

นิพนธ์ฉบับ

ฤทธิ์ต้านการแพ้ ฤทธิ์ต้านการอักเสบและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลมะตูมอ่อน

ปฐมพงษ์ เพือกลี, ภาณุฐ เดชะยนต์, จิตพิสุทธิ์ จันทร์ทองอ่อน, อรุณพร อธิรัตน์

บทคัดย่อ

- บทนำ:** มะตูม (*Aegle marmelos*) อยู่ในวงศ์ Rutaceae ในทางการแพทย์แผนไทยได้มีการใช้ผลมะตูมอ่อนแก้ธาตุพิการ แก้อท้องเสีย แก่โรคกระเพาะอาหาร เจริญอาหาร ขับผายลม บำรุงกำลัง ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านการแพ้ ฤทธิ์ต้านการอักเสบและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลมะตูมอ่อน
- วิธีศึกษา:** นำผลมะตูมอ่อนมาสกัดได้เป็นสารสกัดชั้นเอธานอล 95% และชั้นน้ำจากนั้นนำสารสกัดไปทดสอบฤทธิ์ต้านการแพ้ด้วยวิธียับยั้งการหลั่งของเอนไซม์ β -hexosaminidase ฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธียับยั้งการหลั่ง Nitric oxide และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ABTS FRAP และ NBT dye reduction
- ผลการศึกษา:** สารสกัดชั้นเอธานอล 95% มีฤทธิ์ต้านการแพ้ (IC_{50} เท่ากับ 70.03 ± 0.88 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ในขณะที่สารสกัดชั้นน้ำไม่มีฤทธิ์ต้านการแพ้ จากการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบพบว่าสารสกัดชั้นน้ำมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (IC_{50} เท่ากับ 40.22 ± 2.34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และนอกจากนี้สารสกัดชั้นน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีด้วยวิธี ABTS (EC_{50} เท่ากับ 36.40 ± 1.23 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ FRAP (FRAP value เท่ากับ $111.61 \pm 0.59 Fe^{2+}$ ต่อกรัมของน้ำหนักสารสกัด และ TEAC value เท่ากับ 39.04 ± 0.23 มิลลิกรัม trolox equivalent ต่อกรัมของน้ำหนักสารสกัด) ส่วนการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ในเซลล์พบว่าสารสกัดทั้งสองชั้นไม่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ
- วิจารณ์ และสรุปผลการศึกษา:** สารสกัดผลมะตูมอ่อนชั้นน้ำ มีฤทธิ์ต้านการอักเสบและต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา อีกทั้งยังสอดคล้องกับภูมิปัญญาของการแพทย์แผนไทยที่ใช้ผลมะตูมอ่อนแก้ธาตุพิการ แก่โรคกระเพาะอาหาร บำรุงกำลัง
- คำสำคัญ:** มะตูมอ่อน, ฤทธิ์ต้านการแพ้, ฤทธิ์ต้านการอักเสบ, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

วันที่รับบทความ: ๑๙ ตุลาคม ๒๕๖๐

วันที่อนุญาตให้ตีพิมพ์: ๑๙ เมษายน ๒๕๖๑

ບຸກນຳ

มะตูม (*Aegle marmelos*) อยู่ในวงศ์ Rutaceae มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์เป็นไม้ยืนต้น สูง ๑๐ - ๑๕ เมตร ใบประกอบแบบนิ้วมือ เรียงสลับ ใบย่อยรูปวงรีหรือรูปไข่แกมใบหอก กว้าง ๒ - ๗ เซนติเมตร ยาว ๔ - ๑๓ เซนติเมตร ขอบใบหยักมน ดอกช่อออกที่ซอกใบและที่ปลายกิ่งกลีบดอกด้านนอกสีเขียวย่อมน ด้านในสีนวล ใบและดอกมีกลิ่นหอม ผลเป็นผลสด เนื้อในสีเหลือง มีน้ำเมือก* ส่วนต่างๆ ของมะตูมมีสรรพคุณทางยา เช่น ใบสด รสฝาดปร่าฆ่าเชื้อมัน คั้นเอาน้ำรับประทาน แก้หวัด แก้หลอดลมอักเสบ แก้บวม ผลอ่อน รสฝาดร้อนปร่าขึ้น แก้ธาตุพิการ แก้ท้องเสีย แก้บิด แก้โรคกระเพาะอาหาร เจริญอาหาร ขับผายลม บำรุงกำลัง ผลแก่ รสฝาดหวาน ทูบให้แตก ต้มใส่น้ำตาลทรายแดงเรียกว่า น้ำอัฐบาล ต้มแก้เสมหะและลม บำรุงไพธาคู ช่วยย่อยอาหาร เปลือก รากและลำต้น รสฝาดปร่าฆ่าเชื้อ แก้ไข้จับสั่น ขับลมในลำไส้* การสืบค้นรายงานทางเภสัชศาสตร์ พบว่าสารสกัดลูกมะตูมอ่อน ขึ้นน้ำ ที่ปริมาณของสารสกัดขนาด ๕๐ ๑๐๐ ๒๕๐ ๕๐๐ และ ๑,๐๐๐ ไมโครกรัม ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Superoxide Nitric oxide Hydroxyl และ ABTS⁺ radical scavenging ในหลอดทดลอง พบว่า ทุกขนาดปริมาณของ สารสกัดมีเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ ทุกวิธี โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระขึ้นอยู่กับปริมาณของสารสกัด* และจากการศึกษาเครื่องต้มน้ำมะตูมพบว่า มีปริมาณสารกลุ่ม ฟีนอลิกในปริมาณที่สูง (๘๓.๘ ± ๓๗.๖ มิลลิกรัม GAE/๑๐๐ มิลลิลิตร) และพบว่า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีจากการทดสอบ ด้วยวิธี DPPH (มีค่าเท่ากับ ๖๘.๔ ± ๘.๗ ไมโครโมล ต่อ ๑๐๐ มิลลิลิตร trolox equivalents และ ๖๐.๐ ± ๓.๑ ไมโครโมล ต่อ ๑๐๐ มิลลิลิตร ascorbic acid equivalents) และ Photochemiluminescence assay (มีค่า the integral antioxidant capacity of lipid-soluble substance values เท่ากับ ๑๖๕.๔ ± ๒๐.๙ ไมโครโมล ต่อ ๑๐๐ มิลลิลิตร trolox equivalents และค่า the integral antioxidant capacity of water-soluble substance values เท่ากับ ๒๙๘.๗ ± ๓๑.๒ ไมโครโมล ต่อ ๑๐๐ มิลลิลิตร ascorbic acid equivalents)^๓ นอกจากนี้ พบการศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธีต่างๆ ระหว่างสารสกัดขึ้นเอธานอลของผลมะตูมสุกกับ ผลมะตูมอ่อนพบว่า สารสกัดทั้งสองมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แต่ สารสกัดของผลมะตูมอ่อนมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ ได้ดีว่า สารสกัดผลมะตูมสุก* และการทดสอบโดยให้สารสกัดผล มะตูมขึ้นน้ำแก่หนูขนาด ๑๒๕ และ ๒๕๐ มิลลิกรัมต่อน้ำหนัก

