รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย
การบริโภครังนกแบบเป็นวิทยาศาสตร์
(Scientific Consumption of Edible Bird's Nests)

คณะผู้วิจัย

1. ภก. กมลศักดิ์ เลิศไพบูลย์

2. ผศ.ดร. ภวิกา มหาสวัสดิ์

รายงานต่อฝ่ายนโยบายชาติและความสัมพันธ์ข้ามชาติ (ฝ่าย 1)

สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.)

สนับสนุนโดย สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.)

สัญญาเลขที่ RDG 6110055

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย
การบริโภครังนกแบบเป็นวิทยาศาสตร์
(Scientific Consumption of Edible Bird's Nests)

คณะผู้วิจัย

1. ภก. กมลศักดิ์ เลิศไพบูลย์ (หัวหน้าโครงการวิจัย)

2. ผศ.ดร. ภวิกา มหาสวัสดิ์ (นักวิจัยร่วม)

รายงานต่อฝ่ายนโยบายชาติและความสัมพันธ์ข้ามชาติ (ฝ่าย 1)

สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.)

สนับสนุนโดย สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.)

10 กุมภาพันธ์ 2564

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกสว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

การวิจัยเรื่อง “การบริโภครังนกแบบเป็นวิทยาศาสตร์” นี้ ได้ตรวจวัดสารสำคัญในรังนกบ้านของไทย โดยการเก็บตัวอย่างรังนกบ้านจากทุกภูมิภาคของประเทศไทย หลังจากนั้น สกัดสารสกัดรังนก และศึกษาคุณสมบัติทางการแพทย์ของสารสกัดรังนกไทย รวมทั้งได้ผลิตเครื่องสำอางรังนกที่มีสารสำคัญรังนกเป็นส่วนผสม การทดลองเริ่มจากการเก็บรังนกตัวอย่างจากภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย ได้แก่ ภาคใต้ (จังหวัดกระบี่และนราธิวาส) ภาคกลาง (จังหวัดสมุทรสงคราม) ภาคตะวันออก (จังหวัดระยอง) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (จังหวัดอุดรธานี) และภาคเหนือ (จังหวัดเชียงใหม่) รังนกตัวอย่างจากจังหวัดอุดรธานีมีสีแดงและสีเหลืองมากที่สุด ในขณะที่รังนกตัวอย่างจากจังหวัดเชียงใหม่มีความสว่างมากที่สุด การเตรียมสารสกัดรังนกตัวอย่างในงานวิจัยนี้ ใช้วิธีสกัดด้วยน้ำร้อน โดยมีวิธีเตรียมดังนี้ ต้มรังนกตัวอย่างที่ทำความสะอาดแล้วเป็นเวลา 60 นาที แล้วจึงนำเข้าหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที สารสกัดรังนกคือส่วนใสที่เก็บได้หลังจากการปั่นเหวี่ยง การศึกษาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดในสารสกัดรังนก โดยการตรวจวัดปริมาณสารฟีนอลิกรวมของสารสกัดรังนก ด้วยวิธี Folin-Ciocalteau method พบว่าปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดอยู่ในช่วง 4.16 ถึง 5.70 mg GAE/g รังนกแห้ง และรังนกตัวอย่างจากจังหวัดที่แตกต่างกันส่งผลต่อปริมาณสารฟีนอลิกรวมที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) การตรวจวัดปริมาณกรดเซียลิกในสารสกัดรังนกจากรังนกบ้านในประเทศไทยด้วยวิธีโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง พบว่า ได้ปริมาณกรดเซียลิก 10.325 % และเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี periodate-resorcinol method มีค่าอยู่ในช่วงจาก 7.22 ถึง 9.60 g/100 g รังนกแห้ง โดยมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญขึ้นกับแหล่งที่เก็บรังนกตัวอย่าง ($P<0.05$) การตรวจวัดปริมาณโปรตีนรวมของสารสกัดรังนกตัวอย่าง ใช้วิธี Bradford method พบว่า ปริมาณโปรตีนรวมอยู่ในช่วงระหว่าง 2.78 - 3.42 mg/g รังนกแห้ง และปริมาณโปรตีนรวมของสารสกัดรังนกที่ได้จากจังหวัดที่แตกต่างกันมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรังนกตัวอย่าง ด้วยวิธีที่แตกต่างกัน 3 วิธี ได้แก่ วิธี $ABTS^{\bullet+}$ method วิธี $DPPH^{\bullet}$ method และวิธีอนุมูลอิสระ $^{\bullet}OH$ พบว่า ค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ของสารสกัดรังนกที่ได้จากจังหวัดต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (4.63 ถึง 8.76 mg TE/g รังนกแห้ง ; $P>0.05$) แต่ค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ (1.95 to 2.60 mg TE/g รังนกแห้ง) และอนุมูลอิสระ $^{\bullet}OH$ (26.27 - 56.00 %) ของสารสกัดรังนกที่ได้จากจังหวัดต่างๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) นอกจากนี้ สารสกัดรังนกที่ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ (1.5, 3, 15, and 30 mg/mL) ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสท์ การตรวจสอบการปกป้องเซลล์ไฟโบรบลาสท์ ของสารสกัดรังนกต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยการตรวจวัดจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสท์ที่มีชีวิตด้วยวิธี MTT assay และตรวจวัดระดับอนุมูลออกซิเจนที่ไวต่อการทำปฏิกิริยา (reactive oxygen species: ROS) รวมทั้งระดับอะพอพโทซิสโดยใช้วิธี flow cytometry พบว่า เซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสท์ที่มีชีวิตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ หลังจากบ่มด้วยสารสกัดรังนกที่ความเข้มข้น 3 และ 15 mg/mL เมื่อเปรียบเทียบกับการบ่มด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

เพียงอย่างเดียว ($P<0.05$) และพบว่า การผลิตอนุมูลออกซิเจนที่ไวต่อปฏิกิริยาในเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสท์ที่บ่มด้วยสารสกัดรังนกที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 15 mg/mL ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับการบ่มเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสท์ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพียงอย่างเดียว ($P<0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่า สารสกัดรังนกที่ความเข้มข้น 15 และ 30 mg/mL สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสท์ที่มีชีวิต และลดจำนวนเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสท์ที่เกิดอะพอพโทซิสในระยะเริ่มต้น เซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิสในระยะหลัง และเซลล์ตาย ได้อย่างมีนัยสำคัญ หลังจากกระตุ้นด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ($P<0.05$) การตรวจสอบคุณสมบัติสมานแผลของสารสกัดรังนก ด้วยวิธี *in vitro* scratch assay พบว่า ที่เวลา 8 ชั่วโมงของการบ่มเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ด้วยสารสกัดรังนกที่ความเข้มข้นมากกว่า 1.5 mg/mL ช่องว่างที่สร้างบน cell monolayer ถูกเติมเต็มได้ด้วยเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้บ่มด้วยสารสกัดรังนก สุดท้ายได้ผลิตเครื่องสำอางที่มีสารสกัดรังนกเป็นส่วนผสมสำคัญ ได้แก่ สบู่กลีเซอรีนสารสกัดรังนก เซรั่มสารสกัดรังนก และครีมสารสกัดรังนก ประเทศไทยผลิตรังนกบ้านได้มากกว่าปีละ 100 ตัน รังนกส่วนใหญ่ส่งออกไปต่างประเทศในสภาพรังนกดิบ ถ้ามีการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์รังนกต่าง ๆ จะเป็นการเพิ่มมูลค่าและเพิ่มรายได้ให้ประเทศชาติได้อีกมหาศาล

คำสำคัญ : รังนกบ้าน สารสกัดรังนกบ้าน กรดเซียลิก เครื่องสำอางรังนก

Abstract

This research of the "Scientific Consumption of Edible Bird's Nests" detected the active ingredient in house Edible Bird's Nests (EBN) collected from all regions of Thailand. After that, the EBNs were extracted, and the medical properties of EBN extract from Thailand were investigated. Also, cosmetic products containing the EBN extract as an active ingredient were formulated. The research started with the EBN collection from all regions of Thailand, including Southern Thailand (Krabi and Narathiwas), Central Thailand (Samut Songkhram), Eastern Thailand (Rayong), Northeastern Thailand (Udon Thani), and Northern Thailand (Chiang Mai). The most reddish and yellowish EBN sample was from Udon Thani, whereas the EBN sample from Chiang Mai showed the most lightness. The EBN samples were prepared using the hot water extraction method for EBN extract as follows: cleaned EBN samples were boiled for 60 min, autoclaved at 121°C for 15 min, and centrifuged at 11,000 rpm for 20 min. The supernatant was collected to obtain the EBN extract. Total phenolic contents (TPC) of the EBN extracts were detected using the Folin-Ciocalteau method. The TPC values were in a range of 4.16 to 5.70 mg GAE/g dried EBN and were significantly different between different EBN origins ($P<0.05$). Total sialic acid contents of the EBN extract obtained from the house EBNs in Thailand were determined using high performance liquid chromatography, resulting in the total sialic acid contents of 10.325 %. These contents varied significantly from 7.22 to 9.60 g/100 g dried EBN, depending on the ENB origins ($P<0.05$), when detected using the periodate-resorcinol method. The Bradford method was used to investigate the total protein content of the EBN extracts. The total protein contents ranged from 2.78 to 3.42 mg/g dried EBN, and these values were significantly different between different EBN samples ($P<0.05$). The antioxidant activities of the EBN extract were determined using three different methods, including the $ABTS^{\bullet+}$, $DPPH^{\bullet}$, and $^{\bullet}OH$ method. The $ABTS^{\bullet+}$ inhibition values of the EBN extracts did not differ significantly between different EBN origins (4.63 to 8.76 mg TE/g dried EBN; $P>0.05$). However, the $DPPH^{\bullet}$ (1.95 to 2.60 mg TE/g dried EBN) and $^{\bullet}OH$ inhibition values (26.27 to 56.00 %) obtained from the EBN extracts differed significantly between different EBN origins ($P<0.05$). Moreover, the EBN extracts at the tested doses (1.5, 3, 15, and 30 mg/mL)

were not toxic to fibroblasts. The protective effect of EBN extracts in fibroblasts against hydrogen peroxide (H_2O_2) was assessed by measuring the fibroblast viability using the MTT assay and detecting the reactive oxygen species (ROS) and apoptosis level using the flow cytometry method. The fibroblast viability increased significantly after the EBN extract treatment at 3 and 15 mg/mL when compared with H_2O_2 treatment alone ($P<0.05$). The ROS production in EBN extract-treated fibroblasts at doses lower than 15 mg/mL significantly decreased when compared with H_2O_2 treatment alone ($P<0.05$). Furthermore, the EBN extracts at the dose of 15 and 30 mg/mL significantly enhanced live cells and reduced early apoptotic, late apoptotic, and dead cells after H_2O_2 induction ($P<0.05$). The wound healing properties of the EBN extract was determined using the *in vitro* scratch assay. At 8 h incubation of the EBN extract doses more than 1.5 mg/mL, the gaps created on the cell monolayer were mostly filled by fibroblasts when compared to non-treated cells. Finally, the cosmetic products containing the EBN extract as the active ingredient were formulated, including EBN extract glycerin soap, EBN extract serum, and EBN extract cream. Thailand produces house EBNs for more than 100 tons a year. Most EBNs are exported as raw EBNs. If they are processed into various EBN products, their value will be raised, and eventually, the income of Thailand will be vastly increased.

Keywords: House Edible Bird's Nests, House Edible Bird's Nests Extract, Sialic acid, Bird's Nests cosmetics

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยเรื่อง “การบริโภครังนกแบบเป็นวิทยาศาสตร์” (Scientific Consumption of Edible Bird’s Nests) นี้ สำเร็จลงได้ดีทุกประการ ข้าพเจ้าขอกล่าวขอบคุณบุคคล ดังต่อไปนี้

ข้าพเจ้าขอขอบคุณ ศาสตราจารย์นายแพทย์ *สุทธิพันธ์ จิตพิมลมาศ* อดีตผู้อำนวยการสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ *ดร. อิศรา ศานติศาสน์* อดีตผู้อำนวย การฝ่ายนโยบายชาติและความสัมพันธ์ข้ามชาติ สกว. (ฝ่าย1) ที่เล็งเห็นความสำคัญของธุรกิจรังนกของประเทศไทยจนนำไปสู่การตั้งทีมวิจัยเพื่อสร้างองค์ความรู้ในธุรกิจรังนกไทยในทุกมิติ และ *ผศ.ดร. สุกานดา เหลืองอ่อน ลูวิส* ผู้อำนวยการฝ่ายนโยบายชาติและความสัมพันธ์ข้ามชาติ สกว. (ฝ่าย1)

ขอบคุณ *ผศ.ดร. ภวิกา มหาสวัสดิ์* อาจารย์ประจำหลักสูตร วท.บ.จุลชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา อำเภอเมืองสงขลา จังหวัดสงขลา ในฐานะผู้ช่วยนักวิจัย และ ขอขอบคุณ *ดร.ศุภกร พัฒนวิวัฒน์* นักวิจัยอิสระ ผู้มากประสบการณเรื่อง รังนกแอ่นกินรังในฐานะที่ปรึกษาโครงการวิจัย

ขอบคุณ *คุณเกษม จันทร์ดำ* หัวหน้าชุดโครงการวิจัย“*รังนกไทยในธุรกิจรังนกโลก*” (Thailand in The Global Birds' Nest Industry) ที่ได้มอบหมายงานวิจัย “การบริโภครังนกแบบเป็นวิทยาศาสตร์” (Scientific Consumption of Edible Bird’s Nests) ให้แก่ข้าพเจ้า และให้คำปรึกษาตลอดเวลา จนสิ้นสุดการทำวิจัย

ขอขอบคุณ บุคลลต่อไปนี้ ซึ่งได้อนุเคราะห์รังนกบ้านสำหรับใช้ในการวิจัย ได้แก่ *คุณภาณุมาศ กระแสธาร* และ *คุณบุญนึก บุญลิปตานนท์* มอบรังนกจากจังหวัดกระบี่ *คุณจิระพงศ์ จิโรจน์มนตรี* มอบรังนกจากจังหวัดยะลา *คุณกิตติ ปักเข็ม* มอบรังนกจากจังหวัดนครศรีธรรมราช *คุณพิริยะ ตั้งสินมั่นคง* และ *คุณสมโภชน์ เจนพานิชพงศ์* มอบรังนกจากจังหวัดนราธิวาส *คุณพิสิษฐ์ ภาคย์เติมพงษ์* มอบรังนกจากสมุทรสงคราม *คุณธราดล วัฒนะสิมากร* มอบรังนกจากจังหวัดอุดรธานี และ *คุณรัชเขต จิยางกูร* มอบรังนกจากจังหวัดเชียงใหม่

ขอขอบคุณ *ศาสตราจารย์ (พิเศษ) ดร.กฤษณา ไกรสินธุ์* เจ้าของรางวัลแมกไซไซ สาขาบริการสาธารณะ ประจำปี พ.ศ. 2552 และ *ศาสตราจารย์ ดร. ดำรงศักดิ์ ฟ้ารุ่งสาง* คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ที่ให้คำปรึกษาการดำเนินการวิจัย และขอบคุณ *คุณธนัทอร สุรีย์รักษณ์* ประธานบริหาร บริษัทไทยเนส คอร์เปอร์เรชั่น จำกัด ผู้ผลิตและจัดจำหน่ายผลิตภัณฑ์รังนกบีเวล ที่อำนวยความสะดวกในการตรวจวิเคราะห์กรดเซียลิกในรังนก

ขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา ที่ให้ใช้ห้องปฏิบัติการของคณะฯ ในการทำการวิจัย และขอบคุณ บริษัทไทย เนสคอร์เปอร์เรชัน จำกัด เลขที่ 4/99 หมู่ 4 ตำบลคอกกระบือ อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสาคร ที่ให้ใช้ห้องปฏิบัติการของบริษัทฯ เพื่อทำการวิจัย

ขอขอบคุณ สถาบันต่าง ๆ ที่ให้คำปรึกษาซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากในการทำวิจัยนี้ คือ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัย เชียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ อุทยานวิทยาสาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ อำเภอท่าศาลา จังหวัดนครศรีธรรมราช และ ศูนย์ส่งเสริมอุตสาหกรรม ภาค 10 จังหวัดสุราษฎร์ธานี ถนนเทพรัตนกวี ตำบลวัดประดู่ อำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี

สุดท้าย ข้าพเจ้าขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนในการวิจัย

ภก. กมลศักดิ์ เลิศไพบูลย์

10 กุมภาพันธ์ 2564

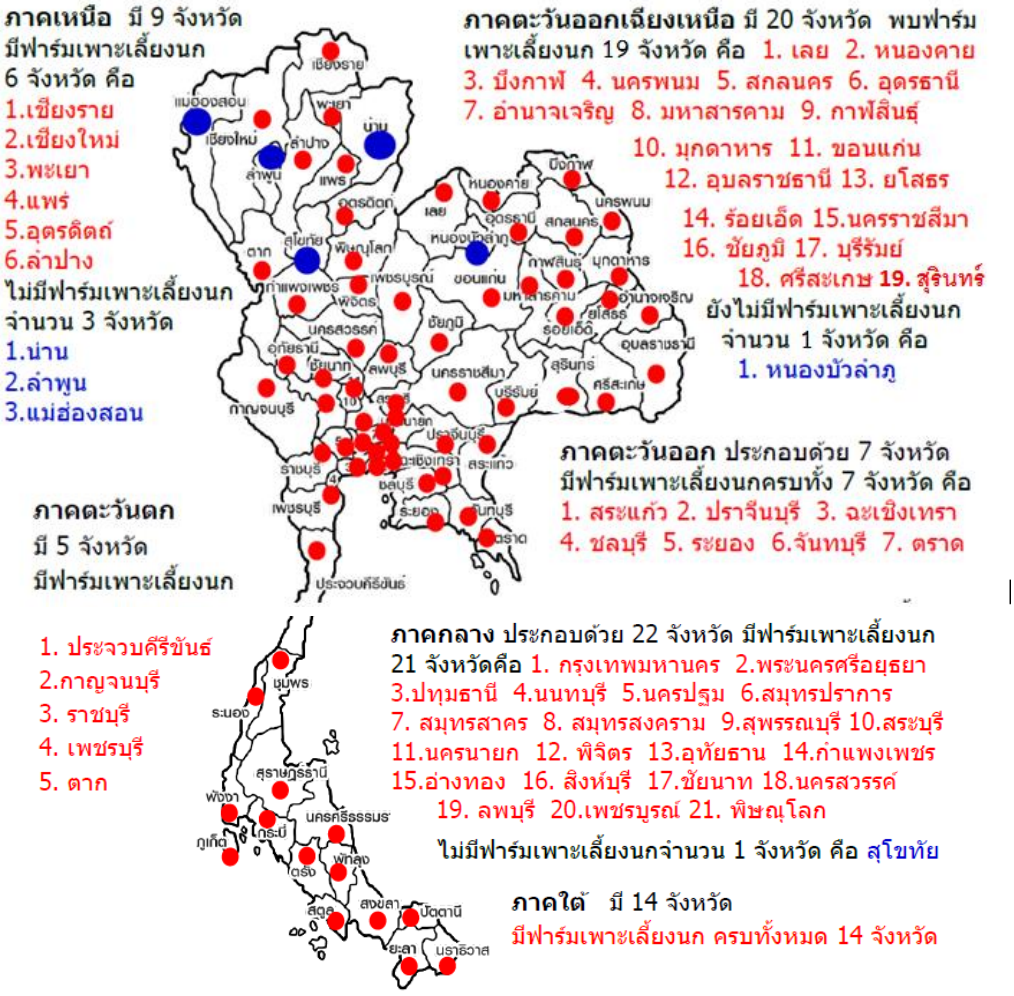
บทสรุปผู้บริหาร

โครงการวิจัย “การบริโภครังนกแบบเป็นวิทยาศาสตร์” (scientific consumption of edible bird’s nests) เป็นโครงการย่อยในโครงการวิจัยชุดใหญ่ คือ “รังนกไทยในธุรกิจรังนกโลก” (Thailand in the global birds’ nest industry) ซึ่งมีหัวหน้าโครงการคือ คุณเกษม จันทร์ดำ (เกษม จันทร์ดำ, 2563) ความสำคัญของรังนกไทยในธุรกิจรังนกโลกนั้น ในทางเชิงเศรษฐกิจมีการประเมินว่า การบริโภครังนกทั่วโลกในแต่ละปีคิดเป็นมูลค่าสูงถึงหนึ่งแสนล้านบาท และไทยนับว่าเป็นประเทศที่ส่งออกรังนกรายใหญ่รายหนึ่งของโลก (เกษม จันทร์ดำ, 2560) แต่ในความเป็นจริงพบว่า สังคมไทยมีความรู้ความเข้าใจเรื่องอุตสาหกรรมรังนก และการส่งออกรังนก น้อยมาก เมื่อเทียบกับประเทศเพื่อนบ้านที่ส่งออกรังนกเช่นกัน ได้แก่ มาเลเซีย และอินโดนีเซีย เป็นต้น ทั้งนี้เนื่องจาก ประเทศไทยมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับรังนกน้อยมาก ดังนั้น คณะผู้ทำโครงการวิจัยนี้มีความคาดหวังว่า ผลงานโครงการวิจัยนี้จะเป็นส่วนหนึ่งของการส่งเสริมการพัฒนาอุตสาหกรรมรังนกของไทยโดยรวม

