

การยับยั้งอนุมูลอิสระและเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์
และผลิตภัณฑ์ลดการอักเสบ

Inhibition of Free Radicals and Matrix Metalloproteinase of Virgin Coconut Oil
and Its Reduction of Inflammatory Product

อุเทน จำใจ¹ ญาณิ พงษ์ไพบูลย์² นริศรา ไล่เลิศ³ และดวงพร อมรเลิศพิศาล^{4, 5*}

Uten Jamjai¹, Yanee Pongpaibul², Narissara Lailerd³ and Doungporn Amornlerdpisan^{4, 5*}

¹สาขาสหวิทยาการเกษตร คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

²ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพายัพ เชียงใหม่ 50000

³ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

⁴คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

⁵ศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางการเกษตรสำหรับบัณฑิตผู้ประกอบการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

¹Interdisciplinary Agriculture Program, Faculty of Engineering and Agro-Industry, Maejo University, Chiang Mai, Thailand 50290

²Department of Pharmaceutical Technology and Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Payap University, Chiang Mai, Thailand 50000

³Department of Physiology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand 50200

⁴Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, Maejo University, Chiang Mai, Thailand 50290

⁵Center of Excellence in Agricultural Innovation for Graduate Entrepreneur, Maejo University, Chiang Mai, Thailand 50290

*Corresponding author: doungpornfishtech@gmail.com

Received: September 03, 2019

Revised: November 28, 2019

Accepted: December 20, 2019

Abstract

The virgin coconut oil (VCO) is extracted from fresh and mature coconut meat (*Cocos nucifera* Linn.) without using chemical reagent or heating in process. The VCO is colorless and clear, it has the aroma of fresh coconut. The present study was carried out to determine VCO for phenolic contents, antioxidant, matrix metalloproteinase inhibitory activities, and then to formulate VCO pain relief product and evaluated their stability of the product. The results revealed that the phenolic contents of VCO was 14.79 ± 0.19 mg GAE. The VCO presented DPPH and superoxide radical scavenging activities with GAE value of 0.56 ± 0.01 mg and 36.32 ± 0.75 mg, respectively. Additionally, matrix metalloproteinase inhibitory activity can be reduced inflammation and protected degradation of cartilage which VCO had the highest inhibitory effect against MMP-9 as $84.53 \pm 1.00\%$. The pain relief ointment product has been developed using VCO as active ingredient. The stability of formulation was tested with subjecting samples at room temperature, 4 and 45°C for 45 days and heating-cooling cycles at intervals of 24 hours over 5 cycles. The product demonstrated good physical stability under the various conditions. The results of product satisfaction revealed that highly satisfied with the VCO ointment and no skin irritation in 20 volunteers.

Keywords: virgin coconut oil, antioxidant activity, anti-matrix metalloproteinase activity
pain relief product

บทคัดย่อ

น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ (Virgin Coconut Oil, VCO) ถูกสกัดจากเนื้อมะพร้าวสดที่แก่เต็มที่ (*Cocos nucifera* Linn.) ด้วยกระบวนการผลิตที่ไม่ผ่านความร้อนและสารเคมี น้ำมันมีลักษณะใส ไม่มีสี และมีกลิ่นของเนื้อมะพร้าวสด ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนสของ VCO จากนั้นนำไปเพิ่มมูลค่าเป็นผลิตภัณฑ์บรรเทาอาการปวดที่มี VCO เป็นส่วนผสม และศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์ ผลจากการศึกษาพบว่า VCO มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมีค่ามิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อตัวอย่าง 1 กรัม (GAE) เท่ากับ 14.79 ± 0.19 มก. มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งดีพีพีเอช (DPPH) และอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ โดยมีค่า GAE เท่ากับ 0.56 ± 0.01 มก. และ 36.32 ± 0.75 มก. ตามลำดับ ส่วนฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส (MMP) ที่ช่วยลดการอักเสบและป้องกันการเสื่อมของข้อพบว่า VCO มีฤทธิ์การยับยั้ง MMP-9 สูงที่สุด เท่ากับ $84.53 \pm 1.00\%$ จากฤทธิ์ชีวภาพดังกล่าวจึงนำ VCO ไปพัฒนาตำรับผลิตภัณฑ์บรรเทาปวดรูปแบบขี้ผึ้ง และทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์โดยเก็บที่อุณหภูมิห้อง อุณหภูมิ 4 และ 45°C. เป็นระยะเวลา 45 วัน รวมถึงการทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์แบบแรงที่อุณหภูมิ 4 และ 45°C. สลับกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จำนวน 5 รอบพบว่าผลิตภัณฑ์มีความคงตัวดีทางกายภาพในทุกสภาวะและเมื่อนำไปทดสอบความพึงพอใจในอาสาสมัครจำนวน 20 คน พบว่าอาสาสมัครมีความพึงพอใจต่อผลิตภัณฑ์โดยรวมดีมาก และไม่มีอาการระคายเคืองตลอดช่วงเวลาที่ทดสอบ

คำสำคัญ: น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส ผลิตภัณฑ์บรรเทาปวด