ตัวของหนู โดยให้หนูรับประทานวันละ ๒ ครั้ง เป็นเวลา ๓๐ วัน พบว่า สารสกัดขนาด ๒๕๐ มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวของหนู มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการยับยั้ง lipid peroxidation ในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานโดยการฉีด Streptozotocin^๔ การศึกษาฤทธิ์ต้านการปวดและต้านการอักเสบในหนูของ สารสกัดใบและผลมะตูมชั้นเอธานอล พบว่า สารสกัดใบและผลมะตูมชั้นเอธานอลที่ขนาด ๒๐๐ มิลลิกรัมต่อกิโกรัมของ น้ำหนักตัวของหนู มีฤทธิ์ลดการปวดทั้งวิธี Eddy's hot plate และ acetic acid induced writhing โดยมีความแตกต่างอย่าง มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มของหนูที่ใช้สารมาตรฐาน pentazocine เป็น positive control และกลุ่มของหนูที่ใช้ สาร Carboxy methyl cellulose เป็น negative control ส่วนการทดสอบฤทธิ์ต้านอาการอักเสบพบว่าสารสกัดใบและผลมะตูมชั้นเอธานอลที่ขนาด ๒๐๐ มิลลิกรัมต่อกิโกรัมของ น้ำหนักตัวของหนูไม่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบเมื่อเทียบกับสาร มาตรฐาน Diclofenac เป็น positive control ในการทดสอบ ด้วยวิธี carrageenan induced paw edema^๖ สารสกัดใบ มะตูมอ่อนชั้นเมธานอล มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ เท่ากับ ๑๘.๖^๗ และ มีการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบในหนูของสารสกัดใบมะตูม ชั้นน้ำ พบว่าสารสกัดใบมะตูมชั้นน้ำที่ขนาด ๒๐๐ มิลลิกรัม ต่อกิโกรัมของน้ำหนักตัวของหนู สามารถลดการอักเสบของ อุ้งเท้าหนู อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเทียบ กับยา aspirin^๘ นอกจากนี้ สารสกัดใบมะตูมชั้นเมธานอลที่ ขนาด ๒๐๐ และ ๓๐๐ มิลลิกรัมต่อกิโกรัมของน้ำหนักตัว ของหนู สามารถลดอาการปวดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยวิธี Acetic acid induced writhing test writhing และ tail flick test เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน Diclofenac เป็น positive control^๙ การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในหนูด้วยวิธี carra- geenan-Induced Rat Paw Edema ของสารสกัดใบมะตูมชั้น เอธานอล พบว่าสารสกัดที่ขนาด ๒๐๐ และ ๔๐๐ มิลลิกรัม ต่อกิโกรัมของน้ำหนักตัวของหนู สามารถยับยั้งการอักเสบได้ 10% และ 30% ตามลำดับ ที่เวลา ๔ ชั่วโมง เมื่อเทียบกับหนู ในกลุ่มควบคุม (1% w/v carrageenan ใน normal saline) โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) โดย ยา diclofenac สามารถยับยั้งการอักเสบได้ 20% ที่เวลา ๓ ชั่วโมงเมื่อเทียบกับหนูในกลุ่มควบคุม^{๑๐} และสารสกัดดอก มะตูมแห้งชั้นน้ำมีฤทธิ์ต้านการอักเสบในระดับสัตว์ทดลอง^{๑๑} แต่อย่างไรก็ตามในส่วนของใบมะตูมพบการศึกษาเป็นจำนวนมาก และยังไม่พบการศึกษาฤทธิ์ต้านการแพ้และฤทธิ์ต้านอนุมูล

อิสระในระดับเซลล์ของผลมะตูมอ่อน ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ด้านการแพ้ ฤทธิ์ด้านการอักเสบ และฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระของผลมะตูมอ่อน