รังนกที่กินได้ (edible bird’s nest: EBN) หรือเรียกว่า คิวบิโลส (cubilose) หมายถึง รังของนกแอ่นกินรัง (edible nest swiftlets) ในประเทศไทย มีรายงานว่า นกแอ่นกินรังชนิดรังขาวประจำถิ่นของไทยมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Aerodramus germani* มีชื่อภาษาไทยว่า นกแอ่นกินรังตะโพกขาว (โอภาส ขอบเขตต์, 2542) รังนกที่นิยมบริโภคกันในสมัยก่อนเป็น “รังนกถ้ำ” คือ เป็นรังของนกแอ่นกินรังถ้ำ ซึ่งเป็นนกแอ่นกินรังที่อาศัยอยู่ตามเกาะรังนก ซึ่งอยู่กลางทะเล และมีรายงานว่าประเทศไทยมีถ้ำรังนกธรรมชาติ ซึ่งอยู่ตามเกาะต่าง ๆ กลางทะเล จำนวน 156 เกาะ มีประชากรนกแอ่นกินรังถ้ำประมาณ 1.09 ล้านตัว (ตวงรัตน์ โพธิ์เที่ยง, 2547) ประเทศไทยมีการเก็บเกี่ยวรังนกถ้ำและส่งออกรังนกถ้ำไปยังต่างประเทศมาตั้งแต่สมัยกรุงศรีอยุธยา โดยระหว่างปี 2546-2550 การบริโภครังนกแอ่นกินรังทั่วโลก ในแต่ละปีปริมาณสูงถึง 160 ตัน คิดเป็นมูลค่าประมาณ 120,000 ล้านบาท ซึ่งประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตและส่งออกรังนกประมาณร้อยละ 20 ของปริมาณการส่งออกของโลก เป็นอันดับสองรองจากอินโดนีเซีย ซึ่งมีมูลค่าการส่งออกประมาณร้อยละ 50 ของการส่งออกของโลก (เกษม จันทร์ดำ, 2560) และรังนกถ้ำส่วนใหญ่ที่ส่งออกไปต่างประเทศเป็น “รังนกดิบ” คือรังนกที่ยังไม่ผ่านการแปรรูป

ปัจจุบันนี้มี “รังนกบ้าน” ซึ่งเป็นรังนกที่เก็บได้จากฟาร์มเพาะเลี้ยงนกแอ่นกินรัง ประเทศไทยมีการทำฟาร์มเพาะเลี้ยงนกแอ่นกินรังมานาน เรียกว่า บ้านรังนก (บ้านนก) หรือ ตึกรังนก (ตึกนก) หรือ คอนโดนก แต่เทคนิคการทำฟาร์มเพาะเลี้ยงนกแอ่นกินรังถือเป็นความลับ และ มีค่าปรึกษาเป็นเงินนับล้านบาท

จนถึงปี 2550 จึงเริ่มมีการทำฟาร์มเพาะเลี้ยงนกแอ่นกินรังอย่างแพร่หลาย และ มีการเปิดเผยความรู้เกี่ยวกับการสร้างบ้านรังนก และยังมีการสัมมนาเรื่อง“บ้านนกแอ่น รังนกแอ่น ความลับที่ต้องเปิด” (กมลศักดิ์ เลิศไพบูลย์ และ ศุภกร พัฒนวิวัฒน์, 2551) จากนั้นฟาร์มเพาะเลี้ยงนกแอ่นกินรังได้เพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็ว จนถึงปีพ.ศ. 2557 ประมาณการว่าในประเทศไทยมีฟาร์มเพาะเลี้ยงนกแอ่นกินรังประมาณ 10,000 หลัง โดยจังหวัดที่มีฟาร์มเพาะเลี้ยงนกแอ่นกินรังทั้งหมด 53 จังหวัด รวมทั้งจังหวัดที่ไม่มีพื้นที่จดกับทะเล (กมลศักดิ์ เลิศไพบูลย์ และ ศุภกร พัฒนวิวัฒน์, 2558) ปัจจุบันรายงานว่า ในประเทศไทยซึ่งมีทั้งหมด 76 จังหวัด (รวมกรุงเทพมหานคร เป็น 77 จังหวัด) มีฟาร์มเพาะเลี้ยงนกแอ่นกินรัง 72 จังหวัด และไม่มีฟาร์มเพาะเลี้ยงนกแอ่นกินรัง 5 จังหวัด และมีจำนวนฟาร์มเพาะเลี้ยงนกแอ่นกินรังรวมกันทั่วประเทศ ประมาณ 17,800 หลัง (ดังแสดงใน ภาพที่ ก)



ภาพที่ ก จังหวัดในประเทศไทยที่มีฟาร์มเพาะเลี้ยงนกแอ่นกินรัง

นำเสนอโดยสมาคมผู้ประกอบการรังนกแอ่นปี 2558 (กมลศักดิ์ เลิศไพบูลย์ และ ศุภกร พัฒนวิวัฒน์, 2558) แก้ไขเพิ่มเติมปี 2563 รายงานว่า ประเทศไทยทั้งหมด 76 จังหวัด รวมกรุงเทพมหานครเป็น 77 จังหวัด มีฟาร์มเพาะเลี้ยงนกแอ่นกินรังทั้งหมด 72 จังหวัด และ ไม่มีฟาร์ม เพาะเลี้ยงนกแอ่นกินรัง 5 จังหวัด (การแบ่งภูมิภาคของประเทศ พิจารณาการแบ่งภูมิภาคโดยยึดเอาลักษณะ ภูมิศาสตร์และลักษณะภูมิประเทศเป็นสำคัญ จึงแบ่งประเทศไทยออกเป็น 6 ภูมิภาค)

จำนวนฟาร์มเพาะเลี้ยงนกแอ่นกินรังในประเทศไทย มีประมาณ 17,800 หลัง กล่าวคือ ภาคใต้มีฟาร์มเพาะเลี้ยงนกแอ่นกินรังครบทั้ง 14 จังหวัด และมีฟาร์มเพาะเลี้ยงนกรวมกันประมาณ 10,000 หลัง ภาคกลางประกอบด้วย 22 จังหวัด (รวม กรุงเทพมหานคร) มีฟาร์มเพาะเลี้ยงนกแอ่นกินรังทั้งหมด 19 จังหวัด ไม่มีฟาร์มเพาะเลี้ยงนก 1 จังหวัด (คือ สุโขทัย) มีฟาร์มเพาะเลี้ยงนกแอ่นกินรังประมาณ 3,500 หลัง ส่วนภาคตะวันตกประกอบด้วย 5 จังหวัด มีฟาร์มเพาะเลี้ยงนกแอ่นกินรังทุกจังหวัด และมีฟาร์มเพาะเลี้ยงนกรวมประมาณ 4,000 หลัง ภาคตะวันออกประกอบด้วย 7 จังหวัด มีฟาร์มเพาะเลี้ยงนกแอ่นกินรังทุกจังหวัด และมีฟาร์มเพาะเลี้ยงประมาณ 4,000 หลัง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือประกอบด้วย 20 จังหวัด พบว่ามีฟาร์มเพาะเลี้ยงนกแอ่นกินรังถึง 19 จังหวัด ไม่พบฟาร์มเพาะเลี้ยงนกแอ่นกินรัง 1 จังหวัด (คือ หนองบัวลำภู) โดยมีฟาร์มเพาะเลี้ยงนกแอ่นกินรังประมาณ 200 หลัง และภาคเหนือซึ่งประกอบด้วย 9 จังหวัด มีฟาร์มเพาะเลี้ยงนกแอ่นกินรัง 6 จังหวัด และไม่พบฟาร์มเพาะเลี้ยงนกแอ่นกินรัง 3 จังหวัด (คือ แม่ฮ่องสอน ลำพูน และน่าน) และมีฟาร์มเพาะเลี้ยงนกแอ่นกินรังราว 20 หลัง ดังนั้น จำนวนฟาร์มเพาะเลี้ยงนกแอ่นกินรังรวมทั่วประเทศ มีประมาณ 17,800 หลัง

การคำนวณปริมาณประชากรนกแอ่นกินรังจากฟาร์มเพาะเลี้ยง หรือ นกแอ่นกินรังบ้าน (นกบ้าน) และปริมาณรังนกที่เก็บเกี่ยวได้จากฟาร์มเพาะเลี้ยง หรือ รังนกบ้าน (รังบ้าน) โดยการคำนวณดังนี้ ทั้งประเทศไทยมีฟาร์มเพาะเลี้ยงนกแอ่นกินรังรวมกันประมาณ 17,800 หลัง และ โดยให้บ้านรังนก 1 หลัง มีประชากรนกขั้นต่ำ 600 ตัว ดังนั้น ประเทศไทยมีประชากรนกแอ่นกินรังจากฟาร์มเพาะเลี้ยงไม่ต่ำกว่า 10 ล้านตัว มากกว่าปริมาณนกแอ่นกินรังถ้ำถึง 10 เท่า ในส่วนของปริมาณรังนกบ้าน ก็คำนวณได้ดังนี้ คือ นกแอ่นกินรัง 10 ล้านตัว เท่ากับ นกแอ่นกินรัง 5 ล้านคู่ ซึ่งสามารถสร้างรังได้ 5 ล้านรัง ในเวลาหนึ่งปี นกแอ่นกินรังบ้านทำรังได้ 3 ครั้ง คิดเป็นปริมาณรังนกบ้านทั้งหมด 15 ล้านรัง/ปี และคิดเป็นปริมาณรังนก 100,000 กิโลกรัม/ปี หรือ 100 ตัน/ปี (โดยเฉลี่ย รังนก 1 กิโลกรัม มีจำนวนรังนก 130-150 รัง) ถ้าคิดว่าราคารังนกดิบเฉลี่ยกิโลกรัมละ 30,000 บาท คิดเป็นมูลค่าประมาณ 3,000 ล้านบาทต่อปี ถ้านำรังนกดิบไปเพิ่มมูลค่าครั้งแรก ด้วยการทำความสะอาด จะได้รังนกแห้งสะอาด พร้อมจะนำไปบริโภคได้ รังนกแห้งสะอาดมีมูลค่าเพิ่มสูงขึ้นมากถึงกิโลกรัมละ 70,000 บาท และรังนกที่สะอาดสามารถนำไปเพิ่มมูลค่าได้อีกโดยการทำผลิตภัณฑ์รังนกแปรรูปต่าง ๆ ได้แก่ รังนกพร้อมชงดื่ม รังนกสำเร็จรูปบรรจุขวด สารสกัดรังนก และเครื่องสำอางรังนก เช่น เซรั่มรังนก โลชั่นรังนก ครีมรังนก และสบู่รังนก เป็นต้น ในแต่ละปีประเทศไทยผลิตรังนกบ้านได้จำนวนมาก ถ้ามีการส่งเสริมให้มีการแปรรูปรังนกดิบให้เป็น ผลิตภัณฑ์รังนกแปรรูปต่าง ๆ จะเป็นการสร้างงานขนาดใหญ่และมีการจ้างแรงงานจำนวนมาก รังนกจะมีมูลค่าเพิ่มขึ้นอีกมหาศาล โครงการวิจัยนี้ ได้ศึกษาผลิตภัณฑ์รังนกแปรรูป กล่าวคือ การทำสารสกัดรังนก และ

เครื่องสำอางรังนก จึงคาดหวังว่า จะมีส่วนในการจ้างแรงงาน การส่งเสริมอุตสาหกรรมรังนกไทยโดยรวม และเพิ่มรายได้ให้แก่ประเทศชาติอย่างมหาศาล

โครงการวิจัยนี้ เป็นการศึกษาสารสำคัญในรังนกบ้านของไทยเป็นครั้งแรก จึงวางแผนการเก็บตัวอย่างรังนกบ้านแบบสำรวจทั่วทั้งประเทศ คือ ภาคเหนือเก็บรังนกบ้านจากจังหวัดเชียงใหม่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเก็บรังนกบ้านจากจังหวัดอุดรธานี ภาคตะวันออกเก็บรังนกจากจังหวัดระยอง ภาคกลางเก็บรังนกบ้านจากจังหวัดสมุทรสงคราม สำหรับภาคใต้ ซึ่งมีฟาร์มเพาะเลี้ยงนกแอ่นกินรังมากที่สุดในประเทศ จึงเลือกเก็บเป็น 2 ตัวอย่าง คือ ภาคใต้ตอนบนเก็บรังนกจากจังหวัดกระบี่ ซึ่งเป็นรังนกบ้านฝั่งทะเลอันดามัน และภาคใต้ตอนล่างเก็บรังนกจาก จังหวัดนราธิวาส ยะลา และนครศรีธรรมราช ซึ่งเป็นรังนกบ้านฝั่งทะเลอ่าวไทย วันเวลาที่เก็บตัวอย่างรังนก ทำการเก็บพร้อมกันในเดือนและฤดูกาลเดียวกัน ผลของการศึกษาวิจัยนี้ จะได้แสดงค่าสารสำคัญของรังนกบ้านของไทยในภาพรวมทั่วประเทศ และยังเป็นการแสดงค่าสารสำคัญของรังนกบ้านไทยเป็นครั้งแรก

โครงการวิจัยนี้ ได้ศึกษาการทำความสะอาดรังนกดิบ ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่ารังนกครั้งที่ 1 (ไม่ได้นำเสนอในงานวิจัยนี้) รังนกบ้านก็เช่นเดียวกับรังนกถ้ำ คือ รังนกบ้านส่วนใหญ่ก็ส่งออกเป็นรังนกดิบเช่นกัน รังนกไม่ว่าเก็บเกี่ยวจากถ้ำรังนกหรือบ้านรังนก ซึ่งเรียกว่า รังนกดิบ ยังไม่สามารถนำไปบริโภคได้ทันที รังนกดิบ จะต้องทำความสะอาดเสียก่อน สมัยก่อนกระบวนการทำความสะอาดรังนกเป็นความลับของผู้ประกอบการ ไม่มีการเปิดเผยต่อสาธารณะ คณะผู้วิจัยจึงได้ร่วมกับ ภาควิชาเทคโนโลยีและการอุตสาหกรรม และศูนย์วิทยาศาสตร์อาหารฮาลาล ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหารและโภชนาการ สังกัดคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มอ. ปัตตานี ได้เปิดการอบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่องการทำความสะอาดรังนกตามหลักมาตรฐานอาหารฮาลาล (กมลศักดิ์ เลิศไพบูลย์ และ ศุภกร พัฒนวิวัฒน์, 2562) ทั้งหมด 4 ครั้ง แต่ละครั้งมีผู้อบรมมากกว่า 200 ท่าน กระบวนการทำความสะอาดรังนกจะต้องใช้แรงงานคนเป็นหลัก ในแต่ละปีประเทศไทยผลิตรังนกบ้านประมาณ 100 ตัน ถ้าจะเพิ่มมูลค่ารังนกด้วยการทำความสะอาดรังนกจะต้องว่าจ้างแรงงานคนเป็นจำนวนมาก ซึ่งเป็นการสร้างรายได้ให้กับแรงงานและเป็นการเพิ่มมูลค่ารังนกของอุตสาหกรรมรังนกไทย

การเพิ่มมูลค่ารังนกดิบอีกวิธีหนึ่ง คือ การทำสารสกัดรังนก ในขั้นตอนการเก็บเกี่ยวรังนกถ้ำหรือรังนกบ้าน จะได้รังนกดิบที่มีคุณภาพหลากหลาย รังนกดิบเหล่านี้จะต้องผ่านกระบวนการทำความสะอาดที่แตกต่างกันออกไป รังนกดิบประเภทที่ 1 คือ รังนกมีขนาดรังใหญ่ รูปทรงสวย และมีขนนกปนเปื้อน

เล็กน้อย จะทำความสะอาดโดยการคงรูปทรงที่สวยงามของรังไว้ ซึ่งต้องใช้เทคนิคเฉพาะในการทำความสะอาด ส่วนรังนกดิบประเภทที่ 2 คือ รังนกดิบรูปทรงไม่สวย มีขนาดเล็ก และมีขนนกปนเปื้อนมาก ก็จะมีการทำความสะอาดแบบแยกรังหรือสลายรัง (กมลศักดิ์ เลิศไพบูลย์ และ ศุภกร พัฒนวิวัฒน์, 2562) รังนกประเภทที่ 2 เมื่อทำความสะอาดแล้ว ราคาขายก็ยังต่ำกว่ารังนกประเภทที่ 1 ที่ทำความสะอาดแล้ว แต่ถ้านำรังนกประเภทที่ 2 ที่ทำความสะอาดแล้ว ไปทำการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์รังนก คือ ทำสารสกัดรังนก จะได้สารสกัดรังนกที่มีราคาสูงมาก สารสกัดรังนกมีราคาสูงกว่ารังนกประเภทที่ 1 ที่ทำความสะอาดแล้ว เป็นการเพิ่มมูลค่าของอุตสาหกรรมรังนกไทย (กมลศักดิ์ เลิศไพบูลย์ และ ศุภกร พัฒนวิวัฒน์, 2558)

การศึกษาวิจัยทางวิทยาการสมัยใหม่ พบว่าในเนื้อรังนกมีสารที่มีประโยชน์อยู่จริง โดยสารที่พบในเนื้อรังนกอาจแบ่งเป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ สารอาหาร (nutrient compounds) และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) สารอาหารที่อยู่ในเนื้อรังนกได้แก่ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน วิตามิน และเกลือแร่ต่าง ๆ มีรายงานการศึกษาเรื่อง สารอาหารในรังนกถ้ำสีขาวและสีแดงของประเทศไทย (บังอร บุญชู, 2547) และการศึกษาเรื่อง สารอาหารในรังนกบ้านสีขาวของประเทศไทย (วราศรี แสงกระจ่าง, 2554) ส่วนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่อยู่ในเนื้อรังนก ได้แก่ ไกลโคโปรตีน สารกระตุ้นการเจริญเติบโตของผิวหนัง (EGF) กรดเซียลิก (หรือ กรดไซอะลิก) แลคโตเฟอรินและโอโวทรานสเฟอริน สารคอนดรอยทินไกลโคสะมิโนไกลแคน และฮอร์โมน เป็นต้น แต่ยังไม่มีรายงานการศึกษาวิจัยเรื่อง สารสำคัญหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรังนกของประเทศไทย ในโครงการวิจัย “การบริโภครังนกแบบเป็นวิทยาศาสตร์” คณะผู้วิจัยได้ตรวจสอบสารสำคัญที่เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรังนกบ้านของประเทศไทย คือ กรดเซียลิก หรือกรดไซอะลิก การศึกษาวิจัยได้ตรวจปริมาณของกรดเซียลิกในรังนกบ้านของไทย และยังได้ตรวจสอบการออกฤทธิ์ของกรดเซียลิกด้วย ซึ่งเป็นการยืนยันว่า การบริโภครังนกในปัจจุบันนี้ เป็นการบริโภครังนกแบบเป็นวิทยาศาสตร์

