylenediamine
4.8 Sulfanilamide
4.9 Dimethylsulfoxide (DMSO)
4.10 L-$N^G$-Nitroarginine methyl ester (L-NAME)

**5. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์ในเซลล์เพาะเลี้ยง**

5.1 เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท
5.2 reagent reservoir
5.3 12-channel micropipette
5.4 dimethylsulfoxide (DMSO)
5.5 3-(4,5-dimethythiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrasodium (MTT)
5.6 Phosphate buffer saline (PBS)

**วิธีการ**

**1. สกัดสารจากเมล็ดลำไยเถา** เก็บตัวอย่างลำไยเถา ทำให้แห้งโดยเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นำตัวอย่างเมล็ดลำไยเถาแห้งมาบดให้เป็นผงละเอียดด้วยเครื่องบดแป้ง ขนาดตะแกรง 0.25 มิลลิเมตร และนำมาสกัดด้วยเอทิลอะซีเตท (Ethyl acetate) เอทานอล (Ethanol) และน้ำ ในอัตราส่วน 1:10 (w/v) เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส กรองสารที่สกัดได้ หลังจากนั้นนำตัวอย่างไประเหยเอทิลอะซีเตทและเอทานอลออกโดยเครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator) ส่วนสารสกัดจากน้ำนำไประเหยด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dryer) และเก็บตัวอย่างเพื่อทำการทดลองต่อไปที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

**2. การเพาะเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ** เซลล์ที่ใช้ประเมินศักยภาพของความสามารถในการต้านการอักเสบคือเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในหนู RAW 264.7 (ATCC, Virginia, USA) อาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์

แมคโครฟาจ คือ DMEM ที่เติม 10% FBS, 1% L-glutamine และ 1% ยาปฏิชีวนะ Streptomycin (100 μg/ml) /Penicillin (100 U/ml) เมื่อปริมาณเซลล์ในขวดเพาะเลี้ยงมีความหนาแน่น 70-80% ต้องแยกเซลล์ออกจากขวดเพาะเลี้ยง (subculture) เพื่อนำไปใช้ศึกษาต่อไป เริ่มต้นโดยล้างเซลล์ด้วย PBS ปริมาตร 10 ml และเทออก ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ใหม่ ปริมาตร 30 ml จากนั้นใช้ cell scraper blade ในการแยกเซลล์ออกจากขวดเพาะเลี้ยง ปิเปตเซลล์ปริมาตร 6 ml ใส่ลงในขวดเพาะเลี้ยงใหม่ในอัตราส่วน 1:5 แล้วบ่มในตู้เพาะเลี้ยงที่ควบคุมความชื้น ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสภายใต้สภาวะก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และนำเซลล์เก่าไปนับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ inverted microscope เพื่อทำการศึกษาต่อไป

**3. การทดสอบปริมาณไนตริกออกไซด์** โดยเพาะเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ (RAW 264.7 cells) ในอาหาร DMEM ที่ปราศจาก phenol red โดยเตรียมตามความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ $5x10^5$ cell/ml ปริมาตร 200 μl ในจานเพาะเลี้ยงแบบ 96 หลุม (96-well plate) แล้วบ่มเซลล์ในตู้เพาะเลี้ยงที่ควบคุมความชื้น ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นระยะเวลา 16-24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะติดกับจานเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นใส่สารสกัดจากเมล็ดลำไยเถาที่ความเข้มข้นต่างๆ (62.5-1000.0 μg/ml) โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย (ความเข้มข้นของ DMSO ไม่เกิน 0.5% เพื่อป้องกันความเป็นพิษต่อเซลล์) พร้อมกับ lipopolysaccharide (LPS) ความเข้มข้น 1 μg/ml ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดสภาวะการอักเสบ หรือไม่ใส่เลยเพื่อเป็นตัวควบคุม และบ่มเซลล์ต่อไปอีก 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลอง 100 μl ผสมกับสารละลาย Griess reagent (0.1% N-(1-naphathyl) ethylenediamine ใน phosphoric acid และ 1% sulfanilamide) ปริมาตร 100 μl ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที และประเมินผลการเปลี่ยนแปลงโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 542 นาโนเมตร ไนตริกออกไซด์ที่สร้างในเซลล์แมคโครฟาจนี้ถูกผลิตโดยเอนไซม์ iNOS ที่ถูกกระตุ้นการแสดงออกของยีนเมื่อมีการสัมผัสกับ LPS จากแบคทีเรีย หลังจากนั้นคำนวณ % การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของสารสกัด โดยเทียบกับเซลล์ควบคุมที่เหนี่ยวนำด้วย LPS เพียงอย่างเดียว และใช้สาร L-NAME เป็นสารควบคุมแบบบวก (positive control) ในการยับยั้งไนตริกออกไซด์