วิธีการศึกษา

๑. การสกัดสารสกัด

นำผลมะตูมอ่อนอายุ ๔ - ๖ เดือนจากจังหวัด นครปฐม มาล้าง แล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ (ใช้ทั้งผลรวมเมล็ด) อบในตู้อบแห้งโดยใช้ความร้อนประมาณ 50°C ใช้เวลาอบให้แห้งประมาณ ๒ วัน โดยผลมะตูมอ่อนดังกล่าวได้ถูกตรวจสอบจากผู้เชี่ยวชาญในสถานการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ จากนั้นนำมาบดเป็นผงหยาบ ชั่งน้ำหนัก ๓๐ กรัม จากนั้น นำไปสกัดด้วยวิธีต่างๆ ดังนี้ ๑) สกัดด้วยวิธีการแช่หมักด้วยตัวทำละลาย (Maceration) นำสมุนไพรมานำแช่หมักใน เอทานอล 95% ปริมาตร ๓๐๐ มิลลิลิตร คนบ่อยๆ เป็นเวลา ๓ วัน กรองเอาส่วนตัวทำละลาย มาระเหยให้แห้งด้วยเครื่อง Rotatory evaporator แล้วนำกากมาสกัดซ้ำ ด้วยวิธีเดิมอีก ๒ ครั้ง แล้วทำสารสกัดให้แห้งอีกครั้ง ด้วยเครื่อง vacuum dry ๒) สกัดด้วยวิธีการต้มกับน้ำ (Decoction) นำสมุนไพรมานำต้มในน้ำเดือด ๑๕ นาที กรองแล้วนำกากมาสกัดซ้ำ ด้วยวิธีเดิมอีก ๒ ครั้ง และนำส่วนที่กรองได้มาทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง vacuum freeze dry

๒. การทดสอบฤทธิ์ด้านการแพ้ (Anti-allergic activity) ด้วยวิธียับยั้งการหลั่งของเอนไซม์ β -hexosaminidase^{๒๒}

เลี้ยง RBL-2H3 (ซึ่งเป็นเซลล์ basophilic leukemia cell line ที่ได้จากหนู *Rattus norvegicus*) ใน 24-well microplates (cell มีความเข้มข้น 2×10^5 cells/well) medium ที่ใช้เลี้ยง cell คือ minimum essential medium eagle (MEM) ที่ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 units ต่อ มิลลิลิตร) และ streptomycin (๑๐๐ ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร) โดย incubate cells ใน CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา ๑ ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม anti-dinitrophenylated IgE (anti-DNP IgE) solution (ความเข้มข้น ๐.๕๕ ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร) ที่อยู่ใน MEM ลงไปหลุมละ ๔๐ ไมโครลิตร เฉพาะหลุม control และ sample ส่วน blank จะใส่ MEM บ่ม ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา ๒๔ ชั่วโมง ดูดสารละลายเก่าออกแล้วล้างด้วย buffer A solution (ประกอบด้วย NaCl 119 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 0.4 mM, PIPES 25 mM, NaOH pH 7.2 40 mM) ๔๐๐ ไมโครลิตร ๒ ครั้ง แล้วเติม buffer A solution

๑๖๐ ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละ well เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา ๑๐ นาที หลังจากนั้นเติม สารสกัดสมุนไพรร (sample solution) ที่ความเข้มข้น ๑ ๑๐ ๕๐ และ ๑๐๐ ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร โดยสารสกัดชั้น เอทานอลใช้สารละลาย DMSO (Dimethyl Sulfoxide) เป็นตัวทำละลาย ส่วนสารสกัดชั้นน้ำใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย จำนวน ๒๐ ไมโครลิตร ลงไปในหลุม sample ส่วนหลุม blank และ control เติม buffer A บ่ม ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา ๑๐ นาที หลังจากนั้นเติม dinitrophenylated bovine serum albumin (DNP-BSA) solution ๒๐ ไมโครลิตร ในหลุม control และ sample ส่วนหลุม blank เติม buffer A บ่ม ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา ๒๐ นาที Pipette solution จาก 24-well microplates ปริมาณ 50 μ l ลงใน 96-well microplates จากนั้นเติม p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide 1 mM (PNAG) 50 μ l ลงใน ๔๘ หลุมด้านบน ส่วน ๔๘ หลุมด้านล่างเติม citric acid บ่ม ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา ๑.๕ ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม Na₂CO₃ buffer ปริมาตร 200 μ l ลงไป ได้สาร p-nitrophenol ที่มีสีเหลืองเมื่ออยู่ในสารละลาย เบส pH 10 ซึ่ง p-nitrophenol ที่เกิดขึ้นจะถูกนำมาวิเคราะห์ โดยใช้ UV-Vis detector ที่ความยาวคลื่น ๔๐๕ นาโนเมตรด้วย เครื่อง Microplate reader (Bio Tek, USA)

การคำนวณ % inhibitory activity on β -hexosaminidase release มีดังนี้

$$\% \text{ inhibition} = [1 - (T-B-N)/(C-N)] \times 100$$

โดยที่ Control (C): ค่าการดูดกลืนแสง DNP-BSA (+), test sample (-) Test (T): ค่าการดูดกลืนแสง DNP-BSA (+), test sample (+)

Normal (N): ค่าการดูดกลืนแสง DNP-BSA (-), test sample (-) Blank (B): ค่าการดูดกลืนแสง DNP-BSA (-), test sample (+)

หมายเหตุ การคำนวณหา IC₅₀ ใช้ Program Prism

๓. การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ (Anti-inflammatory activity) ด้วยวิธียับยั้งการหลั่ง Nitric oxide^{๒๓}

เลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 (ซึ่งเป็นเซลล์ macrophage ที่ได้จากหนู *Mus musculus*; Abelson murine leukemia virus transformed) ใน 96-well microplates (cell มีความเข้มข้น 1×10^5 cells/well) โดยอาหารที่ใช้เลี้ยง cell คือ RPMI-1640 ที่ประกอบด้วย 10% FBS, penicillin (100 units ต่อ มิลลิลิตร) และ streptomycin (๑๐๐ ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร) โดยบ่ม cells ใน CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37°C

เป็นเวลา ๑ ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดสารละลายเก่าออก เติม LPS (lipopolysaccharide) ความเข้มข้น ๕ นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อยู่ใน RPMI ลงไปหลุมละ ๑๐๐ ไมโครลิตร เฉพาะหลุม control และ sample ส่วน blank จะใส่ RPMI จากนั้นเติมสารสกัดสมุนไพร (sample solution) ที่ความเข้มข้น ๑ ๑๐ ๕๐ และ ๑๐๐ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัดชั้นเอธานอลใช้สารละลาย DMSO เป็นตัวทำละลาย ส่วนสารสกัดชั้นน้ำใช้เป็นตัวทำละลาย จำนวน 100 μ l ในหลุมของ sample และ blank ของ sample ส่วนหลุม control และ blank ของ control ให้เติม RPMI แล้วนำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา ๔๘ ชั่วโมง หลังจากนั้นดูด supernatant แต่ละหลุมมา ๑๐๐ ไมโครลิตร ใส่ใน 96-well microplates เติม Griess reagent หลุมละ 100 μ l เคา plate เบาๆ วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ ๕๗๐ นาโนเมตรด้วยเครื่อง Microplate reader (Bio Tek, USA)

การคำนวณ % inhibition of NO production = $[(OD \text{ control} - OD \text{ sample}) / OD \text{ control}] \times 100$

การคำนวณหาค่า IC_{50} ใช้ Program Prism

การทดสอบความเป็นพิษของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay เป็นการทดสอบ cell viability เพื่อตรวจสอบว่าสารสกัดสมุนไพรมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์โดยตรงหรือไม่ โดยนำเซลล์ที่บ่มกับสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา ๔๘ ชั่วโมง เติมสารละลาย MTT หลุมละ ๑๐ ไมโครลิตร เคา plate เบาๆ แล้วนำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา ๒ ชั่วโมง ดูด supernatant ออกทุกหลุม เติม isopropanol ใน 0.04 M HCl ปริมาตร ๑๐๐ ไมโครลิตร เขย่าแล้ววัด ค่าการดูดกลืนแสง ที่ ๕๗๐ นาโนเมตรด้วยเครื่อง Microplate reader (Bio Tek, USA) คำนวณ % survival ตามสมการ The Percentage of survival = $(Abs. Sample / Abs. Control) \times 100$ โดยสารสกัดที่จะนำไปคำนวณหา IC_{50} ต้องมีค่า % survival มากกว่า ๗๐

๔. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

๔.๑ การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH free radical scavenging activity assay^{๔๔}

นำสารสกัดชั้นเอธานอล 95% มาละลายใน absolute ethanol และสารสกัดชั้นน้ำมาละลายในน้ำ ทำให้เป็นความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ ๑๐๐ ๕๐ ๑๐ ๕ และ ๑ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนำมาทดสอบด้วยวิธี DPPH วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ๕๒๐ นาโนเมตรด้วยเครื่อง Microplate reader (Bio Tek, USA) โดยใช้ BHT (butylated hydroxytoluene)

เป็นสารมาตรฐาน นำค่าที่ได้มาคำนวณค่า radical scavenging activity โดยคิดเป็น Half maximal effective concentration (EC_{50}) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ถ้าค่า EC_{50} มีค่าต่ำกว่า ๑๐๐ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คำนวณ % inhibition จากสมการ $\% \text{ inhibition} = [(Abs \text{ control} - Abs \text{ sample}) / Abs \text{ control}] \times 100$ จากนั้นคำนวณหา EC_{50} ใช้ Program Prism

๔.๒ การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical cation decolorization assay^{๔๕}

การตรวจสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS โดยวิธีทดสอบนำสารละลายของ ABTS (๗ มิลลิโมลาร์) เป็นสารที่คงตัวแต่เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย potassium peroxide จะทำให้ ABTS เปลี่ยนไปเป็นอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ ที่มีสีฟ้าเขียว วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ ๗๓๔ นาโนเมตรด้วยเครื่อง Microplate reader (Bio Tek, USA) จากนั้นนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับสารสกัด โดยนำ $ABTS^{\bullet+}$ ๑๘๐ ไมโครลิตร ลงใน 96-well microplate เป็นอันดับแรก จากนั้นใส่สารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ (๑ ๑๐ ๕๐ และ ๑๐๐ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร ๒๐ ไมโครลิตร ลงใน 96-well microplate มาทำปฏิกิริยา เมื่อมีสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในระบบจะทำให้อนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ เปลี่ยนกลับมาเป็น ABTS (๖ นาติ) จึงทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ ๗๓๔ นาโนเมตรด้วยเครื่อง Microplate reader (Bio Tek, USA) โดยถ้าสารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะทำให้การดูดกลืนแสงของ $ABTS^{\bullet+}$ ลดลง และคำนวณ % inhibition จากสมการ $\% \text{ inhibition} = [(Abs \text{ control} - Abs \text{ sample}) / Abs \text{ control}] \times 100$