โครงการวิจัยนี้ ได้ศึกษาการทำผลิตภัณฑ์รังนกแปรรูปเบื้องต้นคือ ทำสารสกัดรังนก (edible bird’s nest extracts) การสกัดรังนกมีวัตถุประสงค์เพื่อแยกสารที่มีประโยชน์ออกจากเนื้อรังนก จะได้สารสกัดรังนกที่เป็นของเหลวใส และเป็นผงแห้ง สีขาว สารสกัดรังนกประกอบด้วยสารอาหารที่มีประโยชน์ ได้แก่ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต เกลือแร่ต่าง ๆ และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ สารกระตุ้นการเจริญเติบโตของผิวหนัง (EGF) กรดเซียลิกหรือกรดไซอะลิก แลคโตเฟอร์รินและโอโวทรานสเฟอร์ริน สารคอนดรอยทิน ไกลโคสะมิโนไกลแคน และฮอร์โมน เป็นต้น โครงการวิจัยนี้ ยังได้ศึกษาชนิดและปริมาณสารสำคัญในสารสกัดรังนก นั่นคือ กรดเซียลิกหรือกรดไซอะลิกของรังนกบ้านของไทย ซึ่งนับว่าเป็นการแสดงค่าสารสำคัญของรังนกบ้านของไทยเป็นครั้งแรก และสามารถนำสารสกัดรังนกไปต่อยอดทำ

ผลิตภัณฑ์แปรรูปอื่น ๆ ได้อีก เช่น ทำเครื่องสำอางรังนก เป็นต้น ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าของอุตสาหกรรมรังนกไทย

โครงการวิจัยนี้ได้ศึกษาการทำผลิตภัณฑ์รังนกแปรรูป คือ ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางรังนก นับว่าเป็นการเพิ่มมูลค่ารังนกครั้งที่ 3 กล่าวคือ การนำสารสกัดรังนกซึ่งมีสารอาหารและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของรังนก ไปเป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางรังนก คือ ครีมรังนก เซรั่มรังนก โลชั่นรังนก และสบู่รังนก ความพิเศษของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางรังนกที่ผลิตจากโครงการวิจัย คือ สามารถระบุชนิดและปริมาณสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างชัดเจนบนฉลากของผลิตภัณฑ์

สรุปผลของการศึกษาและผลงานที่เป็นรูปธรรม ซึ่งเป็นตัวชี้วัดความสำเร็จของโครงการวิจัย “การบริโภครังนกแบบเป็นวิทยาศาสตร์” ของคณะผู้วิจัย มีดังนี้

(1) ได้วิธีสำหรับตรวจวิเคราะห์สารสำคัญในรังนกและสารสกัดรังนก ซึ่งสามารถทำการวิเคราะห์ได้ที่ห้องปฏิบัติการของหลักสูตร วท.บ. จุลชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา จังหวัดสงขลา ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์สารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรังนก คือ กรดเซียลิก หรือกรดไซอะลิก (sialic acid: SA) หรือกรดเอ็น-อะเซทิลนิวรามินิก (นานา; *N*-acetylneuraminic acid: NANA)

(2) มีฐานข้อมูลทางด้านวิทยาศาสตร์ เกี่ยวกับรังนกบ้านของไทย และวิธีการสกัดสารสกัดรังนก ตัวชี้วัดความสำเร็จของโครงการวิจัยนี้ คือ ได้สารสกัดรังนกไทย

(3) มีฐานข้อมูลทางด้านวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับกรดเซียลิกในรังนก กล่าวคือ ปริมาณกรดเซียลิกในรังนกบ้านแห้ง สะอาด มีค่าเฉลี่ย 10.325%

(4) มีฐานข้อมูลทางด้านวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับโปรตีนในสารสกัดรังนกตัวอย่าง พบว่า มีปริมาณโปรตีน ดังแสดงในตารางที่ ก

ตารางที่ ก ผลการตรวจสอบปริมาณโปรตีนในสารสกัดรังนกตัวอย่าง

สารสกัดรังนก	กระบี่	นราธิวาส	สมุทรสงคราม	ระยอง	อุดรธานี	เชียงใหม่
โปรตีน (mg/g รังนกแห้ง)	3.14	3.32	3.12	2.78	3.42	3.28

(5) มีฐานข้อมูลทางด้านวิทยาศาสตร์ เกี่ยวกับคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรังนก โดยผลการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี $ABTS^{\bullet+}$ วิธี $DPPH^{\bullet}$ และวิธี $^{\bullet}OH$ ดังแสดงในตารางที่ ข

ตารางที่ ข ผลการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรังนกตัวอย่างโดยวิธี $ABTS^{\bullet+}$ วิธี $DPPH^{\bullet}$ และวิธี $^{\bullet}OH$ assay

สารสกัดรังนก	กระบี่	นราธิวาส	สมุทรสงคราม	ระยอง	อุดรธานี	เชียงใหม่
$ABTS^{\bullet+}$ assay (mgTE/g รังนกแห้ง)	5.23	6.31	8.31	4.78	8.76	4.63
$DPPH^{\bullet}$ assay (mgTE/g รังนกแห้ง)	1.95	2.46	2.60	2.44	2.59	2.16
$^{\bullet}OH$ assay (IC_{50}; mg/mL)	26.27	47.69	51.09	38.26	49.18	56.00

(6) มีฐานข้อมูลทางด้านวิทยาศาสตร์ เกี่ยวกับประสิทธิภาพของสารสกัดรังนกบ้านไทยต่อเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสท์

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสท์ พบว่า เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิตยังคงมากกว่า 80% บ่งบอกถึงความไม่เป็นพิษต่อเซลล์โบรบลาสท์

การปกป้องเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสท์ (การยับยั้งอะพอพโทซิส) ด้วยวิธี MTT assay และวิธี flow cytometry พบว่า มีการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์มีชีวิต การลดลงของเซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิสในระยะเริ่มต้น การลดลงของเซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิสในระยะหลังและการตายของเซลล์ หลังจากบ่มเซลล์โบรบลาสท์ ด้วยสารสกัดรังนก

การสมานแผล โดยวิธี *in vitro* scratch assay พบว่า รอยขีดบนเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสท์ ที่บ่มด้วยสารสกัดรังนก มีแนวโน้มปิดช่องว่างของรอยขีด เมื่อเวลาผ่านไป 8 ชั่วโมง

(7) มีฐานข้อมูลเกี่ยวกับการทำผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่ใช้สารสกัดรังนกเป็นสารสำคัญ ตัวชี้วัดความสำเร็จของโครงการวิจัยนี้ คือ ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางผสมสารสกัดรังนก ได้แก่ ครีมรังนก เซรั่มรังนก และสบู่รังนก โดยสามารถระบุเป็นปริมาณกรดเซียลิกในช่วง 0.1-0.15% ซึ่งเป็นปริมาณที่สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้

ปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์รังนกแปรรูปต่าง ๆ ได้แก่ รังนกแห้งสำเร็จรูป รังนกบรรจุขวดพร้อมดื่ม เครื่องสำอางรังนก เป็นต้น ผลิตภัณฑ์รังนกเหล่านี้ใช้ปริมาณโปรตีนเป็นมาตรฐานชี้วัด จึงไม่เป็นผลิตภัณฑ์ที่บ่งบอกความเป็นรังนกที่แท้จริงได้อย่างชัดเจน เพราะว่าไม่ได้ระบุถึงชนิดและปริมาณสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรังนก เช่น กรดเซียลิก

โครงการวิจัยนี้ได้วิธีการตรวจวิเคราะห์สารสำคัญในรังนก โดยสามารถตรวจวิเคราะห์สารสำคัญในรังนก คือ กรดเซียลิก ซึ่งจะมีส่วนทำให้ผลิตภัณฑ์รังนกเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคทั้งภายในประเทศและส่งออกไปต่างประเทศได้ เป็นการต่อยอดการทำผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมรังนกและเป็นการเพิ่มมูลค่าของรังนก เป็นการส่งเสริมอุตสาหกรรมรังนกของประเทศไทยโดยรวม

ศูนย์ข้อมูลเพื่อธุรกิจไทยในจีน สถานกงสุลใหญ่ ณ นครหนานหนิง ประเทศจีน รายงานว่า ในปัจจุบัน ไทยมีผลผลิตและส่งออกรังนกปีละราว 200 ตัน คิดเป็นมูลค่าประมาณ 9,000 ล้านบาท แต่ว่าเป็นการส่งออกรังนกดิบ และเมื่อรวมเครื่องดื่มรังนกสำเร็จรูป ตลาดรังนกไทยในจีนจะมีมูลค่ารวมมากกว่าปีละ 10,000 ล้านบาท ธุรกิจรังนกหมื่นล้านนี้ เป็นอีกหนึ่งธุรกิจหนึ่งที่สร้างผลประโยชน์ทางเศรษฐกิจให้กับประเทศและนักธุรกิจรังนก (กฤษณะ สุกันตพงศ์, 2563) แต่น่าเสียดายว่า รังนกที่ส่งออกไปจีนเป็นรังนกดิบ ถ้ามีการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์รังนกตามโครงการวิจัยนี้ เช่น การทำความสะอาดรังนก การทำสารสกัดรังนก เครื่องสำอางรังนก และผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ที่มีส่วนผสมของรังนก ก็จะเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับอุตสาหกรรมรังนกไทยอีกมหาศาล

ผลของโครงการวิจัย “การบริโภครังนกแบบเป็นวิทยาศาสตร์” นอกจากจะเป็นการตอบสนององค์ความรู้ ความเข้าใจของผู้บริโภครังนกในเชิงวิทยาศาสตร์แล้ว ในเชิงเศรษฐกิจการเพิ่มมูลค่ารังนกของไทย จะมีผลต่อการว่าจ้างแรงงานจำนวนมาก และยังเป็นการส่งเสริมการพัฒนาอุตสาหกรรมรังนกไทยโดยรวม

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อ		i
Abstract		iii
กิตติกรรมประกาศ		v
บทสรุปผู้บริหาร		vii
สารบัญ		xv
สารบัญภาพ		xviii
สารบัญตาราง		xx
บทที่ 1	บทนำ	1
	1.1 ความเป็นมาของโครงการ	1
	1.2 การบริโภครังนกในอดีตและปัจจุบัน	2
	1.3 สารอาหารและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	3
	1.4 สารสกัดรังนก	6
	1.5 ผลิตภัณฑ์รังนกแปรรูปและเครื่องสำอางรังนก	6
	1.6 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	7
	1.7 ระเบียบวิธีวิจัย	8
บทที่ 2	ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	18
	2.1 นกแอ่นกินรังและรังของนกแอ่นกินรัง	18
	2.2 การบริโภครังนกในอดีต	19
	2.3 การบริโภครังนกในปัจจุบันและอนาคต	20
	2.4 สารสกัดรังนกและวิธีเตรียมสารสกัดรังนก	21
	2.4.1 วิธีทำความสะอาดรังนก	21
	2.4.2 วิธีสกัดรังนกด้วยเกลือ	22
	2.4.3 วิธีสกัดรังนกด้วยด่าง	22
	2.4.4 วิธีสกัดรังนกด้วยความร้อน	22
	2.4.5 วิธีสกัดรังนกโดยใช้เอนไซม์	23
	2.5 การบริโภครังนกเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ เพราะว่ามีสารอาหารอันอุดม	24
	2.5.1 สารอาหารที่มีอยู่ในรังนก	24
	2.5.2 การวิเคราะห์โปรตีนและสารอาหารอื่น ๆ ที่เป็นองค์ประกอบของรังนก	24

หน้า

2.5.3 การศึกษาคาร์โบไฮเดรตที่เป็นองค์ประกอบของรังนก 25
2.5.4 การศึกษากรดไขมันในรังนก 25
2.5.5 การศึกษาแร่ธาตุต่าง ๆ ในรังนกบ้านประเทศไทย 25
2.5.6 การศึกษาสารอาหารในรังนกบ้านของประเทศไทย 26
2.5.7 การศึกษากรดอะมิโนในรังนกบ้านของไทย 27
2.5.8 เปรียบเทียบปริมาณกรดอะมิโนในรังนกกับอาหารชนิดอื่น 27
2.6 การบริโภครังนกเป็นทั้งการป้องกันและรักษาโรค 29
2.6.1 การบริโภครังนกกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน 30
2.6.2 รังนกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งภาวะเครียดออกซิเดชัน 33
2.6.3 รังนกต้านภาวะเครียดออกซิเดชันและยับยั้งอะพอพโทซิส 37
2.6.4 รังนกมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนัง 39
2.6.5 รังนกมีคุณสมบัติต่อต้านอนุมูลอิสระ การบริโภครังนกสามารถเพิ่มอายุขัย 43
2.6.6 กรดเซียลิกและแลคโตเฟอรินในรังนกมีคุณสมบัติต้านไวรัสไข้หวัดใหญ่ 44
2.6.7 ในรังนกมีสารคอนดรอยทินโปรตีโอไกลแคนที่ไม่มีซัลเฟต 47
2.6.8 ฮอร์โมนเพศในรังนก 49
2.6.9 สารสกัดรังนกออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซิน-คอนเวอร์ติง (ACE) 51
2.7 ผลิตภัณฑ์อาหารรังนกและเครื่องดื่มรังนก 51
2.8 ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางรังนก เวชสำอางรังนก และโภชนเภสัชภัณฑ์ 52
บทที่ 3 วิธีการทดลองและผลการทดลอง 54
3.1 สารสกัดรังนกจากบริษัทขวัญมุย 54
3.1.1 การเตรียมสารสกัดรังนกจากบริษัทขวัญมุย 54
3.1.2 การทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดรังนกจากบริษัทขวัญมุย 54
3.1.3 การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ของสารสกัดรังนกขวัญมุย 60
3.1.4 การตรวจสอบการสร้างคอลลาเจนในเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ของสารสกัดรังนกขวัญมุย 61
3.2 รังนกบ้านและสารสกัดรังนกบ้านตัวอย่าง 62
3.2.1 แหล่งเก็บตัวอย่างรังนกบ้าน 62
3.2.2 ลักษณะทางกายภาพของรังนกตัวอย่าง หลังจากทำความสะอาดรังนกแล้ว 63

หน้า

3.2.3 การเตรียมสารสกัดรังนกตัวอย่าง 65

3.2.4 การทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดรังนกตัวอย่าง 70

3.2.5 การเตรียมเครื่องสำอางที่ประกอบด้วยสารสกัดรังนก 91

บทที่ 4 อภิปรายผลการทดลอง 96

4.1 ลักษณะทางกายภาพของรังนกตัวอย่าง 96

4.2 ปริมาณสารฟีนอลิกรวม 97

4.3 ปริมาณกรดเชียลิก 98

4.4 ปริมาณโปรตีน 100

4.5 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 101

4.6 ความเป็นพิษต่อเซลล์ 104

4.7 การปกป้องเซลล์ 105

4.8 การสมานแผล 107

บทที่ 5 ประโยชน์ที่ได้จากงานวิจัย 109

บทที่ 6 ข้อเสนอแนะ 110

บรรณานุกรม 111

สารบัญภาพ

			หน้า
ภาพที่	ก	จังหวัดในประเทศไทยที่มีฟาร์มเพาะเลี้ยงนกแอ่นกินรัง	viii
ภาพที่	1.1	แผนผังการทดลองทั้งหมดของการวิจัยตามลำดับขั้นตอนต่าง ๆ	9
ภาพที่	1.2	วิธีการสกัดรังนกโดยสังเขป	11
ภาพที่	1.3	โครงสร้างของกรดเซียลิก	12
ภาพที่	1.4	แผนผังการทดลองการตรวจสอบคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของรังนก	15
ภาพที่	2.1	โครงสร้างของไกลโคโปรตีนรังนกที่ศึกษาด้วยแสงซินโครตรอน (นิรันดร มาแทน, 2555)	31
ภาพที่	2.2	โครงสร้างไกลโคโปรตีนรังนก	32
ภาพที่	2.3	โครงสร้างไกลโคโปรตีนและโครงสร้างของกรดเซียลิกของรังนก	34
ภาพที่	2.4	โครงสร้างของสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของผิวหนัง	41
ภาพที่	2.5	การเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสท์หลังจากสัมผัสกับสาร EGF	41
ภาพที่	2.6	อัตราการตายของแมลงวันผลไม้	43
ภาพที่	2.7	ปฏิกิริยาฮีแมกกลูติเนชัน (HA-test) และปฏิกิริยายับยั้งฮีแมกกลูติเนชัน (HI-test)	45
ภาพที่	2.8	โครงสร้างทั่วไปของโปรตีโอไกลแคนเปรียบเทียบกับไกลโคโปรตีน	48
ภาพที่	3.1	ค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ของสารสกัดรังนกขวัญมุย	57
ภาพที่	3.2	ค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ ของสารสกัดรังนกขวัญมุย	58
ภาพที่	3.3	ค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ $^{\bullet}OH$ ของสารสกัดรังนกขวัญมุย	59
ภาพที่	3.4	ค่าร้อยละของเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ที่มีชีวิตหลังจากบ่มด้วยสารสกัดรังนกขวัญมุย	61
ภาพที่	3.5	ปริมาณคอลลาเจนในเซลล์ L929 fibroblasts หลังจากบ่มกับสารสกัดรังนกขวัญมุยเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	62
ภาพที่	3.6	ตัวอย่างรังนกจากจังหวัดต่าง ๆ ในประเทศไทย	64
ภาพที่	3.7	การเตรียมสารสกัดรังนกตัวอย่างด้วยวิธีที่ 1	65
ภาพที่	3.8	การเตรียมสารสกัดรังนกตัวอย่างด้วยวิธีที่ 2	66
ภาพที่	3.9	การเตรียมสารสกัดรังนกตัวอย่างด้วยวิธีที่ 3	67
ภาพที่	3.10	การเตรียมสารสกัดรังนกตัวอย่างด้วยวิธีที่ 4	67
ภาพที่	3.11	การเตรียมสารสกัดรังนกตัวอย่างด้วยวิธีที่ 5	68
ภาพที่	3.12	ปริมาณสารฟีนอลิกรวมจากสารสกัดรังนกตัวอย่างที่เตรียมด้วยวิธีที่แตกต่างกัน	69

