



แบบรายงานการวิจัยและการพัฒนาการวิจัยการเกษตร ฉบับสมบูรณ์
เสนอ สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน)

รหัสโครงการ CRP6205030280

การวิจัยและพัฒนาสารสกัดมะละกอ สำหรับผู้ป่วยที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำในอนาคต
Research and development of papaya extract: Implications for
patients with thrombocytopenia

คณะผู้วิจัย

นงคราญ ลำจวน ปรัชญา สมบูรณ์
จินตนา ยาโนละ สะแกวัลย์ อุ่นใจจิ้น เกรียงไกร ขวาลสันตติ เฉลิมพงษ์ แสนจุ่ม

หน่วยงานที่สังกัด
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

แหล่งเงินทุนวิจัย
สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน)

รายงานการวิจัยและการพัฒนาการวิจัยการเกษตร ฉบับสมบูรณ์
เสนอ สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน)

รหัสโครงการ CRP6205030280

การวิจัยและพัฒนาสารสกัดมะละกอ สำหรับผู้ป่วยที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำในอนาคต
Research and development of papaya extract: Implications for patients
with thrombocytopenia

คณะผู้วิจัย

นงคราญ ลำจวน ปรัชญา สมบูรณ์
จินตนา ยาโนละ สะแกวัลย์ อุ่นใจจิ้น เกรียงไกร ขวาลสันตติ เฉลิมพงษ์ แสนจุ่ม

หน่วยงานที่สังกัด
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

แหล่งเงินทุนวิจัย
สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน)

กิตติกรรมประกาศ

รายงานการวิจัยเรื่อง “การวิจัยและพัฒนาสารสกัดมะละกอ สำหรับผู้ป่วยที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำในอนาคต (Research and development of papaya extract: Implications for patients with thrombocytopenia)” เป็นโครงการที่จัดทำขึ้นโดยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) ประจำปีงบประมาณ 2562 คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) ที่สนับสนุนงบประมาณในการทำงานวิจัย และให้ความช่วยเหลือต่างๆ ทำให้การดำเนินงานวิจัยเป็นไปตามแผนที่ได้กำหนดไว้ได้เป็นอย่างดี ขอขอบพระคุณคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิที่ได้ให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อโครงการวิจัยฯ ขอขอบพระคุณผู้บริหารสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพที่ให้การสนับสนุนและให้โอกาสในการทำงานวิจัย และขอขอบคุณคณะผู้ช่วยวิจัย เจ้าหน้าที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพทุกท่านที่มีส่วนช่วยให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

คณะนักวิจัย

19 ธันวาคม 2562

บทคัดย่อ (ภาษาไทย)

การศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดน้ำจากใบมะละกอ เนื้อมะละกอดิบ และเนื้อมะละกอสุก ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบมะละกอมือองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างจากเนื้อมะละกอดิบ และเนื้อมะละกอสุก โดยพบว่าสารสกัดจากใบมะละกามีปริมาณสารประกอบรวมของสารกลุ่ม phenolic, flavonoid และ alkaloid สูงกว่าสารสกัดจากเนื้อมะละกอดิบ และเนื้อมะละกอสุก การวิเคราะห์โดยวิธีลิควิดโครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโทรเมทรี พบว่ามีสารประกอบกลุ่มอัลคาลอยด์และฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัดจากใบมะละกอ สารประกอบกลุ่มอัลคาลอยด์ที่พบได้แก่ คาร์เบน ดีไฮโดรคาร์เบน 1 และ ดีไฮโดรคาร์เบน 2 สารประกอบกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบได้แก่ เคอร์ซีติน 3-(4-กลูโคซิลแรมโนไซด์) เคอร์ซีติน 3-(2-แกล-แรมโนซิล-โรบินไบโอไซด์) แมนกาสลีน คลิโทริน และ รูบิน ทั้งนี้ไม่พบสารประกอบกลุ่มอัลคาลอยด์และฟลาโวนอยด์เหล่านี้ในสารสกัดจากเนื้อมะละกอดิบ และเนื้อมะละกอสุกแต่อย่างใด ผลการวิเคราะห์โดยวิธีไฮเปอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี ในสารสกัดจากใบมะละกอ พบสารฟีนอลิก (คาเฟอิก แอซิด) และฟลาโวนอยด์ (แคมเฟอร์รอล และเคอร์ซีติน) ผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าสารสกัดจากใบมะละกามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง และฤทธิ์ในการเพิ่มค่าเกล็ดเลือดในหนูขาวเพศเมียพันธุ์วีสตาร์ได้ดีกว่าสารสกัดจากเนื้อมะละกอดิบ และเนื้อมะละกอสุก โดยสรุปสารสกัดจากใบมะละกามีศักยภาพที่จะพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสำหรับผู้ป่วยที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำได้ในอนาคต

บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)

Comparative study of aqueous extracts in different parts of *Carica papaya*, leaves, unripe and ripe pulp, indicated that leaf extract has significantly higher contents of total phenolics, flavonoids, and alkaloids compared to unripe pulp and ripe pulp extracts. LC-MS/MS results indicated that the major phytochemical compounds in the leaf extract were alkaloids and flavonoids. Three alkaloids, carpaine, dehydrocarpaine I and dehydrocarpaine II and 5 flavonoids, quercetin 3-(4-glucosylrhamnoside), quercetin 3-(2Gal-rhamnosyl-robinobioside), manghaslin, clitorin, and rutin were identified in the leaf extract. These compounds were not observed in unripe pulp and ripe pulp extracts. HPLC analysis indicates the presence of phenolic acid (caffeic acid) and flavonoids (kaempferol and quercetin) in the leaf extract. The leaf extract also exhibited higher antioxidant activity and possessed anti-thrombocytopenic activity compared to the extracts from papaya unripe and ripe pulp. In conclusion, the leaf extract of *Carica papaya* has a potential be used as a complementary herbal supplement in patients with thrombocytopenia.

สารบัญเรื่อง

กิตติกรรมประกาศ.....	ค
บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ง
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	จ
สารบัญเรื่อง	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูปภาพ.....	ฌ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง	2
1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	4
1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย	5
1.5 ทฤษฎี สมมติฐาน และ/หรือกรอบแนวความคิดของการวิจัย	6
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	6
1.7 แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมายเมื่อสิ้นสุดการวิจัย.....	6
บทที่ 2 เนื้อเรื่อง.....	7
2.1 วิธีการดำเนินการวิจัย	7
2.1.1 การคัดเลือกสายพันธุ์มะละกอและการตรวจสอบเอกลักษณ์	7
2.1.2 การเตรียมสารสกัดหยาบจากมะละกอโดยวิธีทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง	7
2.1.3 การสกัดสารจากใบมะละกอโดยใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในรูปของไหล	7
2.1.4 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด	8
2.1.5 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด	8
2.1.6 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบอัลคาลอยด์ทั้งหมด	8
2.1.7 การวิเคราะห์หาปริมาณแร่ธาตุและวิตามิน.....	9
2.1.8 การวิเคราะห์หาสารประกอบทางเคมีโดยใช้เทคนิค GC-MS.....	9
2.1.9 การวิเคราะห์หาสารประกอบทางเคมีโดยใช้เทคนิค LC-MS/MS.....	9
2.1.10 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบกลุ่ม phenolic acids และ flavonoids.....	10
2.1.11 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบกลุ่มแคโรทีนอยด์.....	11
2.1.12 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH	12
2.1.13 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี ABTS	12
2.1.14 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี FRAP.....	13
2.1.15 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านการอักเสบในหลอดทดลอง	13
2.1.16 ตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือด	14

2.1.17	ตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการหลั่ง cAMP และ cGMP	15
2.1.18	ตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการสร้าง thromboxen B2	15
2.1.19	การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดน้ำจากมะละกอในการเพิ่มจำนวนเกล็ดเลือดในหนูทดลองพันธุ์วีสตาร์	15
2.1.20	คุณลักษณะของสารสกัดจากใบมะละกอ	17
2.2	ผลการทดลอง	18
2.2.1	สายพันธุ์มะละกอและการตรวจสอบเอกลักษณ์	18
2.2.2	การสกัดสารจากมะละกอโดยวิธีทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง	18
2.2.3	การสกัดสารจากใบมะละกอโดยใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในรูปของของไหล (Supercritical fluid extraction).....	19
2.2.4	การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดน้ำจากมะละกอ.....	19
2.2.5	การวิเคราะห์หาปริมาณแร่ธาตุและวิตามิน.....	20
2.2.6	การวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีโดยใช้เทคนิค GC-MS	20
2.2.7	การวิเคราะห์หาสารประกอบทางเคมีโดยใช้เทคนิค LC-MS/MS	23
2.2.8	การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบสำคัญแต่ละชนิดในกลุ่มฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และแคโรทีนอยด์	33
2.2.9	ฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำจากมะละกอ	34
2.2.10	ผลของสารสกัดน้ำจากมะละกอในการต้านการอักเสบในหลอดทดลอง	35
2.2.11	ผลของสารสกัดน้ำจากมะละกอในการยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือด	36
2.2.12	ตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดมะละกอต่อระดับ cAMP cGMP และ TXB2.....	38
2.2.13	การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดน้ำจากมะละกอในการเพิ่มจำนวนเกล็ดเลือดในหนูขาวเพศเมียพันธุ์วีสตาร์	39
2.2.14	คุณภาพและมาตรฐาน (specification) ของสารสกัดจากใบมะละกอ	43
บทที่ 3	ข้อวิจารณ์	45
บทที่ 4	สรุปและข้อเสนอแนะ	49
	เอกสารอ้างอิง	51

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และอัลคาลอยด์ทั้งหมด	20
ตารางที่ 2.2 ปริมาณแร่ธาตุและวิตามินในสารสกัดน้ำจากมะละกอ	20
ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากใบมะละกอโดยใช้เทคนิค GC-MS	22
ตารางที่ 2.4 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากเนื้อมะละกอดิบ โดยใช้เทคนิค GC-MS	22
ตารางที่ 2.5 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากเนื้อมะละกอสุก โดยใช้เทคนิค GC-MS	22
ตารางที่ 2.6 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากใบมะละกอ (SFE) โดยใช้เทคนิค GC-MS	23
ตารางที่ 2.7 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากใบมะละกอ วิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS โดยใช้เทคนิค positive ESI mode	24
ตารางที่ 2.8 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากใบมะละกอ วิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS โดยใช้เทคนิค negative ESI mode	25
ตารางที่ 2.9 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากเนื้อมะละกอดิบ วิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS โดยใช้เทคนิค positive ESI mode	27
ตารางที่ 2.10 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากเนื้อมะละกอดิบ วิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS โดยใช้เทคนิค negative ESI mode	28
ตารางที่ 2.11 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากเนื้อมะละกอสุก วิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS โดยใช้เทคนิค positive ESI mode	29
ตารางที่ 2.12 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากเนื้อมะละกอสุก วิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS โดยใช้เทคนิค negative ESI mode	30
ตารางที่ 2.13 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากใบมะละกอ SFE วิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS โดยใช้เทคนิค positive ESI mode	31
ตารางที่ 2.14 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากใบมะละกอ SFE วิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS โดยใช้เทคนิค negative ESI mode	32
ตารางที่ 2.15 ปริมาณสารประกอบสำคัญในกลุ่มฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และ แคโรทีนอยด์	33
ตารางที่ 2.16 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะละกอ	34
ตารางที่ 2.17 ความสามารถในการยับยั้งการเสียหายของโปรตีนในหลอดทดลองของสารสกัดมะละกอ	36
ตารางที่ 2.18 ผลของสารสกัดน้ำจากมะละกอต่ค่าเกล็ดเลือดในหนูขาวเพศเมียพันธุ์วีสตาร์	41
ตารางที่ 2.19 ผลของสารสกัดน้ำจากมะละกอต่ค่าโลหิตวิทยา ในหนูขาวเพศเมียพันธุ์วีสตาร์ ที่ได้รับสารสกัดในวันที่ 0 และ 25 ของการศึกษา	41
ตารางที่ 2.20 ผลของสารสกัดน้ำจากมะละกอต่ค่าทางชีวเคมีในหนูขาวเพศเมียพันธุ์วีสตาร์ ที่ได้รับสารสกัดในวันที่ 35 ของการศึกษา	42
ตารางที่ 2.21 Specification ของสารสกัดจากใบมะละกอ	43
ตารางที่ 2.22 ปริมาณสารสำคัญในกลุ่มกรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในสารสกัดจากใบมะละกอ วิเคราะห์โดยวิธี LC/MSD.....	44

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 2.1 ลักษณะทางกายภาพของต้นมะละกอ.....	18
รูปที่ 2.2 ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดด้วยน้ำจากตัวอย่างสดของมะละกอ	19
รูปที่ 2.3 ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดจากใบมะละกอโดยใช้เทคนิคแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในรูปของไหล	19
รูปที่ 2.4 โครงสร้างทางโมเลกุลของสารประกอบหลักที่ตรวจพบได้ในสารสกัดน้ำจากมะละกอโดยวิธี GC-MS	21
รูปที่ 2.5 สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบที่แยกได้จากสารสกัดจากใบมะละกอโดยวิธี LC-MS/MS	26
รูปที่ 2.6 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำจากมะละกอ	35
รูปที่ 2.7 Dose-response curve ของสารสกัดน้ำจากมะละกอ	36
รูปที่ 2.8 ความสามารถของสารสกัดน้ำจากมะละกอในการยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือด .	38
รูปที่ 2.9 ผลของสารสกัดมะละกอต่ระดับ cAMP cGMP และ TXB2	39
รูปที่ 2.10 ผลของสารสกัดน้ำจากมะละกอต่ค่าเกล็ดเลือดในหนูขาวเพศเมียพันธุ์วีสตาร์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำแบบชั่วคราวด้วยสารเคมีคาร์โบพลาคติน	40
รูปที่ 2.11 Chromatogram ของสารสกัดน้ำจากใบมะละกอโดยวิธี LC/MSD.....	44

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

ABTS	2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid
ALP	Alkaline phosphatase
ALT	Alanine aminotransferase
AST	Aspartate aminotransferase
cAMP	Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cyclic AMP, cAMP)
cGMP	Guanosine 3,5-cyclic monophosphate (cyclic GMP, cGMP)
DPPH	2,2'-diphenyl-b-picrylhydrazyl
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
GC-MS	Gas chromatography–mass spectrometry
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LC-MS	Liquid chromatography–mass spectrometry
papaya	<i>Carica papaya</i> L.
PRP	platelet-rich plasma
SFE	Supercritical fluid extraction
TXB2	Thromboxane B2

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ภาวะเกล็ดเลือดต่ำ (thrombocytopenia) คือภาวะที่เกล็ดเลือดมีค่าต่ำกว่า 150,000 ตัวต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร เกล็ดเลือดมีหน้าที่หยุดการไหลของเลือดออกนอกร่างกายผ่านกระบวนการแข็งตัวของเลือด สาเหตุของภาวะเกล็ดเลือดต่ำเกิดได้จากหลายกลไกด้วยกัน ทั้งนี้อาจเกิดได้จากการที่ไขกระดูกมีการผลิตเกล็ดเลือดลดลง หรือมีการทำลายของเกล็ดเลือดเพิ่มขึ้น ภาวะเกล็ดเลือดต่ำมักจะพบได้ในผู้ป่วย ได้แก่ ผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ เช่น ผู้ป่วยไข้เลือดออกเนื่องจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี โรคมาลาเรียบางชนิด การใช้ยาบางชนิดที่กระตุ้นให้เกิดเกล็ดเลือดต่ำ โรคที่เกิดจากภูมิคุ้มกันทำลายเนื้อเยื่อตัวเอง (Immune Thrombocytopenia: ITP) เป็นต้น ผู้ป่วยที่มีเกล็ดเลือดต่ำอาจก่อให้เกิดอาการเลือดออกผิดปกติได้ เช่น มีจุดเลือดออก หรือมีจ้ำเลือดเกิดขึ้นตามผิวหนัง มีเลือดกำเดาไหล เลือดออกตามไรฟัน หรือในรายที่มีอาการรุนแรงอาจมีเลือดออกในระบบทางเดินอาหารได้ ดังนั้นการควบคุมค่าเกล็ดเลือดในผู้ป่วยที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำ จะเป็นแนวทางที่สำคัญในการควบคุมความเจ็บป่วยได้ การรักษาผู้ป่วยที่มีค่าเกล็ดเลือดต่ำมีได้หลายแนวทาง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสาเหตุของการเกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำ ในกรณีผู้ป่วยที่มีค่าเกล็ดเลือดต่ำเนื่องจากโรคไข้เลือดออกนั้น ยังไม่มีการรักษาเฉพาะ แต่เป็นเพียงการรักษาตามอาการเท่านั้น โดยการเฝ้าระวังการเกิดภาวะช็อคและเลือดออก ดังนั้นการให้สารน้ำอย่างเหมาะสม และการเพิ่มระดับของเกล็ดเลือดจะทำให้อัตราการเสียชีวิตลดลงได้ อย่างไรก็ตามการให้เกล็ดเลือดแก่ผู้ป่วยไข้เลือดออกที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำนั้น มีรายงานพบว่าผู้ป่วยมีความถี่ในการเกิดน้ำท่วมปอดสูง และทำให้ไปเพิ่มระยะเวลาในการต้องนอนในโรงพยาบาลนานขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่ไม่ได้รับเกล็ดเลือด นอกจากนี้การให้เกล็ดเลือดจะไปเพิ่มความเสี่ยงการเกิดปฏิกิริยาไม่พึงประสงค์ขึ้นได้ เช่น การติดเชื้อจากการให้เลือด หรือการแพ้สารประกอบของเลือด เป็นต้น ดังนั้นการรักษาพยาบาลผ่านการแพทย์ทางเลือก (complementary medicine) โดยใช้พืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการไปเพิ่มระดับของเกล็ดเลือดในผู้ป่วยที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำ เพื่อไปใช้เสริมหรือใช้ร่วมกับการรักษาแผนปัจจุบันจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง

มีรายงานผลการศึกษาวิจัยบ่งชี้ว่าการดื่มน้ำคั้นสดจากใบมะละกอ และสารสกัดจากใบมะละกอในรูปแบบแคปซูล สามารถเพิ่มปริมาณเกล็ดเลือดในผู้ป่วยไข้เดงกีและไข้เลือดออกให้กลับมาอยู่ในระดับปกติได้เร็วขึ้น ปัจจุบันสารสกัดจากใบมะละกอได้รับความสนใจมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากคุณสมบัติทางชีวภาพที่หลากหลายในการบรรเทาโรค รวมทั้งโรคไข้เลือดออก ดังนั้นจึงมีผลิตภัณฑ์สารสกัดจากใบมะละกอออกมาวางจำหน่ายในตลาดโลกกันอย่างแพร่หลายมากขึ้น อยู่ในรูปของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสุขภาพ ทั้งแบบแคปซูลผง แบบยาเม็ด ยาน้ำ แบบผงพร้อมชง และใบชา มะละกอ ทั้งนี้มีเป้าหมายเพื่อช่วยเสริมระบบการย่อยอาหาร ป้องกันเชื้อแบคทีเรีย สนับสนุนระบบเลือดและระบบภูมิคุ้มกัน อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีผลการดำเนินการวิจัยเชิงทดลองทางคลินิกในกลุ่มทดลองขนาดใหญ่รับรองความปลอดภัยของสารสกัดจากใบมะละกอแต่อย่างใด อนึ่งการนำส่วนของใบมะละกอซึ่งเป็นส่วนที่ไม่นิยมนำมารับประทานมาใช้นั้น ทำให้มีความกังวลในเรื่องของความเป็นพิษของสารประกอบบางตัวที่อยู่ในส่วนใบ ดังนั้นการศึกษาในโครงการนี้จะได้นำส่วนของเนื้อมะละกอดิบและมะละกอสุกซึ่งเป็นส่วนที่นิยมนำมารับประทาน มาศึกษาร่วมกับส่วนของใบมะละกอด้วย ทั้งนี้ผลการศึกษาที่ได้จะนำมาซึ่งการใช้ส่วนประกอบของเนื้อมะละกอ เพื่อใช้ทดแทนส่วนประกอบ

ของใบมะละกอ และอาจจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง เพื่อไปเพิ่มปริมาณเกล็ดเลือดในผู้ป่วยที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำ และสามารถไปลดระยะเวลาการเจ็บป่วย และการเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลได้ โดยไปลดผลกระทบต่อผู้ป่วยและครอบครัวทั้งทางด้านเศรษฐกิจและสังคม

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสอดคล้องกับยุทธศาสตร์การพัฒนาประเทศตามแผน พัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 12 (พ.ศ. 2560-2564) ทางด้านการพัฒนาวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีวิจัยและนวัตกรรม สอดคล้องกับนโยบายและยุทธศาสตร์การวิจัยของชาติ ฉบับที่ 9 (พ.ศ.2560-2564) ยุทธศาสตร์การวิจัยที่ 1 เร่งส่งเสริมการวิจัยและพัฒนาเพื่อให้บรรลุเป้าหมายและสนองตอบต่อประเด็นเร่งด่วนตามยุทธศาสตร์และแผนพัฒนาประเทศ และภารกิจของ หน่วยงาน โดยรัฐลงทุนเพื่อการวิจัยและพัฒนาเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง

1.2 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

พืชสมุนไพรถูกนำมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์แผนโบราณในการรักษาโรคร้ายไข้เจ็บมานาน โดยเฉพาะคนเอเชียและแอฟริกา ได้นำวิธีการรักษาแบบดั้งเดิมตามวัฒนธรรมท้องถิ่นมาใช้ในการรักษาโรคไข้เลือดออกมานาน (Kadir et al 2013) มีงานวิจัยจำนวนมากมุ่งเน้นไปที่พืชสมุนไพรเพื่อนำมาใช้ในทางการแพทย์ทางเลือก โดยนำไปใช้เสริมหรือใช้ร่วมกับการแพทย์แผนปัจจุบันในการรักษาโรคเพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากว่า การใช้ยาบางชนิดในการรักษาโรคมียผลข้างเคียงไม่พึงประสงค์ เนื่องจากการรับยาสูง ในปัจจุบันพืชสมุนไพรมีการศึกษากันอย่างแพร่หลายมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากว่าในพืชจำพวกผักและผลไม้ มีสารเคมีธรรมชาติหรือสารเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ สารเคมีที่ผลิตได้จากเซลล์พืชแบ่งได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่ สารเมแทบอไลต์ปฐมภูมิ (primary metabolites) เป็นสารที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและเมแทบอลิซึมของพืช ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และ ไขมัน ส่วนสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) เป็นผลิตผลจากการทำงานของสารเมแทบอไลต์ปฐมภูมิ โดยสารนี้ไม่เกี่ยวข้องกับการทำงานหลักในเซลล์ของพืช แต่จะทำหน้าที่ต่าง ๆ กันออกไป เพื่อสร้างคุณลักษณะที่เฉพาะตัวของพืชนั้นๆ เช่น การมีสี กลิ่น หรือรสชาติที่แตกต่างกันออกไป หรือเพื่อปกป้องตนเองจากแมลงหรือสิ่งมีชีวิตที่ก่อโรคเป็นต้น สารกลุ่มนี้เรียกว่าสารพฤกษเคมี (phytochemicals) สารพฤกษเคมีแบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoids) ฟีนอลิก (polyphenols) แอลคาลอยด์ (alkaloids) สารประกอบไนโตรเจน (nitrogen-containing compounds) และ สารประกอบกำมะถัน (organosulfur-containing compounds) ทั้งนี้สารประกอบฟีนอลิกเป็นกลุ่มใหญ่ที่สุดที่พบได้ในธรรมชาติ ซึ่งสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้อีก 5 กลุ่ม ได้แก่ phenolic acids, flavonoids, tannins, stilbenes และ coumarins (Bellik et al 2012) สารพฤกษเคมีหลายชนิดมากมายที่สกัดได้จากพืช บางชนิดมีความเป็นพิษ บางชนิดสามารถนำมาใช้เพื่อป้องกัน และรักษาโรคในทางการแพทย์ได้ สารเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นสารที่มีคุณสมบัติต่อต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง และมีฤทธิ์ต่อต้านหรือส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น (Brindha 2016, Hosseini & Ghorbani 2015)

มะละกอ (*Carica papaya* L.) เป็นพืชเมืองร้อน มีแหล่งกำเนิดมาจากอเมริกากลาง เป็นไม้ล้มลุก จัดอยู่ในวงศ์มะละกอ (*Caricaceae*) เป็นพืชใบเลี้ยงคู่ ใบมีลักษณะเป็นใบเดี่ยวมี 5-9 แฉก มียางเหนียวสีขาวอยู่ ออกเรียงสลับรอบต้น ดอกจะเป็นดอกแยกเพศ ต้นที่มีดอกสมบูรณ์เพศคือมีทั้งเกสรตัวเมียและตัวผู้อยู่ในต้นเดียวกัน สามารถผสมพันธุ์ภายในต้นเดียวกันได้ ออกผลได้ภายในดอกเดียวกัน ทั้งนี้มะละกอที่เป็นที่นิยมปลูกส่วนใหญ่มักเป็นเพศคู่ ผลดิบมีของมะละกอมีสีเขียวและมีน้ำ

ยางสีขาวสะสมอยู่ที่เปลือก ส่วนผลสุก เนื้อในจะมีสีเหลืองถึงส้ม มีเมล็ดสีดำเล็ก ๆ อยู่ข้างใน สามารถบริโภคได้ทั้ง ผลดิบและผลสุก มะละกอในแต่ละส่วนประกอบของพืช ได้แก่ ส่วนผล ใบ และเมล็ด ประกอบด้วยสารพฤกษเคมีสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบเฉพาะในพืช (phytochemicals) แตกต่างกันได้แก่ ปาเปน ไคโมปาเปน แอลคาลอยด์ โกลโคไซด์ แทนนิน ซาโปนิน วิตามินอี วิตามินซี วิตามินบี คาร์ทีนอยด์ ฟีนอลิก และแร่ธาตุต่าง ๆ เป็นต้น (Aravind et al 2013, Ayoola & Adeyeye 2010, Ikram et al 2015) ในปัจจุบันการศึกษาส่วนประกอบของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในใบมะละกอนั้นยังมีไม่มากนัก มีรายงานว่าสารกลุ่มฟลาโวนอยด์และแอลคาลอยด์เป็นกลุ่มสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพมาก (Julianti et al 2014)