คำนำ

น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ (Virgin Coconut Oil; VCO) เป็นผลผลิตที่ได้จากการสกัดน้ำมันออกจากเนื้อมะพร้าว (*Cocos nucifera* Linn.) โดยไม่ผ่านความร้อนและสารเคมี หรือเรียกว่าน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็น ทำให้น้ำมันที่มีลักษณะใส ไม่มีสี เป็นหนึ่งในน้ำมันที่ได้รับความนิยมนำมาใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพและอาหารฟังก์ชัน (Marina *et al.*, 2009) VCO มีกรดลอริกซึ่งเป็นกรดไขมันสายปานกลางในปริมาณสูงกว่าร้อยละ 50 (Dayrit, 2014) มีการนำ VOC มาใช้บำรุงผิวและเส้นผม ทำให้ผมดกดำเป็นเงา และยังถูกนำมาใช้กลั้วปากโดยสามารถกำจัดแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของกลิ่นปาก (Tjin *et al.*, 2016; Kaushik *et al.*, 2016) และยังมีฤทธิ์ในการต้านอักเสบ ฤทธิ์ระงับปวด และลดไข้ (Intaphuak *et al.*, 2010)

อนุมูลอิสระเป็นสารที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวในอะตอมหรือโมเลกุล ซึ่งมีความไวสูงต่อการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระกลุ่มที่ไวต่อการทำปฏิกิริยา คือกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ เช่น อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\cdot-}$) อนุมูลไฮดรอกซิล ($OH^{\cdot}$) อนุมูลอัลคอกซิล ($RO^{\cdot}$) และอนุมูลไนตรัส ($NO^{\cdot}$) เป็นต้น อนุมูลเหล่านี้สามารถทำอันตรายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อ เป็นผลให้เกิดภาวะที่เซลล์และร่างกายถูกออกซิไดส์จนเกินสมดุล (Oxidative stress) ส่งผลให้เกิดการเสื่อมของเซลล์และเกิดการทำลายเนื้อเยื่อต่างๆ ของร่างกาย และอาจนำไปสู่พยาธิสภาพต่างๆ ได้แก่ ภาวะทางระบบหลอดเลือดและหัวใจ

(Cardiovascular disease) ความจำเสื่อม (Alzheimer) มะเร็ง (Cancer) และข้อเสื่อม (Arthritis) เป็นต้น (Liou and Storz, 2010; Panth *et al.*, 2016; Lepetsos and Papavassiliou, 2016; Huang *et al.*, 2016) โดยมีการรวบรวมรายงานวิจัยจำนวนมากพบว่า สารประกอบฟีนอลิกที่พบในผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมีฤทธิ์ในการยับยั้งหรือต้านการเกิดออกซิเดชัน (Anti-oxidant) ด้านการอักเสบ และช่วยป้องกันการเกิดโรคไม่ติดต่อเรื้อรังต่างๆ ได้ดี โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างสารสื่อกลาง (Pro-inflammatory mediators) และหรือการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (Dulce *et al.*, 2016)

เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส (Matrix Metalloproteinases; MMPs) เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายโปรตีนเมทริกซ์นอกเซลล์ (Extracellular Matrix; ECM) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการแก่ของผิว (Aging) การอักเสบ และมีส่วนเกี่ยวข้องในการพัฒนาและแพร่กระจายของมะเร็งต่างๆ เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งตับ และมะเร็งปอด เป็นต้น (Radisky and Radisky, 2015; Pittayapruk *et al.*, 2016; Naim *et al.*, 2017; Merchant *et al.*, 2017) นอกจากนี้ยังมีบทบาทสำคัญในโรคกระดูกเสื่อม เช่น โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (Rheumatoid arthritis) และโรคข้อเสื่อม (Osteoarthritis) (Itoh, 2017; Li *et al.*, 2017)

มีรายงานการศึกษาทางพรีคลินิกที่ให้อาสาสมัครสนใจเกี่ยวกับการยับยั้งเอนไซม์ MMP สามารถรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง มะเร็งต่างๆ และข้ออักเสบ (Hu *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2018; Winer *et al.*, 2018) ดังนั้นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MMP อาจมีประโยชน์ในการรักษาและบรรเทาอาการอักเสบจากโรคกระดูกเสื่อม จากรายงานของ Intaphuak *et al.* (2010) ที่ศึกษาฤทธิ์ระงับปวด และยับยั้งการอักเสบของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ในหนูขาวพบว่า น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์สามารถระงับปวด โดยการปิดกั้นการสังเคราะห์และหลั่งของสารสื่อประสาทที่ส่งสัญญาณให้เกิดอาการปวด โดยมีกรดลอริกเป็นตัวออก

ฤทธิ์ที่สำคัญ นอกจากนี้ในตำรับยาแผนโบราณมีการนำน้ำมันมะพร้าวมาใช้ทาหนวด เพื่อช่วยบำบัดรักษาโรคกระดูกและข้อ บรรเทาอาการปวดเมื่อยร่างกาย และลดอาการอักเสบของผิวหนัง ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณสารสำคัญกลุ่มฟีนอลิก และฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์หรือ VCO ที่จะนำไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ ได้แก่ ฤทธิ์การขจัดอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ MMP ร่วมกับการพัฒนาตำรับผลิตภัณฑ์บรรเทาอาการปวดจาก VCO

