บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

การทดสอบความเป็นพิษต่อผิวหนังโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงของสารทดสอบตามแนวปฏิบัติของ OECD (OECD, 2008) มีข้อจำกัดในทางปฏิบัติในประเทศไทยกล่าวคือ ทำให้ต้องทำการศึกษาเพื่อพัฒนาแนวทางการศึกษาความเป็นพิษต่อผิวหนังด้วยวิธีการวัดค่าเชิงปริมาณ (quantitative) กำหนดตัววัด 2 ตัวคือค่าความเข้มข้นที่สารทดสอบแสดงการกัดกร่อนผิวหนัง (skin corrosion) และการก่อระคายเคือง (irritation) ด้วยการวัดปริมาณของสารอักเสบที่เซลล์ผลิตเมื่อสัมผัสสารทดสอบ ใช้เซลล์ผิวหนัง 2 ชนิดที่ยังมีชีวิตเป็นเซลล์ทดสอบ อีกทั้งยังทำการศึกษากระบวนการอะพอพโทซิสเพื่ออธิบายกลไกของความเป็นพิษที่เกิดขึ้นด้วย นอกจากนี้เนื่องจากสารทดสอบเป็นสารสกัดดอกอัญชันและสารสกัดที่ดูดซับด้วยนาโนซีโอไลต์ จึงทำการตรวจวัดเชิงปริมาณด้วย HPLC เพื่อแสดงปริมาณการดูดซับและยืนยันฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกับสารสกัดที่ดูดซับด้วยนาโนซีโอไลต์ด้วยวิธีการโอแรค (ORAC) ผลการศึกษาและการอภิปรายผลเป็นดังนี้

4.1 การกัดกร่อนผิวหนัง (skin corrosion)

สารทดสอบที่ทำให้ผิวหนังถูกกัดกร่อนย่อมจะมีส่วนทำให้เซลล์ผิวหนังสูญเสียการทำงานไปและตาย อาศัยแนวคิดนี้ในการนำวิธีการต่าง ๆ ที่ใช้วัดจำนวนเซลล์มาทำการศึกษา ดังนั้นสมมติฐานคือจำนวนเซลล์ผิวหนังที่ใช้ในการทดสอบซึ่งรอดชีวิตหลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาหนึ่งโดยสัมผัสกับสารทดสอบต่าง ๆ เทียบเท่ากับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้เป็นตัวควบคุมเชิงลบแสดงว่าสารทดสอบไม่กัดกร่อนผิวหนัง วิธีการที่ใช้มี 2 วิธี คือวิธีการเอ็มทีที กับระบบเอ็กเซลลิเจนซ์ (xCELLigence system) วิธีการเอ็มทีทีวัดผลที่ 24 ชั่วโมง ส่วนวิธีเอ็กเซลลิเจนซ์ ติดตามผลที่เกิดขึ้นกับเซลล์หลังจากสัมผัสสารทดสอบอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังนั้นจึงนำผลที่ 24 ชั่วโมงมาศึกษาเปรียบเทียบและใช้ข้อมูลก่อนครบเวลาในการอธิบายกลไก โดยมีไฮโดรเจนเปอออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 ($10\%H_2O_2$) เป็นสารควบคุมเชิงบวก และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็นสารควบคุมเชิงลบในวิธีการเอ็มทีที

นอกจากนี้การวัดปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง ด้วยวิธีการเอ็มทีที เป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับและใช้กันแพร่หลาย แต่อีกปัญหาหนึ่งที่สำคัญอันอาจรบกวนการอ่านผลคือสีของสาร เอ็มทีทีนั้นมีสีม่วง ส่วนสีของแอนโทไซยานินที่ใช้มีสีน้ำเงินอมม่วง การเปรียบเทียบด้วยระบบเอ็กเซลลิเจนซ์จึงช่วยให้วิเคราะห์ปัญหาดังกล่าวได้ชัดเจน

4.1.1 วิธีการเอ็มทีที (MTT assay)

เอ็มทีทีเป็นสารทดสอบการทำงานของไมโทคอนเดรีย (mitochondria) ของเซลล์ โดยทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ไมโทคอนเดรียรีดักเทส (mitochondria reductase) ซึ่งจะรีดิวซ์ (reduce) สารเอ็มทีที ที่ใช้ในวิธีการทดสอบให้กลายเป็นฟอร์มาซาน (formazan) ที่มีสีม่วงซึ่งดูดกลืนแสงจึงใช้วัดค่าเชิงปริมาณด้วยการอ่านค่าการดูดกลืนแสงได้ ดังนั้นโดยวิธีปฏิบัติจึงเติมสารละลายเอ็มทีที ในเซลล์เพาะเลี้ยง ซึ่งเซลล์เพาะเลี้ยงได้สัมผัส

กับสารทดสอบมาเป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้ว ถ้าเซลล์รอดชีวิตจากสารทดสอบที่ได้สัมผัสจะมีการทำงานของไมโทคอนเดรียเป็นปกติ เอ็มทีทีจึงถูกรีดิวซ์เป็นฟอร์มาซานมีสีม่วง ส่วนเซลล์ที่ถูกกัดกร่อนและตายไปนั้นไม่เกิดปฏิกิริยาดังกล่าวและจะไม่แสดงสี ในขั้นตอนละลายฟอร์มาซานด้วย DMSO แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท ค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้แสดงถึงปริมาณของฟอร์มาซาน ซึ่งสัมพันธ์โดยตรงกับเซลล์ที่มีชีวิตรอดจากการสัมผัสสารทดสอบ จึงใช้หาร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์โดยเทียบกับค่าดูดกลืนแสงของสารควบคุมเชิงลบซึ่งทดสอบพร้อมกันกับสารทดสอบ

ผลการศึกษาการกัดกร่อนโดยสารทดสอบ 3 ชนิด คือ แอนโทไซยานิน นาโนซีโอไลต์และสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างแอนโทไซยานินกับนาโนซีโอไลต์ ที่ความเข้มข้น 0.1 – 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้เซลล์ 2 ชนิด คือ เซลล์เคอราติโนไซต์ และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ตารางที่ 4.1 แสดงให้เห็นว่า สารทดสอบทุกตัวกัดกร่อนเซลล์ไฟโบรบลาสต์สูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นโดยลำดับ ที่ความเข้มข้นสูงสุดคือ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของร้อยละของการรอดชีวิตของเซลล์ที่ได้รับแอนโทไซยานิน นาโนซีโอไลต์ และสารประกอบเชิงซ้อน เท่ากับ 59.6 ± 4.8 48.5 ± 7.6 และ 64.6 ± 15.2 ตามลำดับ ที่เวลา 24 ชั่วโมง ถ้าเปรียบเทียบกันที่ความเข้มข้นนี้แสดงให้เห็นว่านาโนซีโอไลต์มีความพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์สูงที่สุดจากข้อมูลการรอดชีวิตของเซลล์ต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับสารทดสอบอื่น ในขณะที่แอนโทไซยานินมีความพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ มากกว่าเมื่อเกิดสารประกอบเชิงซ้อนด้วยการดูดซับแอนโทไซยานินในนาโนซีโอไลต์ ซึ่งอาจเป็นเพราะความเข้มข้นของทั้งแอนโทไซยานินและนาโนซีโอไลต์ในขณะที่ดูดซับมีปริมาณน้อยกว่าสารเดี่ยว ๆ แต่ละตัว แสดงถึงนาโนซีโอไลต์เมื่อมาดูดซับแอนโทไซยานินจนเป็นสารประกอบเชิงซ้อนทำให้พิษที่เกิดต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ลดลง จะเห็นได้จากร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มีมากกว่า เมื่อทดสอบด้วยนาโนซีโอไลต์ และแอนโทไซยานิน

ในทำนองเดียวกันผลการทดสอบด้วยเซลล์เคอราติโนไซต์ ก็พบว่าสารทดสอบทุกตัวกัดกร่อนเซลล์ผิวหนังเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นดังแสดงในตารางที่ 4.2 พบว่าที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้คือ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แอนโทไซยานิน นาโนซีโอไลต์และสารประกอบเชิงซ้อนมีค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์เท่ากับ 56.2 ± 6.2 48.5 ± 11.7 และ 54.0 ± 5.1 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า นาโนซีโอไลต์มีความพิษต่อเซลล์เคอราติโนไซต์มากที่สุดเห็นได้จากร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ต่ำที่สุด แต่ในส่วนแอนโทไซยานินมีความเป็นพิษต่อเซลล์เคอราติโนไซต์สูงกว่าสารประกอบเชิงซ้อนเพียงเล็กน้อย ($P > 0.05$)

สารทดสอบทั้ง 3 ตัวมีแนวโน้มในการกัดกร่อนของเซลล์ทั้ง 2 ชนิดคล้ายกัน คือ เมื่อได้สัมผัสสารนาน 24 ชั่วโมงที่ช่วงความเข้มข้น 0.1 – 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร เมื่อใช้วิธีการเอ็มทีที กล่าวคือเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงทั้ง 2 ชนิดมีแนวโน้มการตายเพิ่มมากขึ้น เมื่อความเข้มข้นของสารทดสอบเพิ่มมากขึ้นแสดงให้เห็นความเป็นพิษที่เกิดขึ้นจากความสัมพันธ์ระหว่างขนาดกับการตอบสนองความเป็นพิษ (dose-response toxicity)

ตารางที่ 4.1 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เมื่อสัมผัสสารทดสอบ 24 ชั่วโมง ด้วยวิธีการเอ็มทีที (n = 16 ทำการทดลอง 2 ชุด ๆ ละ 8 ครั้ง)

สารทดสอบ	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรขณะสัมผัสเซลล์											10% H_2O_2
	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1	
แอนโทไซยานิน	100.0 ± 2.4	91.1 ± 3.8	89.9 ± 3.3	89.0 ± 4.5	85.1 ± 4.9	81.0 ± 2.3	79.4 ± 2.3	76.5 ± 3.6	72.6 ± 2.5	66.8 ± 5.9	59.6 ± 4.8	45.2 ± 2.7
นาโนซีโอไลต์	100.0 ± 8.3	95.0 ± 4.7	88.7 ± 5.2	84.6 ± 5.2	81.0 ± 10.1	79.8 ± 8.1	74.7 ± 6.5	70.9 ± 6.9	65.6 ± 4.9	54.4 ± 8.1	48.5 ± 7.6	38.4 ± 16.4
สารประกอบเชิงซ้อน	100.0 ± 13.1	95.1 ± 16.7	86.1 ± 8.3	82.1 ± 9.2	81.2 ± 11.7	76.6 ± 12.5	72.2 ± 12.5	67.9 ± 12.4	68.0 ± 10.9	70.4 ± 9.1	64.6 ± 15.2	37.9 ± 22.1

ตารางที่ 4.2 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์เคอราติโนไซต์ เมื่อสัมผัสสารทดสอบ 24 ชั่วโมง ด้วยวิธีการเอ็มทีที (n = 16 ทำการทดลอง 2 ชุด ๆ ละ 8 ครั้ง)

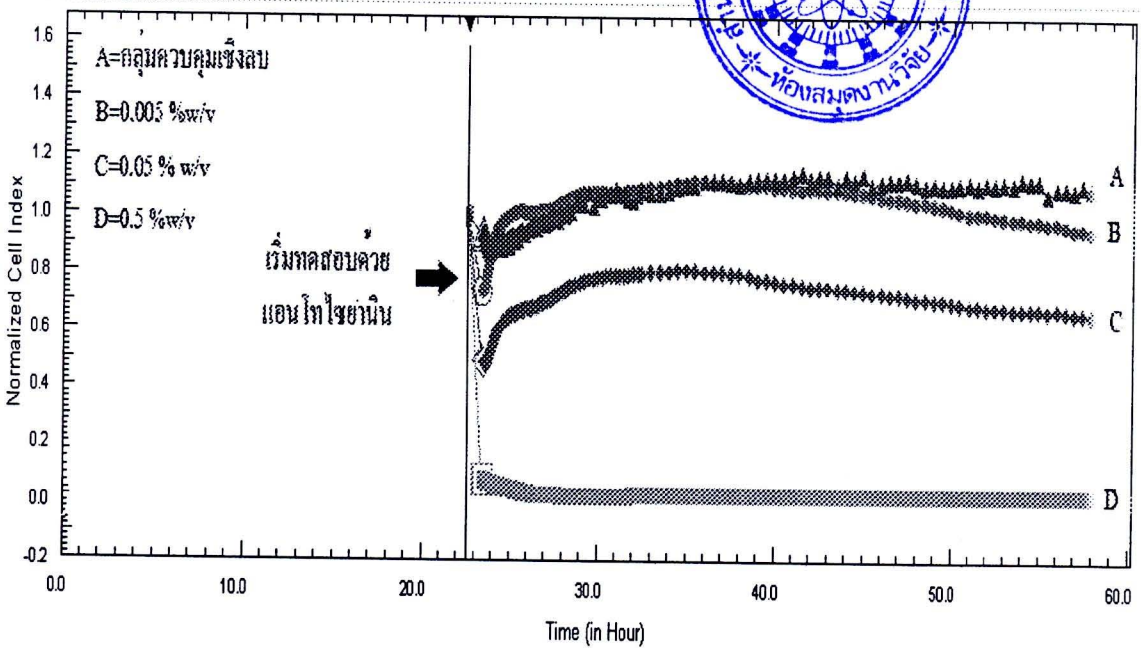
สารทดสอบ	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรขณะสัมผัสเซลล์											10% H_2O_2
	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1	
แอนโทไซยานิน	100.0 ± 18.6	87.6 ± 8.4	82.3 ± 9.3	76.2 ± 14.1	70.3 ± 8.6	71.2 ± 13.5	66.6 ± 10.2	65.4 ± 8.3	58.0 ± 10.0	60.6 ± 5.1	56.2 ± 6.2	45.1 ± 10.7
นาโนซีโอไลต์	100.0 ± 4.0	94.6 ± 8.1	92.1 ± 11.2	83.0 ± 6.0	88.5 ± 16.5	76.1 ± 4.2	78.7 ± 31.2	70.5 ± 16.4	68.5 ± 5.8	52.1 ± 2.1	48.5 ± 11.7	41.8 ± 7.5
สารประกอบเชิงซ้อน	100.0 ± 7.2	99.0 ± 11.9	93.3 ± 7.1	91.3 ± 3.3	80.4 ± 9.7	78.3 ± 12.6	75.4 ± 12.9	71.1 ± 14.5	68.1 ± 12.5	57.0 ± 8.0	54.0 ± 5.1	41.1 ± 6.3