มะละกอเป็นพืชที่มีคุณสมบัติเป็นยา เนื่องจากมีสารพฤกษเคมีหลากหลายชนิดนั้นเอง มะละกอได้ถูกนำมาใช้เป็นอาหารและแก้ไข้ปัญหาสุขภาพ ฟันฟุร่างกายหรือรักษาโรคภัยไข้เจ็บมาแต่โบราณ คุณสมบัติของมะละกอที่สำคัญในการรักษาโรคที่มีการศึกษาวิจัย เช่น คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ (Indran et al 2008, Osato et al 1993) การต้านเชื้อแบคทีเรีย (Akujobi et al 2010, Peter et al 2014) คุณสมบัติการต้านการอักเสบและการควบคุมระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Pandey et al 2016) เป็นต้น อนึ่งในช่วงหลาย ๆ ปีที่ผ่านมาใบมะละกอถูกกล่าวขานถึงอย่างมากมายถึงสรรพคุณในการบรรเทาอาการอันเนื่องมาจากโรคไข้เลือดออก โดยไปมีผลในการเพิ่มระดับของเกล็ดเลือดในผู้ป่วยให้กลับเข้าสู่ระดับปกติได้เร็วขึ้น ทั้งนี้มีบทความทางวิชาการหลายชิ้นได้กล่าวถึงผลของการใช้สารสกัดจากใบมะละกอในการเพิ่มค่าเกล็ดเลือดนั้น เกิดจากองค์ประกอบทางเคมีหลายๆ ชนิดในใบมะละกอ ได้แก่ สารกลุ่มแร่ธาตุ ฟลาโวนอยด์ และ อัลคาลอยด์ เป็นต้น ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและมีฤทธิ์ที่ทำให้เกิดภาวะภูมิคุ้มกันสมดุล หรือที่เรียกกันว่า immunomodulation นั้นเอง (Dharmarathna et al 2013, Sarala & Paknikar 2014, Senthilvel et al 2013, Subenthiran et al 2013)

ปัจจุบันสารสกัดจากใบมะละกอได้รับความสนใจมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากคุณสมบัติทางชีวภาพที่หลากหลายในการบรรเทาโรครวมทั้งโรคไข้เลือดออก ดังนั้นจึงมีผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสารสกัดจากใบมะละกอออกมามากมายจำหน่ายในตลาดโลกกันอย่างแพร่หลายมากขึ้น ทั้งในรูปของแคปซูลผง ยาเม็ด ยาน้ำ และใบชามะละกอ ทั้งนี้มีเป้าหมายเพื่อช่วยส่งเสริมระบบการย่อยอาหาร ป้องกันเชื้อแบคทีเรีย สันับสนุนระบบเลือดและระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีผลการวิจัยเชิงทดลองทางคลินิกในกลุ่มทดลองขนาดใหญ่เพื่อรับรองความปลอดภัยของสารสกัดจากใบมะละกอแต่อย่างใด การนำส่วนของใบมะละกอซึ่งเป็นส่วนที่ไม่นิยมนำมารับประทานเนื่องจากมีรสชาติขม อีกทั้งมีความกังวลในเรื่องของความเป็นพิษของสารประกอบบางตัวที่อยู่ในส่วนใบ เช่น ส่วนของยางขาวจากใบมะละกอที่สามารถทำให้เกิดอาการแพ้ได้ มีรายงานพบว่าสารสกัดน้ำจากมะละกอดิบนั้นมีเอนไซม์ปาเปนอยู่ซึ่ง มีความสัมพันธ์กับการแท้งลูกและอาจมีความเป็นพิษต่อตัวอ่อนในหนู (Cherian 2000) ความเป็นพิษของมะละกอพบได้จากการศึกษาในสัตว์ทดลอง ขณะที่ข้อมูลเรื่องผลของยางมะละกอดิบต่อการตั้งครรภ์ในมนุษย์นั้นยังไม่ชัดเจนนัก ในประเทศไทย มะละกอดิบและมะละกอสุกเป็นที่นิยมนำมารับประทานเป็นอาหารกันมายาวนาน การศึกษาองค์ประกอบเบื้องต้นทางพฤกษเคมีของสารสกัดหยาดชนิดผงแห้งจากส่วนใบ และเนื้อของมะละกอดิบนั้นพบว่าให้ผลไม่แตกต่างกันมากนัก (Asghar et al 2016) ดังนั้นการนำส่วนเนื้อของมะละกอดิบและมะละกอสุกซึ่งเป็นส่วนที่นิยมรับประทาน ที่มีฤทธิ์ต้านภาวะเกล็ดเลือดต่ำ มาใช้เพื่อทดแทนการ

ใช้ส่วนประกอบจากใบมะละกอ เพื่อไปเพิ่มปริมาณเกล็ดเลือดในผู้ป่วยที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง

การศึกษาในโครงการนี้จะศึกษาเปรียบเทียบปริมาณของสารพฤกษเคมีที่สำคัญ ศึกษาคุณสมบัติและฤทธิ์ทางชีวภาพในหลอดทดลองของสารสกัดหยาบชนิดผงแห้งจากส่วนใบ เนื้อมะละกอดิบ และเนื้อมะละกอสุกในตัวทำละลายน้ำ โดยจะมุ่งเน้นไปที่ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดน้ำจากมะละกอจากส่วนใบ เนื้อมะละกอดิบ และเนื้อมะละกอสุกและสารคาร์เปนบริสุทธิ์ที่เตรียมได้จากใบมะละกอ ที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มปริมาณเกล็ดเลือดและผลต่อการยับยั้งเลือดออกในหนูทดลอง รวมทั้งการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดน้ำจากมะละกอต่อกิจกรรมการทำงานของเกล็ดเลือดในหลอดทดลอง ผลการศึกษาที่ได้จะนำมาพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต้นแบบจากมะละกอในรูปแบบเม็ดหรือแคปซูล รวมทั้งการทดสอบประสิทธิผลของผลิตภัณฑ์ต้นแบบจากมะละกอในหลอดทดลองต่อการทำงานของเกล็ดเลือด อนึ่งการเตรียมสมุนไพรให้อยู่ในรูปแบบผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสารสกัดน้ำจากมะละกอในรูปแบบอัดเม็ดหรือแบบแคปซูล จะทำให้เพิ่มโอกาสในการเข้าถึงและนำมาใช้ได้ง่าย ประโยชน์ที่จะได้จากการศึกษาครั้งนี้จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ต้นแบบจากมะละกอ เพื่อนำพัฒนาต่อยอดและทดสอบในทางคลินิกในผู้ป่วยที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำได้ต่อไปในอนาคต

1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เป้าหมายระยะยาวของการวิจัยคือเพื่อที่จะพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากมะละกอ ที่มีฤทธิ์ในการเพิ่มค่าเกล็ดเลือด เพื่อนำมาใช้เป็นทางเลือกร่วมในการรักษาผู้ป่วยที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำ เนื่องจากโรคไข้แดงกึ่งและไข้เลือดออกเดงกี หรือผู้ป่วยที่เกิดจากภูมิคุ้มกันทำลายเนื้อเยื่อตัวเอง (ITP) เป็นต้น ทั้งนี้ผู้ป่วยที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำมากรุนแรง เมื่อไม่ได้รับการรักษาทันท่วงทีอาจทำให้เกิดภาวะเลือดออกได้ โดยเฉพาะเลือดออกในระบบทางเดินอาหาร วัตถุประสงค์หลักของโครงการวิจัยในครั้งนี้เพื่อค้นหาคุณสมบัติทางพฤกษเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ โดยเฉพาะฤทธิ์ในการเพิ่มค่าเกล็ดเลือดของสารสกัดหยาบชนิดผงแห้งจากส่วนใบ เนื้อมะละกอดิบ และเนื้อมะละกอสุก เพื่อนำไปสู่การพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์ต้นแบบอาหารเสริมจากมะละกอ โดยวัตถุประสงค์ย่อยในการศึกษามีดังนี้

- 1) เพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพฤกษเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดน้ำจากมะละกอ (To investigate phytochemical contents, antioxidant and anti-inflammatory activities of papaya extracts)
- 2) เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดน้ำจากมะละกอในการเพิ่มจำนวนเกล็ดเลือดในหนูทดลอง (To evaluate biological activities of papaya extracts to increase platelet count in rat model)
- 3) เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดน้ำจากมะละกอต่อกิจกรรมการทำงานของเกล็ดเลือด (To evaluate biological activities of papaya extracts against platelet functions)
- 4) เพื่อพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากมะละกอ (To develop papaya formulation) [โครงการระยะที่ 2]

ผลการศึกษาในครั้งนี้จะทำให้ทราบความแตกต่างของฤทธิ์ทางชีวภาพ ในการเพิ่มค่าเกล็ดเลือดของสารสกัดจากส่วนใบ เนื้อมะละกอดิบ และเนื้อมะละกอสุก ซึ่งผลการทดลองที่ได้จะนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต้นแบบจากมะละกอในรูปแบบอัดเม็ดหรือแคปซูล ที่มีประสิทธิภาพในการต้านภาวะ

เกล็ดเลือดต่ำ ทั้งนี้เพื่อนำมาใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากมะละกอ ในการบรรเทาอาการเจ็บป่วยอันเนื่องมาจากภาวะเกล็ดเลือดต่ำจากการติดเชื้อไวรัสเด็งกี และภาวะเกล็ดเลือดต่ำเนื่องจากสาเหตุอื่น ๆ ได้ในอนาคต

1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ขอบเขตของการวิจัยปีที่ 1

ตัวอย่างมะละกอที่นำมาศึกษาจะทำการเก็บส่วนใบสด ผลมะละกอดิบ และผลมะละกอสุก สายพันธุ์ฮอลแลนด์จากสวนมะละกอ ในจังหวัดเชียงใหม่หรือจังหวัดใกล้เคียง จากนั้นนำมาทำการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ (authentication) ของพืชเพื่อยืนยันชนิดของตัวอย่างโดยผู้เชี่ยวชาญ จัดทำตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงงานวิจัย (Voucher specimen) เพื่อเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์พืช (Herbarium) ของคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การศึกษาทดลองในปีแรกนี้จะเน้นขั้นตอนพัฒนาวิธีการเตรียมสารสกัดหยาบจากใบมะละกอ เนื้อมะละกอดิบ และเนื้อมะละกอสุก การสกัดสารอัลคาลอยด์ชนิดคาร์เบนจากใบมะละกอ และทำการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณของสารฟลักซ์เคมีโดยใช้วิธีวิเคราะห์ทางเคมี และการวิเคราะห์หาค่าประกอบของสารชั้นสูง (ฟลักซ์เคมี) โดยใช้เทคนิคทาง GC-MS หรือ HPLC หรือ HPTLC การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดน้ำจากมะละกอในตัวทำละลายน้ำในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดน้ำจากมะละกอในการเพิ่มจำนวนเกล็ดเลือดและผลต่อการยับยั้งเลือดออกในหนูทดลองที่ถูกกระตุ้นให้เกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำ ทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากมะละกอต่อการทำงานของเกล็ดเลือด จากนั้นคัดเลือกสารสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุดมาจัดทำมาตรฐานของสารสกัดโดยใช้สารออกฤทธิ์/ตัวบ่งชี้ทางเคมีที่จำเพาะ (Standardization) และ จัดทำคุณภาพและมาตรฐาน (Specification) ของสารสกัด

การใช้สัตว์ทดลอง จะใช้หนูขาวเพศเมียพันธุ์วีสตาร์ (female albino Wistar rat) จากศูนย์สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ น้ำหนักประมาณ (200-300 กรัม) ใช้หนูจำนวน 42 ตัว การทดลองแบ่งออกได้เป็น 7 กลุ่ม กลุ่ม ๆ ละ 6 ตัว

สำหรับอาสาสมัครจะทำการคัดเลือกอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี อายุระหว่าง 20-35 ปี ในสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ จำนวน 10 คน เจาะเลือดอาสาสมัครปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยใช้หลอดบรรจุเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด sodium citrate เลือดที่ได้นำมาเตรียมเกล็ดเลือด เพื่อศึกษาการทำงานของเกล็ดเลือดในหลอดทดลอง

ขอบเขตของการวิจัยปีที่ 2

พัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสารสกัดจากมะละกอ ในรูปแบบอัดเม็ดหรือแบบแคปซูล ชนิดเคลือบเอนเทอริกเพื่อให้สามารถผ่านกระเพาะอาหารไปแตกตัวและปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ในลำไส้เล็ก ศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์สารสกัดจากมะละกอ ผลของระยะเวลา อุณหภูมิ และความชื้นในการจัดเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ต่อความคงตัวทางเคมีและทางกายภาพของผลิตภัณฑ์สารสกัดจากมะละกอ การตรวจวัดปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์สารสกัดจากมะละกอ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบในหลอดทดลอง เป็นต้น

1.5 ทฤษฎี สมมติฐาน และ/หรือกรอบแนวความคิดของการวิจัย

การค้นหาสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพในการเพิ่มค่าเกล็ดเลือดของสารสกัดหยาบชนิดผงแห้งจากส่วนใบมะละกอ เนื้อมะละกอดิบ และเนื้อมะละกอสุก ทั้งนี้ส่วนประกอบของสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพในสารสกัดหยาบชนิดผงแห้งจากเนื้อมะละกอดิบและเนื้อมะละกอสุก อาจมีความแตกต่างจากสารสกัดหยาบชนิดผงแห้งจากส่วนใบ ผลการศึกษาที่ได้ในส่วนนี้จะได้นำมาเปรียบเทียบและวิเคราะห์ ข้อมูล ทั้งนี้จะทำการคัดเลือกสารสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีที่สุด เพื่อนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสารสกัดจากมะละกอในรูปแบบอัดเม็ดหรือแบบแคปซูล ซึ่งสามารถพัฒนาต่อยอดงานวิจัยเพื่อนำทดสอบในอาสาสมัครและผู้ป่วยไข้เลือดออกที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำต่อไปได้ในอนาคต

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ความรู้เชิงวิชาการของสารสกัดจากใบมะละกอและเนื้อมะละกอทางด้านเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพทางการต้านอนุมูลอิสระ การต้านการอักเสบ การทำงานของเกล็ดเลือด และการต้านภาวะเกล็ดเลือดต่ำ
- 2) ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต้นแบบจากมะละกอในรูปแบบอัดเม็ดหรือแคปซูล เพื่อนำมาพัฒนาต่อยอดและทดสอบทางคลินิกในผู้ป่วยที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำต่อไปในอนาคต เพื่อนำไปใช้เป็นการแพทย์ทางเลือกในการเสริมการรักษา ร่วมกับการรักษาแผนปัจจุบันในผู้ป่วยกลุ่มเป้าหมาย เช่น ผู้ป่วยไข้เดงกีและไข้เลือดออกเดงกี ผู้ป่วยจากการใช้ยาเคมีบำบัด และผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันต้านตนเองที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำ ผลกระทบของผลิตภัณฑ์จากมะละกอ ที่มีฤทธิ์ต้านภาวะเกล็ดเลือดต่ำต่อกลุ่มเป้าหมาย คือคาดว่าจะไปเพิ่มระดับของเกล็ดเลือดของผู้ป่วยให้เข้าสู่ภาวะปกติเร็วขึ้น ส่งผลไปลดระยะเวลาในการเจ็บป่วย การนอนโรงพยาบาล และค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลของตัวผู้ป่วยเองและค่าใช้จ่ายของภาครัฐลงได้ ส่งผลต่อการพัฒนาทางสังคมและเพื่อความมั่นคง ทางเศรษฐกิจของประเทศ

1.7 แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมายเมื่อสิ้นสุดการวิจัย

- 1) กลุ่มเป้าหมายที่เป็นนักวิจัย/แพทย์ พัฒนาต่อยอดงานวิจัยผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต้นแบบจากมะละกอในรูปแบบอัดเม็ดหรือแคปซูล โดยทำการทดสอบความปลอดภัยกับอาสาสมัคร และการทดสอบประสิทธิผลทางคลินิกในผู้ป่วยไข้เลือดออกเดงกี หรือผู้ป่วยกลุ่มเป้าหมายอื่น ๆ ที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำต่อไป
- 2) ถ่ายทอดองค์ความรู้และเทคโนโลยีให้กับภาคเอกชนที่สนใจนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากมะละกอในรูปแบบอัดเม็ดหรือแคปซูล ผ่านหน่วยงานอุทยานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- 3) ผู้ป่วยไข้เลือดออกหรือผู้ป่วยกลุ่มเป้าหมายอื่น ๆ ที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำ นำผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากมะละกอไปใช้ เพื่อผลในการรักษาระดับเกล็ดเลือดให้เข้าสู่ระดับปกติได้เร็วขึ้น

บทที่ 2 เนื้อเรื่อง

2.1 วิธีการดำเนินการวิจัย

2.1.1 การคัดเลือกสายพันธุ์มะละกอและการตรวจสอบเอกลักษณ์

การคัดเลือกพันธุ์มะละกอสายพันธุ์ฮอลแลนด์จากสวนมะละกอ ในจังหวัดเชียงใหม่ โดยมีช่วงระยะเวลาที่เก็บ อายุและขนาดเท่ากัน ตัวอย่างมะละกอที่นำมาศึกษาจะทำการเก็บจากส่วนใบสด ผลมะละกอดิบ และผลมะละกอสุก จากนั้นนำมาทำการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ (authentication) ของพืชเพื่อยืนยันชนิดของตัวอย่างโดยผู้เชี่ยวชาญ ตรวจระบุชนิดพืชสมุนไพร โดยใช้รูปวิธานตามหลัก อนุกรมวิธานพืช (จัดทำตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงงานวิจัย เพื่อเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์พืช ของคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่)

2.1.2 การเตรียมสารสกัดหยาบจากมะละกอโดยวิธีทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง

นำตัวอย่างมะละกอส่วนใบมะละกอ ผลมะละกอดิบ และผลมะละกอสุก ที่ต้องการสกัดมาล้างให้สะอาด โดยทำการล้าง 3 ครั้ง ครั้งสุดท้ายให้ล้างด้วยน้ำกลั่น สำหรับใบมะละกอให้ตัดก้านกลางใบออก ส่วนมะละกอดิบและมะละกอสุก ทำการปอกเปลือกและนำเมล็ดออก ใช้ส่วนของเนื้อมะละกอ ซึ่งตัวอย่างมะละกอที่ต้องการสกัดมา 500 กรัมต่อ 1 ตัวอย่าง หั่นให้มีขนาดเล็กกลึง ตักตัวอย่างลงในเครื่องปั่นแล้วเติมน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ปั่นจนละเอียด ทำการกรองด้วยผ้าขาวบาง และคั้นน้ำให้ได้มากที่สุด นำส่วนสารสกัดหยาบที่ได้มาทำให้แห้งเป็นผงโดยการทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง เก็บตัวอย่างสารสกัดหยาบจากใบมะละกอสด ผลมะละกอดิบ และผลมะละกอสุกที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทำการศึกษาต่อไป

การเตรียมตัวอย่างมะละกออบแห้ง นำตัวอย่างมะละกอมาล้างให้สะอาด ส่วนของใบมะละกอ ทำการตัดก้านกลางใบและก้านแขนงที่มีขนาดใหญ่ออก มะละกอดิบและมะละกอสุกทำการปอกเปลือกให้หมดและนำเมล็ดออก จากนั้นทำการล้าง 3 ครั้ง น้ำสุดท้ายจะล้างด้วยน้ำกลั่น เมื่อทำการล้างเรียบร้อยแล้ว นำมาผึ่งลมให้แห้งพอประมาณก่อนนำไปเข้าตู้อบ 60 องศาเซลเซียส ส่วนผลมะละกอทำการหั่นให้มีขนาดหนา 2-3 มิลลิเมตร แล้วนำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิเดียวกันกับใบมะละกอ ใบมะละกออบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนผลมะละกอทำการอบเป็นเวลา 36-48 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างที่อบจนแห้งแล้วมาปั่นด้วยเครื่องปั่นขนาดเล็ก จัดเก็บในรูปของผงตัวอย่างมะละกอ

2.1.3 การสกัดสารจากใบมะละกอโดยใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในรูปของไหล (Supercritical fluid extraction)

นำส่งตัวอย่างใบมะละกออบแห้งปริมาณ 2 กิโลกรัม ไปสกัดหาสารสำคัญโดยใช้ การสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหลวที่สภาวะเหนือวิกฤต (Supercritical Fluid Extraction) ที่กองพัฒนายาแผนไทยและสมุนไพร กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข สภาวะในการทำมีดังนี้ ใช้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ความดัน 25 Mpa ในการสกัดสารจากนั้นเพิ่มตัวทำละลายร่วมชนิด 95% เอทานอล ลงไปในปริมาตร 2 ลิตร (co-solvent) ใช้ความดัน 8 Mpa ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จากนั้นใช้อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 5-6 Mpa ตามลำดับ

2.1.4 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในตัวอย่างมะละกอ ทำการวิเคราะห์ตามวิธีของ Singleton และคณะ (Singleton & Rossi 1965) ใช้ Gallic acid เป็นสารละลายมาตรฐาน โดยทำการละลายด้วยน้ำกลั่น ให้มีความเข้มข้น 50, 100, 150, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยในปฏิกิริยาประกอบไปด้วย 20 ไมโครลิตรของสารละลายมาตรฐาน หรือสารละลายตัวอย่าง 100 ไมโครลิตรของ 10% Follin-Cicalteu's (F-C) phenol reagent และ 80 ไมโครลิตรของสารละลายอิมตัวโซเดียมคาร์บอเนต โดยใช้น้ำกลั่นเป็น Blank นำปฏิกิริยาที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 700 นาโนเมตรทันที โดยใช้เครื่องอ่านปฏิกิริยาจากเพลท CLARIOstar® Plus Multi-mode Microplate Reader (BMG LABTECH) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดแสดงค่าในรูปของ ไมโครกรัมสมมูลของ gallic acid ต่อมิลลิกรัมสารสกัด (μg Gallic Acid Equivalents (GAE) per mg of dry extract)

2.1.5 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในตัวอย่างมะละกอ ทำการวิเคราะห์โดยวิธี aluminum chloride colorimetric assay (Zhishen et al 1999) เตรียมสารละลายมาตรฐาน quercetin โดยใช้ 75% เอทานอลเป็นตัวทำละลาย ที่ความเข้มข้น 50, 100, 150, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยในปฏิกิริยาประกอบไปด้วย 10 ไมโครลิตรของสารละลายมาตรฐาน หรือสารละลายตัวอย่าง 200 ไมโครลิตรน้ำกลั่น และ 30 ไมโครลิตรของ 5% โซเดียมไนไตรด์ นำปฏิกิริยาไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเติม 30 ไมโครลิตร ของสารละลาย 10% อะลูมิเนียมคลอไรด์ลงไป นำปฏิกิริยาไปบ่มต่อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 นาที เมื่อครบเวลาให้เติม 20 ไมโครลิตรของสารละลาย 10 มิลลิโมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องอ่านปฏิกิริยาจากเพลท CLARIOstar® Plus Multi-mode Microplate Reader (BMG LABTECH) ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดแสดงค่าในรูปของ ไมโครกรัมสมมูลของ quercetin ต่อมิลลิกรัมสารสกัด (μg Quercetin Equivalents (QE) per mg of dry extract)

2.1.6 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบอัลคาลอยด์ทั้งหมด

ปริมาณสารประกอบอัลคาลอยด์ทั้งหมด ทำการวิเคราะห์ตามวิธีของ Shamsa และคณะ (Shamsa et al 2008) เตรียมสารละลายมาตรฐาน atropine ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดูดสารละลายมาตรฐานมา 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 และ 1.2 มิลลิลิตร ตามลำดับ ทำการชั่งตัวอย่างใบมะละกอ มะละกอดิบ และมะละกอสุกมาปริมาณ 2, 4 และ 4 กรัม ตามลำดับ ตัวอย่างมะละกอนำไปละลายด้วย 2 N hydrochloric acid โดยใบมะละกอ 2 กรัม ใช้กรดไฮโดรคลอริก 4 มิลลิลิตร มะละกอดิบ 4 กรัม ใช้กรดไฮโดรคลอริก 4 มิลลิลิตร และมะละกอสุก 4 กรัม ใช้กรดไฮโดรคลอริก 8 มิลลิลิตร และเติมเพกติกเอนไซม์ 10 มิลลิกรัมเฉพาะมะละกอสุกหลังละลายด้วยกรดแล้ว เพื่อให้สารละลายตัวอย่างที่ได้ใสขึ้น นำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้นทำการล้างสารละลายที่กรองได้ด้วยคลอโรฟอร์ม 3 ครั้ง ครั้งละ 10 มิลลิลิตร เพื่อทำการชะล้างเอากรดออก เก็บสารละลายส่วนบนแล้วนำไปปรับความเป็นกรด-ด่าง โดยสารละลาย 2 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอก

ไซต์ เพื่อให้ได้สารละลายตัวอย่างที่เป็นกลาง จากนั้นเติม 5 มิลลิลิตรของสารละลาย bromocresol green (BCG) และ 5 มิลลิลิตรของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 4.7 ลงในสารละลายตัวอย่าง และสารละลายมาตรฐาน แล้วทำการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 3 ครั้ง ครั้งละ 5, 3 และ 2 มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อทำการสกัดด้วยคลอโรฟอร์มครบสามครั้งให้ เก็บตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานที่สกัดได้จากชั้นคลอโรฟอร์มมารวมกัน แล้วทำการปรับปริมาตรสารสกัดที่ได้ให้มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร ด้วยคลอโรฟอร์ม นำสารละลายมาตรฐานและตัวอย่างที่สกัดได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 417 นาโนเมตร ปริมาณสารประกอบอัลคาลอยด์ทั้งหมด แสดงค่าในรูปของ ไมโครกรัมสมมูลย์ ของ atropine ต่อมิลลิกรัมสารสกัด ($\mu\text{g Atropine Equivalents (AE) per mg of dry extract}$)

2.1.7 การวิเคราะห์หาปริมาณแร่ธาตุและวิตามิน

ส่งตัวอย่างวิเคราะห์หาปริมาณแร่ธาตุและวิตามินที่สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยขั้นตอนวิธีการวิเคราะห์ดังนี้ แคลเซียม โซเดียมและโพแทสเซียม วิเคราะห์โดยวิธี Atomic Absorption Spectrometry (AAS) (AOAC method 985.35, 2016) ฟอสฟอรัส วิเคราะห์ตามวิธีของ Kolthoff และคณะ (Kolthoff et al 1969) แมกนีเซียม เหล็ก สังกะสี และ ทองแดง วิเคราะห์โดยวิธี inductively coupled plasma หรือ ICP (AOAC method 984.27, 2016) ไทอะมีน (วิตามินบี1) ไบโอฟลาเวิน (วิตามินบี2) และไนอะซินวิเคราะห์ โดยวิธี high performance liquid chromatography (HPLC) (AOAC 2016) วิตามินอี และโฟเลทวิเคราะห์ โดยวิธี In-house method (Speek et al 1985) (Speek., 1985, AOAC, 2016) วิตามินซีวิเคราะห์ โดยตามวิธีของ Odriozola-Serrano และคณะ (Odriozola-Serrano et al 2007)

