583.96
W743
ว 2

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

ใบกะเพรากับมะเร็ง (1) : "ฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่น"

28 ต.ค. 2543

"The leaf of *Ocimum sanctum* and cancer (1) : The antioxidative effect"

งบประมาณรายได้ประจำปี 2543
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ผศ. พรรณี หนูซื่อตรง
ผศ.ดร.ภญ. รุ้งตะวัน สุภาพผล
ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

h # 151743 ว.2

สารบัญเรื่อง

สารบัญเรื่อง 2

สารบัญตาราง 4

สารบัญภาพ 5

กิตติกรรมประกาศ 6

บทคัดย่อ (ภาษาไทย) 7

บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ) 8

บทนำ 9

- ความสำคัญและที่มาของปัญหา 9
- วัตถุประสงค์ 9
- ขอบเขตการวิจัย 9
- ผลที่คาดว่าจะได้รับ 10

การทบทวนวรรณกรรม 11

- สารอนุมูลอิสระ 11
- ลักษณะทั่วไปของกะเพรา 12
- ส่วนประกอบของกะเพรา 13
- การใช้ในยาพื้นบ้าน 13
- ฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ 14
- ประโยชน์ต่อการฉายรังสี 15
- ความปลอดภัยในการบริโภคกะเพรา 16

ระเบียบวิธีวิจัย 18

- ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง 18
- สถานที่ทำการวิจัย 18

- ระยะเวลาดำเนินการวิจัย 18
- เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย 18
- วัสดุและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ 19
- สารเคมี 19
- วิธีดำเนินการวิจัย 20

ผลการวิจัยและอภิปรายผล 23
- การสกัดใบกะเพรา 23
- DPPH assay 24
- Antioxidant activity 38

บทสรุป 41

ข้อเสนอแนะ 42

บรรณานุกรม 43

สารบัญตาราง

ตาราง 1 แสดงข้อมูลการใช้สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นมาตรฐานคือ BHT ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH (n = 3) 25

ตาราง 2 แสดงข้อมูลการใช้สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นมาตรฐานคือ วิตามินซีในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH (n = 3) 27

ตาราง 3 แสดงข้อมูลการใช้สารสกัด hexane จากใบกะเพรา ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH (n = 3) 29

ตาราง 4 แสดงข้อมูลการใช้สารสกัด chloroform จากใบกะเพรา ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH (n = 3) 31

ตาราง 5 แสดงข้อมูลการใช้สารสกัด ethanol จากใบกะเพรา ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH (n = 3) 33

ตาราง 6 แสดงข้อมูลการใช้สารสกัดน้ำจากใบกะเพรา ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH (n = 3) 35

ตาราง 7 แสดงข้อมูล antioxidant activity ของสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นมาตรฐานและสารสกัดใบกะเพราชนิดต่าง ๆ 40

สารบัญภาพ

ภาพ 1 แสดงลักษณะโดยทั่วไปของต้นกะเพรา 12

ภาพ 2 กราฟแสดงการใช้สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นมาตรฐานคือ BHT ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH (n = 3) 26

ภาพ 3 กราฟแสดงการใช้สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นมาตรฐานคือวิตามินซี ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH (n = 3) 28

ภาพ 4 กราฟแสดงการใช้สารสารสกัดกะเพราจาก hexane ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH (n = 3) 30

ภาพ 5 กราฟแสดงการใช้สารสารสกัดกะเพราจาก chloroform ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH (n = 3) 32

ภาพ 6 กราฟแสดงการใช้สารสารสกัดกะเพราจาก ethanol ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH (n = 3) 34

ภาพ 7 กราฟแสดงการใช้สารสารสกัดกะเพราจากน้ำ ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH (n = 3) 36

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

คณะผู้วิจัยขอแสดงความขอบพระคุณเป็นอย่างสูงต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้ให้โอกาสคณะผู้วิจัยเสนอโครงการวิจัยและได้รับการพิจารณาให้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ในปีงบประมาณ 2543 จำนวน 20,000 บาท (สองหมื่นบาทถ้วน)

คณะผู้วิจัยได้ใช้ความวิริยะอุตสาหะอย่างเต็มที่เพื่อให้การวิจัยในครั้งนี้สำเร็จตรงตามวัตถุประสงค์ที่ได้ขอทุนไว้ และใคร่ขอถือโอกาสนี้แสดงความขอบพระคุณเป็นอย่างสูงต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้

ผศ. พรรณี หนูซื่อตรง
ผศ.ดร.ภญ. รุ้งตะวัน สุภาพผล

บทคัดย่อ

กระเพราเป็นพืชที่จัดได้ว่ามีการนำมาใช้ได้อย่างหลากหลาย แต่เดิมในตำรายาไทยพื้นบ้านมักนำกะเพรามาใช้เพื่อบรรเทาอาการของระบบทางเดินอาหาร รายงานการวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ในระยะหลัง ๆ เริ่มมีการศึกษาผลของกะเพราและสารสกัดจากกะเพราที่มีฤทธิ์ต่อระบบต่าง ๆ ของร่างกาย โดยเฉพาะฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระและประโยชน์ต่อการฉายรังสี

โครงการวิจัยนี้ศึกษาความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารสกัดจากใบกะเพราด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิดคือ hexane chloroform ethanol และน้ำ โดยใช้วิธี DDPH assay และตรวจวัดค่าaxtioxidant activity สารสกัดด้วยน้ำมีค่าความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นได้ดีที่สุด แต่ต่ำกว่าสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นมาตรฐานคือ butylated hydroxytoluene ประมาณ 16 เท่า

Abstract

Ocimum sanctum Linn. was reported as the multi-medicinal plant. The previous suggestion in Thai traditional uses was mostly claimed for gastrointestinal effect. The recently scientific reports showed free radical scavening effect and some benefits to irradiation of this plant and its extracts.

In this project, DPPH assay and antioxidant activity determination were utilized to study the axtioxidant effect of hexane, chloroform, ethanol and water extracts. Water extract possessed highest axtioxidant effect compared with the other fractions. BHT, standard antixidant, showed 16 times approximately higher axtioxidant activity than water extract from the leaves of *Ocimum sanctum* Linn.

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โลกในยุคปัจจุบันกำลังมีความตื่นตัวในเรื่องของสารอนุมูลอิสระ (free radical) เป็นอย่างมาก เชื่อกันว่าสารอนุมูลอิสระมีความเกี่ยวข้องในโรคมากมาย โดยเฉพาะโรคเรื้อรังหลายชนิด ได้แก่ เบาหวาน ไตวาย เป็นต้น แต่ที่กำลังเป็นที่กล่าวขวัญถึงอย่างกว้างขวางคือ มะเร็ง สารอนุมูลอิสระพบมากในอาหารประเภทกรุบกรอบ เช่น บะหมี่กึ่งสำเร็จรูปและอาหารทอดกรอบต่าง ๆ ทั้งที่ผลิตมาจากโรงงานอาหารและประเภทที่ทอดกรอบขายริมถนน เนื่องจากใช้น้ำมันซ้ำแล้วซ้ำเล่า ซึ่งเราคงปฏิเสธไม่ได้ว่าโลกปัจจุบันมีอาหารและขนมเหล่านี้แพร่หลายอยู่เป็นจำนวนมาก

สารอนุมูลอิสระและปฏิกิริยาออกซิเดชันไว้มากพอสมควร คณะผู้วิจัยจึงขอนำเสนอสรุปสาระสำคัญของเภสัชวิทยาของกะเพราต่อระบบต่าง ๆ ของร่างกายซึ่งอาจดูหลากหลายไปบ้าง แต่หากพิจารณาไปถึงต้นตอหรือสาเหตุของพยาธิสภาพต่าง ๆ เช่น ความเครียด การอักเสบ มะเร็ง การฉายรังสี ไขมันในหลอดเลือด เบาหวาน เหล่านี้ล้วนมีสารอนุมูลอิสระเข้าไปเกี่ยวข้องทั้งสิ้น

คณะผู้วิจัยจึงเกิดแนวความคิดในการนำกะเพราสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย โดยเฉพาะกะเพราขาวซึ่งมีขายอยู่มากในตลาดสดแถบต่าง ๆ ของกรุงเทพฯ จึงทำให้มีผู้บริโภคในชีวิตประจำวันกันมาก มาศึกษาความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระเพื่อเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภคและเป็นพื้นฐานของการวิจัยกะเพราในระดับสูงต่อไป

วัตถุประสงค์

(1) ศึกษาความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารสกัดจากใบกะเพรา

(2) ศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารสกัดจากตัวทำละลาย 4 ชนิดของใบกะเพรา

ขอบเขตการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ทำการศึกษาในห้องปฏิบัติการทั้งหมด โดยใช้สารสกัดจากใบกะเพราทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดชั่นในหลอดทดลอง

ผลที่คาดว่าจะได้รับ

(1) ยืนยันได้ว่าสารสกัดจากใบกะเพรามีประโยชน์ต่อสุขภาพในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นจริงหรือไม่

(2) สามารถให้บริการความรู้แก่ประชาชนผู้บริโภคใบกะเพรา

(3) เป็นพื้นฐานการวิจัยฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นและต้านสารอนุมูลอิสระของสารจากใบกะเพราในระดับสูงต่อไป

การทบทวนวรรณกรรม

สารอนุมูลอิสระ

ปัจจุบันสมมุติฐานในการเกิดอนุมูลอิสระที่นำไปสู่การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นและนำไปสู่พยาธิสภาพของโรคต่าง ๆ ได้รับการยอมรับอย่างแพร่หลายและมีการวิจัยกันอย่างต่อเนื่อง อนุมูลอิสระสามารถทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลชนิดต่าง ๆ ในร่างกายได้จำนวนมาก ก่อให้เกิดโรคภัยไข้เจ็บหลายชนิด ปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) คือ ทำให้สารที่ถูกอนุมูลอิสระเข้าทำปฏิกิริยาเสื่อมสภาพไปและสร้างสารอนุมูลอิสระใหม่ ไปเร่งให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นและทำลายเนื้อเยื่อข้างเคียงหรือเนื้อเยื่ออื่นอีกต่อไปอย่างควบคุมไม่ได้[1-2]