4.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยการติดตามแบบต่อเนื่องของเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงโดยระบบเอ็กเซลลิเจนซ์

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษต่อผิวหนังของแอนโทไซยานิน นาโนซีโอไลต์และสารประกอบเชิงซ้อนใช้เซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง 2 ชนิด คือเซลล์เคอราติโนไซต์ และไฟโบรบลาสต์เมื่อเปรียบเทียบกันเซลล์ทั้งสองมีการทำงานต่างกันและมีรายละเอียดต่างกัน ในที่นี้ยกตัวอย่างโปรตีนที่ผนังเซลล์ของเคอราติโนไซต์กับไฟโบรบลาสต์ตัวหนึ่งชื่อ EGF (Epidermal Growth Factor) เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่สามารถกระตุ้นการสร้างเซลล์ผิวหนังใหม่ ทำให้เซลล์ผิวหนังเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนของเซลล์ โดยในเซลล์เคอราติโนไซต์มี EGF receptor จำนวนมากกว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Rodrigo B, Jean B, Tom C &Rolf M, 1985) ดังนั้นจากผลการทดสอบ cytotoxicity ของเซลล์ทั้งสอง เมื่อเปรียบเทียบกันจะพบว่าค่า IC_{50} ของเซลล์เคอราติโนไซต์ในการทดสอบสารทั้ง 3 ชนิดมีค่ามากกว่าในการทดสอบด้วยเซลล์โบรบลาสต์

เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ ระบบเอ็กเซลลิเจนซ์ (xCELLigence system) ซึ่งเป็นเครื่องมือเป็นที่ใช้ในการวิเคราะห์เซลล์แบบเวลาจริง ระบบจะติดตามและตรวจดูการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของเซลล์ในทุกช่วงเวลาที่ทำการทดสอบ โดยการวัดความต้านทานที่เกิดขึ้นอาศัยมีอุปกรณ์ที่มีอิเล็กโทรดรับสัญญาณความต้านทานบรรจุอยู่ ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ทดสอบในถาดเลี้ยงเซลล์ (E-plate 96) ที่เคลือบด้วยทองคำบริเวณก้นหลุมเพื่อนำสัญญาณไฟฟ้าวางอยู่บนอุปกรณ์ เมื่อมีเซลล์เกาะอยู่ก้นหลุมของถาดเลี้ยงเซลล์จะมีแรงต้านทานเกิดขึ้น โดยแรงต้านที่เกิดขึ้นแปรผันตามจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่เกาะอยู่ หลักการคือมีการปล่อยกระแสไฟฟ้า 20 มิลลิโวลต์ ไปบนถาดที่ใช้เลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วยทองคำบริเวณก้นหลุม การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับเซลล์จะเป็นผลให้เกิดการเปลี่ยนกระแสไฟฟ้า และจะแสดงค่าความสัมพันธ์ในรูปของกราฟ โดยเส้นกราฟจะแสดงถึงการติดตามการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเซลล์ทุกเวลา ในที่นี้แกน x แสดงเวลาเป็นชั่วโมง และแกน y แสดงค่าดัชนีเซลล์ (CI) ซึ่ง ดัชนีเซลล์เป็นค่าที่ได้จากการวัดแรงต้านที่เกิดขึ้นจากการเกาะของเซลล์ที่ถาดเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วยทองคำ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย



ภาพที่ 4.1 ค่าดัชนีเซลล์โดยระบบเอ็กเซลลิเจนซ์ แสดงการติดตามการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เมื่อสัมผัสกับแอนโทไซยานิน (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร = ร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)

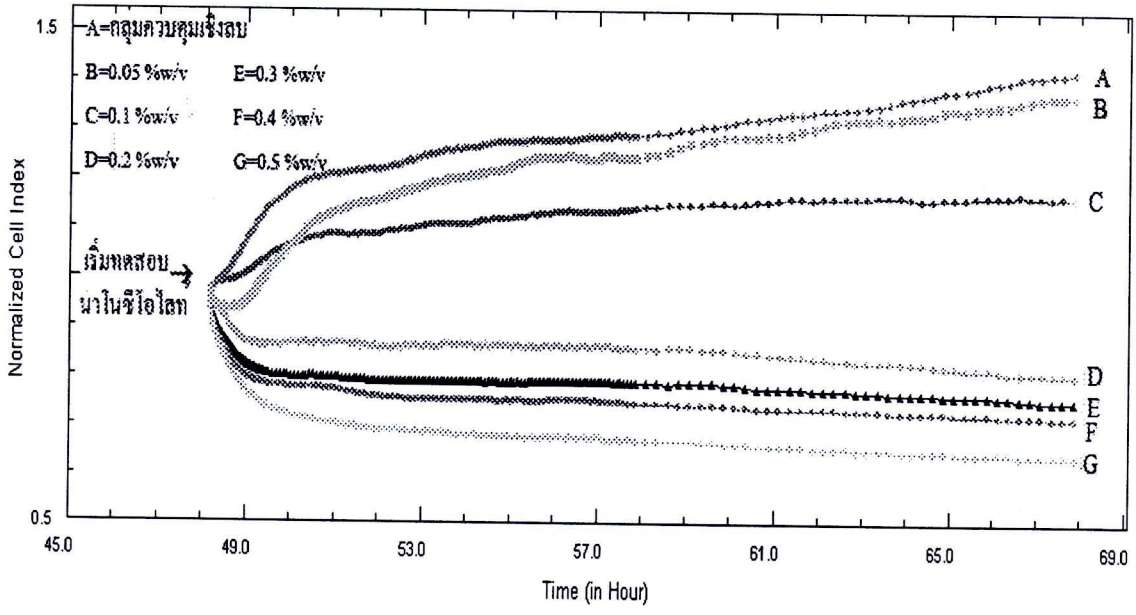
จากภาพที่ 4.1 ผลการศึกษาพบว่าเมื่อมีการบ่มเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ร่วมกับแอนโทไซยานินที่ความเข้มข้น คือ 0.05 0.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และได้ติดตามดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่เกิดขึ้นในต่อเนื่อง โดยในช่วง 0 - 23 ชั่วโมงแรกเซลล์ยังไม่ได้รับสัมผัสกับแอนโทไซยานิน เป็นช่วงที่เซลล์กำลังเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์ให้มีจำนวนมากจนกระทั่งเข้าสู่ระยะเพิ่มจำนวน (log phase) เป็นช่วงที่แสดงถึงการเติบโตเต็มพื้นผิวของแผ่นเพาะเลี้ยงตามที่ต้องการจึงเริ่มทำการทดสอบสาร เมื่อได้รับสารทดสอบที่เวลา 23 ชั่วโมง ค่าดัชนีเซลล์ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับการทดสอบที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีแนวโน้มลดต่ำลงในระยะเวลาตั้งแต่เริ่มหยอดสารจนถึงที่เวลา 60 ชั่วโมง แต่ในความเข้มข้นที่ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบการตายของเซลล์ทันทีที่ได้รับสัมผัสแอนโทไซยานิน จึงคาดว่ามีการตายของเซลล์เกิดขึ้นทันทีที่มีการสัมผัสกับแอนโทไซยานิน ดังนั้นที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์

เมื่อเปรียบเทียบกับค่าดัชนีเซลล์ของกลุ่มควบคุมเชิงลบ ที่แสดงให้เห็นถึงค่าดัชนีเซลล์ที่เพิ่มมากตลอดเวลาที่ทำการทดสอบ กับค่าดัชนีเซลล์ เมื่อทดสอบแอนโทไซยานินที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เห็นได้ว่าค่าดัชนีเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับขณะที่หยอดสารและมีลักษณะการเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกัน และจากภาพที่ 4.1 แสดงให้เห็นว่าค่าดัชนีเซลล์ที่ได้รับสัมผัสกับแอนโทไซยานินจะมีค่าลดต่ำลงเมื่อแอนโทไซยานินมีความเข้มข้นที่สูงมากขึ้น

ผลจากกราฟแสดงให้เห็นใน 10 ชั่วโมงแรกหลังเซลล์มีการสัมผัสกับแอนโทไซยานินในความเข้มข้น 0.05 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รวมถึงกลุ่มควบคุมเชิงลบ มีเส้นกราฟที่แสดงค่าดัชนีเซลล์ ที่ค่อย ๆ เพิ่มมากขึ้น แต่หลังจาก 10 ชั่วโมงแรก ค่าดัชนีเซลล์เริ่มลดต่ำลงในเซลล์ที่ได้รับสัมผัสกับแอนโทไซยานินที่ความเข้มข้น

0.05 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จนสิ้นสุดการทดลอง แต่ให้ผลที่ใกล้เคียงกับดัชนีเซลล์ของกลุ่มควบคุมเชิงลบ สามารถอธิบายได้ว่าแอนโทไซยานินที่ความเข้มข้นนี้ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์

จากการศึกษาครั้งนี้สามารถหาค่าความเข้มข้นของนาโนซีโอไลต์ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ได้ร้อยละ 50 ของเซลล์ทั้งหมด (IC_{50}) ได้เท่ากับ 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการคำนวณด้วยโปรแกรม RTCA software ดังแสดงในภาคผนวก อธิบายถึงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่แสดงถึงจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดต่ำลง เมื่อได้รับการสัมผัสกับแอนโทไซยานินที่ความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น



ภาพที่ 4.2 ค่าดัชนีเซลล์โดยระบบเอ็กเซลลิเจนซ์ แสดงการติดตามการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เมื่อสัมผัสกับนาโนซีโอไลต์ (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร = ร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)

จากภาพที่ 4.2 ผลการศึกษาพบว่าเมื่อมีการบ่มเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ร่วมกับนาโนซีโอไลต์ที่ความเข้มข้น คือ 0.5, 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และได้ติดตามดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่เกิดขึ้นในต่อเนื่องเป็นเวลา โดยในช่วง 0 - 48 ชั่วโมงแรกเซลล์ยังไม่ได้รับสัมผัสกับนาโนซีโอไลต์ เป็นช่วงที่เซลล์กำลังเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์ให้มีจำนวนมากพอจนกระทั่งเข้าสู่ระยะเพิ่มจำนวน เป็นช่วงที่แสดงถึงการเติบโตเต็มพื้นผิวของแผ่นเพาะเลี้ยงตามที่ต้องการ

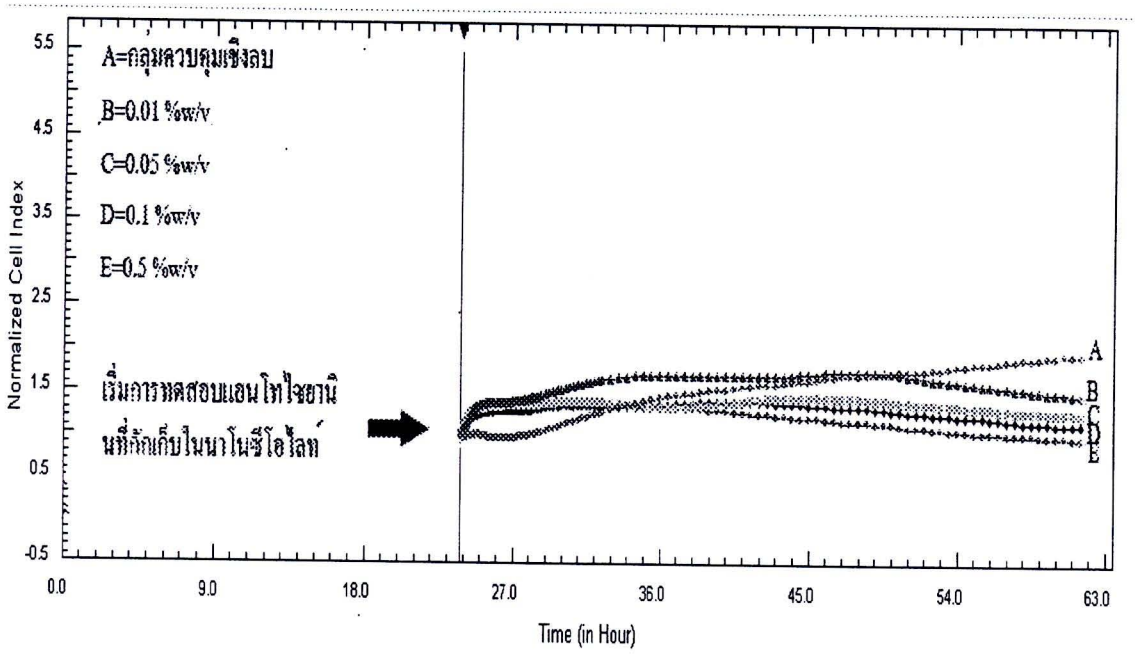
เมื่อได้รับสารทดสอบที่เวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบค่าดัชนีเซลล์ของกลุ่มควบคุมเชิงลบ ที่เพิ่มมากตลอดเวลาที่ทำการทดสอบ กับค่าดัชนีเซลล์ เมื่อทดสอบด้วยนาโนซีโอไลต์ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เห็นได้ว่าดัชนีเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับขณะที่หยอดสารและมีลักษณะการเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมเชิงลบซึ่งแสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของเซลล์แบบปกติที่ไม่ได้รับสัมผัสสารทดสอบใด ๆ

ผลจากกราฟแสดงให้เห็นใน 3 ชั่วโมงแรกหลังเซลล์มีการสัมผัสกับนาโนซีโอไลต์ในความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รวมถึงกลุ่มควบคุมเชิงลบ เส้นกราฟที่แสดงดัชนีเซลล์เพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็ว ใน 3 ชั่วโมงแรก ค่าดัชนีเซลล์ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับการทดสอบที่ความเข้มข้น 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อ

