เรื่อง การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดกะหล่ำปลีเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เจลต้านการอักเสบเฉพาะที่

Study on biological activities of cabbage extracts for development as a local anti-inflammatory gel product

โดย นางสาวพิมพ์ชนก ภู่ทอง

โรงเรียนยุพราชวิทยาลัย

รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงงานวิทยาศาสตร์ ระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย
ในงานเวทีวิชาการนวัตกรรมสะเต็มศึกษาขั้นพื้นฐานแห่งชาติ ครั้งที่ 1 (ออนไลน์)

The 1st National Basic STEM Innovation E-Forum 2021

วันที่ 18 – 19 กันยายน พ.ศ. 2564

เรื่อง การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดกะหล่ำปลีเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เจลต้านการอักเสบเฉพาะที่

Study on biological activities of cabbage extracts for development as a local anti-inflammatory gel product

โดย นางสาวพิมพ์ชนก ภู่ทอง

อาจารย์ที่ปรึกษา นายมงคล ปัญญารัตน์

ที่ปรึกษาพิเศษ 1. ผศ.ดร.รวิวรรณ วงศ์ภูมิชัย

2. ผศ.ดร.ดวงพร อมรเลิศพิศาล

3. ดร.สิริญญา ทายะ

ชื่อเรื่อง การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดกะหล่ำปลีเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เจลต้านการอักเสบเฉพาะที่

Study on biological activities of cabbage extracts for development as a local anti-inflammatory gel product

ชื่อผู้วิจัย นางสาวพิมพ์ชนก ภู่ทอง

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์มงคล ปัญญารัตน์

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา (พิเศษ) ผศ.ดร.รวิวรรณ วงศ์ภูมิชัย

ผศ.ดร.ดวงพร อมรเลิศพิศาล

ดร.สิริญญา ทายะ

โรงเรียน ยุพราชวิทยาลัย 238 ถนนพระปกเกล้า อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ รหัสไปรษณีย์ 50200 โทรศัพท์ 053-418673-5 โทรสาร 053-418673-5

ระยะเวลาโครงงาน มีนาคม 2563 - ธันวาคม 2563

บทคัดย่อ

อาการปวดคัดเต้านมมักพบได้ประมาณ 40% ของมารดาหลังคลอดบุตร หากปล่อยทิ้งไว้ไม่ได้รับการแก้ไขอาจมีอาการอักเสบของเต้านมทำให้เกิดปัญหาการขัดขวางการให้นมบุตรได้ (ปัณฑิตา, 2555) การใช้กะหล่ำปลีสดประคบเต้านมเป็นภูมิปัญญาชาวบ้านในการแก้ปัญหา เนื่องจากเป็นสมุนไพรฤทธิ์เย็นและได้รับการยอมรับทางการแพทย์ แต่การใช้กะหล่ำปลีประคบพบปัญหาคือมีขั้นตอนการเตรียมที่ยุ่งยากและเสี่ยงต่อการได้รับสารเคมีตกค้างซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อมารดาและบุตร ดังนั้นจึงมีแนวคิดในการหาวิธีการหรือผลิตภัณฑ์เพื่อมาทดแทนการประคบเต้านมด้วยกะหล่ำปลีแบบดั้งเดิม การศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นเพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากกะหล่ำปลีต่อการยับยั้งการอักเสบของเซลล์หนูเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เจลลดการอักเสบ โดยการนำกะหล่ำปลีมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ น้ำ น้ำร้อน และเอทานอล แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ความเป็นพิษต่อเซลล์และปริมาณไนตริกออกไซด์ ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดกะหล่ำปลีสกัดน้ำและสารสกัดเอทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์สูงกว่าสารสกัดน้ำร้อน รวมทั้งฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำและสกัดเอทานอลโดยวิธี DPPH และ ABTS ก็มีค่าสูงกว่าสารสกัดน้ำร้อนเช่นกัน นอกจากนี้สารสกัดน้ำและสารสกัดเอทานอลไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อวัดด้วยวิธี MTT แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดทุกชุดการทดลองไม่สามารถลดปริมาณไนตริกออกไซด์ได้ แต่มีความน่าสนใจคือสารสกัดน้ำมีแนวโน้มในการลดปริมาณไนตริกออกไซด์เล็กน้อยแต่ยังไม่แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดกะหล่ำปลีสกัดน้ำน่าจะลดการอักเสบได้ โดยนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต้นแบบเจลกะหล่ำปลีต้านอักเสบหรือเจลกะหล่ำปลีบรรเทาอาการปวดคัดเต้านม

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยการสนับสนุนจาก โครงการพัฒนาอัจฉริยภาพทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสำหรับเด็กและเยาวชน สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์วิจัยและนวัตกรรม โดยได้รับความกรุณาจาก คุณครูมงคล ปัญญารัตน์ คุณครูที่ปรึกษาโครงงานวิทยาศาสตร์ โรงเรียนยุพราชวิทยาลัย เชียงใหม่ ผศ.ดร.รวิวรรณ วงศ์ภูมิชัย อาจารย์ประจำภาควิชาชีวเคมี คณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ดร.สิริญญา ทายะ หน่วยวิจัยอาหารเพื่อสุขภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ผศ.ดร.ดวงพร อมรเลิศพิศาล หัวหน้าศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางการเกษตร สำหรับบัณฑิตผู้ประกอบการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ดร.อธิวัฒน์ ชุ่มแย้ม อาจารย์พิเศษวิชาชีววิทยา ที่ได้ให้คำแนะนำ แนวคิด ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ มาโดยตลอด จนโครงงานเล่มนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่และครอบครัว ที่ให้การสนับสนุนและให้คำปรึกษาในเรื่องต่างๆรวมถึงเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และเจ้าหน้าที่ศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางการเกษตร สำหรับบัณฑิตผู้ประกอบการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่สละเวลาให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจมาโดยตลอด จนโครงงานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลงด้วยดี ผู้วิจัยจึงกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

นางสาวพิมพ์ชนก ภู่ทอง

ผู้จัดทำ

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญภาพ	ง
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 แผนการและขั้นตอนการดำเนินงาน	6
บทที่ 4 ผลการดำเนินงาน	9
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการดำเนินงาน	13
บรรณานุกรม	14
ภาคผนวก	15

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

ตาราง 4.1 ร้อยละผลผลิต (%yield) ของสารสกัดแต่ละชนิดจากกะหล่ำปลี 9

ตาราง 4.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและปริมาณฟลาโวนอยด์ ของสารสกัดกะหล่ำปลีทั้ง 3 ชนิด 10

ตาราง 4.3 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกะหล่ำปลีด้วยวิธี DPPH และ ABTS 11