2.1.8 การวิเคราะห์หาสารประกอบทางเคมีโดยใช้เทคนิค GC-MS

นำตัวอย่างส่งวิเคราะห์หาสารประกอบทางเคมี ที่หน่วยเครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เครื่อง GC-MS ที่ใช้ในการวิจัยนี้ ประกอบด้วย Agilent 7890B gas chromatography (GC) system และ Agilent 5977B mass spectrometer โดยใช้คอลัมน์ชนิด HP-5MS UI (30 m x 0.25 mm, film thickness 0.25 μm) ฉีดสารประมาณ 1 ไมโครลิตร โดยใช้อุณหภูมิในการฉีดสารที่ 220 องศาเซลเซียส ใช้ฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพาที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อ นาที ตั้งโปรแกรมอุณหภูมิของ column oven ดังนี้ เริ่มต้นที่ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นค่อยๆเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาทีจนถึง 180 องศาเซลเซียส และเพิ่มอุณหภูมิเป็น 220 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 5 องศาเซลเซียสต่อนาที และคงที่เป็นเวลา 8 นาที (รวมเวลาทั้งหมดเป็น 29 นาที) ในส่วนของแมสสเปกโตรมิเตอร์ใช้โหมด scan mass ช่วงมวลที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ 30-400 amu. โครมาโตแกรมของสารสกัดที่ได้จากเครื่อง GC-MS นำมาเปรียบเทียบกับเชิงคุณภาพของพีคกับฐานข้อมูล Chemstation Wiley Spectral Library (Wiley 10n14.1) และรายงานความน่าจะเป็น เพื่อบ่งชี้ชนิดของสารได้ โดยใช้ความตรงกันที่มากกว่า 80% ปริมาณของสารที่ได้คำนวณจากค่า retention time และ %area และรายงานผลเฉพาะพีคที่มีคุณภาพตั้งแต่ 80 ขึ้นไป

2.1.9 การวิเคราะห์หาสารประกอบทางเคมีโดยใช้เทคนิค LC-MS/MS

นำตัวอย่างส่งวิเคราะห์หาสารประกอบทางเคมี ที่ศูนย์ปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ด้วยวิธี high-performance liquid chromatography

coupled to electrospray ionization and quadruple time-of-flight mass spectrometry (HPLC-ESI-QTOF-MS) อุปกรณ์ที่ใช้ในประกอบด้วย Agilent 1260 Infinity series HPLC system (Agilent, Waldbronn, Germany) ที่ต่อพ่วงด้วย เครื่องมือชนิด 6540 UHD accurate mass QTOF LC/MS mass spectrometer (Agilent Technologies, Singapore) วิเคราะห์สารโดยตรวจวัดไอออนทั้ง positive และ negative ion modes โดยมีสภาวะในการวิเคราะห์ ดังนี้ ใช้แก๊สไนโตรเจนแห้ง (N₂) อัตราการไหล 10 L/min อุณหภูมิ 350 องศาเซลเซียส nebulizer 30 psig, fragmentor 100V, capillary voltage 3500V, skimmer 65 V; octapole RFV 750 V และสแกนสเปกตรัมจาก m/z 100-1000amu ตั้งค่าการแตกตัวอัตโนมัติ (auto fragmentation) ด้วย collision energies เท่ากับ 10, 20 และ 40V แยกสารโดยใช้คอลัมน์ LunaC18 (2) (4.6 × 150 mm, 5 μm, Phenomenex, USA) ด้วยอัตราการไหล 0.5 mL/min อุณหภูมิคอลัมน์ 35 องศาเซลเซียส ตัวทำละลายเคลื่อนที่ประกอบด้วยส่วนผสมของสารละลาย A (0.1% formic acid in water, v:v) และสารละลาย B (0.1% formic acid in acetonitrile, v:v) โดยการทำให้ linear gradient ตั้งแต่ 5 ถึง 95% ของตัวทำละลาย B โดยให้ตัวอย่างผ่านคอลัมน์เป็นเวลา 30 นาที และคงที่ที่ 95% ของตัวทำละลาย B เป็นเวลา 10 นาที ทำการชะล้างคอลัมน์ด้วย 95% ของตัวทำละลาย B เป็นเวลา 5 นาที ก่อนที่จะเริ่มฉีดสารตัวอย่างใหม่ ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ 10 ไมโครลิตร

การวิเคราะห์ห้องค์ประกอบทางเคมี ค้นหาชนิดของสารจากสเปกตรัมที่ได้และรูปแบบการแตกตัวเป็นไอออนทั้งชนิดบวกและลบ ทำนายชื่อสารโดยใช้ข้อมูลจากรายงานผลการวิจัยและผลงานตีพิมพ์ และข้อมูลจาก database ได้แก่ METLIN Metabolite Personal Compound Database (PCD, Agilent Technologies), Chemspider (<http://www.Chemspider.com>) และ Human metabolome database (<http://www.hmdb.ca>) เป็นต้น ประมวลผลด้วย Agilent MassHunter Qualitative Analysis Software B06.0 วิเคราะห์สูตรโครงสร้างทางโมเลกุลโดยใช้ Agilent MassHunter Qualitative Analysis Software B 06.00.

2.1.10 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบกลุ่ม phenolic acids และ flavonoids

นำตัวอย่างส่งวิเคราะห์หาปริมาณ phenolic acids และ flavonoids ที่สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล ตามวิธีของ Merken และ Beecher (Merken & Beecher 2000) โดยใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) มีวิธีทำโดยย่อดังนี้ คือ ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดแล้วมาประมาณ 5-10 กรัม หลังจากนั้นเติม 62.5% ของสารละลายเมทานอลที่มีองค์ประกอบของ tert-butylhydroquinone (TBHQ) 0.5 กรัมต่อลิตร และเติม 10 มิลลิลิตรของ 6 N hydrochloric acid นำไปสกัด (reflux) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็น และนำสารละลายนั้นไปผ่านเครื่อง ultrasonic เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายไปกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 2.5 ไมครอน แล้วกรองสารละลายอีกครั้งด้วย syringe filter ขนาด 0.2 ไมครอน ก่อนนำสารละลายดังกล่าวไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC

เครื่อง HPLC ที่ใช้ ประกอบด้วย quaternary gradient pumping system (G1315A, serial# DE43631092, Agilent, Germany) และ diode array UV-visible detector (G1315B, serial# DE43625969, Agilent, Germany) พร้อมกับ vacuum degasser (G1379A, serial# JP40722051, Agilent, Germany) และ thermostatted column compartment (G1316A,

serial# DE43645069, Agilent, Germany) และ autosampler (G1329A, serial# DE43614716, Agilent, Germany) โดยใช้คอลัมน์ C18 (Eclipse XDB-C18, 4.6 x 250 mm, 5 μ m column, Agilent, Germany) พร้อมด้วย guard column (Eclipse XDB-C18 cartridge, 4.6 x 12.5 mm, 5 μ m, Grace division, USA) ที่ flow rate 0.6 มิลลิลิตร/นาที โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 30°C และวัดที่ความยาวคลื่น 210, 280, 325, 338 และ 368 nm สำหรับ mobile phase ประกอบด้วย 3 สารละลาย ได้แก่ 0.05% trifluoroacetic acid (TFA) ใน water, 0.05% TFA ใน methanol และ 0.05% TFA ใน acetonitrile (w/w) ด้วย solvent parameters ดังนี้คือ 0-5 min: 90-85% A, 6-9% B, 4-6% C; 5-30 min: 85-71% A, 9-17.4% B, 6-11.6% C; 30-60 min: 71-0% A, 17.4-85% B, 11.6-15% C; 60-61 min: 0-90% A, 85-6%B, 15-4% C; and 61-66 min: 90% A, 6% B, 4% C การหา phenolic acids และ flavonoids ในตัวอย่างอาหารจะใช้วิธีเปรียบเทียบกับโครมาโตแกรมและสเปกตรัมของตัวอย่าง กับโครมาโตแกรมและสเปกตรัมของสารมาตรฐานแต่ละชนิด โดยใช้โปรแกรม ChemStation software (Agilent, Germany)

สารมาตรฐานที่ใช้ได้แก่ Caffeic acid (C0625), p-coumaric acid (C9008), Ferulic acid (128708), Sinapic acid (D7927), Myricetin (M6760), Quercetin (Q4951), Luteolin (L9283), Naringenin (N5893), Hesperetin (H4128), Kaempferol (60010), Apigenin (10798) ของ Sigma-Aldrich, USA

2.1.11 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบกลุ่มแคโรทีนอยด์

นำตัวอย่างส่งวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบกลุ่มแคโรทีนอยด์ ที่สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล การวิเคราะห์หาปริมาณแคโรทีนอยด์ใช้วิธีของ Speek และคณะ ปี 1985 (Speek et al 1985) กล่าวโดยย่อคือ ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดมาประมาณ 5 - 10 กรัม หลังจากนั้นเติม 10 มิลลิลิตรของสารละลาย 10% ascorbic acid และเติม 50 มิลลิลิตรของ 2 N ethanolic potassium hydroxide จากนั้นนำตัวอย่างไปต้มให้เดือด ที่เรียกว่า Saponification ประมาณ 30 นาที เพื่อขจัดไขมันออก หลังจากนั้นตั้งตัวอย่างทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมเฮกเซน (hexane) 70 มิลลิลิตร นำตัวอย่างดังกล่าวมาเขย่าติดต่อกันเป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นดูดเอาสารละลายส่วนบนใส่ลงในขวดแก้วที่มี 50 มิลลิลิตรของ 5% potassium hydroxide อยู่ แล้วเติม 35 มิลลิลิตรของ hexane ลงไปแล้วเขย่าติดต่อกัน 2 นาที ทำซ้ำสองครั้ง จะเห็นสารละลายแยกออกเป็นสองชั้น ปล่อยให้สารละลายชั้นล่างออก หลังจากนั้นเติม 10% sodium chloride แล้วล้างด้วยน้ำจนกระทั่งไม่มีต่างหลงเหลืออยู่ในสารละลายตัวอย่าง นำสารละลายดังกล่าวไปทำให้แห้งบน rotary evaporator หลังจากนั้นนำสารที่ได้จากการระเหยแห้งไปละลายด้วย methylene chloride 1 มิลลิลิตร และสารละลาย mobile phase 2 มิลลิลิตร กรองสารละลายผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน แล้วนำสารละลายดังกล่าวไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC เพื่อหาปริมาณสารอนุพันธ์ของแคโรทีนอยด์

เครื่อง HPLC ที่ใช้ในการวิจัยนี้ ประกอบด้วย Alliance 2695, Waters HPLC และ Waters 486 UV/VIS detector (Waters Corporation, USA) โดยใช้คอลัมน์ C18 (Vydac 201 TP, C18 4.6 x 250 mm, 5 μ m column, Grace division, USA) พร้อมด้วย guard column (monomeric reversed -phase, cartridge C18 4.6 x 7.5 mm, 5 μ m, Grace division, USA) ที่ flow rate 0.7 มิลลิลิตร/นาที โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 30°C และวัดที่ความยาวคลื่น 450 nm ส่วน

mobile phase ประกอบด้วย Acetonitrile (CH₃CN): Methanol (CH₃OH): Methylene chloride (CH₂Cl₂): Triethylamine (TEA): Ammonium acetate (CH₃COONH₄) ในอัตราส่วน 90:8:2:0.085:0.085 (v/v/v/v and w/v) การหาแคโรทีนอยด์แต่ละชนิดในตัวอย่างอาหารจะใช้วิธีเปรียบเทียบโครมาโตแกรมของตัวอย่างกับโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานอ้างอิง โดยการใช้โปรแกรม Empower (Waters Corporation, USA)

สารมาตรฐาน Lutein (0133, CAROTE NATURE, Germany), Zeaxanthin (0119, CAROTE NATURE, Germany), β -cryptoxanthin (0055, CAROTE NATURE, Germany), Lycopene (0031, CAROTE NATURE, Germany), α -carotene (0007, CAROTE NATURE, Germany), β -carotene (C9750, Sigma-Aldrich, USA)

2.1.12 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด ทำการวัดโดยอาศัยหลักการที่สารสังเคราะห์ชนิด 2,2'-diphenyl-b-picrylhydrazyl (DPPH) ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัวและเมื่อละลายในเอทานอลจะทำให้สารละลายเป็นสีม่วง สามารถทำปฏิกิริยาได้กับสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แล้วให้ผลผลิตเป็นสารประกอบสีเหลือง ที่สามารถดูดกลืนคลื่นแสงได้ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (Sharma & Bhat 2009) วิธีการวัดมีดังนี้ ในปฏิกิริยาประกอบไปด้วยสารละลายตัวอย่างของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ หรือสารมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลทขนาด 96 หลุม จากนั้นเติมสารละลาย DPPH (120 μ M DPPH radical solution in 95% ethanol) ปริมาตร 195 ไมโครลิตรลงไป นำไมโครเพลทไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำไปปฏิกิริยาที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ (%Radical Scavenging Activity) จากสมการ

$$\% \text{Radical Scavenging Activity} = [(A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}} / A_{\text{blank}}] \times 100\%$$

เมื่อ A_{blank} คือค่าการดูดกลืนแสงของตัวทำละลายของสารตัวอย่าง
 A_{sample} คือค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

นำค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่าง หรือสารมาตรฐานและค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ มาสร้าง dose-response curve โดยใช้สูตร 5 parameter logistic equation โดยใช้โปรแกรม Graphad Prism เพื่อหาค่า EC₅₀ (50% effective concentration) หรือความเข้มข้นของสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สามารถไปลดความเข้มข้นของสารอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50% จากนั้นเปรียบเทียบกับค่า EC₅₀ ของสารตัวอย่างกับสารละลายมาตรฐาน

2.1.13 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี ABTS

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด ทำการวัดโดยอาศัยหลักการที่สารสังเคราะห์ชนิด (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัว สามารถทำปฏิกิริยาได้กับสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แล้วให้ผลผลิตที่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร (Roberta et al 1999) วิธีการเตรียมสารละลาย ABTS radical มีดังนี้ ทำการผสมสารละลาย 7 mM ABTS และสารละลาย 2.45 mM

potassium persulfate ในอัตราส่วน 1:1 นำสารละลายไปต้มในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12–16 ชั่วโมง ทำการเจือจางสารละลาย ABTS radical ที่ได้ด้วยเอทานอล ให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.7 (± 0.02) ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร วิธีการวิเคราะห์ที่มีดังนี้ ผสมสารละลายตัวอย่างของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ หรือสารมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลทขนาด 96 หลุม จากนั้นเติมสารละลาย ABTS radical ปริมาตร 195 ไมโครลิตรลงไป นำไมโครเพลทไปต้มในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำปฏิกิริยาที่ได้ไปวัดการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ (%Radical Scavenging Activity) จากสมการ

$$\% \text{Radical Scavenging Activity} = [(A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}} / A_{\text{blank}}] \times 100\%$$

เมื่อ A_{blank} คือค่าการดูดกลืนแสงของตัวทำละลายของสารตัวอย่าง
 A_{sample} คือค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

นำค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่าง หรือสารมาตรฐานและค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ มาสร้าง dose-response curve โดยใช้สูตร 5 parameter logistic equation โดยใช้โปรแกรม Graphad Prism เพื่อหาค่า EC50 (50% effective concentration) หรือความเข้มข้นของสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สามารถไปลดความเข้มข้นของสารอนุมูลอิสระ ABTS ได้ 50% จากนั้นเปรียบเทียบกับค่า EC50 ของสารตัวอย่างกับสารละลายมาตรฐาน

2.1.14 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี FRAP

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโดยวิธี FRAP (Ferric reducing antioxidant power) ทำการวัดโดยอาศัยปฏิกิริยาที่สารประกอบเชิงซ้อน ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+} -TPTZ) ได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านอนุมูลอิสระแล้ว เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารประกอบเชิงซ้อน ferrous tripyridyltriazine (Fe^{2+} -TPTZ) ผลผลิตที่ได้นี้ให้สีน้ำเงิน ที่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร (Benzie & Strain 1996) วิธีการเตรียมสารละลาย FRAP มีดังนี้ ทำการผสมสารละลาย 10 mM TPTZ (2,4,6 tripyridyl-S-triazine), สารละลาย 300 mM acetate buffer และสารละลาย 20 mM ferric chloride ในอัตราส่วน 10:1:1 ตามลำดับ วิธีการวิเคราะห์ที่มีดังนี้ ผสมสารละลายมาตรฐาน (ascorbic acid 50, 100, 150, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) และสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลทขนาด 96 หลุม จากนั้นเติมสารละลาย FRAP 180 ไมโครลิตร นำไปต้มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร คำนวณความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการให้อิเล็กตรอน โดยเปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานของ ascorbic acid และแสดงค่าในรูปของ ไมโครกรัมสมมูลของ ascorbic acid ต่อกรัมสารสกัด (μg ascorbic acid equivalent/g extract)

2.1.15 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านการอักเสบในหลอดทดลอง

วิเคราะห์ความสามารถในการต้านการอักเสบในหลอดทดลองของสารสกัดมะละกอ ทำโดยวิธี bovine serum protein denaturation ตามวิธีของ Sunmathi และคณะ (Sunmathi &

Sivakumar 2018) โดยในปฏิกิริยาจะประกอบไปด้วย 100 ไมโครลิตรของสารละลายตัวอย่าง (ได้แก่สารละลายสารสกัด หรือยา nonsteroidal anti-inflammatory drug ชนิด diclofenac ที่ความเข้มข้นต่างๆ หรือ น้ำกลั่นสำหรับหลอดควบคุม) และ 0.45 มิลลิลิตรของ 0.5% สารละลาย bovine serum albumin นำสารละลายผสมที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เติมสารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.4 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรลงในสารละลายผสม จากนั้นนำไปปฏิกิริยาที่ได้มาวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการทำลายโปรตีน (protein denaturation) ดังสมการ

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(\text{OD}_{\text{Sample}} - \text{OD}_{\text{control}})}{(\text{OD}_{\text{control}})} * 100$$

2.1.16 ตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือด

การเตรียมเกล็ดเลือด คัดเลือกอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี อายุระหว่าง 20-35 ปี อาสาสมัครต้องไม่ได้รับประทานยาทุกชนิดเป็นเวลา 14 วัน โดยให้อาสาสมัครอดอาหารในคืนก่อนเจาะเลือดอย่างน้อย 10 ชั่วโมง เจาะเลือดปริมาตร 2.7 มิลลิลิตร จำนวน 6 หลอด โดยใช้หลอดบรรจุเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด 3.2% (0.109 M) sodium (BD vacutainer®) เลือดที่ได้นำมาเตรียมเกล็ดเลือด (platelet-rich plasma; PRP) ดังนี้ นำหลอดเลือดไปปั่นที่ 200 x g ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (ใช้ระบบเบรคเครื่องในระดับต่ำ) ดูดส่วนพลาสมาที่อยู่ชั้นบนมาใส่หลอดทดลองใหม่ เก็บไว้เป็นส่วนประกอบของเลือดชนิด PRP ส่วนการเตรียม PPP (platelet-poor plasma) ทำโดยการดูด PRP มา 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นที่ 1,700 x g ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนพลาสมาที่อยู่ชั้นบนมาใส่หลอดทดลองใหม่ จัดเก็บไว้เป็นส่วนประกอบของเลือดชนิด PPP นำ PRP ที่ได้ไปวัดค่าเกล็ดเลือด

การวัดการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือด (platelet aggregation) นำเกล็ดเลือดที่ได้ (400-500 x 10⁹ cells/L) ปริมาตร 40 ไมโครลิตรมาบ่มร่วมกับ 5 ไมโครลิตรของสารสกัดน้ำจากมะละกอ หรือยาแอสไพรินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำปฏิกิริยาที่ได้ใส่ลงไปใน half-area 96-well microtiter plates ที่มี 10 ไมโครลิตรของสารกระตุ้นการรวมตัวกันของเกล็ดเลือดชนิด adenosine diphosphate (ADP, ความเข้มข้นสุดท้าย 10 ไมโครโมลาร์) นำ microplate ไปเขย่าที่ 900 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นวัดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดในหลอดทดลองในสถานะที่มีตัวกระตุ้นอย่างเดียว และในสถานะที่มีตัวกระตุ้นร่วมกับสารสกัดน้ำจากมะละกอหรือแอสไพริน โดยนำปฏิกิริยาที่ได้ไปวัดค่าความทึบแสง (optical density) ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องอ่านปฏิกิริยาในไมโครเพลท ตามวิธีของ Vinholt และคณะ (Vinholt et al 2017) นำค่าความทึบแสงที่ได้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการรวมตัวกันของเกล็ดเลือด โดยให้ตั้งค่าความทึบแสงของ PRP ที่ได้เป็น 0% aggregation และค่าความทึบแสงของ PPP ที่ได้เป็น 100% aggregation ดังสมการ

$$\text{Platelet aggregation} = \frac{(\text{OD PRP} - \text{OD sample})}{(\text{OD PRP} - \text{OD PPP})} * 100\%$$

2.1.17 ตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการหลั่ง cAMP และ cGMP

เจาะเลือดโดยใช้หลอดบรรจุเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด ACD Solution A (2.5% sodium citrate, 2% D-glucose and 1.5% citric acid; BD Vacutainer®) เลือดที่ได้นำมาเตรียมเกล็ดเลือด (platelet-rich plasma; PRP) ดังนี้ นำหลอดเลือดไปปั่นที่ 200 x g ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน ที่ (ใช้ระบบเบรคเครื่องในระดับต่ำ) ดูดส่วนพลาสมาที่อยู่ชั้นบนมาใส่หลอดทดลองใหม่ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ 1,700 x g ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที ละลายส่วนตะกอนเกล็ดเลือดชนิด PRP ใน wash buffer (138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, 0.36 mM NaH₂PO₄, 5.5 mM glucose, and 1 mM EDTA, pH 6.9) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายเกล็ดเลือดไปปั่นตกตะกอน ที่ 1,300 x g ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ทำการปั่นล้างตะกอนเกล็ดเลือดชนิด PRP จำนวน 2 ครั้งด้วย wash buffer ละลายตะกอนเกล็ดเลือดที่ทำการล้างแล้วใน suspension buffer (138 mM NaCl, 5.5 mM glucose, 2.7 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, 0.36 mM NaH₂PO₄, 0.49 mM MgCl₂, and 0.25% gelatin, pH 7.4) แล้วปรับความเข้มข้นของเกล็ดเลือด PRP ให้เป็น 100×10^9 cells/ml

นำเกล็ดเลือด (100×10^9 cells/ml) มาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ในสภาวะที่มีและไม่มีสารสกัดมะละกอที่ละลายใน 2 mM CaCl₂ จากนั้นกระตุ้นเกล็ดเลือดด้วยสารละลาย ADP (10 μ M) บ่มปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา ทำการหยุดปฏิกิริยาการกระตุ้นเกล็ดเลือดโดยการเติม ice-cold ethanol (50%) ลงไป นำสารละลายในปฏิกิริยาที่ได้ไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 2,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายใสส่วนบนไว้ เพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณ cAMP และ cGMP โดยใช้ชุดทดสอบ cAMP Parameter Assay Kit และ cGMP Parameter Assay Kit (R&D Systems) ตามลำดับ โดยขั้นตอนการวิเคราะห์เป็นไปตามคู่มือของบริษัท

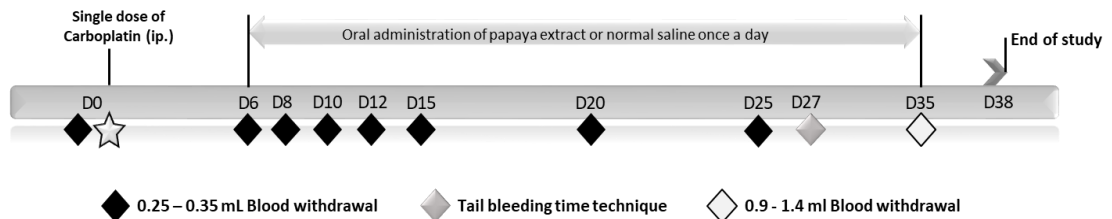
2.1.18 ตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการสร้าง thromboxane B2

นำเกล็ดเลือด (100×10^9 cells/ml) มาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ในสภาวะที่มีและไม่มีสารสกัดมะละกอที่ละลายใน 2 mM CaCl₂ จากนั้นกระตุ้นเกล็ดเลือดด้วยสารละลาย ADP (10 μ M) บ่มปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา ทำการหยุดปฏิกิริยาการกระตุ้นเกล็ดเลือดโดยการเติม ice-cold EDTA (10 mM) ลงไป นำสารละลายในปฏิกิริยาที่ได้ไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายใสส่วนบนไว้ เพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณ TXB2 โดยใช้ชุดทดสอบ Thromboxane B2 Parameter Assay Kit (R&D Systems) โดยมีขั้นตอนการวิเคราะห์เป็นไปตามคู่มือของบริษัท

2.1.19 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดน้ำจากมะละกอในการเพิ่มจำนวนเกล็ดเลือดในหนูทดลองพันธุ์วีสตาร์

หนูขาวเพศเมียพันธุ์วีสตาร์ (female albino Wistar rat) จะถูกนำมาใช้ในการศึกษาผลของสารสกัดน้ำจากมะละกอในการเพิ่มจำนวนเกล็ดเลือด หลังถูกกระตุ้นให้เกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำด้วยยาเคมีบำบัดชนิดคาร์โบพลาติน โดยในการศึกษาจะแบ่งหนูเป็น 5 กลุ่มการทดสอบ กลุ่มละ 6 ตัวรวม

หนูขาวเพศเมียพันธุ์วิสตาทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษานี้จำนวน 30 ตัว ซึ่งทั้ง 5 กลุ่มการทดสอบ ประกอบไปด้วยกลุ่มควบคุม กลุ่มที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำ และกลุ่มทดสอบที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำ ร่วมกับการได้รับสารสกัดน้ำจากมะละกอทางปากจำนวน 3 ชนิด โดยในการศึกษาจะมีการให้ยาคาร์โบพลาตินขนาด 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมทางช่องท้อง 1 ครั้ง การให้สารสกัดขนาด 400 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมทางปาก 29 วัน การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดน้ำจากมะละกอในการเพิ่มจำนวนเกล็ดเลือดและผลต่อการยับยั้งเลือดออกในหนูทดลอง มีขั้นตอนการศึกษา ดังนี้



สัตว์ทดลอง

หนูขาวเพศเมียพันธุ์วิสตา (female albino Wistar rat) จากศูนย์สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ น้ำหนักประมาณ (200-300 กรัม) จะถูกนำมาใช้ในการศึกษานี้ โดยการเลี้ยงหนูจะเลี้ยงอยู่ในกรงไม่เกิน 2 ตัวต่อกรง ในห้องเลี้ยงสัตว์ที่มีระบบควบคุมอุณหภูมิ ความชื้น แรงดันอากาศที่เหมาะสม สัตว์ทดลองได้รับน้ำและอาหารตามมาตรฐานของศูนย์สัตว์ทดลอง

ขั้นตอนการใช้สัตว์ทดลอง

ทำการสุ่มแบ่งหนูขาวเพศเมียพันธุ์วิสตา ออกเป็น 5 กลุ่ม ๆ ละ 6 ตัว เพื่อศึกษาผลของสารสกัดในการเพิ่มจำนวนเกล็ดเลือดและผลต่อการยับยั้งเลือดออกในหนูทดลองที่ถูกกระตุ้นให้เกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำ ได้แก่