ปฏิกิริยาที่มีผลเสียต่อร่างกายอย่างมากคือ การทำให้เกิดพันธะที่ผิดปกติของ DNA มีการทำลายโปรตีน ไขมัน และสารชีวโมเลกุลอื่น ๆ เกิดความเสียหายมากมายตามมาได้แก่ การบาดเจ็บของเซลล์ การแก่ (aging) และโรคภัยได้หลากหลายชนิด เช่น artherosclerosis เบาหวาน มะเร็ง เป็นต้น ปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของอนุมูลอิสระมักจะเกิดกับไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์หรือเยื่อหุ้ม organelles ภายในเซลล์ที่เรียกกันว่า lipid peroxidation[1-2]

ปกติร่างกายจะมีระบบหรือกระบวนการควบคุมและทำลายสารอนุมูลอิสระ ได้แก่ superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase และ glutathione ทำหน้าที่ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นและกำจัดอนุมูลอิสระได้ จึงทำให้เราทุกคนไม่เกิดโรคเมื่อได้รับสารในกลุ่มอนุมูลอิสระเข้าสู่ร่างกาย หากร่างกายได้รับอนุมูลอิสระจำนวนมากจนระบบนี้ไม่สามารถควบคุมอนุมูลอิสระได้ หรือระบบต้านออกซิเดชั่นของอนุมูลอิสระเสื่อมสภาพไปเอง ก็อาจทำให้เกิดโรคดังกล่าวได้[1-2]

ในระยะหลังเริ่มมีผู้สนใจศึกษาความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระกันมากขึ้น เนื่องจากอาหารยุคปัจจุบันมีสารอนุมูลอิสระปนเปื้อนมาเป็นจำนวนมากขึ้นเรื่อย ๆ โดยเฉพาะในอาหารประเภทกรุบกรอบทั้งที่มาจากโรงงานและขายเป็นอาหารสดทั่วไป อาหารที่ใช้น้ำมันทอดโดยเฉพาะที่ใช้น้ำมันเก่า ๆ ทอดซ้ำติดต่อกันหลายครั้ง เช่น ปาท่องโก๋ เป็นต้น

คณะผู้วิจัยมีความสนใจในการศึกษาสารที่ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นจากพืชสมุนไพรเป็นอย่างมาก โดยมีแนวความคิดว่าหากสามารถพบฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระในพืชที่มีราคาไม่แพงนัก ก็จะเป็นประโยชน์อย่างสูงต่อผู้บริโภค และหากเป็นสมุนไพรในครัวเรือนที่มีการบริโภคกันอย่างแพร่หลายอยู่แล้วก็น่าจะมีความปลอดภัยในระดับหนึ่ง และผู้บริโภคก็จะมีความมั่นใจอีกด้วย

ลักษณะทั่วไปของกะเพรา

กะเพรามีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า *Ocimum tenuiflorum* Linn หรือ *Ocimum sanctum* Linn อาจเรียกชื่อตามท้องถิ่นได้หลายชื่อ เช่น กอมก้อ กอมก้อดง กะเพราขาว กะเพราแดง เป็นต้น เป็นไม้ล้มลุก มีลักษณะเป็นพุ่มสูง 1-3 ฟุต ใบเดี่ยวออกตรงข้าม ขอบใบหยักเป็นฟันเลื่อย ลำต้นและใบมีขนอ่อน ใบมีกลิ่นหอมฉุนเฉพาะ ดอกมีลักษณะเป็นดอกช่อ ออกรอบข้อเป็นชั้น ๆ เมื่อผสมในยาไทยมีรสเผ็ดร้อน[3-4]

กะเพราในประเทศไทยพบอยู่ 3 สายพันธุ์ คือ (1) กะเพราขาว มีใบและกิ่งก้านเป็นสีเขียวอ่อน (2) กะเพราแดง มีใบและกิ่งก้านเป็นสีเขียวแกมม่วงแดง หรือแดงคล้ำ นิยมใช้กะเพราแดงมาเป็นยามากกว่ากะเพราขาว และ (3) กะเพราลูกผสมระหว่างกะเพราแดงกะเพราขาว[3]

กะเพรา

ภาพ 1 แสดงลักษณะโดยทั่วไปของต้นกะเพรา[3]

ประเทศในแถบเอเชียเช่น ประเทศไทย และประเทศอินเดีย มีการนำกะเพรามาใช้เป็นเครื่องเทศกันมาเป็นเวลานานแล้ว ตำรายาพื้นบ้านไทยหลายอย่างก็มีกะเพราเป็นส่วนประกอบอยู่ การนำกะเพรามาใช้เป็นยามีทั้งในรูปสดและตากแห้ง[3]

ส่วนประกอบของกะเพรา

กะเพรามีน้ำมันหลายชนิดเป็นส่วนประกอบ ทั้งน้ำมันชนิดธรรมดาที่ไม่ระเหย (fixed oil) และน้ำมันหอมระเหย (volatile oil)[3] ในรายงานฉบับนี้จะกล่าวถึงน้ำมันจากกะเพราไว้มากพอสมควร โดยผู้เขียนใช้คำว่าน้ำมันซึ่งจะหมายถึงน้ำมันจากกะเพราชนิดที่ไม่ระเหย

ผลจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง gas liquid chromatography แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า น้ำมันจากต้นกะเพราประกอบด้วยสารในกลุ่ม triglycerides และกรดไขมันหลักอีกถึง 5 ชนิด คือ stearic acid, palmitic acid, oleic acid, linoleic acid และ linolenic acid[5]

สำหรับน้ำมันหอมระเหยในใบกะเพรามีอยู่ประมาณ 0.35 % ประกอบด้วยสารสำคัญหลายชนิด คือ camphor, cined, eugenol, limonene, pinene, sabinene, terpineol, ocimol, linalool และกรดอินทรีย์อีกหลายชนิด[3]

ปัจจุบันมีรายงานการวิจัยฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของกะเพราต่อระบบต่าง ๆ ของร่างกายออกมาอย่างต่อเนื่อง จนเกิดคำกล่าวที่ว่า กะเพรามีคุณสมบัติเป็น multi-medicinal properties คือมีประสิทธิภาพในการเป็นยาได้อย่างหลากหลาย[6] ในลำดับต่อจากนี้ผู้เขียนจึงใคร่ขอนำเสนอสรุปเป็นสาระสำคัญของรายงานการวิจัยฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของกะเพรานับตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันไว้พอเป็นสังเขป

การใช้ในยาพื้นบ้าน

ฤทธิ์ส่วนใหญ่ของกะเพราจากภูมิปัญญาชาวบ้านในตำรายาพื้นบ้านไทยมักจะเกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหาร ใช้เป็นยาตั้งธาตุ แก้ปวดท้อง ท้องขึ้น จุกเสียดในท้อง ขับลม ลดอาการท้องอืดเฟ้อ เป็นต้น วิธีใช้ให้นำใบสดและยอด 1 กำมือ ซึ่งจะมีน้ำหนักสดประมาณ 25 กรัม หรือคิดเป็นน้ำหนักแห้ง 4 กรัม ต้มเอาส่วนน้ำมาดื่ม หรือใช้ใบสดมาแกงเลียงให้สตรีหลังคลอดบุตรรับประทาน หรืออาจใช้ใบสดขยี้ทาบริเวณท้องเด็กอ่อนเพื่อลดอาการท้องอืดท้องเฟ้อ[3-4]

ฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ

สารสกัดจากกะเพรามีความสามารถในด้านการต้านสารอนุมูลอิสระได้หลายประเภท เช่น peroxyl radical ($OOH^{\bullet}$), superoxide amino ($O^{2\bullet-}$) และ hydroxyl radical ($OH^{\bullet}$)[7] เชื่อว่าความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระส่วนหนึ่งมาจากการยับยั้งฤทธิ์ของเอนไซม์ malate dehydrogenase และ malic enzyme ในไมโตคอนเดรีย ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ก่อปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชันที่ pH 9.5 และ 6.2 ตามลำดับ[8]

สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นในใบกะเพรามีหลายชนิด เช่น cirsilineol, isothymusin, isothymonin, rosmarinic acid และ eugenol สารเหล่านี้มีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นที่ความเข้มข้นต่ำประมาณ 10 ไมโครโมล่าร์[9]

ปกติสาร flavonoids หลายชนิดมีคุณสมบัติเป็น antioxidant คือสามารถต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นได้ Devi PU และคณะจึงทำการทดสอบความสามารถในการต้านปฏิกิริยา lipid peroxidation อันเกิดจากการฉายรังสีในหนูทดลอง โดยทำการสกัดสาร flavonoids สำคัญ 2 ชนิดจากใบกะเพราคือ orientin และ vicenin พบว่า สาร flavonoid ทั้งสองสามารถยับยั้งปฏิกิริยา lipid peroxidation ในตับได้เท่า ๆ กัน ด้วยความเข้มข้นในขนาดต่ำประมาณ 10-500 ไมโครโมล่าร์ โดยยับยั้งการเกิด hydroxyl radical ที่เกิดจาก Fenton reaction[10] และมีคุณสมบัติเป็น radical scavenger[11, 12]

น้ำมันจากเมล็ดกะเพรามีประสิทธิภาพในการชลอการเกิดมะเร็งและเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของหนูทดลองที่ได้รับสารก่อมะเร็ง กลไกการต้านมะเร็งเชื่อว่าผ่านทางปฏิกิริยาออกซิเดชั่นคือ สามารถควบคุมระดับของ superoxide dismutase, glutathione-S-transferase, catalase, glutathione และสาร metabolite ของกระบวนการ lipid peroxidation คือ malondialdehyde (MDA) ไว้ได้[13]

ในปี ค.ศ. 1991 Balanehru S และ Nagarajan B สกัดสาร ursolic acid จากกะเพรามาทดสอบฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระและปฏิกิริยา lipid peroxidation ซึ่งพบว่ามีค่าสูงถึง 60 % และยืนยันว่าสาร ursolic acid เองไม่มีผลเร่งการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation[14] ในปีต่อมา Balanehru S และ Nagarajan B ดำเนินการค้นคว้าวิจัยต่อไปอีกด้วยการนำสาร ursolic acid มาศึกษาฤทธิ์ลดปฏิกิริยา lipid peroxidation ในตับและ microsome ของหัวใจสัตว์ทดลองที่ได้รับ adriamycin ถึง 13 และ 17 % ตามลำดับ แต่หากใช้ร่วมกับ oleanolic acid ที่สกัดได้จาก *Eugenia jumbolaya* จะลด

