

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

นมผึ้งกับมะเร็ง (2) : “ฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน”

“Royal jelly and cancers (2) :
The antioxidative effect”

งบประมาณเงินรายได้ประจำปี 2543
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ผศ.ดร.ภญ. รุ่งตะวัน สุภาพผล

ผศ. พรรณี หนูชื่อตรง

ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

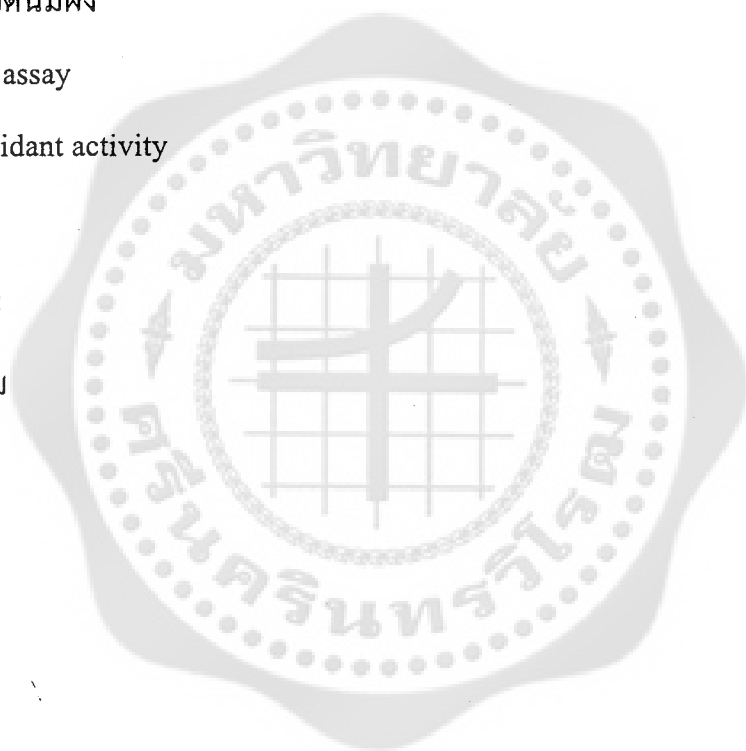
ผศ.นพ. อธิคม สุภาพผล

ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

สารบัญเรื่อง

สารบัญเรื่อง	2
สารบัญตาราง	4
สารบัญภาพ	5
กิตติกรรมประกาศ	6
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	7
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	8
เอกสารตอบรับการนำเสนอโครงการวิจัยแบบบรรยาย	9
บทนำ	10
- ความสำคัญและที่มาของปัญหา	10
- วัตถุประสงค์	10
- ขอบเขตการวิจัย	11
- ผลที่คาดว่าจะได้รับ	11
การทบทวนวรรณกรรม	12
- ลักษณะทั่วไป	12
- ส่วนประกอบของนมผึ้ง	12
-ฤทธิ์อื่นไม่พึงประสงค์ของนมผึ้ง	13
- สารอนุมูลอิสระ	13
- ฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ	14
- คำแนะนำในการบริโภคนมผึ้ง	15
ระเบียบวิธีวิจัย	16
- ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง	16

- สถานที่ทำการวิจัย	16
- ระยะเวลาดำเนินการวิจัย	16
- เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	16
- วัสดุและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์	17
- สารเคมี	17
- วิธีดำเนินการวิจัย	18
ผลการวิจัยและอภิปรายผล	21
- การสกัดนมผึ้ง	21
- DPPH assay	21
- Antioxidant activity	33
บทสรุป	36
ข้อเสนอแนะ	37
บรรณานุกรม	38



สารบัญตาราง

ตาราง 1	แสดงข้อมูลการใช้สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐานคือ BHT ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH (n = 3)	23
ตาราง 2	แสดงข้อมูลการใช้สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐานคือ วิตามินซีในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH (n = 3)	25
ตาราง 3	แสดงข้อมูลการใช้สารสกัด chloroform จากนมผึ้ง ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH (n = 3)	27
ตาราง 4	แสดงข้อมูลการใช้สารสกัด ethanol จากนมผึ้ง ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH (n = 3)	29
ตาราง 5	แสดงข้อมูลการใช้สารสกัดน้ำจากนมผึ้ง ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH (n = 3)	31
ตาราง 6	แสดงข้อมูลเปรียบเทียบผลการศึกษาด้าน ปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากนมผึ้งด้วยวิธี DPPH assay และค่า antioxidant activity	34

สารบัญภาพ

ภาพ 1	กราฟแสดงการใช้สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐานคือ BHT ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH ($n = 3$)	24
ภาพ 2	กราฟแสดงการใช้สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐานคือวิตามินซี ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH ($n = 3$)	26
ภาพ 3	กราฟแสดงการใช้สารสกัดนมผึ้งจาก chloroform ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH ($n = 3$)	28
ภาพ 4	กราฟแสดงการใช้สารสกัดนมผึ้งจาก ethanol ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH ($n = 3$)	30
ภาพ 5	กราฟแสดงการใช้สารสกัดนมผึ้งจากน้ำ ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH ($n = 3$)	32

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

คณะผู้วิจัยขอแสดงความขอบพระคุณเป็นอย่างสูงต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทร-
วิโรฒ ที่ได้ให้โอกาสคณะผู้วิจัยเสนอโครงการวิจัยและได้รับการพิจารณาให้รับทุน
อุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ในปีงบประมาณ 2543 จำนวน 50,000
บาท (ห้าหมื่นบาทถ้วน)

คณะผู้วิจัยได้ใช้ความวิริยะอุตสาหะอย่างเต็มที่เพื่อให้การวิจัยในครั้งนี้สำเร็จ
ตรงตามวัตถุประสงค์ที่ได้ขอทุนไว้ และใคร่ขอถือโอกาสนี้แสดงความขอบพระคุณ
เป็นอย่างสูงต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้

ผศ.ดร.ภญ. รุ่งตะวัน สุภาพผล
ผศ. พรรณี หนูชื่อตรง
ผศ.นพ. อธิคม สุภาพผล

บทคัดย่อ

นมผึ้งเป็นสารธรรมชาติที่ผลิตจากต่อม hypopharyngeal และต่อมน้ำลายของผึ้งงานเพื่อเป็นอาหารอันทรงคุณค่าของผึ้งนางพญาตลอดชีวิต รายงานหลายฉบับกล่าวถึงคุณประโยชน์ของนมผึ้งไว้ในหลาย ๆ ด้านเช่นฤทธิ์การต้านมะเร็ง ลดไขมันในเส้นเลือด และต้านแบคทีเรีย เป็นต้น มุมมองใหม่ของนมผึ้งคือฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการตรวจสอบฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันเบื้องต้นของนมผึ้งด้วยวิธี DPPH assay และวัดค่า antioxidant activity วิธี DPPH assay แสดงให้เห็นว่าค่าความเข้มข้นที่ 50 % inhibition ของสารสกัดนมผึ้งด้วยคลอโรฟอร์ม เอทานอล และน้ำ มีค่าอยู่ที่ 5.38 ± 0.08 , 3.86 ± 0.07 และ 2.98 ± 0.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อวัดค่า antioxidant activity ของของสารสกัดนมผึ้งด้วยคลอโรฟอร์ม เอทานอล และน้ำ ที่ความเข้มข้น 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีค่า 0.20 ± 0.01 , 0.24 ± 0.01 และ 0.36 ± 0.04 มิลลิโมลต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งสามารถบ่งชี้ในเบื้องต้นได้ว่านมผึ้งน่าจะมีคุณสมบัติต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้

Abstract

The worker honey bee produces royal jelly in its hypopharyngeal and mandibular glands as an essential food for queen bee. Royal jelly is fed for her entire life. Many reports have been made regarding the benefits of royal jelly, antitumor, antihyperlipidemia, and antibacterial activities. The new approach was an antioxidant. This research aimed to preliminarily investigate antioxidant activity of royal jelly by DPPH assay and antioxidant activity determination. In DPPH assay, the chloroform, ethanol and water extracts showed concentration of 50 % inhibition at 5.38 ± 0.08 , 3.86 ± 0.07 and 2.98 ± 0.13 mg/ml, respectively. The total antioxidant activity of chloroform, ethanol and water extracts at 160 μ g/ml were 0.20 ± 0.01 , 0.24 ± 0.01 and 0.36 ± 0.04 mmol/l, respectively. These findings indicate the possibility of royal jelly to contain antioxidant activity.

**** บทความคัดย่อดังกล่าวนี้ได้รับการยอมรับให้เสนอผลงานแบบบรรยายในการประชุมวิชาการสตรีวิทยา ประจำปี 2545 ณ โรงแรมโกลเด้น แชนด์ จังหวัดเพชรบุรี ในวันที่ 8-10 พฤษภาคม 2545 โดยใช้ชื่อเรื่องว่า “**THE NEW APPROACH OF ROYAL JELLY AS AN ANTIOXIDANT**” รายละเอียดตามความในเอกสารตอบรับหน้า 9

ใบตอบรับการเสนอผลงานวิชาการ
การประชุมวิชาการสตรีวิทยาประจำปี ครั้งที่ 31
วันที่ 8 – 10 พฤษภาคม 2545
ณ โรงแรม โกลเด้นแจนซ์ อำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี

ชื่อเรื่อง The new approach of royal jelly as an antioxidant.
ชื่อผู้วิจัย Roongtawan Supabphol, Athikom Supabphol, Punnee Nusuetrong.