ตาราง 4.4 ผลการศึกษาปริมาณสารที่จะทำให้เซลล์ตาย 20 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ทั้งหมด (IC 20) 11

ตาราง 4.5 ผลการศึกษายับยั้งการสร้าง nitric oxide 12

ตารางภาคผนวก 1 สูตรเจลบรรเทาปวดคัดเต้านม 15

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

ภาพ 2.1 กะหล่ำปลีเขียว 3

ภาพ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของ DPPH และ ABTS 4

ภาพ 2.3 การประคบเต้านมด้วยกะหล่ำปลี 5

ภาพ 4.1 ลักษณะสารสกัดกะหล่ำปลีในรูปแบบสารสกัดหยาบ 9

ภาพ 4.2 ผลิตภัณฑ์เจลต้านการอักเสบเฉพาะที่ 12

ภาพภาคผนวก 5 ผลการทดลองการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกะหล่ำปลี 15

ภาพภาคผนวก 6 ผลการทดลอง MTT assay ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ 15

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

การอักเสบของเนื้อเยื่อ (Inflammation) เป็นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย ต่อการติดเชื้อหรือการบาดเจ็บ ซึ่งเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น การได้รับอุบัติเหตุทำให้เกิดการบาดเจ็บต่ออวัยวะหรือเนื้อเยื่อแบบเฉียบพลัน การใช้งานมากเกินไป หรือ การได้รับสารเคมีหรือสารพิษเข้าสู่ร่างกาย โดยมีอาการบ่งชี้คือ อาการปวด บวม แดง ร้อน และสูญเสียการทำงานของอวัยวะต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง อาการอักเสบที่เกิดขึ้นก่อให้เกิดความลำบากในการทำกิจวัตรประจำวันและไม่สุขสบาย หากปล่อยทิ้งไว้อาจเป็นอันตรายแก่ร่างกายได้ (พีรยุทธ,2554) ในปัจจุบันมีกระบวนการลดการอักเสบด้วยวิธีการต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นการใช้สารเคมีและสารชีวภาพ ส่วนใหญ่ยาบรรเทาอักเสบที่ผลิตจากสารเคมีมักจะมีราคาแพงและนำเข้าจากต่างประเทศ ในปัจจุบันจึงมีความนิยมที่จะใช้สารชีวภาพมาทดแทนสารเคมีที่มีราคาแพง

"กะหล่ำปลี" ผักยอดนิยมของคนไทยที่มีราคาถูกและหาซื้อได้ง่ายตามท้องตลาด เนื่องจากเป็นพืชที่สามารถเพาะปลูกได้ทุกฤดูกาลทั่วประเทศ โดยเฉพาะทางภาคเหนือของประเทศไทย ซึ่งมีอากาศหนาวเย็นเหมาะแก่การเจริญเติบโต นอกจากจะใช้ในการประกอบอาหารได้หลากหลายแล้ว กะหล่ำปลียังถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ในการช่วยบรรเทาอาการอักเสบได้ (อทิตยา,2560) จากการนำใบกะหล่ำปลีสดประคบเต้านมมารดาหลังคลอดที่มีภาวะคัดตึงเต้านม พบว่าการประคบเต้านมด้วยใบกะหล่ำปลีสดนั้นสามารถลดการอักเสบ ลดการคัดตึงเต้านมระดับปานกลางถึงรุนแรงได้ เนื่องจากกะหล่ำปลีจัดเป็นพืชสมุนไพรชนิดเย็นที่มีฤทธิ์ดูดซับความร้อน มีสรรพคุณในการป้องกันการติดเชื้อ ป้องกันการระคายเคือง ทำให้ลดอาการบวมของเนื้อเยื่อได้ นับเป็นภูมิปัญญาชาวบ้านของไทยที่มีประโยชน์ แต่อย่างไรก็ตามการใช้ใบกะหล่ำปลีสดในการประคบเพื่อลดอาการปวดบวมอักเสบเต้านมของมารดาหลังคลอดนั้นมีข้อจำกัดคือ ขั้นตอนการเตรียมที่ยุ่งยากและไม่สะดวกในการใช้ ต้องมีการนำใบกะหล่ำปลีไปแช่ล้าง จากนั้นนำไปแช่เย็นให้แข็ง นาน 20-30 นาที จึงนำมาประคบ ขณะประคบก็มีโอกาสเลื่อนหลุดได้ ทั้งยังเสี่ยงต่อการได้รับสารพิษตกค้างจากยาฆ่าแมลงในใบกะหล่ำปลีที่อาจระคายเคืองต่อผิวหนังหากล้างไม่ดีพอ และยังไม่มีผลการวิจัยใดที่บ่งบอกอย่างชัดเจนว่าสารใดในกะหล่ำปลี มีผลต่อการต้านการอักเสบ (AMPRO Health, ม.ป.ป.; ปัณฑิตา,2555) ดังนั้นการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นศึกษาชนิดของสารในกะหล่ำปลีที่มีคุณสมบัติในการต้านอาการอักเสบได้ เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ และพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่พร้อมใช้งาน สำหรับมารดาหลังคลอดที่มีภาวะคัดตึงเต้านมและผู้ป่วยรายอื่นๆ ที่มีภาวะอักเสบ ซึ่งสามารถใช้ได้อย่างปลอดภัย มีประสิทธิภาพ และราคาไม่แพง เพราะผลิตจากพืชที่หาง่ายในท้องถิ่น อีกทั้งยังเป็นการสนับสนุน เพิ่มรายได้และเป็นการส่งเสริมการตลาดให้แก่เกษตรกรผู้ปลูกกะหล่ำปลี ให้มีแหล่งจำหน่ายผลิตผลได้อีกทางหนึ่ง

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงาน

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในกะหล่ำปลีของสารสกัดกะหล่ำปลีด้วยวิธีสเปคโตรโฟโตเมตรี

2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการต้านการอักเสบในสารสกัดกะหล่ำปลีด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์

1.3 สมมติฐานโครงงาน

สารสกัดจากกะหล่ำปลีสามารถต้านการอักเสบของเนื้อเยื่อได้

1.4 ขอบเขตโครงงาน

1.4.1 ตัวแปร

ตัวแปรต้น สารสกัดจากกะหล่ำปลี

ตัวแปรตาม ปริมาณสารชีวภาพที่ออกฤทธิ์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ตัวแปรควบคุม วิธีการสกัด วิธีการทดสอบ ค่า Phenolic และ Flavonoid

1.4.2 ระยะเวลาที่ใช้ในการทำโครงงาน มีนาคม 2563 - ธันวาคม 2563

1.4.3 สถานที่ใช้ในการทำทดลอง

1. ห้องปฏิบัติการชีววิทยา โรงเรียนยุพราชวิทยาลัย

2. หน่วยวิจัยอาหารเพื่อสุขภาพ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3. ศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางการเกษตร สำหรับบัณฑิตผู้ประกอบการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ

1.5.1 **กะหล่ำปลีเขียว** หมายถึง กะหล่ำปลีออร์แกนิคสีเขียว จากโครงการหลวงเชียงใหม่

1.5.2 **สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive compounds)** หมายถึง สารประกอบที่มี Biological activity หรือมีกิจกรรม (Activity) ต่อสิ่งมีชีวิต การออกฤทธิ์อาจให้ผลดี (beneficial) หรือให้ผลเสีย (adverse) ขึ้นอยู่กับชนิดของสารและปริมาณสารที่ได้รับ คือ Phenolic และ Flavonoid

1.5.3 **ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)** หมายถึง ความสามารถในการยับยั้งหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (oxidation) ที่เป็นสาเหตุของการเกิดอนุมูลอิสระ (free radical)

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้เรียนรู้วิธีการเตรียมสารสกัดจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

2. ได้สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบและสารต้านอนุมูลอิสระ

3. องค์ความรู้เกี่ยวกับการเกิดกระบวนการอักเสบและการเพาะเลี้ยงเซลล์

4. ได้ผลิตภัณฑ์ต้นแบบที่ช่วยลดภาวะคัดตึงเต้านมในรูปแบบที่พร้อมใช้ปลอดภัยต่อการให้นมบุตร

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอกสารที่เกี่ยวข้อง

2.1.1 กะหล่ำปลี

กะหล่ำปลี หรือ กะหล่ำใบ หรือ กะหล่ำปลีเขียว (Cabbage) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Brassica oleracea* Linn. Var. *capitata* อยู่ในวงศ์ Brassicaceae (Cruciferae) จัดเป็นพืชผักสวนครัวที่นิยมรับประทานมากในปัจจุบัน เนื่องจาก มีเนื้อกรอบ และหวาน สามารถประกอบอาหารได้หลากหลายชนิด กะหล่ำปลีแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กะหล่ำปลีธรรมดา (พันธุ์โกลเดนเอเคอร์, พันธุ์โคเปนเฮเกนมาร์เก็ต), กะหล่ำปลีแดง (ใบเป็นสีแดงทับทิม ขึ้นดีในที่อากาศหนาวเย็น), กะหล่ำปลีใบย่น (ขึ้นได้ในที่ที่มีอากาศหนาวเย็นเป็นพิเศษ) (อทิตยา,2560; AMPRO Health,ม.ป.ป.)

ภาพ 2.1 กะหล่ำปลีเขียว

(ที่มา : https://sites.google.com/site/11cauliflower11/phanthu-kahla-pli)

2.1.2 กระบวนการสกัดพืชสมุนไพรด้วยวิธี Lyophilization

Lyophilization หรือ Freeze Dehydration หรือ Freeze Drying หมายถึงการทำให้แห้งด้วยการแช่เยือกแข็ง โดยทำให้น้ำที่อยู่ในเซลล์ซึ่งเป็นของเหลวเปลี่ยนสถานะเป็นของแข็งที่เป็นผลึกน้ำแข็งเล็ก ๆ ก่อน จากนั้นจะทำการลดความดันของสภาพแวดล้อมให้ต่ำกว่าบรรยากาศปกติ เพื่อให้ผลึกน้ำแข็งสามารถ ระเหิด (Sublimation) กลายเป็นไอ ภายใต้อุณหภูมิเท่ากับหรือต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส จะทำให้น้ำแข็งเกิดการระเหิดที่ความดัน 4.7 มิลลิเมตรปรอทหรือต่ำกว่า การทำให้แห้งแบบ Freeze Drying นี้รู้จักกันมานานแล้ว แต่เพราะต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงเนื่องจากเครื่องมือราคาแพง เมื่อต้องใช้ระบบทำความเย็นจัดและเครื่องปั๊มที่มีประสิทธิภาพสูงในการดูดอากาศให้เป็นสุญญากาศ และการใช้ที่ต้องการเทคนิคเฉพาะ รวมทั้งการดูแลรักษา จึงไม่ค่อยเป็นที่นิยมใช้ในระบบผลิตทั่วไป นอกจากผลิตภัณฑ์บางอย่าง เช่น biological substances หรือผลิตภัณฑ์ยาบางชนิด ซึ่งผลิตภัณฑ์ประเภทนี้ไม่สามารถทนต่อความร้อนสูง ที่ใช้กันในวิธีทำแห้งแบบทั่วไปได้ แต่อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยวิธีนี้นั้นมีคุณสมบัติของสารที่มีการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด สามารถคงตัวอยู่ได้นาน ณ อุณหภูมิห้อง และข้อดีที่สำคัญคือ สามารถนำกลับมาละลายน้ำ (reconstitute) ได้ง่ายมาก

2.1.3 กระบวนการเกิดการอักเสบ

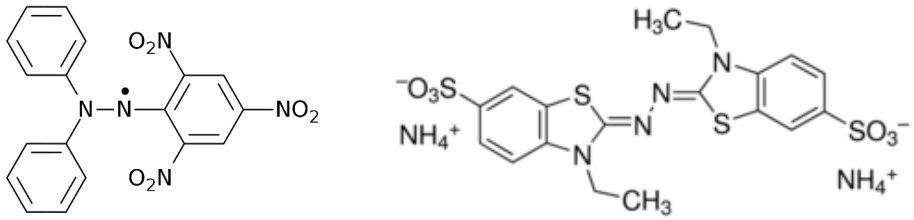
การอักเสบ (Inflammation) เป็นกระบวนการที่ร่างกายตอบสนองต่อสิ่งที่ทำให้เนื้อเยื่อของร่างกายได้รับบาดเจ็บ เช่น เชื้อโรค การตายของเซลล์จากการขาดเลือดหรือขาดออกซิเจน โดยการตอบสนองของกระบวนการอักเสบมักประกอบด้วย การเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือด การเข้ามาของเซลล์เม็ดเลือดขาว และผลกระทบที่เกิดกับร่างกายทั้งระบบ (Systemic effect) (พีรยุทธ.2554; สรรเพชญ,ม.ป.ป.)