มิลลิลิตร มีแนวโน้มลดต่ำลงในระยะเวลาตั้งแต่เริ่มทดสอบสารจนถึงที่เวลา 68 ชั่วโมง สามารถอธิบายได้ว่านาโนซีโอไลต์ที่ความเข้มข้นนี้ มีผลทำให้เซลล์มีการลดการเจริญเติบโต และแบ่งจำนวนเซลล์ลง ดังนั้นนาโนซีโอไลต์ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์

เมื่อเปรียบเทียบค่าดัชนีเซลล์ของเซลล์ที่ได้รับสัมผัสกับนาโนซีโอไลต์จะมีค่าลดต่ำลงมากขึ้นเมื่อได้รับสัมผัสกับนาโนซีโอไลต์ที่มีความเข้มข้นที่สูงมากขึ้น เป็นไปในลักษณะความเป็นพิษสัมพันธ์กับขนาด

จากการศึกษาครั้งนี้สามารถหาค่าความเข้มข้นของนาโนซีโอไลต์ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ได้ร้อยละ 50 ของเซลล์ทั้งหมด (IC_{50}) ได้เท่ากับ 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการคำนวณด้วยโปรแกรม RTCA software ดังแสดงในภาคผนวก อธิบายถึงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่แสดงถึงจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดต่ำลง เมื่อได้รับการสัมผัสกับนาโนซีโอไลต์ที่ความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น



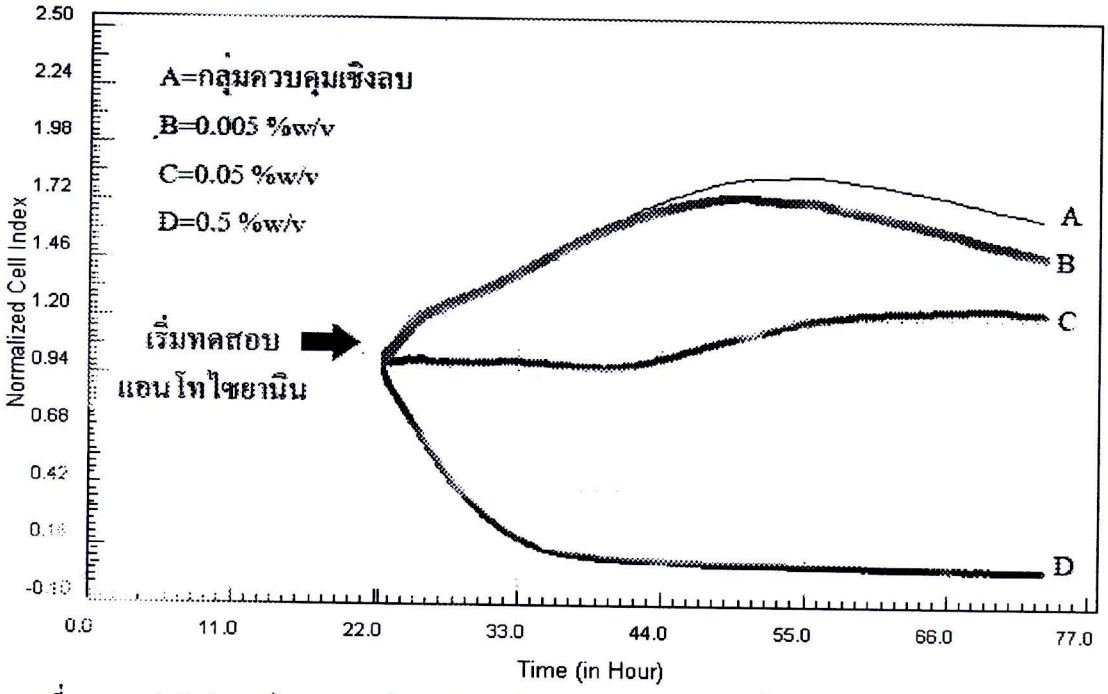
ภาพที่ 4.3 ค่าดัชนีเซลล์โดยระบบเอ็กเซลลิเจนซ์ แสดงการติดตามการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เมื่อสัมผัสกับสารประกอบเชิงซ้อน (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร = ร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)

จากภาพที่ 4.3 ผลการศึกษาพบว่าเมื่อมีการบ่มเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ร่วมกับสารประกอบเชิงซ้อนที่ความเข้มข้น คือ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ประกอบไปด้วยแอนโทไซยานิน 0.01 มิลลิกรัม และนาโนซีโอไลต์ 0.09 มิลลิกรัม) 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ประกอบไปด้วยแอนโทไซยานิน 0.05 มิลลิกรัม และนาโนซีโอไลต์ 0.45 มิลลิกรัม) 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ประกอบไปด้วยแอนโทไซยานิน 0.1 mg และ นาโนซีโอไลต์ 0.9 mg) และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ประกอบไปด้วยแอนโทไซยานิน 0.5 มิลลิกรัม และนาโนซีโอไลต์ 4.5 มิลลิกรัม) และได้ติดตามดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่เกิดขึ้นในต่อเนื่อง โดยในช่วง 0-24 ชั่วโมงแรกเซลล์ยังไม่ได้รับสัมผัสกับสารประกอบเชิงซ้อนเป็นช่วงที่เซลล์กำลังเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์ให้มีจำนวนมากพอสังเกตเห็นว่า

จนกระทั่งเข้าสู่ระยะเพิ่มจำนวนเป็นช่วงที่แสดงถึงการเติบโตเต็มพื้นผิวของแผ่นเพาะเลี้ยงตามที่ต้องการ เมื่อได้รับสารทดสอบที่เวลา 24 ชั่วโมง ค่าดัชนีเซลล์ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับการทดสอบ จะมีค่าลดต่ำลงมากขึ้นเมื่อได้รับสัมผัสกับสารประกอบเชิงซ้อนที่มีความเข้มข้นที่สูงมากขึ้น เป็นไปในลักษณะความเป็นพิษสัมพันธ์กับขนาด

ผลจากกราฟแสดงให้เห็นใน 3 ชั่วโมงแรกหลังเซลล์มีการสัมผัสกับสารประกอบเชิงซ้อนในทุกความเข้มข้น รวมถึงกลุ่มควบคุมเชิงลบ มีเส้นกราฟที่แสดงดัชนีเซลล์ เพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็ว และหลังจากนั้นก็จะค่อย ๆ ลดลงจนคงที่ แต่ในเซลล์กลุ่มควบคุมเชิงลบ มีค่าดัชนีเซลล์ที่เพิ่มมากขึ้นไปเรื่อย ๆ จนจบการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้สามารถหาค่าความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อนที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ได้ร้อยละ 50 ของเซลล์ทั้งหมด (IC_{50}) ได้เท่ากับ 1.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการคำนวณด้วยโปรแกรม RTCA software ดังแสดงในภาคผนวก อธิบายถึงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่แสดงถึงจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดต่ำลง เมื่อได้รับการสัมผัสกับสารประกอบเชิงซ้อนที่ความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น



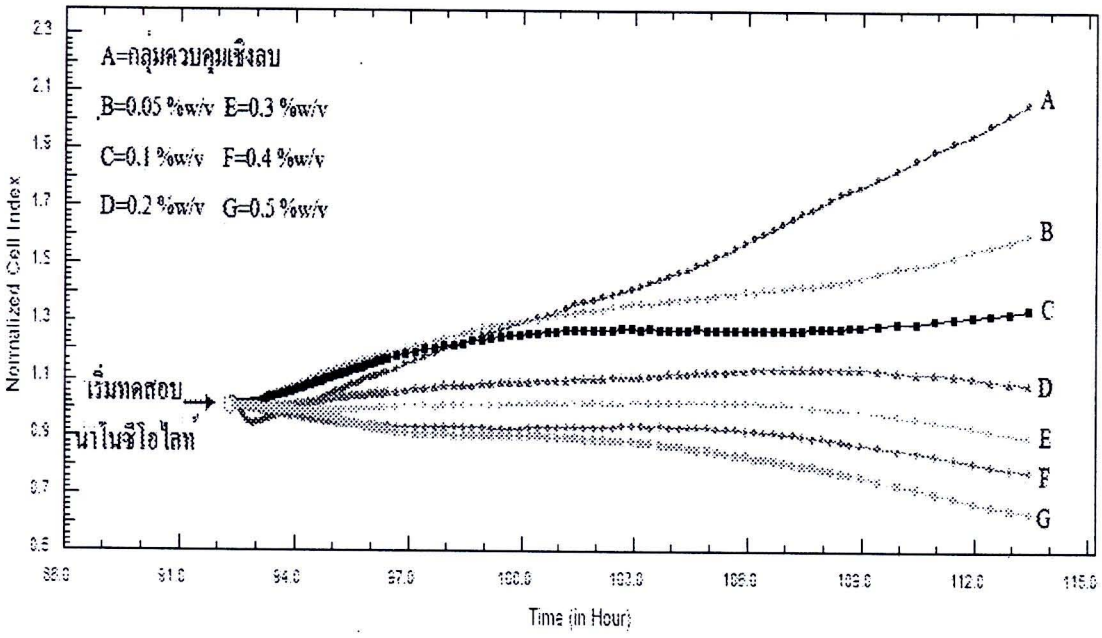
ภาพที่ 4.4 ค่าดัชนีเซลล์โดยระบบเอ็กเซลลิเจนซ์ แสดงการติดตามการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เคอราติโนไซต์เมื่อสัมผัสกับแอนโทไซยานิน (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร = ร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)

จากภาพที่ 4.4 ผลการศึกษาพบว่าเมื่อมีการบ่มเลี้ยงเซลล์เคอราติโนไซต์ร่วมกับแอนโทไซยานินที่ ความเข้มข้น คือ 0.05, 0.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และได้ติดตามดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่เกิดขึ้นในต่อเนื่อง โดยในช่วง 0 - 22 ชั่วโมงแรกเซลล์ยังไม่ได้รับสัมผัสกับแอนโทไซยานิน เป็นช่วงที่เซลล์กำลังเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์ให้มีจำนวนมากพอจนกระทั่งเข้าสู่ระยะเพิ่มจำนวน เป็นช่วงที่แสดงถึงการเติบโตเต็มพื้นผิวของแผ่นเพาะเลี้ยงตามที่ต้องการจึงเริ่มทำการทดสอบสาร เมื่อได้รับสารทดสอบที่เวลา 22 ชั่วโมง ค่าดัชนีเซลล์ของเซลล์ที่ได้รับการทดสอบที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีแนวโน้มลดต่ำลงในระยะเวลาตั้งแต่เริ่มทดสอบสารจนถึงที่เวลา 44 ชั่วโมง และหลังจากนั้นค่าดัชนีเซลล์ ค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจนเสร็จสิ้นการทดลอง

แต่ก็ยังต่ำกว่าค่าดัชนีเซลล์ของกลุ่มควบคุมเชิงลบ แต่เมื่อทดสอบด้วยแอนโทไซยานินด้วยความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบการตายของเซลล์ทันทีที่ได้รับสัมผัสแอนโทไซยานิน แสดงให้เห็นถึงค่าดัชนีเซลล์ที่ลดลงอย่างรวดเร็ว ทันทีที่มีเซลล์ได้สัมผัสกับสาร จึงคาดว่ามีการตายของเซลล์เกิดขึ้นทันทีที่มีการสัมผัสกับแอนโทไซยานิน

เปรียบเทียบกับค่าดัชนีเซลล์ของกลุ่มควบคุมเชิงลบ ที่แสดงถึงค่าดัชนีเซลล์ที่เพิ่มมากตลอดเวลาที่ทำการทดสอบ กับค่าดัชนีเซลล์ เมื่อทดสอบแอนโทไซยานินที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เห็นได้ว่าดัชนีเซลล์ เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับขณะที่หยอดสารและมีลักษณะการเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกัน ซึ่งผลจากกราฟแสดงให้เห็นในระยะแรกหลังจากเซลล์มีการสัมผัสกับแอนโทไซยานินในความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รวมถึงกลุ่มควบคุมเชิงลบ มีเส้นกราฟที่แสดงค่าดัชนีเซลล์ ที่ค่อยๆเพิ่มมากขึ้น และจนถึงชั่วโมงที่ 44 ค่าดัชนีเซลล์ ค่อย ๆ ลดต่ำลง สามารถอธิบายได้ว่าแอนโทไซยานินที่ความเข้มข้นนี้ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์

การศึกษานี้สามารถหาค่าความเข้มข้นของแอนโทไซยานินที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เคอราติโนไซต์ได้ร้อยละ 50 ของเซลล์ทั้งหมด (IC_{50}) ได้เท่ากับ 1.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการคำนวณด้วยโปรแกรม RTCA software ดังแสดงในภาคผนวก อธิบายถึงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่แสดงถึงจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดต่ำลง เมื่อได้รับการสัมผัสกับแอนโทไซยานินที่ความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น



ภาพที่ 4.5 ค่าดัชนีเซลล์โดยระบบเอ็กเซลลิเจนซ์ แสดงการติดตามการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เคอราติโนไซต์เมื่อสัมผัสกับนาโนซีโอไลต์ (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร = ร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)

จากภาพที่ 4.5 ผลการศึกษาพบว่าเมื่อมีการบ่มเลี้ยงเซลล์เคอราติโนไซต์ ร่วมกับสารละลายนาโนซีโอไลต์ที่ความเข้มข้น คือ 0.5, 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และได้ติดตามดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่เกิดขึ้นในต่อเนื่องเป็นเวลา โดยในช่วง 0 - 92 ชั่วโมงแรกเซลล์ยังไม่ได้รับสัมผัสกับนาโนซีโอไลต์ เป็นช่วงที่เซลล์กำลังเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์ให้มีจำนวนมากพอจนกระทั่งเข้าสู่ระยะเพิ่มจำนวน เป็นช่วงที่แสดงถึงการเติบโตเต็มพื้นผิวของแผ่นเพาะเลี้ยงตามที่ต้องการ