หน้า

ภาพที่	3.13	ปริมาณสารฟีนอลิกรวมของสารสกัดรังนกตัวอย่าง	71
ภาพที่	3.14	ปริมาณกรดเซียลิกที่ได้จากสารสกัดรังนกตัวอย่าง	72
ภาพที่	3.15	ปริมาณโปรตีนที่ได้จากสารสกัดรังนกตัวอย่าง	75
ภาพที่	3.16	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ของสารสกัดรังนกตัวอย่าง	76
ภาพที่	3.17	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ ของสารสกัดรังนกตัวอย่าง	77
ภาพที่	3.18	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $^{\bullet}OH$ ของสารสกัดรังนกตัวอย่าง	78
ภาพที่	3.19	ความเป็นพิษของสารสกัดรังนกตัวอย่างต่อเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสท์	80
ภาพที่	3.20	ผลการปกป้องเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ จากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยวิธี MTT assay	81
ภาพที่	3.21	ระดับออกซิเจนที่ไวต่อการทำปฏิกิริยาในเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์หลังจากบ่มด้วยสารสกัดรังนกตัวอย่าง	83
ภาพที่	3.22	ระดับออกซิเจนที่ไวต่อการทำปฏิกิริยาในเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์หลังจากบ่มด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และสารสกัดรังนกตัวอย่าง	83
ภาพที่	3.23	ผลการตรวจสอบอะพอพโทซิสด้วยวิธี flow cytometry หลังจากบ่มด้วยสารสกัดรังนกตัวอย่าง	86
ภาพที่	3.24	จำนวนเซลล์มีชีวิต เซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิสในระยะเริ่มต้น เซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิสในระยะหลัง และเซลล์ตายหลังจากบ่มด้วยสารสกัดรังนกตัวอย่าง	87
ภาพที่	3.25	ผลการตรวจสอบอะพอพโทซิสด้วยวิธี flow cytometry หลังจากบ่มด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และสารสกัดรังนกตัวอย่าง	88
ภาพที่	3.26	จำนวนเซลล์มีชีวิต เซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิสในระยะเริ่มต้น เซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิสในระยะหลัง และเซลล์ตายหลังจากบ่มด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และสารสกัดรังนกตัวอย่าง	89
ภาพที่	3.27	การตรวจสอบผลการสมานแผลในเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบบลาสท์ โดยวิธี *in vitro* scratch assay	90
ภาพที่	3.28	ผลิตภัณฑ์ต้นแบบสบู่กลีเซอรีนสารสกัดรังนก	92
ภาพที่	3.29	ผลิตภัณฑ์ต้นแบบเซรั่มสารสกัดรังนก	94
ภาพที่	3.30	ผลิตภัณฑ์ต้นแบบครีมสารสกัดรังนก	95
ภาพที่	4.1	การเกิด $ABTS^{\bullet+}$ จากปฏิกิริยา oxidation ระหว่าง ABTS และ potassium persulfate	99
ภาพที่	4.2	ปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ และสารต้านอนุมูลอิสระ	100
ภาพที่	4.3	ปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันของกรดเอ็น-อะเซทิลนิวรามินิกโดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	103
ภาพที่	4.4	การวิเคราะห์การเคลื่อนที่ของเซลล์โดยวิธี *in vitro* scratch assay ในเซลล์ primary ECs	104

สารบัญตาราง

			หน้า
ตารางที่	ก	ปริมาณโปรตีนในสารสกัดรังนกตัวอย่าง	xii
ตารางที่	ข	ผลการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรังนกตัวอย่างโดยวิธี ABTS$^{\bullet+}$ วิธี DPPH$^{\bullet}$ และวิธี $^{\bullet}$OH assay	xiii
ตารางที่	1.1	สารอาหารประเภท โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และ ไขมัน ที่ปรากฏในรังนกถ้ำชนิดรังขาวและชนิดรังแดง จากแหล่งสัมปทานรังนกจังหวัดชุมพรและสงขลา (บังอร บุญชู, 2547) และรังนกบ้านชนิดรังขาว จากจังหวัดต่าง ๆ ของไทย (วราศรี แสงกระจ่าง, 2554)	3
ตารางที่	1.2	แร่ธาตุต่าง ๆ ในรังนกถ้ำชนิดรังขาวและชนิดรังแดง จากแหล่งสัมปทานรังนกจังหวัดชุมพรและสงขลา (บังอร บุญชู, 2547) และ รังนกบ้านชนิดรังขาวจากจังหวัดต่าง ๆ ของไทย (วราศรี แสงกระจ่าง, 2554)	4
ตารางที่	1.3	สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในเนื้อรังนกและผลการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	5
ตารางที่	1.4	คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของกรดเซียลิกในรังนกและผลทางชีวภาพต่อเซลล์และร่างกาย	12
ตารางที่	2.1	ชนิดและปริมาณน้ำตาลที่พบในรังนกจากประเทศต่าง ๆ (Yang et al., 2014)	25
ตารางที่	2.2	ปริมาณแร่ธาตุต่าง ๆ ในรังนกบ้านของประเทศไทย (วราศรี แสงกระจ่าง, 2554)	26
ตารางที่	2.3	ผลการศึกษาสารอาหารในรังนกบ้านประเทศไทย (วราศรี แสงกระจ่าง, 2554)	27
ตารางที่	2.4	ผลวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนจำเป็น และ กรดอะมิโนไม่จำเป็น ที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนของรังนกบ้านไทย (วราศรี แสงกระจ่าง, 2554)	28
ตารางที่	2.5	ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนในรังนก น้ำนม ไข่แดง และไข่ขาวของไข่ไก่ รวมทั้งสูตรอาหารของทารก (Y. G. Chua et al., 2015)	29
ตารางที่	2.6	ปริมาณของแลคโตเฟอร์รินและโอโวทรานสเฟอร์รินในรังนก	37
ตารางที่	3.1	คุณสมบัติของสารสกัดรังนกจากบริษัทขวัญมุย	59
ตารางที่	3.2	ค่าสีของรังนกตัวอย่าง	63
ตารางที่	3.3	ผลการตรวจหาปริมาณกรดเซียลิจากบริษัทไทยเนส คอร์เปอร์เรชัน จำกัด	73
ตารางที่	3.4	ผลการตรวจหาปริมาณกรดเซียลิกจากบริษัทห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด	74
ตารางที่	3.5	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรังนกตัวอย่าง	78
ตารางที่	3.6	สูตรสบู่กลีเซอรีนสารสกัดรังนก	92

หน้า

ตารางที่ 3.7 สูตรเซรั่มสารสกัดรังนก 93
ตารางที่ 3.8 สูตรครีมสารสกัดรังนก 94
ตารางที่ 4.1 ผลการตรวจปริมาณกรดเซียลิกในรังนกตัวอย่าง 99

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงการวิจัย

หลักการและเหตุผลของโครงการวิจัยเรื่อง “การบริโภครังนกแบบเป็นวิทยาศาสตร์” (scientific consumption of edible bird’s nests) นั้น มาจากความเป็นจริงที่ว่า สังคมไทยมีความรู้และความเข้าใจเกี่ยวกับรังนกกินได้ (รังนกของนกแอ่นกินรัง) ในเชิงวิทยาศาสตร์น้อยมาก ทั้ง ๆ ที่มีบันทึกว่า ในประเทศไทยมีการเก็บเกี่ยวรังนก (รังนกถ้ำ) มีการบริโภครังนก และ ส่งออกรังนกไปต่างประเทศ มาตั้งแต่สมัยกรุงศรีอยุธยา ในส่วนของอุตสาหกรรมรังนกของประเทศไทย ก็มีการพัฒนาค่อนข้างช้ามากเช่นเดียวกัน เมื่อเทียบกับประเทศอื่นที่มีรังนก เช่น มาเลเซียและอินโดนีเซีย เป็นต้น ทั้งนี้เพราะว่าประเทศไทยมีการศึกษาการวิจัยเรื่องรังนกน้อยมาก เพื่อพัฒนาอุตสาหกรรมรังนกของประเทศไทย คณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) โดย ศาสตราจารย์ ดร.อิศรา ศานติศาสน์ อดีตผู้อำนวยการฝ่ายนโยบายชาติและความสัมพันธ์ข้ามชาติ สกว. (ฝ่าย1) ที่ได้เล็งเห็นความสำคัญของอุตสาหกรรมรังนกของประเทศไทย จนนำไปสู่การตั้งทีมวิจัยเพื่อสร้างองค์ความรู้ในธุรกิจรังนกในทุกมิติ ในชุดโครงการวิจัย “รังนกไทยในธุรกิจรังนกโลก” (Thailand in The Global Birds' Nest Industry) โดยมอบหมายให้ คุณเกษม จันทร์ดำ เป็นหัวหน้าชุดโครงการวิจัย และมอบหมายให้คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษา “การบริโภครังนกแบบเป็นวิทยาศาสตร์” ซึ่งเป็นโครงการย่อยในชุดโครงการวิจัย ชุดใหญ่ “รังนกไทยในธุรกิจรังนกโลก”

อุตสาหกรรมรังนกไทยนั้น มีความเชื่อมโยงกับการพัฒนาประเทศในหลาย ๆ มิติ ไม่ว่าจะเป็นในด้านเศรษฐกิจและในเชิงชาติพันธุ์ นอกจากนี้ยังเชื่อมโยงกับธุรกิจรังนกของโลก โดยในเชิงเศรษฐกิจมีการประเมินว่า ปริมาณการบริโภครังนกแอ่นกินรังทั่วโลก คิดเป็นมูลค่าสูงถึงประมาณ 120,000 ล้านบาท ซึ่งประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตและจำหน่ายรังนกแอ่นกินรังแหล่งใหญ่แห่งหนึ่งของโลก ทำให้อุตสาหกรรมรังนกไทย ได้แก่ การผลิตรังนก การแปรรูปรังนก การค้ารังนก และการส่งออกรังนก ขยายตัวเติบโตอย่างรวดเร็ว ทำให้เกิดธุรกิจต้นน้ำ กลางน้ำ และปลายน้ำ ที่เกี่ยวข้องกับรังนกเป็นจำนวนมาก กลายเป็นแหล่งจ้างงาน สร้างรายได้ให้แก่ประชาชนและประเทศชาติจำนวนมหาศาล (เกษม จันทร์ดำ, 2560)

ประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตและส่งออกรังนกแหล่งใหญ่แห่งหนึ่งของโลก รังนกส่วนใหญ่ส่งออกไปยังประเทศจีนและฮ่องกง โดยศูนย์ข้อมูลเพื่อธุรกิจไทยในจีน สถานกงสุลใหญ่ ณ นครหนานหนิง

ประจำประเทศจีน รายงานว่า ปัจจุบันไทยมีผลผลิตและส่งออกรังนกปีละราว 200 ตัน คิดเป็นมูลค่าประมาณ 9,000 ล้านบาท ซึ่งเป็นการส่งออกรังนกดิบ เมื่อรวมเครื่องดื่มรังนกสำเร็จรูป ตลาดรังนกไทยจะมีมูลค่ารวมมากกว่าปีละหมื่นล้านบาท ธุรกิจหมื่นล้านนี้เป็นอีกหนึ่งธุรกิจที่สร้างผลประโยชน์ทางเศรษฐกิจให้กับประเทศและนักธุรกิจรังนก (กฤษณะ สุกันตพงศ์, 2563) และยังระบุว่า รังนกที่ส่งออกไปจีนเป็นรังนกดิบ ถ้ามีการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์รังนกตามโครงการวิจัยฯ นี้ คือ การทำความสะอาดรังนก การทำสารสกัดรังนก และเครื่องสำอางรังนก จะเพิ่มมูลค่ามากขึ้นอีกมหาศาล

1.2 การบริโภครังนกในอดีตและปัจจุบัน

การบริโภครังนกเป็นวัฒนธรรมในเชิงชาติพันธุ์ที่ผสมผสานกันระหว่างกลุ่มชาติพันธุ์ต่าง ๆ ได้แก่ ชนชาติจีนและกลุ่มชาติพันธุ์อื่น ๆ ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ที่ได้สั่งสมประสบการณ์ ความรู้ และผลิตซ้ำความเชื่อในการบริโภครังนก ผ่านกระบวนการหล่อหลอมทางสังคมที่ก่อให้เกิดโครงสร้างการรับรู้และการให้ความสำคัญกับคุณค่าของรังนก ที่เอื้ออำนวยให้ผู้คนได้รับรู้ และเชื่อมั่นในคุณค่าและคุณสมบัติพิเศษของรังนก อันเป็นการสนับสนุนวัฒนธรรมการบริโภครังนกและระบบธุรกิจรังนก (เกษม จันทร์ดำ, 2560) ในส่วนของชนชาติจีนนั้น มีความเชื่อว่าการบริโภครังนก นอกจากจะทำให้ร่างกายมีสุขภาพแข็งแรงแล้ว ยังเป็นยารักษาโรคได้ด้วย ซึ่งตำราการแพทย์แผนโบราณของจีน (traditional Chinese medicine) บรรยายว่า รังนกเป็นทั้งอาหาร-เป็นทั้งยา (Chinese food therapy) สำหรับการบริโภครังนกของคนรุ่นใหม่ในปัจจุบัน เกิดจากกระแสความต้องการบริโภคอาหารเสริมเพื่อสุขภาพที่แข็งแรงและเพื่อให้ผิวพรรณผ่องใส ผลิตภัณฑ์รังนกจึงเป็นทางเลือกที่ดีของผู้บริโภค อย่างไรก็ตาม การศึกษาสรรพคุณของรังนกโดยวิทยาศาสตร์สมัยใหม่ Chua et al. (2014) รายงานว่า ในเนื้อรังนกประกอบด้วยสารเมแทบอไลต์มากกว่า 78 ชนิด ซึ่งเป็นสารประกอบที่หลากหลายและแบ่งเป็น (1) สารอาหาร (nutritional contents) ที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย และ (2) สารประกอบทางชีวภาพ (bioactive compounds) ที่มีศักยภาพการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactivities) ต่อร่างกายและด้านเภสัชวิทยารักษาโรค (pharmacological effects) (Y. G. Chua et al., 2014) ต่อมา Akmal et al. (2017) ระบุว่า รังนกเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (natural products) ที่ส่งผลทางการแพทย์ (medicinal effect) หมายความว่าการบริโภครังนกสามารถป้องกันโรค (prophylactic agent) และสามารถรักษาโรค (therapeutic agent) ไปพร้อม ๆ กัน (Akmal et al., 2017) รังนกจึงเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ประกอบด้วยสารอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีสรรพคุณทางการแพทย์ ดังนั้นการบริโภครังนกในปัจจุบันจึงเป็นการบริโภครังนกแบบเป็นวิทยาศาสตร์

1.3 สารอาหารและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

สารอาหารที่อยู่ในเนื้อรังนกสามารถแบ่งเป็น 5 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ (1) โปรตีน (protein) (2) คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) (3) แร่ธาตุ (minerals) (4) ไขมัน (fat) และ (5) วิตามิน (vitamins) สำหรับประเทศไทยที่ผ่านมา มีรายงานการศึกษาวิจัยเรื่อง สารอาหาร ทั้งในรังนกถ้ำและรังนกบ้านของประเทศไทย คือ การศึกษาเรื่อง สารอาหารในรังนกถ้ำชนิดรังขาวและชนิดรังแดง ซึ่งเป็นรังนกถ้ำจากแหล่งสัมปทานรังนกจังหวัดชุมพรและสงขลา (บังอร บุญชู, 2547) และการศึกษาเรื่อง สารอาหารในรังนกบ้านสีขาวของประเทศไทย (วราศรี แสงกระจ่าง, 2554)

โปรตีนในรังนกไทยมีประมาณ 50-60% และโปรตีนในรังนกประกอบด้วยหน่วยย่อย ๆ คือ กรดอะมิโน (amino acids) มีทั้งหมด18-20 ชนิด ส่วนคาร์โบไฮเดรตในรังนกของไทยโดยรวมๆ มีประมาณ 20-30% (บังอร บุญชู, 2547; วราศรี แสงกระจ่าง, 2554) นอกจากนี้มีรายงานว่า คาร์โบไฮเดรตในรังนก ประกอบด้วย น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharides หรือ monoses) ประมาณ 7-8 ชนิด (Y. G. Chua et al., 2015) สำหรับไขมันในรังนกมีประมาณ 1% โดยไขมันในรังนก ประกอบด้วย กรดไขมัน (fatty acids) มีทั้งกรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัว (Marcone, 2005) สำหรับรายงานเรื่องสารอาหารในรังนกถ้ำชนิดรังขาวและชนิดรังแดง (บังอร บุญชู, 2547) และสารอาหารในรังนกบ้านสีขาวของประเทศไทย (วราศรี แสงกระจ่าง, 2554) แสดงไว้ใน ตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 สารอาหารประเภท โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และ ไขมัน ที่ปรากฏในรังนกถ้ำชนิดรังขาวและชนิดรังแดง จากแหล่งสัมปทานรังนกจังหวัดชุมพรและสงขลา (บังอร บุญชู, 2547) และ รังนกบ้านชนิดรังขาว จากจังหวัดต่าง ๆ ของไทย (วราศรี แสงกระจ่าง, 2554)

สารอาหาร (ประเภท)	**ปริมาณ (ร้อยละโดยน้ำหนัก)**						
	รังนกถ้ำ (บังอร บุญชู, 2547)		**รังนกบ้านชนิดรังขาว (วราศรี แสงกระจ่าง, 2554)**				
	ชนิดรังขาว	**ชนิดรังแดง**	**ตราด**	**เพชรบุรี**	**นครศรีธรรมราช**	**สตูล**	**นราธิวาส**
โปรตีน	52.8	56.6 - 56.9	66.89	61.01	60.85	61.46	62.59
คาร์โบไฮเดรต	22.3	22.0 - 22.7	25.39	31.04	30.40	31.40	30.12
ไขมัน	–	–	0.83	1.10	1.27	1.19	0.40
เถ้า	7.03	8.08 -10.2	6.78	6.73	7.37	5.86	6.75

การศึกษาเรื่อง แร่ธาตุในรังนกของประเทศไทยประกอบด้วยแร่ธาตุต่าง ๆ ที่สำคัญ 8 ชนิด ได้แก่ โซเดียม แคลเซียม แมกนีเซียม โพแทสเซียม เหล็ก ซีลีเนียม ทองแดง และแมงกานีส (บังอร บุญชู, 2547; วราศรี แสงกระจ่าง, 2554) ดังแสดงใน ตารางที่ 1.2 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณโซเดียม ในรังนกถ้ำชนิดรังขาว รังนกถ้ำชนิดรังแดง และรังนกบ้านชนิดรังขาว พบว่า มีปริมาณใกล้เคียงกัน เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแคลเซียม และ ปริมาณเหล็ก พบว่า รังนกถ้ำชนิดรังแดง มีปริมาณแคลเซียมและเหล็ก มากกว่ารังนกชนิดรังขาว ดังแสดงใน ตารางที่ 1.2

ตารางที่ 1.2 แร่ธาตุต่าง ๆ ในรังนกถ้ำชนิดรังขาวและชนิดรังแดง จากแหล่งสัมปทานรังนกจังหวัดชุมพรและสงขลา (บังอร บุญชู, 2547) และ รังนกบ้านชนิดรังขาวจากจังหวัดต่าง ๆ ของไทย (วราศรี แสงกระจ่าง, 2554)

แร่ธาตุ (ชนิด)	**ปริมาณ (mg/100 g)**						
	รังนกถ้ำ (บังอร บุญชู, 2547)		**รังนกบ้านชนิดรังขาว (วราศรี แสงกระจ่าง, 2554)**				
	ชนิดรังขาว	**ชนิดรังแดง**	**ตราด**	**เพชรบุรี**	**นครศรีธรรมราช**	**สตูล**	**นราธิวาส**
โซเดียม	1,572.1	1,182.9-1,282.5	1987.61	1508.85	1418.54	1233.78	1494.33
แคลเซียม	814.0	1,596.4-2,115.2	674.18	628.05	696.70	814.36	749.03
แมกนีเซียม	–	–	142.13	143.79	148.09	143.80	147.27
โพแทสเซียม	11.5	28.7-60.1	38.19	23.05	27.15	42.84	21.08
เหล็ก	1.17	3.68 – 5.63	0.83	0.48	0.63	1.08	0.66
ซิลิเนียม	–	–	0.39	054	0.38	0.40	0.51
ทองแดง	3.81	4.52 – 5.48	0.29	0.24	0.37	0.31	0.25
แมกกานีส	1.47	11.6 – 5.51	0.04	0.02	0.04	0.06	0.25