2.1.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์

การเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ (Animal cell culture) หมายถึง การเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ขึ้นในหลอดทดลอง โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่แตกต่างกันตามชนิดของเซลล์ ปัจจุบันนักวิจัยได้นำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์มาใช้ในการทดสอบสิ่งต่างๆ เช่น การทดสอบยาต้านเชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้นนักวิจัยจึงหันมาใช้แนวทางการทดสอบสิ่งต่างๆในเซลล์สัตว์ที่ทำการเพาะเลี้ยงขึ้นในหลอดทดลองแทน ประโยชน์ของการเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลองคือ สามารถควบคุมสภาวะแวดล้อมที่จะให้เซลล์อยู่ได้ เซลล์จะมีความเหมือนและมีลักษณะเฉพาะตัว ประหยัด และสามารถคาดเดาผลที่จะเกิดกับสัตว์ทดลองได้เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยสารต่างๆ (วริศรา,2564)

2.1.5 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นความสามารถของสารในการลดหรือกำจัดอนุมูลอิสระเพื่อลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งเรียกว่า ศักยภาพในการต้านออกซิเดชัน (antioxidant capacity) โดยทั่วไปมีวิธีวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหลายวิธี ซึ่งวิธีที่ได้รับความนิยมได้แก่ วิธี DPPH radical scavenging และ ABTS radical scavenging เนื่องจากทั้งสองวิธีเป็นวิธีที่มีความแม่นยำและมีขั้นตอนที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน โดยหลักการของทั้งสองวิธีคือให้สารต้านอนุมูลอิสระที่สกัดได้ทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ DPPH หรือ ABTS ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่คงตัวและมีสีม่วงและสีเขียวอมฟ้าตามลำดับ เมื่ออนุมูล DPPH หรือ ABTS ทำปฏิกิริยากับสารสกัด จะได้สาร DPPH หรือ ABTS อีกรูปซึ่งเป็นสารไม่มีสี จึงสามารถวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้จากการเปลี่ยนแปลงสีของอนุมูล DPPH หรือ ABTS



ภาพ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของ DPPH (ซ้าย) และ ABTS (ขวา)

(ที่มา : https://en.wikipedia.org/wiki/DPPH และ

https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a1888?lang=en&region=TH)

2.1.6 สรรพคุณของสารที่เป็นส่วนประกอบในการผลิตเจลต้านอักเสบ

- Glycerin มีคุณสมบัติเป็น humectant (สารกักเก็บและดูดความชื้นสู่ผิว)
- Disodium EDTA สารจับประจุในน้ำ ป้องกันไม่ให้ประจุในน้ำมารบกวนส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์บางตัวที่มีความอ่อนไหวต่อประจุ
- Allantoin เป็นสารที่พบมากในน้ำนมแม่ที่มีประโยชน์ในการช่วยสร้างเซลล์ใหม่ๆให้กับเด็กแรกเกิดและเด็กทารก ช่วยลดการแพ้ การระคายเคืองกับผิว และลดการอักเสบของผิวหนัง
- Phenoxyethanol สารกันเสียที่มีความอ่อนโยน ใช้กับผิวเด็กได้
- Triethanolamine (TEA) คุณสมบัติปรับ pH 5.5- 6 ซึ่งสมดุลกับสภาพผิว

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการศึกษางานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า การใช้กะหล่ำปลีสดประคบเต้านมแม่หลังคลอดที่มีอาการคัดตึงเต้านม สามารถลดอัตราการเจ็บปวดของแม่ที่มีความเจ็บปวดรุนแรงลงได้มากกว่ากลุ่มแม่ที่ไม่ได้ใช้กะหล่ำปลีประคบ (งานวิจัยของคลินิกนมแม่โรงพยาบาลบุรีรัมย์, 2550) นอกจากนี้การประคบเต้านมด้วยใบกะหล่ำปลีสด สามารถลดอาการอักเสบและลดอาการคัดตึงเต้านมระดับปานกลางจนถึงระดับรุนแรงได้ โดยคาดว่าเกิดจากสาร phytoestrogens ที่ป้องกันการเติบโตของเซลล์เนื้อเยื่อเต้านม (ปัณฑิตา, 2555)

ภาพ 2.3 การประคบเต้านมด้วยกะหล่ำปลี

(ที่มา : https://www.amarinbabyandkids.com/pregnancy/mother-breast-pain)

นอกจากนี้ ในการพัฒนานวัตกรรม “แผ่นเจลกะหล่ำปลีแก้ปวด” ของ ราชวิทยาลัยจุฬาภรณ์ พบว่ากะหล่ำปลีมีสาร Glutamine anthocyanins ซึ่งมีฤทธิ์ต้านการอักเสบในปริมาณที่สูงและออกฤทธิ์ได้ดีในอุณหภูมิต่ำ รวมทั้งยังมีการศึกษาคุณสมบัติของสาร 3 ชนิด ในกะหล่ำปลี ได้แก่ Indole-3-carbinole (I3C), Sulforaphane และ Indoles พบว่ามีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและช่วยป้องกันการเกิดมะเร็งได้ โดยเฉพาะ I3C มีคุณสมบัติลดการเกิดมะเร็งเต้านมในสตรีได้ หากได้รับสารชนิดนี้ ขนาด 6-7 มิลลิกรัม/กิโลกรัมร่างกาย/วัน (ธนพล,2562)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงาน

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 พืชธรรมชาติที่ทดลอง

1) กะหล่ำปลีเขียว 3 กิโลกรัม (ที่มา : จากโครงการหลวง สาขา มช.)

3.1.2 วัสดุและอุปกรณ์

1) บีกเกอร์ขนาด 25 ml	2	ใบ	2) บีกเกอร์ 1000 ซีซี	2	ใบ
3) หลอดทดลอง	4	หลอด	4) แท่งแก้วคนสาร	2	แท่ง
5) ช้อนตักสาร	2	คัน	6) มีด	2	เล่ม
7) กระดาษกรอง	10	ชิ้น	8) ผ้าขาวบาง	2	ผืน
9) ขวด Duran	2	ขวด	10) centrifuge tube	12	หลอด

3.1.3 สารเคมี

น้ำกลั่น (DW), MeOH / Methyl alcohol / CH_3OH, EtOH / Ethyl alcohol / C_2H_6O DMSO, DPPH (2,2-Diphenyl-1-plcrylhydrazyl), Potassium persulphate, Sodium acetate-trihydrate, Acetic acid, HCl, TPTZ (2,4,6-tripyridyl-S-trihydate), Ferric chloride (Iron(III)chloride hexahydrate, $Fecl_3 \cdot 6H_2O$), Trolox ((+/-)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chromane-2-carboxylic acid), Catechin, $NaNO_2$, $AlCl_3 \cdot 6H_2O$

3.1.4 เครื่องมือ

เครื่องชั่ง (Ohaus) , เครื่องปั่นน้ำผลไม้ (Haier), เครื่องปั่นเหวี่ยง Centrifuge (Brand Nuve), เครื่องกรอง (Glassco), เครื่อง Evaporator (Buchi), เครื่อง Spectrophotometry (Hach)

3.2 วิธีการดำเนินโครงงาน

ตอนที่ 1 การสกัดสารจากกะหล่ำปลี (Crude extracts)