กระบวนการ lipid peroxidation ได้สูงถึง 69 % ทำให้ความเป็นพิษต่อหัวใจของ adriamycin ลดลง เพราะปกติ adriamycin มีข้อจำกัดในการใช้คือเป็นพิษต่อหัวใจ เนื่องจากก่อให้เกิดสารอนุมูลอิสระที่มีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์หัวใจ[15]

ประโยชน์ต่อการฉายรังสี

การฉายรังสีแก่สัตว์ทดลองทั้งตัวก่อให้เกิดสารอนุมูลอิสระขึ้นมากมาย ก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไขมัน คือ lipid peroxidation ในตับ คือมี lipid peroxide activity สูงขึ้น สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นหลายชนิดลดลง เช่น glutathione, glutathione transferase, glutathione reductase, glutathione peroxidase และ superoxide dismutase สารอนุมูลอิสระจำนวนมากที่เกิดขึ้นมีผลให้โครโมโซมของเซลล์ไขกระดูกเกิดการแตกหักเป็นจำนวนมาก[11, 16, 17] รายงานวิจัยหลายฉบับยืนยันผลของสารสกัดกะเพราที่ช่วยลดอันตรายอันเกิดจากการฉายรังสีแก่สัตว์ทดลองทั้งตัวได้ในหลายประเด็น คือ

(1) ลดการเกิดกระบวนการ lipid peroxidation อย่างมีนัยสำคัญ สารสกัดด้วยน้ำจากใบกะเพรามีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นที่นับว่าน่าสนใจมากคือ การฉีดสารสกัดด้วยน้ำจากกะเพราเข้าช่องท้องของหนูทดลองในขนาด 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเป็นเวลานานติดต่อกัน 5 วัน ก่อนที่หนูทดลองจะได้รับการฉายรังสี ทำให้กระบวนการ lipid peroxidation ลดลงอย่างมีนัยสำคัญและคืนกลับมาสู่ระดับปกติเร็วกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัดจากกะเพรา รวมทั้งทำให้สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นดังกล่าวมาแล้วยังคงมีระดับปกติ Devi PU และ Ganasoundari A จึงสรุปว่าสารสกัดด้วยน้ำจากกะเพราช่วยป้องกันกระบวนการ lipid peroxidation ที่เกิดจากการฉายรังสีโดยผ่านทาง antioxidant enzymes[16]

(2) ลดความแตกหักเสียหายของโครโมโซม โดยเฉพาะในเซลล์ไขกระดูก[12] สารสกัดจากน้ำจะมีผู้ศึกษากันมากและเห็นผลลดความเสียหายของโครโมโซมอย่างชัดเจน และช่วยให้เซลล์ไขกระดูกของหนูที่ได้รับรังสีมีอัตราการรอดชีวิตมากขึ้น[16, 18]

(3) ลดการเกิดสารอนุมูลอิสระประเภท hydroxyl radical การให้สารสกัดจากกะเพราแก่หนูทดลองที่ได้รับการฉายรังสีจะช่วยให้หนูทดลองฟื้นสภาพได้เร็วกว่าปกติและมีความเสียหายของโครโมโซมน้อยลง ซึ่งคาดว่าน่าจะออกฤทธิ์น่าจะมีกลไกมาจาก free radical scavenging activity[19]

หลักฐานเหล่านี้พอที่จะทำให้ผู้วิจัยจำนวนมากเชื่อได้ว่า สารสกัดจากกะเพราน่าจะมีประโยชน์ในการป้องกันอันตรายจากการฉายรังสีหรือได้รับสารรังสีโดยไม่เจตนา คือช่วยให้สัตว์ทดลองที่ได้รับสาร flavonoids จากกะเพราแล้วฉายรังสี มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่มิได้รับสาร flavonoids จากกะเพรา[11] สารสกัดน้ำของกะเพราในขนาด 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (ซึ่งเป็นขนาดที่น้อยกว่า 1/100 ของ LD50) ให้ผลในการลดอันตรายจากรังสีได้มากกว่าสารสกัดด้วย ethanol ในขนาดเดียวกัน ขนาดดังกล่าวให้ผลการปกป้องสูงสุด แม้จะเพิ่มขนาดมากกว่านี้ก็ไม่เพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันอันตรายจากรังสี ทั้งนี้การให้ทางช่องท้องจะได้ผลดีที่สุด การให้ทางหลอดเลือดหรือฉีดเข้ากล้ามหรือรับประทานจะให้ผลน้อยกว่า[20]

สาร flavonoids สำคัญ 2 ชนิดจากกะเพราคือ orientin และ vicenin ได้รับความสนใจและถูกนำมาศึกษาการป้องกันอันตรายจากการฉายรังสี หากฉีดฉีด orientin และ vicenin ในขนาด 50 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เข้าทางช่องท้องสามารถลดการแตกหักของโครโมโซมได้ในเซลล์ไขกระดูกหนูทดลองที่ได้รับการฉายรังสีอย่างมีนัยสำคัญ โดย vicenin มีประสิทธิภาพสูงกว่า orientin[17] การเพิ่มขนาดของ flavonoid ทั้งสองนี้จะไม่เพิ่มประสิทธิภาพให้มากขึ้น[11]

ผลการวิจัยที่แสดงความสามารถของ orientionและ vicenin ในการลดการแตกหักของโครโมโซม รวมกับความปลอดภัยที่มี effective dose (50 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) และ toxic dose (มากว่า 200 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) กว้างเช่นนี้ทำให้ flavonoid ทั้งสองชนิดได้รับความสนใจในการนำมาใช้ป้องกันรังสีในมนุษย์ได้[17]

ความปลอดภัยในการบริโภคกะเพรา

การศึกษาความปลอดภัยอย่างถูกต้องตามหลักการทางเภสัชวิทยาของกะเพราและสารสกัดจากกะเพรา ยังมิได้มีรายงานไว้อย่างเป็นทางการ แต่มีรายงานไว้ว่าสาร flavonoid สำคัญจากกะเพราที่กล่าวมาแล้ว 2 ชนิด คือ orientin และ vicenin ไม่มีพิษต่อระบบต่าง ๆ ในร่างกาย (systemic toxicity) แม้จะให้ในขนาดสูงถึง 200 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมของหนูทดลอง[11, 17]

เมื่อพิจารณาการใช้กะเพราในชีวิตประจำวันของคนไทย จะเห็นได้ว่ามีการนำมาใช้เป็นเครื่องเทศกันมาช้านาน บุคคลทั่วไปจะบริโภคกะเพราค่อนข้างบ่อย เพราะเป็นส่วนประกอบในอาหารประจำวันอยู่แล้ว ผู้เขียนจึงมีความเห็นว่ากะเพราน่าจะมีความปลอดภัยสูง ผู้บริโภคไม่จำเป็นต้องวิตกกังวลถึงความปลอดภัยดังเช่นที่รับประทานยาแผนปัจจุบันทั่วไป

ระเบียบวิธีวิจัย

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

กะเพราที่นำมาใช้ในโครงการวิจัยนี้ซื้อมาจากตลาดสด 2 ครั้ง โดยเลือกชนิดกะเพราขาว มาทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิดคือ hexane, chloroform, ethanol และน้ำ

สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการของภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
สุขุมวิท 23, กรุงเทพ 10110

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

มกราคม 2544 - กุมภาพันธ์ 2545

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)

เครื่องนึ่งปราศจากเชื้อ (autoclave)

เครื่องประมวลผล (microcomputer)

เครื่องปั่น (centrifuge)

เครื่องระเหยแห้งด้วยความเย็น (freeze-drier)

เครื่องปั่นผสม (vortex)

ตู้อบ (incubator)

ปั๊มสูญญากาศ (vacuum pump)

เครื่องระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำ (rotatory vacuum evaporator)

methanol bath

ตู้เก็บสารเคมีอุณหภูมิต่ำ

วัสดุและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์

autopipette ขนาดต่าง ๆ

pipette tip ขนาดต่าง ๆ

pipette tip rack

eppendorf tube

eppendorf tube rack

glass test tube

glass test tube with screw cap

test tube rack

quartz cuvette

ขวดแก้ว (Duran) ขนาดต่าง ๆ

autoclaved tape

aluminium foil

สารเคมี

กะเพรา

ethanol, (Merck)

chloroform, (Merck)

hexane, (Merck)

DPPH (Sigma)

ethylbenzythiazoline sulphonate (Sigma)

sodium chloride (Merck)

peroxidase (Sigma)

hydrogen peroxide (Sigma)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมผงใบกะเพรา นำกะเพราสดประมาณ 10 กิโลกรัมมาเด็ดเอาแต่ใบไปเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 40 °ซ. ประมาณ 24-30 ชั่วโมง กลับให้ใบกะเพราส่วนต่าง ๆ ขึ้นมาสัมผัสความร้อนในตู้ทุก ๆ 6-10 ชั่วโมง รอจนกะเพราแห้งดี แล้วจึงนำมาบดละเอียดด้วยเครื่องปั่น จะได้ผงใบกะเพราประมาณ 500-800 กรัม การสูญเสียน้ำหนักจำนวนมากเช่นนี้ส่วนใหญ่หายไปกับน้ำที่ระเหยแห้งในขณะอบ บางส่วนหายไปกับลำต้นและติดตามเครื่องปั่น

2. การสกัดใบกะเพรา การสกัดในกะเพราใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิดคือ hexane, chloroform, ethanol และน้ำ ดังต่อไปนี้

2.1 *การสกัดด้วย hexane* นำผงกะเพราที่ทำการบดละเอียดทั้งหมดใส่ลงใน volumetric flask (ชนิดจุกแก้ว) ขนาด 2 ลิตร เติม hexane ประมาณ 1 ลิตร เขย่าให้เข้ากันทุก ๆ 15-20 นาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง กรองแยก hexane filtrate ไปเก็บไว้ นำกากไปแช่ต่อใน hexane อีกครั้งหนึ่งเขย่าให้เข้ากันทุก ๆ 15-20 นาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง กรองแยก hexane filtrate ไปเก็บรวมไว้กับของเดิม นำกากไปแช่ใน hexane ต่อไป ทำเช่นนี้นานประมาณ 3 วัน (หากกรอง filtrate ในตอนเย็นให้นำกากไปแช่ใน hexane ใหม่ค้างคืนในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °ซ. และกรองแยก hexane filtrate ในเวลาเช้า) เก็บรวบรวม hexane filtrate ทั้งหมดไประเหยแห้งในเครื่อง rotatory evaporator จะได้ hexane extract ที่มีลักษณะหนืดสีเขียวเข้ม นำกากไปใช้ในข้อ 2.2