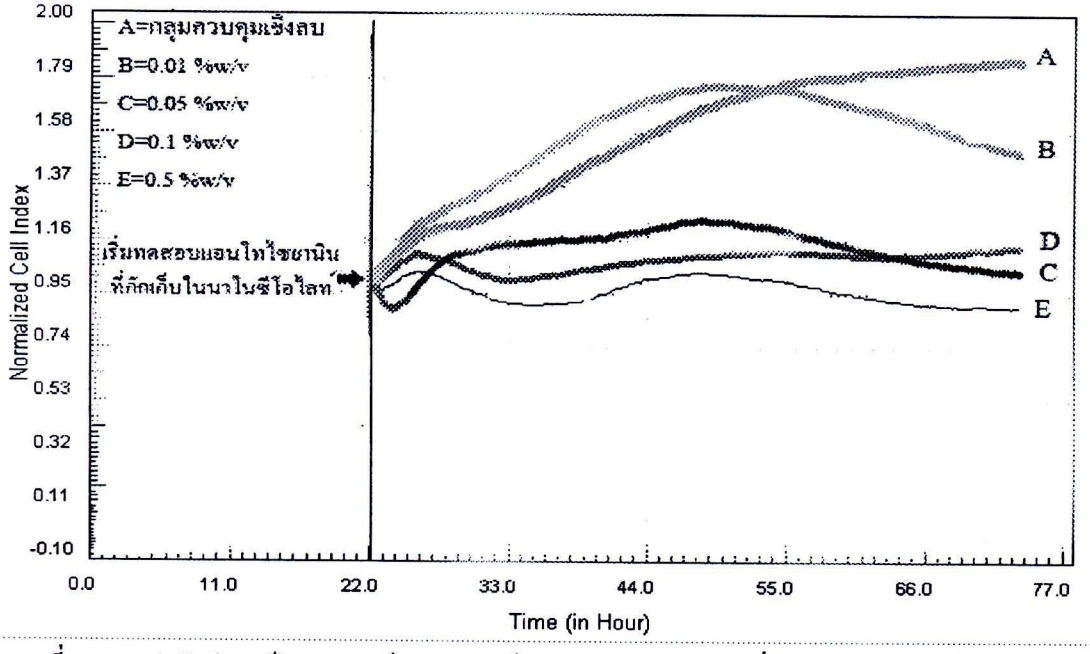
เมื่อได้รับสารทดสอบ ค่าดัชนีเซลล์ของเซลล์เคอราติโนไซต์ที่ได้รับการทดสอบที่ความเข้มข้น 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีแนวโน้มลดต่ำลงในระยะเวลาตั้งแต่เริ่มทดสอบสารจนเสร็จสิ้นการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับค่าดัชนีเซลล์ของกลุ่มควบคุมเชิงลบ ที่แสดงถึงค่าดัชนีเซลล์ที่เพิ่มมากตลอดเวลาที่ทำการทดสอบ

ผลการทดสอบด้วยนาโนซีโอไลต์ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เห็นได้ว่าดัชนีเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับขณะที่ทดสอบสารและมีลักษณะการเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ ซึ่งแสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของเซลล์แบบปกติที่ไม่ได้รับสัมผัสสารทดสอบใด ๆ และเมื่อเปรียบเทียบค่าดัชนีเซลล์ของเซลล์ที่ได้รับสัมผัสกับนาโนซีโอไลต์จะมีค่าลดต่ำลงมากขึ้นเมื่อนาโนซีโอไลต์มีความเข้มข้นที่สูงมากขึ้น สามารถสรุปได้ว่า เมื่อสารละลายนาโนซีโอไลต์มีความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้นกว่า 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ก็จะส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์เคอราติไนไซต์เพิ่มมากขึ้นจากการลดจำนวนลงของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่

ซึ่งผลจากกราฟแสดงให้เห็นใน 5 ชั่วโมงแรกหลังเซลล์มีการสัมผัสกับนาโนซีโอไลต์ในความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รวมถึงกลุ่มควบคุมเชิงลบ มีเส้นกราฟที่แสดงค่าดัชนีเซลล์ เพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากเมื่อเซลล์ได้รับสัมผัสกับนาโนซีโอไลต์ แสดงให้เห็นว่าเซลล์เคอราติโนไซต์มีการเจริญโต และแบ่งตัวได้อย่างรวดเร็ว แต่เมื่อหลังจาก 5 ชั่วโมงแรก ค่าดัชนีเซลล์ก็ค่อย ๆ ลดต่ำลง และคงที่จนจบการทดลอง แต่ในกลุ่มควบคุมเชิงลบค่าดัชนีเซลล์ เพิ่มต่อไปเรื่อย ๆ จนจบการทดลอง ดังนั้นในช่วงแรกของการทดสอบด้วยนาโนซีโอไลต์ที่ความเข้มข้นนี้ไม่มีผลเป็นพิษต่อเซลล์ แต่เมื่อเซลล์ได้รับสัมผัสเป็นเวลานานขึ้น ส่งผลให้ก่อความเป็นพิษต่อเซลล์ได้

เมื่อทดสอบด้วยนาโนซีโอไลต์ที่ความเข้มข้น 2 – 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงค่าดัชนีเซลล์ของเซลล์เคอราติโนไซต์ลดลงอย่างรวดเร็วทันทีที่มีเซลล์ได้รับสัมผัส จะเห็นได้จากว่ากราฟที่แสดงค่าดัชนีเซลล์นั้นต่ำกว่าเส้นกราฟของค่าดัชนีเซลล์ของกลุ่มควบคุมเชิงลบ จึงคาดว่ามีการตายของเซลล์เกิดขึ้นทันทีที่มีการสัมผัสกับนาโนซีโอไลต์

การศึกษานี้สามารถหาค่าความเข้มข้นของนาโนซีโอไลต์ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เคอราติโนไซต์ได้ร้อยละ 50 ของเซลล์ทั้งหมด (IC_{50}) ได้เท่ากับ 0.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการคำนวณด้วยโปรแกรม RTCA software ดังแสดงในภาคผนวก อธิบายถึงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่แสดงถึงจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดต่ำลง เมื่อได้รับการสัมผัสกับนาโนซีโอไลต์ที่ความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น



ภาพที่ 4.6 ค่าดัชนีเซลล์โดยระบบเอ็กเซลลิเจนซ์ แสดงการติดตามการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เคอราติโนไซต์เมื่อสัมผัสกับสารประกอบเชิงซ้อน (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร = ร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)

จากภาพที่ 4.6 ผลการศึกษาพบว่าเมื่อมีการบ่มเลี้ยงเซลล์เคอราติโนไซต์ ร่วมกับสารประกอบเชิงซ้อนที่ความเข้มข้น คือ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ประกอบไปด้วยแอนโทไซยานิน 0.01 มิลลิกรัม และนาโนซีโอไลต์ 0.09 มิลลิกรัม) 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ประกอบไปด้วยแอนโทไซยานิน 0.05 มิลลิกรัม และนาโนซีโอไลต์ 0.45 มิลลิกรัม) 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ประกอบไปด้วยแอนโทไซยานิน 0.1 mg และ นาโนซีโอไลต์ 0.9 mg) และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ประกอบไปด้วยแอนโทไซยานิน 0.5 มิลลิกรัม และนาโนซีโอไลต์ 4.5 มิลลิกรัม) และได้ติดตามดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่เกิดขึ้นในต่อเนื่อง โดยในช่วง 0 - 22 ชั่วโมงแรกเซลล์ยังไม่ได้รับสัมผัสกับสารประกอบเชิงซ้อนเป็นช่วงที่เซลล์กำลังเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์ให้มีจำนวนมากพอจนกระทั่งเข้าสู่ระยะเพิ่มจำนวน เป็นช่วงที่แสดงถึงการเติบโตเต็มพื้นผิวของแผ่นเพาะเลี้ยงตามที่ต้องการ

เมื่อได้รับสารทดสอบที่เวลา 22 ชั่วโมง ค่าดัชนีเซลล์ของเซลล์เคอราติโนไซต์ที่ได้รับสารทดสอบที่ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีแนวโน้มลดต่ำลงในระยะเวลาตั้งแต่เริ่มทดสอบสารจนถึงเวลาที่ 77 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับค่าดัชนีเซลล์ ของกลุ่มควบคุมเชิงลบ ที่แสดงถึงค่าดัชนีเซลล์ที่เพิ่มมากตลอดเวลาที่ทำการทดสอบ

เมื่อทดสอบด้วยสารประกอบเชิงซ้อนที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เห็นได้ว่าดัชนีเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับขณะที่หยอดสารและมีลักษณะการเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมเชิงลบซึ่งแสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของเซลล์แบบปกติที่ไม่ได้รับสัมผัสสารทดสอบใด ๆ จนกระทั่งในชั่วโมงที่ 54 เซลล์เริ่มมีการลดจำนวนลงจนจบการทดลอง

ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงค่าดัชนีเซลล์ที่ได้รับสัมผัสกับสารประกอบเชิงซ้อนจะมีค่าลดต่ำลงเมื่อเซลล์ได้รับสัมผัสกับสารประกอบเชิงซ้อนที่ความเข้มข้นสูงมากขึ้น ซึ่งสัมพันธ์กันในลักษณะความเป็นพิษขึ้นกับขนาด (dose response toxicity) ซึ่งค่าดัชนีเซลล์จากกราฟนี้สามารถสรุปได้ว่า เมื่อสารประกอบเชิงซ้อนมีความเข้มข้น

เพิ่มมากขึ้นกว่า 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ก็จะส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงเพิ่มมากขึ้น แสดงได้จากการลดจำนวนลงของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่

ผลจากกราฟแสดงให้เห็นใน 3 ชั่วโมงแรก หลังเซลล์มีการสัมผัสกับสารประกอบเชิงซ้อนในทุกความเข้มข้น รวมถึงกลุ่มควบคุมเชิงลบ มีเส้นกราฟที่แสดงดัชนีเซลล์ เพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็ว และเมื่อหลังจาก 3 ชั่วโมงแรก ค่าดัชนีเซลล์ เริ่มลดต่ำลงจนกระทั่งจบการทดลอง ในเซลล์ที่ได้รับสัมผัสกับสารประกอบเชิงซ้อนที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถอธิบายได้ว่าสารประกอบเชิงซ้อนที่ความเข้มข้นนี้ มีผลทำให้เซลล์เริ่มมีการลดการเจริญเติบโต และแบ่งจำนวนเซลล์ลดลง

ผลการทดลองในเซลล์ที่ได้รับสัมผัสกับสารประกอบเชิงซ้อนที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าดัชนีเซลล์ ที่แสดงนั้นเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ แสดงว่าเซลล์สามารถเจริญเติบโตและแบ่งตัวได้ภายใต้สภาวะนี้ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบที่แสดงดัชนีเซลล์ที่เพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ แสดงให้เห็นว่าสารประกอบเชิงซ้อนที่ความเข้นข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่เป็นพิษต่อเซลล์

ผลการทดลองในเซลล์ที่ได้รับสัมผัสสารประกอบเชิงซ้อนที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นถึงดัชนีเซลล์ที่ลดลงอย่างรวดเร็ว หลังเซลล์ได้สัมผัสกับสาร จะเห็นได้จากว่ากราฟที่แสดงค่าดัชนีเซลล์นั้นต่ำกว่าเส้นกราฟของ ดัชนีเซลล์ของกลุ่มควบคุมเชิงลบ จึงคาดว่ามีการตายของเซลล์เกิดขึ้นทันทีที่มีการสัมผัสกับสาร

การศึกษาครั้งนี้สามารถหาค่าความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อนที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เคอราติโนไซต์ได้ร้อยละ 50 ของเซลล์ทั้งหมด (IC_{50}) ได้เท่ากับ 2.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการคำนวณด้วยโปรแกรม RTCA software ดังแสดงในภาคผนวก อธิบายถึงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่แสดงถึงจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดต่ำลง เมื่อได้รับการสัมผัสกับสารประกอบเชิงซ้อนที่ความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น

ตารางที่ 4.3 ค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ร้อยละ 50 ของเซลล์ทั้งหมด (IC_{50})

เซลล์ทดสอบ	ค่า IC_{50} (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	แอนโทไซยานิน	นาโนซีโอไลต์	สารประกอบเชิงซ้อน
ไฟโบรบลาสต์	1.4	0.8	1.9
เคอราติโนไซต์	1.7	0.9	2.7

ค่าความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อนที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ร้อยละ 50 ของเซลล์ทั้งหมด (IC_{50}) พบว่าเซลล์เคอราติโนไซต์มีค่า IC_{50} สูงกว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (ตารางที่ 4.3) แสดงให้เห็นถึงธรรมชาติของเซลล์เคอราติโนไซต์ ซึ่งเป็นเซลล์ที่อยู่ในผิวหนังชั้นหนังกำพร้าทำหน้าที่ปกป้องสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย ทำให้เซลล์เคอราติโนไซต์ทนต่อสารทดสอบได้มากกว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ซึ่งอยู่ในชั้นหนังแท้ ซึ่งอยู่ถัดลงไป เซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นั้นประกอบไปด้วยแอนโทไซยานินประมาณ 0.2 มิลลิกรัม และ นาโนซีโอไลต์ประมาณ 1.7 มิลลิกรัม ซึ่งเกินค่าความเข้มข้นที่ IC_{50}