ผู้นำเสนอผลงาน ผศ. ดร. รุ่งตะวัน สุภาพผล

เสนอผลงานแบบ บรรยาย



(รศ. สุวรรณ ชีระวรพันธ์)

ประธานคณะกรรมการฝ่ายวิชาการ

ภาควิชาสตรีวิทยา คณะเภสัชศาสตร์

มหาวิทยาลัยมหิดล

โทร 0-2644-8703

โทรสาร 0-2246-4796

e-mail: pustr@mahidol.ac.th

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โลกในยุคปัจจุบันกำลังมีความตื่นตัวในเรื่องของสารอนุมูลอิสระ (free radical) เป็นอย่างมาก เชื่อกันว่าสารอนุมูลอิสระมีความเกี่ยวข้องกับโรคมามากมาย โดยเฉพาะโรคเรื้อรังหลายชนิด ได้แก่ เบาหวาน ไขมัน เป็นต้น แต่ที่กำลังเป็นที่กล่าวขวัญถึงอย่างกว้างขวางคือ มะเร็ง สารอนุมูลอิสระพบมากในอาหารประเภทกรอบกรอบ เช่น ระเบิดที่สำเร็จรูปและอาหารทอดกรอบต่าง ๆ ทั้งที่ผลิตมาจากโรงงานอาหารและประเภทที่ทอดกรอบขายริมถนน เนื่องจากใช้น้ำมันซ้ำแล้วซ้ำเล่า ซึ่งเราคงปฏิเสธไม่ได้ว่าโลกปัจจุบันมีอาหารและขนมเหล่านี้แพร่หลายอยู่เป็นจำนวนมาก

สารอนุมูลอิสระและปฏิกิริยาออกซิเดชันไว้มากพอสมควร คณะผู้วิจัยจึงขอเสนอสรุปสาระสำคัญของเภสัชวิทยาของกะเพราต่อระบบต่าง ๆ ของร่างกายซึ่งอาจหลากหลายไปบ้าง แต่หากพิจารณาไปถึงต้นตอหรือสาเหตุของพยาธิสภาพต่าง ๆ เช่น ความเครียด การอักเสบ มะเร็ง การฉายรังสี ไขมันในหลอดเลือด เบาหวาน เหล่านี้ล้วนมีสารอนุมูลอิสระเข้าไปเกี่ยวข้องทั้งสิ้น

ปัจจุบันมีการนำนมผึ้งมาใช้เป็นอาหารเสริมกันอย่างแพร่หลาย โดยที่ยังไม่มีหลักฐานการวิจัยทางการแพทย์อย่างแน่ชัด เพียงแต่อาศัยหลักการที่ว่าผึ้งงานนำนมผึ้งมาเลี้ยงผึ้งนางพญาตลอดชีวิต ทำให้ผึ้งนางพญามีคุณสมบัติพิเศษมาก ๆ ต่างจากผึ้งงานทั่วไปที่มีโอกาสได้รับนมผึ้งเพียง 3 วันแรกของชีวิตเท่านั้น แต่หลักฐานทางการแพทย์สำหรับนมผึ้งถือได้ว่ายังน้อยมาก โดยเฉพาะความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน คณะผู้วิจัยจึงเกิดแนวความคิดในการนำนมผึ้งที่ผลิตในประเทศไทยมาศึกษาความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระ เพื่อเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภค และเป็นพื้นฐานของการวิจัยนมผึ้งในระดับสูงต่อไป

วัตถุประสงค์

- (1) ศึกษาความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากนมผึ้ง
- (2) ศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากตัวทำละลาย 4 ชนิดของนมผึ้ง

ขอบเขตการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ทำการศึกษาในห้องปฏิบัติการทั้งหมด โดยใช้สารสกัดจากนมผึ้งทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดชันในหลอดทดลอง

ผลที่คาดว่าจะได้รับ

- (1) ยืนยันได้ว่า สารสกัดจากนมผึ้งมีประโยชน์ต่อสุขภาพในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันจริงหรือไม่
- (2) สามารถให้บริการความรู้แก่ประชาชนผู้บริโภคนมผึ้ง
- (3) เป็นพื้นฐานการวิจัยฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันและด้านสารอนุมูลอิสระของสารจากนมผึ้งในระดับสูงต่อไป



การทบทวนวรรณกรรม

ลักษณะทั่วไปของนมผึ้ง

นมผึ้งจัดเป็นหนึ่งในอาหารเสริมบำรุงสุขภาพ (healthy food) หลาย ๆ ชนิดที่มีการค้นคว้าวิจัยกันอย่างต่อเนื่องตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน⁽¹⁻⁴⁾ นมผึ้ง (royal jelly) มีลักษณะเป็นครีมเหลว ข้น สีขาวนวล รสฝาด และเผ็ดเล็กน้อย สร้างมาจากต่อมใต้คอหอย (hypopharyngeal gland) และต่อมน้ำลายใต้ขากรรไกร (mandibular salivary gland) ของผึ้งงานที่มีอายุเฉลี่ยประมาณ 5-15 วัน ที่เรียกว่า ผึ้งพยาบาล ผึ้งงานใช้นมผึ้งเลี้ยงตัวอ่อนของผึ้งนางพญาจนเติบโตไปตลอดชีวิต⁽⁵⁻⁸⁾

แม้ว่าประสิทธิภาพของนมผึ้งจะไม่ได้ได้รับการยืนยันอย่างเป็นทางการจากวงการแพทย์ก็ตาม อีกทั้งกลไกการออกฤทธิ์ก็ยังไม่เป็นที่ทราบกันอย่างชัดเจน แต่เนื่องจากการที่นมผึ้งถูกนำมาใช้เลี้ยงตัวอ่อนของผึ้งนางพญา ทำให้ผึ้งนางพญามีลักษณะที่โดดเด่นกว่าผึ้งวรรณะอื่น เช่น ขนาดโตกว่า สวยงามกว่า อายุยืนนานกว่าผึ้งทั่วไป 10-20 เท่า สามารถออกไข่ในวันหนึ่ง ๆ ได้มากถึง 2,000 ฟอง เป็นเวลาติดต่อกันทุกวัน นานประมาณ 10 เดือนใน 1 ปี ผลต่าง ๆ เหล่านี้ทำให้นมผึ้งถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ทั้งที่รับประทานเป็นอาหารเสริม (supplement food) บำรุงร่างกาย (health tonic) ตลอดจนนำมาผสมในเครื่องสำอางผิวพรรณ⁽⁵⁻⁸⁾

ส่วนประกอบของนมผึ้ง

ส่วนประกอบของนมผึ้งนับได้ว่ามีสารที่เป็นประโยชน์มากมายต่อร่างกาย เช่น คาร์โบไฮเดรต 10-12 % โปรตีน 14-15 % ไขมัน 3-5 % เกลือแร่ และวิตามินหลายชนิด รวมทั้งพบสารสำคัญอีกหลายชนิดเช่น royalisin, acetylcholine, insulin-like peptide, sebatic acid และฮอร์โมนเพศชาย เป็นต้น⁽⁹⁻²²⁾

สารสำคัญชนิดหนึ่งซึ่งมีรายงานมาตั้งแต่อดีตว่า มีความสำคัญที่สุดในนมผึ้งคือ 10-hydroxy-2-decenoic acid สามารถวิเคราะห์ได้โดยการใช้เครื่องมือ high pressure liquid chromatography (HPLC) เป็นสารที่พบเฉพาะในนมผึ้งเท่านั้น ใช้เป็นดัชนีบ่งบอกคุณภาพของนมผึ้ง โดยถือนมผึ้งที่มีคุณภาพดีควรจะต้องมีกรดไขมันนี้อยู่มาก^(9-13, 21, 22)

สารอาหารสำคัญอีกประเภทหนึ่งในนมผึ้งที่มีผู้ศึกษากันไว้ค่อนข้างมากนอกจากกรดไขมันก็คือโปรตีน โปรตีนหลายชนิดในนมผึ้งได้รับความสนใจจากนักวิจัยมากจนถึงระดับที่มีการ clone ยีนที่สังเคราะห์โปรตีนในนมผึ้งและศึกษาโครงสร้างโดยละเอียดของโปรตีนเหล่านั้น⁽²³⁻²⁹⁾ ปัจจุบันมีการศึกษาโปรตีนในนมผึ้งไว้หลายชนิด ได้แก่ royalisin⁽²⁰⁾, major royal jelly proteins (MRJPs)^(30,31), royal jelly protein-1 (RJP-1)⁽³³⁾ และ neopterin⁽³⁴⁾

ฤทธิ์อันไม่พึงประสงค์ของนมผึ้ง

เนื่องจากนมผึ้งมีโปรตีนเป็นส่วนประกอบอยู่มาก ดังนั้นข้อควรระวังเป็นอย่างยิ่งในการบริโภคนมผึ้งคือเรื่องของอาการแพ้ (allergic reaction) อุบัติการณ์ที่มีรายงานการพบค่อนข้างบ่อยมากของนมผึ้งคือ การเกิดหลอดลมหด (bronchospasm) และอาการหอบหืด (asthma) สันนิษฐานว่าการแพ้จะผ่านกลไกของ IgE-mediated hypersensitivity reaction⁽³⁵⁻⁴⁵⁾

อาการแพ้เป็นฤทธิ์อันไม่พึงประสงค์หลักของนมผึ้ง นอกจากอาการแพ้แล้วยังมีรายงานบางฉบับกล่าวถึงพิษของนมผึ้งไว้แต่น้อยมากเช่น การมีเลือดออกจากอาการลำไส้ใหญ่อักเสบ (haemorrhagic colitis)⁽⁴⁶⁾ ภาวะแพ้อาหารและลำไส้เล็กอักเสบ (gastroenteritis)⁽⁴⁷⁾ เป็นต้น

สารอนุมูลอิสระ

ปัจจุบันสมมุติฐานในการเกิดอนุมูลอิสระที่นำไปสู่การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและนำไปสู่พยาธิสภาพของโรคต่าง ๆ ได้รับการยอมรับอย่างแพร่หลายและมีการวิจัยกันอย่างต่อเนื่อง อนุมูลอิสระสามารถทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลชนิดต่าง ๆ ในร่างกายได้จำนวนมาก ก่อให้เกิดโรคภัยไข้เจ็บหลายชนิด ปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) คือ ทำให้สารที่ถูกอนุมูลอิสระเข้าทำปฏิกิริยาเสื่อมสภาพไปและสร้างสารอนุมูลอิสระใหม่ ไปเร่งให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและทำลายเนื้อเยื่อข้างเคียงหรือเนื้อเยื่ออื่นอีกต่อไปอย่างควบคุมไม่ได้^(48, 49)

ปฏิกิริยาที่มีผลเสียต่อร่างกายอย่างมากคือ การทำให้เกิดพันธะที่ผิดปกติของ DNA มีการทำลายโปรตีน ไขมัน และสารชีวโมเลกุลอื่น ๆ เกิดความเสียหายมากมายตามมาได้แก่ การบาดเจ็บของเซลล์ การแก่ (aging) และโรคภัยได้หลากหลาย