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมน้ำมันมะพร้าวสกัดบริสุทธิ์

สกัดน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ (Virgin Coconut Oil; VCO) ตามวิธีการของ Wong and Hartina (2014) ดังนี้ นำน้ำกะทิ 1 กิโลกรัม นำมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman's เบอร์ 4 จากนั้นนำส่วนที่กรองได้แช่ที่อุณหภูมิ -20°C. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาตั้งที่อุณหภูมิห้องเพื่อละลายน้ำแข็ง ต่อมานำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแยกตะกอน ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°C. เป็นเวลา 30 นาที น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ที่ได้เก็บไว้ในขวดที่มีฝาปิด แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง ปริมาณร้อยละของผลผลิตน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์เท่ากับ 8.8

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

ตรวจวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ ตามวิธีการของ Hammerschmidt and Pratt (1978) ผสมสารตัวอย่าง 0.20 มล. ด้วยสารละลาย 10% Folin-Ciocalteu 1.00 มล. และสารละลาย 7.5% โซเดียมคาร์บอเนต 0.80 มล. ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-51 series, Trulab) โดยใช้สารมาตรฐาน คือ กรดแกลลิก (Gallic acid) รายงานผลเป็น มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารทดสอบ (mg GAE/g sample)

การศึกษาฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระดีพีพีเอช

วิเคราะห์ฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH radical scavenging assay) ตามการทดสอบของ Hou *et al.* (2001) โดยเตรียมสารตัวอย่างปริมาตร 0.30 มล. ละลายใน Tris-HCl buffer (pH 7.9) ปริมาตร 0.10 มล. จากนั้นเติม 0.2 มิลลิโมลาร์ ของอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (Diphenyl-picrylhydrazyl radical, DPPH[•]) ปริมาตร 0.60 มล. บ่มในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-51 series, Trulab) ใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน คำนวณร้อยละการขจัดอนุมูลอิสระดีพีพีเอช ดังนี้

ร้อยละการขจัดอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (%)

$$= ((A_{\text{ควบคุม}} - A_{\text{ตัวอย่าง}}) / A_{\text{ควบคุม}}) \times 100$$

โดย $A_{\text{ควบคุม}}$ และ $A_{\text{ตัวอย่าง}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดควบคุม และค่าการดูดกลืนแสงของหลอดตัวอย่าง

เปรียบเทียบความเข้มข้นของสารตัวอย่างกับความเข้มข้นของกรดแกลลิกที่แสดงฤทธิ์เท่ากัน (Gallic Acid Equivalent, GAE) รายงานผลมีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อกรัมของสารตัวอย่าง (mg GAE/g extract)

การศึกษาฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์

ฤทธิ์การขจัดอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ (Superoxide radical scavenging assay) ตามวิธีการของ Nishikimi, *et al.* (1972) โดยผสม 156 ไมโครโมลาร์ของสารละลาย Nitroblue Tetrazolium (NBT) ปริมาตร 1 มล. และ 468 ไมโครโมลาร์ ของสารละลาย Nicotinamide Adeninedinucleotide (NADH) ปริมาตร 1 มล. กับสารตัวอย่างปริมาตร 0.1 มล. จากนั้นเติม 60 ไมโครโมลาร์ของสารละลาย Phenazine Methosulphate (PMS) ปริมาตร 0.1 มล. ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน คำนวณร้อยละการขจัดอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ ดังนี้

ร้อยละการขจัดอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์

$$= ((A_{\text{ควบคุม}} - A_{\text{ตัวอย่าง}}) / A_{\text{ควบคุม}}) \times 100$$

โดย $A_{\text{ควบคุม}}$ และ $A_{\text{ตัวอย่าง}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดควบคุม และค่าการดูดกลืนแสงของหลอดตัวอย่าง

เปรียบเทียบความเข้มข้นของสารตัวอย่างกับความเข้มข้นของกรดแกลลิกที่แสดงฤทธิ์เท่ากัน (Gallic Acid Equivalent, GAE) รายงานผลมีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อกรัมของสารตัวอย่าง (mg GAE/g extract)

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรติเนส

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรติเนส (Matrix Metalloproteinase; MMP) ตามวิธีการของ Panyathep *et al.* (2013) โดยใช้ชุดการทดสอบ (Enzo Life Sciences AK016) ละลาย VCO ใน Dimethyl Sulfoxide (DMSO) ที่ความเข้มข้น 0.1 มก./มล. เพื่อทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 และ MMP-13) และใช้ N-Isobutyl-N-(4-methoxyphenyl-sulfonyl) Glycyl Hydroxamic Acid (NNGH) เป็นสารยับยั้งเอนไซม์มาตรฐาน นำส่วนผสมที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C. นาน 30 นาที จากนั้นเติมซับสเตรต Omni-MMP fluorogenic แล้วนำไปวัดค่าเอนไซม์ MMP ด้วยแสงฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence signal) ที่ Ex/Em 328/420 นาโนเมตร คำนวณค่าเอนไซม์ MMP จากสมการ

$$\text{ค่าเอนไซม์ MMP} = \frac{\text{ค่าดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง}}{\text{ค่าดูดกลืนแสงของ MMP ควบคุม}}$$