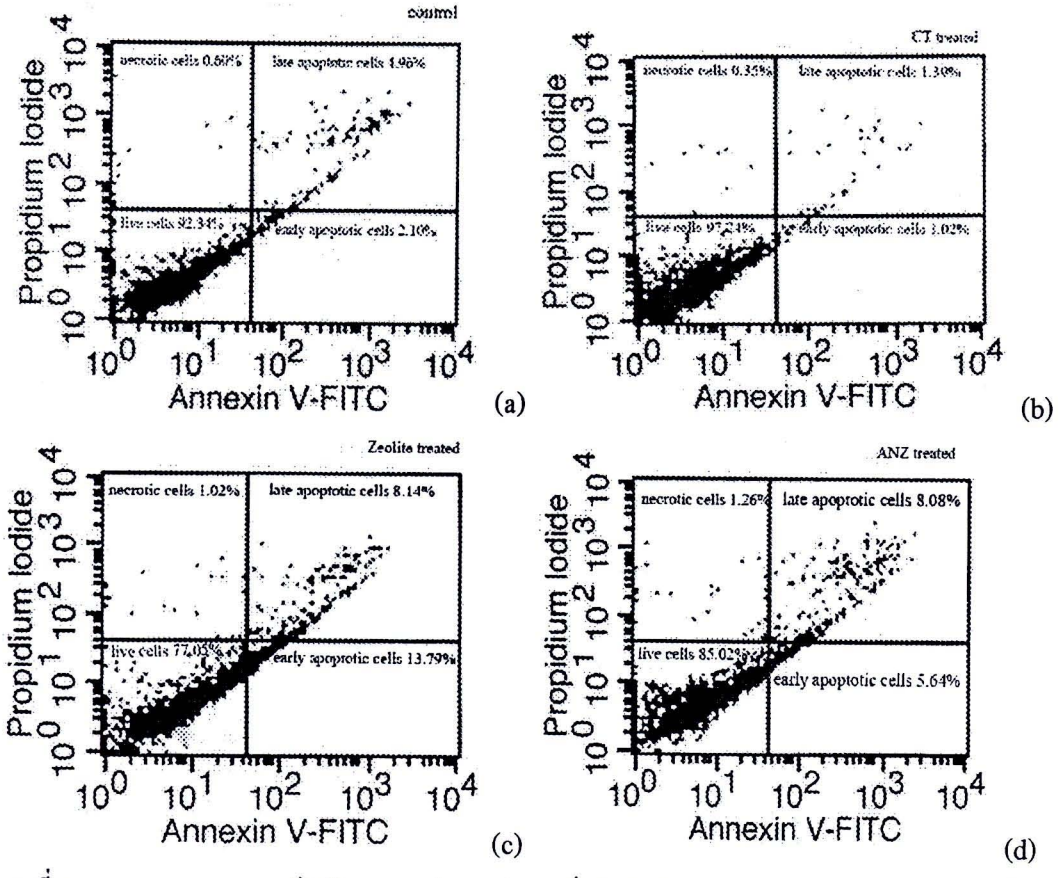
ของนาโนซีโอไลต์ แต่เมื่อมีการดูดซับแอนโทไซยานินเพียง 0.2 มิลลิกรัม ทำให้ค่าความเข้มข้นที่ IC_{50} ของสารประกอบเชิงซ้อนเพิ่มขึ้นมาเป็น 1.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์เคอราติโนไซต์ก็เช่นเดียวกัน ค่า IC_{50} ของสารประกอบเชิงซ้อนเท่ากับ 2.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งประกอบไปด้วยแอนโทไซยานินประมาณ 0.3 มิลลิกรัม และนาโนซีโอไลต์ประมาณ 2.4 มิลลิกรัม ซึ่งเกินค่าความเข้มข้นที่ IC_{50} ของนาโนซีโอไลต์ เมื่อเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน โดยการกักเก็บแอนโทไซยานินเข้าไปในรูพรุนก็ทำให้ค่า IC_{50} เพิ่มขึ้นมาเป็น 2.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างนาโนซีโอไลต์และแอนโทไซยานินทำให้พิษของแอนโทไซยานินที่เกิดต่อเซลล์ผิวหนังทั้ง 2 ชนิดลดลง โดยปกติแล้วนาโนซีโอไลต์เป็นสารที่นำมาดูดซับสารพิษ แต่นาโนซีโอไลต์เองก็มีพิษต่อเซลล์ผิวหนังในระดับหนึ่ง เมื่อมีการดูดซับแอนโทไซยานินก็ทำให้การเกิดพิษลดลงไปด้วย ซึ่งสารทั้งสองเสริมประโยชน์กัน จึงอาจเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการนำไปใช้พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์พร้อมใช้ในรูปแบบอนุภาคนาโนต่อไปในอนาคต

การนำเครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบ คือ ระบบเอ็กเซลลิเจนซ์ เข้ามาใช้ในงานวิจัย ซึ่งเป็นทางเลือกใหม่ในการวิเคราะห์เซลล์ วิธีการวัดโดยระบบเอ็กเซลลิเจนซ์จะทำให้เห็นจุดที่เซลล์เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงได้ชัดเจนกว่าตลอดการทดสอบนั้น เพื่อให้ได้ผลการศึกษาที่สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีวัดการมีชีวิตรอดของเซลล์แบบวิธีการเอ็มทีที เป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับในการวัดการมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง แต่วิธีการวัดนั้นจะวัดการอยู่รอดของเซลล์ที่จุดสิ้นสุดการทดสอบเท่านั้น ทำให้ไม่สามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ได้อย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังมีปัญหาของสีของสารเอ็มทีที ซึ่งใกล้เคียงกับสีของแอนโทไซยานินที่อาจมีผลรบกวนผลการทดลองด้วยนั้น จึงได้มี ผลการศึกษาที่ได้จากวิธีการทั้งสอง ให้ผลการศึกษาออกมาในแนวทางเดียวกัน คือ นาโนซีโอไลต์มีความพิษต่อเซลล์เคอราติไซต์มากที่สุดเช่นเดียวกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ในส่วนแอนโทไซยานินก็มีความพิษต่อเซลล์มากกว่าสารประกอบเชิงซ้อนแต่เมื่อนำนาโนซีโอไลต์มาดูดซับแอนโทไซยานินทำให้พิษต่อเซลล์จากนาโนซีโอไลต์ลดลง

4.3 การชักนำการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (apoptosis) โดยวิธีโฟลไซโทเมทรี (flow cytometry)

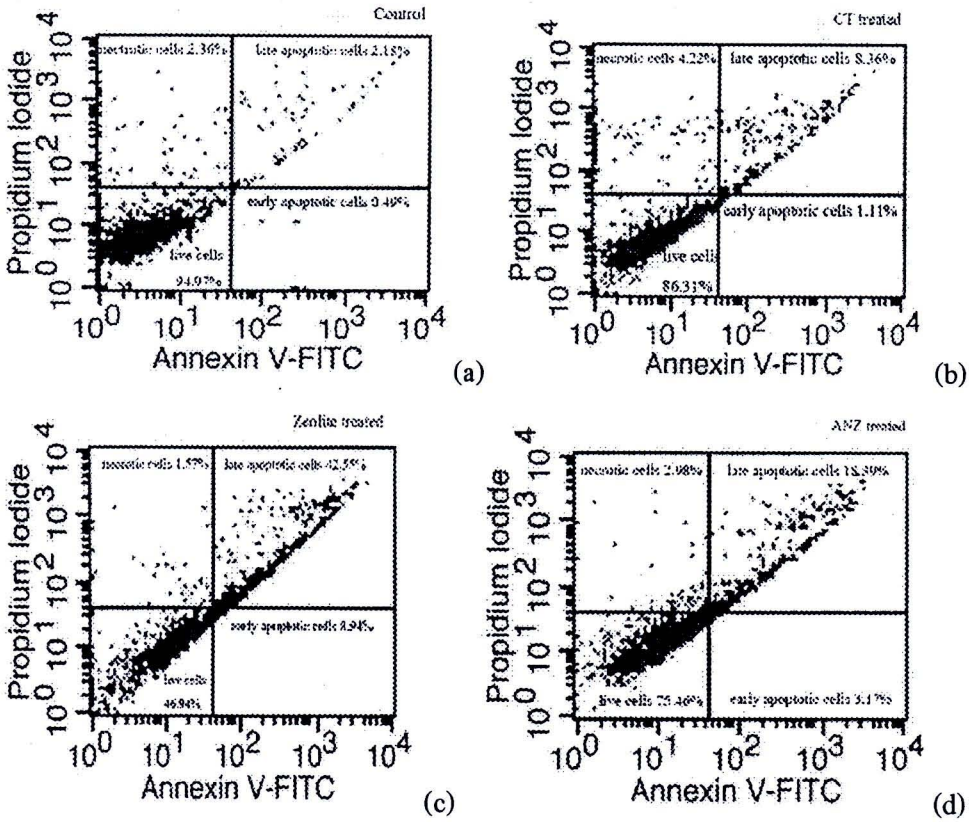
วิถีการชักนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (apoptosis) ในที่นี้เรียกว่าอะพอพโทซิส โดยหลักการโฟลไซโทเมทรี อาศัยการย้อมติดสีแอนเนกเซินไฟว์ (annexin V) และโพรพิเดียมไอโอไดด์ (propidium iodide) ซึ่งเกิดขึ้นกับเซลล์ที่เข้าสู่อะพอพโทซิสต่างระยะกัน คือ แอนเนกซินไฟว์แสดงสีในระยะแรกของอะพอพโทซิส ส่วนโพรพิเดียมไอโอไดด์แสดงสีในระยะอะพอพโทซิสตอนท้าย เมื่อเซลล์เข้าสู่อะพอพโทซิสระยะแรกเริ่มมีการสลายตัวบางส่วนของพลาสมาเมมเบรนทำให้โมเลกุลของฟอสฟาติดิลเซอรีน (phosphotidyl serine, PS) หลุดออกจากการเรียงตัวในพลาสมาเมมเบรนและยังไม่เคลื่อนที่ออกมานอกเซลล์ ดังนั้นพลาสมาเมมเบรนยังคงสภาพอยู่ แอนเนกซินไฟว์ สามารถเข้าไปในเซลล์จับกับประจุลบของฟอสฟาติดิลเซอรีนได้ในระยะนี้ แต่โพรพิเดียมไอโอไดด์ ไม่สามารถแทรกผ่านพลาสมาเมมเบรน แต่เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะสุดท้ายของอะพอพโทซิส (late apoptotic cell) จะมีการหดตัว ผนังเซลล์โป่งพอง โครมาตินจับตัวแน่น และมีการแตกย่อยของดีเอ็นเอ เซลล์ในระยะนี้จะสามารถย้อมนิวเคลียสด้วยสารโพรพิเดียมไอโอไดด์ แล้วจะสามารถจับกับสารเรืองแสงที่ใช้ในการทดสอบชื่อฟลูออเรสซิน (fluorescein) แล้วแสดงการเรืองแสงที่ความยาวคลื่นต่างกัน กล่าวคือให้แสงสีแตกต่างกันด้วย

จึงสามารถแยกแยะระยะของอะพอพโทซิสได้ การใช้เครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ช่วยให้สามารถนับจำนวนได้แม่นยำมากกว่าการอ่านด้วยตาเปล่า



ภาพที่ 4.7 การตายของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ระยะต่าง ๆ เมื่อสัมผัสกับ (a) กลุ่มควบคุมเชิงลบ (b) แอนโทไซยานิน 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (c) นาโนซีโอไลต์ 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (d) สารประกอบเชิงซ้อน 1.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยวิธีโฟลไซโทเมทรี

ภาพที่ 4.7 และ 4.8 แสดงผลการศึกษาในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ กับเซลล์เคอราติโนไซต์ตามลำดับ แต่ละช่องแสดงผลต่างกันตามการเรืองแสงจากการติดสีต่างกัน เซลล์ที่มีชีวิต (living cells) ไม่สามารถติดสีย้อมทั้งสองชนิดจัดอยู่ในช่องล่างซ้าย ช่องล่างขวาแสดงเซลล์เข้าสู่อะพอพโทซิสระยะแรก (early apoptotic cells) จากผลการย้อมติดสีของแอนเนกซินไฟว์ ช่องบนขวาแสดงเซลล์เข้าสู่อะพอพโทซิสระยะสุดท้าย (late apoptotic cells) จากผลการย้อมติดสีของการย้อมติดสีโพรพิเดียมไอโอไดด์ ส่วนช่องบนซ้ายแสดงการตายของเซลล์แบบไม่ใช้พลังงานที่เรียกว่าการตายเฉพาะส่วน (necrosis)



ภาพที่ 4.8 การตายของเซลล์เคอราติโนไซต์ ระยะต่าง ๆ เมื่อสัมผัสกับ (a) กลุ่มควบคุมเชิงลบ (b) แอนโทไซยานิน 1.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (c) นาโนซีโอไลต์ 0.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (d) สารประกอบเชิงซ้อน 2.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยวิธีโฟลไซโทเมทรี

เมื่อนำสารทดสอบแอนโทไซยานิน นาโนซีโอไลต์ และสารประกอบเชิงซ้อน ที่ความเข้มข้นที่ IC_{50} คือ 1.4, 0.8 และ 1.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งได้จากผลการทดสอบการกัดกร่อนของเซลล์ด้วยระบบเอ็กเซลลิเจนซ์มาทดสอบกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ พบว่านาโนซีโอไลต์ทำให้เซลล์ตายด้วยอะพอพโทซิสมากกว่าการตายเฉพาะส่วน คิดเป็นร้อยละ21.9 และ 1.02 ตามลำดับ โดยเป็นอะพอพโทซิสระยะแรกร้อยละ 13.8 และระยะสุดท้ายร้อยละ 8.1 ในขณะที่ไม่พบอะพอพโทซิสเมื่อทดสอบด้วยแอนโทไซยานินซึ่งเห็นได้จากร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต 97.2 มากกว่ากลุ่มควบคุมเชิงลบซึ่งมีร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต 92.3 ในขณะที่สารประกอบเชิงซ้อนทำให้เกิดอะพอพโทซิสมากกว่าการตายเฉพาะส่วน คิดเป็นร้อยละ 13.7 และ 1.3 ตามลำดับ จำแนกได้เป็นอะพอพโทซิสระยะแรก และระยะสุดท้ายร้อยละ 5.6 และ 8.1 ตามลำดับ

เมื่อนำสารทดสอบแอนโทไซยานิน นาโนซีโอไลต์ และสารประกอบเชิงซ้อนที่ความเข้มข้นที่ IC_{50} คือ 1.7, 0.9 และ 2.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งได้จากผลการทดสอบการกัดกร่อนของเซลล์ด้วยระบบเอ็กเซลลิเจนซ์มาทดสอบกับเซลล์เคอราติโนไซต์ นาโนซีโอไลต์พบเซลล์ตายด้วยอะพอพโทซิสมากกว่าการตายเฉพาะส่วนคิดเป็นร้อยละ 51.5 และ 1.6 ตามลำดับ เป็นอะพอพโทซิสระยะแรกน้อยกว่าระยะสุดท้าย คือ ร้อยละ 8.9 และ 42.6 ตามลำดับ ส่วนแอนโทไซยานินพบอะพอพโทซิสและการตายเฉพาะส่วน ร้อยละ 9.5 และ 4.2 ตามลำดับ เป็นระยะแรกของอะพอพโทซิสร้อยละ 1.4 และระยะสุดท้ายร้อยละ 8.4 และสารประกอบเชิงซ้อน