กลุ่มที่	
1	กลุ่มควบคุม ได้รับน้ำเกลือ
2	กลุ่มที่มีเกล็ดเลือดต่ำจากยาคาร์โบพลาติน และได้รับน้ำเกลือ
3	กลุ่มที่มีเกล็ดเลือดต่ำจากยาคาร์โบพลาติน และได้รับสารสกัดจากใบมะละกอ
4	กลุ่มที่มีเกล็ดเลือดต่ำจากยาคาร์โบพลาติน และได้รับสารสกัดจากผลมะละกอดิบ
5	กลุ่มที่มีเกล็ดเลือดต่ำจากยาคาร์โบพลาติน และได้รับสารสกัดจากผลมะละกอสุก

โดยในกลุ่มที่ 2-5 จะได้รับยา carboplatin (single dose) ซึ่งเป็นยาที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งในมนุษย์ (pharmaceutical-grade) ขนาด 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ซึ่งเป็นปริมาณยาที่ทำให้เกล็ดเลือดต่ำชั่วคราว โดยไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อหนูทดลอง (Saraf & Kavimandan 2017, Siddik et al 1987) โดยการให้ยาเข้าทางช่องท้อง (Intraperitoneal injection; I.P.) ในวันแรกของการทดสอบ (วันที่ 0) กลุ่มที่ 3-5 เป็นกลุ่มทดสอบ จะได้รับสารสกัดน้ำจากมะละกอ โดยการให้กินทางปากด้วยวิธี intragastric administration (oral gavage) โดย

ปริมาณของสารสกัดที่ใช้นี้เป็นปริมาณที่มีความปลอดภัย ไม่มีความเป็นพิษ และไม่ก่อให้เกิดการตายของสัตว์ทดลอง (Halim et al 2011, Tarkang et al 2012) รวมถึงไม่ก่อให้เกิดการกระตุ้นการสร้างเกล็ดเลือดที่มากเกินไปในสัตว์ทดลองที่มีภาวะปกติ (Afzan et al 2012, Ismail et al 2014) สำหรับกลุ่มที่ 1) กลุ่มควบคุม และ 2) กลุ่มถูกกระตุ้นให้เกล็ดเลือดต่ำจากยา carboplatin จะได้รับน้ำเกลือปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ทางปากแทนสารสกัดน้ำจากมะละกอ โดยจะได้รับสารสกัดและน้ำเกลือทุกวันตั้งแต่วันที่ 6 จนถึงวันที่ 34

การวิเคราะห์การเพิ่มจำนวนเกล็ดเลือด ทำการเก็บเลือดหนูหลังการทดสอบ ในวันที่ 0, 6, 8, 10, 12, 15, 20 และ 25 โดยทำการเจาะกับเลือดจากหนูจากเส้นเลือดดำบริเวณขา (saphenous vein) ปริมาตร 0.25 – 0.35 มิลลิลิตรขึ้นอยู่กับน้ำหนักตัวของหนูทดลอง โดยใช้สารกันเลือดแข็งชนิด EDTA เพื่อส่งตรวจทางโลหิตวิทยาเพื่อตรวจดูความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด หาค่าจำนวนเกล็ดเลือด ค่าฮีโมโกลบินและค่าฮีมาโตคริต เป็นต้น

การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดน้ำจากมะละกอ เมื่อครบกำหนด 30 วันของการให้สารสกัดมะละกอ (วันที่ 35) ทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากหนูทดลองปริมาตร 0.90 – 1.4 มิลลิลิตร ขึ้นอยู่กับน้ำหนักตัวของหนูทดลอง จาก saphenous vein เพื่อส่งตรวจทางชีวเคมี ได้แก่ การตรวจการทำงานของตับ โดยวิเคราะห์หาปริมาณของ alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), alkaline phosphatase (ALP), Albumin, Total protein, Bilirubin การตรวจการทำงานของไต โดยวิเคราะห์หาปริมาณของยูเรียไนโตรเจนในเลือด (BUN) และการตรวจระดับครีเอตินิน (creatinine)

2.1.20 คุณลักษณะของสารสกัดจากใบมะละกอ

คุณลักษณะ (characteristic) คุณสมบัติทางกายภาพทางเคมี รวมทั้งการวัดปริมาณสารบ่งชี้ (marker) ที่จำเพาะในสารสกัดจากใบมะละกอชนิด quercetin, rutin และ kaempferol ส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบ polyphenolics ที่บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด สาขาเชียงใหม่ โดยวิธี Reverse-phase high performance liquid chromatography (Peñarrieta et al 2007)

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์สารประกอบ polyphenolics ประกอบด้วย Agilent 1100 series LC system (Agilent, Waldbronn, Germany) ที่ต่อพ่วงด้วย mass detector system ชนิด LC/MSD (Mass Selective Detector) SL mass spectrometer (Agilent Technologies, USA) วิเคราะห์สารโดยตรวจวัดการแตกตัวของไอออนแบบ positive ion mode โดยมีสภาวะในการวิเคราะห์ ดังนี้ ใช้แก๊สไนโตรเจนแห้ง (N₂) อัตราการไหล 13 L/min อุณหภูมิ 320 องศาเซลเซียส nebulizer 60 psig, capillary voltage 4000V, และสแกนสเปกตรัมจาก m/z 100-700amu โดยใช้คอลัมน์ LiChroCART RP-18e 150 x 4.6 mm, 5 μ m, Purospher STAR Merck, USA) ที่ flow rate 1.0 มิลลิลิตร/นาที โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 40°C และวัดที่ความยาวคลื่น 270, 330, 350 และ 370 nm สำหรับ mobile phase ประกอบด้วย 2 สารละลาย ได้แก่ acetonitrile (A) และ 10 mM ammonium formate buffer pH4 (B) ด้วย solvent parameters ดังนี้คือ 0-5 min: 100% A, 5-10 min: 0-20% A, 10-20 min: 20% A และ 20-60 min: 20-40% A การหา phenolic acids และ flavonoids ในตัวอย่างจะใช้วิธีเปรียบเทียบกับโครมา

โตแกรมและสเปกตรัมของตัวอย่าง กับโครมาโตแกรมและสเปกตรัมของสารมาตรฐานแต่ละชนิด โดยใช้โปรแกรม ChemStation software (Agilent, Germany)

วิเคราะห์หาปริมาณสารโดยใช้ selected ion monitoring mode สารมาตรฐานที่ใช้ได้แก่ 188, 209 m/z สำหรับ gallic acid; 185, 329, 503, 649 m/z สำหรับ catechin, isoquercetin, tannic acid และ rutin ตามลำดับ; 289, 327, 341 m/z สำหรับ hydroquinin, eriodictyol และ quercetin ตามลำดับ; 271, 287, 309, 325 m/z สำหรับ apigenin และ kaempferol ของ Sigma-Aldrich, USA

2.2 ผลการทดลอง

2.2.1 สายพันธุ์มะละกอและการตรวจสอบเอกลักษณ์

มะละกอที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คัดเลือกมะละกอสายพันธุ์ฮอลแลนด์จากสวนมะละกอ ในอำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่ (Map for 19.0897475 N, 99.0814447 E) ระบุชนิดพืชสมุนไพร โดยใช้รูปวิธานตามหลัก อนุกรมวิธานพืช มะละกอเป็นไม้ต้น มีความสูงประมาณ 4 เมตร ลำต้นตั้งตรง มีน้ำยางสีขาว ใบมีลักษณะเป็นใบเดี่ยว ขอบใบเป็นใบแฉก ดอกเป็นดอกช่อ ดังรูปที่ 2.1 ผลมีรูปร่างรี มีหลายเมล็ด จัดทำตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงงานวิจัย จัดเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์พืช ของคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่



รูปที่ 2.1 ลักษณะทางกายภาพของต้นมะละกอ

2.2.2 การสกัดสารจากมะละกอโดยวิธีทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง

ตัวอย่างสดจากมะละกอ 3 ส่วน ได้แก่ ใบมะละกอ เนื้อมะละกอดิบ และ เนื้อมะละกอสุก หลังจากทำการสกัดด้วยน้ำ แล้วทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) จะได้เป็นสารสกัดน้ำ (aqueous extract) จากใบมะละกอ เนื้อมะละกอดิบ และ เนื้อมะละกอสุก ที่มีน้ำหนักสารสกัด ร้อยละผลผลิต (Percentage yield; g/100g fresh weight) เป็น 3.32 ± 0.16 , 2.36 ± 0.17 และ 5.96 ± 0.44 ตามลำดับ (ตารางที่ 2.1) และมีลักษณะทางกายภาพ ดังแสดงในภาพที่ 2.2



รูปที่ 2.2 ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดด้วยน้ำจากตัวอย่างสดของมะละกอ

2.2.3 การสกัดสารจากใบมะละกอโดยใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในรูปของของไหล (Supercritical fluid extraction)

การสกัดสารประกอบสำคัญจากใบมะละกอโดยใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในรูปของของไหล แทนตัวทำละลาย เพื่อสกัดหาสารสำคัญชนิด carpain ในสภาวะที่ปราศจากตัวทำละลาย โดยตั้งต้นใช้วัตถุดิบเป็นใบมะละกอบแห้งปริมาณ 2 กิโลกรัม ที่สภาวะอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ความดัน 25 Mpa พบว่าไม่สามารถสกัดสารสำคัญออกมาได้ จึงต้องเพิ่มตัวทำละลายร่วมชนิด 95% เอทานอลลงไป ปริมาตร 2 ลิตร จึงสามารถทำการสกัดสารสำคัญออกมาได้ โดยสารสกัดที่ได้มีลักษณะเป็นสีเหลืองกึ่งเหลว (paste-like) ดังรูปที่ 2.3 ทำการชะล้างสารสกัดที่ได้ด้วยเอทานอลแล้ว ทำการระเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator และนำไประเหยเพื่อเอาเอทานอลส่วนที่เหลือออก โดยนำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดที่มีน้ำหนักสารสกัด 0.778 กรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง (percentage yield)



รูปที่ 2.3 ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดจากใบมะละกอโดยใช้เทคนิคแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในรูปของของไหล

2.2.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดน้ำจากมะละกอ

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และอัลคาลอยด์ทั้งหมด ในสารสกัดจากใบมะละกามีค่าสูงกว่าค่าที่พบได้ในสารสกัดจากผลดิบและผลสุก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.0001$ (ตารางที่ 2.1) ทั้งนี้พบว่าสารสกัดจากผลดิบมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และอัลคาลอยด์ทั้งหมด ไม่แตกต่างจากค่าที่พบได้ในสารสกัดจากผลสุก

ตารางที่ 2.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และอัลคาลอยด์ทั้งหมด

Papaya parts	Extraction yield (%)	Phytochemical profile		
		TPC (mg GAE/g dry extract)	TFC (mg QE/g dry extract)	TAC (mg AE/g dry extract)
Leave	3.32 ± 0.16	54.82 ± 1.34 ^a	101.89 ± 8.64 ^a	90.98 ± 8.82 ^a
Unripe pulp	2.36 ± 0.17	4.09 ± 1.12 ^b	0.74 ± 0.10 ^b	1.30 ± 0.12 ^b
Ripe pulp	5.96 ± 0.44	4.48 ± 0.19 ^b	0.53 ± 0.08 ^b	1.30 ± 0.03 ^b

ค่าในตารางคือค่า mean ± SE (n = 3) ค่า mean ในแต่ละ column ที่ตัวอักษร a และ b ที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% (p < 0.05) จากการวิเคราะห์โดยใช้ one-way ANOVA ตามด้วย Tukey's Honest Significant Difference test; AAE, ascorbic acid equivalent. TPC: total phenolic content; TFC: total flavonoid content; TAC: total alkaloid content; GAE: gallic acid equivalents; QE: quercetin equivalents; AE: atropine equivalent.

2.2.5 การวิเคราะห์หาปริมาณแร่ธาตุและวิตามิน

ปริมาณแร่ธาตุและวิตามินแสดงในตารางที่ 2.2 ปริมาณแร่ธาตุชนิด calcium, phosphorus, potassium, magnesium, iron, zinc และ copper ในสารสกัดจากใบมะละกอบพบได้ในปริมาณที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับที่พบได้ในสารสกัดจากผลดิบและผลสุก ยกเว้นปริมาณของ sodium ที่พบว่ามีปริมาณที่สูงในสารสกัดจากผลดิบและผลสุกเมื่อเปรียบเทียบกับที่พบได้ในสารสกัดจากใบมะละกอ ส่วนปริมาณวิตามินก็ให้ผลการศึกษาล้ำๆ กัน ปริมาณวิตามินส่วนใหญ่ ได้แก่ vitamin C, B1, B2, folate (vitamin B9) และ niacin (vitamin B3) ในสารสกัดจากใบมะละกามีปริมาณที่สูงกว่าที่พบได้ในสารสกัดจากผลดิบและผลสุก ยกเว้น vitamin E ทั้งนี้ส่วนของใบมะละกอบพบว่าเป็นแหล่งสะสม folate ที่พบมากที่สุด โดยพบได้ในปริมาณที่มากกว่าในผลดิบและผลสุกถึง 5.4 และ 8.5 เท่า ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าใบมะละกอเป็นแหล่งที่มีการสะสมของแร่ธาตุและวิตามินเช่นเดียวกัน

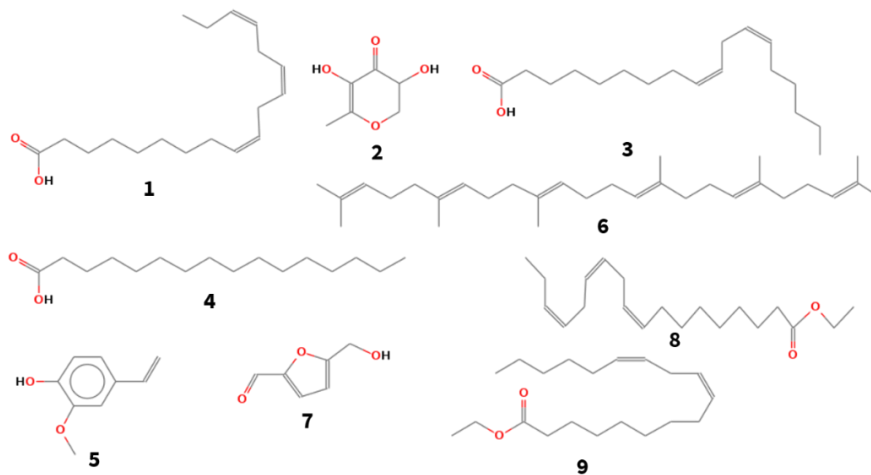
ตารางที่ 2.2 ปริมาณแร่ธาตุและวิตามินในสารสกัดน้ำจากมะละกอ

	Papaya leave	Papaya unripe pulp	Papaya ripe pulp
Mineral components (per 100 g dry extract)			
Calcium (mg)	668.76 ± 25.40	363.12 ± 0.75	125.61 ± 1.73
Phosphorus (mg)	539.84 ± 14.82	200.14 ± 1.90	98.08 ± 1.41
Sodium (mg)	22.37 ± 0.19	93.10 ± 3.51	85.61 ± 9.90
Potassium (mg)	6,247.46 ± 83.98	2,707.58 ± 52.96	1,465.67 ± 59.49
Magnesium (mg)	1,095.39 ± 21.62	418.15 ± 4.91	87.69 ± 0.15
Iron (mg)	13.60 ± 0.62	2.62 ± 0.06	1.55 ± 0.07
Zinc (mg)	4.12 ± 0.22	1.16 ± 0.05	0.69 ± 0.01
Copper (mg)	1.11 ± 0.05	0.32 ± 0.01	0.31 ± 0.01
Vitamin components (per 100 g dry extract)			
Vitamin C (mg)	40.46 ± 3.24	0.53 ± 0.03	1.49 ± 0.07
Vitamin E (mg)	117.85 ± 7.43	423.62 ± 14.57	325.85 ± 1.91
Vitamin B1 (mg)	9.26 ± 0.53	0.15 ± 0.00	0.90 ± 0.01
Vitamin B2 (mg)	1.05 ± 0.06	0.03 ± 0.00	0.06 ± 0.00
Folate (mcg; µg)	3,327.50 ± 180.31	614.50 ± 2.12	392.00 ± 24.04
Niacin (mg)	10.97 ± 0.25	1.60 ± 0.10	2.57 ± 0.01

2.2.6 การวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีโดยใช้เทคนิค GC-MS

เทคนิคทาง GC-MS ถูกนำมาใช้เพื่อวิเคราะห์หาสารประกอบอินทรีย์ที่ระเหยได้ ชื่อองค์ประกอบทางเคมี ค่า retention time, molecular formula, molecular weight, %

peak area แสดงในตารางที่ 2.3-2.6 สารประกอบหลักที่พบได้ในสารสกัด 5 ลำดับแรก เรียงตามปริมาณจากมากไปหาน้อย (% peak area) มีดังนี้ องค์ประกอบหลักในส่วนของสารสกัดจากใบมะละกอในตัวทำละลายน้ำ คือ 9,12,15-octadecatrienoic acid, (Z,Z,Z)- (24.38%), 4H-pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl (14.55%), 9,12-octadecadienoic acid (Z,Z)- (7.82%), n-hexadecanoic acid (6.94%) และ 2-methoxy-4-vinylphenol (6.66%) ตามลำดับ (ตารางที่ 2.3) องค์ประกอบหลักในส่วนของสารสกัดจากเนื้อมะละกอดิบในตัวทำละลายน้ำ คือ 9,12,15-octadecatrienoic acid, (Z,Z,Z)- (25.12%), squalene (10.55%), 4H-pyran-4-one (10.47%), 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl (10.47%), 9,12-octadecadienoic acid (Z,Z)- (10.28%), และ n-hexadecanoic acid (9.55%) ตามลำดับ (ตารางที่ 2.4) องค์ประกอบหลักในส่วนของสารสกัดจากเนื้อมะละกอสุกในตัวทำละลายน้ำ คือ 4H-pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl (25.29%), 9,12,15-octadecatrienoic acid, (Z,Z,Z)- (13.96%), 9,12-octadecadienoic acid (Z,Z)- (4.24%), n-hexadecanoic acid (4.03%) และ 5-hydroxymethylfurfural (3.98%) ตามลำดับ (ตารางที่ 2.5) องค์ประกอบหลักในส่วนของสารสกัดจากใบมะละกอโดยวิธี SFE คือ 9,12,15-octadecatrienoic acid, (Z,Z,Z)- (28.58%), n-hexadecanoic acid (19.64%), 9,12,15-octadecatrienoic acid, ethyl ester (12.81%), (Z,Z)-, 9,12-octadecadienoic acid (Z,Z)- (11.35%) และ linoleic acid ethyl ester (9.20%) ตามลำดับ (ตารางที่ 2.6) ทั้งนี้องค์ประกอบหลักที่พบเหมือนกันได้แก่กรดไขมันชนิด 9,12,15-octadecatrienoic acid, (Z,Z,Z)-, 9,12-octadecadienoic acid (Z,Z)- และ n-hexadecanoic acid และ 4H-pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl เป็นส่วนประกอบหลัก โดยพบได้ในสารสกัดจากส่วนใบ เนื้อมะละกอดิบและเนื้อมะละกอสุก โครงสร้างทางโมเลกุลของสารประกอบอินทรีย์หลักที่ตรวจพบได้ในสารสกัดน้ำจากมะละกอแสดงในรูปที่ 2.4 จะเห็นได้ว่าสารประกอบอินทรีย์ที่ระเหยได้ ที่พบส่วนใหญ่ในสารสกัดจากใบมะละกอ เนื้อมะละกอดิบ และเนื้อมะละกอสุกจะคล้ายกัน และมีความแตกต่างกันไม่มากนัก



รูปที่ 2.4 โครงสร้างทางโมเลกุลของสารประกอบหลักที่ตรวจพบได้ในสารสกัดน้ำจากมะละกอโดยวิธี GC-MS
 1 = 9,12,15-Octadecatrienoic acid, (Z,Z,Z)-, 2 = 4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-, 3 = 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, 4 = n-Hexadecanoic acid, 5 = 2-Methoxy-4-vinylphenol, 6 = Squalene, 7 = 5-Hydroxymethylfurfural, 8 = 9,12,15-Octadecatrienoic acid, ethyl ester, (Z,Z,Z)-, 9 = Linoleic acid ethyl ester

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากใบมะละกอโดยใช้เทคนิค GC-MS

RT	Compound name ^a	% Area	Quality	FW	MW
7.575	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl 2	14.55	97	C ₆ H ₈ O ₄	144.12
9.999	2-Methoxy-4-vinylphenol 5	6.66	96	C ₉ H ₁₀ O ₂	150.17
18.534	n-Hexadecanoic acid 4	6.94	99	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256.43
21.267	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)- 3	7.82	99	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280.4
21.381	9,12,15-Octadecatrienoic acid, (Z,Z,Z)- 1	24.38	99	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	278.4
21.724	Octadecadienoic acid (Z,Z)-	2.18	95	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280.4

^a Purity of compounds more than 95% were presented. Bold number, 1-5 represents the major phytochemicals in terms of their relative abundance, which was expressed as % area. RT: Retention Time; MF: Molecular Formula; MW: Molecular Weight.

ตารางที่ 2.4 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากเนื้อมะละกอดิบโดยใช้เทคนิค GC-MS

RT	Compound name ^a	% Area	Quality	FW	MW
7.605	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl 3	10.47	97	C ₆ H ₈ O ₄	144.12
8.748	5-Hydroxymethylfurfural	1.47	96	C ₆ H ₆ O ₃	126.11
11.322	LACTONE G	1.33	97	C ₄ H ₃ O ₂ R ₃	83.01(excl. R groups)
18.558	n-Hexadecanoic acid 5	9.55	99	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256.43
21.303	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)- 4	10.28	99	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280.4
21.432	9,12,15-Octadecatrienoic acid, (Z,Z,Z)- 1	25.12	99	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	278.4
21.743	Octadecadienoic acid (Z,Z)-	2.07	98	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280.4
25.441	Squalene 2	10.55	95	C ₃₀ H ₅₀	410.7

^a Purity of compounds more than 95% were presented. Bold number, 1-5 represents the major phytochemicals in terms of their relative abundance, which was expressed as % area. RT: Retention Time; MF: Molecular Formula; MW: Molecular Weight.

ตารางที่ 2.5 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากเนื้อมะละกอสุกโดยใช้เทคนิค GC-MS

RT	Compound name ^a	% Area	Quality	FW	MW
7.600	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl 1	25.29	97	C ₆ H ₈ O ₄	144.12
8.747	5-Hydroxymethylfurfural 5	3.98	95	C ₇ H ₈ O ₃	126.11
11.299	LACTONE G	1.09	96	C ₄ H ₃ O ₂ R ₃	83.01(excl. R groups)
18.536	n-Hexadecanoic acid 4	4.03	99	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256.43
21.271	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)- 3	4.24	99	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280.4
21.381	9,12,15-Octadecatrienoic acid, (Z,Z,Z)- 2	13.96	99	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	278.4
21.727	Octadecadienoic acid (Z,Z)-	1.25	97	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280.4

^a Purity of compounds more than 95% were presented. Bold number, 1-5 represents the major phytochemicals in terms of their relative abundance, which was expressed as % area. RT: Retention Time; MF: Molecular Formula; MW: Molecular Weight.

ตารางที่ 2.6 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากใบมะละกอ (SFE) โดยใช้เทคนิค GC-MS

RT	Compound name ^a	% Area	Quality	FW	MW
18.587	n-Hexadecanoic acid 2	19.64	99	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256.43
19.08	Hexadecanoic acid, ethyl ester	8.12	99	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284.484
20.972	2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetramethyl-, [R-[R*,R*-(E)]]-	2.39	98	C ₂₀ H ₄₀ O	296.5
21.32	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)- 4	11.35	99	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	280.4
21.448	9,12,15-Octadecatrienoic acid, (Z,Z,Z)- 1	28.58	99	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	278.4
21.791	Linoleic acid ethyl ester 5	9.20	99	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	308.5
21.916	9,12,15-Octadecatrienoic acid, ethyl ester, (Z,Z)- 3	12.81	99	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	306.5
22.354	Octadecadienoic acid, ethyl ester	1.58	99	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	308.5

^a Purity of compounds more than 95% were presented. Bold number, 1-5 represents the major phytocomponents in terms of their relative abundance, which was expressed as % area. RT: Retention Time; MF: Molecular Formular; MW: Molecular Weight.