เลือกใช้กะหล่ำปลีเขียวชนิดกลม จากโครงการหลวง สาขามหาวิทยาลัยเชียงใหม่ นำมาล้างทำความสะอาดแล้วตัดแบ่งเป็นชิ้นเล็กๆ ก่อนนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ กัน 3 ชนิด ได้แก่ น้ำ น้ำร้อน และเอทานอล ในอัตราส่วน กะหล่ำปลีสด 1 กิโลกรัมต่อตัวทำละลาย 1,000 มิลลิลิตร โดยนำไปปั่นละเอียด และกรองด้วยผ้าขาวบางและกระดาษกรองตามลำดับ จากนั้นนำสารละลายสกัดที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ตกตะกอนแล้วเก็บส่วนของเหลวใส (supernatant) จากนั้นนำเข้าเครื่อง Evaporator เพื่อผ่านกระบวนการทำแห้งด้วยการแช่เยือกแข็ง (Lyophilization) หลังจากผ่านกระบวนการทั้งหมดจะได้สารสกัดหยาบ (Crude Extract) แบบผง

ตอนที่ 2 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ของสารสกัดกะหล่ำปลี

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยวิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric ดัดแปลงจากวิธีการ Amin *et al.* (2006) โดยนำสารสกัดแต่ละชนิดมาละลายน้ำปริมาตร 10 ไมโครลิตร ให้มีความเข้มข้นของสารสกัดแตกต่างกัน (1, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 7 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 180 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำมาพักไว้ที่อุณหภูมิห้องอีก 5 นาที นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิค (ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.025-0.30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ในหน่วยมิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัด และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเมื่อนำไปคำนวณกับผลผลิตร้อยละในหน่วยมิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของน้ำหนักสด

วิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์โดยวิธี aluminum chloride colorimetry ดัดแปลงจากวิธีของ Prommark *et al.* (2008) โดยนำสารสกัดแต่ละชนิดมาละลายน้ำปริมาตร 250 ไมโครลิตร ให้มีความเข้มข้นของสารสกัดแตกต่างกัน (1, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) แล้วเติมน้ำกลั่นลงไป 1,250 ไมโครลิตร จากนั้นเติมโซเดียมไนเตรตปริมาตร 75 ไมโครลิตร แล้วจึงนำมาพักไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วเติม 10 % aluminum chloride 150 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปพักไว้ที่อุณหภูมิอีกครั้งเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาจึงจะเติม 1 M potassium acetate 0.1 มิลลิลิตรและน้ำกลั่น 275 ไมโครลิตร แล้วพักไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานเคอร์ซิติน (ความเข้มข้น 10-160 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ในหน่วยมิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัด และปริมาณสารฟลาโวนอยด์เมื่อนำไปคำนวณกับผลผลิตร้อยละในหน่วยมิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของน้ำหนักสด

ตอนที่ 3 ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกะหล่ำปลี

การวิเคราะห์ศักยภาพรวมในการต้านออกซิเดชันวิธี ABTS radical scavenging ดัดแปลงจากวิธีการของ Huang *et al.* (2005) โดยเตรียมสารละลาย 7 mM ABTS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย 2.45 mM potassium persulphate ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายนี้ไปเก็บไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง แล้วนำมาเจือจางด้วย 80% (v/v) ethanol ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.7±0.02 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ก่อนนำไปใช้ ซึ่งเรียกว่า ABTS solution จากนั้นนำ ABTS solution ที่ได้ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมกับสารสกัดกะหล่ำปลีที่ความเข้มข้นต่างกัน (0.0625, 0.125, 0.025, 0.5, 1 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) แล้ววางทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer คำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยเทียบเป็นค่าปริมาณสารที่ทำให้ความเข้มข้นของสารก่ออนุมูลอิสระเหลือร้อยละ 50

การวิเคราะห์ศักยภาพรวมในการต้านออกซิเดชันวิธี DPPH radical scavenging ดัดแปลงจากวิธีการของ Mun'im *et al.* (2003) โดยเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย 0.3 M acetate buffer pH 5.5 ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร, 0.12 mM DPPH ที่ละลายใน 100% methanol

ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และสารสกัดกะหล่ำปลีที่ความเข้มข้นต่างกัน (0.0625, 0.125, 0.025, 0.5, 1 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากันแล้ววางไว้ในที่มืดอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง VIS spectrophotometer คำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยเทียบเป็นค่าปริมาณสารที่ทำให้ความเข้มข้นของสารก่ออนุมูลอิสระเหลือร้อยละ 50 (EC 50)

ตอนที่ 4 จำลองกระบวนการการเกิดการอักเสบและทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์เพาะเลี้ยง

4.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell culture)

เพาะเลี้ยงเซลล์มาโครฟาจ RAW 264.7 ใน อาหารเลี้ยงเซลล์ ชนิด DMEM ที่มีส่วนประกอบ ของ 10% (v/v) fetal bovine serum, 100 ยูนิต/มิลลิลิตร penicillin, 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร streptomycin จากนั้น นำไปเก็บไว้ใน CO_2 incubator ที่มีปริมาณ CO_2 อยู่ 5% อุณหภูมิ 37°C และทำการ sub-cultured ทุกๆ 3 วัน

4.2 ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดกะหล่ำปลีต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ด้วยวิธี MTT assay

เพาะเลี้ยงเซลล์มาโครฟาจ (macrophage cell line RAW 264.7) ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (96 well plates) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ ชนิด DMEM หลังจากครบ 24 ชั่วโมง เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดเดิมออก และเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดกะหล่ำปลีละลายอยู่ในความเข้มข้นต่างๆ กัน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์ ด้วยวิธี MTT assay และนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 และ 630 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Microplate reader

4.3 ศึกษาผลของสารสกัดสกัดกะหล่ำปลีต่อการยับยั้งการสร้าง nitric oxide

เพาะเลี้ยงเซลล์มาโครฟาจ (macrophage cell line RAW 264.7) ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (96 well plates) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ ชนิด DMEM หลังจากครบ 24 ชั่วโมง เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดเดิมออก และเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดกะหล่ำปลีละลายอยู่ในความเข้มข้นต่างๆ กัน เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยในแต่ละหลุม จะเติมสาร lipopolysaccharide (LPS) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ug/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อกระตุ้นการสร้าง NO และทำการตรวจวัดปริมาณ NO ที่สร้างขึ้นจากเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร LPS โดยวัดปริมาณของไนตริคออกไซด์ที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเซลล์ในรูปของ nitrite โดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาทำปฏิกิริยากับ Griess reagent จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