การรายงานผลเป็นค่า EC_{50} โดยใช้ BHT ซึ่งเป็น positive control ในการทดลอง

๔.๓ การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay^{๔๖}

การเตรียมสารละลาย FRAP reagent โดยผสม 300 mM acetate buffer (pH 3.6) กับ 20 mM Ferric chloride solution และ 10 mM TPTZ (2,4,6-Tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine) solution ให้เข้ากัน ในอัตราส่วน ๑๐ : ๑ : ๑ แล้วนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๔ นาที และเตรียมสารสกัดตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้น ๑ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิด วัดค่าการดูดกลืนแสงในนาติที่ ๘ ที่ความยาวคลื่น ๕๙๓ นาโนเมตรด้วยเครื่อง Microplate reader (Bio Tek, USA) ทำการทดลอง ๓ ซ้ำ โดยเปรียบเทียบ

กับสารละลายมาตรฐาน Ferrous sulfate และ Trolox คำนวณหาปริมาณ Relative antioxidant activity (FRAP value) และ ค่า TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) จากกราฟมาตรฐานของ FeSO_4 และ Trolox ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ FeSO_4 และ Trolox กับค่า absorbance โดยต้องเจือจางสารสกัดตัวอย่างให้อยู่ในช่วงกราฟมาตรฐาน

๔.๔ การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ super oxide ด้วยวิธี Nitroblue tetrazolium (NBT) dye reduction assay^{๑๗}

เลี้ยงเซลล์ HL-60 (ซึ่งเป็นเซลล์ promyeloblast หรือ promyelocytic cell line ที่ได้จากมนุษย์ *Homo sapiens*) ที่กระตุ้นให้เกิด super oxide ด้วย 1.3% DMSO เป็นเวลา ๗ วัน จากนั้นนำเซลล์ HL-60 จำนวน ๑ ล้านเซลล์ ผสมกับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ละลายด้วยสารละลาย HBSS และใส่ NBT solution ที่ความเข้มข้น ๑.๒๕ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเป็นเวลา ๓๐ นาที ที่ตู้ incubator ที่ 5% CO_2 atmosphere อุณหภูมิ 37°C และความชื้น 95% จากนั้นใส่สาร PMA (Phorbol-12-myristate-13-acetate) ที่ความเข้มข้น ๕๐๐ นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ตู้ CO_2 เป็นเวลา ๓๐ นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1M HCl ปริมาตร ๒ มิลลิลิตร จากนั้นปั่นตกตะกอนเซลล์ ที่ 12,000 x g เป็นเวลา ๕ นาที ด้วยเครื่อง centrifuge เท supernatant ที่จากนั้นละลาย ผลึก formazan ด้วย DMSO ปริมาตร ๒๕๐ มิลลิลิตร นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ ๕๗๒ นาโนเมตรด้วยเครื่อง Microplate reader (Bio Tek, USA) คำนวณค่า % inhibition ตามสมการ

The Percentage of Inhibition = $[(\text{Abs.Control} - \text{Abs.Sample}) / \text{Abs.Control}] \times 100$

การรายงานผลเป็นค่า EC_{50} โดยโปรแกรม Prism

การทดสอบความเป็นพิษของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay

เป็นการทดสอบ cell viability เพื่อดูว่าสารสกัดสมุนไพรมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์โดยตรงหรือไม่ โดยทำการเลี้ยงเซลล์ HL-60 ที่กระตุ้นให้เกิด super oxide ด้วย 1.3% DMSO เป็นเวลา ๗ วัน จากนั้นนำเซลล์ HL-60 จำนวน ๑ ล้านเซลล์ ผสมกับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ละลายด้วยสารละลาย HBSS และใส่ PMA ที่ความเข้มข้น ๕๐๐ นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเป็นเวลา ๖๐ นาที จากนั้นตรวจสอบความเป็นพิษของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay ใส่สาร MTT solution ปริมาตร ๑๐๐ ไมโครลิตร บ่มเป็นเวลา ๒ - ๓ ชั่วโมง ที่ตู้ incubator ที่ 5% CO_2 atmosphere อุณหภูมิ 37°C

และความชื้น 95% อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ ๕๗๐ นาโนเมตรด้วยเครื่อง Microplate reader (Bio Tek, USA) คำนวณ % survival ตามสมการ The Percentage of survival = $(\text{Abs. Sample} / \text{Abs. Control}) \times 100$ โดยสารสกัดที่จะนำไปคำนวณหาค่า EC_{50} ต้องมีค่า % survival มากกว่า ๗๐

๕. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ในการศึกษาการทดสอบฤทธิ์ต้านการแพ้ ฤทธิ์ต้านการอักเสบและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะทำการทดสอบซ้ำตัวอย่างละ ๓ ครั้งและนำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ($\pm$ SEM) และสถิติ one-way ANOVA เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism5

ผลการศึกษา

๑. การสกัดสารสกัด

จากการสกัดสารสกัดของผลมะตูมอ่อนพบว่า การสกัดด้วยวิธี Decoction ให้ค่า % yield สูงกว่าการสกัดด้วยวิธี Maceration โดยสารสกัดเข้มข้นน้ำของผลมะตูมอ่อน มีค่า % yield เท่ากับ ๒๗.๙๓ และสารสกัดเข้มข้นเอทานอล 95% มีค่า % yield เท่ากับ ๗.๕๐ (ตารางที่ ๑)

๒. การทดสอบฤทธิ์ต้านการแพ้ (Anti-allergic activity) ด้วยวิธียับยั้งการหลั่งของเอนไซม์ β -hexosaminidase