2.2.7 การวิเคราะห์หาสารประกอบทางเคมีโดยใช้เทคนิค LC-MS/MS

ตารางที่ 2.7-2.14 เป็นผลสรุปการวิเคราะห์หาสารประกอบทางเคมีโดยใช้เทคนิค LC-MS/MS ในสารสกัดจากใบมะละกอ สารสกัดจากเนื้อมะละกอดิบ สารสกัดจากเนื้อมะละกอสุก และสารสกัดใบมะละกอโดยเทคนิค SFE โดยวิเคราะห์ทั้งแบบ positive ion mode และ negative ion mode สารประกอบทางเคมีที่แยกได้จากสารสกัดจากใบมะละกอ (ตารางที่ 2.7-2.8) สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ 1) กลุ่ม alkaloids ได้แก่ carpaine, dehydrocarpaine I และ dehydrocarpaine II 2) กลุ่ม flavonoids ได้แก่ quercetin 3-(4-glucosylrhamnoside), quercetin 3-(2Gal-rhamnosyl-robinobioside), manghaslin (quercetin 3-2G-rhamnosylrutinoside), clitorin (kaempferol 3-(2G-rhamnosylrutinoside) และ rutin (quercetin-3-O-rutinoside) 3) กลุ่มกรดอะมิโน เช่น asparagine, valine, leucine, เป็นต้น และ 4) กลุ่ม กรดอินทรีย์ เช่น gluconic acid, malic acid, citric acid, เป็นต้น สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบกลุ่ม alkaloids และ flavonoids ที่พบได้ในสารสกัดจากใบมะละกอ แสดงในรูปที่ 2.5 ขณะที่สารประกอบทางเคมีส่วนใหญ่ที่แยกได้จากสารสกัดจากเนื้อมะละกอดิบ (ตารางที่ 2.9-2.10) และสารสกัดจากเนื้อมะละกอสุก (ตารางที่ 2.11-2.12) ได้แก่ กลุ่มกรดอะมิโน กลุ่มกรดอินทรีย์ และกรดไขมัน เป็นต้น ส่วนสารสกัดจากใบมะละกอที่สกัดโดยเทคนิค SFE พบว่าสารประกอบทางเคมีส่วนใหญ่ เป็นสารกลุ่มกรดไขมัน นอกจากนี้พบว่ามีสาร alkaloid ชนิด carpaine อยู่ด้วย (ตารางที่ 2.13-2.14)

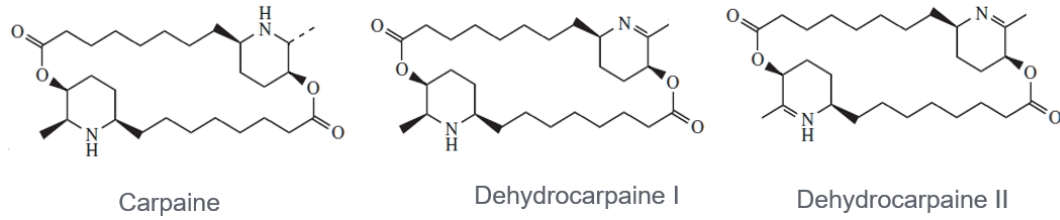
ตารางที่ 2.7 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากใบมะละกอ วิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS โดยใช้เทคนิค positive ESI mode

RT	m/z		MS/MS	Tentative Identification	Formula	Error (ppm)
2.932	104.0704	[M+H] ⁺	88.0471,60.0441	Dimethylglycine	C4H9NO2	1.97
3.075	133.0607	[M+H] ⁺	74.0214	L-Asparagine	C4H8N2O3	0.52
3.309	198.0977	[M+NH4] ⁺		alpha-D-Glucose	C6H12O6	-2.45
3.398	138.0552	[M+H] ⁺	95.0681,93.0525,79.0377,66.0405,52.0300	2-Pyridylacetic acid	C7H7NO2	-1.78
3.504	360.1505	[M+NH4] ⁺		Sucrose	C12H22O11	-1.29
3.923	118.0865	[M+H] ⁺	59.0487	L-Valine	C5H11NO2	-2.07
4.182	280.1396	[M+H] ⁺	264.1311,246.1356	N-(1-Deoxy-1-fructosyl)valine	C11H21NO7	-1.86
6.03	132.1019	[M+H] ⁺	119.0338,91.0540,87.0993	L-Leucine	C6H13NO2	0.04
6.375	132.1022	[M+H] ⁺	87.1002	L-Isoleucine	C6H13NO2	-2.23
7.743	166.0867	[M+H] ⁺	121.0845,104.0543,78.0425	L-Phenylalanine	C9H11NO2	-2.68
8.963	358.2706	[M+H] ⁺	305.0012,246.0802,177.0961,121.0491	Leu-Leu-Leu	C18H35N3O4	-1.58
9.23	256.1912	[M+H] ⁺	188.0689	Geranyl acetoacetate	C14H22O3	-1.87
10.183	475.3541	[M+H] ⁺	238.183	Dehydrocarpaine II	C28H46N2O4	6.62
10.299	258.2071	[M+H] ⁺	242.2020,224.1932	N-Lauroylglycine	C14H27NO3	-2.83
10.751	511.3738	[M+H] ⁺	256.1913	3,17-Diethyl-1,15-dioxa-4,18-diazacyclooctacosane-5,14,19,28-tetrone	C28H50N2O6	0.71
10.761	495.3775	[M+H] ⁺	248.1929	araguspongine L	C28H50N2O5	3.53
10.919	477.3675	[M+H] ⁺	239.1883	Dehydrocarpaine I	C28H48N2O4	2.48
11.097	611.1593	[M+H] ⁺	303.0495	Quercetin 3-(4-glucosylrhamnoside)	C27H30O16	2.23
	757.2201	[M+H] ⁺		Quercetin 3-(2Gal-rhamnosyl-robinobioside)	C33H40O20	-2.02
11.218	479.3879	[M+H] ⁺	240.1978	Carpaine	C28H50N2O4	-7.44
	218.2118	[M+H] ⁺		Lauric acid	C12H24O2	-1.58
14.189	177.0545	[M+H] ⁺	121.0514,90.0408,59.0490	Herniarin (7-Methoxycoumarin)	C10H8O3	0.68
17.104	274.2749	[M+NH4] ⁺	221.1140,165.0549,88.0734	C16 Sphinganine	C16H35NO2	-3.09
17.286	318.3007	[M+H] ⁺	174.9836	Phytosphingosine	C18H39NO3	-1.35

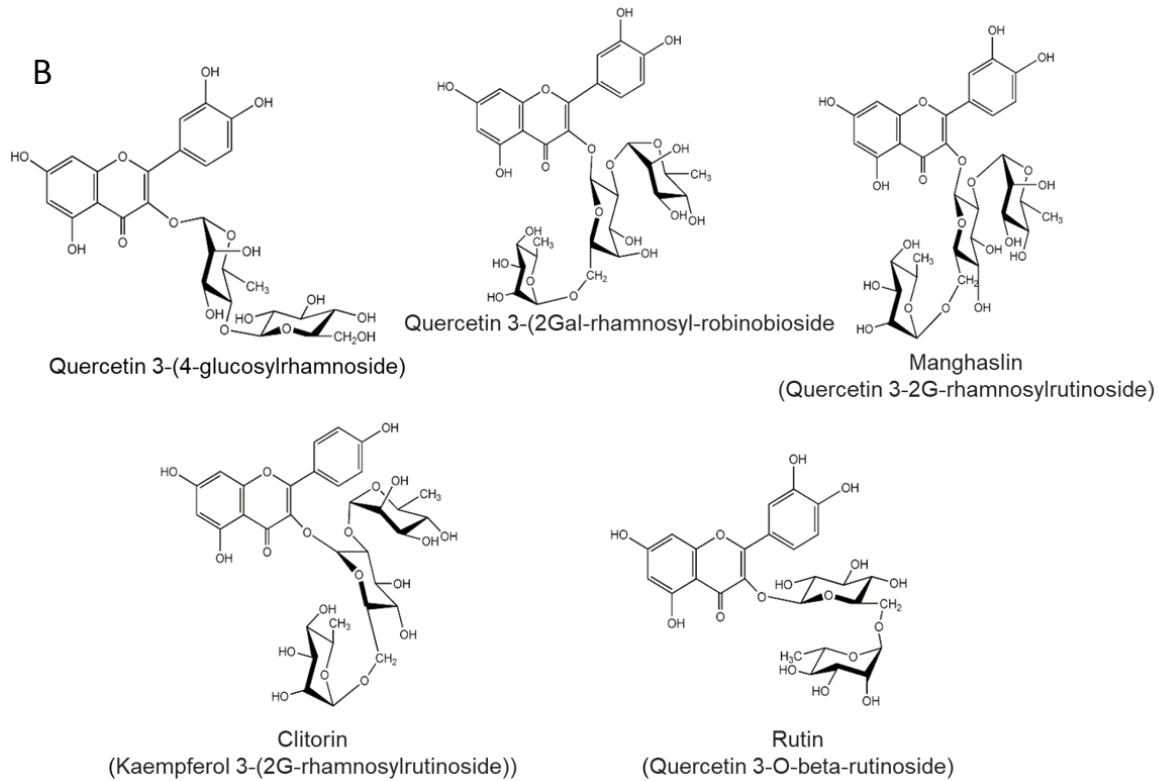
ตารางที่ 2.8 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากใบมะละกอ วิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS โดยใช้เทคนิค negative ESI mode

RT	m/z		MS/MS	Tentative Identification	Formula	Error (ppm)
3.069	132.0309	[M-H]-		L-Aspartic acid	C4H7NO4	-5.06
3.157	179.0576	[M-H]-	59.0142	Glucose	C6 H12 O6	-8.31
3.18	195.0529	[M-H]-	75.0088,59.0136	Gluconic acid	C6H12O7	-9.81
4.078	133.0147	[M-H]-	116.0054,55.6175	Malic acid	C4H6O5	-3.41
5.496	191.0214	[M-H]-		Citric acid	C6H8O7	-8.76
6.396	117.0195	[M-H]-	91.0195,74.036	Succinic acid	C4H6O4	-1.43
7.479	164.0729	[M-H]-	148.0503,104.0587	L-Phenylalanine	C9H11NO2	-7.3
8.179	313.0617	[M-H]-	153.0575,108.0235	(R)-lavandulyl diphosphate	C10H20O7P2	-1.76
8.953	203.0849	[M-H]-	101.0247,73.0293	2-hydroxy-7-methyl-Octanedioic acid	C9H16O5	37.41
10.814	755.2243	[M-H]-	423.1418,133.0148	Manghaslin (Quercetin 3-2G-rhamnosylrutinoside)	C33H40O20	-26.86
11.515	739.2292	[M-H]-	707.3322,603.1856,567.1937,193.0547,91.6529	Clitorin (Kaempferol 3-(2G-rhamnosylrutinoside)	C33H40O19	-27.19
12.346	295.0511	[M-H]-	135.0192	Milleyanaflavone	C17H12O5	34.22
13.801	469.3498	[M-H]-		N-stearoyl tryptophan	C29H46N2O3	-13.28
14.174	609.1611	[M-H]-		Rutin	C27H30O16	-24.61

A



B



รูปที่ 2.5 สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบที่แยกได้จากสารสกัดจากใบมะละกอโดยวิธี LC-MS/MS
(A) สารประกอบกลุ่ม alkaloids (B) สารประกอบกลุ่ม flavonoids

ตารางที่ 2.9 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากเนื้อมะละกอดิบ วิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS โดยใช้เทคนิค positive ESI mode

RT	m/z		MS/MS	Tentative Identification	Formula	Error (ppm)
6.279	132.1021	[M+H] ⁺	87.0989	L-Leucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	-0.72
6.604	132.1018	[M+H] ⁺		L-Leucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	0.8
7.938	166.0863	[M+H] ⁺	121.0828,104.0550,78.0396	L-Phenylalanine	C ₉ H ₁₁ NO ₂	-0.27
9.461	256.1911	[M+NH ₄] ⁺	175.1473,116.0701,84.9584	Geranyl acetoacetate	C ₁₄ H ₂₂ O ₃	0.47
10.501	282.207	[M+NH ₄] ⁺	209.0408,147.0758,107.0866,69.0677	12-Oxo-2,3-dinor-10,15-phytodienoic acid	C ₁₆ H ₂₄ O ₃	-2.23
10.518	584.4382	[M+H] ⁺		L-Leucine, L-leucyl-L-leucyl-L-leucyl-L-leucyl-	C ₃₀ H ₅₇ N ₅ O ₆	-0.07
10.987	697.5239	[M+H] ⁺	609.2391,513.0973,313.3751	L-Leucyl-L-leucyl-L-leucyl-L-leucyl-L-leucyl-L-leucine	C ₃₆ H ₆₈ N ₆ O ₇	
12.167	453.3438	[M+H] ⁺	397.0874,251.0724,114.0931	1-eicosyl-glycero-3-phosphate	C ₂₃ H ₄₉ O ₆ P	
12.793	566.4305	[M+H] ⁺	435.3303,228.1594,114.0905	Monoanhydroescholtzanthin	C ₄₀ H ₅₂ O	
13.078	374.1455	[M+Na] ⁺	335.1123,293.1002	Trp Phe	C ₂₀ H ₂₁ N ₃ O ₃	
13.107	218.2121	[M+NH ₄] ⁺		Lauric acid	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	
17.537	274.2751	[M+H] ⁺	161.0965	C16 Sphinganine	C ₁₆ H ₃₅ NO ₂	-3.81
17.662	318.3007	[M+H] ⁺		Phytosphingosine	C ₁₈ H ₃₉ NO ₃	-1.35

ตารางที่ 2.10 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากเนื้อมะละกอดิบ วิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS โดยใช้เทคนิค negative ESI mode

RT	m/z	Mass	MS/MS	Tentative Identification	Formula	Error (ppm)
3.258	195.0529	[M-H]-	130.0224,75.0074,59.0122	Gluconic acid	C6H12O7	-9.61
3.363	193.0373	[M-H]-	129.0189,75.0076,59.0123	6-(Hydroxymethyl)-2,4(1H,3H)-pteridinedione	C7H6N4O3	-3.04
3.984	175.0261	[M-H]-	87.0069,71.0124,59.0119	Ascorbic acid	C6H8O6	-7.36
5.062	191.0218	[M-H]-		citric acid	C6H8O7	-10.86
6.254	117.0194	[M-H]-	73.0273,55.0167	succinic acid	C4H6O4	-0.58
6.333	173.0107	[M-H]-	129.4931,59.0117	cis-Aconitic acid	C6H6O6	-8.89
7.358	299.0821	[M-H]-	267.1039,139.0291	Dimethyl fukiic acid	C13H15O8	-16.25
7.476	164.0729	[M-H]-	148.0469	L-Phenylalanine	C9H11NO2	-7.3
7.67	380.1639	[M-H]-	293.1173,221.0943,112.9846	Petasitenine	C19H27NO7	19.93
7.973	218.1059	[M-H]-	131.0341	Pantothenic acid	C9H17NO5	-16.32
9.097	254.1799	[M-H]-	190.9619,80.9630	N-decanoyl-homoserine lactone	C14H25NO3	-14.69
9.237	313.098	[M-H]-	161.0489	2-Hydroxyphenylacetic acid O-b-D-glucoside	C14H18O8	-16.32
9.811	293.1286	[M-H]-	233.2883,223.1078,131.0693,59.0138	Nigellidine	C18H18N2O2	3.25

ตารางที่ 2.11 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากเนื้อมะละกอสุก วิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS โดยใช้เทคนิค positive ESI mode

RT	m/z		MS/MS	Tentative Identification	Formula	Error (ppm)
3.1	133.0604	[M+H] ⁺	76.0384	L-Asparagine	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	2.77
3.203	295.1132	M+CH ₃ OH+H	261.0964,213.0757	Glutamylaspartic acid	C ₉ H ₁₄ N ₂ O ₇	
3.433	138.0547	[M+H] ⁺	85.028	2-Pyridylacetic acid	C ₇ H ₇ NO ₂	-1.78
4.798	150.0588	[M+H] ⁺		L-Methionine	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	-3.16
6.118	132.102	[M+H] ⁺	87.0993	L-Leucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	-0.72
6.158	182.0815	[M+NH ₄] ⁺		2-Hydroxycinnamic acid	C ₉ H ₈ O ₃	-1.81
7.862	166.0863	[M+H] ⁺	121.0832,104.0572,78.0423	L-Phenylalanine	C ₉ H ₁₁ NO ₂	-0.27
9.367	256.1906	[M+NH ₄] ⁺	222.1776,120.0810	Geranyl acetoacetate	C ₁₄ H ₂₂ O ₃	0.47
12.653	566.4292	[M+NH ₄] ⁺	114.0903	Monoanhydroescholtzanthin	C ₄₀ H ₅₂ O	12.96
17.445	274.2751	M+NH ₄		C16 Sphinganine	C ₁₆ H ₃₅ NO ₂	-3.81
17.576	318.3011	[M+H] ⁺		Phytosphingosine	C ₁₈ H ₃₉ NO ₃	-2.61

ตารางที่ 2.12 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากเนื้อมะละกอสุก วิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS โดยใช้เทคนิค negative ESI mode

RT	m/z		MS/MS	Tentative Identification	Formula	error(ppm)
3.228	193.0373	[M-H]-	129.0187,75.0079,59.0127	6-(Hydroxymethyl)-2,4(1H,3H)-pteridinedione	C7H6N4O3	-3.04
3.26	195.0531	[M-H]-	131.0228,75.0076,59.0128	Gluconic acid	C6H12O7	-10.63
3.281	209.0328	[M-H]-	96.9592,59.0128	Galactaric acid	C6H10O8	-12
3.361	191.0216	[M-H]-		Citric acid	C6H8O7	-9.81
3.771	226.9991	[M-H]-	112.9879,99.0080,71.0130	Thiorubrine A	C13H8S2	1.61
3.947	175.0265	[M-H]-	115.0017,87.0078	Ascorbic acid	C6H8O6	-9.65
4.078	133.0149	[M-H]-	116.0062,90.0253,72.0165	Malic acid	C4H6O5	-4.91
4.99	111.0088	[M-H ₂ O-H]-	79.9553,68.9947	Citraconic acid	C5H6O4	-0.7
4.991	191.0215	[M-H]-		Citric acid	C6H8O7	-9.29
6.142	117.0194	[M-H]-	73.0294	Succinic acid	C4H6O4	-0.58
6.239	173.0106	[M-H]-	85.029	cis-Aconitic acid	C6H6O6	-8.31
7.048	153.0331	[M-H]-	78.9582	Diethylphosphate	C4H11O4P	-5.76
7.39	164.0728	[M-H]-	104.0562	L-Phenylalanine	C9H11NO2	-6.69

ตารางที่ 2.13 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากใบมะละกอ SFE วิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS โดยใช้เทคนิค positive ESI mode

RT	m/z		MS/MS	Tentative Identification	Formula	error(ppm)
8.214	144.102	[M+H] ⁺	86.0663	3b,6b-Dihydroxynortropane	C7H13NO2	-0.66
10.91	479.3847	[M+H] ⁺	401.1836,339.0078,257.0730	Carpaine	C28H50N2O4	-0.76
12.423	566.4286	[M+NH4] ⁺	453.3501,341.2450,209.1653,114.0925	Monoanhydroescholtzanthin	C40H52O	12.43
13.455	453.3447	[M+H] ⁺	339.2778,239.1489,114.0898	1-eicosyl-glycero-3-phosphate	C23H49O6P	-23.71
13.837	197.1174	[M+H] ⁺	119.7012	11-oxo-undeca-5,8-dienoic acid	C11H16O3	-0.91
14.987	197.1171	[M+H] ⁺	181.1134,133.1003	11-oxo-undeca-5,9-dienoic acid	C11H16O3	0.61
16.013	183.0786	[M+H] ⁺	98.9831	Furfuryl isovalerate	C10H14O3	125
21.787	181.1223	[M+H] ⁺	141.0799	7E,10-undecadien-4-olide	C11H16O2	0.03
23.595	275.2012	[M+H] ⁺	135.1133	(10Z,14E,16E)-10,14,16-Octadecatrien-12-ynoic acid	C18H26O2	-2.34
26.681	277.2171	[M+H] ⁺		Coniferonic acid	C18H28O2	-3.22
28.465	319.2246	[M+Na] ⁺	277.1817,137.0605	Avenoleic acid	C18H32O3	-0.73
28.471	279.2322	[M+H] ⁺	181.1214	α-Linolenic acid	C18H30O2	-1.23
29.239	277.2164	[M+H] ⁺		β-parinaric acid	C18H28O2	-3.22
29.305	295.2277	[M+H] ⁺	157.1018	9-hydroxy-10-Octadecen-12-ynoic acid	C18H30O3	-3.15
31.956	375.2523	[M+Na] ⁺	363.3095,195.1178,133.0842	Ceriporic acid C	C21H36O4	-4.58
32.526	403.2334	[M+H] ⁺	319.2245,231.2141,123.1185	5S-HETE di-endoperoxide	C20H34O8	-1.87
32.555	425.2158	[M+H] ⁺	165.0933	4-(5'-((1E,3E,6Z,9Z)-dodeca-1,3,6,9-tetraen-1-yl)-[3,3'-bi(1,2-dioxolan)]-5-yl) - 4-hydroperoxybutanoic acid	C22H32O8	2.81
32.743	305.2482	[M+H] ⁺	222.1493,149.1333,91.0515	Juniperonic acid	C20H32O2	-2.27
32.889	461.2878	[M+Na] ⁺	379.2986,283.1760,133.0886,57.0701	3β-(3-methyl-butanoyloxy)-villanovane-13α,17-diol	C25H42O6	-0.95
33.345	280.2642	[M+H] ⁺	191.142	Linoleamide	C18H33NO	-2.53
34.123	387.2512	[M+Na] ⁺	195.1209,132.1026	11-deoxy-16,16-dimethyl-PGE2	C22H36O4	-1.6

ตารางที่ 2.14 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากใบมะละกอ SFE วิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS โดยใช้เทคนิค negative ESI mode

RT	m/z		MS/MS	Tentative Identification	Formula	error(ppm)
3.322	179.0575	[M-H]-	59.0126	Hexose	C ₆ H ₁₂ O ₆	-7.75
6.695	147.0306	[M-H]-	59.0129	2-Dehydro-3-deoxy-L-arabinonate,2-Dehydro-3-deoxy-L-arabinonate	C ₅ H ₈ O ₅	-4.78
8.298	117.0558	[M-H]-	76.0088,65.0141	3-Hydroxy-2-methyl-[R-(R,S)]-butanoic acid	C ₅ H ₁₀ O ₃	-0.7
11.27	211.0636	[M-H]-	183.0205	Danielone	C ₁₀ H ₁₂ O ₅	-11.38
11.984	497.3448	[M-H]-	409.1921,297.1843,185.0459	Neurosporaxanthin	C ₃₅ H ₄₆ O ₂	-4.62
14.864	187.0991	[M-H]-	171.0450,159.0311,146.9388,135.0320,117.7650	3-Methylsubericacid	C ₉ H ₁₆ O ₄	-8.11
18.265	147.0458	[M-H]-	104.0567,70.0289	4-Hydroxycinnamyl aldehyde	C ₉ H ₈ O ₂	-4.4
25.244	429.2582	[M-H]-	331.7555,193.0885	Arg Lys Gln	C ₁₇ H ₃₄ N ₈ O ₅	-0.61

2.2.8 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบสำคัญแต่ละชนิดในกลุ่มฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และ แคโรทีนอยด์

จากผลการศึกษาข้างต้น ในตารางที่ 2.1 แสดงให้เห็นถึงปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่พบได้สูงในสารสกัดจากใบมะละกอ การศึกษาในส่วนนี้จึงได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบที่สำคัญเป็นที่จัดอยู่ในกลุ่ม polyphenols ได้แก่สารประกอบกลุ่ม phenolic acids ได้แก่ ferulic acid, p-coumaric acid, sinapic acid, caffeic acid และ สารประกอบกลุ่ม flavonoids ได้แก่ kaempferol, quercetin, myricetin, apigenin, luteolin, hesperetin, naringenin โดยใช้เทคนิคทาง HPLC และใช้สารมาตรฐานอ้างอิงจำนวน 9 ชนิด ข้างต้น ผลการศึกษาพบสารสำคัญชนิด caffeic acid, kaempferol และ quercetin ในสารสกัดจาก ใบมะละกอในปริมาณ $44,219.22 \pm 910.22$, $144,325.81 \pm 4,367.35$ และ $303,212.38 \pm 9,481.84$ $\mu\text{g}/100$ g dry extract ตามลำดับ โดยที่สารกลุ่ม polyphenols จำนวนทั้ง 9 ชนิดนี้ไม่สามารถตรวจพบได้ในสารสกัดจากผลดิบและผลสุกของมะละกอแต่อย่างใด (ตารางที่ 2.15)

การระบุชนิดและหาปริมาณของสารประกอบกลุ่มแคโรทีนอยด์โดยใช้เทคนิคทาง HPLC และใช้สารมาตรฐานอ้างอิง ผลการศึกษาบ่งชี้ว่าแคโรทีนอยด์ชนิด lutein, zeaxanthin, β -cryptoxanthin, lycopene, α -carotene และ β -carotene พบได้ทั้งในสารสกัดจากผลดิบและผลสุก โดยสารแคโรทีนอยด์ส่วนใหญ่ที่พบได้ในผลสุกจะมีปริมาณสูงกว่าที่พบได้ในสารสกัดจากผลดิบ ยกเว้น lutein ที่พบว่าปริมาณไม่แตกต่างกันมากนัก (ตารางที่ 2.15) ในขณะที่มีแคโรทีนอยด์เพียง 3 ชนิดเท่านั้นที่ตรวจพบได้ในสารสกัดจากใบมะละกอ ได้แก่ lutein, α -carotene และ β -carotene โดยมีปริมาณที่พบดังนี้ $51,205.72 \pm 273.88$, $2,432.78 \pm 11.22$ และ $56,084.64 \pm 379.52$ $\mu\text{g}/100$ g dry extract ตามลำดับ ซึ่งเป็นปริมาณที่พบได้สูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับที่พบได้ในสารสกัดจากผลมะละกอทั้งดิบและสุก

ตารางที่ 2.15 ปริมาณสารประกอบสำคัญในกลุ่มฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และ แคโรทีนอยด์

Compound	Aqueous Extract of Papaya		
	leave	unripe pulp	ripe pulp
Polyphenols (mcg/100 g dry extract)			
Ferulic acid	ND	ND	ND
p-Coumaric acid	ND	ND	ND
Sinapic acid	ND	ND	ND
Caffeic acid	$44,219.22 \pm 910.22$	ND	ND
Kaempferol	$144,325.81 \pm 4,367.35$	ND	ND
Quercetin	$303,212.38 \pm 9,481.84$	ND	ND
Myricetin	ND	ND	ND
Apigenin	ND	ND	ND
Luteolin	ND	ND	ND
Hesperetin	ND	ND	ND
Naringenin	ND	ND	ND
Carotenoids (mcg/100 g dry extract)			
Lutein	$51,205.72 \pm 273.88$	98.34 ± 1.27	90.91 ± 2.00
Zeaxanthin	ND	2.86 ± 0.01	68.39 ± 1.67
β -cryptoxanthin	ND	27.24 ± 0.23	$1,637.46 \pm 17.26$
Lycopene	ND	7.56 ± 0.08	$5,752.15 \pm 150.92$
α -carotene	$2,432.78 \pm 11.22$	4.82 ± 0.12	390.63 ± 9.45
β -carotene	$56,084.64 \pm 379.52$	147.67 ± 1.52	834.35 ± 15.92

ND: not detectable

2.2.9 ฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำจากมะละกอ

ผลการทดสอบความสามารถของสารสกัดในการจับอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay พบว่า สารสกัดจากใบมะละกอมี radical scavenging activity ต่อสาร DPPH มีค่า EC50 เท่ากับ 0.040 ± 0.014 mg/ml (ตารางที่ 2.16) ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกับการทดสอบความสามารถในการจับอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay (0.036 ± 0.006 mg/ml) จะเห็นได้ว่าค่า EC50 ของสารสกัดจากใบมะละกอ มีค่าต่ำกว่าค่า EC50 ของสารสกัดจากผลดิบและผลสุกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.0001$ ทั้งนี้พบว่าค่า EC50 ของสารสกัดจากใบมะละกอ ให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อทำการเปรียบเทียบกับค่า EC50 ของสารมาตรฐานที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงชนิด ascorbic acid, quercetin kaempferol และ caffeic acid โดยค่า EC50 ของสารสกัดจากใบมะละกอมีค่าสูงกว่าค่า EC50 ของสารมาตรฐานดังกล่าวข้างต้นอยู่ในช่วง 6.7-13.3 เท่า สำหรับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อสาร DPPH และ อยู่ในช่วง 6 -36 เท่า สำหรับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อสาร ABTS (รูปที่ 2.6)