ชนิด เช่น atherosclerosis เบาหวาน มะเร็ง เป็นต้น ปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระมักจะเกิดกับไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์หรือเยื่อหุ้ม organelles ภายในเซลล์ที่เรียกกันว่า lipid peroxidation^(48, 49)

ปกติร่างกายจะมีระบบหรือกระบวนการควบคุมและทำลายสารอนุมูลอิสระ ได้แก่ superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase และ glutathione ทำหน้าที่ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันและกำจัดอนุมูลอิสระได้ จึงทำให้เราทุกคนไม่เกิดโรคเมื่อได้รับสารในกลุ่มอนุมูลอิสระเข้าสู่ร่างกาย หากร่างกายได้รับอนุมูลอิสระจำนวนมากจนระบบนี้ไม่สามารถควบคุมอนุมูลอิสระได้ หรือระบบต้านออกซิเดชันของอนุมูลอิสระเสื่อมสภาพไปเอง ก็อาจทำให้เกิดโรสดังกล่าวได้^(48, 49)

ในระยะหลังเริ่มมีผู้สนใจศึกษาความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระกันมากขึ้น เนื่องจากอาหารยุคปัจจุบันมีสารอนุมูลอิสระปนเปื้อนมาเป็นจำนวนมากขึ้นเรื่อย ๆ โดยเฉพาะในอาหารประเภทกรูบกรอบทั้งที่มาจากโรงงานและขายเป็นอาหารสดทั่วไป อาหารที่ใช้น้ำมันทอดโดยเฉพาะที่ใช้น้ำมันเก่า ๆ ทอดซ้ำติดต่อกันหลายครั้ง เช่น ปาท่องโก๋ เป็นต้น

ฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ

การศึกษาฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของนมผงได้รับความสนใจในระยะหลัง ๆ เริ่มตั้งแต่ปี ค.ศ. 1998 อย่างไรก็ตามรายงานการวิจัยในส่วนนี้ถือว่ายังมีอยู่น้อยมาก ในปี ค.ศ. 1998 มีการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของนมผงในการยับยั้งการเกิด lipid peroxides ในเซลล์กล้ามเนื้อลายพบว่า เกิดจากการเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระคือ superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) และ glutathione peroxidase⁽⁵⁰⁾ ต่อมาในปี ค.ศ. 1999 Hamerlinck FF รายงานว่า นมผงมีโปรตีนสำคัญชนิดหนึ่งคือ neopterin ซึ่งมีบทบาทเป็น chain breaking antioxidant⁽³⁴⁾

ในปี ค.ศ. 2001 มีรายงานที่กล่าวเป็นนัยของนมผงในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันถึง 3 ฉบับคือ นมผงสามารถเพิ่มปริมาณของ glutathione ในเซลล์ macrophage⁽⁵¹⁾ อาจมีฤทธิ์ทางใดทางหนึ่งในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน เช่น superoxide anion scavenging activity หรือมีคุณสมบัติเป็น prooxidant และ antioxidant ได้⁽¹⁾ รวมทั้งสรุปว่านมผงมีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีกว่าผลิตภัณฑ์เสริมอาหารอีกหลาย ๆ ชนิดแม้จะได้รับความร้อนสูงก็ตาม⁽⁵²⁾

คำแนะนำในการบริโภคนมผง

นมผงยังคงเป็นอาหารเสริมที่มีอยู่ในท้องตลาดประเทศไทย และมีผู้นิยมบริโภคกันมาก ก่อนอื่นต้องทำความเข้าใจก่อนว่านมผงมีโปรตีนเป็นส่วนประกอบอยู่พอสมควร และการรับประทานโปรตีนหรือทาผิวด้วยผลิตภัณฑ์ใด ๆ ก็ตามที่มีโปรตีนเป็นส่วนประกอบอาจก่อให้เกิดอาการแพ้ได้ ดังนั้นผู้บริโภคบางรายจึงอาจเกิดการแพ้ได้ ปฏิกริยาตอบสนองต่อการแพ้จะรุนแรงแตกต่างกันออกไปแล้วแต่บุคคล มีตั้งแต่เพียงผื่นคัน หรือมากขึ้นเรื่อย ๆ ไปจนถึงหลอดลมหดและเกิดอาการช็อคได้ รายงานการเสียชีวิตของผู้ป่วยเกิดจากการใช้ผลิตภัณฑ์นมผงชนิดฉีดยารับประทานไม่ทำให้เกิดอาการแพ้ที่รุนแรงหรือแก้ไขไม่ได้ แต่หากมองโดยภาพรวมก็ถือว่ามียเปอร์เซ็นต์ต่ำมาก สำหรับรายงานความเป็นพิษในด้านอื่นถือว่าน้อยมาก ๆ

การบริโภคนมผงด้วยวิธีรับประทานในขนาดไม่มากนัก เช่น ครั้งละ 1-2 แคปซูล (แคปซูลละประมาณ 350 มิลลิกรัม) วันละ 1-2 ครั้ง จึงน่าจะปลอดภัยในระดับหนึ่ง หากเกิดอาการแพ้ให้หยุดรับประทานทันที สำหรับผู้ที่มีโรคประจำตัวอยู่ (โดยเฉพาะอาการภูมิแพ้) ควรต้องระมัดระวังการบริโภคนมผงมากกว่าปกติ หากมีความประสงค์จะรับประทานนมผงจริง ๆ ก็ควรเริ่มต้นจากขนาดต่ำ ๆ ก่อน เช่น วันละ 1 แคปซูล เป็นต้น

ระเบียบวิธีวิจัย

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

นมผงที่นำมาใช้ในโครงการวิจัยนี้ซื้อมาจาก โดยเลือกชนิด มาทำการสกัด ด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิดคือ hexane, chloroform, ethanol และน้ำ

สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการของภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
สุขุมวิท 23, กรุงเทพฯ 10110

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

มกราคม 2544 - กุมภาพันธ์ 2545

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
เครื่องนึ่งปราศจากเชื้อ (autoclave)
เครื่องประมวลผล (microcomputer)
เครื่องปั่น (centrifuge)
เครื่องระเหยแห้งด้วยความเย็น (freeze-drier)
เครื่องปั่นผสม (vortex)
ตู้อบ (incubator)
ปั๊มสุญญากาศ (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

นมผึ้ง
ethanol, (Merck)
chloroform, (Merck)
hexane, (Merck)
DPPH, (Sigma)
ethylbenzothiazoline sulphonate, (Sigma)
sodium chloride, (Merck)
peroxidase, (Sigma)
hydrogen peroxide, (Sigma)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมนมผง นำนมผงสดมาทำให้แห้งด้วยความเย็น (frozen dry) แล้วชั่งนมผงแห้ง 100 กรัม บดเบา ๆ ให้ละเอียดโดยทั่วกัน

2. การสกัดนมผง สกัดนมผงโดยใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิดคือ hexane, chloroform, ethanol และน้ำ เรียงตามลำดับดังต่อไปนี้

2.1 การสกัดด้วย hexane นำนมผงทั้งหมดใส่ลงใน 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 ที่มีลักษณะเป็นก้อนนิ่มสีครีมอ่อน ๆ นำกากไปใช้ในข้อ 2.2

2.2 การสกัดด้วย chloroform นำกากนมผงในข้อ 2.1 มาแช่ใน chloroform ทำเช่นเดียวกับข้อ 2.1 แต่เปลี่ยนตัวทำละลายจาก hexane เป็น chloroform หลังจากนำ chloroform filtrate ทั้งหมดไประเหยแห้งในเครื่อง rotatory evaporator จะได้ chloroform extract ที่มีลักษณะข้นหนืดสีเหลืองอ่อน นำกากส่วนนี้ไปผึ่งให้แห้งและใช้ในข้อ 2.3

2.3 การสกัดด้วย ethanol นำกากนมผงในข้อ 2.2 มาแช่ต่อใน ethanol ทำเช่นเดียวกับข้อ 2.1 แต่เปลี่ยนตัวทำละลายจาก hexane เป็น ethanol หลังจากนำ ethanol filtrate ทั้งหมดไประเหยแห้งในเครื่อง rotatory evaporator จะได้ ethanol extract ที่มีลักษณะข้นหนืดสีเหลือง นำกากส่วนนี้ไปผึ่งให้แห้งและใช้ในข้อ 2.4

2.4 การสกัดด้วยน้ำ นำกากนมผงในข้อ 2.3 มาแช่ต่อในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ทำเช่นเดียวกับข้อ 2.1 แต่เปลี่ยนตัวทำละลายจาก hexane เป็นน้ำ หลังจากแช่สกัดแล้วนำ water filtrate ทั้งหมดไประเหยแห้งในเครื่อง freeze-drier จะได้ผงแห้งที่มีลักษณะร่วน ไม่หนืด มีสีเหลือง

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

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

- **STANDARD** ผสม DPPH ขนาด 6×10^{-5} โมลาร์ใน ethanol จำนวน 1000 ไมโครลิตร กับสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐานคือ 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 6×10^{-5} โมลาร์ใน ethanol จำนวน 1000 ไมโครลิตร กับสารตัวอย่างคือสารสกัดจากนมผึ้ง (ทดลองและปรับความเข้มข้นให้เหมาะสม) จำนวน 1000 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร โดยใช้ ethanol เป็น blank

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

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

เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดจากนมผึ้ง (แกน X) กับ % inhibition (แกน Y) โดยคำนวณค่าเปรียบเทียบความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ความเข้มข้นของสารที่ 50 % inhibition

4. ANTIOXIDANT ACTIVITY เป็นการศึกษาความแรงของสารตัวอย่างในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน นำสารสกัดจากนมผึ้งในข้อ 2 มาทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน เพื่อดูว่าสารสกัดจากนมผึ้งสามารถออกฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารเคมีในหลอดทดลองได้ดีมากน้อยเพียงใด โดยมีขั้นตอนการเตรียมและเปรียบเทียบ blank standard และ sample ดังต่อไปนี้

- **BLANK** เตรียม ethylbenzothiazoline 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, ethylbenzothiazoline 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 ethylbenzothiazoline sulphonate 610 ไมโครโมลต่อลิตรใน phosphate buffer saline, peroxidase 10 ไมโครโมลต่อลิตร และสารสกัดจากนมผง 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