ผลการทดสอบพบว่า สารสกัดผลมะตูมอ่อนขึ้นเอทานอล 95% มีฤทธิ์ต้านการแพ้ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 70.03 ± 0.88 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัดดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านการแพ้ไม่ตีเท่าสารมาตรฐาน ketotifen (IC_{50} เท่ากับ 25.06 ± 2.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ส่วนสารสกัดเข้มข้นน้ำนั้นพบว่าไม่มีฤทธิ์ต้านการแพ้ (IC_{50} มากกว่า ๑๐๐ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) (ตารางที่ ๑)

๓. การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory activity) ด้วยวิธียับยั้งการหลั่ง Nitric oxide

ผลการทดสอบ พบว่า สารสกัดเข้มข้นน้ำมีฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 40.22 ± 2.34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีฤทธิ์ต้านการอักเสบได้น้อยกว่าสารมาตรฐาน indomethacin (IC_{50} มีค่าเท่ากับ 29.97 ± 2.33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ส่วนสารสกัดขึ้นเอทานอล 95% ไม่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (IC_{50} มีค่ามากกว่า ๑๐๐ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ส่วนการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT พบว่า สารสกัดทุกชั้นไม่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยมีค่า % survival เกิน ๗๐ ที่ความเข้มข้น ๑๐๐ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ ๑)

๔. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

๔.๑ การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH
ผลการทดสอบ พบว่า สารสกัดผลมะตูมอ่อนทั้งชั้น
เอธานอล 95% และชั้นน้ำ ไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (ซึ่งมีค่า
 EC_{50} มากกว่า ๑๐๐ ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) ส่วนสาร BHT
ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน มีค่า EC_{50} เท่ากับ 12.48 ± 0.01
ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม (ตารางที่ ๑)

๔.๒ การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS
radical cation decolorization

ผลการทดสอบ พบว่า สารสกัดชั้นน้ำและชั้นเอธานอล
95% มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ $36.40 \pm$
 1.23 และ 68.07 ± 5.23 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ
แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้
ไม่ดีกว่าสาร BHT ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน (EC_{50} เท่ากับ $5.66 \pm$
 0.26 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) (ตารางที่ ๑)

๔.๓ การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric
reducing antioxidant power (FRAP)

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP
จะใช้สารละลายเฟอร์รัสซัลเฟตเป็นสารละลายมาตรฐาน
กราฟมาตรฐานของเฟอร์รัสซัลเฟตเป็นสมการเชิงเส้นตรง
 $y = 0.0043x - 0.0081$ $R^2 = 0.9996$ และใช้สารละลาย
Trolox เป็นสารมาตรฐาน กราฟมาตรฐานของ Trolox เป็น
สมการเชิงเส้นตรง $y = 0.0113x - 0.0307$ $R^2 = 0.9998$ ผล
การทดสอบ พบว่า สารสกัดชั้นน้ำให้ค่ายับยั้งอนุมูลอิสระสูง
ที่สุด (มีความสามารถรวมในการเป็นสารรีดิวซ์มากที่สุด) โดย
มีค่า FRAP value เท่ากับ 111.61 ± 0.59 Fe^{2+} ต่อกรัมของ
น้ำหนักสารสกัด ส่วนสารสกัดชั้นเอธานอล 95% มีค่า FRAP value
เท่ากับ 80.90 ± 6.69 Fe^{2+} ต่อกรัมของน้ำหนักสารสกัด และ
เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Trolox (trolox equivalent)
พบว่า สารสกัดชั้นน้ำมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีที่สุด มีค่าเท่ากับ
 39.04 ± 0.23 มิลลิกรัม trolox equivalent ต่อกรัมของ
น้ำหนักสารสกัด ส่วนสารสกัดชั้นเอธานอล 95% มีค่าเท่ากับ
 27.35 ± 2.54 มิลลิกรัม trolox equivalent ต่อกรัมของ
น้ำหนักสารสกัด (ตารางที่ ๑)

๔.๔ การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ superoxide
ด้วยวิธี Nitroblue tetrazolium (NBT) dye reduction assay

ตารางที่ ๑ แสดง % yield และผลการศึกษาฤทธิ์ต้านการแพ้ ฤทธิ์ต้านการอักเสบและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีต่างๆ ของสาร
สกัดผลมะตูมอ่อน (n = 3)

สาร	% yield	IC_{50} (μ g/ml) ของ Anti- allergic activity	IC_{50} (μ g/ml) ของ Anti- inflammatory activity	EC_{50} (μ g/ml) ของ DPPH assay	EC_{50} (μ g/ml) ของ ABTS assay	Fe^{2+} ต่อกรัม ของน้ำหนัก สารสกัดของ FRAP assay	มิลลิกรัม trolox equivalent ต่อกรัมของ น้ำหนักสารสกัด ของ FRAP assay	EC_{50} (μ g/ml) ของ NBT assay
สารสกัด ชั้นเอธานอล 95%	๗.๕๐	$70.03 \pm$ 0.88^*	มากกว่า ๑๐๐	มากกว่า ๑๐๐	$68.07 \pm$ 5.23^*	$80.90 \pm$ 6.69	$27.35 \pm$ 2.54	มากกว่า ๒๐๐
สารสกัดชั้นน้ำ	๒๓.๙๓	มากกว่า ๑๐๐	$40.22 \pm$ 2.34^*	มากกว่า ๑๐๐	$36.40 \pm$ 1.23^*	$111.61 \pm$ 0.59	$39.04 \pm$ 0.23	มากกว่า ๒๐๐
Ketotifen		25.06 ± 2.02	-	-	-	-	-	-
Indomethacin		-	29.97 ± 2.33	-	-	-	-	-
BHT		-	-	12.48 ± 0.01	5.66 ± 0.26	-	-	-
Propyl gallate		-	-	-	-	-	-	21.48 ± 1.21