ตอนที่ 5 การผลิตเจลต้านอักเสบต้นแบบจากสารสกัดกะหล่ำปลี

ทำการเลือกสารสกัดกะหล่ำปลีที่ดีที่สุด เพื่อนำไปพัฒนาต่อเป็นผลิตภัณฑ์ต้นแบบ โดยใช้สูตรตามตารางภาคผนวกที่ 1

บทที่ 4

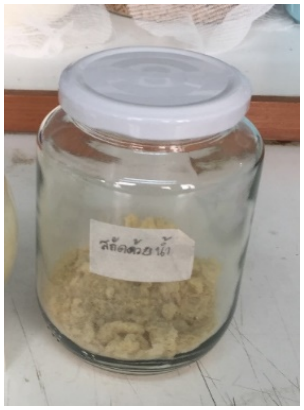
ผลการทดลอง

ตอนที่ 1 การสกัดสารจากพืชธรรมชาติจากกะหล่ำปลีเขียว

จากการนำกะหล่ำปลีไปสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด คือ น้ำ น้ำร้อน และเอทานอล เมื่อได้สารสกัดแล้วนำไปผ่านกระบวนการ Lyophilization เพื่อทำให้เป็นผง (Crude extracts) (ภาพ 4.1) ซึ่งสารสกัดผงจากกะหล่ำปลีสกัดน้ำ ได้ผลผลิตร้อยละ 2.72 สารสกัดผงจากกะหล่ำปลีสกัดน้ำร้อน ได้ผลผลิตร้อยละ 3.58 และสารสกัดผงจากกะหล่ำปลีสกัดเอทานอล ได้ผลผลิตร้อยละ 1.69 ตามลำดับ (ตาราง 4.1)

ตาราง 4.1 ร้อยละผลผลิต (%yield) ของสารสกัดแต่ละชนิดจากกะหล่ำปลี

สารสกัด	ผลผลิตร้อยละ (%yield)
สารสกัดกะหล่ำปลีสกัดน้ำ	2.72
สารสกัดกะหล่ำปลีสกัดน้ำร้อน	3.58
สารสกัดกะหล่ำปลีสกัดเอทานอล	1.69



ภาพ 4.1 ลักษณะสารสกัดกะหล่ำปลีในรูปแบบสารสกัดหยาบ

ตอนที่ 2 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ของสารสกัดกะหล่ำปลี

จากการทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดทั้ง 3 ชนิด พบว่าสารสกัดกะหล่ำปลีสกัดน้ำมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก 5.99 ± 0.84 มิลลิกรัม ต่อสารสกัด 1 กรัม สารสกัดกะหล่ำปลีสกัดน้ำร้อนมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก 3.57 ± 0.16 มิลลิกรัม ต่อสารสกัด 1 กรัม และ สารสกัดกะหล่ำปลีสกัดเอทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก4.33 ± 0.20 มิลลิกรัม ต่อสารสกัด 1 กรัม ตามลำดับ (ตาราง 4.2)

จากการทดสอบปริมาณฟลาโวนอยด์จากสารสกัดทั้ง 3 ชนิด พบว่าสารสกัดกะหล่ำปลีสกัดน้ำมีปริมาณฟลาโวนอยด์ 1.14 ± 0.04 มิลลิกรัม ต่อสารสกัด 1 กรัม สารสกัดกะหล่ำปลีสกัดน้ำร้อนมีปริมาณ

ฟลาโวนอยด์ 0.84 ± 0.12 มิลลิกรัม ต่อสารสกัด 1 กรัม และ สารสกัดกะหล่ำปลีสกัดเอทานอลมีปริมาณฟลาโวนอยด์ 1.32 ± 0.03 มิลลิกรัม ต่อสารสกัด 1 กรัม ตามลำดับ (ตาราง 4.2)

ตาราง 4.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดกะหล่ำปลีทั้ง 3 ชนิด

สารสกัด	**ปริมาณ Total Phenolic Compound**		**ปริมาณ Total Flavonoid**	
	mg/g สารสกัด	**mg/100 สารสกัดสด**	**mg/g สารสกัด**	**mg/100 สารสกัดสด**
สารสกัดกะหล่ำปลีสกัดน้ำ	5.99±0.84 a	16.30±2.27 a	1.14±0.04 a	3.11±0.10 a
สารสกัดกะหล่ำปลีสกัดน้ำร้อน	3.57±0.16 b	12.77±0.58 b	0.84±0.12 b	3.02±0.45 b
สารสกัดกะหล่ำปลีสกัดเอทานอล	4.33±0.20 b	7.32±0.34 c	1.32±0.03 a	2.24±0.04 b

หมายเหตุ: ตัวอักษร (a-c) ที่แตกต่างกันในแนวตั้งหมายถึงข้อมูลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตอนที่ 3 ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกะหล่ำปลี

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่า สารสกัดกะหล่ำปลีสกัดน้ำมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด มีค่าปริมาณสารที่ทำให้ความเข้มข้นของสารก่ออนุมูลอิสระ DPPH เหลือร้อยละ 50 (EC 50) เป็น 25.4±1.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนค่า EC 50 ของสารสกัดกะหล่ำปลีสกัดเอทานอลและสารสกัดกะหล่ำปลีสกัดน้ำร้อน เพิ่มมากขึ้นตามลำดับ (ตาราง 4.3)

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS พบว่า สารสกัดกะหล่ำปลีสกัดเอทานอลมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด มีค่าปริมาณสารที่ทำให้ความเข้มข้นของสารก่ออนุมูลอิสระ ABTS เหลือร้อยละ 50 (EC 50) เป็น 68.8 ± 3.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนค่า EC 50 ของสารสกัดกะหล่ำปลีสกัดน้ำ และสารสกัดกะหล่ำปลีสกัดน้ำร้อน เพิ่มมากขึ้นตามลำดับ (ตาราง 4.3)

ตาราง 4.3 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกะหล่ำปลีด้วยวิธี DPPH และ ABTS

สารสกัด	ปริมาณสารที่ทำให้ความเข้มข้นของสารก่ออนุมูลอิสระเหลือร้อยละ 50 (EC 50) (ug/ml)	
	DPPH scavenging	ABTS scavenging
สารสกัดกะหล่ำปลีสกัดน้ำ	25.4±1.2 c	73.9±7.8 ab
สารสกัดกะหล่ำปลีสกัดน้ำร้อน	92.7±6.1 a	94.5±13.0 a
สารสกัดกะหล่ำปลีสกัดเอทานอล	44.9±0.4 b	68.8±3.8 b

หมายเหตุ: ตัวอักษร (a-c) ที่แตกต่างกันในแนวตั้งหมายถึงข้อมูลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตอนที่ 4 จำลองกระบวนการการเกิดการอักเสบและทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์เพาะเลี้ยง