<u>การคำนวณ</u>

% การยับยั้งไนตริกออกไซด์ = 100 x ([ค่าการดูดกลืนแสงของ LPS-treated control cells] – [ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างทดสอบ] ÷ [ค่าการดูดกลืนแสงของ LPS-treated control cells])

**4. การทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์ (cell viability)** ด้วยวิธี 3-(4,5-dimethythiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrasodium bromide (MTT) assay โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่เตรียมตามความเข้มข้น $5x10^5$ cell/ml ปริมาตร 200 μl ใน 96-well plate แล้วบ่มในตู้เพาะเลี้ยงที่ควบคุมความชื้น ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

5% เป็นระยะเวลา 16-24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารสกัดจากเมล็ดลำไยเถาที่ความเข้มข้นต่างๆ (62.5-1000.0 μg/ml) นำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์อีกครั้งเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด เติมสารละลาย MTT (ความเข้มข้น 1 mg/ml ใน PBS บัฟเฟอร์) ปริมาตร 20 μl นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสในที่มืด เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และนำ plate ที่ทดสอบไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1500 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดอาหารและสารละลายออกจนหมดและเติม DMSO ปริมาตร 200 μl ผสมให้เข้ากัน และนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

<u>การคำนวณ</u>

$$\% \text{ ความมีชีวิตรอดของเซลล์} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ทดสอบ}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ควบคุม}} \times 100$$

**5. การวิเคราะห์ทางสถิติ** วิเคราะห์ข้อมูลการทดลองที่ได้จากการตรวจสอบ % การยับยั้งไนตริกออกไซด์ ค่า $IC_{50}$ และอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ โดยคิดค่าเฉลี่ยของข้อมูลอย่างน้อย 3 ซ้ำ โดยเปรียบเทียบแบบ one-way ANOVA หรือ Student’s t-test ที่ $p=0.05$