(*) indicates a significant difference at the level $p < 0.05$, compared with positive control of each assay

ผลการทดสอบ พบว่า สารสกัดทั้งสองมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระที่ความเข้มข้นมากกว่า ๒๐๐ ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม (EC₅₀ มีค่ามากกว่า ๒๐๐ ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน Propyl gallate (EC₅₀ มีค่าเท่ากับ ๒๑.๙๘ ± ๑.๒๑ ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) และสารสกัดทุกชั้นไม่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยมีค่า %survival เกิน ๗๐ ที่ความเข้มข้น ๑๐๐ ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม

วิจารณ์ และสรุปผลการศึกษา

มะตูม (*Aegle marmelos*) อยู่ในวงศ์ Rutaceae ผลอ่อน มีรสฝาดร้อนปราณี้น สรรพคุณแก้ธาตุพิการ แก้ท้องเสีย แก้บิด แก้โรครกระเพาะอาหาร เจริญอาหาร ขับผายลม บำรุงกำลัง การทดสอบฤทธิ์ด้านการแพ้ของสารสกัดผลมะตูมอ่อน พบว่า สารสกัดผลมะตูมอ่อนขึ้นเอธานอล 95% มีฤทธิ์ต้านการแพ้ด้วยวิธียับยั้งการหลั่งของเอนไซม์ β -hexosaminidase ส่วนสารสกัดชั้นน้ำพบว่าไม่มีฤทธิ์ต้านการแพ้ ส่วนผลการศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบด้วยวิธียับยั้งการหลั่ง Nitric oxide พบว่า สารสกัดผลมะตูมอ่อนขึ้นน้ำมีฤทธิ์ต้านอักเสบ แต่สารสกัดชั้นเอธานอล 95% ไม่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธีดังกล่าว ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาที่พบว่าสารสกัดชั้นเอธานอลของผลมะตูมไม่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบในระดับสัตว์ทดลอง^๖ ในส่วนของการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในครั้งนี้เลือกการทดสอบคุณสมบัติในการขจัดอนุมูลอิสระ (free radical scavenger) ด้วยวิธี DPPH และ ABTS นอกจากนี้ยังศึกษาคุณสมบัติในการเป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผลมะตูมอ่อน ซึ่งเป็นการทดสอบในระดับหลอดทดลอง (in vitro) พบว่า สารสกัดชั้นน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP สารสกัดดังกล่าวจึงมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระเพื่อให้อยู่ในสภาวะเสถียร นอกจากนี้ สารสกัดชั้นน้ำยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีเมื่อทดสอบด้วยวิธี ABTS ซึ่งในส่วนของผลการทดลองวิธี ABTS นั้นสอดคล้องกับการศึกษาของ Krushna GSS และคณะ^๗ แต่อย่างไรก็ตาม สาร ABTS⁺ ไม่เป็นสารธรรมชาติที่พบในร่างกายหรือในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต แต่มีข้อดีคือ ละลายได้ดีในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์จึงทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว^๘ จึงสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ ส่วนผลการศึกษาดำเนินการด้วยวิธี DPPH พบว่า สารสกัดทั้งสองไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (ค่า EC₅₀ มากกว่า

๑๐๐ ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาของ Krushna GSS และคณะ ได้พบว่าสารสกัดลูกมะตูมอ่อนขึ้นน้ำมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ด้วยวิธี DPPH โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระขึ้นอยู่กับปริมาณของสารสกัด^๗ ดังนั้นเมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นจะทำให้มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระได้

ส่วนผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผลมะตูมอ่อนด้วยวิธี NBT ซึ่งศึกษาในระดับเซลล์พบว่า สารสกัดทั้งสองมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ความเข้มข้นมากกว่า ๒๐๐ ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม อย่างไรก็ตาม สารสกัดอาจมีความเข้มข้นที่น้อยเกินไปจึงทำให้ไม่มีความสามารถในต้านอนุมูลอิสระ และจากการศึกษาของ Kamalakkannan และ Prince ที่ศึกษาสารสกัดผลมะตูมขึ้นน้ำในระดับสัตว์ทดลองที่ขนาด ๒๕๐ มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวของหนูมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ^๔ ดังนั้นหากมีการเพิ่มความเข้มข้นที่มากกว่า ๒๐๐ ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมอาจจะทำให้มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในระดับเซลล์

ผลการวิจัยในครั้งนี้สามารถสรุปเบื้องต้นได้ว่า สารสกัดผลมะตูมอ่อนขึ้นน้ำ มีฤทธิ์ต้านการอักเสบและต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสอดคล้องกับภูมิปัญญาของการแพทย์แผนไทยที่ใช้ผลมะตูมอ่อน แก้อาตุพิการ แก้โรครกระเพาะอาหาร เจริญอาหาร บำรุงกำลัง ดังนั้นผลมะตูมอ่อนควรมีการศึกษาวิจัยด้วยกลไกอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับสรรพคุณและศึกษาในระดับคลินิกต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณงบประมาณสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปีการศึกษา ๒๕๕๙ และคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่อนุเคราะห์สถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

๑. วุฒิ วุฒิธรรมเวช. สารานุกรมสมุนไพร รวมหลักเภสัชกรรมไทย. พิมพ์ครั้งที่ ๑. กรุงเทพมหานคร: โอเดียนสโตร์; ๒๕๔๐.
๒. Krushna GSS, Kareem MA, Reddy VD, Padmavathi P, Hussain SA, Kodidhela LD. Aegle marmelos fruit extract attenuates isoproterenol-induced oxidative stress in rats. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition. 2012;50:199-204.