ปัจจุบันได้มีการศึกษาทางวิทยาศาสตร์ โดยการศึกษาผลการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของรังนกต่อเซลล์เพาะเลี้ยงหรือเซลล์ต้นกำเนิด ในหลอดทดลอง (*in vitro*) และการศึกษาในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) จึงมีรายงานผลการศึกษาทางวิทยาศาสตร์เป็นจำนวนมาก ซึ่งได้สนับสนุนและยืนยันว่า การบริโภครังนกเป็นการบริโภคแบบเป็นวิทยาศาสตร์ ดังแสดงในตารางที่ 1.3

ตารางที่ 1.3 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในเนื้อรังนกและผลการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

สารประกอบทางชีวภาพ (bioactive compounds)	ผลการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactivities)	อ้างอิง
1. ไกลโคโปรตีน (glycoprotein)	กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน กระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ กระตุ้นการแบ่งเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดขาว กระตุ้นการฟาโกไซโตซิสของเซลล์เม็ดเลือดขาว	(Ng et al., 1986) (Y. C. Kong et al., 1987) (Roh et al., 2012)
2. กรดเซียลิก (กรดไซอะลิก; sialic acid) หรือกรดเอ็น-อะเซทิลนิวรามินิก (นานา) (*N*-acetylneuraminic acid, NANA)	ยับยั้งเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ยับยั้งปฏิกิริยาฮีแมกกลูติเนชัน ต่อต้านอนุมูลอิสระ ต่อต้านภาวะเครียดออกซิเดชัน ยับยั้งการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ ชลอความชราภาพของเซลล์ และ เพิ่มอายุขัย	(Guo et al., 2006) (Kim et al., 2012) (Yew et al., 2014) (Hu et al., 2016) (Nur et al., 2017) (Ghassem et al., 2017)
3. ไกลโคเปปไทด์ (active peptides)	ต่อต้านอนุมูลอิสระ	(Ghassem et al., 2017)
4. สารกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนัง (epidermal growth factor: EGF)	กระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนัง ต่อต้านริ้วรอยและชะลอความชราภาพของเซลล์ ช่วยสมานแผล	(Y. C. Kong et al., 1987) (Guo et al., 2006) (Roh et al., 2012)
5. แลคโตเฟอร์ริน (lactoferrin: LF) และ โอโวทรานสเฟอร์ริน (ovotransferrin: OVF)	ต่อต้านภาวะดื้ออินซูลิน ต่อต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่	(Yida et al., 2015) (Hou et al., 2015) (Akmal et al., 2017)
6. สารคอนดรอยทินไกลโคสะมิโนไกลแคนที่ไม่มีซัลเฟต (non-sulfated chondroitin glycosaminoglycan) และกลูโคซามีน	กระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ข้อต่อ กระดูกเสริมสร้างกระดูกให้แข็งแรง ป้องกันและรักษาโรคข้อเสื่อม	(Nakagawa et al., 2007) (Matsukawa et al., 2011) (K.-H. Chua et al., 2013)
7. ฮอร์โมนเพศ 6 ชนิด ได้แก่ เทสโทสเตอโรน, เอสตราไดออล, โพรเจสเตอโรน เป็นต้น	รังนกสามารถกระตุ้นการหลั่งฮอร์โมนเพศ เสริมสร้างสมรรถภาพทางเพศ รักษาอาการหย่อนสมรรถภาพทางเพศ	(Ma & Liu, 2012) (Hou et al., 2019)
8. สารยับยั้งเอ็นไซม์แองจิโอเทนซิน-คอนเวอร์ติง (angiotensin-converting enzyme inhibitor)	ลดความดันในหลอดเลือด	(Nurfatin et al., 2016)
9. วิตามินเอ ดี ซี	มีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิต	(Ma & Liu, 2012)

1.4 สารสกัดรังนก

การสกัด (extraction) เป็นขั้นตอนแรกของการแยกสารธรรมชาติที่ต้องการออกจากวัตถุดิบธรรมชาติ ในเอกสารของกรมส่งเสริมอุตสาหกรรม เรื่อง สารสกัดสมุนไพร ให้คำนิยามว่า การสกัด

หมายถึง การคัดหรือสกัดเอาสารเฉพาะส่วนออกมาจากวัตถุดิบธรรมชาติ ซึ่งเป็นสารเฉพาะส่วนที่มีประโยชน์และออกฤทธิ์อย่างใดอย่างหนึ่งต่อร่างกาย การสกัดเป็นการแปรรูปวัตถุดิบในขั้นแรก ก่อนที่จะนำสารสกัดดังกล่าวไปใช้เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ซึ่งเป็นการแปรรูปผลิตภัณฑ์ในขั้นที่สองและที่สามต่อไป วัตถุประสงค์ของการใช้สารสกัด คือ (1) สารสกัดใช้เป็นยารับประทาน (2) สารสกัดที่ใช้เป็นยาทาภายนอก (3) สารสกัดที่ใช้เป็นส่วนผสมของอาหารและเครื่องดื่ม และ (4) สารสกัดใช้เป็นส่วนประกอบในการผลิตเครื่องสำอาง ได้แก่ ครีมบำรุงผิว ครีมนวดผม สบู่ ยาสีฟัน แชมพูสระผม เป็นต้น

การทำสารสกัดรังนก (edible bird's nest extract) มีวัตถุประสงค์เพื่อ แยกสารสำคัญที่มีประโยชน์ออกจากเนื้อรังนก ซึ่งการสกัดรังนกจะได้สารสกัดรังนกที่มีสารสำคัญที่มีประโยชน์หลายชนิดรวมกัน มีทั้งสารอาหารและสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สำหรับวิธีการสกัดรังนกมีหลายวิธี ได้แก่ การสกัดด้วยความร้อน การสกัดด้วยสารละลายด่าง การสกัดด้วยสารละลายเกลือ และการสกัดด้วยเอนไซม์ เป็นต้น (Daud et al., 2019; Zulkifli et al., 2019) ในโครงการวิจัยฯ นี้ ได้สกัดรังนกโดยการใช้ความร้อน ซึ่งถือว่าเป็นการสกัดแบบง่าย สารสกัดรังนกที่ได้มีทั้งรูปแบบที่เป็นสารละลายใสและเป็นผงแห้งสีขาว จากนั้น นำสารสกัดรังนกที่ได้มาใช้เป็นส่วนประกอบในการผลิตอาหารรังนก เครื่องดื่มรังนก รวมทั้งเครื่องสำอางรังนก อาจกล่าวได้ว่า สารสกัดรังนกทำให้เกิดการต่อยอดและการพัฒนาผลิตภัณฑ์แปรรูปรังนก ทำให้การบริโภครังนกมีหลายแบบและเป็นการบริโภครังนกแบบที่เป็นวิทยาศาสตร์

1.5 ผลิตภัณฑ์รังนกแปรรูปและเครื่องสำอางรังนก

ดร.ฟิลิปป์ คอตเลอร์ ปรมาจารย์ทางด้านการตลาด ให้ความหมายของผลิตภัณฑ์ ว่าหมายถึงอะไรก็ได้ที่สามารถนำเสนอขายสู่ตลาด เพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค และแนวคิดการตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค หมายถึง ความพึงพอใจของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์นั้น ๆ ทั้งทางด้านกายภาพ (ตัวผลิตภัณฑ์) จิตวิทยา (ความเชื่อมั่น ภาพลักษณ์ผลิตภัณฑ์) และสังคมวิทยา (การเป็นส่วนหนึ่งของสังคม) ที่ผู้บริโภคได้รับหลังการบริโภคผลิตภัณฑ์นั้น สำหรับตลาดของเครื่องสำอาง ดร.ธนธรรศ สนธีระ รองประธานคลัสเตอร์เครื่องสำอางไทย ภายใต้กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม เผยว่า ภายในปี 2561 ที่ผ่านมา ตลาดเครื่องสำอางของประเทศไทยมีมูลค่ารวม 2.76 แสนล้านบาท เพิ่มขึ้น 10% จากปี 2560 แบ่งเป็นสัดส่วนตลาดภายในประเทศ 1.81 แสนล้านบาท และตลาดส่งออก 9.5 หมื่นล้านบาท โดยมีตลาดส่งออกหลัก คือ อาเซียน ออสเตรเลีย ญี่ปุ่น เวียดนาม เกาหลีใต้ และฟิลิปปินส์ นอกจากนั้นยังพบว่า 2 เดือนแรกของปี 2562 ประเทศไทยส่งออกสินค้ากลุ่มเครื่องสำอางมีมูลค่าแล้วกว่า 16,160 ล้านบาท ซึ่งเติบโตกว่าช่วงเดียวกันของปี 2561 ประมาณ 20% ในขณะที่ตลาด

เครื่องสำอางภายในประเทศเติบโตเพิ่มขึ้น 7.7% เมื่อเทียบช่วงเดียวกันของปี 2561 แสดงให้เห็นว่าตลาดเครื่องสำอางอื่น ๆ รวมทั้งเครื่องสำอางรังนก ยังสดใสและเติบโตได้อีกมาก

ปริมาณการบริโภคผลิตภัณฑ์รังนกแปรรูปในประเทศไทยไม่มีข้อมูลที่ชัดเจน แต่มีแนวโน้มการเลือกบริโภคผลิตภัณฑ์ด้านส่งเสริมสุขภาพในประเทศเพิ่มสูงขึ้นมาก เนื่องจากผู้บริโภคตระหนักถึงสุขภาพของตนเองมากขึ้น จึงหันมาบริโภครังนกเพื่อเป็นอาหารเสริมสุขภาพและเพื่อประโยชน์ทางยารักษาโรค สำหรับประเทศจีน ประเทศจีนอยู่ในฐานะผู้บริโภครังนกรายใหญ่ที่สุดในโลก ชาวจีนบริโภครังนก 900 ตันต่อปี คิดเป็น 90% ของรังนกที่ผลิตได้ในโลก ประเทศจีนจึงเป็นตลาดรังนกขนาดมหึมา แต่ประเทศจีนไม่ใช่ประเทศต้นกำเนิดของรังนก จีนต้องพึ่งพาการนำเข้ารังนก ที่มาหลัก ๆ ของรังนกในโลก คือ ประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น อินโดนีเซีย มาเลเซีย และไทย กำลังการผลิตของรังนกทั้งหมดในอินโดนีเซีย มาเลเซีย และไทย สูงถึง 1,000 ตันต่อปี จากรายงานตั้งแต่ปี 2558 ถึงปี 2560 พบว่าประชากรจีนที่มีอายุระหว่าง 26-30 ปี เป็นผู้บริโภคหลักของรังนกสำเร็จรูป ประชากรจีนที่มีอายุระหว่าง 31-35 ปี เป็นผู้บริโภครายใหญ่อันดับสอง และประชากรจีนวัย 18-25 ปี เป็นกลุ่มผู้บริโภครายใหญ่อันดับสาม เป็นที่น่าสังเกตว่า ประชากรจีนที่มีอายุระหว่าง18-35 ปี กลายเป็นผู้บริโภคหลักของรังนกสำเร็จรูปแทนที่กลุ่มผู้บริโภคดั้งเดิม (กลุ่มผู้สูงวัย รวมทั้งสตรีสูงอายุ) ในรายงานยังบอกว่า ปริมาณรังนก 80-90% ที่ถูกนำเข้าสู่ประเทศจีน เป็นรังนกดิบและทำให้เกิดความเสียหายอย่างร้ายแรงแก่อุตสาหกรรมรังนกของจีน เนื่องจากรังนกส่วนใหญ่ที่ได้เข้าสู่ประเทศจีนเป็นรังนกดิบและการลักลอบนำเข้าแบบผิดกฎหมาย โครงการวิจัยฯ นี้ เป็นการแปรรูปรังนกบ้านของไทย ด้วยการทำความสะอาดรังนกและทำสารสกัดรังนก จากนั้นนำสารสกัดรังนกไปผลิตเครื่องสำอางรังนก ได้แก่ ครีมรังนก ซีรั่มรังนก และสบู่รังนก เป็นต้น นับว่าเป็นการส่งเสริมอุตสาหกรรมรังนกของไทย ทั้งภายในประเทศและการส่งออกไปประเทศจีน ซึ่งสามารถนำรายได้จำนวนมหาศาลมาสู่ประเทศชาติ

1.6 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.6.1 เพื่อศึกษาวิธีการสกัด สารสกัดรังนก ที่เหมาะสม โดยใช้รังนกบ้านของประเทศไทย แยกตามแหล่งภูมิภาคต่าง ๆ

1.6.2 เพื่อศึกษา วิธีการตรวจวิเคราะห์สารสำคัญที่อยู่ในสารสกัดรังนก ได้แก่ กรดไซอะลิก หรือกรดเซียลิก เป็นต้น

1.6.3 เพื่อศึกษา การตรวจสอบ ประสิทธิภาพของสารสกัดรังนก โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสท์

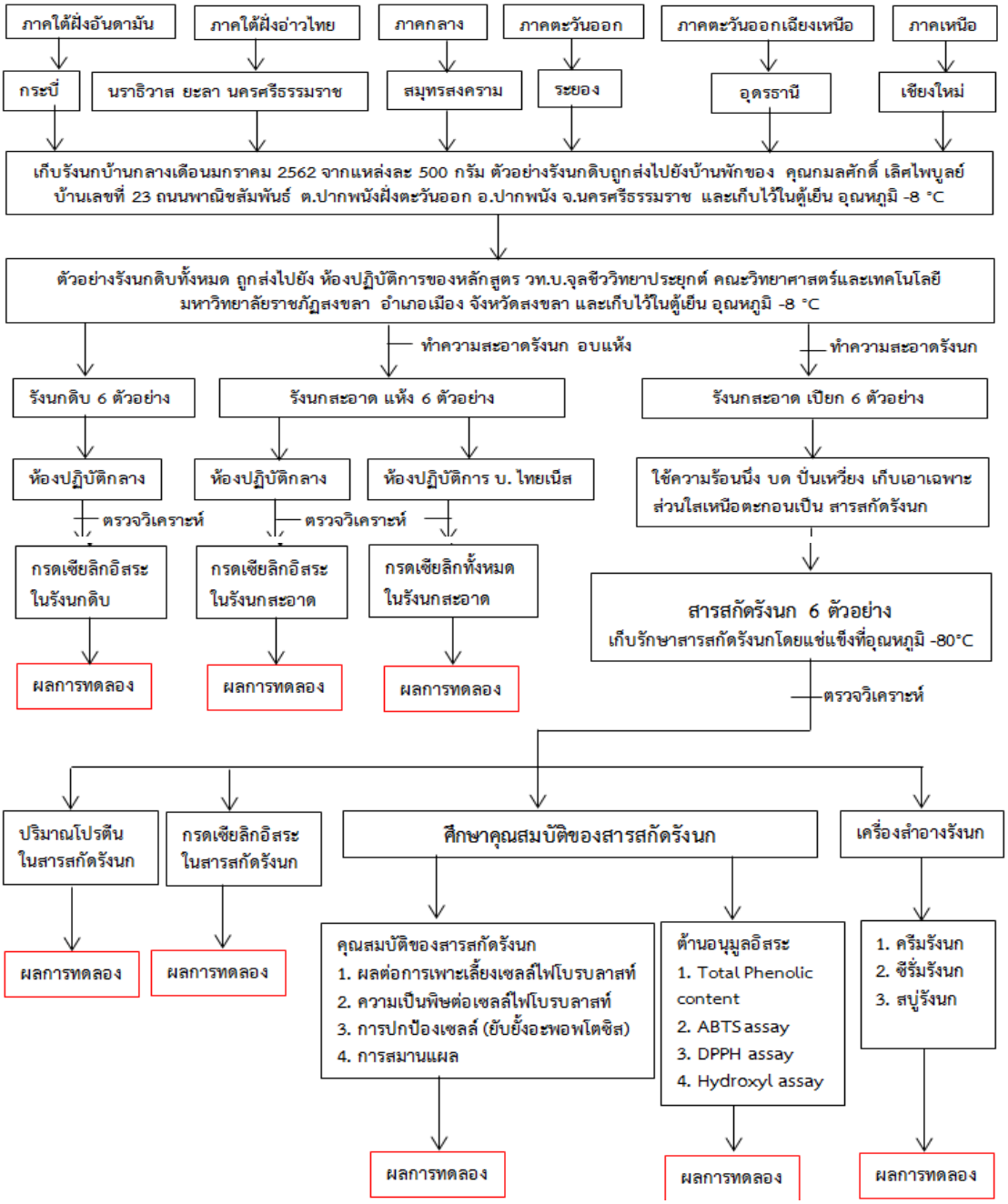
1.6.4 เพื่อศึกษา การผลิตเครื่องสำอางผสมสารสกัดรังนก ได้แก่ ครีมทาหน้าสารสกัดรังนก เป็นต้น

1.6.5 เพื่อศึกษา ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ของรังนกบ้านของประเทศไทย

1.7 ระเบียบวิธีวิจัย

โครงการวิจัยเรื่อง “การบริโภครังนกแบบเป็นวิทยาศาสตร์” (scientific consumption of edible bird’s nests) เป็นการศึกษาเรื่อง สารสกัดรังนกและสารสำคัญในรังนกบ้าน (ซึ่งเป็นรังนกที่เก็บมาจากฟาร์มเพาะเลี้ยงนกแอ่นกินรัง) เป็นครั้งแรกของประเทศไทย โดยมีลำดับขั้นตอนการทดลอง ดังแสดงใน ภาพที่ 1.1 และมีรายละเอียดการทดลองดังนี้

การเก็บตัวอย่างรังนกดิบ เนื่องจากประเทศไทยมีฟาร์มเพาะเลี้ยงนกแอ่นกินรังรวม 72 จังหวัด และมีจำนวนฟาร์มเพาะเลี้ยงนกแอ่นกินรังรวมกันทั่วประเทศประมาณ 17,800 หลัง (ดังแสดงในภาพที่ ก) ดังนั้น จึงวางแผนเก็บตัวอย่างรังนกบ้านกระจายเป็นภาค รวม 6 ภาค ดังนี้ ภาคใต้ฝั่งอันดามัน เก็บตัวอย่างรังนกบ้านจากจังหวัดกระบี่ ภาคใต้ฝั่งอ่าวไทย เก็บตัวอย่างรังนกบ้านจากจังหวัดนครศรีธรรมราช ยะลา และนราธิวาส ภาคตะวันออก เก็บตัวอย่างรังนกบ้านจากจังหวัดระยอง ภาคกลางเก็บตัวอย่างรังนกจากจังหวัดสมุทรสงคราม ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เก็บตัวอย่างรังนกบ้านจากจังหวัดอุดรธานี และภาคเหนือ เก็บตัวอย่างรังนกบ้านจากจังหวัดเชียงใหม่ ช่วงเวลาเก็บรังนกประมาณกลางเดือนมกราคม ปีพ.ศ. 2562 โดยมีการควบคุมเงื่อนไขภายในฟาร์มเพาะเลี้ยงนกแอ่นกินรังใกล้เคียงกันทุกฟาร์ม คือ อุณหภูมิอากาศภายในฟาร์มเลี้ยงอยู่ในช่วง 27-29 °C ความชื้นสัมพัทธ์ภายในฟาร์มอยู่ในช่วง 70-90 % และภาย ในฟาร์มมืดสนิท ไม่มีแสงสว่าง เก็บตัวอย่างรังนกบ้านจากแหล่งละ 70 รัง น้ำหนักรังนกดิบ" ประมาณ 500 g บรรจุในถุงพลาสติก ใส่กล่องโฟม จากนั้นนำตัวอย่างรังนกทั้งหมดส่งไปยังห้องปฏิบัติการของหลักสูตร วท.บ.จุลชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการทดลองขั้นต่อไป โดยลำดับขั้นตอนการทดลอง แสดงดังภาพที่ 1.1 ไม่ต้องส่งไปยังบริษัทขวัญมุย