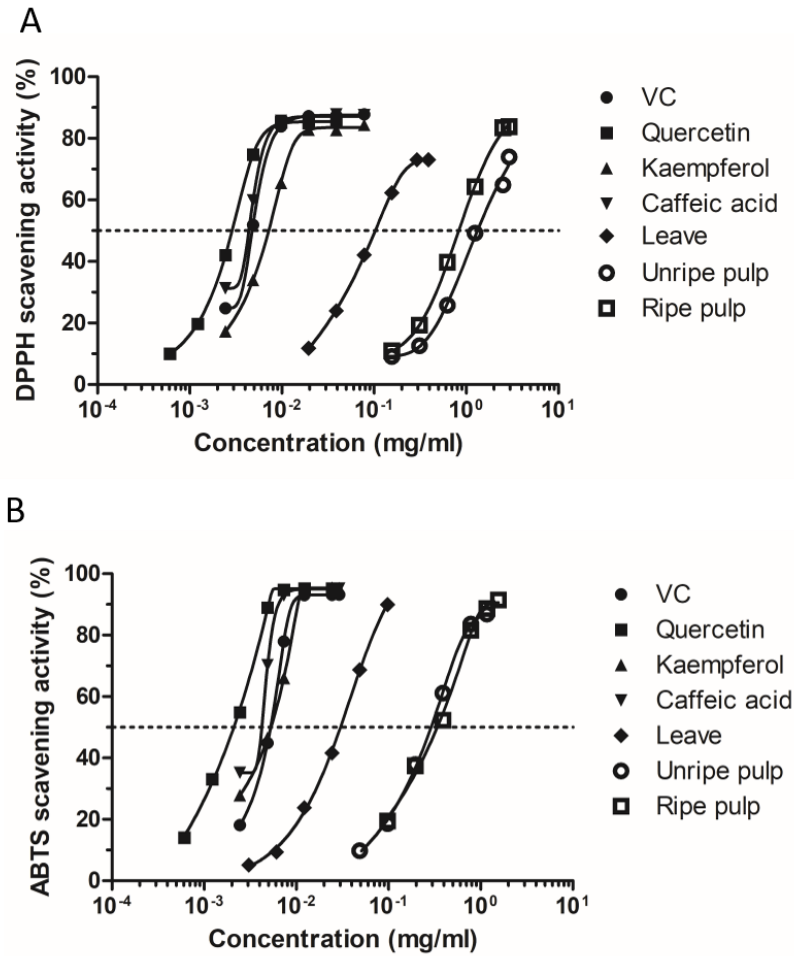
ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay พบว่าสารสกัดจากใบมะละกอมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดจากผลดิบและผลสุกเช่นกัน ดังตารางที่ 2.16 ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay และ ABTS assay

อย่างไรก็ตามความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะละกอจากผลดิบและผลสุก โดยวิธีทดสอบทั้ง 3 วิธี ได้แก่ DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay พบว่าให้ค่าการทดสอบที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 2.16 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะละกอ

Papaya parts	Antioxidant activity		
	DPPH assay EC ₅₀ (mg /ml)	ABTS assay EC ₅₀ (mg /ml)	FRAP assay (mg AAE/g dry extract)
Leave	0.040 ± 0.014^a	0.036 ± 0.006^a	199.05 ± 6.68^a
Unripe pulp	0.896 ± 0.079^b	0.216 ± 0.022^b	24.46 ± 0.41^b
Ripe pulp	0.831 ± 0.167^b	0.202 ± 0.026^b	29.60 ± 1.53^b
Ascorbic acid	0.006 ± 0.000^a	0.005 ± 0.000^a	-
Quercetin	0.003 ± 0.000^a	0.001 ± 0.000^a	-
Kaempferol	0.006 ± 0.001^a	0.006 ± 0.000^a	-
Caffeic acid	0.005 ± 0.000^a	0.005 ± 0.000^a	-

ค่า EC50 คำนวณได้จากนำค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่าง หรือสารมาตรฐานและค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธีวิธี DPPH assay และ ABTS assay มาสร้าง dose-response curve โดยใช้สูตร 5 parameter logistic equation โดยใช้โปรแกรม Graphad Prism 5.0; แต่ละค่าในตารางคือค่า mean \pm SE (n = 3) ค่า mean ในแต่ละ column ที่ตัวอักษร a และ b ที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างกันของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($p < 0.05$) จากการวิเคราะห์โดยใช้ one-way ANOVA ตามด้วย Tukey's Honest Significant Difference test; AAE, ascorbic acid equivalent



รูปที่ 2.6 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำจากมะละกอ

สร้างกราฟมาตรฐานแบบ dose-response curves ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดน้ำจากมะละกอ หรือสารมาตรฐานที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิด ascorbic acid, quercetin, kaempferol และ caffeic acid กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay (A) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS assay (B) โดยใช้วิธี 5 parameter regression model analysis

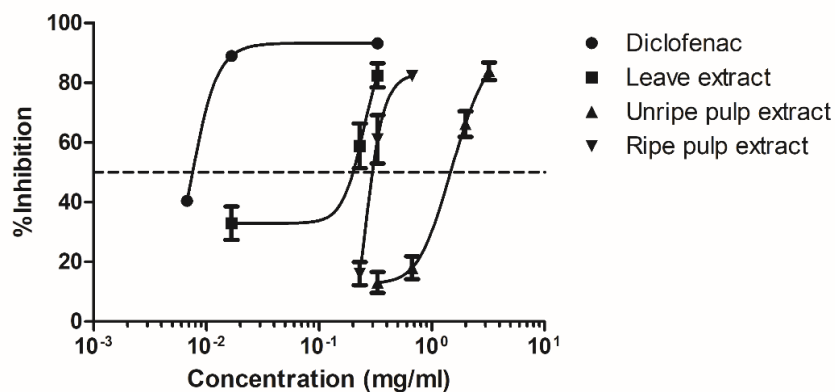
2.2.10 ผลของสารสกัดน้ำจากมะละกอในการต้านการอักเสบในหลอดทดลอง

การทดสอบการยับยั้งการเสียสภาพของโปรตีน (protein denaturation) ในหลอดทดลอง ในสภาวะที่อุณหภูมิสูง เป็นการศึกษาวิธีหนึ่งเพื่อนำมาใช้ทดสอบความสามารถของสารสกัดในการต้านการอักเสบของสารสกัดในหลอดทดลอง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดมะละกามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเสียสภาพของโปรตีนได้ และลักษณะการยับยั้งเป็นแบบ dose-dependent โดยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 2.17) ในการทดลองได้นำยามาตรฐานชนิด diclofenac sodium มาทำการทดลองร่วมด้วย เมื่อทำการเปรียบเทียบกับมาตรฐานกับสารสกัดมะละกอที่ความเข้มข้นเท่ากัน (0.33 mg/ml) ผลการศึกษาพบว่าการยับยั้งการเสียสภาพของโปรตีนของ ยามาตรฐานชนิด diclofenac sodium สารสกัดจากใบมะละกอ สารสกัดจากผลมะละกอดิบ และสารสกัดจากผลมะละกอสุก มีค่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเสียสภาพของโปรตีน ดังนี้ 93.22 ± 0.08 , 58.86 ± 7.50 , 13.11 ± 3.52 และ 61.04 ± 8.06 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า

สารสกัดน้ำจากมะละกอ ให้ผลการยับยั้งการเสียหายของโปรตีนได้ต่ำกว่ามาตรฐานชนิด diclofenac sodium พบว่าสารสกัดจากใบมะละกอ และสารสกัดจากผลมะละกอสุกมีความสามารถในการยับยั้งการเสียหายของโปรตีนได้ดีกว่าสารสกัดจากผลมะละกอดิบ ทั้งนี้สารสกัดจากใบมะละกอ มีความสามารถในการยับยั้งการเสียหายของโปรตีนได้ใกล้เคียงกับสารสกัดจากผลมะละกอสุก อย่างไรก็ตามการศึกษาในครั้งนี้ไม่ได้ทำการคำนวณหาค่า EC50 เนื่องจากขาดข้อมูลบางส่วนไป ทำให้ไม่สามารถสร้างกราฟแบบ dose-response curve ที่สมบูรณ์ได้ (รูปที่ 2.7)

ตารางที่ 2.17 ความสามารถในการยับยั้งการเสียหายของโปรตีนในหลอดทดลองของสารสกัดมะละกอ

Concentration (mg/ml)	%inhibition			
	Diclofenac	Leave extract	Unripe pulp extract	Ripe pulp extract
0.00673	40.46 ± 1.02			
0.0167	88.97 ± 1.40			
0.23		32.95 ± 5.60		16.07 ± 3.89
0.33	93.22 ± 0.08	58.86 ± 7.50	13.11 ± 3.52	61.04 ± 8.06
0.67		82.49 ± 4.06	18.04 ± 3.85	82.26 ± 1.00
1.99			66.19 ± 4.29	
3.22			83.84 ± 2.99	



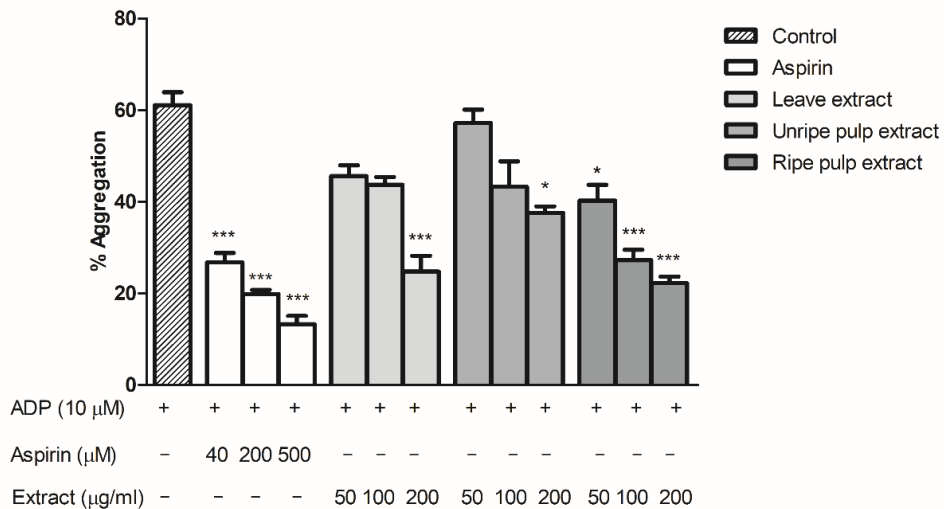
รูปที่ 2.7 Dose-response curve ของสารสกัดน้ำจากมะละกอ

2.2.11 ผลของสารสกัดน้ำจากมะละกอในการยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือด (platelet aggregation)

การทำงานของเกล็ดเลือด ในสภาวะปกติเกล็ดเลือดจะไม่เกาะติดกันเองหรือเกาะติดผนังหลอดเลือด แต่เมื่อมีการฉีกขาดของหลอดเลือด เกล็ดเลือดจะเข้ามามีบทบาทต่อการแข็งตัวของเลือด กลไกการห้ามเลือดในระยะแรกมี 3 ขั้นตอนด้วยกัน 1) การยึดจับของเกล็ดเลือด (platelet adhesion) โดยเกล็ดเลือดจะเข้ามายึดจับบริเวณผนังหลอดเลือดที่มีการฉีกขาด โดยอาศัย glycoprotein receptor บนผิวเซลล์ของเกล็ดเลือดที่สามารถยึดจับได้กับคอลลาเจนบนผิวเซลล์ของหลอดเลือด หรือโปรตีน von Willebrand factor (vWF) ซึ่งโปรตีนนี้จะทำหน้าที่เป็นสะพานเชื่อมในการจับกับคอลลาเจนบนผิวเซลล์ของหลอดเลือดอีกที ทำให้เกล็ดเลือดสามารถมายึดเกาะบริเวณที่มีการฉีกของหลอดเลือดได้ 2) การกระตุ้นเกล็ดเลือด (platelet activation) ในขั้นตอนนี้จะมีการส่ง

สัญญาณให้เกิดการทำงานต่าง ๆ เช่น เกล็ดเลือดจะเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการยึดเกาะกับชั้นผนังหลอดเลือดได้ดีขึ้น เกิดการหลั่งของสารต่าง ๆ ออกมาจากภายในเกล็ดเลือด เช่น fibrinogen, vWF, Ca^{2+} , serotonin adenosine diphosphate (ADP) และ thromboxane A2 (TXA2) ซึ่งสารเหล่านี้มีบทบาทในการกระตุ้นเกล็ดเลือด และทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด 3) การเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด (platelet aggregation) ในขั้นตอนนี้เกล็ดเลือดจะมาจับกลุ่มกันเอง โดยอาศัย glycoprotein receptor บนผิวของเกล็ดเลือด โดยมี fibrinogen และ vWF ทำหน้าที่ในการเชื่อมโยงเข้าด้วยกัน เกิดการรวมกลุ่มกันเองเกล็ดเลือดมากขึ้นเกิดเป็น platelet plug เพื่อมาอุดบริเวณที่มีการฉีกขาดของหลอดเลือดได้ อย่างไรก็ตามสำหรับการฉีกขาดของหลอดเลือดขนาดใหญ่ นั้น จะมีกระบวนการห้ามเลือดในขั้นตอนถัดไปคือการสร้างลิ่มเลือด ซึ่งมีความแข็งแรงและสามารถห้ามเลือดได้ดีกว่า (Xu et al 2016) อย่างไรก็ตามการเกิด plaques formation ในผนังของหลอดเลือด อาจเป็นจุดเริ่มต้นของการเกิดภาวะลิ่มเลือดในหลอดเลือดดำอุดตัน ทำให้เลือดไหลเวียนไม่สะดวก (thrombosis) นำไปสู่การเกิดโรคของหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular disease) ได้

มีรายงานสารสกัดจากพืชบางชนิดมีคุณสมบัติในการต้านการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดได้ (Pierre et al 2005) ดังนั้นเพื่อให้ทราบบทบาทของสารสกัดน้ำจากมะละกอดต่อการยับยั้งการทำงานของเกล็ดเลือดดังกล่าว จึงได้ทำการทดสอบสารสกัดน้ำจากมะละกอที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดในสถานะที่มี ADP เป็นตัวกระตุ้น ผลการศึกษาแสดงในรูปที่ 2.8 สารสกัดน้ำจากมะละกอมีความสามารถในการยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดในสถานะที่ถูกกระตุ้นด้วย ADP ได้ ซึ่งลักษณะของการยับยั้งเป็นแบบ concentration-dependent สารสกัดจากใบมะละกอและสารสกัดจากผลมะละกอดิบ ที่ความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/ml}$ เท่านั้นที่สามารถการยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ถูกกระตุ้นด้วย ADP เพียงอย่างเดียว ($p < 0.001$ และ $p < 0.05$ ตามลำดับ) ขณะที่สารสกัดจากผลมะละกอสุกที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 200 $\mu\text{g/ml}$ มีผลไปลดการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และมีคุณสมบัติในการต้านการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือด (anti-platelet aggregation) ได้ดีกว่าสารสกัดจากใบมะละกอและสารสกัดจากผลมะละกอดิบ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ aspirin ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดผ่านกระบวนการยับยั้งการสร้าง thromboxane A2 เป็นกลุ่มควบคุมแบบบวก (positive control) ที่ความเข้มข้นของ aspirin ที่ 40 μM สามารถไปลดการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดได้ถึงประมาณ 57%



รูปที่ 2.8 ความสามารถของสารสกัดน้ำจากมะละกอในการยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือด

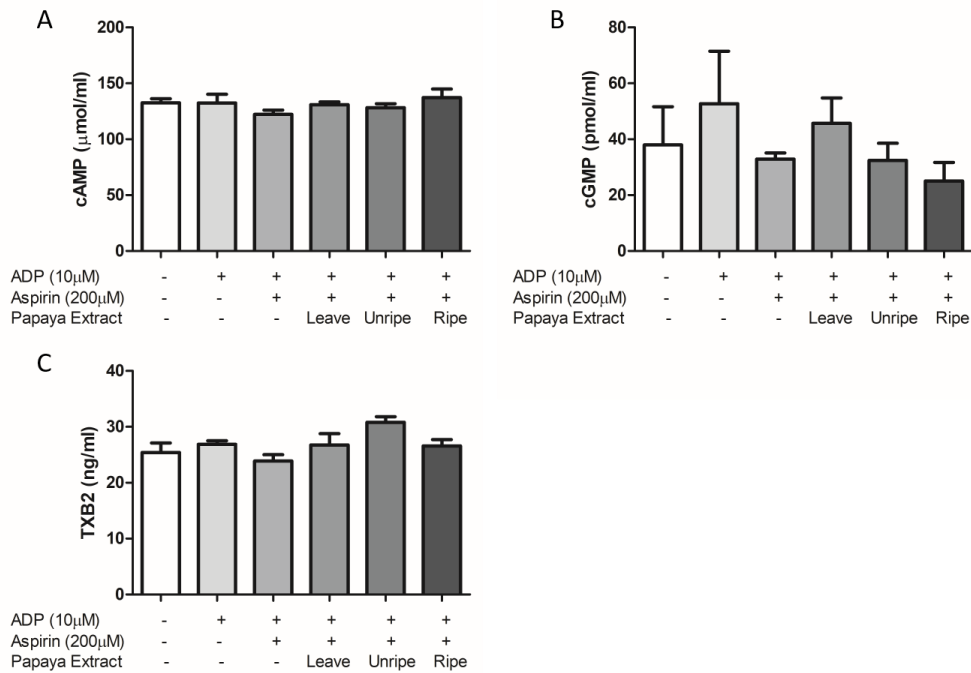
Inhibitory effect of the papaya extracts on human platelet aggregation *in vitro*. Platelets were preincubated with different concentrations of papaya extract in half-area 96 well microplate and then treated with ADP (10 μM). Platelet aggregation was monitored at 595 nm as decrease absorbance by microplate spectrophotometer. Each value represents the mean ± SE (n = 3). SE = standard error. One-way ANOVA followed by Tukey's test; *P < 0.05, ***P < 0.001 compared to ADP group.

2.2.12 ตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดมะละกอต่อร์ดับ cAMP cGMP และ TXB2

จากผลการทดลองข้างต้นบ่งชี้ว่า สารสกัดน้ำจากมะละกามีคุณสมบัติในการยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดได้ หนึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่า cAMP และ cGMP สามารถไปยับยั้งการกระตุ้นเกล็ดเลือด (platelet activation) และส่งผลให้ไปลดการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดได้ ดังนั้นการทดลองในครั้งนี้เพื่อทดสอบว่าสารสกัดมะละกอมีผลต่อการเพิ่มการหลั่งของ cAMP และ cGMP จากเกล็ดเลือดหรือไม่ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า สารสกัดมะละกอไม่สามารถไปเพิ่มระดับของ cAMP และ cGMP ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เกล็ดเลือดถูกกระตุ้นด้วย ADP (รูปที่ 2.9 A และ B)

การหลั่งของสาร TXA2 จากภายในเกล็ดเลือด มีผลไปกระตุ้นเกล็ดเลือดและนำมาสู่การเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดได้ เพื่อทดสอบกลไกการลดการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดอันเนื่องมาจากสารสกัดมะละกอ จึงทำการทดสอบผลของสารสกัดต่อการลดระดับของ TXA2 ในสภาวะที่เกล็ดเลือดถูกกระตุ้นด้วย ADP ผลการศึกษาแสดงในรูปที่ รูปที่ 2.9 C พบว่าสารสกัดมะละกอไม่มีผลต่อระดับ TXB2 (a stable metabolite of TXA2)

จากการศึกษาข้างต้น สามารถระบุได้ว่าการยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดโดยสารสกัดมะละกอ ไม่ได้เกิดจากการที่สารสกัดมะละกอไปเพิ่มระดับของ ของ cAMP และ cGMP หรือไปลดระดับของ TXA2 แต่อย่างใด กลไกการยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดโดยสารสกัดมะละกอยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ทั้งนี้อาจจะต้องมีการศึกษาต่อไป



รูปที่ 2.9 ผลของสารสกัดมะละกอต่อดระดับ cAMP cGMP และ TXB2

Effects of papaya extracts on the level of cAMP (A), cGMP (B) and TXA₂ formation (C). Data are expressed as mean ± SE (n = 3). SE = standard error. One-way ANOVA followed by Tukey's test compared to ADP group.

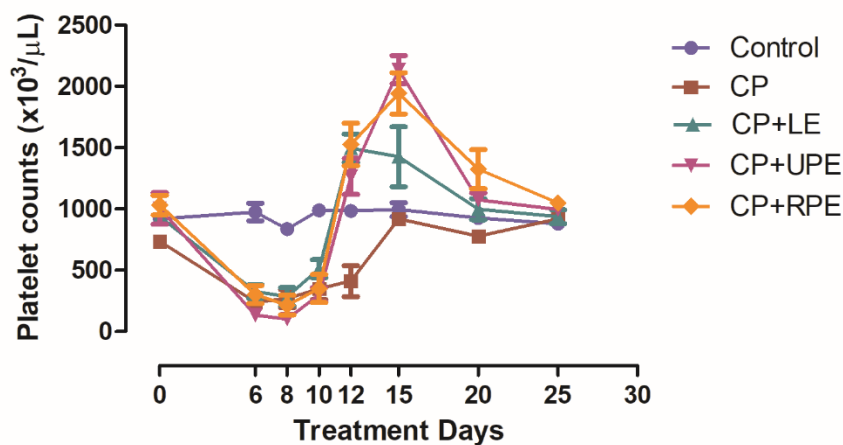
2.2.13 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดน้ำจากมะละกอในการเพิ่มจำนวนเกล็ดเลือดในหนูขาวเพศเมียพันธุ์วีสตาร์

ผลของสารสกัดน้ำจากมะละกอในการเพิ่มจำนวนเกล็ดเลือดในหนูทดลองนั้น ทำการศึกษาโดยการเหนี่ยวนำให้สัตว์ทดลองเกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำโดยยาชนิด carboplatin ซึ่งเป็นยาต้านมะเร็งในกลุ่ม second-generation platinum compound ที่มีผลข้างเคียงทำให้เกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำชั่วคราวได้ โดยหนูที่ได้รับยา carboplatin เกล็ดเลือดจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงวันที่ 5-8 หลังจากรับยา โดยพบภาวะเกล็ดเลือดต่ำนี้ประมาณ 4-7 วัน จากนั้นจำนวนเกล็ดเลือดจะเพิ่มขึ้นจนสู่ภาวะปกติในช่วงวันที่ 15-20 หลังจากรับยา (รูปที่ 2.10) การตรวจสอบภาวะเกล็ดเลือดต่ำทำได้โดยการวัดหาปริมาณเกล็ดเลือด โดยใช้เครื่องมืออัตโนมัติเพื่อวัดความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (complete blood count, CBC) หนูขาวเพศเมียพันธุ์วีสตาร์จะได้รับสารสกัดน้ำจากมะละกอขนาด 400 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมของสัตว์ทดลองในวันที่ 6 หลังจากรับยา carboplatin โดยการให้กินทางปากด้วยวิธี intragastric administration (oral gavage)

ผลการทดสอบการให้สารสกัดน้ำจากใบมะละกอ เนื้อมะละกอดิบและเนื้อมะละกอสุกในหนูขาวเพศเมียพันธุ์วีสตาร์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำจากยาคาร์โบพลาติน พบว่าสามารถไปเพิ่มค่าเกล็ดเลือดในหนูได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$ ในวันที่ 12 ของการศึกษา เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำจากยาคาร์โบพลาตินแต่เพียงอย่างเดียว (รูปที่ 2.10 และ ตารางที่ 2.18) ขณะที่ค่าเกล็ดเลือดในหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดน้ำจากเนื้อมะละกอดิบและเนื้อมะละกอสุก มีค่าเพิ่มขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.001$ และ $p < 0.01$

ตามลำดับ ในวันที่ 15 ของการศึกษา เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำจากยาคาร์โบพลาคินแต่เพียงอย่างเดียว การเพิ่มขึ้นของค่าเกล็ดเลือดในหนูกุ่มที่ได้รับสารสกัดน้ำจากเนื้อมะละกอดิบและเนื้อมะละกอสุก (2136.0 ± 114.3 และ 1943.0 ± 168.1 เซลล์ต่อไมโครลิตร ตามลำดับ) นี้จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนมากเกินกว่าค่าเกล็ดเลือดปกติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($995.5 \pm 56.5 \times 10^3$ เซลล์ต่อไมโครลิตร) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.001$ ทั้งนี้พบว่าสารสกัดน้ำจากใบมะละกอ สามารถไปเพิ่มค่าเกล็ดเลือดในหนูขาวเพศเมียพันธุ์วีสตาร์ให้เข้าสู่ภาวะปกติได้เร็วกว่าสารสกัดน้ำจากเนื้อมะละกอดิบและเนื้อมะละกอสุก โดยพบความแตกต่างได้ในวันที่ 10 ของการศึกษา (วันที่ 5 ของการได้รับสารสกัดน้ำจากใบมะละกอ) โดยค่าเกล็ดเลือดที่เพิ่มขึ้นมีค่าเท่ากับ 1.5 เท่าของค่าเกล็ดเลือดในกลุ่มที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำจากยาคาร์โบพลาคิน ทั้งนี้ไม่พบการเพิ่มขึ้นของค่าเกล็ดเลือดในวันที่ 10 ของการศึกษา ในหนูกุ่มที่ได้รับสารสกัดน้ำจากเนื้อมะละกอดิบและเนื้อมะละกอสุก เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกุ่มที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำจากยาคาร์โบพลาคิน อย่างไรก็ตามค่าเกล็ดเลือดในหนูกุ่มทุกกลุ่มของการศึกษาจะเข้าสู่ภาวะปกติในวันที่ 25 ของการศึกษา

ผลของการให้สารสกัดน้ำจากใบมะละกอ เนื้อมะละกอดิบและเนื้อมะละกอสุก ในหนูขาวเพศเมียพันธุ์วีสตาร์ทุกกลุ่มการทดลอง พบว่าสารสกัดน้ำจากมะละกอไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าทางโลหิตวิทยา ได้แก่ WBC, RBC, HGB, HCT, MCV และ MCHC ตลอดระยะเวลาของการศึกษา (ตารางที่ 2.19) ผลของสารสกัดน้ำจากใบมะละกอ เนื้อมะละกอดิบและเนื้อมะละกอสุก ต่อค่าทางชีวเคมีในหนูขาวเพศเมียพันธุ์วีสตาร์ ที่ได้รับสารสกัดในวันที่ 35 ของการศึกษา พบว่าค่าการทำงานของไต (blood urea nitrogen, creatinine) และค่าการทำงานของตับ (total protein, albumin, globulin, total bilirubin, direct bilirubin, ALT, AST และ ALP) มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในทุกกลุ่มของการศึกษา (ตารางที่ 2.20)



รูปที่ 2.10 ผลของสารสกัดน้ำจากมะละกอต่อค่าเกล็ดเลือดในหนูขาวเพศเมียพันธุ์วีสตาร์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำแบบชั่วคราวด้วยสารเคมีคาร์โบพลาคิน ค่าแสดงในรูป mean \pm SE. Control = กลุ่มควบคุม ได้รับน้ำเกลือ, CP = กลุ่มที่มีเกล็ดเลือดต่ำจากยาคาร์โบพลาคิน และได้รับน้ำเกลือ, CP+LE = กลุ่มที่มีเกล็ดเลือดต่ำจากยาคาร์โบพลาคิน และได้รับสารสกัดจากใบมะละกอ, CP+UPE = กลุ่มที่มีเกล็ดเลือดต่ำจากยาคาร์โบพลาคิน และได้รับสารสกัดจากผลมะละกอดิบ, CP+RPE = กลุ่มที่มีเกล็ดเลือดต่ำจากยาคาร์โบพลาคิน และได้รับสารสกัดจากผลมะละกอสุก