ทำให้เกิดอะพอพโทซิสมากกว่าการตายเฉพาะส่วน ร้อยละ 21.6 และ 3 ตามลำดับ จำแนกได้เป็นอะพอพโทซิสระยะแรก และระยะสุดท้ายร้อยละ 3.2 และ 18.4 ตามลำดับ ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ร้อยละของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เมื่อศึกษาการชักนำการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส เมื่อทดสอบด้วยแอนโทไซยานิน นาโนซีโอไลต์ และสารประกอบเชิงซ้อนที่ความเข้มข้นที่ IC_{50}

กลุ่มของเซลล์	สารควบคุมเชิงลบ	แอนโทไซยานิน	นาโนซีโอไลต์	สารประกอบเชิงซ้อน
เซลล์ที่มีชีวิต	92.34	97.24	77.05	85.02
อะพอพโทซิสระยะแรก	2.10	1.02	13.79	5.64
อะพอพโทซิสระยะสุดท้าย	4.96	1.39	8.14	8.08
ตายเฉพาะส่วน	0.60	0.35	1.02	1.26

ตารางที่ 4.5 ร้อยละของเซลล์เคอราติโนไซต์เมื่อศึกษาการชักนำการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส เมื่อทดสอบด้วยแอนโทไซยานิน นาโนซีโอไลต์ และสารประกอบเชิงซ้อนที่ความเข้มข้นที่ IC_{50}

กลุ่มของเซลล์	สารควบคุมเชิงลบ	แอนโทไซยานิน	นาโนซีโอไลต์	สารประกอบเชิงซ้อน
เซลล์ที่มีชีวิต	94.97	86.31	46.94	75.46
อะพอพโทซิสระยะแรก	2.18	1.11	8.94	3.17
อะพอพโทซิสระยะสุดท้าย	0.49	8.36	42.55	18.39
ตายเฉพาะส่วน	2.36	4.22	1.57	2.98

จากผลการทดสอบนาโนซีโอไลต์มีผลทำให้เซลล์ทั้งสองชนิดเกิดการตายตามวิถีของอะพอพโทซิสมากที่สุด เซลล์เคอราติไนซต์เกิดการตายแบบเฉพาะส่วนมากกว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เนื่องจากนาโนซีโอไลต์เป็นอนุภาคขนาดนาโน เมื่อทดสอบกับเซลล์ทำให้นาโนซีโอไลต์เข้าไปคลุม และสัมผัสกับผนังเซลล์โดยตรง

ทำให้การทำงานของโปรตีนที่ผนังเซลล์ทำงานไม่ได้ ทำให้เซลล์ลดการเจริญเติบโตและลดการแบ่งตัวเมื่อทดสอบด้วยนาโนซีโอไลต์ ผลจากการทดสอบที่ได้ก็พบว่าแอนโทไซยานินนั้นไม่ได้ชักนำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และพบจำนวนเซลล์ตายน้อยเซลล์เคอราติโนไซต์ แต่เมื่อนาโนซีโอไลต์กักเก็บแอนโทไซยานินเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนทำให้ความเป็นพิษต่อเซลล์ทั้งสองชนิดลดลง เนื่องจากว่าแอนโทไซยานินไปมีผลลดความเป็นพิษจากนาโนซีโอไลต์ ทำให้เซลล์ทำงานดีกว่าเมื่อสัมผัสกับนาโนซีโอไลต์มีผลทำให้การตายของเซลล์แบบ อะพอนโทซิส ลดลงแสดงให้เห็นว่าเมื่อนำแอนโทไซยานินมากักเก็บในนาโนซีโอไลต์นั้นทำให้ความเป็นพิษต่อเซลล์ของนาโนซีโอไลต์ลดลงได้

จากการทดลองโดยใช้ค่าความเข้มข้นที่ IC_{50} ที่ได้การติดตามแบบต่อเนื่องของเซลล์เพาะเลี้ยงโดยระบบเอ็กเซลลิเจนซ์ แต่พบว่าไม่ได้มีความสัมพันธ์กับการชักนำให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส เห็นได้จากร้อยละการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสไม่ถึงร้อยละ 50 แสดงว่าสารทดสอบที่ทำให้เซลล์เกิดการตายไม่ได้เกิดจากวิถีการตายแบบอะพอพโทซิสทั้งหมด ซึ่งตามปกติแล้ววิถีการตายแบบอะพอพโทซิสเป็นกระบวนการที่สามารถเกิดขึ้นเองได้ภายในเซลล์เอง แต่สารทดสอบก็มีส่วนในการไปเร่งวิถีการตายแบบอะพอพโทซิสได้ในระดับหนึ่ง

4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์การระคายเคืองต่อเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง

ในส่วนของสารอักเสบที่เซลล์ผลิตเมื่อสัมผัสสารทดสอบเลือกวัดระดับของอินเตอร์ลิวคิน–1 แอลฟา (interleukin-1α, IL-1α) ที่ 15 นาที และ 48 ชั่วโมง ตามแนวทางของ OECD

การทดสอบฤทธิ์การระคายเคืองต่อเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงทั้งสองชนิดของแอนโทไซยานิน นาโนซีโอไลต์ สารประกอบเชิงซ้อน ตรวจสอบโดยการวัดระดับของสารอินเตอร์ลิวคิน-1 แอลฟา โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป (ELISA Development Kit) ซึ่งชุดทดสอบจะสามารถตรวจจับกับอินเตอร์ลิวคิน–1 แอลฟา โดยวัดหลังจากที่เซลล์รับสัมผัสสารเป็นเวลา 15 นาที และ 48 ชั่วโมง

ผลการทดสอบความระคายเคืองต่อผิวหนังโดยวัดระดับการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-1 แอลฟาของเซลล์ผิวหนังทั้งสองชนิด ซึ่งการตรวจวัดระดับอินเตอร์ลิวคิน-1 แอลฟา จะเป็นตัวชี้วัดว่าสารทดสอบเป็นสารก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังหรือไม่ ผลการศึกษาพบว่าการปลอดปล่อยระดับสาร อินเตอร์ลิวคิน-1 แอลฟา ของทั้งสองเซลล์ เป็นไปในลักษณะความเป็นพิษขึ้นกับขนาด คือ เมื่อรับสัมผัสกับสารที่มีความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น ระดับสาร อินเตอร์ลิวคิน-1 แอลฟา ที่วัดได้ก็มีปริมาณที่มากขึ้นด้วย และยังพบว่าเซลล์เคอราติโนไซต์มีการปลดปล่อยระดับสารอินเตอร์ลิวคิน-1 แอลฟา มากกว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เมื่อรับสัมผัสกับสารที่ความเข้มข้นเท่ากันและเวลาเท่ากัน เนื่องจากเซลล์เคอราติโนไซต์ โดยธรรมชาติเป็นเซลล์ปกป้อง ดังนั้นเมื่อมีการสัมผัสกับสารที่ก่อให้เกิดการระคายเคือง การตอบสนองจึงมากกว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์

ตารางที่ 4.6 ปริมาณอินเตอร์ลิวคิน-1 แอลฟา และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่หลั่งจากเซลล์เคอราติโนไซต์และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เมื่อรับสัมผัสกับสารโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต เป็นเวลา 15 นาที และ 48 ชั่วโมง ทำการทดลอง 2 ครั้ง (n=4)

ความเข้มข้นในอาหารเลี้ยงเซลล์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	อินเตอร์ลิวคิน - 1 แอลฟา (พิโกกรัมต่อมิลลิลิตร)			
	เซลล์เคอราติโนไซต์		เซลล์ไฟโบรบลาสต์	
	15 นาที	48 ชั่วโมง	15 นาที	48 ชั่วโมง
0.05	49.5 ± 3.8	44.9 ± 1.9	6.4 ± 4.3	33.2 ± 5.6
0.1	75.9 ± 4.3	68.4 ± 1.7	10.9 ± 2.6	43.5 ± 2.0
0.15	119.2 ± 3.2	130.9 ± 0.9	53.2 ± 4.5	80.6 ± 2.9
0.2	194.8 ± 2.0	337.4 ± 3.1	82.6 ± 1.6	96.7 ± 3.8

ในการทดสอบครั้งนี้ได้ใช้สารควบคุมเชิงบวก คือ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต เมื่อเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงได้รับสัมผัสกับสาร จะเห็นว่ามีการปลดปล่อยสาร อินเตอร์ลิวคิน-1 แอลฟา มากที่สุด เนื่องจากว่าสารโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเป็นสารที่ก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง เมื่อเซลล์สัมผัสกับโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเป็นเวลา 15 นาที ทำให้เกิดการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-1 แอลฟา ออกมามากจากเซลล์ทั้งสองชนิด โดยเฉพาะในเซลล์เคอราติโนไซต์ที่สัมผัสกับโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที และ 48 ชั่วโมง ทำให้เซลล์เกิดการหลั่งถึง 194.8 ± 2.0 และ 337.4 ± 3.1 พิโกกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และในเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลั่ง 82.6± 1.6 และ 96.7± 3.8 พิโกกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.6 เซลล์ทั้ง 2 ชนิด เมื่อได้รับสัมผัสกับสารโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดการระคายเคืองก็จะเกิดการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-1 แอลฟา แม้จะรับสัมผัสไปเพียง 15 นาที และเมื่อเซลล์สัมผัสกับโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก็ทำให้เซลล์เพิ่มการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-1 แอลฟา

ตารางที่ 4.7 ปริมาณอินเตอร์ลิวคิน - 1 แอลฟา และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่หลั่งจากเซลล์เคอราติโนไซต์และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เมื่อรับสัมผัสกับแอนโทไซยานิน เป็นเวลา 15 นาที และ 48 ชั่วโมง ทำการทดลอง 2 ครั้ง (n=4)

ความเข้มข้นของแอนโทไซยานินในอาหารเลี้ยงเซลล์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	อินเตอร์ลิวคิน - 1 แอลฟา (พิโกกรัมต่อมิลลิลิตร)			
	เซลล์เคอราติโนไซต์		เซลล์ไฟโบรบลาต์	
	15 นาที	48 ชั่วโมง	15 นาที	48 ชั่วโมง
0.05	18.2 ± 3.4	55.6 ± 0.7	1 ± 0.2	6.7 ± 2.1
0.1	41.4 ± 2.0	82.2 ± 4.5	0.6 ± 0.3	15.0 ± 3.8
0.2	60.9 ± 2.6	115.9 ± 3.2	1.4 ± 0.7	26.1 ± 6.2
0.3	115.6 ± 3.4	125.8 ± 1.9	3.4 ± 1.9	27.9 ± 1.5
0.4	126.9 ± 2.6	159.3 ± 2.0	5.9 ± 2.0	32.4 ± 4.4
0.5	128.0 ± 3.2	260.0 ± 4.9	6.6 ± 0.9	48.2 ± 1.8

ในการทดสอบด้วยแอนโทไซยานิน 15 นาที พบว่าเซลล์เคอราติโนไซต์ มีการหลั่งสารอินเตอร์ลิวคิน-1 แอลฟา มากที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรขึ้นไป เซลล์มีการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-1 แอลฟา 60.9 ± 2.6 พิโกกรัมต่อมิลลิลิตร และเพิ่มมากขึ้นจนถึง 128.0 พิโกกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อความเข้มข้นของแอนโทไซยานิน 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าแอนโทไซยานินเริ่มก่อให้เกิดการระคายต่อเซลล์เคอราติโนไซต์ที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ไม่พบการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-1 แอลฟา ในระดับที่ก่อให้เกิดระคายเคืองต่อเซลล์ของแอนโทไซยานิน และลักษณะในการหลั่งก็พบว่าเมื่อเซลล์สัมผัสกับแอนโทไซยานินที่ความเข้มที่สูงมากขึ้น เซลล์จะเกิดการหลั่งของอินเตอร์ลิวคิน-1 แอลฟามากขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 4.7 เมื่อเซลล์ทั้งสองชนิดรับสัมผัสสารเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่ามีการหลั่งของอินเตอร์ลิวคิน-1 แอลฟามากขึ้น พบความระคายเคืองต่อเซลล์เคอราติโนไซต์ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรขึ้นไป และไม่พบการหลั่งของอินเตอร์ลิวคิน-1 แอลฟา จนถึงระดับที่ก่อให้เกิดความระคายเคืองในเซลล์ไฟโบรบลาสต์

ตารางที่ 4.8 ปริมาณอินเตอร์ลิวคิน-1 แอลฟา และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่หลั่งจากเซลล์เคอราติโนไซต์ และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เมื่อรับสัมผัสกับนาโนซีโอไลต์ เป็นเวลา 15 นาที และ 48 ชั่วโมง ทำการทดลอง 2 ครั้ง (n=4)

ความเข้มข้นของนาโนซีโอไลต์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	อินเตอร์ลิวคิน - 1 แอลฟา (พิโกกรัมต่อมิลลิลิตร)			
	เซลล์เคอราติโนไซต์		เซลล์ไฟโบรบลาสต์	
	15นาที	48 ชั่วโมง	15นาที	48 ชั่วโมง
0.5	22.7 ± 2.4	21.3 ± 3.2	7.7 ± 2.8	18.1 ± 3.7
1	38.6 ± 3.8	27.4 ± 1.5	13.6 ± 3.3	24.2 ± 4.4
5	30.2 ± 1.5	70.5 ± 0.8	17.2 ± 1.6	26.6 ± 2.4
10	31.8 ± 4.4	85.9 ± 2.3	26.2 ± 4.6	25.5 ± 2.0

ในการทดสอบด้วยนาโนซีโอไลต์ในทุกความเข้มข้นไม่พบการหลั่งของอินเตอร์ลิวคิน-1 แอลฟา จนระดับที่ก่อให้เกิดความระคายเคืองต่อเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงทั้งสองชนิด โดยในเซลล์ทั้งสองชนิด พบว่ามีการหลั่งในระดับที่ไม่เกิน 40 พิโกกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเซลล์สัมผัสกับนาโนซีโอไลต์เป็นเวลา 15 นาที และเมื่อเซลล์สัมผัสนาโนซีโอไลต์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เซลล์เคอราติโนไซต์พบการระคายเคืองเพิ่มมากขึ้นที่ความเข้มข้น 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และไม่พบความระคายเคืองในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ดังแสดงในตารางที่ 4.8