**6. รวบรวมผล สรุปผลการทดลองและจัดทำรายงาน**

สถานที่ทำการทดลอง: สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก

# บทที่ 4
# ผลการวิจัยและข้อวิจารณ์

## 1. ผลการศึกษาปริมาณ % yield ของสารสกัดอย่างหยาบจากเมล็ดลำไยเถา

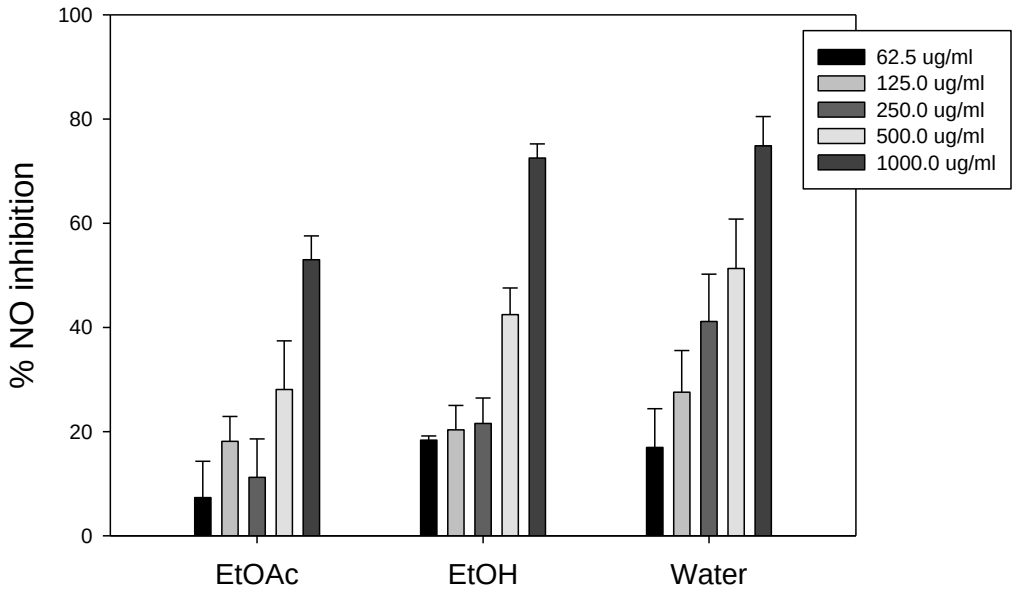
ทำการสกัดผงเมล็ดลำไยเถา (*Dimocarpus longan* var. *obtusus* Leenh.) ด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (EtOAc) เอทานอล (EtOH) และน้ำ (Water) ในอัตราส่วน 1:10 (w/v) ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่าร้อยละของปริมาณการสกัด (% yield) เมล็ดลำไยเถาด้วยเอทิลอะซิเตท เอทานอล และน้ำเท่ากับ 6.02%, 3.53% และ 20.58% ตามลำดับ ซึ่งการสกัดเมล็ดลำไยเถาด้วยน้ำให้ % yield มากที่สุด และสารสกัดเหล่านี้มีสีน้ำตาลเข้ม

## 2. ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านการอักเสบในสารสกัดเมล็ดลำไยเถา

ไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide: NO) เป็นสารสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบแบบเรื้อรังของเซลล์แมคโครฟาจ การทดลองนี้ได้นำสารสกัดเมล็ดลำไยเถาจากเอทิลอะซิเตท เอทานอล และน้ำไปทดสอบกับเซลล์แมคโครฟาจ (RAW 264.7) ที่เหนี่ยวนำด้วยสาร LPS เพื่อทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นให้มีการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบต่างๆ รวมทั้งไนตริกออกไซด์ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นหาฤทธิ์ต้านการอักเสบ หรือการยับยั้งไนตริกออกไซด์ด้วยปฏิกิริยา Griess reaction ใน 96-well plate จากผลการทดสอบด้วย เครื่อง microplate reader ที่ค่าการดูดกลืนแสง 542 nm พบว่าสารสกัดเมล็ดลำไยเถาด้วยน้ำมีฤทธิ์ต้านการอักเสบสูงสุด ($p < 0.05$) และสามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ (NO) ได้ โดยมีค่า inhibitory concentration at 50% ($IC_{50}$) เท่ากับ 465.94±15.67 μg/ml รองลงมาคือสารสกัดเมล็ดลำไยเถาจากตัวทำละลายเอทานอล ซึ่งมีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 638.20±15.73 μg/ml และสารสกัดเมล็ดลำไยเถาจากเอทิลอะซิเตทมีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 957.84±49.88 μg/ml (ภาพที่ 7) ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ใน RAW 264.7 ต่ำที่สุด โดยสารสกัดที่เพิ่มความเข้มข้นขึ้น จะส่งผลต่อการยับยั้งไนตริกออกไซด์ที่มากขึ้น (dose dependent response) สารสำคัญที่อาจมีผลต่อความสามารถในการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7