ภาพที่ 1.1 แผนผังการทดลองทั้งหมดของการวิจัยตามลำดับขั้นตอนต่าง ๆ

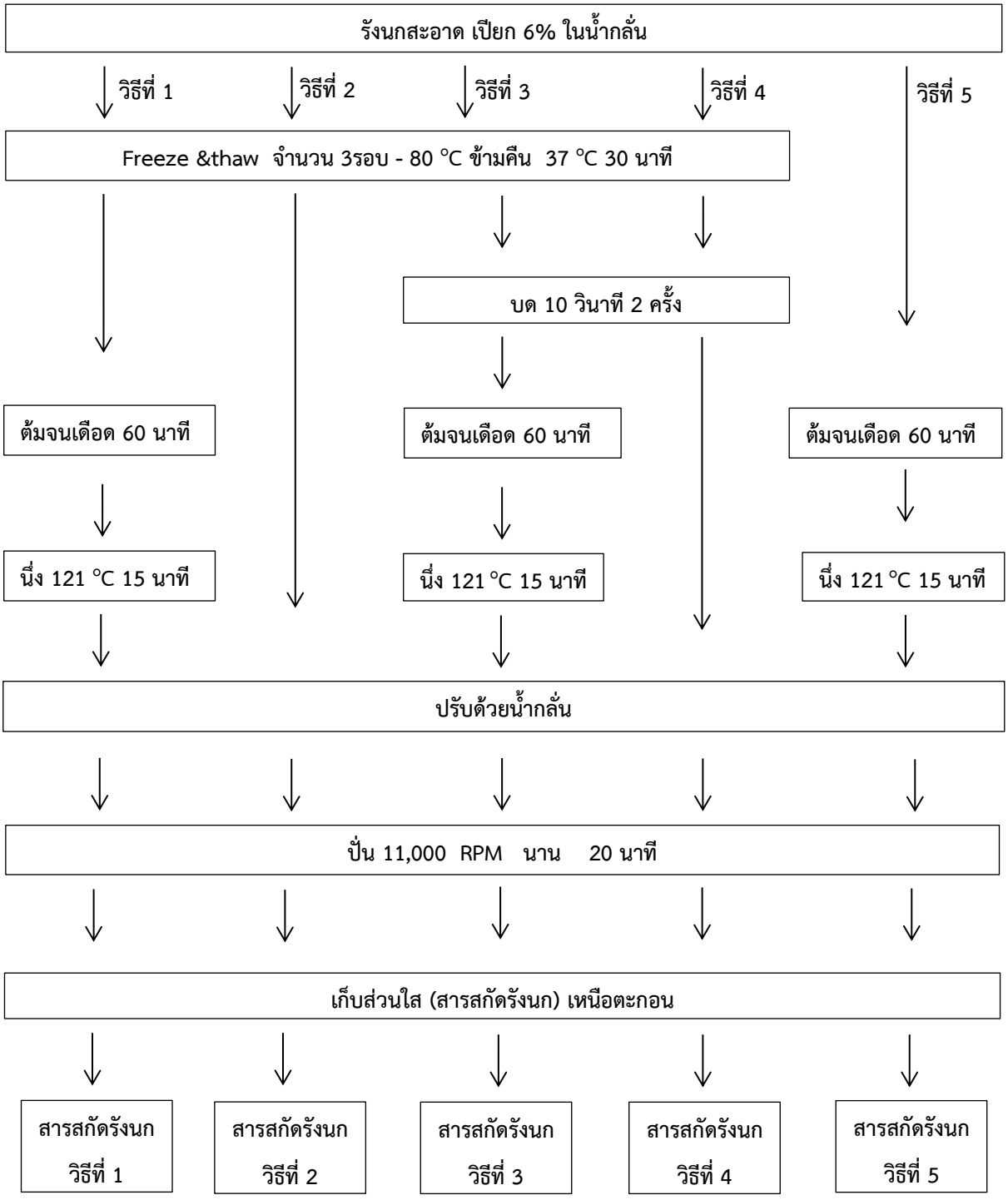
เริ่มตั้งแต่การเก็บตัวอย่างรังนกบ้านจากแหล่งทั่วประเทศ การตรวจวิเคราะห์รังนกดิบ การทำความสะอาดรังนก การตรวจวิเคราะห์รังนก การทำสะอาด การทำสารสกัดรังนก การตรวจวิเคราะห์สารสกัดรังนก และการทำเครื่องสำอางรังนก

การทำความสะอาดรังนกดิบ ก่อนที่จะนำรังนกดิบไปสกัดเพื่อให้ได้สารสกัดรังนก ต้องทำความสะอาดรังนกดิบเสียก่อน โดยนำรังนกดิบทั้ง 6 ภาค เป็น 6 ตัวอย่าง ไปทำความสะอาดตามวิธีการทำความสะอาดรังนก โดยนำรังนกดิบแช่ในน้ำกลั่นจนรังนกพองตัว ใช้แหนบเลือกขนนกและสิ่งแปลกปลอมออกจากรังนก จนรังนกสะอาด จากนั้นอบรังนกให้แห้งที่อุณหภูมิ 8-10 °C จนได้รังนกแห้งสะอาด (กมลศักดิ์ เลิศไพบูลย์ และ ศุภกร พัฒนวิวัฒน์, 2562) ทำความสะอาดรังนกที่ห้องปฏิบัติการของหลักสูตร

วท.บ.จุลชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา และเก็บรักษารังนกแห้งสะอาด ไว้ที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการทดลองขั้นต่อไป คือ การทำสารสกัดรังนก ดังแสดงใน ภาพที่ 1.1

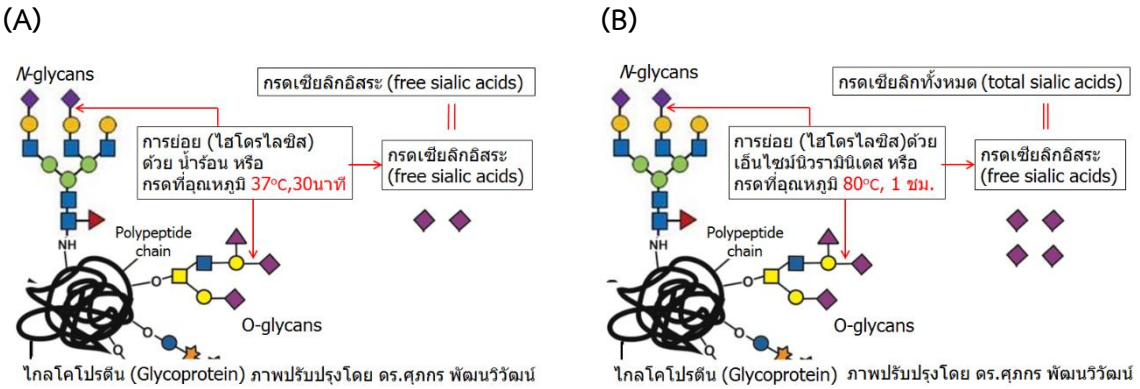
การทำสารสกัดรังนก การสกัดสารที่มีเป้าหมายเพื่อนำไปบริโภค โดยทั่วไปมักนิยมใช้น้ำร้อนเป็นตัวสกัด การสกัดรังนกก็เช่นเดียวกัน Tong et al. (2020) ศึกษาวิธีการสกัดรังนกโดยใช้น้ำร้อนช่วยในการสกัดเพื่อเตรียมสารสำคัญของรังนก และได้ศึกษาเมตาบอไลต์โปรไฟล์ (metabolite profiles metabolite) ของสารสกัดรังนกด้วยน้ำร้อน โดยใช้วิธีเทคนิคของเหลวโครมาโตกราฟี/แมสสเปกโตกราฟี (LC/MS) พบว่า ในสารสกัดรังนกมีสารที่ละลายน้ำได้มีจำนวนถึง 193 รายการ (Tong et al., 2020) ในการวิจัยนี้ได้ศึกษาวิธีการสกัดรังนก 5 วิธี เพื่อหาวิธีการสกัดที่เหมาะสม เพื่อนำไปใช้ในการวิจัย ทุกวิธีสกัดรังนกใช้น้ำร้อนเป็นหลัก ดังแสดงใน ภาพที่ 1.2 โดยปฏิบัติงานที่ห้องปฏิบัติการของหลักสูตร วท.บ.จุลชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา สารสกัดรังนกที่เตรียมได้ เป็นของเหลวใส และเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

ตรวจวิเคราะห์กรดเซียลิกอิสระและกรดเซียลิกรวมในรังนกบ้าน สารสำคัญตัวแรกในรังนก คือ กรดเซียลิกหรือกรดไซอะลิก ในโครงการวิจัยฯ นี้ เป็นการตรวจวิเคราะห์กรดเซียลิกในรังนกบ้านของไทยเป็นครั้งแรก โครงสร้างของกรดเซียลิกในรังนกแสดงไว้ใน ภาพที่ 1.3 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า กรดเซียลิกอยู่ในส่วนปลายของโอลิโกแซคคาร์ไรด์ (โอลิโอไกลแคน) ซึ่งเชื่อมโยงกับสายโปลีเปปไทด์ และกลายเป็นไกลโคโปรตีนของรังนก กรดเซียลิกเป็นสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย ผลของคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของกรดเซียลิกได้แสดงใน ตารางที่ 1.4 ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากรดเซียลิกมีประโยชน์มากมายต่อร่างกาย เป็นการยืนยันว่าการบริโภครังนกเป็นการบริโภคแบบวิทยาศาสตร์



ภาพที่ 1.2 วิธีการสกัดรังนกโดยสังเขป

วิธีที่ 1-4 เริ่มต้นเหมือนกันคือ ใช้การทำ Freeze & thaw ส่วนวิธีที่ 5 เป็นวิธีเดียวที่ไม่ได้เริ่มต้นด้วยการทำ Freeze & thaw



ภาพที่ 1.3 โครงสร้างของกรดเซียลิก

(A) โครงสร้างของไกลโคโปรตีน ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนหรือสายโปลิเพปไทด์และโอลิโกไกลแคน ซึ่งมีกรดเซียลิกอยู่ที่ปลายของไกลแคน แสดงการย่อยหรือไฮโดรซิสที่ได้กรดเซียลิกอิสระ (กรดเซียลิกที่ละลายน้ำได้) และ (B) การย่อยที่ได้กรดเซียลิกรวม (กรดเซียลิกที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด)

ตารางที่ 1.4 คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของกรดเซียลิกในรังนกและผลทางชีวภาพต่อเซลล์และร่างกาย

คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของกรดเซียลิกในรังนก กรดเซียลิกดักจับออกซิเจนที่ไวต่อการทำปฏิกิริยาและยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ออกซิเดชันอนุมูลอิสระ		**เอกสารอ้างอิง**
กรดเซียลิกออกฤทธิ์ทางชีวภาพสามารถยับยั้งภาวะเครียดออกซิเดชันและยับยั้งการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์	ผลของคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของกรดเซียลิกในรังนกต่อเซลล์และร่างกาย	
กรดเซียลิกสามารถทำลายความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงคีราติโนไซต์	ชลอความชราภาพของเซลล์ต่อต้านการเกิดริ้วรอย คืนค่าความมีชีวิตของเซลล์ที่ได้รับความเสียหายจากการทำลายของอนุมูลอิสระ	(Kim et al., 2012)
กรดเซียลิกปกป้องและรักษาเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงSH-SY5Y ที่มีสาเหตุมาจากภาวะเครียดออกซิเดชัน	ปกป้องและรักษาโรคระบบประสาทเสื่อม ได้แก่ โรคอัลไซเมอร์ และ โรคพาร์กินสัน	(Yew et al., 2014)
กรดเซียลิกสามารถต้านภาวะดื้ออินซูลินในหนูที่กินอาหารที่มีไขมันสูง	รังนกสามารถต้านภาวะดื้ออินซูลินเป็นการลดความเสี่ยงการเกิดโรคเบาหวานและโรคหัวใจล้มเหลว	(Yida et al., 2015)
รังนกสามารถลดอัตราการตาย และเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของแมลงวันผลไม้ที่กินอาหารผสมรังนก	การเพิ่มอายุขัย ทำให้อายุยืน	(Hu et al., 2016) (Ghassem et al., 2017)
ยับยั้งเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ยับยั้งปฏิกิริยาฮีแมกกลูติเนชัน	ใช้เป็นยาทางเลือกในการป้องกันและรักษาเชื้อไข้หวัดใหญ่	(Howe et al., 1961) (Guo et al., 2006)

กรดเซียลิกในรังนกมี 2 รูป คือ กรดเซียลิกอิสระ (free sialic acid) และ กรดเซียลิกรวม (total sialic acid หรือ bounded sialic acid)

กรดเซียลิกอิสระ (free sialic acid: FSA) คือ กรดเซียลิกที่ละลายน้ำได้ วิธีตรวจสอบกรดเซียลิกอิสระมี 2 วิธี คือ (1) โดยการใช้น้ำกลั่นหรือสารละลายบับเฟอร์ และ (2) โดยการใช้สารละลายกรด (กรดอะเซติก หรือ กรดไฮโดรคลอริก หรือ กรดซัลฟูริก) จากนั้นจึงต้มในอ่างน้ำแบบเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C เป็นเวลา 20-30 นาที สามารถย่อยกรดเซียลิกอิสระออกจากไกลแคนได้ ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000-12,000 rpm เป็นเวลา 10-15 นาที เก็บส่วนใสเหนือตะกอนไปทดสอบกรดเซียลิกอิสระ (van der Ham et al., 2007; Zhang et al., 2020) ดังแสดงใน ภาพที่ 1.3A

กรดเซียลิกรวม (total sialic acid: TSA) คือ กรดเซียลิกที่อยู่ในโอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งเชื่อมโยงกับโปลิเปปไทด์เป็นไกลโคโปรตีนรังนก (conjugated sialic acids-CSA หรือ bounded sialic acids-BSA) วิธีตรวจสอบกรดเซียลิกรวมในรังนกมี 2 วิธี คือ (1) การย่อยหรือไฮโดรไลซิสรังนกโดยใช้เอนไซม์นิวรามินิเดส (neuraminidase) เอนไซม์จะไปตัดกรดเซียลิก (กรดเอ็น-อะเซทิลนิวรามินิก; *N*-acetylneuraminic: NANA) ทั้งหมดออกจากไกลแคนที่เชื่อมกับไกลโคโปรตีนได้ หรือวิธี (2) โดยการเติมสารละลายกรด (กรดไฮโดรคลอริก หรือ กรดซัลฟูริก) แล้วต้มในอ่างน้ำแบบเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 80°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สามารถย่อยกรดเซียลิกทั้งหมดออกจากไกลโคโปรตีนได้ ดังแสดงใน ภาพที่ 1.3B

การตรวจปริมาณกรดเซียลิกในรังนกและสารสกัดรังนก สำหรับการตรวจวิเคราะห์กรดเซียลิกมีดังนี้ รังนกดิบทั้ง 6 ตัวอย่าง และรังนกแห้ง สะอาดทั้ง 6 ตัวอย่าง นำส่งไปตรวจกรดเซียลิกอิสระ ที่ห้องปฏิบัติการบริษัทห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด เลขที่9/116 ถนนกาญจนวณิชย์ ตำบลหาดใหญ่ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา จากนั้น นำรังนกแห้ง สะอาด ทั้ง 6 ตัวอย่าง รวมเป็นรังนกแห้ง สะอาด 1 ตัวอย่าง แล้วส่งไปตรวจวิเคราะห์กรดเซียลิกรวมที่ห้องปฏิบัติการบริษัทไทยเนส คอร์เปอร์เรชัน จำกัด เลขที่4/99 ตำบลคอกกระบือ อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสาคร และการตรวจวิเคราะห์กรดเซียลิกอิสระในสารสกัดรังนกทั้ง 6 ตัวอย่าง ได้ปฏิบัติงานที่ห้องปฏิบัติการของหลักสูตร วท.บ.จุลชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา จังหวัดสงขลา โดยทำตามวิธีของ Jourdian et al. (1971) (Jourdian et al., 1971)

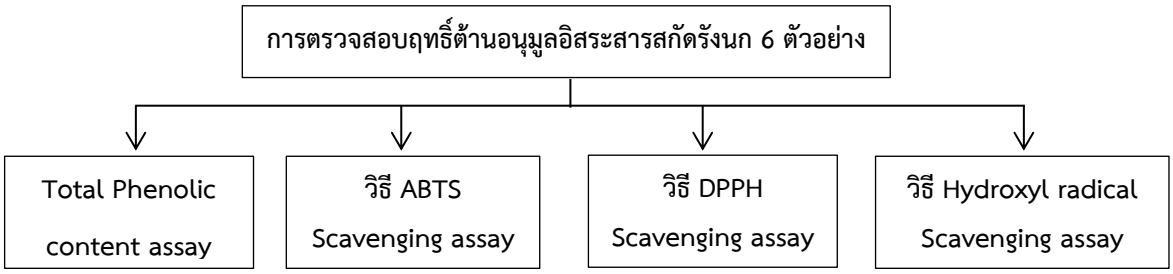
การตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติของสารสกัดรังนก รังนกดิบซึ่งเป็นรังนกบ้าน 6 ตัวอย่าง ที่ผ่านการทำความสะอาดแล้ว ได้เป็นรังนกเปียก สะอาด 6 ตัวอย่าง จากนั้นนำรังนกเปียก สะอาด ทั้ง 6 ตัวอย่าง

ไปทำสารสกัดรังนก จะได้สารสกัดรังนก 6 ตัวอย่าง นำสารสกัดรังนกทั้ง 6 ตัวอย่าง ไปศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดรังนก ได้แก่ การตรวจปริมาณโปรตีนในสารสกัดรังนก การตรวจปริมาณกรดเซียลิกอิสระในสารสกัดรังนก การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรังนก การทดสอบสารสกัดรังนกต่อการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสท์ (primary human dermal fibroblasts) การทดสอบความเป็นพิษ การปกป้องเซลล์ (ยับยั้งอะพอพโทซิส) และการสมานแผลของสารสกัดรังนกต่อเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสท์ รวมทั้งการนำสารสกัดรังนกไปผลิตเครื่องสำอางรังนกได้แก่ ครีมรังนก เซรั่มรังนก และสบู่รังนก

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรังนก กิตติพัฒน์ โสภิตธรรมคุณ และ ปานทิพย์ รัตนศิลป์กัลชาญ (2560) รายงานว่า ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เป็นคุณสมบัติที่สำคัญของสารสกัดสมุนไพร เนื่องจากอนุมูลอิสระเป็นปัจจัยเสี่ยงที่จะทำให้เกิดโรคร้ายแรงในมนุษย์ เช่น โรคความดันในหลอดเลือด โรคสมองเสื่อม และโรคมะเร็ง เป็นต้น ซึ่งการศึกษาคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพร เป็นองค์ความรู้ที่สำคัญที่นำไปสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและยารักษาโรคได้ เพื่อเพิ่มมูลค่าของสารสกัดสมุนไพร

สารสกัดรังนกนับว่าเป็นสารต้านอนุมูลอิสระหรือสารต้านปฏิกิริยาลูกโซ่ออกซิเดชันของอนุมูลอิสระ มีรายงานว่า คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของรังนก เป็นผลมาจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิดที่พบอยู่ในรังนก คือ กรดเซียลิก (Guo et al., 2006; Howe et al., 1961) แอคทีฟไกลโคเปปไทด์ รวมทั้งกรดอะมิโนอะโร-มาติก และกรดอะมิโนไม่ชอบน้ำ (Ghassem et al., 2017; Hu et al., 2016) และยังมีสารแลคโตเฟอร์ริน และโอโวทรานสเฟอร์ริน (Hou et al., 2015) สำหรับการตรวจสอบสมบัติต้านอนุมูลอิสระของรังนกมีหลายวิธี ในโครงการวิจัยฯ นี้ ได้เลือกใช้วิธีดังต่อไปนี้ การตรวจปริมาณสารฟีนอลิกรวม (total phenolic content assay) วิธี DPPH radical scavenging assay วิธี ABTS radical scavenging assay และ วิธี hydroxyl radical scavenging assay ดังแสดงใน<u>ภาพที่</u> 1.4