2.2 *การสกัดด้วย chloroform* นำกากผงกะเพราในข้อ 2.1 มาแช่ใน chloroform ทำเช่นเดียวกับข้อ 2.1 แต่เปลี่ยนตัวทำละลายจาก hexane เป็น chloroform หลังจากนำ chloroform filtrate ทั้งหมดไประเหยแห้งในเครื่อง rotatory evaporator จะได้ chloroform extract ที่มีลักษณะข้นหนืดสีเหลืองเข้มคล้ำเล็กน้อย นำกากส่วนนี้ไปผึ่งให้แห้งและใช้ต่อในข้อ 2.3

2.3 *การสกัดด้วย ethanol* นำกากผงกะเพราในข้อ 2.2 มาแช่ต่อใน ethanol ทำเช่นเดียวกับข้อ 2.1 แต่เปลี่ยนตัวทำละลายจาก hexane เป็น ethanol หลังจากนำ ethanol filtrate ทั้งหมดไประเหยแห้งในเครื่อง rotatory evaporator จะได้ ethanol extract ที่มีลักษณะข้นหนืดสีเขียวเข้ม นำกากส่วนนี้ไปผึ่งให้แห้งและใช้ต่อในข้อ 2.4

2.4 *การสกัดด้วยน้ำ* นำกากผงกะเพราในข้อ 2.3 มาแช่ต่อในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ทำเช่นเดียวกับข้อ 2.1 แต่เปลี่ยนตัวทำละลายจาก hexane เป็นน้ำ หลังจากแช่สกัดแล้วนำ water filtrate ทั้งหมดไประเหยแห้งในเครื่อง freezed-drier จะได้ผงแห้งที่มีลักษณะร่วน ไม่หนืด มีสีน้ำตาลเข้ม

3. DPPH ASSAY เป็นการศึกษาว่าสารตัวอย่างมีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นหรือไม่ นำสารสกัดจากใบกะเพราในข้อ 2 มาผสมกับสารอนุมูลอิสระ (คือ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl หรือเรียกสั้น ๆ กันทั่วไปว่า DPPH) เพื่อดูการเข้มจางของสีของสารอนุมูลอิสระ โดยมีขั้นตอนการเตรียมและเปรียบเทียบ blank standard และ sample ดังต่อไปนี้

- ***BLANK*** ผสม DPPH ขนาด 6 x 10^{-5} โมล่าร์ใน ethanol จำนวน 1000 ไมโครลิตร กับ ethanol 1000 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร โดยใช้ ethanol เป็น blank

- ***STANDARD*** ผสม DPPH ขนาด 6 x 10^{-5} โมล่าร์ใน ethanol จำนวน 1000 ไมโครลิตร กับสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นมาตรฐานคือ butylated hydroxy-toluene (BHT) ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 1000 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร โดยใช้ ethanol เป็น blank

- ***SAMPLE*** ผสม DPPH ขนาด 6 x 10^{-5} โมล่าร์ใน ethanol จำนวน 1000 ไมโครลิตร กับสารตัวอย่างคือสารสกัดจากใบกะเพรา (ทดลองและปรับความเข้มข้นให้เหมาะสม) จำนวน 1000 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร โดยใช้ ethanol เป็น blank

- ***การคำนวณ*** นำค่าการดูดกลืนแสงของ blank ลบออกจากค่าการดูดกลืนแสงของสาร BHT และสารสกัดจากะเพรา แล้วคำนวณเป็นค่า % inhibition จากสูตร

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

เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดจากกะเพรา (แกน X) กับ % inhibition (แกน Y) โดยคำนวณค่าเปรียบเทียบความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นที่ความเข้มข้นของสารที่ 50 % inhibition

h 161443
5.2

4. ANTIOXIDANT ACTIVITY เป็นการศึกษาความแรงของสารตัวอย่างในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่น นำสารสกัดจากใบกะเพราในข้อ (2) มาทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่น เพื่อดูว่าสารสกัดจากใบกะเพราสามารถออกฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารเคมีในหลอดทดลองได้ดีมากน้อยเพียงใด โดยมีขั้นตอนการเตรียมและเปรียบเทียบ blank standard และ sample ดังต่อไปนี้

- ***BLANK*** เตรียม ethylbenzythiazoline sulphonate 610 ไมโครโมลต่อลิตรใน phosphate buffer saline, peroxidase 10 ไมโครโมลต่อลิตร และน้ำกลั่น 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วอ่านค่าการดูดกลืนแสงเริ่มแรกที่ 600 นาโนเมตร บันทึกเป็นค่า A1 จากนั้นเติม hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลต่อลิตร ผสมให้เข้ากันดีเป็นเวลา 3 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรอีกครั้งหนึ่ง บันทึกเป็นค่า A2 คำนวณค่า A2-A1 เรียกว่าค่า Δ blank

- ***STANDARD*** เตรียม tetramethylchroman carboxylic acid 200 ไมโครโมลต่อลิตร, ethylbenzythiazoline sulphonate 610 ไมโครโมลต่อลิตรใน phosphate buffer saline และ peroxidase 10 ไมโครโมลต่อลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วอ่านค่าการดูดกลืนแสงเริ่มแรกที่ 600 นาโนเมตร บันทึกเป็นค่า A1 จากนั้นเติม hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลต่อลิตร ผสมให้เข้ากันดีเป็นเวลา 3 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรอีกครั้งหนึ่ง บันทึกเป็นค่า A2 คำนวณค่า A2-A1 เรียกว่าค่า Δ standard

- ***SAMPLE*** เตรียม ethylbenzythiazoline sulphonate 610 ไมโครโมลต่อลิตรใน phosphate buffer saline, peroxidase 10 ไมโครโมลต่อลิตร และสารสกัดจากใบกะเพรา 10-20 ไมโครลิตร แล้วแต่ความเหมาะสม ผสมให้เข้ากันแล้วอ่านค่าการดูดกลืนแสงเริ่มแรกที่ 600 นาโนเมตร บันทึกเป็นค่า A1 จากนั้นเติม hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลต่อลิตร ผสมให้เข้ากันดีเป็นเวลา 3 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรอีกครั้งหนึ่ง บันทึกเป็นค่า A2 คำนวณค่า A2-A1 เรียกว่าค่า Δ sample

- ***การคำนวณ*** นำค่า Δ blank, Δ standard และ Δ sample มาคำนวณหาค่า antioxidant activity ได้ดังนี้

$$\text{factor} = \frac{\text{conc of tetramethylchroman carboxylic acid}}{(\Delta \text{ blank} - \Delta \text{ standard})}$$

$$\text{antioxidant activity} = \text{factor} \times (\Delta \text{ blank} - \Delta \text{ sample})$$

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

การสกัดใบกะเพรา

คณะผู้วิจัยพยายามที่จะทำการวิจัยสมุนไพรในครัวเรือนให้ใกล้เคียงความเป็นจริงมากที่สุด ดังนั้นในโครงการวิจัยนี้จึงเลือกใช้ส่วนใบของกะเพรา เนื่องจากการใช้กะเพราในครัวเรือนของไทยมักใช้ส่วนใบในการประกอบอาหาร

กะเพราที่นำมาใช้ในโครงการวิจัยนี้ซื้อมาจากตลาดสด โดยเลือกชนิดกะเพราขาว เนื่องจากมีจำหน่ายอยู่เป็นส่วนใหญ่ในตลาด จึงเป็นกะเพราที่ผู้ซื้อทั่วไปนำมาบริโภค ซึ่งนับว่าใกล้เคียงกับการนำกะเพราไปใช้จริงในชีวิตประจำวันมากที่สุด

ปกติการสกัดจะใช้ตัวทำละลายที่ไล่ตาม polarity จากค่าต่ำ ๆ ก่อนคือ hexane ตามด้วย chloroform และ ethanol ตามลำดับ โดยจะเลือกใช้น้ำหรือ ethanol เพียงชนิดเดียวเท่านั้นเพราะสารทำละลายทั้งสองมี polarity ใกล้เคียงกัน แต่เนื่องจาก

(1) การทบทวนวรรณกรรมในด้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นที่ผ่านมามีการใช้สารสกัดและน้ำกันมาก คณะผู้วิจัยจึงเลือกใช้ตัวทำละลายทั้งสองชนิด

(2) ผลจากการทดสอบความสามารถในการต้านปฏิกิริยาอกซิเดชั่นในการสกัดครั้งแรกซึ่งคณะผู้วิจัยใช้ตัวทำละลายเพียง 3 ชนิดคือ hexane chloroform และ ethanol ตามลำดับ พบว่า สารสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีค่าสูงคือสารสกัดด้วย ethanol ให้ค่าปฏิกิริยาที่น่าสนใจ ก็อาจเป็นไปได้ว่าอาจมีสารที่มีค่า polarity สูงอื่นอีกที่มีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นได้ดี

(3) สารสกัดด้วย ethanol มีความข้นหนืดสูง การนำไปใช้จะมีปัญหาในเรื่องของความข้นหนืดโดยเฉพาะการนำไปศึกษาวิจัยต่อในการเลี้ยงเซลล์ซึ่งเป็นสิ่งที่หลีกเลี่ยงได้ยากเมื่อต้องการทราบกลไกในระดับเซลล์

คณะผู้วิจัยจึงทำการสกัดใบกะเพราด้วยตัวทำละลายเพิ่มขึ้นอีก 1 ชนิดคือน้ำ ซึ่งจะให้สารสกัดที่เป็นของแข็ง มีลักษณะร่วน สามารถละลายน้ำได้ดี ละลายเข้ากับอาหารเลี้ยงเซลล์ (ซึ่งเป็นโครงการในอนาคต) ได้ง่าย และลดปัญหาในเรื่องของความหนืด ทำให้สามารถเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดน้ำของกะเพราให้มีความเข้มข้นสูงขึ้นได้