ตารางที่ 2.18 ผลของสารสกัดน้ำจากมะละกอต่ค่าเกล็ดเลือดในหนูขาวเพศเมียพันธุ์วีสตาร์

Groups	Platelet count (x10 ³ /μL)						
	Day-0	Day-8	Day-10	Day-12	Day-15	Day-20	Day-25
Control	919.5 ± 39.0	836.2 ± 37.9	989.8 ± 43.9	985.2 ± 52.5	995.5 ± 56.5	927.0 ± 28.9	881.8 ± 37.9
CP	736.3 ± 52.9	270.7 ± 74.1	351.0 ± 87.3	412.5 ± 126.5	1022.0 ± 51.7	778.7 ± 37.8	965.0 ± 22.7
CP+LE	938.4 ± 52.0	286.5 ± 74.4	513.0 ± 73.0	1496.0 ± 116.5 ^b	1426.0 ± 243.3	999.0 ± 86.0	918.0 ± 49.9
CP+UPE	1005.0 ± 128.2	104.0 ± 29.5	302.0 ± 57.3	1266.0 ± 147.6 ^b	2136.0 ± 114.3 ^a	1076.0 ± 53.7	995.4 ± 33.5
CP+RPE	1033.0 ± 79.8	217.3 ± 79.3	351.8 ± 114.8	1526.0 ± 173.8 ^b	1943.0 ± 168.1 ^b	1325.0 ± 159.1	1051.0 ± 46.4

ค่าแสดงในรูปแบบ mean ± SE. Control = กลุ่มควบคุม ได้รับน้ำเกลือ, CP = กลุ่มที่มีเกล็ดเลือดต่ำจากยาคาร์โบพลาคิน และได้รับน้ำเกลือ, CP+LE = กลุ่มที่มีเกล็ดเลือดต่ำจากยาคาร์โบพลาคิน และได้รับสารสกัดจากใบมะละกอ, CP+UPE = กลุ่มที่มีเกล็ดเลือดต่ำจากยาคาร์โบพลาคิน และได้รับสารสกัดจากผลมะละกอดิบ, CP+RPE = กลุ่มที่มีเกล็ดเลือดต่ำจากยาคาร์โบพลาคิน และได้รับสารสกัดจากผลมะละกอสุก การทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ย ใช้ตัววิเคราะห์ทางสถิติแบบ ANOVA และตามด้วย Tukey's HSD test ^a และ ^b แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p<0.001 และ p<0.01 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม CP

ตารางที่ 2.19 ผลของสารสกัดน้ำจากมะละกอต่ค่าโลหิตวิทยา ในหนูขาวเพศเมียพันธุ์วีสตาร์ ที่ได้รับสารสกัดในวันที่ 0 และ 25 ของการศึกษา

Hematological parameters	Control		CP		CP + LE		CP + UPE		CP + RPE	
	D0	D25	D0	D25	D0	D25	D0	D25	D0	D25
WBC (x10 ³ /μL)	6.48 ± 0.43	8.58 ± 0.61	8.02 ± 0.26	9.21 ± 0.54	7.58 ± 0.83	8.76 ± 0.64	6.40 ± 0.63	7.28 ± 0.38	8.56 ± 0.78	8.94 ± 0.53
RBC (x10 ⁶ /μL)	7.58 ± 0.31	8.46 ± 0.12	7.82 ± 0.33	8.14 ± 0.15	7.46 ± 0.19	8.04 ± 0.28	7.42 ± 0.26	7.92 ± 0.55	7.36 ± 0.32	8.07 ± 0.44
HGB (g/dl)	15.73 ± 0.52	16.88 ± 0.17	16.23 ± 0.46	17.12 ± 0.54	15.65 ± 0.27	16.87 ± 0.50	15.73 ± 0.53	16.88 ± 0.16	15.70 ± 0.53	17.27 ± 0.58
HCT (%)	48.28 ± 1.41	50.98 ± 0.71	49.83 ± 1.64	50.23 ± 0.89	47.92 ± 0.72	50.48 ± 1.32	48.33 ± 1.86	49.85 ± 0.66	48.07 ± 1.75	52.40 ± 2.10
MCV (fL)	63.87 ± 0.84	60.28 ± 0.59*	63.87 ± 0.85	61.78 ± 0.64	64.33 ± 0.72	62.92 ± 1.05	65.08 ± 0.42	63.33 ± 0.58	65.40 ± 0.66	65.07 ± 1.22
MCH (pg)	20.77 ± 0.23	19.95 ± 0.21	20.83 ± 0.33	20.65 ± 0.29	20.98 ± 0.18	20.98 ± 0.30	21.18 ± 0.16	21.45 ± 0.13	21.37 ± 0.24	21.43 ± 0.49
MCHC (g/dL)	32.58 ± 0.18	33.13 ± 0.38	32.57 ± 0.19	33.42 ± 0.37	32.65 ± 0.13	33.38 ± 0.21	32.58 ± 0.23	33.88 ± 0.15	32.67 ± 0.12	32.97 ± 0.23

ค่าแสดงในรูปแบบ mean ± SE. การทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ย ใช้ตัววิเคราะห์ทางสถิติแบบ ANOVA และตามด้วย Tukey's HSD test * แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเดียวกันที่ D0

ตารางที่ 2.20 ผลของสารสกัดน้ำจากมะละกอดต่อค่าทางชีวเคมีในหนูขาวเพศเมียพันธุ์วีสตาร์ ที่ได้รับสารสกัดวันที่ 35 ของการศึกษา

Biochemical parameters			Control	CP	CP + LE	CP + UPE	CP + RPE
RFT	BUN	(mg/dl)	20.68 ± 1.69	20.47 ± 0.73	21.05 ± 1.36	19.10 ± 1.80	20.44 ± 1.21
	Creatinine	(mg/dl)	0.69 ± 0.03	0.65 ± 0.03	0.67 ± 0.02	0.66 ± 0.05	0.65 ± 0.05
LFT	Total protein	(g/dl)	8.00 ± 0.13	8.48 ± 0.25	8.00 ± 0.30	8.32 ± 0.30	7.44 ± 0.48
	Albumin	(g/dl)	4.22 ± 0.09	4.42 ± 0.17	4.17 ± 0.15	4.32 ± 0.09	3.92 ± 0.21
	Globulin	(g/dl)	3.78 ± 0.07	4.07 ± 0.09	3.83 ± 0.15	3.92 ± 0.23	3.52 ± 0.29
	Total bilirubin	(mg/dl)	0.12 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.17 ± 0.04	0.16 ± 0.02	0.22 ± 0.05
	Direct bilirubin	(mg/dl)	0.04 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.04 ± 0.01
	ALT	(U/L)	31.00 ± 1.76	36.67 ± 2.54	37.50 ± 4.78	30.33 ± 1.48	33.20 ± 4.49
	AST	(U/L)	130.00 ± 7.41	146.50 ± 9.32	158.00 ± 5.97	144.67 ± 9.96	144.00 ± 4.59
	ALP	(U/L)	91.80 ± 11.19	85.67 ± 6.11	95.33 ± 13.00	75.17 ± 12.16	72.80 ± 9.87

ค่าแสดงในรูป mean ± SE. Control = กลุ่มควบคุม ได้รับน้ำเกลือ, CP = กลุ่มที่มีเกล็ดเลือดต่ำจากยาคาร์โบพลาติน และได้รับน้ำเกลือ, CP+LE = กลุ่มที่มีเกล็ดเลือดต่ำจากยาคาร์โบพลาติน และได้รับสารสกัดจากใบมะละกอ, CP+UPE = กลุ่มที่มีเกล็ดเลือดต่ำจากยาคาร์โบพลาติน และได้รับสารสกัดจากผลมะละกอดิบ, CP+RPE = กลุ่มที่มีเกล็ดเลือดต่ำจากยาคาร์โบพลาติน และได้รับสารสกัดจากผลมะละกอดสุก RFT = Renal function, LFT = Liver function, BUN = Blood urea nitrogen, ALT = Alanine aminotransferase, AST = Aspartate aminotransferase, ALP = Alkaline phosphatase การทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ย ใช้ตัววิเคราะห์ทางสถิติแบบ ANOVA และตามด้วย Tukey's HSD test

2.2.14 คุณภาพและมาตรฐาน (specification) ของสารสกัดจากใบมะละกอ

จัดทำมาตรฐานสารสกัดจากใบมะละกออย่างย่อ ทางด้านคุณลักษณะ (characteristic) คุณสมบัติทางกายภาพทางเคมี รวมทั้งการวัดปริมาณสารบ่งชี้ (marker) ที่จำเพาะชนิด quercetin และ rutin โดยการจัดทำ chromatogram ของสารสกัด (ส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่ บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด สาขาเชียงใหม่) รายละเอียดแสดงดัง ตารางที่ 2.21 การหาปริมาณสารสำคัญที่พบได้ในสารสกัดจากใบมะละกอ โดยเทคนิค HPLC แสดงในตารางที่ 2.22 สารมาตรฐานที่ใช้ได้แก่ phenolic acids (gallic acid, hydroquinin), tannin (tannic acid) และ flavonoids (quercetin, isoquercetin, rutin, kaempferol, apigenin, catechin และ eriodictyol) ผลการวิเคราะห์สารประกอบชนิด gallic acid, catechin, tannic acid, rutin, isoquercetin, eriodictyol, quercetin และ apigenin มีปริมาณสารสำคัญดังนี้ 1,712.00, 424.47, 1,010.00, 2,484.00, 1,037.00, < 10.00, 821.47 และ 166.37 mg/kg dry extract ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์โดยเทคนิคนี้ ไม่สามารถวัดปริมาณสาร kaempferol และ hydroquinin ได้ ทั้งนี้ค่าขีดจำกัดการตรวจหาหรือ limit of detection (LOD) ของ kaempferol และ hydroquinin คือ 5 mg/kg dry extract รูปที่ 2.11 แสดง chromatogram ของสารมาตรฐานจำนวน 10 ชนิด และสารสกัดน้ำจากใบมะละกอ อนึ่งพบว่าในสารสกัดจากใบมะละกอพบพีคที่มีค่า retention time ที่ 16.496 และ 17.130 ทั้งนี้ยังไม่สามารถระบุองค์ประกอบทางเคมีของทั้ง 2 พีคนี้ได้

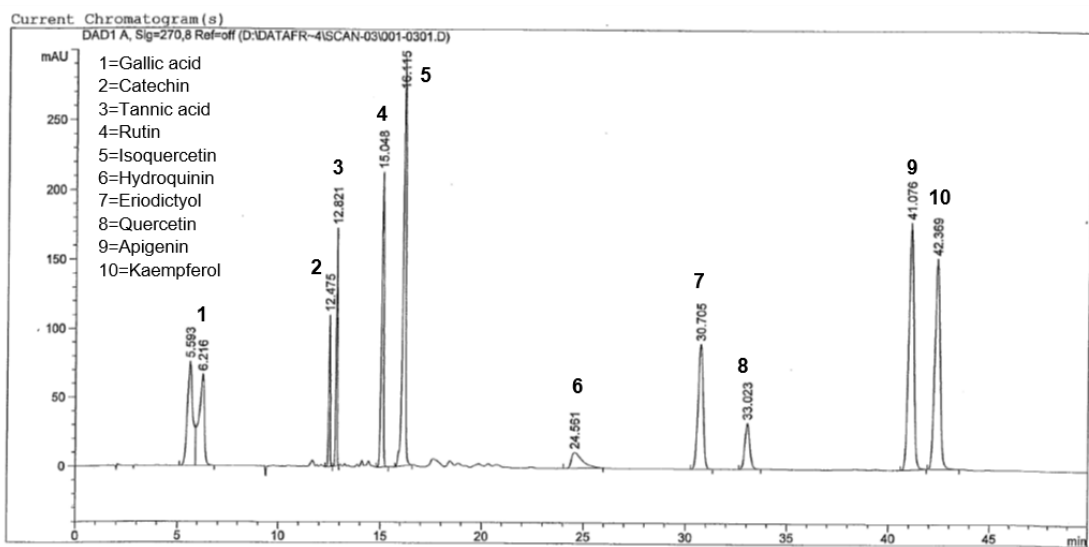
ตารางที่ 2.21 Specification ของสารสกัดจากใบมะละกอ

ข้อมูลรายละเอียดของสารสกัดจากใบมะละกอ	
1. ชื่อพืช	มะละกอ (<i>Carica papaya L.</i>), สายพันธุ์ฮอลแลนด์
2. ส่วนที่ใช้	ใบ
3. ชื่อวัตถุดิบ	สารสกัดใบมะละกอ/สกัดด้วยน้ำ
4. องค์ประกอบสำคัญ	phenolic acids, flavonoids, alkaloids, carotenoids
5. ลักษณะทางกายภาพ	ผงสีเขียวเข้ม
6. ความเป็นกรด-ด่าง	เป็นกลาง (pH = 7)
7. คุณสมบัติในการละลายในตัวทำละลายต่างๆ	ละลายในน้ำ
8. ฤทธิ์ทางชีวภาพในหลอดทดลอง	มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และฤทธิ์ต้านการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือด
9. ฤทธิ์ทางชีวภาพในสัตว์ทดลอง	มีฤทธิ์เพิ่มค่าเกล็ดเลือดในหนูทดลอง
10. การควบคุมคุณภาพของสารสกัด	ค้นหาสารบ่งชี้ (phytochemical biomarker) โดยการทำการ chromatogram สำหรับสารสกัดจากใบมะละกอ โดยใช้ quercetin และ rutin เป็น bioactive marker

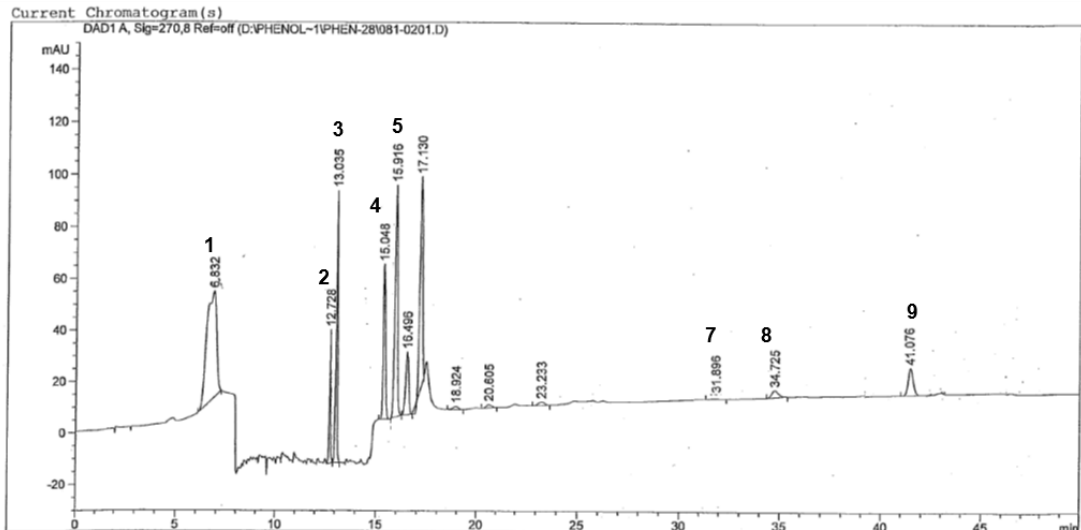
ตารางที่ 2.22 ปริมาณสารสำคัญในกลุ่มกรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในสารสกัดจากใบมะละกอ วิเคราะห์โดยวิธี LC/MSD

Peak NO.	RT	Compounds	Contents (mg/kg dry extract)	Limit of Detection (LOD)
1	5.593	Gallic acid	1,712.00	-
2	12.475	Catechin	424.47	-
3	12.821	Tannic acid	1,010.00	-
4	15.048	Rutin	2,484.00	-
5	16.115	Isoquercetin	1,037.00	-
6	24.561	Hydroquinin	Not detected	5
7	30.705	Eriodictyol	< 10.00	-
8	33.023	Quercetin	821.47	-
9	41.076	Apigenin	166.37	-
10	42.369	Kaempferol	Not detected	5

A



B



รูปที่ 2.11 Chromatogram ของสารสกัดน้ำจากใบมะละกอโดยวิธี LC/MSD

A) Chromatogram ของสารมาตรฐานจำนวน 10 ชนิด พีคระบุเป็นตัวเลข 1-10 1=Gallic acid, 2=Catechin, 3=Tannic acid, 4=Rutin, 5=Isoquercetin, 6=Hydroquinin, 7=Eriodictyol, 8=Quercetin, 9=Apigenin, 10=Kaempferol. B) Chromatogram ของสารสกัดน้ำจากใบมะละกอ

บทที่ 3 ข้อวิจารณ์

การศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดน้ำจากใบมะละกอ เนื้อมะละกอดิบ และเนื้อมะละกอสุก ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบมะละกามีองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างจากเนื้อมะละกอดิบ และเนื้อมะละกอสุก โดยพบว่าสารสกัดจากใบมะละกามีปริมาณสารประกอบรวมของสารกลุ่ม phenolic, flavonoid และ alkaloid สูงกว่าสารสกัดจากเนื้อมะละกอดิบ และเนื้อมะละกอสุก ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องการวิเคราะห์หาชนิดของสารประกอบโดยวิธี qualitative LC-MS/MS ซึ่งพบสารกลุ่ม alkaloids ชนิด carpaine และ dehydrocarpain นอกจากนี้ยังพบสารกลุ่ม polyphenols ชนิด flavonoids ซึ่งจัดอยู่ใน subgroup flavonols ได้แก่ quercetin 3-(4-glucosylrhamnoside), quercetin 3-(2Gal-rhamnosyl-robinobioside), manghaslin (Quercetin 3-2G-rhamnosylrutinoside), clitorin (kaempferol 3-O-(2",6"-di-O-rhamnopyranosyl)glucopyranoside) และ rutin (quercetin-3-O-rutinoside) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้าที่พบสารประกอบชนิด nicotiflorin, rutin, clitorin, manghaslin และ carpaine ในสารสกัดจากใบมะละกอ (Afzan et al 2012, Brasil et al 2014) ขณะที่ Nugroho และคณะสามารถวิเคราะห์หาชนิดของสารฟลาโวนอยด์ได้ถึง 7 ชนิด ทั้งหมดจัดอยู่ในกลุ่ม flavonols ได้แก่ quercetin, quercetin glycoside, kaempferol, kaempferol glycoside และ myricetin glycoside และเมื่อทำการวิเคราะห์ในเชิงปริมาณ พบว่าสารสกัดจากใบมะละกามีปริมาณ clitorin หรือ kaempferol 3-(2G-rhamnosylrutinoside) มากกว่าสารตัวอื่นที่วิเคราะห์ได้ (Nugroho et al 2017) ผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณสารกลุ่ม polyphenols ที่จำเพาะเป็นรายตัวในสารสกัดจากใบมะละกอในโครงการนี้ด้วยเทคนิค HPLC สามารถวัดระดับปริมาณของสารชนิด caffeic acid, kaempferol และ quercetin ที่ระดับ 44.22 ± 0.91 , 144.32 ± 4.37 และ 303.21 ± 9.48 mg/ 100 g dry extract ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าในใบมะละกอเป็นแหล่งของสารกลุ่ม carotenoids ชนิด lutein α -carotene และ β -carotene สารกลุ่มแอลคาลอยด์ที่พบได้ในใบมะละกอได้แก่ คาร์เพน (carpaine), carpamic acid, methyl carpamate ทั้งนี้มีรายงานพบว่าคาร์เพนเป็นสารหลักในกลุ่มแอลคาลอยด์ที่พบได้มากในมะละกอเช่นกัน (Julianti et al 2014) ทั้งนี้ยังไม่มีรายงานการพบสารคาร์เพนในพืชชนิดอื่น ๆ แต่อย่างใด

การวิเคราะห์องค์ประกอบหลักทางเคมีชนิดที่ระเหยได้ในสารสกัดจากใบมะละกอและเนื้อมะละกอทั้งสุกและดิบ พบสารประกอบชนิด 9,12,15-octadecatrienoic acid, (Z,Z,Z)-, 9,12-octadecadienoic acid (Z,Z), n-hexadecanoic acid และ 4H-pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl เป็นส่วนประกอบหลักเหมือนกัน 9,12,15-octadecatrienoic acid, (Z,Z,Z)- หรือ alpha-linolenic acid (ALA) เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิด omega-3 ขณะที่ 9,12-octadecadienoic acid (Z,Z)- หรือ linoleic acid (LA) เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิด omega-6 สารทั้งสองชนิดพบมากในพืช ผัก และผลไม้ omega-3 fatty acid (ALA) และ omega-6 fatty acid เป็นกรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกาย แต่ร่างกายสร้างเองไม่ได้ ทั้งนี้ต้องได้รับการรับประทานเท่านั้น ส่วน n-hexadecanoic acid หรือ palmitic acid นั้น เป็นกรดไขมันชนิดอิ่มตัว มีรายงานว่ามีความสมบัติเป็นสารต้านการอักเสบ (Aparna et al 2012) ส่วน squalene ที่พบได้ใน

สารสกัดน้ำจากมะละกอดิบ เป็นสารที่พบได้ในสัตว์และพืช ทั้งนี้ squalene เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ steroid hormones คุณสมบัติทางชีวภาพของ squalene ที่มีการรายงานไว้ ได้แก่ cardioprotector, antioxidant, antibacterial and antifungal และ anticancer (Lozano et al 2018) 4H-pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl หรือ 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4(H)-pyran-4-one (DDMP) และ 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) เป็นสารในกลุ่ม dihydropyranones และ furans ตามลำดับ มีรายงานว่า DDMP มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (Kanzler et al 2016) ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Takara et al 2007) มีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งลำไส้ (Ban et al 2007) และมีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทอัตโนมัติในสัตว์ทดลอง (Beppu et al 2012) ขณะที่ HMF มีรายงานเช่นกันว่ามีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบ (Kitts et al 2012, Zhao et al 2013) DDMP และ 5-HMF สามารถถูกสร้างขึ้นได้ในปฏิกิริยา Maillard reaction ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างกรดอะมิโน และ reduced sugar โดยไม่อาศัยเอนไซม์ ในสภาวะที่มีความร้อน เช่นการประกอบอาหาร เป็นต้น ทำให้สีของอาหารที่ได้เป็นสีน้ำตาล (Pénicaud et al 2011)

การเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลองของสารสกัดจากใบมะละกอ เนื้อมะละกอดิบ และเนื้อมะละกอดิบในตัวทำละลายน้ำ พบว่าสารสกัดจากใบมะละกอมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดจากเนื้อมะละกอดิบ และเนื้อมะละกอดิบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากว่า ในสารสกัดจากใบมะละกอนั้นมีสารประกอบกลุ่ม flavonoids เป็นส่วนประกอบ ในขณะที่ในสารสกัดจากเนื้อมะละกอดิบ และเนื้อมะละกอดิบนั้นไม่พบสารประกอบในกลุ่ม flavonoids อยู่ มีรายงานว่าสารประกอบกลุ่ม flavonoids หลายชนิด ที่พบได้ในพืชนั้นมีฤทธิ์ทางชีวภาพอยู่มากมาย โดยเฉพาะฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระ โดยสาร flavonoids สามารถไปจับทำลายอนุมูลอิสระได้หลากหลาย (Pietta 2000) Nugroho และคณะ ทำการแยกสารฟลาโวนอยด์ที่ได้ในใบมะละกอแต่ละตัวมาวิเคราะห์หาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี peroxynitrite scavenging assay พบว่าสารฟลาโวนอยด์ทั้ง 7 ชนิด มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง ($IC_{50} \leq 4.15 \mu\text{mol/L}$) (Nugroho et al 2017)

ผลการทดสอบสารสกัดจากใบมะละกอ ในการเพิ่มจำนวนเกล็ดเลือดในหนูขาวเพศเมียพันธุ์วีสตาร์ พบว่าสารสกัดจากใบมะละกอสามารถไปเพิ่มค่าเกล็ดเลือดในหนูที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำให้เข้าสู่ภาวะปกติได้เร็วขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับหนูก่อนที่ถูกกระตุ้นให้เกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำด้วยคาร์โบพลลาติน และพบว่าสารสกัดจากใบมะละกอมีแนวโน้มในการเพิ่มค่าเกล็ดเลือดได้เร็วกว่าสารสกัดจากเนื้อมะละกอดิบและเนื้อมะละกอดิบ อย่างไรก็ตามพบว่าสารสกัดจากเนื้อมะละกอดิบ และเนื้อมะละกอดิบมีความสามารถในการเพิ่มค่าเกล็ดเลือดได้เช่นเดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบกับหนูก่อนที่ถูกกระตุ้นให้เกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำด้วยคาร์โบพลลาติน ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ ที่ได้กล่าวถึงคุณสมบัติของสารสกัดจากผลมะละกอดิบและสุก ในการเพิ่มค่าเกล็ดเลือดในหนูทดลองที่ถูกกระตุ้นให้เกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำด้วยสาร cyclophosphamide ได้เช่นกัน (Jose et al 2018) การศึกษาก่อนหน้านี้บ่งชี้ว่าสารสกัดจากใบมะละกอในตัวทำละลายน้ำ มีผลไปเพิ่มค่าเกล็ดเลือดในหนูทดลองได้ (Anjum et al 2017, Saraf & Kavimandan 2017, Zunjar et al 2016) รายงานการศึกษานี้พบว่ามีสารสกัดจากใบมะละกอ น้ำคั้นสดจากใบมะละกอ และสารสกัดจากใบมะละกอในรูปแบบแคปซูล สามารถเพิ่มปริมาณเกล็ดเลือดในผู้ป่วยไข้แดงและไข้เลือดออก และผู้ป่วยมะเร็งที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำเนื่องจากการใช้เคมีบำบัด ให้กลับมาอยู่ในระดับปกติได้เร็วขึ้น

(Dharmarathna et al 2013, Hussain et al 2017, Zunjar et al 2016) การให้สารสกัดจากใบมะละกอในรูปแบบแคปซูลแก่ผู้ป่วยไข้แดงที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำ พบว่าสามารถไปเพิ่มค่าของเกล็ดเลือด โดยไม่มีรายงานว่า พบผลข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์ที่เกิดจากการรับประทานสารสกัดจากใบมะละกอในรูปแบบแคปซูล (Gadhwali et al 2016) การวิเคราะห์โดยวิธี meta-analysis จากผลการศึกษาศึกษาการใช้สารสกัดจากใบมะละกอจำนวน 4 ชิ้น พบว่าการใช้สารสกัดจากใบมะละกอมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของปริมาณเม็ดเลือดแดงและค่าเกล็ดเลือด อีกทั้งสามารถไปลดระยะเวลาในการนอนโรงพยาบาลในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสแดงก็ได้ดีกว่ากลุ่มควบคุม (Charan et al 2016) นอกจากนี้ การศึกษาขั้นต้นในผู้ป่วยมะเร็งที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำเนื่องจากการใช้ยาเคมีบำบัด พบว่าเมื่อให้ผู้ป่วยรับประทานสารสกัดจากใบมะละกอในรูปแบบเม็ด (CPLE) ขนาด 1100 มิลลิกรัม 3 เวลาต่อวัน ในวันที่ 7-14 หลังจากได้รับยาเคมีบำบัดไปแล้ว 7 วัน ผลการศึกษาพบว่า CPLE มีผลไปเพิ่มค่าเกล็ดเลือดผู้ป่วยได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในวันที่ 13 หลังการให้ยาเคมีบำบัดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (147.54 ± 54.36 และ 46.36 ± 14.77 ตัวต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร ตามลำดับ) (Sundarmurthy et al 2017) จะเห็นได้ว่าสารสกัดจากใบมะละกามีฤทธิ์ทางชีวภาพในการเพิ่มค่าเกล็ดเลือดได้ไม่จำเพาะต่อผู้ป่วยไข้เลือดออกที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำเท่านั้น แต่สามารถไปมีผลต่อการเพิ่มค่าเกล็ดเลือดในผู้ป่วยที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำเนื่องจากการใช้ยาเคมีบำบัดได้อีกด้วย