การพัฒนาสูตรตำรับผลิตภัณฑ์บรรเทาปวด

การพัฒนาสูตรตำรับผลิตภัณฑ์บรรเทาปวดรูปแบบขี้ผึ้ง (Oleaginous ointment) ประเมินคุณสมบัติทางกายภาพและเคมี โดยพิจารณาจากลักษณะที่มองเห็นได้แก่ ลักษณะของเนื้อผลิตภัณฑ์ สี กลิ่น และการประเมินความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ โดยในตำรับผลิตภัณฑ์มีส่วนประกอบของ น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ (VCO) พาราฟิน

(Paraffin) ขี้ผึ้ง (Bees wax) ปิโตรลาทัม (Petrolatum) เชียบัตเตอร์ (Shea butter) ลาโนลิน (Lanolin) เมนทอล (Menthol) เมทิลซาลิไซเลต (Methyl salicylate) และการบูร (Camphor) ซึ่งส่วนประกอบทั้งหมด และหลอมให้เข้ากันโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65°C. ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงและบรรจุใส่ภาชนะที่มีฝาปิด

การศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์

การศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์ ดัดแปลงตามวิธีการของ Chantree (2015) โดยพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางกายภาพจากเนื้อสัมผัสและสีของผลิตภัณฑ์ ความคงตัวของผลิตภัณฑ์ที่ 3 สภาวะ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง อุณหภูมิ 4 และ 45°C. เป็นเวลา 45 วัน และทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์แบบเร่งโดยเก็บไว้ที่ความร้อนสลับเย็น (Heating-cooling cycle) จำนวน 5 รอบ ที่อุณหภูมิ 45°C. เป็นเวลา 24 ชั่วโมงสลับกับที่อุณหภูมิ 4°C. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับ 1 รอบ

การประเมินความพึงพอใจของผลิตภัณฑ์

ทดสอบความพึงพอใจและการยอมรับหลังการใช้ผลิตภัณฑ์ในอาสาสมัคร เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ โดยใช้แบบสอบถามในอาสาสมัครจำนวน 20 คน แบบสอบถามประกอบด้วย ข้อมูลส่วนตัว ความพึงพอใจ และการยอมรับต่อผลิตภัณฑ์ โดยมีเกณฑ์ระดับความพึงพอใจ 5

ระดับ จากน้อยไปมาก ดังนี้ 1 = ไม่ชอบ (Dislike) 2 = ชอบน้อย (Slight), 3 = ชอบปานกลาง (Moderate), 4 = ชอบมาก (Good) และ 5 = ชอบมากที่สุด (Excellent) และแสดงความพึงพอใจในแต่ละระดับเป็นร้อยละ (% Satisfaction) โดยได้ชี้แจงให้อาสาสมัครทราบก่อนการทดสอบว่า หากมีอาการแพ้ เช่น อาการแดง (Erythema) และอาการบวม (Edema) ให้หยุดใช้ทันที

ผลการวิจัย

ในการศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ชีวภาพในการขจัดอนุมูลอิสระของ VCO พบว่า มีสารประกอบฟีนอลิกมีค่ามีลิกกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมของสารตัวอย่าง (GAE) เท่ากับ 14.79 ± 0.19 มก. โดยมีฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระดีฟิฟิเอช และฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ มีค่า GAE เท่ากับ 0.56 ± 0.01 มก. และ 36.32 ± 0.75 มก. ตามลำดับ ส่วนค่าความเข้มข้นของ VCO ต่อการขจัดอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (50% Inhibitory Concentration; IC_{50}) แสดงใน Table 1 การเพิ่มความเข้มข้นของ VCO จะสามารถเพิ่มฤทธิ์ในการขจัดอนุมูลอิสระทั้งสองชนิดได้ดี โดย VCO ขนาด 20-100 มก./มล. สามารถขจัดอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ได้ร้อยละ 34-83 ซึ่งมีประสิทธิภาพดีกว่าการขจัดอนุมูลอิสระดีฟิฟิเอชที่ได้ร้อยละ 19-62 ดังแสดงใน Figure 1

Table 1 Antioxidant activities and phenolic compound of virgin coconut oil

	mg GAE/g extract	IC_{50} (mg/mL)
DPPH radical scavenging	0.56 ± 0.01	78.16 ± 0.60
Superoxide radical scavenging	36.32 ± 0.75	27.43 ± 0.37
Total phenolic contents	14.79 ± 0.19	—

Data expressed as mean $\pm$ standard deviation of triplicate measurements.

GAE expressed as mg gallic acid per gram of VCO.