DPPH assay

DPPH assay เป็นการวิจัยเบื้องต้นในหลอดทดลองที่อาศัยความสามารถของสารสมุนไพรในการยับยั้งหรือลบสีน้ำเงินของสารอนุมูลอิสระมาตรฐานคือ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) สารที่มีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นหรือต้านสารอนุมูลอิสระสูงจะทำให้สีน้ำเงินของ DPPH จางลงได้มาก ความเข้มจางของสีน้ำเงินนี้วัดได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer เกณฑ์การคำนวณจะเปรียบเทียบค่าความสามารถในการลดการดูดกลืนแสงสีน้ำเงินลงครึ่งหนึ่งหรือเรียกกันว่าเป็นค่า 50 % inhibition หากสารใดมีค่าความเข้มข้นที่ 50 % inhibition ต่ำจะถือว่ามีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นสูง โดยทั่วไปค่าความเข้มข้นที่ 50 % inhibition ที่จัดว่าดีไม่ควรสูงเกิน 100-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าที่สูงกว่านี้ถือว่าให้ผลลบ (negative) การวิจัยในส่วนนี้จะเปรียบเทียบกับสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นมาตรฐานที่รู้จักกันดี คือ วิตามินซี และ BHT[21, 22]

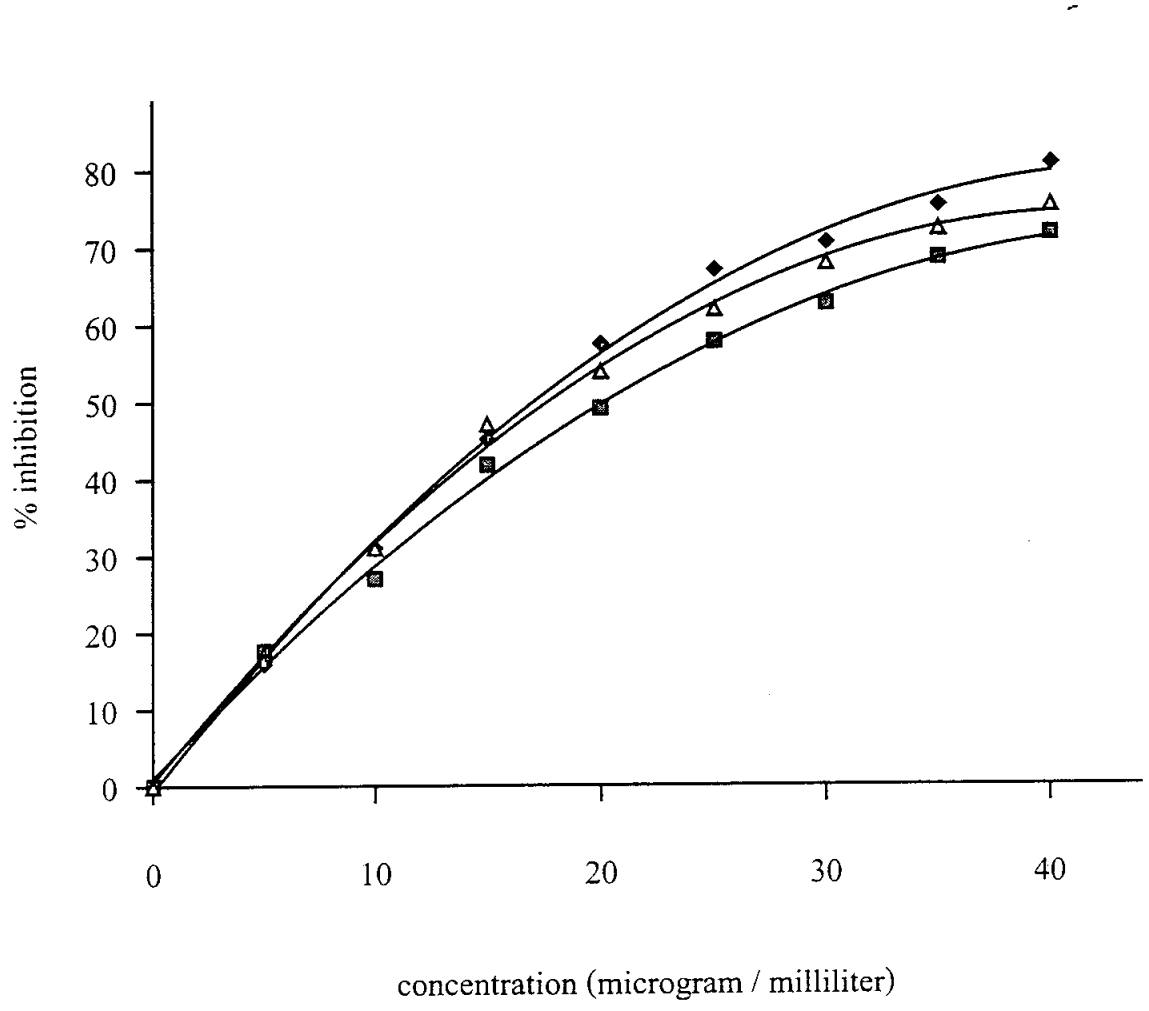
ในการทำ DPPH assay คณะผู้วิจัยได้ทดสอบสารต่าง ๆ จำนวน 6 ชนิดคือ วิตามินซี BHT และสารสกัดจากใบกะเพราอีก 4 ชนิดคือ สารสกัดจาก hexane, chloroform, ethanol และน้ำ ให้ผลดังแสดงเป็นค่า % inhibition ต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

1. Butylated hydroxytoluene (BHT) ก่อนที่จะทำการศึกษาสารตัวอย่าง คณะผู้วิจัยใช้สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นมาตรฐานที่เป็นที่รู้จักกันดี (known antioxidant) คือ BHT ก็พบว่า BHT มีฤทธิ์ลดปริมาณสาร DPPH ได้ดี โดยมีค่า 50 % free radical inhibition ประมาณ 18.31 $\pm$ 1.65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพ 2) ซึ่งใกล้เคียงกับค่า 50 % free radical inhibition ของ BHT ที่อยู่ในช่วงประมาณ 10-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร[21, 22] แสดงว่าระบบการทดสอบการต้านสารอนุมูลอิสระในเบื้องต้นนี้ได้มาตรฐาน สามารถนำไปใช้ทดสอบค่า 50 % free radical inhibition ของสารชนิดอื่น ๆ ได้

การทำ DPPH assay ในแต่ละวันนั้น คณะผู้วิจัยจะใช้ BHT ที่ความเข้มข้นประมาณ 50 % free radical inhibition คือ 18-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจสอบระบบดูว่าสามารถยับยั้งหรือลดค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH ได้ประมาณ 50 % จริงหรือไม่ เพื่อยืนยันว่าระบบที่ใช้ในวันนั้นเหมือนกับทุก ๆ วันที่ผ่านมา ไม่มีความผิดพลาดใด ๆ เกิดขึ้น ค่าที่ได้ในแต่ละวันก็จะนำมาใช้เปรียบเทียบกันได้

ตาราง 1 แสดงข้อมูลการใช้สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นมาตรฐานคือ BHT ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH (n = 3)

ความเข้มข้นของ BHT (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	% inhibition (n = 1)	% inhibition (n = 2)	% inhibition (n = 3)
0	0.00	0.00	0.00
5	15.92	17.59	17.33
10	31.06	27.01	31.02
15	45.12	41.77	47.06
20	57.52	49.15	53.90
25	67.07	57.78	61.93
30	70.58	62.66	67.91
35	75.41	68.56	72.30
40	80.79	71.74	75.40



ภาพ 2 กราฟแสดงการใช้สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นมาตรฐานคือ BHT ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH (n = 3)

ค่า 50 % inhibition ของ n = 1 คือ 17.07 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

n = 2 คือ 20.19 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

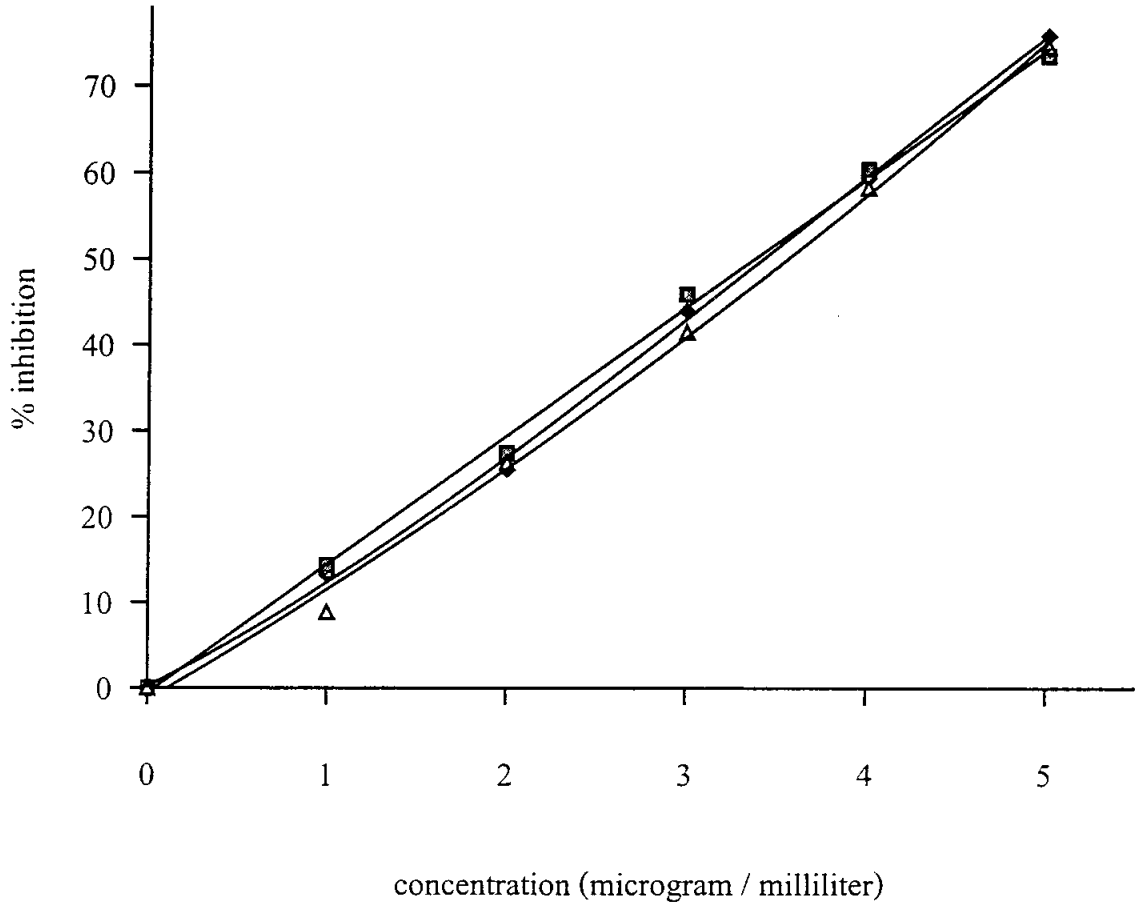
n = 3 คือ 17.68 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ดังนั้น ค่า 50 % inhibition เฉลี่ย คือ 18.31 $\pm$ 1.65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตาราง 2 แสดงข้อมูลการใช้สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นมาตรฐานคือวิตามินซี ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH (n = 3)