การสกัดนมผึ้ง

นมผึ้งสดมีความคงตัวต่ำ ต้องเก็บไว้ในช่องแช่แข็งตลอดเวลา การนำมาผ่านกระบวนการสกัดที่อุณหภูมิห้องหรืออุณหภูมิ 4 °ซ. นานกว่า 12 ชั่วโมงอาจไม่เหมาะสมเท่าใดนัก คณะผู้วิจัยจึงนำนมผึ้งมาทำให้แห้งก่อนด้วยความเย็น การทำให้แห้งนี้ทำให้น้ำหนักหายไปประมาณสองในสาม แต่นมผึ้งจะมีความคงตัวมากกว่าสามารถนำมาเก็บที่อุณหภูมิห้องหรือเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °ซ. ได้ ซึ่งจะเหมาะต่อการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

ปกติการสกัดจะใช้ตัวทำละลายที่ไล่ตาม polarity จากค่าต่ำ ๆ ก่อนคือ hexane ตามด้วย chloroform และ ethanol ตามลำดับ โดยจะเลือกใช้น้ำหรือ ethanol เพียงชนิดเดียวเท่านั้นเพราะสารทำละลายทั้งสองมี polarity ใกล้เคียงกัน เนื่องจากต้องการทราบความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของ ethanol extract แต่สารสกัดด้วย ethanol มีความข้นหนืดสูง การนำไปใช้จะมีปัญหาในเรื่องของความข้นหนืด โดยเฉพาะการนำไปศึกษาวิจัยต่อในการเลี้ยงเซลล์ซึ่งเป็นสิ่งที่หลีกเลี่ยงได้ยากเมื่อต้องการทราบกลไกในระดับเซลล์

คณะผู้วิจัยจึงทำการสกัดนมผึ้งด้วยตัวทำละลายเพิ่มขึ้นอีก 1 ชนิดคือน้ำ ซึ่งจะให้สารสกัดที่เป็นของแข็ง มีลักษณะร่วน สามารถละลายน้ำได้ดี ละลายเข้ากับอาหารเลี้ยงเซลล์ (ซึ่งเป็นโครงการในอนาคต) ได้ง่าย และลดปัญหาในเรื่องของความข้นหนืด ทำให้สามารถเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดนมผึ้งให้มีความเข้มข้นสูงขึ้นได้

DPPH assay

DPPH assay เป็นการวิจัยเบื้องต้นในหลอดทดลองที่อาศัยความสามารถของสารในการยับยั้งหรือลดสีน้ำเงินของสารอนุมูลอิสระมาตรฐานคือ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) สารที่มีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือต้านสารอนุมูลอิสระสูงจะทำให้สีน้ำเงินของ DPPH จางลงได้มาก ความเข้มจางของสีน้ำเงินนี้วัดได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer เกณฑ์การคำนวณจะเปรียบเทียบค่าความสามารถในการลดการดูดกลืนแสงสีน้ำเงินลงครึ่งหนึ่งหรือเรียกกันว่าเป็นค่า 50 % inhibition หากสารใดมีค่าความเข้มข้นที่ 50 % inhibition ต่ำจะถือว่ามีความสามารถในการ

การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสูง โดยทั่วไปค่าความเข้มข้นที่ 50 % inhibition ที่จัดว่าดีไม่ควรสูงเกิน 100-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าที่สูงกว่านี้ถือว่าให้ผลเป็นลบ (negative) การวิจัยในส่วนนี้จะเปรียบเทียบกับสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐานที่รู้จักกันดี คือ วิตามินซี และ BHT^(53, 54)

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

1. Butylated hydroxytoluene (BHT) ก่อนที่จะทำการศึกษาสารตัวอย่าง คณะผู้วิจัยใช้สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐานที่เป็นที่รู้จักกันดี (known antioxidant) คือ BHT ก็พบว่า BHT มีฤทธิ์ลดปริมาณสาร DPPH ได้ดี โดยมีค่า 50 % free radical inhibition ประมาณ 18.31 ± 1.65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตาราง 1 และภาพ 1) ซึ่งใกล้เคียงกับค่า 50 % free radical inhibition ของ BHT ที่อยู่ในช่วงประมาณ 10-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร^(53, 54) แสดงว่าระบบการทดสอบการต้านสารอนุมูลอิสระในเบื้องต้นนี้ได้มาตรฐาน สามารถนำไปใช้ทดสอบค่า 50 % free radical inhibition ของสารชนิดอื่น ๆ ได้

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

2. วิตามินซี (ascorbic acid) สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐานอีกชนิดหนึ่งก็นำมาใช้ในโครงการวิจัยนี้ คือ วิตามินซี ตาราง 2 และกราฟในภาพ 2 แสดงข้อมูลการยับยั้ง DPPH และค่าความเข้มข้นที่ 50 % inhibition ของวิตามินซีที่มีค่าต่ำมากคือ 3.45 ± 0.09 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. สารสกัดจาก hexane สารสกัดส่วนนี้จะมี polarity ต่ำที่สุดคือใกล้เคียงกับ hexane ผลจากการวิเคราะห์พบว่าสารสกัดจาก hexane ไม่มีผลยับยั้งสีของ DPPH แม้จะใช้ในความเข้มข้นสูงกว่า 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรก็ตาม สันนิษฐานว่าไม่มีสารที่มีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในสารสกัดส่วนนี้

การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสูง โดยทั่วไปค่าความเข้มข้นที่ 50 % inhibition ที่จัดว่าดีไม่ควรสูงเกิน 100-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าที่สูงกว่านี้ถือว่าให้ผลเป็นลบ (negative) การวิจัยในส่วนนี้จะเปรียบเทียบกับสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐานที่รู้จักกันดี คือ วิตามินซี และ BHT^(53, 54)

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

1. Butylated hydroxytoluene (BHT) ก่อนที่จะทำการศึกษาสารตัวอย่าง คณะผู้วิจัยใช้สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐานที่เป็นที่รู้จักกันดี (known antioxidant) คือ BHT ก็พบว่า BHT มีฤทธิ์ลดปริมาณสาร DPPH ได้ดี โดยมีค่า 50 % free radical inhibition ประมาณ 18.31 ± 1.65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตาราง 1 และภาพ 1) ซึ่งใกล้เคียงกับค่า 50 % free radical inhibition ของ BHT ที่อยู่ในช่วงประมาณ 10-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร^(53, 54) แสดงว่าระบบการทดสอบการต้านสารอนุมูลอิสระในเบื้องต้นนี้ได้มาตรฐาน สามารถนำไปใช้ทดสอบค่า 50 % free radical inhibition ของสารชนิดอื่น ๆ ได้

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

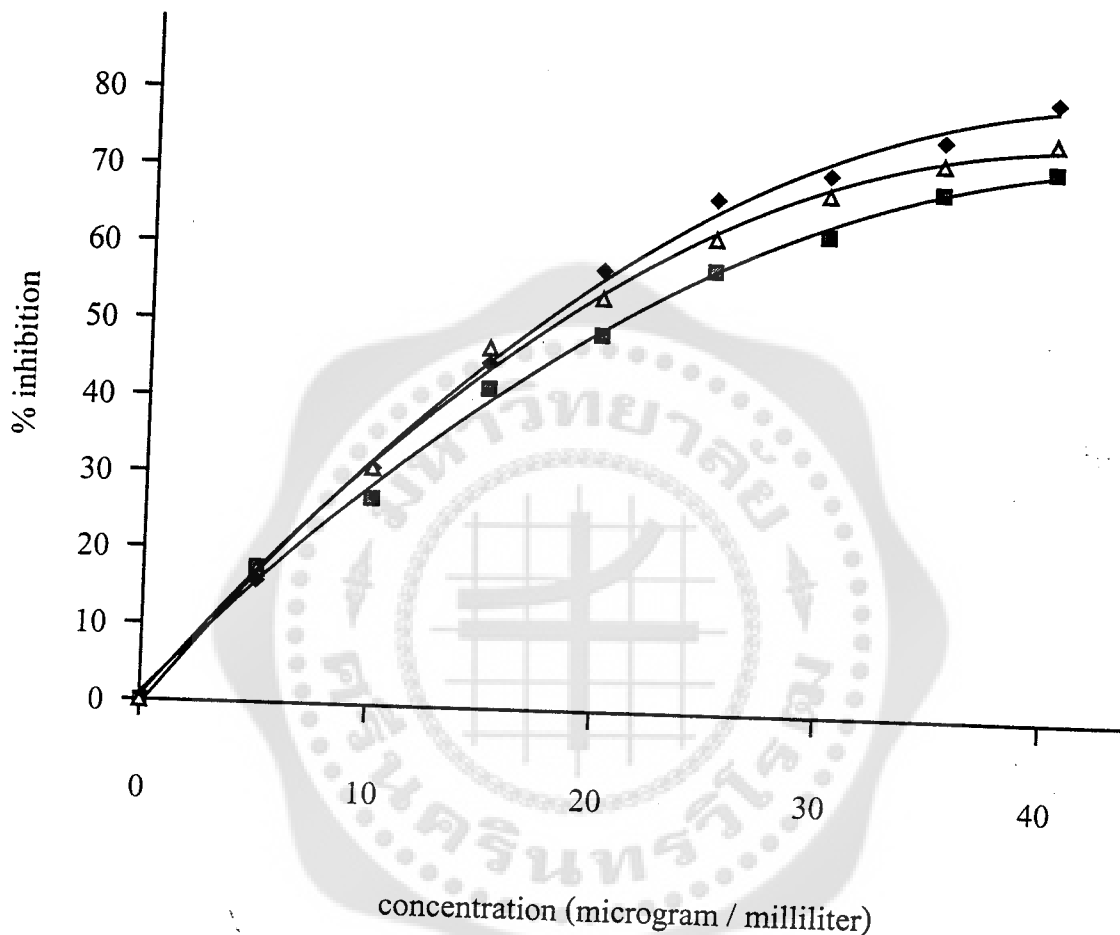
2. วิตามินซี (ascorbic acid) สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐานอีกชนิดหนึ่งก็นำมาใช้ในโครงการวิจัยนี้ คือ วิตามินซี ตาราง 2 และกราฟในภาพ 2 แสดงข้อมูลการยับยั้ง DPPH และค่าความเข้มข้นที่ 50 % inhibition ของวิตามินซีที่มีค่าต่ำมากคือ 3.45 ± 0.09 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. สารสกัดจาก hexane สารสกัดส่วนนี้จะมี polarity ต่ำที่สุดคือใกล้เคียงกับ hexane ผลจากการวิเคราะห์พบว่าสารสกัดจาก hexane ไม่มีผลยับยั้งสีของ DPPH แม้จะใช้ในความเข้มข้นสูงกว่า 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรก็ตาม สันนิษฐานว่าไม่มีสารที่มีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในสารสกัดส่วนนี้