เมื่อทดสอบด้วยสารประกอบเชิงซ้อน กลับพบว่าที่ความเข้มข้น 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์มีการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-1 แอลฟา ที่ 215.8 และ 274.4 พิโกกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในระดับที่ก่อให้เกิดความระคายเคืองต่อเซลล์เคอราติโนไซต์ แต่ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ไม่พบการหลั่งของอินเตอร์ลิวคิน-1 แอลฟา ในระดับที่ก่อให้เกิดความระคายเคือง เมื่อเซลล์สัมผัสกับสารเป็นเวลา 15 นาที ดังแสดงในตารางที่ 4.9 และเมื่อเซลล์สัมผัสกับสารประกอบเชิงซ้อนเป็นเวลา 48 ชั่วโมง กลับพบว่าที่ความเข้มข้น 1, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบความระคายเคืองต่อเซลล์เคอราติโนไซต์ แต่ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ไม่พบการระคายเคือง

ตารางที่ 4.9 ปริมาณอินเตอร์ลิวคิน-1 แอลฟา และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่หลั่งจากเซลล์เคอราติโนไซต์และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เมื่อรับสัมผัสกับสารประกอบเชิงซ้อน เป็นเวลา 15 นาที และ 48 ชั่วโมง ทำการทดลอง 2 ครั้ง (n=4)

ความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อนในอาหารเลี้ยงเซลล์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	อินเตอร์ลิวคิน - 1 แอลฟา (พิโกกรัมต่อมิลลิลิตร)			
	เซลล์เคอราติโนไซต์		เซลล์ไฟโบรบลาสต์	
	15 นาที	48 ชั่วโมง	15 นาที	48 ชั่วโมง
0.5	39.1 ± 2.3	46.8 ± 1.2	3.5 ± 2.7	20.4 ± 3.2
1	40.5 ± 4.6	81.4 ± 5.4	7.0 ± 2.5	27.0 ± 1.2
5	215.8 ± 4.6	106.0 ± 2.0	11.3 ± 2.4	34.2 ± 2.2
10	274.4 ± 3.7	163.1 ± 0.9	13.4 ± 3.0	38.8 ± 4.8

จากผลการทดสอบเมื่อเซลล์สัมผัสกับสารเป็นเวลา 15 นาที พบว่า นาโนซีโอไลต์ไม่ก่อการระคายเคืองต่อเซลล์ทั้งสองชนิด แต่เมื่อทดสอบด้วยแอนโทไซยานิน เซลล์เคอราติโนไซต์เริ่มมีการหลั่งสารอินเตอร์ลิวคิน-1 แอลฟา มากกว่า 60 พิโกกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และผลการทดสอบด้วยสารประกอบเชิงซ้อนก็ทำให้เซลล์เคอราติโนไซต์หลั่งอินเตอร์ลิวคิน-1 แอลฟา มากกว่า 60 พิโกกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อเซลล์สัมผัสกับสารเป็นเวลา 48 ชั่วโมงเซลล์เคอราติโนไซต์พบการระคายเคืองเพิ่มมากขึ้นที่ความเข้มข้น 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และไม่พบความระคายเคืองในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเป็นผลจากแอนโทไซยานินที่กักเก็บในนาโนซีโอไลต์ที่ทำให้เกิดการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-1 แอลฟา ของเซลล์เคอราติโนไซต์เพิ่มมากขึ้น

การศึกษาถึงฤทธิ์การระคายเคืองของสาร 3 ชนิด พบว่านาโนซีโอไลต์ทำให้เซลล์ผิวหนังเกิดการหลั่งของอินเตอร์ลิวคิน-1 แอลฟา น้อยที่สุดเมื่อเทียบกับการทดสอบด้วยแอนโทไซยานิน และแอนโทไซยานินที่กักเก็บในนาโนซีโอไลต์ ซึ่งในการทดสอบการกัดกร่อนต่อผิวหนังกลับพบว่านาโนซีโอไลต์มีพิษต่อเซลล์ผิวหนังมากที่สุด อาจเป็นไปได้ว่านาโนซีโอไลต์ทำให้เซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงตาย โดยเฉพาะกลไกการตายแบบอะพอพโทซิส ที่นาโนซีโอไลต์เหนี่ยวนำให้เกิดการตายมากที่สุดก่อนที่จะเกิดการหลั่ง อินเตอร์ลิวคิน-1 แอลฟา ทำให้ผลการทดสอบด้วยนาโนซีโอไลต์พบการหลั่งของอินเตอร์ลิวคิน-1 แอลฟาน้อยที่สุด

4.5 ผลการดูดซับแอนโทไซยานินด้วยนาโนซีโอไลต์

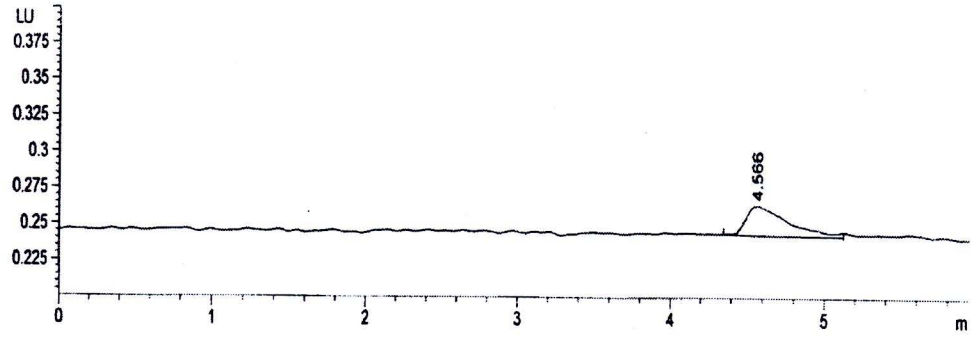
4.5.1 โครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC)

พัฒนาโดยอาศัย HPLC-UV spectrophotometry (Jungmin, Rennaker, & Wrolstad, 2008) นำวิธีการดังกล่าวมาพัฒนาให้เป็นการวิเคราะห์ที่ง่ายขึ้น เนื่องจากทำการวิเคราะห์ในสภาวะที่แตกต่างจากงานวิจัยอื่นซึ่งต้องการแยกวิเคราะห์สารที่มีโครงสร้างคล้ายกันอยู่ในตัวอย่างเดียวกัน แต่ในตัวอย่างการศึกษานี้มีสารเพียงชนิดเดียว มีการทดสอบปรับส่วนประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) โดยใช้เมทานอล (methanol)

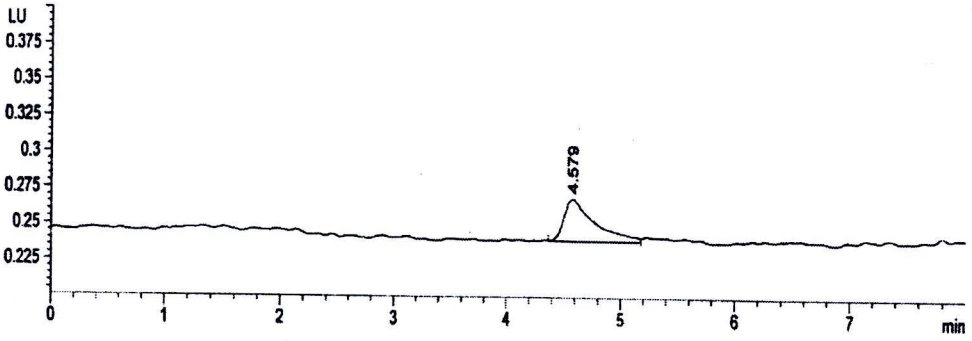
กับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) pH ต่าง ๆ พบว่าถ้าเมทานอลเพิ่มขึ้นเวลาคงอยู่ (retention time) จะช้ากว่าเมทานอลในปริมาณน่อยกว่า ถ้า pH เพิ่มขึ้นทำให้เวลาคงอยู่ออกมาช้ากว่า pH ต่ำ

ดังนั้นวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เลือกใช้ในการทดลองมีเมทานอลร้อยละ 30 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอชควบคุมให้มีอัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้คอลัมน์ซี 18 ชนิดเฟสกลับ (reverse phase C_{18} column) และอ่านผลด้วยเครื่องฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence detector) ที่ความยาวคลื่นระดับ(λexc)540 และความยาวคลื่นปลดปล่อย(λems)620 นาโนเมตร พีค(peak) ของแอนโทไซยานินที่สกัดจากดอกอัญชันสีน้ำเงินปรากฏที่เวลา (retention time) โดยเฉลี่ยและ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 4.56 ± 0.01 นาที (n = 6) ซึ่งแสดงตัวอย่างของพีค ของสารละลายแอนโทไซยานินสกัดจากดอกอัญชันความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในภาพที่ 4.9 พบพีคที่เวลา 4.566 นาที พื้นที่ใต้กราฟ 0.3445 LU.s จากภาพที่ 4.10 (a) และเปรียบเทียบกับ (b) เป็นพีคของเดลฟินิดีน (delphinidin) ปรากฏที่เวลา 4.579 นาที พื้นที่ใต้กราฟ 0.5535 LU.s โครมาโตแกรมของแอนโทไซยานินที่สกัดและแยกจากดอกอัญชันและเดลฟินิดีน มีความใกล้เคียงกันมากที่สุด

เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานอีกตัวหนึ่งของแอนโทไซยานิน คือ ไซยานิดิน (cyanidin) ซึ่งปรากฏพีคที่เวลา 4.63 สารมาตรฐานทั้งสองตัวนี้มีความแตกต่างกันในสูตรโครงสร้างตรงตำแหน่ง R_5(Castaneda-O et al., 2009; Jin-Ming et al., 2003) ทำให้มีความเป็นไปได้ที่ถูกชะพาด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ซึ่งใช้ในงานวิจัยนี้ออกมาปรากฏพีคที่เวลาต่างกัน ประกอบกับดอกอัญชันสีน้ำเงินให้แอนโทไซยานินโครงสร้างเดฟินิดินมากกว่าสารอื่น (Castaneda-O et al., 2009; Jin-Ming et al., 2003) ดังนั้นจึงสรุปในเบื้องต้นว่าแอนโทไซยานินที่สกัดจากดอกอัญชันเป็นเดลฟินิดีน การที่จะยืนยันว่าเป็นเดลฟินิดินจำเป็นต้องได้รับการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธีอื่นเพิ่มเติมอีกครั้ง อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ได้ควบคุมแหล่งที่มาของดอกอัญชัน (สายพันธุ์ การเก็บเกี่ยว และการปฏิบัติต่อตัวอย่างพืชด้วยวิธีเดียวกันตลอด) รวมถึงวิธีการสกัดไฮโดรไลซิสและแยกสารสกัดด้วยโครมาโตกราฟีชนิดเหลว (liquid chromatography) ก่อนการวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง แสดงถึงความเฉพาะเจาะจง (specificity) ของวิธีวิเคราะห์ต่อเดลฟินิดินในสารสกัดจากดอกอัญชันสีน้ำเงินที่ใช้เป็นสารทดสอบในงานวิจัยนี้



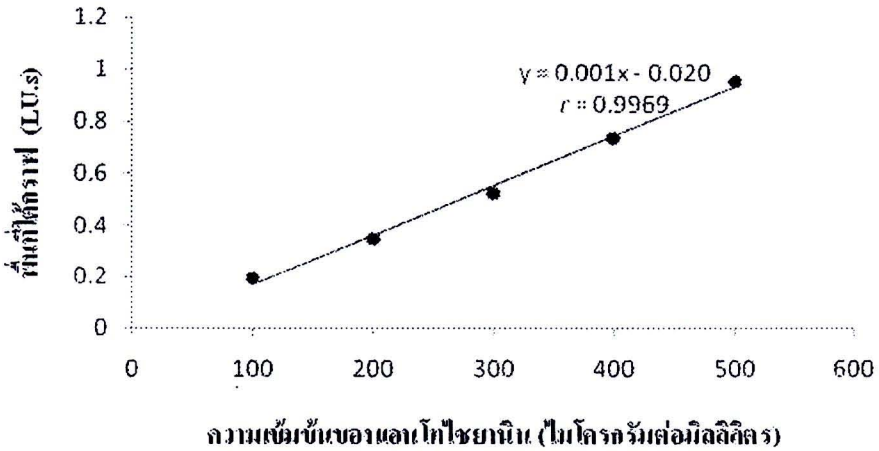
(a)



(b)

ภาพที่ 4.9 แสดงโครมาโตแกรมของ (a) สารละลายแอนโทไซยานินที่สกัดจากสารสกัดอัญชันในน้ำที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (b) สารละลายมาตรฐานเดลฟินิดินในน้ำที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาพที่ 4.10 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารแอนโทไซยานินที่สกัดและแยกจากดอกอัญชันสีน้ำเงินกับพื้นที่ใต้พีค (peak area) ในช่วงความเข้มข้น 100 – 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นช่วงความเข้มข้นที่ใช้ในการวิเคราะห์สารตัวอย่างทั้งหมด ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ 0.9969 แสดงถึงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity) ความลาดชันของเส้นกราฟมาตรฐานนี้คือ 0.001-0.02



ภาพที่ 4.10 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของแอนโทไซยานินที่สกัดได้จากดอกอัญชันสีน้ำเงิน วิเคราะห์โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง สภาวะ เมทานอล: ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8 = 30:70 (n = 6, sd < 5)