ความเข้มข้นของวิตามินซี (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	% inhibition (n = 1)	% inhibition (n = 2)	% inhibition (n = 3)
0	0.00	0.00	0.00
1	13.25	14.35	8.85
2	25.54	27.38	26.32
3	43.97	45.89	41.49
4	59.38	60.35	58.28
5	75.86	73.49	74.60

วิตามินซี (ascorbic acid หรือ vitamin C)



ภาพ 3 กราฟแสดงการใช้สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นมาตรฐานคือวิตามินซี ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH (n = 3)

ค่า 50 % inhibition ของ n = 1 คือ 3.46 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

n = 2 คือ 3.36 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

n = 3 คือ 3.53 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ดังนั้น ค่า 50 % inhibition เฉลี่ย คือ 3.45 ± 0.09 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

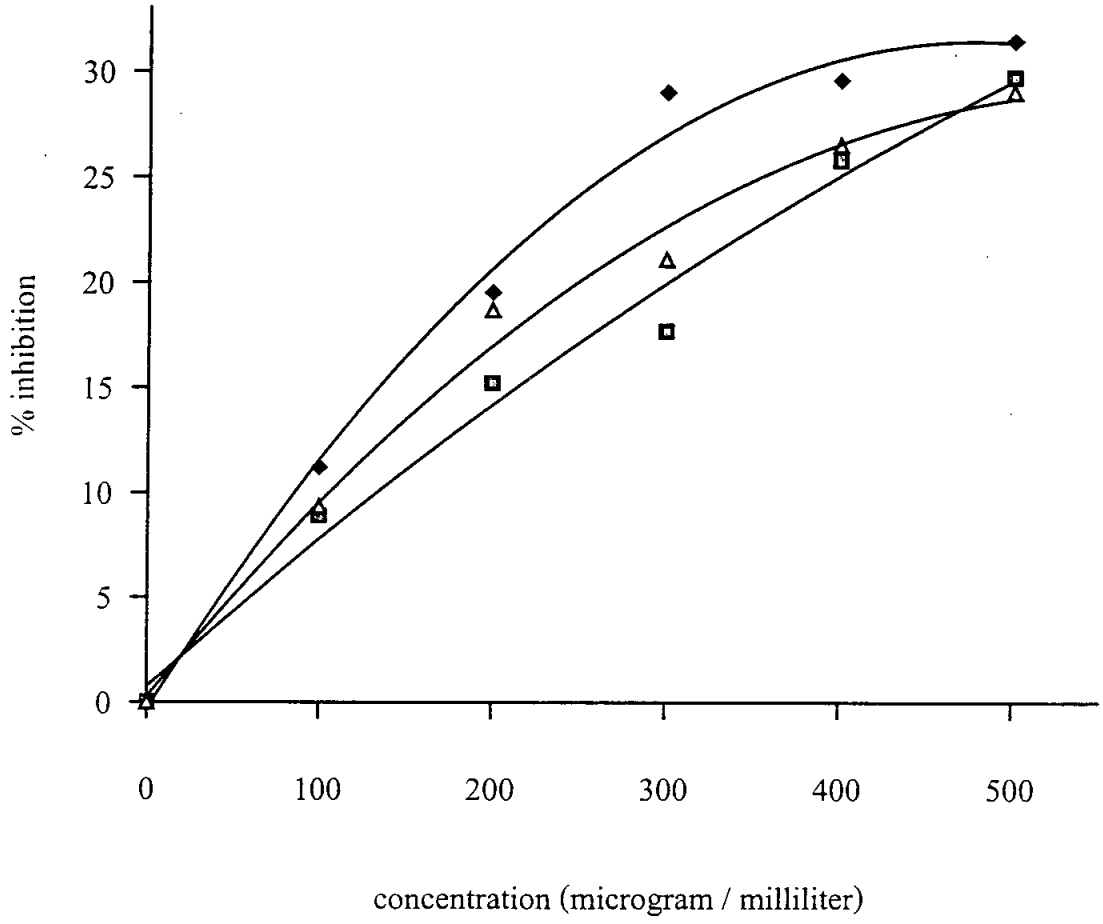
ตาราง 3 แสดงข้อมูลการใช้สารสกัด hexane จากใบกะเพรา ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH (n = 3)

ความเข้มข้นของสารสกัด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	% inhibition (n = 1)	% inhibition (n = 2)	% inhibition (n = 3)
0	0.00	0.00	0.00
100	3.74	1.39	1.42
200	4.74	4.16	4.54
300	5.03	5.55	5.11
400	5.32	5.41	4.68
500	5.75	5.55	5.82

ตาราง 4 แสดงข้อมูลการใช้สารสกัด chloroform จากใบกะเพรา ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH (n = 3)

ความเข้มข้นของสารสกัด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	% inhibition (n = 1)	% inhibition (n = 2)	% inhibition (n = 3)
0	0.00	0.00	0.00
100	11.21	8.89	9.35
200	19.54	15.22	18.69
300	29.02	17.69	21.11
400	29.60	25.79	26.53
500	31.47	29.74	29.05

สารสกัด chloroform จากใบกะเพรา

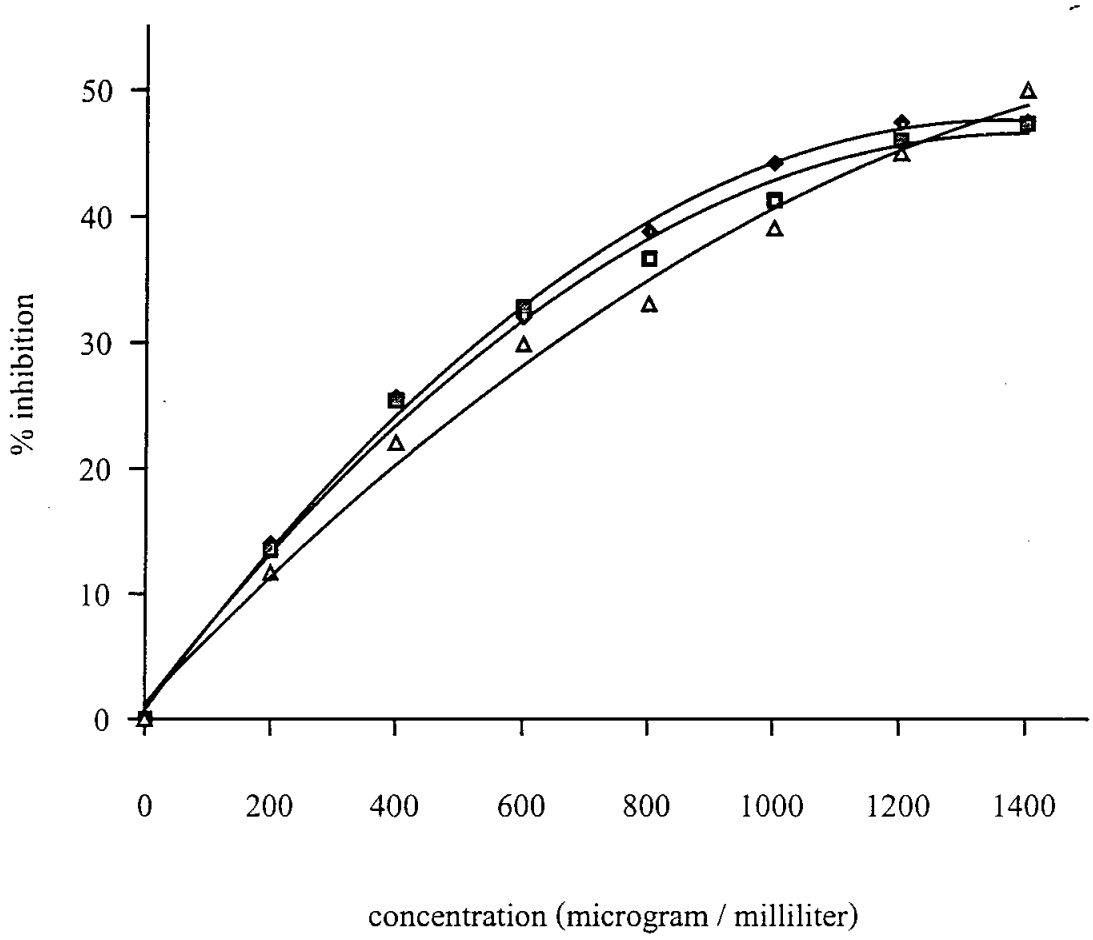


ภาพ 5 กราฟแสดงการใช้สารสกัด chloroform จากใบกะเพรา
ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH (n = 3)
โดยที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
มีค่าความสามารถยับยั้งสารอนุมูลอิสระได้ประมาณ 30 %

ตาราง 5 แสดงข้อมูลการใช้สารสกัด ethanol จากใบกะเพรา ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH (n = 3)

ความเข้มข้นของสารสกัด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	% inhibition (n = 1)	% inhibition (n = 2)	% inhibition (n = 3)
0	0.00	0.00	0.00
200	14.02	13.47	11.70
400	25.67	25.39	22.04
600	32.04	32.78	29.89
800	38.83	36.64	33.09
1000	44.23	41.28	39.10
1200	47.46	46.03	45.03
1400	47.57	47.35	50.00