cells ได้แก่ กรดแกลลิก (gallic acid) กรดแอลลาจิก (ellagic acid) และกรดโคริลาจิน ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่มีการรายงานว่าพบมากในเมล็ดลำไยต้น (*Dimocarpus longan* Lour.) (Rangkadilok et al., 2005) โดยเฉพาะกรดแกลลิกที่สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้ว และมีความสามารถในการต้านการอักเสบในหนู (Mard et al., 2015) การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าสารสกัดเมล็ดลำไยเถาด้วยน้ำมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยรวมและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (วิริยา, 2559) จึงมีความเป็นไปได้ว่าสารประกอบฟีนอลิกในเมล็ดลำไยเถาส่งผลต่อความสามารถในการต้านการอักเสบเมื่อทดสอบใน LPS-induced RAW 264.7 cells อย่างไรก็ตาม ควรทำการวิจัยต่อไปเกี่ยวกับชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกที่พบในสารสกัดเมล็ดลำไยเถา

นอกจากนี้การศึกษาของ (Kunworarath et al., 2016) พบว่าค่า $IC_{50}$ ของสารสกัดจากลำไยต้นในส่วนของดอก เมล็ด และเนื้อมีค่าเท่ากับ 128.2, 1127.4 และ 1260.2 μg/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 2) โดยพบว่าส่วนของดอกลำไยต้นมีความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ใน LPS-activated RAW 264.7 cells ดีที่สุด จากการเปรียบเทียบพบว่าสารสกัดเมล็ดลำไยเถาด้วยน้ำ (*Dimocarpus longan* var. *obtusus* Leenh.) มีความสามารถในการยับยั้งการอักเสบได้ดีกว่าสารสกัดเมล็ดลำไยต้นด้วยน้ำ (*Dimocarpus longan* Lour.) การใช้สารสกัดการทดสอบนี้เป็นการหาความเป็นไปได้ของการใช้สารสกัดเมล็ดลำไยเถาด้วยน้ำในอาหาร เพื่อต้านกระบวนการอักเสบ และนำไปสู่การพัฒนาเป็นวัตถุเจือปนอาหาร (food additives) หรืออาหารเสริม (dietary supplement) ต่อไป สำหรับป้องกันการเกิดมะเร็ง