ตาราง 1 แสดงข้อมูลการใช้สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐานคือ 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

Butylated hydroxytoluene (BHT)



ภาพ 1 กราฟแสดงการใช้สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐานคือ BHT

ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH (n = 3)

ค่า 50 % inhibition ของ n = 1 คือ 17.07 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

n = 2 คือ 20.19 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

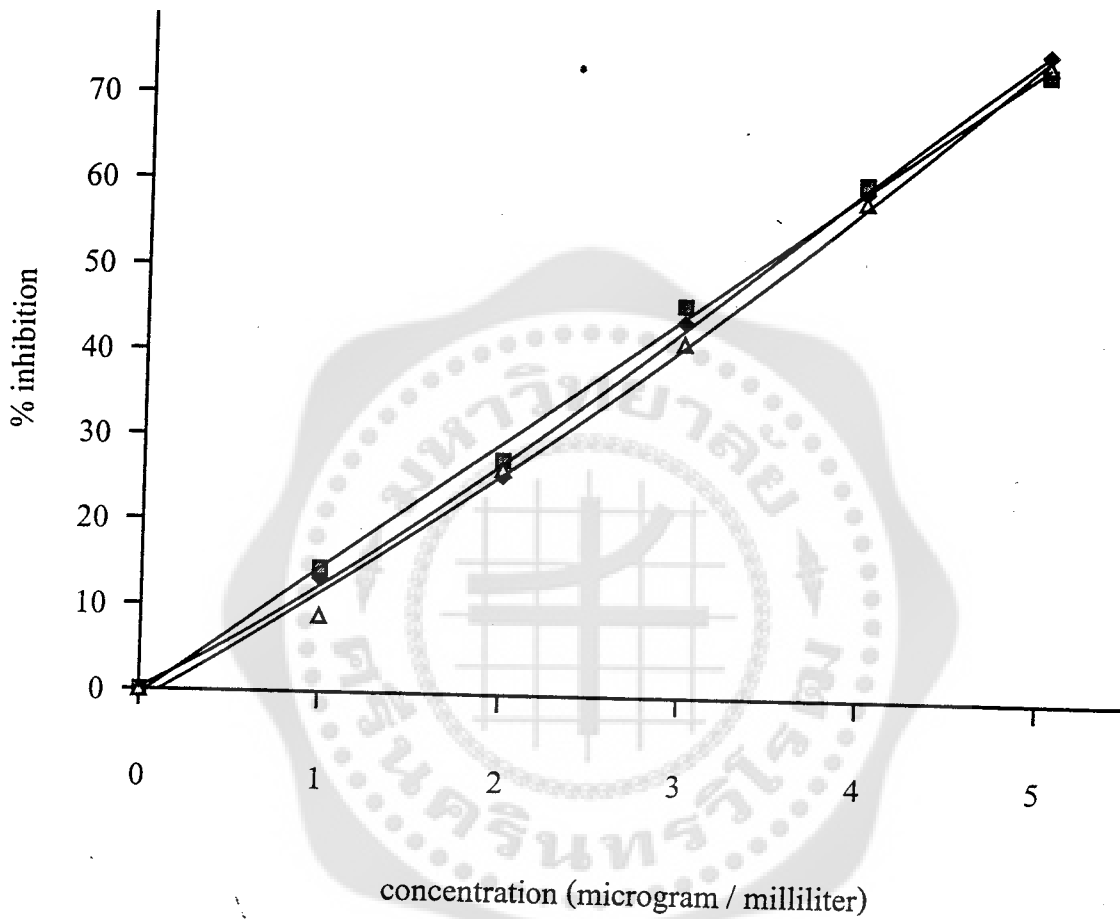
n = 3 คือ 17.68 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ดังนั้น ค่า 50 % inhibition เฉลี่ย คือ 18.31 ± 1.65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตาราง 2 แสดงข้อมูลการใช้สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐานคือวิตามินซี 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)



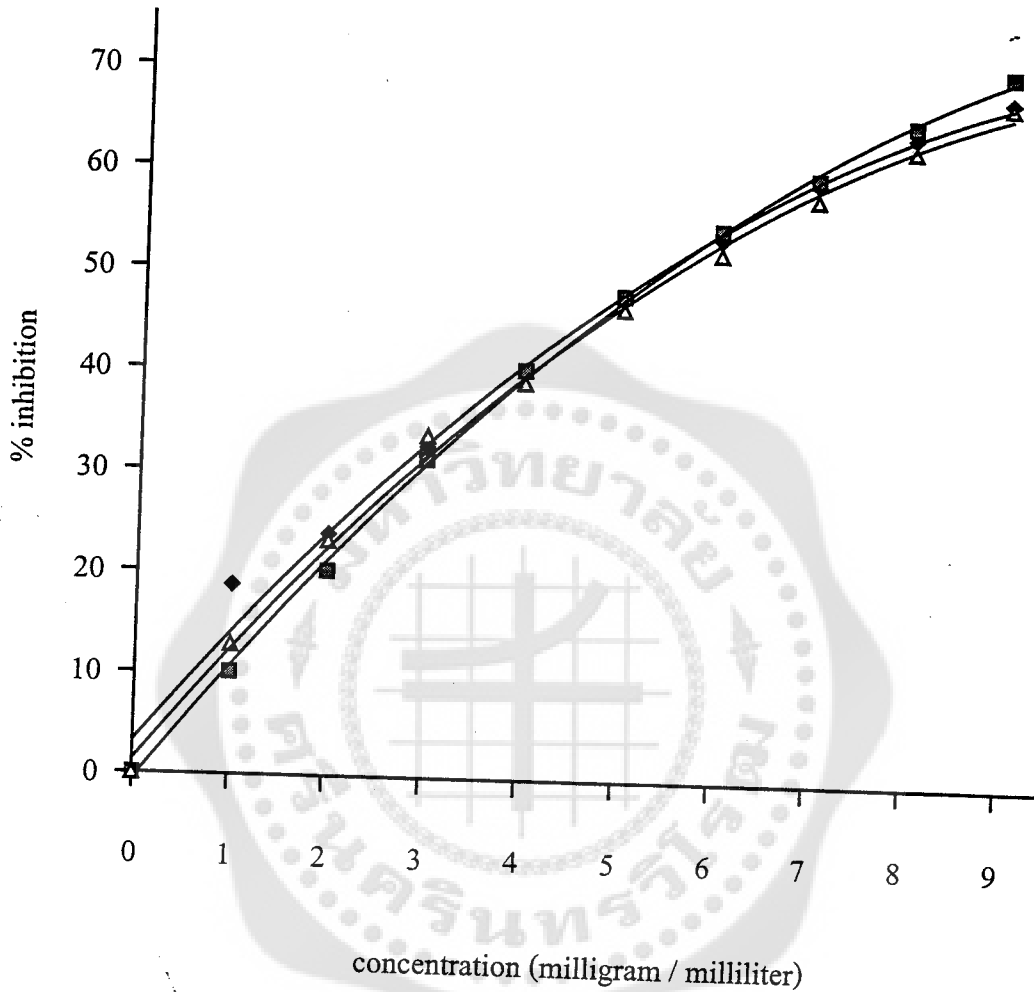
ภาพ 2 กราฟแสดงการใช้สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐานคือวิตามินซี ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH (n = 3)

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 chloroform จากนมผึ้ง
ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH (n = 3)

ความเข้มข้นของสารสกัด (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	% inhibition (n = 1)	% inhibition (n = 2)	% inhibition (n = 3)
0	0.00	0.00	0.00
1	18.68	10.09	12.84
2	23.83	20.17	23.16
3	32.66	31.35	33.70
4	40.38	40.34	39.08
5	47.76	47.87	46.54
6	53.58	54.43	52.14
7	59.17	59.66	57.63
8	63.98	65.13	62.68
9	67.79	70.35	67.29

สารสกัด chloroform จากนมผึ้ง



ภาพ 3 กราฟแสดงการใช้สารสกัด chloroform จากนมผึ้ง

ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH (n = 3)

ค่า 50 % inhibition ของ n = 1 คือ 5.32 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