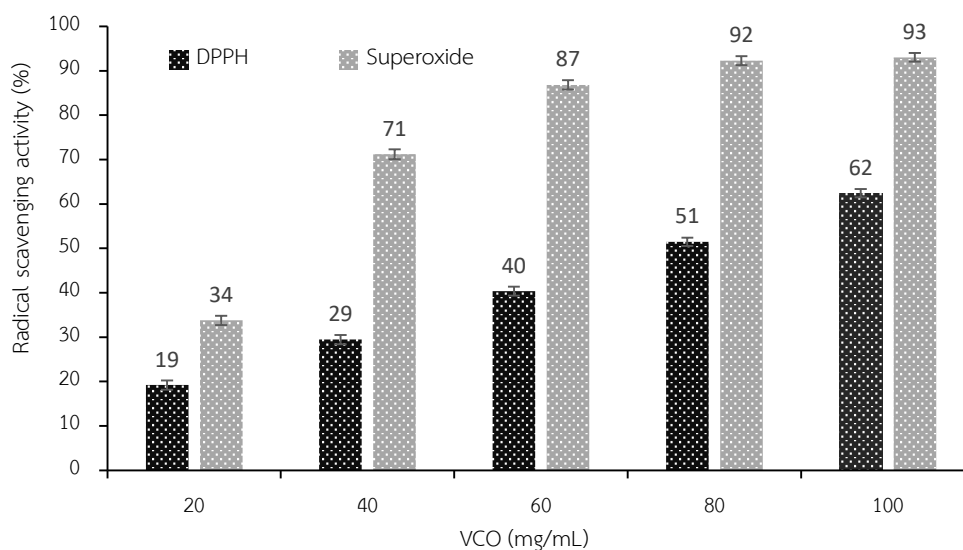


Figure 1 Free radicals scavenging activity of virgin coconut oil against DPPH and superoxide radicals

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรติเนส 5 ชนิด ได้แก่ MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 และ MMP-13 ผลการยับยั้งเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรติเนสของ VCO แสดงใน Figure 2 ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่า น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์มีความสามารถในการยับยั้งกลุ่มเอนไซม์ MMP ได้

หลากหลายชนิด โดยมีค่าการยับยั้งในช่วงร้อยละ 50-85 ซึ่งน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์มีฤทธิ์การยับยั้ง MMP-9 สูงที่สุด ร้อยละ 84.53 ± 1.00 โดยระดับ MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 และ MMP-13 ใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Biomarker) ที่แสดงถึงกระบวนการย่อยสลายโปรตีนเมทริกซ์นอกเซลล์ และกระบวนการอักเสบของร่างกาย

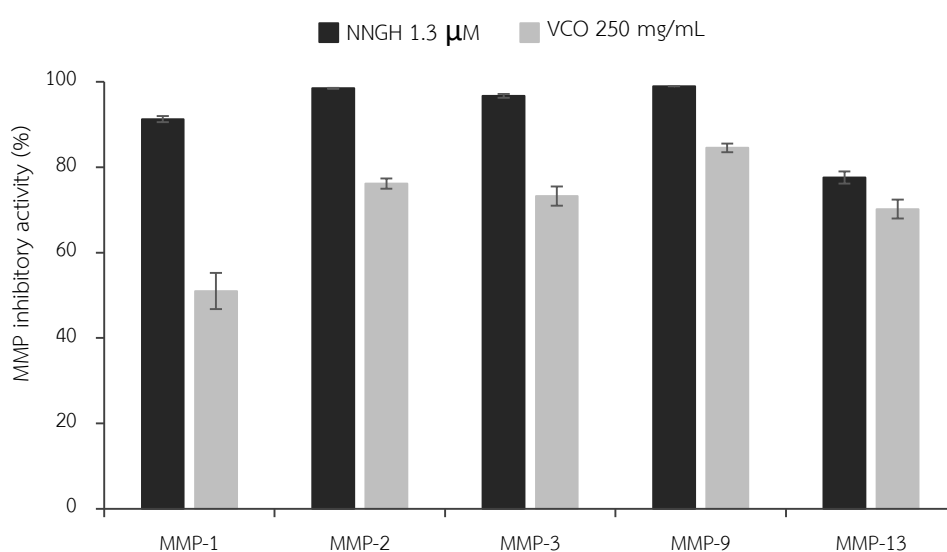


Figure 2 Matrix-metalloproteinase inhibitory activity of the virgin coconut oil

จากการพัฒนาตำรับขี้ผึ้งบรรเทาปวดที่มีน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์เป็นส่วนผสม ตำรับที่ได้มีสีของเนื้อขี้ผึ้งเป็นสีขาว มีกลิ่นหอมสมุนไพรอ่อนๆ เนื้อของขี้ผึ้งมีความแข็ง เมื่อทาแล้วสามารถกระจายตัวได้ดี ไม่เป็นก้อน และไม่มีการแยกชั้น เมื่อนำมาทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์โดยการเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง อุณหภูมิ 4 และ

45°C. เป็นระยะเวลา 45 วัน พบว่า สี กลิ่น และความแข็งของขี้ผึ้งยังคงสภาพเดิม และขี้ผึ้งไม่มีการเปลี่ยนแปลงหลังการทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์แบบเร่ง (ร้อนสลับเย็น ที่อุณหภูมิ 4 และ 45°C. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จำนวน 5 รอบ) ดังแสดงใน Table 2

Table 2 Stability test of VCO ointment product under the various conditions

Conditions	Colour	Odour	Texture	Separation
Initial	white	soft aroma	hard	none
RT	white	soft aroma	hard	none
4°C	white	soft aroma	hard	none
45°C	white	soft aroma	hard	none
H/C	white	soft aroma	hard	none