การตรวจสอบปริมาณสารฟีนอลิกรวม สารฟีนอลิกมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ หรือสารต้านปฏิกิยาออกซิเดชัน สารฟีนอลิกจะพบได้ในส่วนต่าง ๆ ของพืชสมุนไพร โดยสารฟีนอลิกที่สำคัญได้แก่ กรดฟีนอลิก กรดแกลลิก (gallic acid) ซึ่งพบในใบชา และพืชทั่ว ๆ ไป ดังนั้นในการศึกษาสารสกัดสมุนไพรทุกชนิด จะต้องมีการศึกษาคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ โดยการตรวจสอบปริมาณสารฟีนอลิกรวม ในการศึกษาวิจัยเรื่อง สารสกัดรังนก ก็เช่นเดียวกัน จะต้องมีการสอบปริมาณสารฟีนอลิกรวม ซึ่งจะเป็นตัวบ่งบอกคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรังนก



ภาพที่ 1.4 แผนผังการทดลองการตรวจสอบคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของรังนก

ในโครงการวิจัยฯ นี้ วิธี total phenolic content assay เป็นวิธีตรวจสอบปริมาณสารฟีนอลิกรวมในสารสกัดรังนก และตรวจความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของรังนกด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay วิธี ABTS radical scavenging assay และ วิธี hydroxyl radical scavenging assay

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรังนกด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay

เป็นการฟอกสีอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ทำตามวิธีของ Re et al. (1999) ข้อดีของวิธีนี้คือ เป็นวิธีการที่ง่าย โดยอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ จะทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับสารต้านอนุมูลอิสระ และอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ละลายได้ดีในน้ำ ส่วนข้อด้อยของวิธีนี้ คือ อนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ไม่ใช่อนุมูลอิสระตามธรรมชาติ และไม่ใช่อนุมูลอิสระที่เกิดในร่างกายคน (Re et al., 1999)

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรังนกด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay

เป็นการทำลายอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ ทำตามวิธีของ Yusoff et al. (2017) โดยอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่มีสีม่วง เมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไป จะถูกออกซิไดซ์เปลี่ยนเป็นสีเหลือง (Yusoff et al., 2017) วิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ เพราะว่าเป็นวิธีที่ง่ายและใช้เครื่องมือที่มีอยู่ทั่วไปได้ แต่มีข้อด้อยคือ อนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ มีความคงตัวค่อนข้างมาก จึงไม่ไวต่อปฏิกิริยาที่ใช้ทดสอบ

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรังนกด้วยวิธี hydroxyl radical scavenging assay เป็นการทำลายอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล ($^{\bullet}OH$) ทำตามวิธีของ (Halliwell et al., 1987; Ramakrishna et al., 2012) วิธีนี้เป็นวิธีใกล้เคียงกับการทำลายอนุมูลอิสระในร่างกายมากที่สุด เพราะว่าอนุมูลอิสระ $^{\bullet}OH$ เป็นอนุมูลอิสระที่เกิดภายในร่างกายคน

การตรวจปริมาณโปรตีนในสารสกัดรังนก โปรตีนนับเป็นสารอาหารที่สำคัญในรังนก เพราะว่าโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลักในรังนก และโปรตีนยังเชื่อมโยงกับคาร์โบไฮเดรตในรังนก เป็นสาร

ไกลโคโปรตีน ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญของรังนก มีรายงานการศึกษาโปรตีนในรังนกบ้านชนิดรังขาวของไทย (วราศรี แสงกระจ่าง, 2554) โครงการวิจัยฯ นี้ ได้ตรวจวิเคราะห์โปรตีนในรังนกบ้านของไทย โดยกระจายไปตามภาคต่าง ๆ ทั่วประเทศ สำหรับการตรวจสอบปริมาณโปรตีนในสารสกัดรังนกในโครงการวิจัยฯ นี้ ใช้วิธี Bradford และปฏิบัติงานที่ห้องปฏิบัติการของหลักสูตร วท.บ.จุลชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา

การเพาะเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสท์ ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสท์ (primary human dermal fibroblasts) ในอาหาร Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ที่ประกอบด้วย fetal bovine serum (FBS; 10 %v/v) ยาปฏิชีวนะ penicillin (100 U/mL) และ streptomycin (100 µg/mL) และเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ 37°C และ 5% CO_2 ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสท์ที่ห้องปฏิบัติการของหลักสูตร วท.บ.จุลชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา จังหวัดสงขลา และเก็บรักษาเซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสท์ เพื่อทำการศึกษาต่อไป

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดรังนกต่อเซลล์เพาะเลี้ยง โดยทั่วไปเมื่อทำการสกัดใด ๆ เพื่อให้ได้มาซึ่งสารสกัดจากธรรมชาติ ก่อนอื่นจะต้องทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดนั้นก่อน สารสกัดรังนกก็เช่นเดียวกัน การตรวจสอบความเป็นพิษของสารสกัดรังนกต่อเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสท์ (primary human dermal fibroblasts) ด้วยวิธี MTT assay (Hamid et al., 2012) ซึ่งเป็นวิธีทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดรังนกต่อเซลล์ไฟโบรบลาสท์ และคำนวณค่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต (% relative cell viability) ที่เวลา 24 ชั่วโมง

การปกป้องเซลล์ไฟโบรบลาสท์ของสารสกัดรังนกตัวอย่าง

(1) วิธี MTT assay

การศึกษาผลของสารสกัดรังนกตัวอย่างต่อการลดการตายของเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสท์ จากการกระตุ้นด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เพื่อดูความเป็นไปได้ในการปกป้องเซลล์จากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยบ่มสารสกัดรังนกตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสท์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และคำนวณค่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต (% relative cell viability) (Hamid et al., 2012)

(2) วิธี Flow cytometry

(2.1) การตรวจสอบออกซิเจนที่ไวต่อการทำปฏิกิริยา

เป็นการตรวจสอบออกซิเจนที่ไวต่อการทำปฏิกิริยา (reactive oxygen species: ROS) ในเซลล์ที่มีชีวิต (live cells) ด้วยวิธี flow cytometry (Amnis® imaging flow cytometer, part of EMD Millipore) โดยใช้ชุด kit (CellROX™ Green flow cytometry assay kits, C10492) ในการตรวจสอบ หลังจากบ่มเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรพลาสท์กับสารสกัดรังนกตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จึงเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หลังจากนั้น ตรวจสอบระดับออกซิเจนที่ไวต่อการทำปฏิกิริยาในเซลล์โดยใช้แหล่งกำเนิดแสงเลเซอร์ที่ความยาวคลื่น 488 nm และรายงานผลเป็นค่าความเข้มของการเรืองแสง (median fluorescence intensity: MFI)

(2.2) การตรวจสอบอะพอพโทซิส

การตรวจสอบอะพอพโทซิส (apoptosis) ได้ตรวจสอบด้วยวิธี flow cytometry (Amnis® imaging flow cytometer, part of EMD Millipore) โดยใช้ชุด kit (Dead cell apoptosis kit with annexin V FITC and PI, V13242) ในการตรวจสอบ หลังจากบ่มเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรพลาสท์กับสารสกัดรังนกตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จึงเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ตรวจสอบอะพอพโทซิสโดยใช้แหล่งกำเนิดแสงเลเซอร์ที่ความยาวคลื่น 488 nm วิเคราะห์ผลอะพอพโทซิสโดยใช้โปรแกรม IDEAS version 6.2 และรายงานผลเป็นจำนวน (count) เซลล์มีชีวิต เซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิสในระยะเริ่มต้น เซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิสในระยะหลัง และเซลล์ตาย

การตรวจสอบคุณสมบัติสมานแผลของสารสกัดรังนก

การตรวจสอบการสมานแผล (wound healing) ด้วยวิธี *in vitro* scratch assay ตามวิธีของ Liang et al. (2007) หลังจากเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสท์ ที่ 37°C, 5% CO_2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำให้เซลล์เกิดรอยขีด (scratch) เป็นแนวยาว หลังจากนั้นบ่มเซลล์ไฟโบรบลาสท์กับสารสกัดรังนกตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (Liang et al., 2007)

การผลิตเครื่องสำอางที่มีสารสกัดรังนกเป็นส่วนผสม

เป็นการผลิตเครื่องสำอางทั่ว ๆ ไป โดยการนำเอาสารสกัดรังนกมาเป็นสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ในการศึกษาครั้งนี้ ได้เตรียมผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ได้แก่ สบู่กลีเซอรีน เซรั่ม และครีม

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 นกแอ่นกินรังและรังของนกแอ่นกินรัง

รังนกที่กินได้ (edible bird's nest: EBN) หรือเรียกว่า คิวบิโลส (cubilose) หมายถึง รังของนกแอ่นกินรัง (edible-nest swiftlets) นกแอ่นกินรังเป็นนกขนาดเล็ก มีขนาดใกล้เคียงกับนกนางแอ่น การจัดลำดับชั้นของนกแอ่นกินรังตามอนุกรมวิธาน (swiftlet taxonomy) เป็นดังนี้ Class (กลุ่ม): Aves- Birds; Order (อันดับ): Apodiformes; Family (วงศ์): Apodidae; Genus (สกุล): *Aerodramus* หรือ *Collocalia*; *species* (ชนิด) : *Aerodramus fuciphagus* (นกแอ่นกินรังรังขาว); *Aerodramus germani* (นกแอ่นกินรังรังขาว) และ *Aerodramus maximus* (นกแอ่นกินรังรังดำ) ในประเทศไทย มีรายงานว่า นกแอ่นกินรังรังขาวประจำถิ่นของไทยมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Aerodramus germani* ชื่อไทยว่า นกแอ่นกินรังตะโพกขาว (โอภาส ขอบเขตต์, 2542) ต่อมาได้ยืนยันชื่อวิทยาศาสตร์เป็น *Aerodramus inexpectatus germani* หรือ Grey-rumped Swiftlet (Cranbrook et al., 2013; Petkliang et al., 2017) นกแอ่นกินรังมีการแพร่กระจายและดำรงพันธุ์อยู่ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ ไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย เวียดนาม พม่า และกัมพูชา รังนกที่นิยมบริโภคกันในสมัยก่อนเป็น "รังนกถ้ำ" คือเป็นรังของนกแอ่นกินรังถ้ำ ซึ่งเป็นนกแอ่นกินรังที่อาศัยอยู่ตามเกาะรังนกที่อยู่กลางทะเล (โอภาส ขอบเขตต์, 2542; ตวงรัตน์ โพธิ์เที่ยง, 2547) ปัจจุบันมี "รังนกบ้าน" ซึ่งเป็นรังนกที่เก็บเกี่ยวได้จากฟาร์มเพาะเลี้ยงนกแอ่นกินรัง

นกแอ่นกินรังถ้ำ (นกถ้ำ) และ นกแอ่นกินรังเพาะเลี้ยง (นกบ้าน) นกแอ่นกินรังแบ่งเป็นสองประเภท ตามแหล่งที่อยู่ คือ (1) นกแอ่นกินรังธรรมชาติ หรือนกแอ่นกินรังถ้ำ หรือนกถ้ำ (cave swiftlet) เป็นนกแอ่นกินรังที่มีถิ่นอาศัยอยู่ตามเกาะรังนกกลางทะเล และ (2) นกแอ่นกินรังเพาะเลี้ยง หรือนกแอ่นกินรังบ้าน หรือนกบ้าน (house-farmed white-nest swiftlets) เป็นนกแอ่นกินรังที่อาศัยอยู่ตาม "ฟาร์มเพาะเลี้ยงนกแอ่นกินรัง" หรือเรียกว่า บ้านรังนก (บ้านนก) หรือ คอนโดนกหรือตึกรังนก ตวงรัตน์ โพธิ์เที่ยง (2547) รายงานว่า นกแอ่นกินรังถ้ำมีการแพร่กระจายพันธุ์อยู่ตามบริเวณชายฝั่งทะเล และตามเกาะต่าง ๆ ในทะเล ทั้งทะเลด้านอ่าวไทยและอันดามัน โดยมีถิ่นที่อยู่อาศัยคือ เกาะรังนก และประเทศไทยมีเกาะรังนกจำนวน 156 เกาะ และมีประชากรนกแอ่นกินรังถ้ำประมาณ 1.09 ล้านตัว ในปี 2558 สมาคมผู้ประกอบการธุรกิจรังนกแอ่น (ประเทศไทย) รายงานว่า มีการเพาะเลี้ยงนกแอ่นกินรังอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศไทย รวมทั้งหมด 68 จังหวัด รวมทั้งจังหวัดที่ไม่มีพื้นที่จดกับทะเล และมีฟาร์มเพาะเลี้ยงนกแอ่นกินรังรวมกันทั่วประเทศ ประมาณ 17,800 หลัง (ภาพที่ ก) คิดเฉลี่ยขั้นต่ำ โดยให้บ้านรังนก 1

หลัง มีประชากรนกขั้นต่ำ 600 ตัว ดังนั้น ทั่วประเทศไทยมีประชากรนกแอ่นกินรังที่เป็นนกแอ่นกินรังจากฟาร์มเพาะเลี้ยงไม่ต่ำกว่า 10 ล้านตัว ซึ่งมากกว่านกแอ่นกินรังถ้ำถึง 10 เท่า (กมลศักดิ์ เลิศไพบูลย์ และศุภกร พัฒนวิวัฒน์, 2558)

2.2 การบริโภครังนกในอดีต

รังนก หรือ คิวบิโลส (cubilose) หมายถึง รังของนกแอ่นกินรัง (swiftlets) รังนกที่บริโภคกันในสมัยก่อน เป็นรังนกถ้ำ ซึ่งเป็นรังของนกแอ่นกินรังถ้ำ การบริโภครังนกในอดีตมีรูปแบบเดียว คือ นำรังนกมาต้มในหม้อต้มสองชั้นและตุ๋นรังนกเป็นเวลาหลายชั่วโมง จนเส้นรังนกพองตัวและนุ่ม เหมาะสำหรับการบริโภค รังนกที่ต้มแล้วเรียกว่า ซุปรังนก ในตำราแพทย์แผนจีน (traditional Chinese medicine: TCM) นั้น ได้บันทึกเป็นความเชื่อที่สืบทอดกันมานานว่า ซุปรังนกถูกใช้เป็นอาหารชั้นเลิศ และเป็นยาชั้นเยี่ยมสำหรับวัตถุประสงค์ต่าง ๆ เช่น การเสริมสร้างพลังงานภายใน (increasing energy) การเสริมสร้างเมตาบอลิซึมของร่างกาย (increasing metabolism) บำรุงผิวพรรณให้กระจ่างใส (complexion enhancement) ต่อต้านริ้วรอยและชะลอความชรา (anti-aging) บำรุงปอด (nourishing the lungs) โดยเฉพาะคนชราที่สูบบุหรี่จัด ถ้ากินรังนกเป็นประจำจะช่วยรักษาปอด บรรเทาวัณโรค (alleviating tuberculosis) บรรเทาอาการหอบหืด (alleviating asthma) บรรเทาอาการไอธรรมดา (relieve cough) และไอแห้ง (dry coughs) ละลายเสมหะ (dissolving phlegm) รักษาแผลในกระเพาะอาหาร (stomach ulcers) รักษาอาเจียนเป็นเลือด (curing hematemesis) เสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันให้แข็งแรง (strengthening immune system) แก้ไขอาการอ่อนเปลี้ยเพลียแรง (asthenia) บรรเทาอาการอักเสบ (Inflammation) เร่งการฟื้นตัวจากป่วยไข้(speeding recovery from illness) เร่งการฟื้นตัวจากการผ่าตัดและเร่งแผลผ่าตัดให้หายเร็วขึ้น (speeding recovery from surgery) แก้ไขความผิดปกติของไต (renal dysfunction) ต่อต้านการเกิดมะเร็ง (anti-cancer) เสริมสร้างการเจริญเติบโตของสมองเด็กตั้งแต่อยู่ในท้องแม่ (increasing child growth) เสริมสร้างความตั้งใจหรือสมาธิในเด็ก (improving concentration) ปรับปรุงการออกเสียง (voice improvement) เป็นยาบำรุงทางเพศ (Aphrodisiac) เป็นต้น (Aminuddin et al., 2016; Y. G. Chua et al., 2014; Cranbrook et al., 2013; Helm et al., 2018; Ma & Liu, 2012; Marcone, 2005; Teh & Ma, 2018; Zhao et al., 2016) จนถึงปัจจุบันมีการบริโภครังนกเพิ่มขึ้นมาก เพราะว่าในปัจจุบันมีรังนกบ้าน ซึ่งเป็นรังของนกแอ่นกินรังที่ได้จากฟาร์มเพาะเลี้ยง ทำให้รังนกบ้านมีราคาถูกกว่ารังนกถ้ำมาก นอกจากนี้ ยังมีผลิตภัณฑ์อาหารรังนกหลายรูปแบบ เช่น รังนกบรรจุขวดพร้อมดื่ม รังนกแห้งกึ่งสำเร็จ รูปพร้อมชงดื่ม และผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางรังนก ทำให้การบริโภครังนกบ้านเพิ่มขึ้นมาก

2.3 การบริโภครังนกในปัจจุบันและอนาคต

รังนกเป็นโภชนเภสัช (nutraceutical products) โดย Akmal et al. (2017) รายงานว่า การบริโภครังนก นอกจากจะบริโภคเพื่อเป็นอาหารเสริมสุขภาพแล้ว ยังบริโภคเพื่อเป็นยาป้องกันและยารักษาโรคไปพร้อม ๆ กัน (Akmal et al., 2017) จึงสามารถกล่าวว่า รังนกเป็นผลิตภัณฑ์โภชนเภสัช โดยสรุปการบริโภครังนก นับเป็นวิธีการเสริมสร้างสุขภาพร่างกายแบบองค์รวมที่ปลอดภัยและมีประสิทธิภาพ

ปัจจุบันมีการศึกษาทางวิทยาศาสตร์สมัยใหม่ ทำการศึกษาผลของรังนกต่อเซลล์เพาะเลี้ยงหรือเซลล์ต้นกำเนิด (stem cells) ในหลอดทดลอง (*in vitro*) และการศึกษาในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) มีรายงานผลการศึกษาทางวิทยาศาสตร์เป็นจำนวนมากที่ได้สนับสนุนและยืนยันว่า การบริโภครังนกเป็นอาหารเสริมบำรุงสุขภาพร่างกายให้แข็งแรง และยังเป็นอาหารยาทางเลือกที่มีประสิทธิภาพสำหรับปกป้องและรักษาอาการที่ผิดปกติของร่างกาย มีรายงานการศึกษาว่า การบริโภครังนกสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Aminuddin et al., 2016; Y. C. Kong et al., 1987; Ng et al., 1986; Zhao et al., 2016) ซึ่งส่งผลเสริมสร้างความแข็งแรงแก่ร่างกายโดยรวม มีการศึกษาว่า รังนกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระสูงมาก การบริโภครังนกสามารถบรรเทาภาวะเครียดออกซิเดชันและยับยั้งอะพอพโทซิส (Daud et al., 2019; Hou et al., 2015; Kim et al., 2012; Yew et al., 2014) มีการศึกษาว่า รังนกสามารถบรรเทาความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่กระทำต่อเซลล์ประสาท การบริโภครังนกสามารถปกป้องเซลล์ประสาทและป้องกันการเสื่อมของเซลล์ประสาท (Hou et al., 2015; Yew et al., 2014; Yida et al., 2015) การบริโภครังนกเป็นทางเลือกใหม่สำหรับการบรรเทาภาวะความเครียดออกซิเดชัน ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเสื่อมของระบบประสาท เช่น โรคอัลไซเมอร์และโรคพาร์กินสัน มีการศึกษาว่า รังนกประกอบด้วยสารกระตุ้นการเจริญเติบโตเซลล์ผิวหนัง และสามารถกระตุ้นการสร้างเซลล์ใหม่ (Kim et al., 2012; Y. C. Kong et al., 1987; Roh et al., 2012) การบริโภครังนกจึงสามารถต้านริ้วรอย ชะลอการแก่ชราภาพของเซลล์และชะลอวัย และรังนกมีความสามารถในการสมานแผลภายนอก ใช้สมานแผลจากการบาดเจ็บของกระจกตา (Abidin et al., 2011; Ofiwijayanti et al., 2017) มีรายงานการศึกษาว่า รังนกมีคุณสมบัติต่อต้านไวรัสไข้หวัดใหญ่ในหลอดทดลอง โดยรังนกออกฤทธิ์ต่อต้านไวรัสไข้หวัดใหญ่ด้วยการยับยั้งปฏิกิริยาฮีแมกกลูติเนชันของไวรัสต่อเม็ดเลือดแดง (Akmal et al., 2017; Aminuddin et al., 2016; Guo et al., 2006; Howe et al., 1961) การบริโภครังนกจึงเป็นยาทางเลือกสำหรับยับยั้งการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ มีรายงานการศึกษาวิจัยว่า รังนกมีคุณสมบัติคล้ายกับเมทริกซ์กระดูกอ่อน และสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูกอ่อนของมนุษย์ (K.-H. Chua et al., 2013; Matsukawa et al., 2011; Nakagawa et al.,