ขณะที่กลไกการทำงานของสารสกัดจากใบมะละกอ เนื้อมะละกอดิบ และเนื้อมะละกอสุกรวมทั้งสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในการเพิ่มค่าเกล็ดเลือดนั้นยังมีการศึกษาไม่มากนัก ผลการทดสอบสารสกัดจากใบมะละกอ เนื้อมะละกอดิบ และเนื้อมะละกอสุกพบว่า มีผลไปลดการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ทั้งนี้มีรายงานก่อนหน้านี้พบว่า น้ำคั้นสดจากใบมะละกอมีความสามารถในการไปปรับสมดุลของพลาสมาของผู้ป่วยที่มีเชื้อไวรัสแดงก็อยู่ ทำให้ไปลดการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดในหลอดทดลองได้ (platelet aggregation) (Chinnappan et al 2016) อนึ่งการยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดโดยสารสกัดจากมะละกอในสัตว์ทดลอง ที่มีความสัมพันธ์กับระดับของเกล็ดเลือดในกระแสเลือดที่เพิ่มขึ้นนั้น ยังไม่มีการศึกษาแต่อย่างใด นอกจากนี้พบว่าผู้ป่วยไข้เลือดออกที่ได้รับน้ำคั้นสดจากใบมะละกอมีระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเกล็ดเลือดสูงกว่าในกลุ่มควบคุม (Subenthiran et al 2013) การสร้างแบบจำลองบนคอมพิวเตอร์โดยวิธี molecular docking พบว่าสารฟลาโวนอยด์ที่พบได้ในใบมะละกามีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ NS2B-NS3 protease และป้องกันการประกอบตัวของไวรัสแดงชนิดที่ 2 (viral assembly) (Senthilvel et al 2013) การศึกษาสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในการเพิ่มเกล็ดเลือดในหนูทดลองที่ถูกกระตุ้นให้เกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำด้วยสารเคมีบูซลแฟน โดยวิธี bioassay-guided fractionation โดยทำการสกัดสารจากใบมะละกอด้วยวิธีการต้มเพื่อสกัดเอาสารสำคัญออกมา จากนั้นทำการสกัดต่อด้วยตัวทำละลายตามลำดับ และสามารถแยกสารออกได้เป็น 2 กลุ่มได้แก่สารกลุ่มฟีนอลิก และกลุ่มอัลคาลอยด์ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารสกัดกลุ่มอัลคาลอยด์เท่านั้นที่มีฤทธิ์ต้านภาวะเกล็ดเลือดต่ำได้ (anti-thrombocytopenic activity) เมื่อทำการสกัดสารกลุ่มอัลคาลอยด์ต่อจนได้สารสำคัญชนิดหนึ่งคือ สารคาร์เพน (carpaine) ซึ่งพบว่ามีคุณสมบัติในการต้านภาวะเกล็ดเลือดต่ำในหนูทดลองได้เช่นกัน แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดจากใบมะละกอที่ได้จากการต้มในครั้งแรกนั้น พบว่าไม่มีฤทธิ์ต้านภาวะเกล็ดเลือดต่ำแต่อย่างใด (Zunjar et al 2016) ขณะที่รายงานวิจัยอื่น ๆ ที่กล่าวมาก่อนหน้านี้ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดน้ำจากใบมะละกอสดหรือใบมะละกอตากแห้งในร่มที่ทำการสกัดในอุณหภูมิห้อง ให้ผลในการเพิ่มค่าเกล็ดเลือดได้เป็นอย่างดี

ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าสารสำคัญบางชนิดที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านภาวะเกล็ดเลือดต่ำจัดอยู่ในกลุ่มไม่ทนต่อความร้อนก็เป็นได้ (thermolabile bioactive compounds) การศึกษาสารสกัดจากใบมะละกอในตัวทำละลายต่าง ๆ ได้แก่ น้ำ เฮกเซน อะซิโตน เอทานอล และเมทานอล ผลการศึกษาบ่งชี้ว่าสารสกัดจากใบมะละกอในทุกตัวทำละลายดังกล่าวมีผลไปเพิ่มค่าเกล็ดในหนูทดลองที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำได้เร็วกว่าหนูทดลองกลุ่มควบคุม (Saraf & Kavimandan 2017) การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณสารฟลาโวนอยด์กลุ่มฟีนอล ซาโปนิน ฟลาโวนอยด์ และวิตามินซี พบว่าสารสกัดน้ำจากใบมะละกอสดที่ทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็งมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์มากกว่าในสารสกัดจากใบมะละกอตากแห้งในร่มโดยตรง แสดงให้เห็นว่าสารสำคัญอาจถูกทำลายในตัวอย่างที่ตากแห้งได้ (Hossain et al 2016) อนึ่งสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในสารสกัดน้ำจากใบมะละกอในการเพิ่มค่าเกล็ดเลือดนั้นควรจะมีการศึกษาต่อไป ทั้งนี้กลไกของสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในสารสกัดจากใบมะละกอนอกจากสารคาร์เพนที่ได้มีการรายงานไว้แล้วอาจจะมีสารออกฤทธิ์ตัวอื่น ๆ ที่มีบทบาทในการทำงานร่วมกัน (synergist effect) ในการไปเพิ่มค่าเกล็ดเลือดก็เป็นได้ เช่น สารประกอบในกลุ่ม flavonoids ทั้งนี้มีรายงานการศึกษาทดลองในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสารเคมีชนิดแคดเมียม และโพลีคลอริเนตไบฟีนิล (PCB) พบว่าเมื่อให้สารประกอบชนิด quercetin ร่วมด้วย ผลการศึกษาพบว่า quercetin มีผลไปเพิ่มค่าเกล็ดเลือดในหนูทดลองกลุ่มนี้ได้ (Donmez et al 2019 , Selvakumar et al 2013)

อนึ่งการศึกษาในโครงการนี้ ไม่ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านภาวะเกล็ดเลือดต่ำในหนูทดลองของสารอัลคาลอยด์และสารคาร์เพนที่สกัดได้จากส่วนใบมะละกอ ทั้งนี้เนื่องจากไม่สามารถสกัดสารคาร์เพนให้บริสุทธิ์ได้ อีกทั้งไม่ได้ทดสอบผลของสารสกัดมะละกอต่อภาวะเลือดออกในหนูทดลอง การตรวจวัดเวลาในการไหลของเลือดในหนูทดลอง (blood bleeding time) เป็นการตรวจวัดช่วงเวลาตั้งแต่เลือดเริ่มไหลหลังจากการถูกทำให้เกิดบาดแผลจนกระทั่งเลือดหยุดไหลในหนูทดลอง ทั้งนี้พบว่าขั้นตอนในการตัดหางหนูเพื่อให้เกิดบาดแผลมีความไม่สม่ำเสมอ หลังจากได้ทำการทดสอบในชุดแรกไป ทำให้ค่า blood bleeding time ที่ได้มีความแปรปรวน จึงได้หยุดการทดสอบในส่วนนี้ไป

บทที่ 4

สรุปและข้อเสนอแนะ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจาก สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) ประจำปี 2562 ภายใต้โครงการ “การวิจัยและพัฒนาสารสกัดมะละกอ สำหรับผู้ป่วยที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำในอนาคต” ได้เริ่มดำเนินงานในเดือนธันวาคม 2561 และสิ้นสุดโครงการในเดือนธันวาคม 2562 โดยมีวัตถุประสงค์หลักในปีแรกของโครงการวิจัย เพื่อค้นหาคุณสมบัติทางพิษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ โดยเฉพาะฤทธิ์ในการเพิ่มค่าเกล็ดเลือดของสารสกัดหยาบชนิดผงแห้งจากส่วนใบ เนื้อมะละกอดิบ และเนื้อมะละกอสุก ผลการศึกษาในครั้งนี้ทำให้ทราบความแตกต่างขององค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพ ในการเพิ่มค่าเกล็ดเลือดของสารสกัดน้ำจากมะละกอสดจากส่วนส่วนใบ เนื้อมะละกอดิบ และเนื้อมะละกอสุก โดยพบว่าสารสกัดน้ำจากใบมะละกอมีสารกลุ่ม alkaloids ชนิด carpaine, dehydrocarpain I และ dehydrocarpain II และสารกลุ่ม polyphenols ชนิด flavonoids ซึ่งจัดอยู่ใน subgroup flavonols ได้แก่ quercetin 3-(4-glucosylrhamnoside), quercetin 3-(2Gal-rhamnosyl-robinobioside), manghaslin (quercetin 3-2G-rhamnosylrutinoside), clitorin (kaempferol 3-O-(2",6"-di-O-rhamnopyranosyl)glucopyranoside) และ rutin (quercetin-3-O-rutinoside) เป็นองค์ประกอบหลัก ทั้งนี้ไม่พบสารดังกล่าวข้างต้นในสารสกัดจากเนื้อมะละกอดิบและเนื้อมะละกอสุก การเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพในหลอดทดลองของสารสกัดจากใบมะละกอ เนื้อมะละกอดิบ และเนื้อมะละกอสุกในตัวทำละลายน้ำ พบว่าสารสกัดจากใบมะละกอมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดจากเนื้อมะละกอดิบ และเนื้อมะละกอสุกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพในการเพิ่มจำนวนเกล็ดเลือดในหนูทดลอง พบว่าสารสกัดจากใบมะละกอให้ผลในการเพิ่มค่าเกล็ดเลือดได้ และการเพิ่มขึ้นของค่าเกล็ดเลือดเกิดได้เร็วกว่าสารสกัดจากเนื้อมะละกอดิบ และเนื้อมะละกอสุก ผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่าฤทธิ์ในการต้านภาวะเกล็ดเลือดต่ำของสารสกัดจากใบมะละกออาจจะเนื่องมาจากในใบมะละกอมีสารพิษเคมีชนิด flavonoids และ alkaloids เป็นองค์ประกอบ

ข้อเสนอแนะ

ผลงานวิจัยในครั้งนี้เป็นผลสำเร็จเบื้องต้นเป็นองค์ความรู้ ที่จะนำไปสู่การวิจัยในระยะที่ 2 คือ การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต้นแบบเสริมอาหารสารสกัดจากใบมะละกอในรูปแบบอัดเม็ดหรือแบบแคปซูล ที่มีฤทธิ์ต้านภาวะเกล็ดเลือดต่ำที่ได้มาตรฐานการผลิต ซึ่งจะมีขั้นตอนที่จะดำเนินการดังนี้ 1) การพัฒนาวิธีการสกัดสารสำคัญที่เหมาะสมจากใบมะละกอ และจัดทำมาตรฐานของสารสกัด (standardization extract) 2) การพัฒนาผลิตภัณฑ์สารสกัดจากใบมะละกอ 3) การทดสอบความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์สารสกัดจากใบมะละกอในสัตว์ทดลอง ตามข้อกำหนดของผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) 4) การตรวจวัดฤทธิ์ทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์สารสกัดจากใบมะละกอ 5) จัดทำคุณภาพและมาตรฐาน (specification) ของผลิตภัณฑ์สารสกัดจากใบมะละกอ ผลสำเร็จของงานวิจัยในระยะนี้จะนำไปสู่ผลสำเร็จของงานวิจัยในระยะสุดท้าย (การวิจัยระยะที่ 3) คือการนำผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากใบมะละกอ ในรูปอัดเม็ดหรือแคปซูลที่ได้คุณภาพมาตรฐานที่มีปริมาณสารสำคัญที่จำเพาะ มาทดสอบความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจาก

มะละกอในอาสาสมัคร รวมทั้งการทดสอบประสิทธิผลทางคลินิกในผู้ป่วยที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำต่อไป
ได้ในอนาคต ทั้งนี้เพื่อให้บรรลุเป้าหมายระยะยาวของการวิจัยคือ เพื่อที่จะพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริม
อาหารจากใบมะละกอ ที่มีฤทธิ์ในการเพิ่มค่าเกล็ดเลือด เพื่อนำมาใช้เป็นทางเลือกร่วมในการ
รักษาผู้ป่วยที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำ

อย่างไรก็ตามการค้นหาสารออกฤทธิ์ที่สำคัญจำเพาะ และมีบทบาทในการเพิ่มค่าเกล็ดเลือด
จำเป็นจะต้องมีการศึกษาต่อไป อนึ่งมีรายงานสารกลุ่มฟลาโวนอยด์มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย
เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ต้านมะเร็ง ต้านไวรัส ลดความดัน เป็นต้น ดังนั้นการที่สารสกัดจากใบ
มะละกอมีสารประกอบกลุ่มฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบทางเคมีอยู่หลายชนิดนั้น ทำให้เป็นที่
น่าสนใจว่า นอกจากฤทธิ์ในการต้านภาวะเกล็ดเลือดต่ำแล้ว สารสกัดจากใบมะละกออาจจะมีฤทธิ์
ทางชีวภาพของทางด้านอื่น ๆ ร่วมด้วยเช่นกัน

เอกสารอ้างอิง

- Afzan A, Abdullah N, Halim SZ, Abd Rashid B, Semail R, et al. 2012. Repeated Dose 28-Days Oral Toxicity Study of *Carica papaya* L. Leaf Extract in Sprague Dawley Rats. *Molecules* 17: 4326-42
- Akujobi CN, Ofodeme CN, Enweani CA. 2010. Determination of antibacterial activity of *Carica papaya* (paw-paw) extracts. 13: 55-57
- Anjum V, Arora P, Ansari SH, Najmi AK, Ahmad S. 2017. Antithrombocytopenic and immunomodulatory potential of metabolically characterized aqueous extract of *Carica papaya* leaves. *Pharm Biol.* 55(1): 2043-56
- Aparna V, Dileep KV, Mandal PK, Karthe P, Sadasivan C, Haridas M. 2012. Anti-inflammatory property of n-hexadecanoic acid: structural evidence and kinetic assessment. *Chem Biol Drug Des* 80: 434-9
- Aravind G, Bhowmik D, Duraivel S, Harish G. 2013. Traditional and Medicinal Uses of *Carica papaya*. *Journal of Medicinal Plants Studies* 1
- Asghar N, Naqvi SAR, Hussain Zea. 2016. Compositional difference in antioxidant and antibacterial activity of all parts of the *Carica papaya* using different solvents. *Chemistry Central Journal* 10
- Ayoola PB, Adeyeye A. 2010. Phytochemical and nutrient evaluation of *Carica papaya* (pawpaw) leaves *International Journal of Recent Research and Applied Studies* 5: 325-28
- Ban JO, Hwang IG, Kim TM, Hwang BY, Lee US, et al. 2007. Anti-proliferate and proapoptotic effects of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyranone through inactivation of NF-kappaB in human colon cancer cells. *Arch Pharm Res* 30(11): 1455-63
- Bellik Y, Boukraa L, Alzahrani HA, Bakhotmah BA, Abdellah F, et al. 2012. Molecular mechanism underlying anti-inflammatory and anti-allergic activities of phytochemicals: an update. *Molecules* 18: 322-53
- Benzie IF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 239(70-6
- Beppu Y, Komura H, Izumo T, Horii Y, Shen J, et al. 2012. Identificaton of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one isolated from *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84 culture supernatants as a compound that stimulates autonomic nerve activities in rats. *J Agric Food Chem* 60: 11044-9
- Brasil G, Ronchi S, Nascimento A, Lima E, Romão W, et al. 2014. Antihypertensive Effect of *Carica papaya* Via a Reduction in ACE Activity and Improved Baroreflex. *Planta medica* 80

- Brindha P. 2016. Role of phytochemicals as immunomodulatory agents: a review. *international journal of green pharmacy* 10
- Charan J, Saxena D, Goyal JP, Yasobant S. 2016. Efficacy and safety of *Carica papaya* leaf extract in the dengue: A systematic review and meta-analysis. *Int J Appl Basic Med Res* 6: 249-54
- Cherian T. 2000. Effect of papaya latex extract on gravid and non-gravid rat uterine preparations in vitro. *J Ethnopharmacol* 70: 205-12
- Chinnappan S, Ramachandrappa VS, Tamilarasu K, Krishnan UM, Pillai AK, Rajendiran S. 2016. Inhibition of Platelet Aggregation by the Leaf Extract of *Carica papaya* During Dengue Infection: An In Vitro Study. *Viral Immunol* 29: 164-8
- Dharmarathna SL, Wickramasinghe S, Waduge RN, Rajapakse RP, Kularatne SA. 2013. Does *Carica papaya* leaf-extract increase the platelet count? An experimental study in a murine model. *Asian Pac J Trop Biomed* 3: 720-4
- Donmez HH, Donmez N, Kisadere I, Undag I. 2019 Protective effect of quercetin on some hematological parameters in rats exposed to cadmium. *Biotech Histochem* 94: 381-86
- Gadhwal AK, Ankit BS, Chahar C, Tantia P, Sirohi P, Agrawal RP. 2016. Effect of *Carica papaya* Leaf Extract Capsule on Platelet Count in Patients of Dengue Fever with Thrombocytopenia. *The Journal of the Association of Physicians of India* 64 22-26
- Halim SZ, Abdullah NR, Afzan1 A, Abdul Rashid BA, Jantan I, Ismail Z. 2011. Study of acute toxicity of *Carica papaya* leaf extract in Sprague Dawley rats. *J. Med. Plant Res* 5: 1867-72
- Hossain N, Kumar PV, Wei YS. 2016. A comparative study of phytochemical content in air dried and lyophilized *Carica papaya* leaves. *International Journal of Green Pharmacy* 10 (4) | 220-27
- Hosseini A, Ghorbani A. 2015. Cancer therapy with phytochemicals: evidence from clinical studies. *Avicenna J Phytomed* 5: 84-97
- Hussain SM, Sohrab MH, Al-Mahmood AK, Shuayb M, Abdullah Al-Mansur MA, Hasan CM. 2017. Clinical use of *Carica papaya* leaf extract in chemotherapy induced thrombocytopaenia. *Int J Clin Exp Med* 10: 3752-56
- Ikram E, Stanley R, Netzel M, Fanning K. 2015. Phytochemicals of papaya and its traditional health and culinary uses - A review. *Journal of Food Composition and Analysis* 41: 201-11
- Indran M, Mahmood AA, Kuppusamy UR. 2008. Protective effect of *Carica papaya* L leaf extract against alcohol induced acute gastric damage and blood oxidative stress in rats. *West Indian Med J.* 57: 323-6

- Ismail Z, Halim SZ, Abdullah N, Afzan A, Abd Rashid B, Jantan I. 2014. Safety Evaluation of Oral Toxicity of *Carica papaya* Linn. Leaves: A Sub-chronic Toxicity Study in Sprague Dawley Rats. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*: 1-10
- Jose M, Sasmi MB, Elsy MI. 2018 Effect of *Carica papaya* Linn. Unripe and Ripe Fruit Pulp Juice in Augmenting Platelet Count in Rats: An Experimental Study. *Journal of Clinical & Diagnostic Research* 12: 8-11
- Julianti T, De Mieri M, Zimmermann S, Ebrahimi SN, Kaiser M, et al. 2014. HPLC-based activity profiling for antiplasmodial compounds in the traditional Indonesian medicinal plant *Carica papaya* L. *J Ethnopharmacol* 155 426-34
- Julianti T, Oufir M, Hamburger M. 2014 Quantification of the antiplasmodial alkaloid carpaine in papaya (*Carica papaya*) leaves. *Planta Med* 80 (13): 1138-42
- Kadir SLA, Yaakob H, Zulkifli RM. 2013 Potential anti-dengue medicinal plants: a review. *J Nat Med* 67: 677-89
- Kanzler C, Haase PT, Schestkova H, Kroh LW. 2016. Antioxidant Properties of Heterocyclic Intermediates of the Maillard Reaction and Structurally Related Compounds. *J Agric Food Chem* 64: 7829-37
- Kitts DD, Chen XM, Jing H. 2012. Demonstration of antioxidant and anti-inflammatory bioactivities from sugar-amino acid maillard reaction products. *J Agric Food Chem* 60: 6718-27
- Kolthoff IM, Sandell EB, Meehan EJ, Bruckenstein S. 1969. *Quantitative Chemical Analysis*. Macmillan, New York, 353.
- Lozano A, Gorinstein S, Espitia-Rangel E, Dávila-Ortiz G, Martinez-Ayala A. 2018. Plant Sources, Extraction Methods, and Uses of Squalene. *International Journal of Agronomy*: 1-13
- Merken HM, Beecher GR. 2000 Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. *J Agric Food Chem* 48: 577-99
- Nugroho A, Heryani H, SueChoi J, Park HJ. 2017. Identification and quantification of flavonoids in *Carica papaya* leaf and peroxynitrite-scavenging activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 7: 208-13
- Odriozola-Serrano I, Aguiló-Aguayo I, Soliva-Fortuny R, Gimeno-Añó V, Martín-Belloso O. 2007. Lycopene, Vitamin C, and Antioxidant Capacity of Tomato Juice as Affected by High-Intensity Pulsed Electric Fields Critical Parameters. *Journal of agricultural and food chemistry* 55. : 9036-42
- Osato JA, Santiago LA, Remo GM, Cuadra MS, Mori A. 1993. Antimicrobial and antioxidant activities of unripe papaya. *Life Sci* 53: 1383-9
- Pandey S, Cabot PJ, Shaw PN, Hewavitharana AK. 2016. Anti-inflammatory and immunomodulatory properties of *Carica papaya*. *J Immunotoxicol.* 13(590-602

- Peñarrieta M, Alvarado J, Akesson B, Bergenståhl B. 2007. Separation of phenolic compounds from foods by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Revista Bolivia Quimica* 24: 1-4
- Pénicaud C, Broyart B, Goujot D, Courel M, Meyer X, Bonazzi C. 2011. Coupling between heat and mass transfer and stoichiometric models to bring insight into Maillard reaction kinetics during baking of sponge-cake products
- Peter JK, Kumar Y, Pandey P, Masih H. 2014. Antibacterial activity of seed and leaf extract of *Carica papaya* var. Pusa dwarf Linn. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences* 9: 29-37
- Pierre S, Crosbie L, Duttaroy AK. 2005 Inhibitory effect of aqueous extracts of some herbs on human platelet aggregation in vitro. *Platelets* 16: 469-73
- Pietta PG. 2000. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 63: 1035-42
- Roberta R, Nicoletta P, Anna P, Ananth P, Catherine RE. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26: 1231-37
- Saraf M, Kavimandan B. 2017. Animal Trials of *Carica Papaya* Leaf Extracts for Increasing Platelet Count. *Indian Journal of Public Health Research and Development* 8 (4): 782-87
- Sarala N, Paknikar S. 2014. Papaya extract to treat dengue: a novel therapeutic option? *Ann Med Health Sci Res* 4: 320-4
- Selvakumar K, Bavithra S, Suganya S, Ahmad Bhat F, Krishnamoorthy G, Arunakaran J. 2013. Effect of Quercetin on Haematobiochemical and Histological Changes in the Liver of Polychlorinated Biphenyls-Induced Adult Male Wistar Rats. *Journal of Biomarkers* 2013: 1-12
- Senthilvel P, Lavanya P, Kumar KM, Swetha R, Anitha P, et al. 2013. Flavonoid from *Carica papaya* inhibits NS2B-NS3 protease and prevents Dengue 2 viral assembly. *Bioinformation* 9: 889-95
- Shamsa F, Monsef H, Ghamooshi R, Verdian-rizi M. 2008. Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. *Thai J. Pharm. Sci.* 32: 17-20
- Sharma OP, Bhat TK. 2009. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry* 113: 1202-05
- Siddik ZH, Boxall FE, Harrap KR. 1987. Haematological toxicity of carboplatin in rats. *Br. J. Cancer* 55: 375-79
- Singleton VL, Rossi JA. 1965 Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic.* 16: 144-58

- Speek AJ, Schrijver J, Schreurs WHP. 1985. Vitamin E Composition of Some Seed Oils as Determined by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorometric Detection. *Journal of Food Science* 50
- Subenthiran S, Choon TC, Cheong KC, Thayan R, Teck MB, et al. 2013. Carica papaya Leaves Juice Significantly Accelerates the Rate of Increase in Platelet Count among Patients with Dengue Fever and Dengue Haemorrhagic Fever. *Evid Based Complement Alternat Med eCAM*, 2013, 616737. <http://doi.org/10.1155/2013/616737>
- Sundarmurthy D, Jayanthi C, R, , Lakshmaiah K, C,. 2017. Effect of Carica papaya leaf extract on platelet count in chemotherapy-induced thrombocytopenic patients: A preliminary study. *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology* 7: 685-92
- Sunmathi D, Sivakumar R. 2018. In vitro Anti-inflammatory and Antiarthritic activity of ethanolic leaf extract of *Alternanthera sessilis* (L.) R.BR. ex DC and *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. *International journal of advances in pharmacy, biology and chemistry* 5: 109-15
- Takara K, Otsuka K, Wada K, Iwasaki H, Yamashita M. 2007. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Radical Scavenging Activity and Tyrosinase Inhibitory Effects of Constituents of Sugarcane Molasses. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 71: 183-91
- Tarkang PA, Agbor GA, Armelle TD, Yamthe TLR, David K, Ngadema YSM. 2012. Acute and Chronic Toxicity Studies of the aqueous and ethanol leaf extracts of *Carica papaya* Linn in Wistar rats. *J. Nat. Prod. Plant Resour.* 2: 617-27
- Vinholt PJ, Mads Nybo M, Nielsen CB, Hvas AM. 2017. Light transmission aggregometry using pre-coated microtiter plates and a Victor X5 plate reader. *PlosOne*
- Xu XR, Carrim N, Neves M, McKeown T, Stratton T, et al. 2016. Platelets and platelet adhesion molecules: Novel mechanisms of thrombosis and anti-thrombotic therapies. *Thrombosis Journal* 14: 29
- Zhao L, Chen J, Su J, Li L, Hu S, et al. 2013 In vitro antioxidant and antiproliferative activities of 5-hydroxymethylfurfural. *J Agric Food Chem* 61
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry* 64: 555-59
- Zunjar V, Dash RP, Jivrajani M, Trivedi B, Nivsarkar M. 2016 Antithrombocytopenic activity of carpaiane and alkaloidal extract of *Carica papaya* Linn. leaves in busulfan induced thrombocytopenic Wistar rats. *J Ethnopharmacol* 181: 20-25