RT: room temperature, H/C: heating/cooling

ผลการประเมินความพึงพอใจของผลิตภัณฑ์ขี้ผึ้งบรรเทาปวดผสมน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ ในอาสาสมัครจำนวน 20 คน ทั้งเพศหญิงและเพศชาย อายุระหว่าง 30-50 ปี พบว่า จากการประเมินโดยรวมของผลิตภัณฑ์ ได้แก่ สี กลิ่น เนื้อของผลิตภัณฑ์ การกระจายตัว การซึมเข้าสู่ผิว

ความมัน ความเหนอะ และความพึงพอใจโดยรวม อยู่ในระดับชอบมากถึงชอบมากที่สุด ดังแสดงใน Figure 3 อาสาสมัครมีความพึงพอใจต่อสีของผลิตภัณฑ์สูงที่สุดเท่ากับ 4.80 ± 0.41 ในขณะที่มีความพึงพอใจต่อการซึมเข้าสู่ผิวน้อยที่สุด เท่ากับ 4.10 ± 0.79

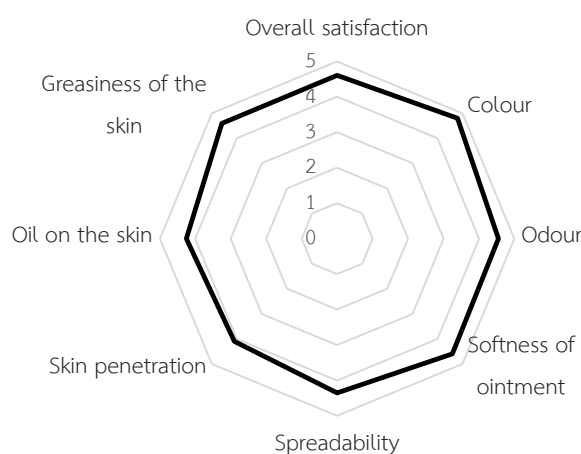


Figure 3 Volunteers' satisfaction with the VCO ointment product

วิจารณ์ผลการวิจัย

สารประกอบฟีนอลิกเป็นกลุ่มสารทุติยภูมิที่พบทั่วไปในพืช และมีรายงานการวิจัยจำนวนมากพบว่าเป็นสารสำคัญที่มีฤทธิ์ชีวภาพในการต้านการเกิดออกซิเดชันและต้านการอักเสบได้ มีผลการศึกษาของ Annuar (2012) และ Ahmad *et al.* (2015) พบว่า ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของ VCO ที่สกัดด้วยวิธีปั่นเหวี่ยงมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 4.34 ± 0.09 mg GAE/100 กรัม VCO และ 16.02 ± 0.44 mg GAE/100 กรัม VCO ตามลำดับ ส่วนปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้มีปริมาณ 14.79 ± 0.19 mg GAE/1 กรัม VCO ซึ่งสูงกว่ารายงานดังกล่าว ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากวัตถุดิบมะพร้าว วิธีการสกัด ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด และวิธีวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน

อนุมูลอิสระมีผลต่อเซลล์และสารชีวโมเลกุลในร่างกายทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อในร่างกาย ทำให้เกิดการอักเสบซึ่งเป็นกลไกการป้องกันสิ่งแปลกปลอมที่เกิดขึ้นกับเซลล์หรือเนื้อเยื่อของร่างกายที่ได้รับบาดเจ็บ เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมเหล่านั้นออกจากร่างกาย ส่งเสริมเซลล์และเนื้อเยื่อให้เกิดการซ่อมแซม การอักเสบที่เกิดจากความเครียดออกซิเดชันเป็นสาเหตุของโรคเรื้อรังหลายชนิด รวมถึงข้อเสื่อมและข้ออักเสบรูมาตอยด์ (Biswas *et al.*, 2017) จากรายงานของ Marina *et al.* (2009) พบว่าฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระดีฟิฟิเอซของ VCO ที่ได้จากการสกัดแยกน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ด้วยการหมัก (Fermentation method) และการใช้ความร้อนสลับความเย็น (Heating-cooling method) มีค่า IC_{50} ในช่วง 1.24-3.23 มก./มล. ซึ่งมีฤทธิ์ในการขจัดอนุมูลอิสระดีฟิฟิเอซที่สูงกว่าในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งใช้วิธีการสกัดแบบปั่นเหวี่ยง (Centrifugation method) และใช้ระยะเวลาสกัดสั้นกว่า อย่างไรก็ตาม VCO ที่สกัดได้ในการศึกษาครั้งนี้มีค่า IC_{50} ในการขจัดอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ได้สูง

กว่าอนุมูลอิสระดีฟิฟิเอซถึง 3 เท่า และในขนาด 100 มก./มล. สามารถขจัดอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ได้ถึงร้อยละ 93 ซึ่งอนุมูลชนิดนี้สามารถทำลายเนื้อเยื่อและอาจนำไปสู่พยาธิสภาพต่างๆ ได้