การวิเคราะห์วิธีการโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง ที่ใช้ในการศึกษาเพื่อกำหนดขอบเขตที่พึงใช้ในการวิเคราะห์โดยการคำนวณหาขีดจำกัดในการตรวจวัด (limit of detection, LOD) และขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) โดยคำนวณจาก LOD = 3SB +YB และ LOQ = 10SB +YB ได้ค่า LOD เท่ากับ 0.11 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ LOQ คือ 0.13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การตรวจสอบความเที่ยงตรง (precision) ของการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน (within day precision) โดยเตรียมสารละลายแอนโทไซยานินความเข้มข้น 100-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบการวิเคราะห์ซ้ำ ๆ จำนวน 5 ครั้งโดยแยกเวลาแต่อยู่ภายในวันเดียวกัน แล้วนำผลที่ได้มาคำนวณค่าเฉลี่ยร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์(% Relative standard deviation, %RSD) ของพื้นที่ใต้พีคเท่ากับ 3.5 แสดงว่าการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันมีความเที่ยงตรง การตรวจสอบความเที่ยงตรงเมื่อทำการวิเคราะห์ระหว่างวัน (between day precision) โดยวิเคราะห์สารละลายแอนโทไซยานินความเข้มข้นดังกล่าวเป็นเวลา 3 วันแล้วคำนวณร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของพื้นที่ใต้พีคของแต่ละวัน (% RSD) เฉลี่ยเท่ากับ 2.5 แสดงว่าการวิเคราะห์ในแต่ละวันให้ผลเที่ยงตรง

การตรวจสอบความถูกต้อง (accuracy) ของวิธีวิเคราะห์โดยวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานเดลฟินิดิน 3 ความเข้มข้นคือ 50 100 และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วคำนวณค่าร้อยละการได้กลับคืน (% Recovery) ดังแสดงในตารางที่ 4.10 พบว่ามีค่าการกลับคืน ในช่วงร้อยละ 97.7 – 112.5 ค่าเฉลี่ยร้อยละ 105.3 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานร้อยละ 7.4 และค่าสัมประสิทธิ์การแปรปรวน (coefficient of variation) ร้อยละ 7.1 ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 ค่าร้อยละการกลับคืนของแอนโทไซยานิน

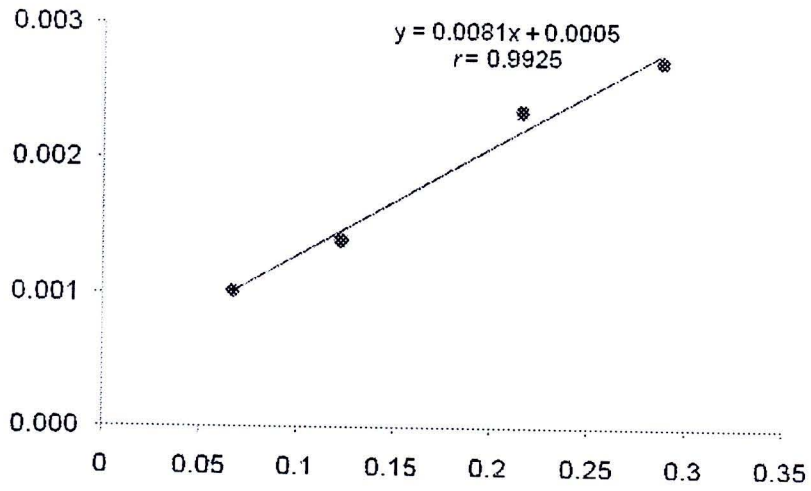
ปริมาณสาร (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าที่วิเคราะห์ได้	ร้อยละการกลับคืน
50	56.25	112.49
100	97.65	97.65
150	158.74	105.82

4.5.2 การดูดซับแอนโทไซยานินโดยนาโนซีโอไลต์

การวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูงดังกล่าว เพื่อหาค่าความเข้มข้นของแอนโทไซยานินที่กักเก็บในนาโนซีโอไลต์โดยแยกเอาเฉพาะส่วนสารละลายใสหลังจากปล่อยให้นาโนซีโอไลต์กระจายตัวในสารละลายแอนโทไซยานินแล้ว นำสารละลายใสมาวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานินที่เหลืออยู่หลังจากการกักเก็บแล้ว โดยนำค่าพื้นที่ใต้กราฟเฉลี่ยที่ได้จากเทคนิคโครมาโทกราฟีเหลวสมรรทณะสูงไปแทนค่า y ในสมการ $y = 1.0349x + 0.07$ ซึ่งเป็นสมการเส้นตรงของเส้นกราฟมาตรฐานของแอนโทไซยานิน จะได้ค่าความเข้มข้นของแอนโทไซยานินที่เหลืออยู่ (ce) คำนวณหาปริมาณแอนโทไซยานินที่ถูกดูดซับในนาโนซีโอไลต์โดยนำไปลบกับความเข้มข้มเริ่มต้นของแอนโทไซยานินด้วย จากนั้นนำมาเทียบกับปริมาณของตัวดูดซับคือนาโนซีโอไลต์ตามตารางที่ 4.11 ค่า x/m คือ ปริมาณของแอนโทไซยานินที่ถูกดูดซับต่อหน่วยน้ำหนักนาโนซีโอไลต์ (กรัมต่อกรัม) นำค่าที่ได้จากการคำนวณนี้ไปเขียนกราฟระหว่าง Ce และ Ce/x/m ซึ่งพบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงเนื่องจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ 0.9925 และมีค่าจุดตัดบนแกนนอน (y axis) ต่ำ แสดงถึงการดูดซับของแอนโทไซยานินโดยตัวดูดซับ ซึ่งการดูดซับต่อหน่วยน้ำหนักของตัวดูดซับเพิ่มขึ้นตามน้ำหนักของสารถูกดูดซับที่คงเหลือ แสดงว่าการดูดซับสัมพันธ์กับจำนวนโมเลกุลของสารทั้งสองชนิดที่เกี่ยวข้องในปรากฏการณ์ที่ผิวประจันนี้ มีลักษณะความสัมพันธ์ตามสมการของแลงเมียร์ (Langmuir Isotherm) ซึ่งทำที่อุณหภูมิเดียวกัน (isotherm) ดังแสดงในรูปที่ 4.11 ต่อมาใช้ในการทำนายปริมาณการกักเก็บแอนโทไซยานินของนาโนซีโอไลต์ซีโอไลต์ในช่วงความเข้มข้นนี้ การศึกษานี้ทำที่ 5 องศาเซลเซียสเนื่องจากที่อุณหภูมิสูงจะเป็นการกระตุ้นให้แอนโทไซยานิน ที่ถูกดูดซับในนาโนซีโอไลต์ถูกปลดปล่อยออกมาจากรูพรุนของนาโนซีโอไลต์ได้

ตารางที่ 4.11 ความเข้มข้นของแอนโทไซยานินที่ถูกดูดซับ โดยปริมาณนาโนซีโอไลต์ที่ใช้คือ 2 มิลลิกรัม (n = 4)

ปริมาณแอนโทไซยานินเริ่มต้น (มิลลิกรัม)	ปริมาณสารที่เหลือ, Ce (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณสารที่ถูกดูดซับ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณสารที่ถูกดูดซับ, x (กรัมต่อมิลลิลิตร)	x/m (กรัมต่อกรัม)	Ce/x/m (mg/g)
5	0.288	0.212	0.000212	0.106	0.00272
4	0.216	0.184	0.000184	0.092	0.00235
3	0.123	0.177	0.000177	0.0885	0.00140
2	0.067	0.133	0.000133	0.0665	0.00102



ภาพที่ 4.11 กราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารถูกดูดซับคงเหลือ (C_e มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) กับสัดส่วนความเข้มข้นของสารดังกล่าวเทียบกับปริมาณตัวดูดซับ ($C_e/x/m$, มิลลิกรัมต่อกรัม)ที่ 5องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ($n = 4$ sd < 1)

4.6 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีโอแรค (Oxygen Radical Absorbance Capacity assay, ORAC assay)

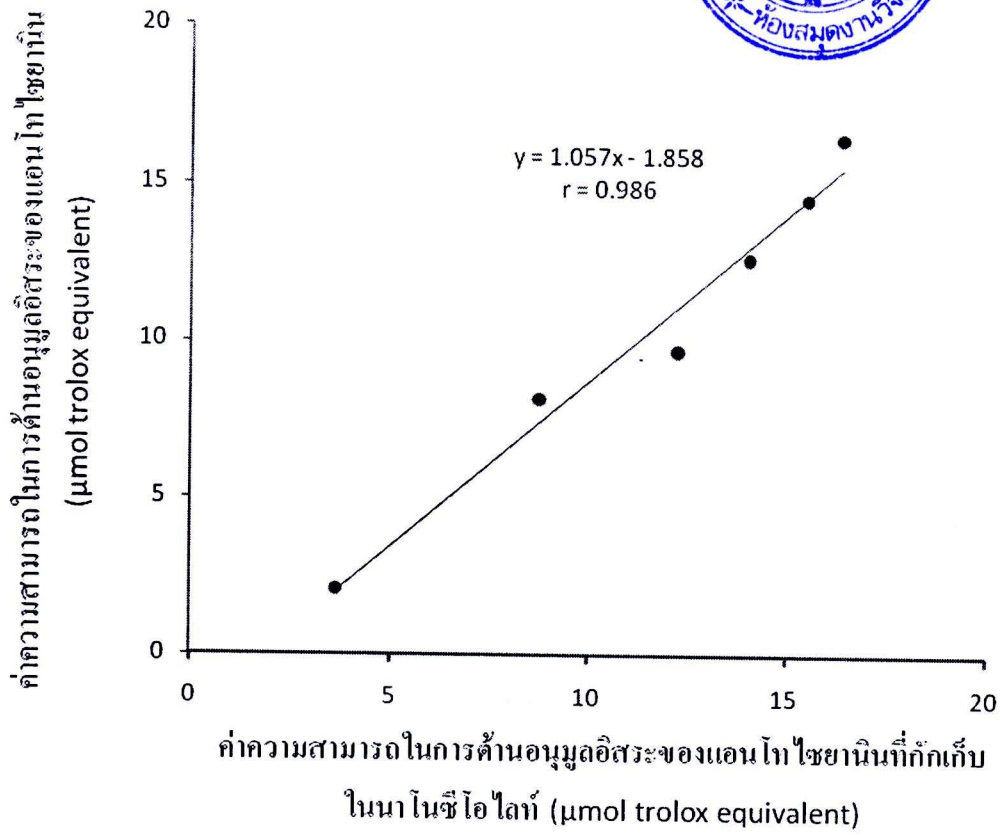
วิธีโอแรคเป็นวิธีการที่ใช้ในการตรวจปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระโดยวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการทำหน้าที่รับส่งอะตอมของไฮโดรเจนหรือการจับอนุมูลอิสระ (free radical scavenging capacity) อนุมูลอิสระเกิดขึ้นจากรีเอเจนต์ที่ใช้คือ 2,2 -azobis 2-amidino-propane dihydrochloride (AAPH) อนุมูลอิสระนี้ทำให้โครงสร้างของฟลูโอเรสซีน (fluorescein) เปลี่ยนไปเป็นผลให้การเรืองแสงลดลง กรณีที่มีสารต้านอนุมูลอิสระไปยับยั้งอนุมูลอิสระก็จะไปมีผลยับยั้งการทำลายโครงสร้างและการแสดงสีของฟลูโอเรสซีน จึงทำให้สียังคงเรืองแสงอยู่ ความเข้มของการเรืองแสงแปรผกผันกับปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่มีในสารทดสอบ ในการทดสอบใช้สารมาตรฐานเทียบด้วย สารมาตรฐานนี้ คือ โทรลอกซ์ (trolox) ซึ่งเป็นอนุพันธ์วิตามินอีแทน ดังนั้นค่าสารต้านอนุมูลอิสระที่วิเคราะห์ได้แสดงหน่วยเป็น μmol Trolox Equivalents ดังแสดงในตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของแอนโทไซยานิน นาโนซีโอไลต์ และสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างแอนโทไซยานินกับนาโนซีโอไลต์โดยวิธีโอแรค (ORAC) (ค่าเฉลี่ยการทดลอง 3 ครั้ง ๆ ละ 4 ซ้ำ)

ความเข้มข้น (µg/ml)	Antioxidant capacity (µmol trolox equivalent)		
	แอนโทไซยานิน	สารประกอบเชิงซ้อน	นาโนซีโอไลต์
0.0005	2.082 ± 0.15	0.230 ± 0.03	0.14 ± 0.01
0.001	8.154 ± 0.55	1.770 ± 0.16	0.15 ± 0.03
0.005	9.648 ± 0.68	3.643 ± 0.18	0.24 ± 0.02
0.01	12.59 ± 0.49	8.756 ± 0.22	0.40 ± 0.04
0.05	14.52 ± 0.44	12.23 ± 0.39	0.51 ± 0.02
0.1	16.44 ± 0.22	14.01 ± 0.25	0.77 ± 0.09
0.5	24.04 ± 1.05	15.47 ± 0.44	1.30 ± 0.05
1	26.30 ± 0.58	16.38 ± 0.33	1.73 ± 0.09

ผลการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีการโอแรคพบว่าแอนโทไซยานินเดี่ยว ๆ และสารประกอบเชิงซ้อนนั้น มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยในแอนโทไซยานินมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่า และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารทั้งสองชนิด ก็พบว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นด้วย ดังแสดงในตารางที่ 4.12 และเมื่อทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของนาโนซีโอไลต์ พบว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ต่ำมาก ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบเชิงซ้อน เกิดจากแอนโทไซยานินที่ถูกดูดซับอยู่ในนาโนซีโอไลต์ และเมื่อมีการดูดซับแล้วยังสามารถปลดปล่อยสารสำคัญที่ถูกดูดซับออกมาได้

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย



ภาพที่ 4.12 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบเชิงซ้อนเทียบกับแอนโทไซยานิน เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีโอแรค (ORAC)

เมื่อนำผลของการศึกษาปริมาณการดูดซับแอนโทไซยานินในข้อ 4.4 ทำให้ทราบถึงปริมาณของแอนโทไซยานินที่ดูดซับในนาโนซีโอไลต์ เมื่อนำมาศึกษาถึงความสัมพันธ์ค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของแอนโทไซยานินและสารประกอบเชิงซ้อน พบว่าได้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง โดยมีค่าความชัน คือ 1.057 จากภาพที่ 4.12 แสดงให้เห็นถึงว่าแอนโทไซยานินที่ดูดซับในนาโนซีโอไลต์นั้นมีการปลดปล่อยแอนโทไซยานินออกมาจนมีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ เทียบได้กับแอนโทไซยานินเดี่ยว