จากการศึกษาปริมาณสารที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 20 ของเซลล์ทั้งหมด (IC 20) เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารสกัดสูงสุด 1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในการทดสอบ พบว่าสารสกัดกะหล่ำปลีสกัดน้ำจะทำให้เซลล์ตายมากกว่าร้อยละ 20 เมื่อใช้ปริมาณตั้งแต่ 630 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขึ้นไป สารสกัดกะหล่ำปลีสกัดน้ำร้อนจะทำให้เซลล์ตายมากกว่าร้อยละ 20 เมื่อใช้ปริมาณตั้งแต่ 22.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขึ้นไป และสารสกัดกะหล่ำปลีสกัดเอทานอลเมื่อใช้ปริมาณสารสกัด 1,000 มิลลิกรัม ทำให้เซลล์ตายน้อยกว่าร้อยละ 20 (ตาราง 4.4)

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยการวัดปริมาณ nitric oxide พบว่าสารสกัดกะหล่ำปลีสกัดน้ำและสารสกัดกะหล่ำปลีสกัดเอทานอล สามารถลดปริมาณ nitric oxide ได้เพียงเล็กน้อย แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และในสารสกัดกะหล่ำปลีสกัดน้ำร้อนมีการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบเพิ่มมากขึ้น (ตาราง 4.5)

ตาราง 4.4 ผลการศึกษาปริมาณสารที่จะทำให้เซลล์ตาย 20 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ทั้งหมด (IC 20)

สารสกัด	ปริมาณสารที่จะทำให้เซลล์ตายร้อยละ 20 ของเซลล์ทั้งหมด (IC 20; ug/ml)
สารสกัดกะหล่ำปลีสกัดน้ำ	630.00
สารสกัดกะหล่ำปลีสกัดน้ำร้อน	22.39
สารสกัดกะหล่ำปลีสกัดเอทานอล	>1000 *

* เมื่อใช้ความเข้มข้นสูงสุดที่ 1000 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร เซลล์ยังตายไม่เกิน 20 เปอร์เซ็นต์

ตาราง 4.5 ผลการศึกษายับยั้งการสร้าง nitric oxide

สารสกัด	**ความเข้มข้น (μg/ml)**	**ปริมาณ nitric oxide (μM)**	
		ใส่ไลโปโพลิแซคาไรด์ (LPS)	ไม่ใส่ไลโปโพลิแซคาไรด์ (NO LPS)
น้ำกลั่น	0	15.84±1.03 a	-1.46±0.60 b
สารสกัด	100	15.29±0.74 a	-0.76±0.22 b
กะหล่ำปลี	200	15.40±0.56 a	-0.63±0.56 b
สกัดน้ำ	400	14.86±0.66 a	-0.82±0.27 b
สารสกัด	5	16.25±2.08 a	11.85±3.21 a
กะหล่ำปลี	10	16.16±1.92 a	14.89±2.62 a
สกัดน้ำร้อน	20	15.57±1.18 a	15.14±0.87 a
สารสกัด	100	15.55±1.32 a	-1.02±0.48 b
กะหล่ำปลี	200	15.82±1.46 a	-0.67±0.99 b
สกัดเอทานอล	400	16.29±1.03 a	-0.97±0.37 b

หมายเหตุ: ตัวอักษร (a-c) ที่แตกต่างกันในแนวตั้งหมายถึงข้อมูลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตอนที่ 5 การผลิตเจลต้านอักเสบต้นแบบจากสารสกัดกะหล่ำปลี

ภาพ 4.2 ผลิตภัณฑ์เจลต้านการอักเสบเฉพาะที่

จากการผสมส่วนต่างๆในการสร้างเจลต้านการอักเสบ พบว่าเจลมีลักษณะเหลวใส มีความหนืดเล็กน้อย ไม่มีกลิ่น เมื่อนำมาทาที่ผิวหนังมีลักษณะไม่เหนียวเหนอะหนะ ทั้งนี้ต้องทำการศึกษาประสิทธิภาพในการลดการอักเสบและศึกษาการก่อให้เกิดอาการแพ้กับผิวหนังต่อไป

บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

5.1 อภิปรายผลการทดลอง

จากการทดลองเมื่อทำการสกัดสารสกัดจากกะหล่ำปลีด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ น้ำ น้ำร้อน และเอทานอล พบว่า สารสกัดกะหล่ำปลีสกัดน้ำร้อน มีร้อยละของผลผลิตสูงที่สุด รองลงมาคือสารสกัดกะหล่ำปลีสกัดน้ำและสารสกัดกะหล่ำปลีสกัดเอทานอลตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ จากกะหล่ำปลีสด 100 กรัม กลับพบว่ามีปริมาณสูงที่สุดในสารสกัดกะหล่ำปลีสกัดน้ำเนื่องจากในสารสกัดกะหล่ำปลีสกัดน้ำร้อนอาจมีสารประกอบชนิดอื่นเจือปนอยู่มากเลยทำให้มีผลผลิตร้อยละสูง แต่มีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพน้อยกว่าสารสกัดกะหล่ำปลีสกัดน้ำ ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญที่พบได้ในพืช จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH และ ABTS พบว่า สารสกัดกะหล่ำปลีสกัดน้ำมีแนวโน้มของแนวโน้มในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด สอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่มีปริมาณสูงที่สุดเช่นกัน

ในการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์และเนื้อเยื่อ เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ โดยวิเคราะห์ปริมาณสารที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 20 ของเซลล์ทั้งหมด (IC 20) ด้วยวิธี MTT พบว่าสารสกัดกะหล่ำปลีสกัดน้ำปละสารสกัดกะหล่ำปลีสกัดเอทานอลไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ เนื่องจากมีค่า IC20 สูงกว่า 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (เป็นค่าที่ยอมรับได้ในการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์) ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ปลอดภัยในอนาคตได้

ไนตริกออกไซด์จัดเป็นสารในกลุ่มอนุมูลอิสระที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดอาการอักเสบของเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตได้ จากวิเคราะห์ปริมาณไนตริกออกไซด์พบว่า สารสกัดกะหล่ำปลีสกัดทั้ง 3 วิธี ยังไม่สามารถลดปริมาณไนตริกออกไซด์ได้อย่างมีนัยสำคัญ แต่ในชุดการทดลองที่ใช้สารสกัดกะหล่ำปลีสกัดน้ำมีแนวโน้มของปริมาณไนตริกออกไซด์ลดลงเล็กน้อย ในขณะที่สารสกัดกะหล่ำปลีสกัดน้ำร้อนมีผลข้างเคียงคือกระตุ้นให้มีปริมาณสารไนตริกออกไซด์เพิ่มมากขึ้น ซึ่งไม่สอดคล้องเป้าหมายของงานวิจัยนี้ นั่นชี้ให้เห็นว่าสารสกัดกะหล่ำปลีสกัดน้ำน่าจะเป็นทางเลือกที่สำคัญในการพัฒนาไปเป็นผลิตภัณฑ์