n = 2 คือ 5.36 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

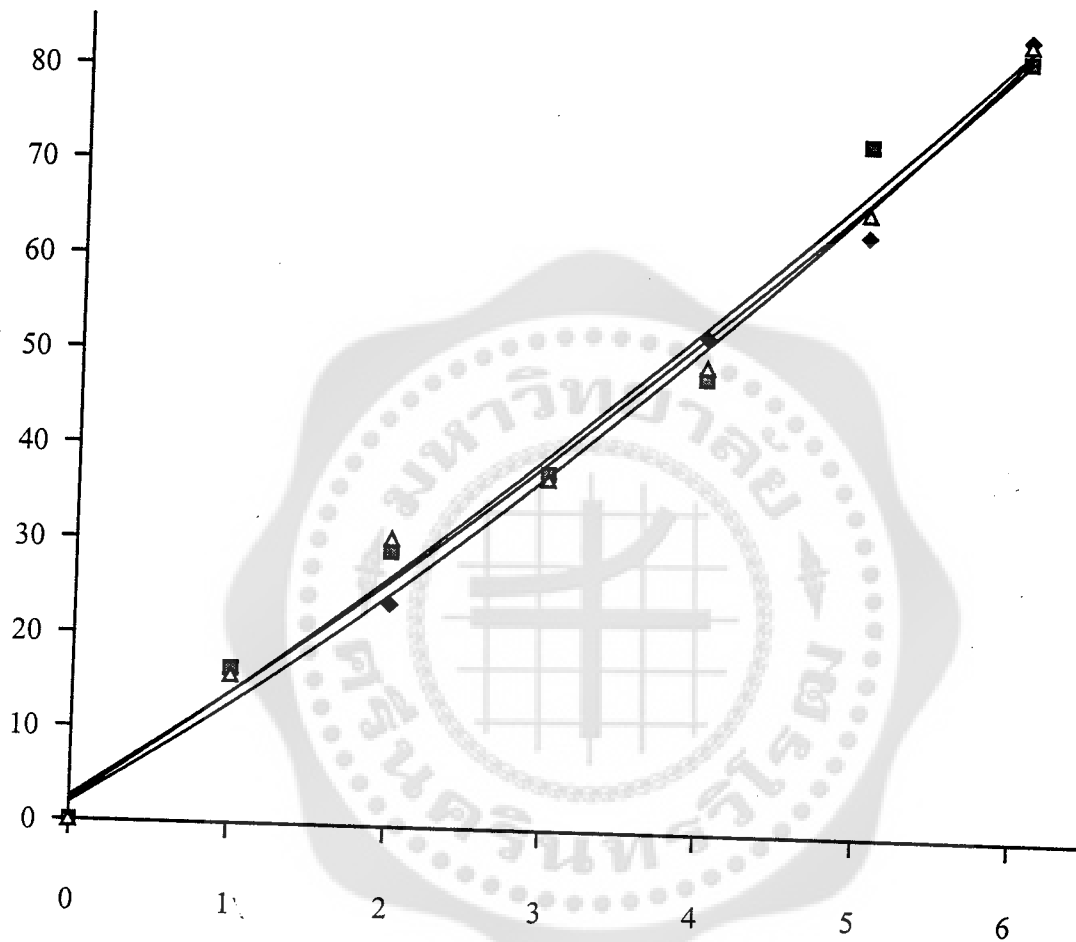
n = 3 คือ 5.47 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ดังนั้น ค่า 50 % inhibition เฉลี่ย คือ 5.38 ± 0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตาราง 4 แสดงข้อมูลการใช้สารสกัด ethanol จากนมผึ้ง
ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH (n = 3)

ความเข้มข้นของสารสกัด (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	% inhibition (n = 1)	% inhibition (n = 2)	% inhibition (n = 3)
0	0.00	0.00	0.00
1	15.95	16.43	15.77
2	23.55	29.11	30.47
3	37.37	37.68	37.12
4	52.36	48.00	49.25
5	63.38	72.89	65.77
6	84.48	82.16	84.01

สารสกัด ethanol จากนมผึ้ง



ภาพ 5 กราฟแสดงการใช้สารสกัด ethanol จากนมผึ้ง

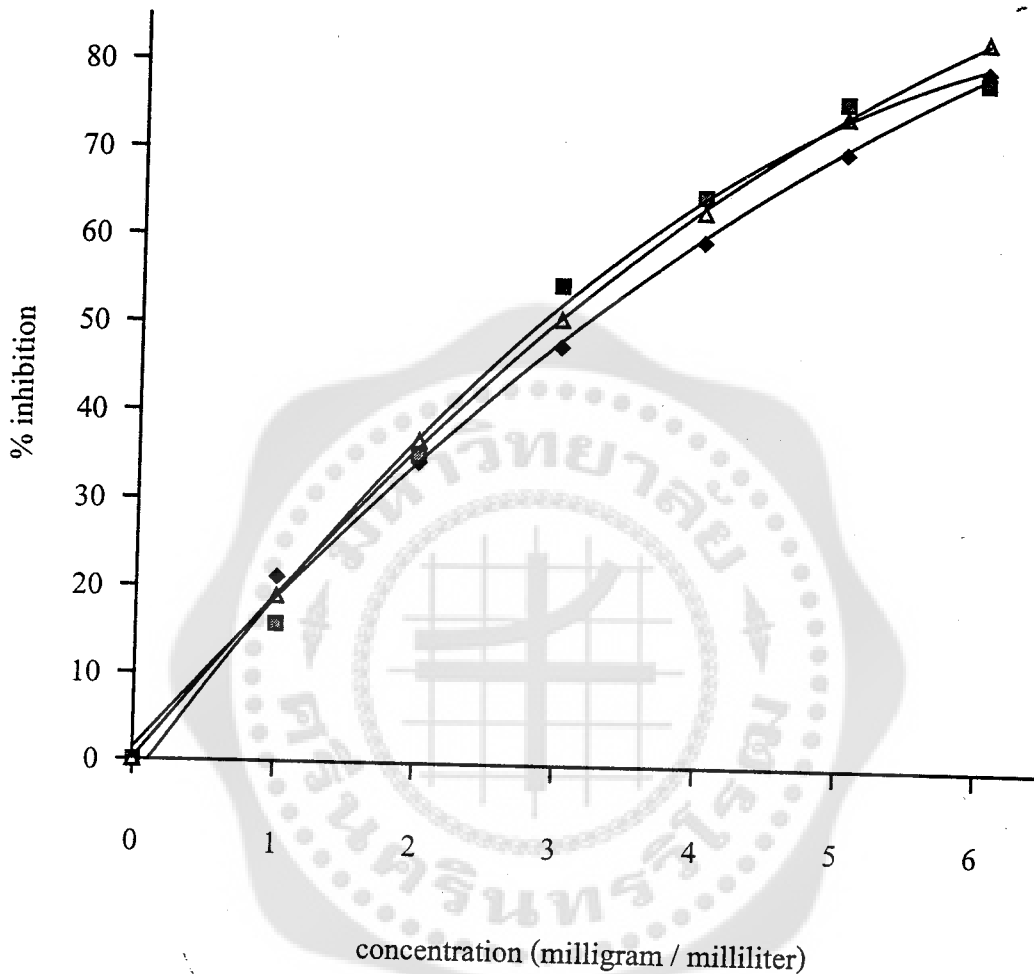
ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH (n = 3)

ค่า 50 % inhibition ของ n = 1 คือ	3.90	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
n = 2 คือ	3.76	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
n = 3 คือ	3.83	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
ดังนั้น ค่า 50 % inhibition เฉลี่ย คือ	3.86 ± 0.07	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตาราง 5 แสดงข้อมูลการใช้สารสกัดน้ำจากนมผึ้ง
ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH (n = 3)

ความเข้มข้นของสารสกัด (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	% inhibition (n = 1)	% inhibition (n = 2)	% inhibition (n = 3)
0	0.00	0.00	0.00
1	21.18	15.80	18.99
2	34.45	35.24	36.88
3	47.71	54.68	50.82
4	59.87	65.01	63.23
5	70.23	75.94	74.31
6	79.71	78.43	83.10

สารสกัดน้ำจากนมผึ้ง



ภาพ 4 กราฟแสดงการใช้สารสกัดน้ำจากนมผึ้ง

ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH (n = 3)

ค่า 50 % inhibition ของ n = 1 คือ 3.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

n = 2 คือ 2.88 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

n = 3 คือ 2.93 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ดังนั้น ค่า 50 % inhibition เฉลี่ย คือ 2.98 ± 0.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4. สารสกัดจาก chloroform สารสกัดส่วนนี้จะมี polarity สูงกว่าสารสกัดจาก hexane ตามค่า polarity ของ chloroform ข้อมูลในตาราง 3 และกราฟภาพ 3

4. สารสกัดจาก chloroform สารสกัดส่วนนี้จะมี polarity สูงกว่าสารสกัดจาก hexane ตามค่า polarity ของ chloroform ข้อมูลในตาราง 3 และกราฟภาพ 3 แสดงให้เห็นว่า สารสกัด chloroform ที่ความเข้มข้นสูงถึง $5,382.7 \pm 79.9$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 5.38 ± 0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จึงจะให้ค่า % inhibition ได้สูงถึง 50 % ซึ่งถือเป็นการเข้มข้นที่สูงมาก นั่นคือมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันต่ำ ดังนั้นแม้ว่าสารสกัดส่วนนี้จะมีคุณสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสูงกว่าสารสกัดจาก hexane แต่ก็ยังถือว่ามีความสามารถอยู่ในระดับต่ำ

5. สารสกัดจาก ethanol สารสกัดส่วนนี้จะมี polarity สูงกว่าสารสกัดจาก chloroform ข้อมูลในตาราง 4 และกราฟภาพ 4 แสดงให้เห็นว่า สารสกัด ethanol ที่ความเข้มข้นประมาณ $3,859.3 \pm 85.7$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 3.86 ± 0.09 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จึงจะให้ค่า % inhibition ได้ถึง 50 % ซึ่งก็เป็นการเข้มข้นที่อยู่ในเกณฑ์สูง นั่นคือมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันต่ำ ดังนั้นแม้ว่าสารสกัดส่วนนี้จะมีคุณสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสูงกว่าสารสกัดจาก chloroform แต่ก็ยังถือว่ามีความสามารถอยู่ในระดับต่ำ

6. สารสกัดจากน้ำ สารสกัดส่วนนี้มีสารที่มี polarity สูงมาก จากข้อมูลในตาราง 5 และกราฟภาพ 5 แสดงให้เห็นว่า ค่าความเข้มข้นที่ 50 % inhibition ของสารสกัดด้วยน้ำมีค่าค่อนข้างสูง คือใช้ความเข้มข้น $2,979.0 \pm 132.7$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 2.98 ± 0.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งก็ถือว่าเป็นการเข้มข้นที่อยู่ในเกณฑ์สูง หรือกล่าวได้ว่ามีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันต่ำเช่นเดียวกับสารสกัดจาก ethanol

ANTIOXIDANT ACTIVITY

เมื่อทำการศึกษาใน DPPH assay แล้ว ก็จะนำมาศึกษาต่อว่าสารสกัดมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้มากน้อยเท่าใด การวิจัยส่วนนี้ดูความสามารถของสารสกัดจากนมผึ้งในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ก่อให้เกิดสารอนุมูลอิสระสีน้ำตาลหรือฟาวมเขียวที่คงตัวขึ้นในหลอดทดลอง สารใดมีความสามารถต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันดีก็จะเกิดสารอนุมูลอิสระได้น้อย สีของสารอนุมูลอิสระมีสีน้ำตาลอมเขียวจะจางหรือไม่เข้ม เมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer จะมีค่าการดูดกลืนแสงต่ำ ดังนั้นเมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงมาเข้าสู่สูตรคำนวณจะให้ค่า anti-oxidant activity สูง⁽⁵⁵⁻⁵⁹⁾