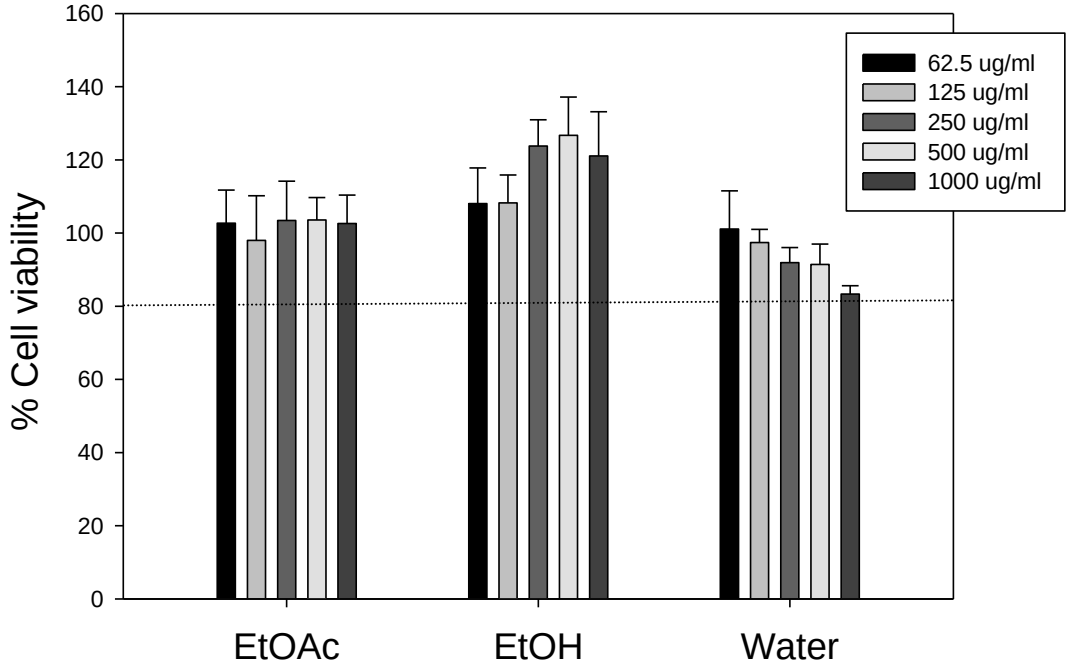

**ภาพที่ 7** เปอร์เซนต์การยับยั้งสารไนตริกออกไซด์ (NO) ในเซลล์แมคโครฟาจ (RAW 264.7 cells) เหนี่ยวนำด้วย LPS เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดเมล็ดลำไยเถาด้วยตัวทำละลายต่างๆที่ความเข้มข้น 62.5-1000 μg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

**ตารางที่ 2** ค่าการยับยั้งไนตริกออกไซด์ $IC_{50}$ ของสารสกัดจากส่วนต่างๆของลำไยต้น อ้างอิงจาก (Kunworarath et al., 2016)

| ค่า | ดอกลำไยต้น | เมล็ดลำไยต้น | เนื้อลำไยต้น | เมล็ดลำไยเถา |
|---|---|---|---|---|
| $IC_{50}$ (μg/ml) | 128.2 | 1127.4 | 1260.2 | 465.94±15.67 |

**3. ผลการศึกษาการทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์**

ทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์ (cell viability) ของตัวอย่างสารสกัดเมล็ดลำไยเถาที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท เอทานอล และน้ำ ในเซลล์แมคโครฟาจ (RAW 264.7) ที่เหนี่ยวนำด้วย LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธี MTT assay ซึ่งเป็นการวัดสภาวะ reduction environment (mitochondria reductase) ของไมโทคอนเดรียในเซลล์ เมื่อ MTT ถูก reduced ด้วย mitochondria reductase จะทำให้สีของ MTT เปลี่ยนเป็นสีม่วงของสี formazan โดยสีจะถูกวัดการดูดกลืนแสงที่ 570 nm จากการทดสอบนี้พบว่าสารสกัดอย่างหยาบจากเมล็ดลำไยเถาด้วยเอทิลอะซิเตท เอทานอล และน้ำที่ความเข้มข้น 62.5-1000 μg/ml ไม่มีผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยพบว่าเปอร์เซนต์การรอดของเซลล์มีค่าเกินกว่า 90% ยกเว้นสารสกัดเมล็ดลำไยเถาจากน้ำที่ความเข้มข้น 1000 μg/ml จะมีเปอร์เซนต์การรอดชีวิตลดลงเหลือ 83% ซึ่งความเข้มข้นของสารสกัดจากน้ำที่มากขึ้นมีแนวโน้มทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ (ภาพที่ 8) จึงไม่ควรใช้สารสกัดด้วยน้ำที่ความเข้มข้นสูงเกินกว่า 1000 μg/ml ในการทดสอบกับเซลล์เพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของสารสกัดเมล็ดลำไยเถาที่ใช้ยังขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์เพาะเลี้ยง




**ภาพที่ 8** เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของเซลล์แมคโครฟาจ (RAW 264.7 cells) ที่เหนี่ยวนำด้วย LPS เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดเมล็ดลำไยเถาด้วยตัวทำละลายต่างๆที่ความเข้มข้น 62.5-1000 μg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

# บทที่ 5
# สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติหรือสมุนไพรมาใช้ในการบำบัดรักษา เป็นการเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ในปัจจุบันต้นลำไยเถาเป็นต้นไม้ท้องถิ่นในจังหวัดชลบุรี การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเมล็ดลำไยเถามีศักยภาพในการต้านการอักเสบ จึงควรส่งเสริมการอนุรักษ์ต้นลำไยเถาและสนับสนุนการนำส่วนเนื้อและเมล็ดไปแปรรูปให้มากขึ้น โดยเฉพาะสารสกัดเมล็ดลำไยเถาจากน้ำซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้สูงที่สุดใน LPS-activated RAW 264.7 cells ซึ่งเป็นเซลล์ที่เป็นต้นแบบในการศึกษา โดยที่สารสกัดเมล็ดลำไยเถาไม่เป็นอันตรายต่อ RAW 264.7 cells ซึ่งความสามารถในการต้านอักเสบนี้อาจเนื่องจากสารประกอบฟินอลิกที่อยู่ในสารสกัดเมล็ดลำไยเถา ซึ่งข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เหล่านี้ แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการนำสารสกัดเมล็ดลำไยเถาไปใช้เป็นวัตถุเจือปนอาหาร หรืออาหารเสริมเพื่อป้องกันโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบต่อไป อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดเมล็ดลำไยเถาในสัตว์ทดลองต่อไปเพื่อให้ผู้บริโภคเกิดความมั่นใจในการบริโภค