5.2 สรุปผลการทดลอง

สารสกัดกะหล่ำปลีสกัดน้ำน่าจะลดการอักเสบได้ โดยมีผลลดปริมาณไนตริกออกไซด์ มีปริมาณสารออกฤทธิ์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง โดยนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เจลกะหล่ำปลีต้านอักเสบหรือเจลกะหล่ำปลีบรรเทาอาการปวดคัดเต้านม

บรรณานุกรม

งานวิจัยของคลินิกนมแม่โรงพยาบาลบุรีรัมย์. (2550). ผลของการใช้กะหล่ำปลีต่อการลดอาการปวดคัดตึงเต้านมแม่, สืบค้นเมื่อวันที่ 28 มิถุนายน 2563. จาก. https://www.hsri.or.th/people/media/

ธนพล ชอบเป็นไทย. (2562). ผลิตภัณฑ์แผ่นเจลเย็นกะหล่ำปลีแก้ปวด, สืบค้นเมื่อวันที่ 28 มิถุนายน 2563. จาก. https://www.hfocus.org/content/2014/11/8643

ปัณฑิตา ศรีจันทร์ดร. (2555). รพ.นครพิงค์ ใช้ "กะหล่ำปลี ประคบลดปวด คัดเต้านม" แม่หลังคลอดพบได้ผลดี, สืบค้นเมื่อวันที่ 28 มิถุนายน 2563. จาก.https://www.hfocus.org/content/

พีรยุทธ สิทธิไชยากุล. (2554). กระบวนการอักเสบของเนื้อเยื่อ, สืบค้นเมื่อวันที่ 27 มิถุนายน 2563. จาก. http://www.med.nu.ac.th/pathology/405313/book54/Inflammation.pdf

วริศรา สุวรรณ. (2564). การเพาะเลี้ยงเซลล์เบื้องต้น, สืบค้นเมื่อวันที่ 6 สิงหาคม 2563. จาก. https://erp.mju.ac.th/acticleDetail.aspx?qid=576

สรรเพชญ เบญจวงศ์กุลชัย. (ม.ป.ป.). พยาธิวิทยาการอักเสบ, สืบค้นเมื่อวันที่ 27 มิถุนายน 2563. จาก. http://cai.md.chula.ac.th/chulapatho/chulapatho/lecturenote/inflammation.html

สุชาดา มานอก. (2558). การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้ายอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดสมุนไพรในตำรับยาหอมเทพจิตร, สืบค้นเมื่อวันที่ 15 กรกฎาคม 2563. จาก. http://sci.bsru.ac.th/advscij/e-magazine/15-1/chapter-10.pdf

อทิตยา บุรารักษ์. (2560). สรรพคุณของกะหล่ำปลี, สืบค้นเมื่อวันที่ 26 มิถุนายน 2563. จาก. https://sites.google.com/site/11cauliflower11/naeana-kar-chi-bth-reiyn

อลิสรา คูประสิทธิ์. (2020). วิธีทำเจลล้างมือ ทำเองง่ายๆ สูตรจาก Lab วว. สืบค้นเมื่อวันที่ 30 มิถุนายน 2563. จาก. https://www.tistr.or.th/tistrblog/?p=546.

Amin, I., Norazaidah, Y. and Hainida, K. I. E. (2006). Antioxidant activity and phenolic content of raw and blanched Amaranthus species. Food Chemistry 94: 47-52.

AMPRO Health. (ม.ป.ป.). ประโยชน์ของกะหล่ำปลี , สืบค้นเมื่อวันที่ 26 มิถุนายน 2563. จาก. https://amprohealth.com/food/cabbage

Huang, D., Ou, B. and Prior, R.L. 2005. The Chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 1841-1856.

Mun'im, A., Negishi, O. and Ozawa, T. 2003. Antioxidant compounds from Crotalaria sessiliflora. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 67: 410-414.

Prommuak, C., D-Eknamkul, W. and Shotipruk, A. (2008). Extraction of flavonoids and carotenoids from Thai silk waste and antioxidant activity of extract. Separation and Purification Technology 62: 444-448.

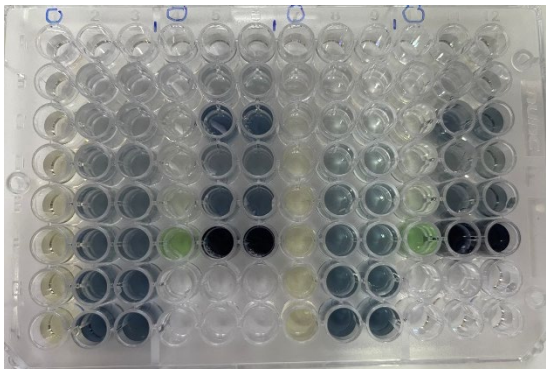
ภาคผนวก

<u>สูตรเจลบรรเทาปวดคัดเต้านม</u>

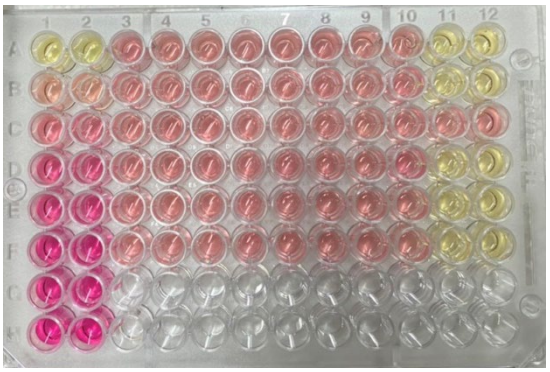
Part	Ingredient	%w/w	1 kg
A	Water	53	530
	Glycerin	3	30
	Disodium EDTA	0.1	1
B	5% Carbopol 940	12	120
C	Water	20	200
	Allantoin	0.5	5
D	Water	10	100
	Cabbage extract	0.5	5
E	Phenoxyethanol	0.5	5
F	Triethanolamine	0.4	4

วิธีเตรียม

1. ผสม part A เข้าด้วยกัน
2. ค่อย ๆ เติม 5% Carbopol 940 ลง Part A พร้อมปั่น magnetic จนกว่าจะพองตัว
3. ผสม part C ให้เข้ากัน จากนั้นเทลงใน part A+B และคนให้เข้ากัน
4. ผสม part D ให้เข้ากัน จากนั้นเทลงใน part A+B+C
5. เติม part E และ F ตามลำดับ และผสมให้เข้ากัน



ภาพภาคผนวก 1 ผลการทดลองการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกะหล่ำปลี



ภาพภาคผนวก 2 ผลการทดลอง MTT assay ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์