สารสกัด ethanol จากใบกะเพรา

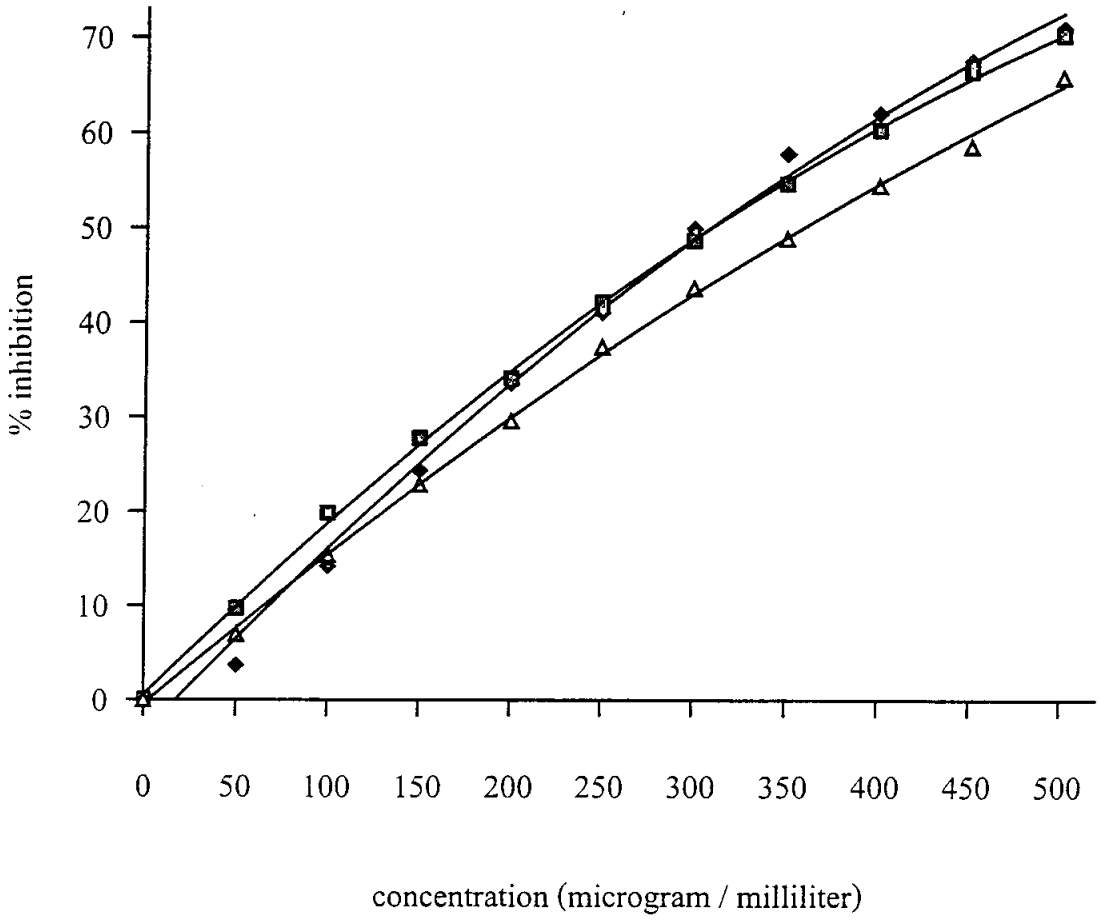


ภาพ 6 กราฟแสดงการใช้สารสกัด ethanol จากใบกะเพรา ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH (n = 3) และจะแสดงค่า 50 % inhibition ที่ความเข้มข้นสูงถึงประมาณ 1,400-1,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตาราง 6 แสดงข้อมูลการใช้สารสกัดน้ำจากใบกะเพรา ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH (n = 3)

ความเข้มข้นของสารสกัด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	% inhibition (n = 1)	% inhibition (n = 2)	% inhibition (n = 3)
0	0.00	0.00	0.00
50	3.70	9.75	6.97
100	14.20	19.82	15.40
150	24.36	27.80	22.85
200	33.60	34.11	29.58
250	41.11	42.19	37.44
300	50.00	48.73	43.68
350	57.85	54.71	48.95
400	62.12	60.35	54.54
450	67.67	66.56	58.67
500	71.13	70.32	65.96

สารสกัดน้ำจากใบกะเพรา



ภาพ 7 กราฟแสดงการใช้สารสกัดน้ำจากใบกะเพรา
ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH (n = 3)

ค่า 50 % inhibition ของ n = 1 คือ 311.62 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
n = 2 คือ 303.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
n = 3 คือ 357.52 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ดังนั้น ค่า 50 % inhibition เฉลี่ย คือ 324.21 $\pm$ 29.13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. วิตามินซี (ascorbic acid) สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นมาตรฐานอีกชนิดหนึ่งที่นำมาใช้ในโครงการวิจัยนี้ คือ วิตามินซี ตาราง 2 และกราฟในภาพ 3 แสดงข้อมูลการยับยั้ง DPPH และค่าความเข้มข้นที่ 50 % inhibition ของวิตามินซีที่มีค่าต่ำมากคือ 3.45 $\pm$ 0.09 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. สารสกัดจาก hexane สารสกัดส่วนนี้จะมี polarity ต่ำที่สุดคือใกล้เคียงกับ hexane ข้อมูลในตาราง 3 และกราฟภาพ 4 แสดงให้เห็นว่า แม้ว่าจะใช้ความเข้มข้นสูงถึง 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรก็ให้ค่า % inhibition ต่ำมากคือ ประมาณ 5 % เท่านั้น สันนิษฐานว่าสารที่มีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นในส่วนนี้มีปริมาณต่ำมากหรือแทบจะไม่มีอยู่เลย

4. สารสกัดจาก chlorofrom สารสกัดส่วนนี้จะมี polarity สูงกว่าสารสกัดจาก hexane ตามค่า polarity ของ chloroform ข้อมูลในตาราง 4 และกราฟภาพ 5 แสดงให้เห็นว่า เช่นเดียวกับสารสกัดจาก hexane คือแม้จะใช้ความเข้มข้นสูงถึง 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรก็ให้ค่า % inhibition ประมาณ 30 % เท่านั้น สารสกัดส่วนนี้น่าจะมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นสูงกว่าสารสกัดจาก hexane แต่ก็ยังถือว่ามีขีดความสามารถอยู่ในระดับต่ำ

5. สารสกัดจาก ethanol สารสกัดส่วนนี้จะมี polarity สูงกว่าสารสกัดจาก chloroform ข้อมูลในตาราง 5 และกราฟภาพ 6 แสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นที่ประมาณ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า % inhibition ประมาณ 30 % เช่นเดียวกับสารสกัดจาก hexane และใช้ความเข้มข้นสูงถึง 1,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจึงจะให้ค่า % inhibition ได้ถึง 50 % ก็นับว่ามีขีดความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิ-เดชั่นอยู่ในระดับต่ำ

6. สารสกัดจากน้ำ สารสกัดส่วนนี้มีสารที่มี polarity สูงมาก จากข้อมูลในตาราง 6 และกราฟภาพ 7 แสดงให้เห็นว่า ค่าความเข้มข้นที่ 50 % inhibition มีค่าต่ำกว่าทุก ๆ fraction ที่ผ่านมา คือใช้ความเข้มข้นเพียง 324.21 $\pm$ 29.13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยความเข้มข้นของสารสกัดน้ำที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิ-ลิตร ให้ค่า % inhibition ได้ประมาณ 70 % จึงถือเป็น fraction ที่มีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นที่แรงที่สุดแม้ว่าจะใช้ความเข้มข้นที่ 50 % inhibition สูงกว่า 200 ไมโคร-กรัมต่อมิลลิลิตรก็ตาม แต่เนื่องจากเป็นสารสกัดก็อาจพออนุโลมว่าให้ผล positive ได้ในอนาคต หากสามารถสกัดสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นจากสารสกัด

น้ำจากใบกะเพรา แล้วนำมาทดสอบ DPPH assay ก็คาดว่าอาจจะให้สารที่มีค่า 50 % inhibition ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรได้

ANTIOXIDANT ACTIVITY

เมื่อการศึกษาใน DPPH assay ให้ผลบวก (positive) แล้ว ก็จะนำมาศึกษาต่อว่าสารสกัดมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นได้มากน้อยเท่าใด การวิจัยส่วนนี้ดูความสามารถของสารสกัดจากใบกะเพราในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นที่ก่อให้เกิดสารอนุมูลอิสระสีน้ำเงินหรือฟ้าอมเขียวที่คงตัวขึ้นในหลอดทดลอง สารใดมีความสามารถต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นดีจะเกิดสารอนุมูลอิสระได้น้อย สีของสารอนุมูลอิสระมีสีน้ำเงินอมเขียวจะจางหรือไม่เข้ม เมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer จะมีค่าการดูดกลืนแสงต่ำ ดังนั้นเมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงมาเข้าสูตรคำนวณจะให้ค่า antioxidant activity สูง[36]

ค่า antioxidant activity ในตาราง 7 แสดงให้เห็นว่า ผลจาก DPPH assay สอดคล้องกับค่า antioxidant activity กล่าวคือ เมื่อเปรียบเทียบที่ค่าความเข้มข้นเดียวกันที่ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า ค่า antioxidant activity ของสารสกัด hexane มีค่า 0.009 $\pm$ 0.015 ต่ำสุดหรือกล่าวได้ว่าแทบจะไม่มีเลย ลำดับต่อมาเป็นสารสกัดจาก chloroform ethanol และน้ำ ตามลำดับ โดยสารสกัดน้ำมีค่า antioxidant activity สูงสุดคือ 1.052 $\pm$ 0.020 มิลลิโมลต่อลิตร เมื่อทดลองเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดน้ำเป็น 300 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า ค่า antioxidant activity เพิ่มขึ้นเป็น 1.642 $\pm$ 0.033 และ 1.956 $\pm$ 0.023 มิลลิโมลต่อลิตร ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบความสามารถของสารสกัดน้ำในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นกับ BHT จะเห็นได้ว่าที่ค่า antioxidant activity เท่า ๆ กันคือ ประมาณ 1.6-1.7 มิลลิโมลต่อลิตร BHT ใช้ความเข้มข้นเพียง 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่สารสกัดน้ำจากใบกะเพราใช้ความเข้มข้นสูงกว่าคือ ประมาณ 16 เท่าของ BHT หรือต้องใช้ถึงมากกว่า 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เล็กน้อย หรืออีกนัยหนึ่งก็คือ BHT มีความแรงในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นเป็น 16 เท่าของสารสกัดน้ำจากใบกะเพรา