เอนไซม์ MMPs มีความสัมพันธ์กับกระบวนการอักเสบ โดยเป็นตัวควบคุมกระบวนการอักเสบ การแสดงออกของเอนไซม์ MMPs ที่เพิ่มขึ้น ถูกพบได้ในกระบวนการอักเสบส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย ซึ่งเอนไซม์ MMPs ทำหน้าที่ควบคุมกลไกการป้องกันตนเอง (Barrier function) ไซโตไคน์ที่กระตุ้นการอักเสบ (Inflammatory cytokine) และกิจกรรมของคีโมไคน์ (Chemokine activity) (Nissinen and Kähäri, 2014; Fingleton, 2017) ฤทธิ์ต้านเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนสของ VCO นั้น อาจมาจากความสามารถไปจับกับ Zn^{2+} ไอออน ที่ช่วยในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส ส่งผลให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้อย่างปกติ สอดคล้องกับการศึกษาของ Huang *et al.* (2011) ระบุว่ากรดเอลลาจิก (Ellagic acid) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก สามารถยับยั้งเอนไซม์ MMP-2 เนื่องจากความสามารถในการจับกับ Zn^{2+} ไอออน นอกจากนี้การศึกษาของ Calabriso *et al.* (2016) รายงานว่าสารกลุ่มฟีนอลิก ได้แก่ ทรานส์เรสเวอราทรอล (Trans-resveratrol) ทรานส์ฟิซิด (Trans-piceid) แคมเฟอรอล (Kaempferol) และเคอเซติน (Quercetin) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ดังนั้นสารประกอบฟีนอลิกที่พบในน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์จึงน่าจะเป็นสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส

จากฤทธิ์ชีวภาพของ VCO สรุปได้ว่ามีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และเป็นสารต้านเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส จึงมีศักยภาพในการนำไปเป็นสารประกอบเชิงหน้าที่ (Functional ingredient) จึงนำไปเป็นส่วนผสมที่สำคัญในตำรับผลิตภัณฑ์บรรเทาอาการอักเสบของกล้ามเนื้อและข้อ โดยมีผลการประเมินความ

พึงพอใจของอาสาสมัครต่อผลิตภัณฑ์ซีพีผสม VCO ในระดับมากถึงดีมาก นอกจากนี้ยังไม่พบอาการแพ้ หรือ ระบายเคืองผิวหนังในอาสาสมัครอีกด้วย

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาฤทธิ์จัดอนุมูลอิสระดีพีพีเอช และ อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ของน้ำมันมะพร้าวสกัดบริสุทธิ์ แสดงให้เห็นว่าน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งเอนไซม์ เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส 1, 2, 3, 9 และ 13 ซึ่งช่วยลด การอักเสบ และการเสื่อมสลายของข้อ เมื่อนำมาพัฒนา เป็นผลิตภัณฑ์บรรเทาปวดในรูปแบบซีพีผสมที่มีส่วนผสมของ น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ พบว่าผลิตภัณฑ์มีคุณสมบัติทาง กายภาพและเคมีที่ดี รวมถึงความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ เมื่อครบเวลาทดสอบไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง เมื่อทดสอบ ความพึงพอใจในอาสาสมัครพบว่า อาสาสมัครมีความ พึงพอใจโดยรวมอยู่ในระดับดีมาก

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุน การวิจัย (สกว.) สำหรับทุนสนับสนุนการวิจัยระดับ ปริญาเอกภายใต้โครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัย เพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) รหัสโครงการ PHD58I0076 ร่วมกับบริษัทอำพลฟู้ดส์ โพรเซสซิง จำกัด ขอขอบคุณ คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ และศูนย์ ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางการเกษตรสำหรับบัณฑิต ผู้ประกอบการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ สำหรับการสนับสนุน ด้านสถานที่และอุปกรณ์ในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Ahmad, Z., R. Hasham, N.F. Aman Nor and M.R. Sarmidi. 2015. Physico-chemical and antioxidant analysis of virgin coconut oil using west African tall variety. *J. Adv. Res. Mater. Sci.* 13(1): 1-10.
- Annuar, N.A.B.S. 2012. **Lipid and Phytochemicals Profiles of Non-heat Treated Virgin Coconut Oil.** Master Thesis. University Technology Malaysia. 33 p.
- Biswas, S., R. Das and E.R. Banerjee. 2017. Role of free radicals in human inflammatory diseases. *AIMS Biophys.* 4(4): 596-614.
- Calabriso, N., M. Massaro, E. Scoditti, M. Pellegrino, I. Ingrosso, G. Giovino, and M.A. Carluccio. 2016. Red grape skin polyphenols blunt matrix metallo proteinase-2 and -9 activity and expression in cell models of vascular inflammation: protective role in degenerative and inflammatory diseases. *Molecules* 21(9): 1147-1164.
- Chantree, K. 2015. Formulation of whitening cosmetics from lakoocha extract. *SDU. Res. J.* 8(1): 1-24.
- Dayrit, F.M. 2014. Lauric acid is a medium-chain fatty acid, coconut oil is a medium-chain triglyceride. *Philippine J. Sci.* 143(2): 157-166.