**ข้อเสนอแนะ**

- ควรศึกษาหาชนิดและปริมาณของสารประกอบฟินอลิกที่อยู่ในเมล็ดลำไยเถาด้วยวิธีการ HPLC
- ควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับกลไกยับยั้งการอักเสบอื่นๆ ในระดับโมเลกุล เช่น เอนไซม์ iNOS และ COX-2

## บรรณานุกรม

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช, มปป. รายงานความก้าวหน้าโครงการ. ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์บางพระ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล, ชลบุรี. 275 น.

พาวิน มะโนชัย, ยุทธนา เขาสุเมรุ, ชิติ ศรีตนทิพย์ และสันติ ช่างเจรจา. 2547. เทคโนโลยีการผลิตลำไย. วารสารเคหเกษตร. 126 น.

พิชัย สราญรมณ์. 2531. ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับลำไย สำหรับการศึกษาระดับปริญญาตรี. โครงการพัฒนาตำราวิชาการ วิทยาลัยครูรำไพพรรณี, จันทบุรี. 271 น.

พงษ์ศักดิ์ อังกสิทธิ์ ดุษฎี ณ ลำปาง และรำไพพรรณ อภิชาตพงศ์ชัย. 2542. ลำไย: ไม้ผลเศรษฐกิจสำคัญเพื่อพัฒนาอุตสาหกรรม. โรงพิมพ์มิ่งเมือง, เชียงใหม่. 258 น.

วิรัตน์ สมตน. 2543. การปลูกลำไยในภาคใต้. สำนักงานส่งเสริมเกษตรภาคใต้ กรมส่งเสริมการเกษตรฯ กรุงเทพ. 127 น.

วิริยา นิตย์ธีรานนท์. 2559. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดเมล็ดลำไยเถา และการนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์แยมลำไยเถา. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก.

Chandrasekaran, C.V., Thiyagarajan, P., Deepak, H.B. and Agarwal, A. (2011) In vitro modulation of LPS/calcimycin induced inflammatory and allergic mediators by pure compounds of Andrographis paniculata (King of bitters) extract. *Int Immunopharmacol*, 11, 79-84.

Cheung, K.L., Khor, T.O. and Kong, A.N. (2009) Synergistic effect of combination of phenethyl isothiocyanate and sulforaphane or curcumin and sulforaphane in the inhibition of inflammation. *Pharm Res*, 26, 224-231.

Chung, Y.C., Lin, C.C., Chou, C.C. and Hsu, C.P. (2010) The effect of Longan seed polyphenols on colorectal carcinoma cells. *Eur J Clin Invest*, 40, 713-721.

Coussens, L.M. and Werb, Z. (2002) Inflammation and cancer. *Nature*, 420, 860-867.

Fogliani, B., Raharivelomanana, P., Bianchini, J.P., Bouraima-Madjebi, S. and Hnawia, E. (2005) Bioactive ellagitannins from Cunonia macrophylla, an endemic Cunoniaceae from New Caledonia. *Phytochemistry*, 66, 241-247.

Hseu, Y.C., Wu, F.Y., Wu, J.J., Chen, J.Y., Chang, W.H., Lu, F.J., Lai, Y.C. and Yang, H.L. (2005) Anti-inflammatory potential of Antrodia Camphorata through inhibition of iNOS, COX-2 and cytokines via the NF-kappaB pathway. *Int Immunopharmacol*, 5, 1914-1925.