ตาราง 6 แสดงข้อมูลเปรียบเทียบผลการศึกษาด้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากนมผึ้งด้วยวิธี DPPH assay และค่า antioxidant activity

สารสกัดนมผึ้ง	DPPH assay (n = 3) ค่าความเข้มข้น ที่ 50 % inhibition (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	total antioxidant activity (n = 3)	
		ที่ความเข้มข้น (มกค./มล.)	ค่า activity (มิลลิโมลต่อลิตร)
BHT	18 ± 1.65	20	1.88 ± 0.02
chloroform	5,382 ± 79.9	160	0.20 ± 0.01
ethanol	3,859 ± 85.7	160	0.24 ± 0.01
water	2,979 ± 132.7	160	0.36 ± 0.04

ค่า antioxidant activity ในตาราง 6 แสดงให้เห็นว่า ผลจาก DPPH assay สอดคล้องกับค่า antioxidant activity กล่าวคือ เมื่อเปรียบเทียบที่ค่าความเข้มข้นเดียวกันที่ 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า ค่า antioxidant activity ของสารสกัด hexane มีค่าต่ำสุดและไม่สามารถวัดได้ ลำดับต่อมาเป็นสารสกัดจาก chloroform ethanol และน้ำ ที่มีค่า antioxidant activity เป็น 0.20 ± 0.01 , 0.24 ± 0.01 และ 0.36 ± 0.04 มิลลิโมลต่อลิตร ตามลำดับ

เมื่อนำผลจาก DPPH assay มาพิจารณาเปรียบเทียบกับค่า antioxidant activity จะเห็นได้ว่ามีทิศทางไปเป็นในทางเดียวกัน หรือกล่าวได้ว่าการทดสอบทั้ง 2 protocol ให้ผลหรือมีแนวโน้มเช่นเดียวกันคือ สารสกัดจากตัวทำละลายมีขี้ให้สารที่ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีกว่าสารสกัดจากตัวทำละลายไม่มีขี้ แต่เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐานดังเช่น BHT ก็พบว่าฤทธิ์ต่ำกว่ามาก กล่าวคือ BHT ที่ความเข้มข้นต่ำเพียง 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่มีค่า antioxidant activity สูงถึง 1.88 ± 0.02 มิลลิโมลต่อลิตร อย่างไรก็ตามผลจากทั้งสองวิธีก็แสดงให้เห็นว่านมผึ่งน่าจะมีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันอยู่บ้างไม่มากก็น้อย

เมื่อพิจารณาสารสกัดนมผึ่งด้วย ethanol และน้ำจะเห็นได้ว่า นมผึ่งมีการละลายใน ethanol และน้ำได้มาก การสกัดด้วย ethanol และน้ำจึงมีเนื้อสารออกมาในปริมาณสูงมากคือเป็นการสกัดอย่างหยาบ ซึ่งต่างกับการสกัดพืชสมุนไพรที่จะมีกากเหลือค้างอยู่มากกว่านมผึ่งเป็นจำนวนมาก จึงคาดว่าสารที่ถูกสกัดออกมามีทั้งสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันจำนวนหนึ่ง และสารที่ไม่มีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันอีกจำนวนมาก จึงทำให้ดูเหมือนว่าสารสกัดนมผึ่งในส่วนนี้มีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันต่ำ แต่หากทำการสกัดสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันให้บริสุทธิ์ (purification) ได้ ก็อาจได้สารที่ใช้ความเข้มข้นไม่สูงดังเช่นสารสกัดหยาบ ethanol และน้ำ คณะผู้วิจัยจึงไม่อาจสรุปได้ทันทีว่านมผึ่งมีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันต่ำ

ข้อแก้ไขอีกประการหนึ่งก็คือขั้นตอนวิธีการสกัดนมผึ่ง คณะผู้วิจัยขอเสนอเป็น 2 ประเด็น คือ (1) หลังจากสกัดด้วย chloroform แล้วให้ใช้น้ำสกัดต่อไปเลย เพื่อให้สารที่มี polarity สูงที่อาจจะออกมากับ ethanol เปลี่ยนมาออกในน้ำเลย หรือ (2) ในกรณีที่ทราบว่าสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมีคุณสมบัติ polarity สูง ก็อาจใช้น้ำสกัดเพียงอย่างเดียวได้เลย โดยไม่ต้องใช้ hexane chloroform และ ethanol ก่อนเลย การสกัดด้วยน้ำเพียงอย่างเดียวจะช่วยให้ไม่สูญเสียสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันไปกับตัวทำละลายมีขี้ชนิดอื่น ๆ ซึ่งจะมีข้อดีในอนาคตเมื่อต้องการใช้ทดสอบฤทธิ์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ก็จะละลายได้อย่างสะดวก

บทสรุป

ผลจากการวิจัยสารสกัดนมผึ้งด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วต่าง ๆ กันด้วยวิธี DPPH assay และวิเคราะห์ความแรงของ antioxidant activity สามารถสรุปได้ว่า

(1) สารสกัดจากนมผึ้งด้วยน้ำมีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีที่สุดเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH assay คือให้ค่าความเข้มข้นที่ 50 % inhibition ต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดอื่น ๆ จึงสามารถสันนิษฐานในเบื้องต้นได้ว่า สารที่มีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในนมผึ้งเป็นสารที่มีค่า polarity สูง และสูงใกล้เคียงกับ ethanol และน้ำ สำหรับสารสกัดจาก chloroform ก็ยังสามารถต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้บ้างแต่น้อยกว่าสารสกัดจาก ethanol และน้ำ อย่างไรก็ตาม สารสกัดจากทุก fraction มีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันต่ำกว่าสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐานคือ BHT

(2) สารสกัดจากนมผึ้งด้วยน้ำมีค่า antioxidant activity สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดด้วยตัวทำละลายอื่น ๆ คือ ethanol chloroform และ hexane โดยแตกต่างกันไม่เด่นชัดมากนัก แต่ก็พอจะกล่าวได้ว่าสารสกัดจาก hexane มีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันน้อยมาก ๆ

(3) การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH assay และตรวจวัดค่า antioxidant activity ให้ผลสอดคล้องกันมากคือ สารสกัดนมผึ้งจากน้ำมีค่าความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้สูงสุด แต่จะอยู่ในเกณฑ์ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับ BHT

ผลจากรายงานการวิจัยระยะหลัง ^(34, 50-52) รวมทั้ง DPPH assay และการวัดค่า antioxidant activity ในโครงการวิจัยนี้แสดงให้เห็นในระดับหนึ่งว่า นมผึ้งน่าจะมีสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันอยู่ และควรจะเป็นสารที่มีคุณสมบัติที่มี polarity สูง คืออยู่ในส่วนของสารสกัดจาก ethanol และน้ำ

ข้อเสนอแนะ

การวิจัยสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันจากนมผึ้งควรจะดำเนินต่อไปในระดับที่สูงขึ้นเนื่องจากผลการวิจัยในโครงการนี้แสดงให้เห็นในเบื้องต้นว่า นมผึ้งน่าจะมีสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันอยู่ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงขอเสนอแนะแนวทางการทำวิจัยสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันจากนมผึ้งในอนาคตไว้ดังต่อไปนี้

(1) สกัดสารบริสุทธิ์หรือกึ่งบริสุทธิ์จากนมผึ้ง และนำมาทดสอบฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH assay และวัดความแรงของ antioxidant activity การวิจัยในส่วนนี้มีประโยชน์ 2 ประการ คือ (1) เป็นการศึกษาสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งอาจนำไปสู่การสังเคราะห์สารให้มีความสามารถต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสูงขึ้นกว่าสารเริ่มต้นที่พบในใบกะเพรา (2) ศึกษาเปรียบเทียบความสามารถต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ เพื่อประโยชน์ในการกำหนดขนาด (dose) ที่เหมาะสมในการรับประทานสารสกัดเพื่อให้ได้ฤทธิ์เท่ากับสารบริสุทธิ์

(2) ศึกษาความสามารถในการลดปริมาณสารอนุมูลอิสระใน model ต่าง ๆ เช่น การกระตุ้นด้วยไฟฟ้า และการฉายรังสีต่อเซลล์ เพื่อยืนยันว่าสารสกัดจากนมผึ้งมีฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระได้โดยตรงจริง ก่อนที่จะดำเนินการศึกษาทั่วโลกในระดับเซลล์และระดับโมเลกุลต่อไป

(3) การศึกษาฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในอนาคตควรใช้น้ำสกัดเพียงอย่างเดียวได้เลย โดยไม่ต้องใช้ hexane chloroform และ ethanol ก่อนเลย การสกัดด้วยน้ำเพียงอย่างเดียวจะช่วยให้ไม่สูญเสียสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันไปกับตัวทำละลายมีขั้วชนิดอื่น ๆ ซึ่งจะมีข้อดีในอนาคตเมื่อต้องการใช้ทดสอบฤทธิ์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ก็จะละลายได้อย่างสะดวก

บรรณานุกรม

1. Kobayashi N, Unten S, Kakuta H, Komatsu N, Fujimaki M, Satoh K, Aratsu C, Nakashima H, Kikuchi H, Ochiai K and Sakagami H. Diverse biological activities of healthy foods. *In Vivo* 2001 ; 15 : 17-23.
2. Williams DL. A veterinary approach to the European honey bee (*Apis mellifera*). *Vet J* 2000 ; 160 : 61-73.
3. Shaw D, Leon C, Kolev S and Murray V. Traditional remedies and food supplements. A 5-year toxicological study (1991-1995). *Drug Saf* 1997 ; 17 : 342-56.
4. Shimanuki H and Knox DA. Bee health and international trade. *Rev Sci Tech* 1997 ; 16 : 172-6.
5. สิริวัฒน์ วงษ์ศรี, เพ็ญศรี ตั้งคณะสิงห์. ชีวิตวิทยาของผึ้ง 39-43, 128-131, 2529.
6. Nimmannit U. Royal jelly. *Drug Information. Th J Pharm Sci* 1988 ; 13 : 85-9.
7. Dayan AD. A note on royal jelly : A critical evaluation. *J Pharm Pharmacol* 1906 ; 12 : 377-83.
8. สุภาภรณ์ พงศกร Royal jelly (นมผึ้ง) นิตยสารใกล้หมอ กรกฎาคม 2531 ; 72-3.
9. Lercker G, Capella P, Conte LS and Ruini F. Components of royal jelly : I. Identification of the organic acid. *Lipids* 1981 ; 16 : 912-9.
10. Townsend GF and Lucas GG. The chemical nature of royal jelly. *Biochem J* 1940 ; 34 : 1155-62.
11. Nevin W, John HL and Norah CJ. Study on lipid of royal jelly. *Biopharm Biophys Acta* 1964 ; 84 : 305-15.
12. Barker SA, Foster AB and Lamb DC. Biological origin and configuration of 10-hydroxy-2-decenoic acid. *Nature* 1959 ; 184 : 634.
13. Brown WH and Freure RJ. Some carboxylic acids present in royal jelly. *Can J Chem* 1959 ; 37 : 2042-6.
14. Abdel-Wahab SM, Selim MA, Shehata MM and Mohamed TR. Detection and estimation of neurohormonal substance in honey and royal jelly. *Egypt J Pharm Sci* 1982 ; 20 : 353-63.