- Dulce L.A., N. Leyva-López, P.E. Gutierrez-Grijalva and J. Basilio. 2016. Phenolic compounds: natural alternative in inflammation treatment. A review. **J. Cogent Food Agric.** 2(1) 1-14.
- Fingleton, B. 2017. Matrix metalloproteinases as regulators of inflammatory processes. **Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res.** 1864(11): 2036-2042.
- Hammerschmidt, P.A. and D.E. Pratt. 1978. Phenolic antioxidants of dried soybeans. **J. Food Sci.** 43(2): 556-559.
- Hou, W.C., Y.C. Chen, H.J. Chen, Y.H. Lin, L.L. Yang and M.H. Lee. 2001. Antioxidant activities of trypsin inhibitor, a 33 KDa root storage protein of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam cv. Tainong 57). **J. Agri. Food Chem.** 49(6): 2978-2981.
- Hu, J., P.E. Van den Steen, Q.X. Sang and G. Opdenakker. 2007. Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. **Nat. Rev. Drug Discov.** 6(6): 480-498.
- Huang, S.T., R.C. Yang, H.T. Wu, C.N. Wang and J.H. Pang. 2011. Zing-chelation contributes to the anti-angiogenic effect of ellagic acid on inhibiting MMP-2 activity, cell migration and tube formation. **PLoS One** 6(5): e18986.
- Huang, W.J., X. Zhang and W.W. Chen. 2016. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. **Biomed. Rep.** 4(5): 519-522.
- Intaphuak, S., P. Khonsung and A. Panthong. 2010. Anti-inflammatory, analgesic, and antipyretic activities of virgin coconut oil. **Pharm. Biol.** 48(2): 151-157.
- Itoh, Y. 2017. Metalloproteinases in rheumatoid arthritis: potential therapeutic targets to improve current therapies. **Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.** 148: 327-338.
- Kaushik, M., P. Reddy, R. Sharma, P. Udameshi, N. Mehra and A. Marwaha. 2016. The effect of coconut oil pulling on *Streptococcus mutans* count in saliva in comparison with chlorhexidine mouthwash. **J. Contemp. Dent. Pract.** 17(1): 38-41.
- Lepetsos, P. and A.G. Papavassiliou. 2016. ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis. **Biochim. Biophys. Acta.** 1862(4): 576-591.
- Li, H., D. Wang, Y. Yuan and J. Min. 2017. New insights on the MMP-13 regulatory network in the pathogenesis of early osteoarthritis. **Arthritis Res. Ther.** 19(248) 1-12.
- Liou, G.Y. and P. Storz. 2010. Reactive oxygen species in cancer. **Free Radical Res.** 44(5): 479-496.
- Marina, A.M., Y.B. Che Man and I. Amin. 2009. Virgin coconut oil: emerging functional food oil. **Trends Food Sci. Tech.** 20(10): 481-487.

- Merchant, N., G.P. Nagaraju, B. Rajitha, S. Lammata, K. Jella, Z. Buchwald, S. Lakka and A. Ali. 2017. Matrix metalloproteinases: their functional role in lung cancer. **Carcinogenesis** 38(8): 766-780.
- Naim, A., Q. Pan and M.S. Baig. 2017. Matrix metalloproteinases (MMPs) in liver diseases. **J. Clin Exp. Hepatol.** 7(4): 367-372.
- Nishikimi, M., N. Appaji and K. Yagi. 1972. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 46(2): 849-854.
- Nissinen, L. and V.M. Kähäri. 2014. Matrix metalloproteinases in inflammation. **Biochim. Biophys. Acta.** 1840(8): 2571-2580.
- Panth, N., K.R. Paudel and K. Parajuli. 2016. Reactive oxygen species: a key hallmark of cardiovascular disease. **Adv. Med.** 2016(9152732): 1-12.
- Panyathap, A., T. Chewonarin, K. Taneyhill and U. Vinitketkumnuen. 2013. Antioxidant and anti-matrix metalloproteinases activities of dried longan (*Euphoria longana*) seed extract. **Sci. Asia.** 39: 12-18.
- Pittayapruerk, P., J. Meephansan, O. Prapapan, M. Komine and M. Ohtsuki. 2016. Role of matrix metalloproteinases in photoaging and photocarcinogenesis. **Int. J. Mol. Sci.** 17(6): 868.
- Radisky, E.S. and D.C. Radisky. 2015. Matrix metalloproteinases as breast cancer drivers and therapeutic targets. **Front. Biosci.** 20(7): 1144-1163.
- Tjin, L.D., A.S. Setiawan and E. Rachmawati. 2016. Exposure time of virgin coconut oil against oral *Candida albicans*. **Padjadjaran J. Dent.** 28(2): 89-94.
- Winer, A., S. Adams and P. Mignatti. 2018. Matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy: turning past failures into future successes. **Mol. Cancer Ther.** 17(6): 1147-1155.
- Wong, Y.C. and H. Hartina. 2014. Virgin coconut oil production by centrifugation method. **Orient. J. Chem.** 30(1): 237-245.
- Wu, Y., E.L. Goh, D. Wang and S. Ma. 2018. Novel treatments for osteoarthritis: an update. **Open Access Rheumatol.** 10: 135-140.