Hsieh, M.C., Shen, Y.J., Kuo, Y.H. and Hwang, L.S. (2008) Antioxidative activity and active components of longan (Dimocarpus longan Lour.) flower extracts. *J Agric Food Chem*, 56, 7010-7016.

Huang, G.J., Wang, B.S., Lin, W.C., Huang, S.S., Lee, C.Y., Yen, M.T. and Huang, M.H. (2012) Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of Longan (Dimocarpus longan Lour.) Pericarp. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 709483.

Huie, R.E. and Padmaja, S. (1993) The reaction of no with superoxide. *Free Radic Res Commun*, 18, 195-199.

Jin, F., Cheng, D., Tao, J.Y., Zhang, S.L., Pang, R., Guo, Y.J., Ye, P., Dong, J.H. and Zhao, L. (2013) Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of corilagin in a rat model of acute cholestasis. *BMC Gastroenterol*, 13, 79.

Kinoshita, S., Inoue, Y., Nakama, S., Ichiba, T. and Aniya, Y. (2007) Antioxidant and hepatoprotective actions of medicinal herb, Terminalia catappa L. from Okinawa Island and its tannin corilagin. *Phytomedicine*, 14, 755-762.

Kunworarath, N., Rangkadilok, N., Suriyo, T., Thiantanawat, A. and Satayavivad, J. (2016) Longan (Dimocarpus longan Lour.) inhibits lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production in macrophages by suppressing NF-kappaB and AP-1 signaling pathways. *J Ethnopharmacol*, 179, 156-161.

Levitz, S.M. and Diamond, R.D. (1985) A rapid colorimetric assay of fungal viability with the tetrazolium salt MTT. *J Infect Dis*, 152, 938-945.

Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. and Balkwill, F. (2008) Cancer-related inflammation. *Nature*, 454, 436-444.

Mard, S.A., Mojadami, S., Farbood, Y. and Gharib Naseri, M.K. (2015) The anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of gallic acid against mucosal inflammation- and erosions-induced by gastric ischemia-reperfusion in rats. *Vet Res Forum*, 6, 305-311.

Pande, V., Sousa, S.F. and Ramos, M.J. (2009) Direct covalent modification as a strategy to inhibit nuclear factor-kappa B. *Curr Med Chem*, 16, 4261-4273.

Panyathep, A., Chewonarin, T., Taneyhill, K., Vinitketkumnuen, U. and Surh, Y.J. (2013) Inhibitory effects of dried longan (Euphoria longana Lam.) seed extract on invasion and matrix metalloproteinases of colon cancer cells. *J Agric Food Chem*, 61, 3631-3641.

Rangkadilok, N., Worasuttayangkurn, L., Bennett, R.N. and Satayavivad, J. (2005) Identification and quantification of polyphenolic compounds in Longan (Euphoria longana Lam.) fruit. *J Agric Food Chem*, 53, 1387-1392.

Raso, G.M., Meli, R., Di Carlo, G., Pacilio, M. and Di Carlo, R. (2001) Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. *Life Sci*, 68, 921-931.

Sautebin, L. (2000) Prostaglandins and nitric oxide as molecular targets for anti-inflammatory therapy. *Fitoterapia*, 71 **Suppl** 1, S48-57.

Srivastava, R., Akthar, S., Sharma, R. and Mishra, S. (2015) Identification of Ellagic acid analogues as potent inhibitor of protein Kinase CK2:A chemopreventive role in oral Cancer. *Bioinformation*, 11, 21-26.

Vane, J.R. and Botting, R.M. (1998) Mechanism of action of antiinflammatory drugs. *Int J Tissue React*, 20, 3-15.

Wisitsak, P., Nimkamnerd, J. and Thitiparmote, N. (2012) Comparison the bioactive compounds and their activities between longan and litchi seeds extracts. *The 1st Mae Fah Luang University International Conference* 2012.