15. Blum MS, Novak AF and Taber S. 10-hydroxy-2-decenoic acid, an antibiotic found in royal jelly. *Science* 1959 ; 130 : 452-3.
16. Yatsunami K and Echigo T. Antibacterial action of royal jelly. The XXXth International Apicultural Congress of Apitherapy; 30th. Oct 10-16 ; Nagoya : 1985.
17. Dixit PK and Patel NG. Insulin-like activity in larval foods of the honeybee. *Nature* 1964 ; 202 : 189-90.
18. O'Conner KJ and Baxter D. The demonstration of insulin-like material in the honeybee, *Apis mellifera*. *Comp Biochem Physiol* 1985 ; 81B : 755-60.
19. Kramer KJ, Tager HS, Childs CN and Sperirs RD. Insulin-like hypoglycemic and immunological activities in honeybee royal jelly. *J Insect Physiol* 1977 ; 23 : 293-5.
20. Fujiwara S, Imai J, Fujiwara M, Yaeshima T, Kawashima T and Kobayashi K. A potent antibacterial protein in royal jelly. *J Biol Chem* 1990 ; 265 : 11333-7.
21. Genc M and Aslan A. Determination of trans-10-hydroxy-2-decenoic acid content in pure royal jelly and royal jelly products by column liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1999 ; 839 : 265-8.
22. Bloodworth BC, Harn CS, Hock CT and Boon YO. Liquid chromatographic determination of trans-10-hydroxy-2-decenoic acid content of commercial products containing royal jelly. *J AOAC Int* 1995 ; 78 : 1019-23.
23. Kimura Y, Miyagi C, Kimura M, Nitoda T, Kawai N and Sugimoto H. Structural features of N-glycans linked to royal jelly glycoproteins : structures of high-mannose type, hybrid type, and biantennary type glycans. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000 ; 64 : 2109-20.
24. Albert S, Bhattacharya D, Klaudiny J, Schmitzova J and Simuth J. The family of major royal jelly proteins and its evolution. *J Mol Evol* 1999 ; 49 : 290-7.
25. Maleszka R and Kucharski R. Analysis of *Drosophila* yellow-B cDNA reveals a new family of proteins related to the royal jelly proteins in the honeybee and to an orphan protein in an unusual bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 ; 270 : 773-6.
26. Kimura Y, Kajiyama S, Kanaeda J, Izukawa T and Yonekura M. N-linked sugar chain of 55-kDa royal jelly glycoprotein. *Biosci Biotechnol Biochem* 1996 ; 60 : 2099-102.

27. Kubo T, Sasaki M, Nakamura J, Sasagawa H, Ohashi K, Takeuchi H and Natori S. Change in the expression of hypopharyngeal-gland proteins of the worker honeybees (*Apis mellifera* L.) with age and/or role. J Biochem (Tokyo) 1996 ; 119 : 291-5.
28. Kimura Y, Washino N and Yonekura M. N-linked sugar chains of 350-kDa royal jelly glycoprotein. Biosci Biotechnol Biochem 1995 ; 59 : 507-9.
29. Ohashi K, Natori S and Kubo T. Change in the mode of gene expression of the hypopharyngeal gland cells with an age-dependent role change of the worker honeybee *Apis mellifera* L. Eur J Biochem 1997 ; 249 : 797-802.
30. Albert S, Klaudiny J and Simuth J. Molecular characterization of MRJP3, highly polymorphic protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. Insect Biochem Mol Biol 1999 ; 29 : 427-34.
31. Schmitzova J, Klaudiny J, Albert S, Schroder W, Schreckengost W, Hanes J, Judova J and Simuth J. A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. Cell Mol Life Sci 1998 ; 54 : 1020-30.
32. Kamakura M, Fukuda T, Fukushima M and Yonekura M. Storage-dependent degradation of 57-kDa protein in royal jelly: a possible marker for freshness. Biosci Biotech 2001 ; 65 : 277-84.
33. Kamakura M, Suenobu N and Fukushima M. Fifty-seven-kDa protein in royal jelly enhances proliferation of primary cultured rat hepatocytes and increases albumin production in the absence of serum. Biochem Biophys Res Commun 2001 ; 13 : 865-74.
34. Hamerlinck FF. Neopterin : a review. Exp Dermatol 1999 ; 8 : 167-76.
35. Lombardi C, Senna GE, Gatti B, Feligioni M, Riva G, Bonadonna P, Dama AR, Canonica GW and Passalacqua G. Allergic reactions to honey and royal jelly and their relationship with sensitization to compositae. Allergol Immunopathol 1998 ; 26 : 288-90.
36. Leung R, Ho A, Chan J, Choy D and Lai CK. Royal jelly consumption and hypersensitivity in the community. Clin Exp Allergy 1997 ; 27 : 333-6.
37. Harwood M, Harding S, Beasley R and Frankish PD. Asthma following royal jelly. N Z Med J 1996 ; 109 : 325.
38. Laporte JR, Ibaanez L, Vendrell L and Ballarin E. Bronchospasm induced by royal jelly. Allergy 1996 ; 51 : 440.

39. Baldo BA. Allergies to wheat, yeast and royal jelly : a connection between ingestion and inhalation? *Monogr Allergy* 1996 ; 32 : 84-91.
40. Peacock S, Murray V and Turton C. Respiratory distress and royal jelly. *BMJ* 1995 ; 311 : 1472.
41. Thien FC, Leung R, Plomley R, Weiner J and Czarny D. Royal jelly-induced asthma. *Med J Aust* 1993 ; 159 : 639.
42. Leung R, Thien FC, Baldo B and Czarny D. Royal jelly-induced asthma and anaphylaxis : clinical characteristics and immunologic correlations. *J Allergy Clin Immunol* 1995 ; 96 : 1004-7.
43. Roger A, Rubira N, Nogueiras C, Guspi R, Baltasar M and Cadahia A. Anaphylaxis caused by royal jelly. *Allergol Immunopathol (Madr)* 1995 ; 23 : 133-5.
44. Bullock RJ, Rohan A and Straatmans JA. Fatal royal jelly-induced asthma. *Med J Aust* 1994 ; 160 : 44.
45. Thien FC, Leung R, Baldo BA, Weiner JA, Plomley R and Czarny D. Asthma and anaphylaxis induced by royal jelly. *Clin Exp Allergy* 1996 ; 26 : 216-22.
46. Yonei Y, Shibagaki K, Tsukada N, Nagasu N, Inagaki Y, Miyamoto K, Suzuki O and Kiryu Y. Case report: haemorrhagic colitis associated with royal jelly intake. *J Gastroenterol Hepatol* 1997 ; 12 : 495-9.
47. Murakami K, Fujioka T, Nasu M, Inage T, Nishimiya M, Matsunaga K, Saburi Y and Moriuchi A. A case of eosinophilic gastroenteritis induced by “royal jelly”. *Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi* 1994 ; 91 : 1447-50.
48. Basu TK, Temple NJ and Garg. *Antioxidant in Human Health and Disease*. CABI Publishing, 1999.
49. PUNCHARD NA and KELLY FJ. *Free Radicals*. IRL press, 1996.
50. Kritsanakriengkrai S. Effect of royal jelly in lipid peroxidation in cardiac and skeletal muscles induced by exercise in rats. Ph.D. thesis, 1998, Mahidol University.
51. Oka H, Emori Y, Kobayashi N, Hayashi Y and Nomoto K. Suppression of allergic reactions by royal jelly in association with the restoration of macrophage function and the improvement of Th1/Th2 cell responses. *Int Immunopharmacol* 2001 ; 1 : 521-32.

52. Nagai T, Sakai M, Inoue R, Inoue H and Susuki N. Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. *Food Chem* 2001 ; 75 : 237-40.
53. Hatano, T., Edamatsu, R., Hiramatsu, M., Mori, A., Fujita, Y., Yasuhara, T., Yoshida, T. and Okuda, T. 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.
54. Yamasaki, K., Hashimoto, A., Kokusenya, Y., Miyamoto, T., Sato, T. Electrochemical method for estimating the antioxidative effects of methanol extracts of crude drugs. *Chem Pharm Bull* 1994 ; 42 : 1663-1665.
55. Arnao MB, Cano A, Hernandez-Ruiz J, Garcia-Canovas F and Acosta M. Inhibition by L-ascorbic acid and other Antioxidants of the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic Acid) oxidation catalyzed by peroxidase : A new approach for determining total antioxidant status of foods. *Anal Biochem* 1966 ; 236 : 255-61.
56. Makinen K and Tenovuo J. Observations on the use of guaiacol and 2,2'-azino-di (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) as peroxidase substrates. *Anal Biochem* 1982 ; 126 : 100-8.
57. George BP and Irvine DH. The reaction between metmyoglobin and hydrogen peroxide. *Biochem* 1952 ; 52 : 511-5.
58. Koleva II, Niederlander HAG and van Beek TA. Application of ABTS radical cation for selective on-line detection of radical scavengers in HPLC eluates. *Anal Chem* 2001 ; 73 : 3373-81.
59. Tian-Wei Y and Choon NO. Lag-time measurement of antioxidant capacity using myoglobin and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) : rationale, application, and limitation. *Anal Biochem* 1999 ; 275 : 217-23.