๓. Abdullakasim P, Songchitsomboon S, Techagumpuch M, Balee N, Swatsitang P, Sungpuag P. Antioxidant capacity, total phenolics and sugar content of selected Thai health beverages. *International Journal of Food Science and Nutrition*. 2007;58:77-85.
๔. Sharmila S, Vasundra Devi PA. Comparison of in vitro antioxidant activity of the ethanolic extract of ripe and unripe fruit of *Aegle marmelos*. *Journal of Pharmacy Research*. 2011;4:720-2.
๕. Kamalakkannan N, Prince S M. Effect of *Aegle marmelos* Correa. (Bael) fruit extract on tissue antioxidants in streptozotocin diabetic rats. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2003;4:1285-88.
๖. Krishnakanth K, Abhilash BG, Neeraja K, Hari Jagannadha Rao G, Chakrapani C. Analgesic and anti-inflammatory activity of ethanolic extracts of leaf and fruit pulp of *Aegle marmelos* in albino rats. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology*. 2017;6:1596-1601.
๗. Kantha DA, Subhashini S, Sathesh Kumar A. Wound healing and Antigenotoxic activities of *Aegle marmelos* with relation to its antioxidant properties. *Journal of Pharmacy Research*. 2012;5:1492-1502.
๘. Ghangale GR, Surve VS, Anbarasan K, Gatne MM. Evaluation of *Aegle marmelos* (Bael) for anti-inflammatory activity in rats. *Journal of Bombay Veterinary College*. 2008;16:15-16.
๙. Shankarnanth V, Balakrishnan N, Suresh D, Sureshpandian G, Edwin E, Sheeja E. Analgesic activity of methanol; extract of *Aegle marmelos* leaves. *Fitoterapia*. 2007;78:258-9.
๑๐. Vijay Anand Raju D, Sandhya V, Vineel Chandra M, Muralidhar Reddy M and Bhattacharya B. Evaluation of antidiarrhoeal and antiinflammatory activity of *Aegle marmelos* on albino wistar rats. *European Journal of Experimental Biology*. 2016;6:26-9.
๑๑. Kumaria KDKP, Weerakoona TCS, Handunnettib SM, Samarasinghec K, Suresha TS. Anti-inflammatory activity of dried flower extracts of *Aegle marmelos* in Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2014;151:1202-8.
๑๒. Tewtrakul S, Subhadhirasakul S. Anti-allergic activity of some selected plants in the Zingiberaceae family. *Journal of Ethanopharmacology*. 2007;109:535-8.
๑๓. Tewtrakul S, Subhadhirasakul S. Effects of compounds from *Kaempferia parviflora* on nitric oxide, prostaglandin E2 and tumor necrosis factor-alpha productions in RAW 264.7 macrophage cells. *Journal of Ethanopharmacology*. 2008;120:81-4.
๑๔. Yamasaki K, Hashimoto A, Kokusenya Y, Miyamoto T, Sato T. Electrochemical method for estimating the antioxidative effects of methanol extracts of crude drugs. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*. 1994;42:1663-5.
๑๕. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999;26:1231-7.
๑๖. Benzie IFF and Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 1996;239:70-6.
๑๗. Takahashi N, Honda T. Ohba T. Anticancer and superoxide scavenging activities of p-alkylaminophenols having various length alkyl chains. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2006;14:409-17.

Abstract

Anti-allergic, anti-inflammatory and antioxidant activities of *Aegle marmelos* Correa. fruit

Pathompong Phuaklee, Bhanuz Dechayont, Jitpisute Chunthorng-Orn, Arunporn Itharat

Department of Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine, Thammasat University

Introduction: *Aegle marmelos*, or Matuum, belongs to Rutaceae. In Thai traditional medicine, unripe fruit has been used to treat diarrhea, gastritis, flatulence, fatigue and maintain body balance. The objective of this study was to investigate the anti-allergic, anti-inflammatory and antioxidant activities of *A. marmelos* fruit.

Method: Two extraction methods (maceration and decoction) were used to extract unripe fruit. Inhibitory effects on the release of β -hexosaminidase and nitric oxide inhibitory assay were used to evaluate anti-allergic and anti-inflammatory activities. DPPH, ABTS, FRAP, and NBT assays were used to evaluate antioxidant activity.

Result: The 95% ethanol extract exhibited the potent allergic activity ($IC_{50} = 70.03 \pm 0.88 \mu\text{g/ml}$), whereas, water extract had no anti-allergic activity. The water extract exhibited the most potent NO inhibitory activity ($IC_{50} = 40.22 \pm 2.34 \mu\text{g/ml}$). Moreover, it displayed the highest antioxidant activity on ABTS assay ($EC_{50} = 36.40 \pm 1.23 \mu\text{g/ml}$) and FRAP assay (FRAP value = $111.61 \pm 0.59 \text{ Fe}^{2+}/\text{g}$ crude extract and TEAC value = $39.04 \pm 0.23 \text{ mg trolox equivalent /g}$ crude extract). In addition, both were not show antioxidant activity on NBT assay.

Discussion and Conclusion: The water extract of *Aegle marmelos* fruit which was according with the previous report showed anti-inflammatory and antioxidant activities. Moreover, this result supports the use of unripe fruit in Thai traditional medicine for treatment of gastritis, fatigue, and maintains body balance.

Key words: *Aegle marmelos*, anti-allergic, anti-inflammatory, antioxidant