ครั้นเมื่อพิจารณาย้อนกลับไปที่ DPPH assay จะเห็นได้ว่า ค่าความเข้มข้นที่ 50 % inhibition ของสารสกัดน้ำจากใบกะเพรามีค่า 324.21 $\pm$ 29.13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสูงประมาณ 16-17 เท่าของค่าความเข้มข้นที่ 50 % inhibition ของ BHT

ที่ใช้เพียง 18.31 ± 1.65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือกล่าวได้ว่าการทดสอบทั้ง 2 protocol ให้ผลหรือมีแนวโน้มเช่นเดียวกันคือ สารมาตรฐาน BHT มีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นสูงเป็น 16 เท่าของสารสกัดน้ำจากใบกะเพรา

ตาราง 7 แสดงข้อมูลค่า antioxidant activity ของสารสกัดจากใบกะเพรา fraction ต่าง ๆ เปรียบเทียบกับสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นมาตรฐาน

ชนิดของสารสกัดจากใบกะเพรา	ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	antioxidant activity (มิลลิโมลต่อลิตร)				
		n = 1	n = 2	n = 3	เฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
BHT	20	1.692	1.787	1.798	1.759	0.058
สารสกัดน้ำ	600	1.967	1.930	1.972	1.956	0.023
	300	1.666	1.656	1.604	1.642	0.033
	150	1.030	1.061	1.066	1.052	0.020
สารสกัด ethanol	150	0.875	0.792	0.818	0.828	0.042
สารสกัด chloroform	150	0.461	0.492	0.471	0.474	0.016
สารสกัด hexane	150	0.000	0.026	0.000	0.009	0.015

บทสรุป

ผลจากการวิจัยสารสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วต่าง ๆ กันด้วยวิธี DPPH assay และวิเคราะห์ความแรงของ antioxidant activity สามารถสรุปได้ว่า

(1) สารสกัดจากใบกะเพราด้วยน้ำมีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นได้ดีที่สุด เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH assay คือให้ค่าความเข้มข้นที่ 50 % inhibition ต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดอื่น ๆ คือ 324.21 $\pm$ 29.13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จึงสามารถสันนิษฐานในเบื้องต้นได้ว่า สารที่มีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นในกะเพราเป็นสารที่มีค่า polarity สูง และสูงใกล้เคียงกับน้ำ แต่มีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นต่ำกว่าสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นมาตรฐานคือ BHT

(2) สารสกัดจากใบกะเพราด้วยน้ำมีค่า antioxidant activity สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากใบกะเพราด้วยตัวทำละลายอื่น ๆ คือ ethanol chloroform และ hexane โดยแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเจน แต่อย่างไรก็ตาม สารสกัดทุก fraction จากใบกะเพรามีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นต่ำกว่าสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นมาตรฐานคือ BHT

(3) สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นในใบกะเพราควรเป็นสารประเภทมีขั้ว (polar)

(4) การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นด้วยวิธี DPPH assay และตรวจวัดค่า antioxidant activity ให้ผลสอดคล้องกันมากคือ สารสกัดน้ำจากใบกะเพรามีค่าความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นได้สูงสุด แต่จะต่ำกว่า BHT โดย BHT มีความแรงในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นสูงเป็น 16 เท่าของของสารสกัดน้ำจากใบกะเพรา

ข้อเสนอแนะ

การวิจัยสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นจากใบกะเพราควรจะดำเนินต่อไปในระดับที่สูงขึ้นด้วยเหตุผล 2 ประการ คือ มีรายงานการวิจัยยืนยันความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นในแง่มุมต่าง ๆ ไว้มากพอสมควร[9-20] เหตุผลอีกประการหนึ่งก็คือผลการวิจัยในโครงการนี้แสดงให้เห็นในเบื้องต้นว่า ในใบกะเพราน่าจะมีสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นอยู่อย่างแน่นอน ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงขอเสนอแนะแนวทางการทำวิจัยสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่จากใบกะเพราในอนาคตไว้ดังต่อไปนี้

(1) สกัดสารบริสุทธิ์หรือกึ่งบริสุทธิ์จากกะเพรา และนำมาทดสอบฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นด้วยวิธี DPPH assay และวัดความแรงของ antioxidant activity การวิจัยในส่วนนี้มีประโยชน์ 2 ประการ คือ (1) เป็นการศึกษาสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่น ซึ่งอาจนำไปสู่การสังเคราะห์สารให้มีความสามารถต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นสูงขึ้นกว่าสารเริ่มต้นที่พบในใบกะเพรา (2) ศึกษาเปรียบเทียบความสามารถต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ เพื่อประโยชน์ในการกำหนดขนาด (dose) ที่เหมาะสมในการรับประทานสารสกัดเพื่อให้ได้ฤทธิ์เท่ากับสารบริสุทธิ์

(2) ศึกษาความสามารถในการลดปริมาณสารอนุมูลอิสระใน model ต่าง ๆ เช่น การกระตุ้นด้วยไฟฟ้า และการฉายรังสีต่อเซลล์ เพื่อยืนยันว่าสารสกัดจากใบกะเพรามีฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระได้โดยตรงจริง ก่อนที่จะดำเนินการศึกษากลไกในระดับเซลล์และระดับโมเลกุลต่อไป

บรรณานุกรม

1. Basu TK, Temple NJ and Garg. Antioxidant in Human Health and Disease. CABI Publishing, 1999.

2. Punchard NA and Kelly FJ. Free Radicals. IRL press, 1996.

3. ยาสมุนไพรสำหรับงานสาธารณสุขมูลฐาน โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก พ.ศ. 2537

4. เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ เอกสารประกอบการประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่องการแพทย์แผนไทยกับโรคเรื้อรัง วันที่ 15-17 สิงหาคม 2544 ตึกสำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข

5. Singh S, Majumdar DK and Yadav MR. Chemical and pharmacological studies on fixed oil of *Ocimum sanctum*. Indian J Exp Biol 1996 ; 34 : 1212-5.

6. Karthikeyan K, Ravichandran P and Govindasamy S. Chemopreventive effect of *Ocimum sanctum* on DMBA-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. Oral Oncol 1999 ; 35 : 112-9.

7. Maulik G, Maulik N, Bhandari V, Kagan VE, Pakrashi S and Das DK. Evaluation of antioxidant effectiveness of a few herbal plants. Free Radic Res 1997 ; 27 : 221-8.

8. Banu MJ, Nellaiappan K and Dhandayuthapani S. Mitochondrial malate dehydrogenase and malic enzyme of a filarial worm *Setaria digitata* : some properties and effects of drugs and herbal extracts. Jph J Med Sci Biol 1992 ; 45 : 137-50.

9. Kelm MA, Nair MG, Strasburg GM and DeWitt DL. Antioxidant and cyclooxygenase inhibitory phenolic compounds from *Ocimum sanctum* Linn. Phytomedicine 2000 ; 7 : 7-13.

10. Devi PU, Ganasoundari A, Vrinda B, Srinivasan KK and Unnikrishnan MK. Radiation protection by the ocimum flavonoids orientin and vicenin : mechanisms of action. Radiat Res 2000 ; 154 : 455-60.

11. Devi PU, Ganasoundari A, Rao BS and Srinivasan KK. In vivo radioprotection by ocimum flavonoids : survival of mice. Radiat Res 1999 ; 151 : 74-8.

12. Ganasoundari A, Devi PU and Rao BS. Enhancement of bone marrow radioprotection and reduction of WR-2721 toxicity by *Ocimum sanctum*. Mutat Res 1998 ; 397 : 303-12.

13. Prakash J and Gupta SK. Chemopreventive activity of *Ocimum sanctum* seed oil. J Ethnopharmacol 2000 ; 72 : 29-34.

14. Balanehru S and Nagarajan B. Protective effect of oleanolic acid and ursolic acid against lipid peroxidation. Biochem Int 1991 ; 24 : 981-90.

15. Balanehru S and Nagarajan B. Intervention of adriamycin induced free radical damage. Biochem Int 1992 ; 28 : 735-44.

16. Devi PU and Ganasoundari A. Modulation of glutathione and antioxidant enzymes by *Ocimum sanctum* and its role in protection against radiation injury. Indian J Exp Biol 1999 ; 37 : 262-8.

17. Devi PU, Bisht KS and Vinitha M. A comparative study of radioprotection by Ocimum flavonoids and synthetic aminothiol protectors in the mouse. Br J Radiol 1998 ; 71 : 782-4.

18. Ganasoundari A, Zare SM and Devi PU. Modification of bone marrow radio-sensensitivity by medicinal plant extracts. Br J Radiol 1997 ; 70 : 599-602.

19. Ganasoundari A, Devi PU and Rao MN. Protection against radiation-induced chromosome damage in mouse bone marrow by *Ocimum sanctum*. Mutat Res 1997 ; 373 : 271-6.

20. Devi PU and Ganasoundari A. Radioprotective effect of leaf extract of Indian medicinal plant *Ocimum sanctum*. Indian J Exp Biol 1995 ; 33 : 205-8.

21. Hatano, T., Edamatsu, R., Hiramatsu, M., Mori, A., Fujita, Y., Yasuhara, T., Yoshida, T. and Okuda, T. 1989. Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. Chem Pharm Bull 1989 ; 37 : 2016-21.

22. Yamasaki, K., Hashimoto, A., Kokusenya, Y., Miyamoto, T., Sato, T. Electro-chemical method for estimating the antioxidative effects of methanol extracts of crude drugs. Chem Pharm Bull 1994 ; 42 : 1663-1665.

23. Wang M, Shao Y, Li J, Zhu N, Rangarajan, LaVoie EJ and Ho CT. Antioxidative phenolic glycosides from sage (*Salvia officinalis*). J Nat Med Prod 1999 ; 62 : 454-6.