2007) สรุปว่า การบริโภครังนกได้รับประโยชน์ในการเสริมสร้างกระดูกให้แข็งแรง และสามารถป้องกันและรักษาโรคข้อเสื่อม

มีรายงานการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับฮอร์โมนเพศในรังนกทั้งในหลอดทดลอง และทดลองในหนูเพศเมียที่ถูกตัดรังไข่และหนูเพศผู้ที่ถูกตัดอัณฑะ (Hou et al., 2019; Ma et al., 2012; Ma & Liu, 2012) การบริโภครังนกอาจเป็นการเสริมสร้างฮอร์โมนที่ได้จากรังนก สำหรับรักษาอาการหย่อนสมรรถภาพทางเพศในหนูเพศผู้ที่ทำหมัน กระตุ้นการทำงานของมดลูกและระบบสืบพันธุ์ในหนูเพศเมียที่ถูกตัดรังไข่ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาวิจัยว่า รังนกสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซิน-คอนเวอร์ติง (ACE) ดังนั้น การบริโภครังนกสามารถลดความดันในหลอดเลือด และป้องกันภาวะโรคหลอดเลือดหัวใจได้ (Babji et al., 2018; Nurfatin et al., 2016) การบริโภครังนกทั้งในปัจจุบันและอนาคต เป็นการบริโภคที่อยู่บนพื้นฐานของผลการศึกษาทางวิทยาศาสตร์สมัยใหม่ ดังนั้น การบริโภครังนกจึงเป็นการบริโภคที่เป็นวิทยาศาสตร์

2.4 สารสกัดรังนกและวิธีเตรียมสารสกัดรังนก

สารสกัดรังนก (edible bird's nest extract: EBNE) รังนกที่เก็บมาจากฟาร์มเพาะเลี้ยงนกแอ่นกินรังเป็นรังนกดิบ ซึ่งรังนกดิบจะต้องผ่านกระบวนการสกัด (extraction) หรือการย่อย (digestion) ให้เป็นสารสกัดรังนกหรือไฮโดรไลเสตรังนก (hydrolysate) เสียก่อน จึงจะนำมาบริโภคได้ หรือนำไปใช้งานอื่น ๆ ต่อไปได้ Yida et al. (2014) ศึกษาการย่อยรังนกในหลอดทดลอง โดยใช้สภาวะเหมือนกับการย่อยในร่างกาย (human gastro-intestinal digestion) พวกเขารายงานว่า ภายใต้วิธีการและสภาวะการสกัดรังนกหรือย่อยรังนกที่เหมาะสม จะได้สารสกัดรังนกหรือไฮโดรไลเสตรังนกที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพปริมาณค่อนข้างสูงและสามารถออกฤทธิ์แบบเฉพาะเจาะจง (Yida et al., 2014) สำหรับวิธีการสกัดรังนกมีหลายวิธี และวิธีการสกัดรังนกทุกวิธีจะต้องผ่านขั้นตอนแรก คือ การทำความสะอาดรังนกดิบก่อน

2.4.1 วิธีทำความสะอาดรังนก

วิธีการทำความสะอาดรังนกก่อนที่จะนำรังนกดิบมาบริโภคหรือนำรังนกดิบไปทำการสกัดรังนก รังนกดิบจะต้องผ่านกระบวนการทำความสะอาด ให้เป็นรังนกสะอาดเสียก่อน วิธีทำความสะอาดรังนกมี 2 วิธี คือ (1) วิธีเตรียมแบบเปียก วิธีการทำโดยสังเขป ดังนี้ นำรังนกดิบไปแช่น้ำจนเส้นรังนกเปียกน้ำ เส้นรังนกจะพองตัวและนุ่ม จากนั้นใช้แหนบปลายแหลมดึงเอาขนนกและสิ่งแปลกปลอมอื่น ๆ ออกจากเนื้อรังนกให้หมด ล้างรังนกด้วยน้ำหลาย ๆ ครั้ง จนเนื้อรังนกสะอาด สามารถนำไปบริโภคได้หรือนำไปทำ

การสกัดต่อไปได้ (กมลศักดิ์ เลิศไพบูลย์ และ ศุภกร พัฒนวิวัฒน์, 2562) และ (2) วิธีเตรียมแบบแห้ง มีวิธีทำโดยสังเขป ดังนี้ นำรังนกดิบไปอบแห้ง แล้วบดรังนกให้ละเอียด จากนั้นนำรังนกไปร่อนผ่านตะแกรงขนาดรู 600μm (30 mesh) เพื่อแยกเอาขนนกและสิ่งแปลกปลอมออกให้หมด จะได้ผงรังนกแห้ง บดละเอียดสำหรับไปทำการสกัดต่อไป (Daud et al., 2019; Guo et al., 2006; Kim et al., 2012)

2.4.2 วิธีสกัดรังนกด้วยเกลือ

วิธีการสกัดรังนกด้วยเกลือ (salt extraction) วิธีสกัดโดยสังเขป ดังนี้ นำรังนกตัวอย่าง ซึ่งผ่านการอบแห้งแล้ว มาบดให้ละเอียด แล้วนำรังนกไปละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่ pH 8 (อัตราส่วนโดยประมาณ รังนก 1 g ต่อ สารละลายเกลือ 50-100 mL) จากนั้นนำไปเขย่า เป็นเวลา 3 ชม. ด้วยเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิ 40°C และความเร็ว 150 rpm จากนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนที่เป็นน้ำใสเหนือตะกอน (supernatant) ไว้ เพื่อนำไปศึกษาสารสกัดรังนกต่อไป ในการสกัดใช้น้ำปราศจากไอออนตลอดการทดลอง (Daud et al., 2019)

2.4.3 วิธีสกัดรังนกด้วยด่าง

วิธีการสกัดรังนกด้วยด่าง (alkaline extraction) วิธีการสกัดโดยสังเขป ดังนี้ นำรังนกตัวอย่าง ซึ่งผ่านการอบแห้งแล้วมาบดให้ละเอียด นำรังนกไปละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (อัตราส่วนโดยประมาณ รังนก 1 g ต่อ สารละลายด่าง 50-100 mL) จากนั้น นำไปเขย่าเป็นเวลา 3 ชม. ด้วยเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิ 40 °C และความเร็ว 150 rpm แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนที่เป็นน้ำใสเหนือตะกอนไว้นำไปศึกษาสารสกัดรังนกต่อไป ในการสกัดใช้น้ำปราศจากไอออนตลอดการทดลอง (Daud et al., 2019)

2.4.4 วิธีสกัดรังนกด้วยความร้อน

วิธีการสกัดรังนกด้วยความร้อน (heat extraction) วิธีสกัดโดยสังเขป ดังนี้ นำรังนกตัวอย่างซึ่งผ่านการอบแห้งแล้ว มาบดให้ละเอียด นำรังนกไปละลายในน้ำปราศจากไอออน (อัตราส่วนโดยประมาณ รังนก 1 g ต่อ น้ำ 50-100 mL) จากนั้นนำไปเขย่าเป็นเวลา 3 ชม. ด้วยเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิ 100°C และความเร็ว 150 rpm แล้วนำไปทำปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 rpm เป็น เวลา 15 นาที เก็บส่วนที่เป็นน้ำใสเหนือตะกอนไว้เพื่อนำไปศึกษาสารสกัดรังนกต่อไป (Daud et al., 2019; H. Kong et al., 2016)

2.4.5 วิธีสกัดรังนกโดยใช้เอนไซม์

การสกัดรังนกหรือการย่อยรังนกด้วยเอนไซม์ โดยเอนไซม์จะตัดสายโพลีเปปไทด์ขนาดใหญ่ ซึ่งเป็นองค์ประกอบของรังนก ให้ออกเป็นเปปไทด์ขนาดเล็กหลายเปปไทด์ ซึ่งเป็นเปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (active peptides) สำหรับเอนไซม์ที่ใช้ในการศึกษาสกัดรังนก ได้แก่ กลุ่มเอนไซม์โปรตีโอไลติก เช่น โปรตีเอส (protease) และปาเปน (papain) นอกจากนี้ยังใช้ เอนไซม์อัลคาเลส (alcalase) และคะตะเลส (catalase) (Babji et al., 2018; Daud et al., 2019; Kim et al., 2012; Zulkifli et al., 2019) วิธีการสกัดสารสกัดรังนกโดยใช้เอนไซม์อย่างสังเขป ดังนี้

ขั้นที่ 1 การเตรียมรังนกวัตถุดิบเบื้องต้น คือ นำรังนกวัตถุดิบไปอบแห้ง ที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 16 ชม. แล้วบดรังนกให้ละเอียด แล้วจึงร่อนรังนกผ่านตะแกรงขนาดรู 600 µm (30 mesh) เพื่อแยกเอาขนนกและสิ่งแปลกปลอมออกให้หมด ร่อนหลายครั้งจนได้ผงรังนกบดที่ละเอียดและสะอาด

ขั้นที่ 2 การสกัดครั้งที่ 1 ด้วยเครื่องอัลตราโซนิค (ultrasonic extraction) โดยการนำผงรังนกแห้งที่บดละเอียด ไปละลายในน้ำปราศจากไอออน (อัตราส่วนโดยประมาณ รังนก 1 g ต่อ น้ำ 50 mL) นำไปเขย่า ด้วยเครื่องเขย่า เป็นเวลา 16 ชม. ที่อุณหภูมิ 5°C และความเร็ว 150 rpm จากนั้นสกัดด้วยเครื่องอัลตราโซนิค จะได้สารสกัดรังนกแบบหยาบที่ผ่านการย่อยด้วยเครื่องอัลตราโซนิค

ขั้นที่ 3 การสกัดครั้งที่ 2 สกัดด้วยความร้อน (heat extraction) เสร็จแล้วนำรังนกที่สกัดด้วยเครื่องอัลตราโซนิค ไปสกัดต่ออีกครั้งโดยการต้มที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 1 ชม. ซึ่งจะได้สารสกัดรังนกแบบหยาบที่ผ่านการย่อยด้วยความร้อน ต่อจากนั้นสกัดต่อด้วยเอนไซม์

ขั้นที่ 4 การสกัดครั้งที่ 3 เป็นการสกัดต่อด้วยเอนไซม์ (enzymic extraction) โดยการเติมเอนไซม์ปริมาณ 0.5 mg/mL ปล่อยให้เอนไซม์ย่อยสารละลายรังนกเป็นเวลา 4 ชม. ที่อุณหภูมิ 45°C pH 8.5-9.0 หลังจากนั้นเพิ่มความร้อนทันที เป็น 90°C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ จะได้สารสกัดรังนกที่แบบหยาบที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์

ขั้นที่ 5 นำสารสกัดรังนกแบบหยาบที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนที่เป็นน้ำใสเหนือตะกอนซึ่งเป็นสารสกัดรังนกไว้ นำสารสกัดรังนกไปแช่แข็งที่

อุณหภูมิ -80℃ จากนั้น นำสารสกัดรังนกไป freeze-dried จนแห้ง เก็บสารสกัดรังนกแห้งไว้ที่อุณหภูมิ -80℃ จนกว่าจะนำไปใช้ศึกษาสารสกัดรังนกต่อไป

2.5 การบริโภครังนกเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ เพราะว่ามีสารอาหารอันอุดม

2.5.1 สารอาหารที่มีอยู่ในรังนก

สารสำคัญทั้งหมดในรังนก หรือเรียกว่า เมแทบอไลต์ (metabolites) ประกอบด้วยสารอาหารชนิดต่าง ๆ (nutritional compounds) และสารประกอบทางชีวภาพ (bioactive compounds) ซึ่งเป็นสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactivities) นับตั้งแต่ปี 2464 ซึ่งเป็นปีที่มีการศึกษาวิจัยสารสำคัญในรังนกเป็นครั้งแรก โดยเริ่มจาก Wang (1921) ได้ศึกษาวิเคราะห์สารไกลโคโปรตีนในรังนก (Wang, 1921) ต่อจากนั้นจึงมีการศึกษาสารสำคัญในรังนกอย่างแพร่หลาย Chua et al. (2014) ได้ใช้เทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี/แมสสเปกโตกราฟี (GC/MS) ร่วมกับเทคนิคของเหลวโครมาโตกราฟี/แมสสเปกโตกราฟี (LC/MS) เพื่อศึกษาเมแทบอไลต์ที่มีอยู่ในรังนก และรายงานเป็นเมแทบอโลมิกส์โปรไฟล์รังนก (metabolomic profiles) โดยรายงานว่า ในรังนกมีเมแทบอไลต์มากกว่า 78 ชนิด เป็นสารประกอบที่หลากหลาย เช่น กรดอินทรีย์ กรดอะมิโน ฮอร์โมน น้ำตาล น้ำตาลแอลกอฮอล์ กรดไขมัน และสเตียรอยด์ เป็นต้น ซึ่งเมแทบอไลต์ของรังนกทั้งหมด เป็นทั้งสารอาหารที่มีประโยชน์ และสารประกอบทางชีวภาพที่มีศักยภาพการออกฤทธิ์ทางชีวภาพและด้านเภสัชวิทยา (pharmacological effects) (Y. G. Chua et al., 2014)

2.5.2 การวิเคราะห์โปรตีนและสารอาหารอื่น ๆ ที่เป็นองค์ประกอบของรังนก

มีการศึกษาเรื่อง สารอาหารที่อยู่ในรังนกจากหลาย ๆ ประเทศ Marcone (2005) ได้ศึกษาเรื่องสารอาหารในรังนกจากประเทศมาเลเซียและอินโดนีเซีย และรายงานผลการวิเคราะห์ว่า มีโปรตีนรวม 62.0% คาร์โบไฮเดรตรวม 27.26% ไขมันรวม 0.14% ความชื้น 7.50% และเถ้า 2.10% (Marcone, 2005) การศึกษาในประเทศจีน Ma & Liu (2012) รายงานผลการวิเคราะห์สารอาหารในรังนกว่า มีไนโตรเจนรวม 25.62-27.26% โปรตีน 42-63% คาร์โบไฮเดรต 10.63-27.26% ไขมัน 0.14-1.28% เถ้า 2.1-7.3% และความชื้น 7.5-12.9% (Ma & Liu, 2012) ซึ่งการศึกษาสารอาหารในรังนกในอดีตจะมีข้อจำกัดหลายเรื่อง เช่น การสุ่มตัวอย่างรังนกและปริมาณตัวอย่างรังนก เพื่อแก้ปัญหานี้ Shi et al. (2017) ได้ใช้ตัวอย่างรังนกเป็นจำนวนถึง 60 ตัวอย่าง ศึกษาปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และปริมาณกรดเซียลิกในรังนก ด้วยวิธีไฮเปอร์สเปกตรัม (hyper-spectral imaging) ร่วมกับวิธีเคโมเมทริกซ์ (chemometrics) รายงานว่า ในรังนก 60 ตัวอย่าง มีปริมาณโปรตีนเฉลี่ยอยู่ในช่วง 45-65% (450-650 mg/g) คาร์โบไฮเดรตเฉลี่ยอยู่ในช่วง 20-45% (200-450 mg/g) และปริมาณกรดเซียลิกเฉลี่ยอยู่ในช่วง 8-11% (80-110 mg/g) (Shi et al., 2017)

2.5.3 การศึกษาคาร์โบไฮเดรตที่เป็นองค์ประกอบของรังนก

ได้มีการศึกษาเรื่อง คาร์โบไฮเดรตในรังนกจากนักวิจัยหลายคณะ (Y. G. Chua et al., 2015; Tung et al., 2008; Yu-Qin et al., 2000) โดยรายงานศึกษาพบว่า คาร์โบไฮเดรตในรังนกประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monoses) จำนวน 5-8 ชนิด ได้แก่ กรดเซียลิกหรือกรดไซอะลิก กาแล็กโทส กาแล็กโทซามีน กลูโคซามีน แมนโนส และฟิวโคส เป็นต้น ทุกการศึกษารายงานเหมือนกันว่า กรดเซียลิกเป็นน้ำตาลที่มีปริมาณมากที่สุด Yang et al. (2014) ได้ศึกษาปริมาณน้ำตาลต่าง ๆ ในรังนกจากประเทศต่าง ๆ โดยรายงานว่า มีกรดเซียลิกเป็นน้ำตาลที่มีปริมาณมากที่สุด คือ 10.28-11.79% ดังแสดงใน ตารางที่ 2.1 (Yang et al., 2014)

ตารางที่ 2.1 ชนิดและปริมาณน้ำตาลที่พบในรังนกจากประเทศต่าง ๆ (Yang et al., 2014)

แหล่งรังนก (origin)	ปริมาณน้ำตาล (monoses) มิลลิกรัม/100มิลลิกรัม (%)					ปริมาณ EGF
ประเทศ	แมนโนส	กาแล็คโทส	กาแล็คโทซามีน	กลูโคซามีน	กรดเซียลิก	มิลลิกรัม/กรัมโปรตีน
อินโดนีเซีย	0.92	5.59	4.57	5.37	11.79	3.78
มาเลเซีย	0.86	5.44	4.28	5.82	10.86	3.55
ประเทศไทย	0.79	5.40	3.83	6.04	11.52	3.27
สิงคโปร์	0.74	5.35	4.60	5.99	10.28	3.34

2.5.4 การศึกษากรดไขมันในรังนก

สำหรับการศึกษาปริมาณไขมัน (fatty acids) ในรังนก Marcone (2005) รายงานการผลการศึกษาโดยใช้รังนกของประเทศมาเลเซีย พบว่า มีทั้งกรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัว ดังนี้ เป็นกรดไขมันชนิดอิ่มตัว พบ 2 ตัว คือ กรดปาลมิติก (palmitic acid, C16:0) ปริมาณ 23% และกรดสเตียริก (steric acid, C18:0) ปริมาณ 29% และพบกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว 2 ตัว คือ กรดลิโนเลอิก (linoleic acid, C18:1) ปริมาณ 22% และกรดลิโนเลนิก (linolenic acid, C18:3) ปริมาณ 26% (Marcone, 2005)

2.5.5 การศึกษาแร่ธาตุต่าง ๆ ในรังนกบ้านประเทศไทย

มีรายงานการศึกษาแร่ธาตุชนิดต่าง ๆ ในรังนกของประเทศมาเลเซีย ซึ่งผลการวิเคราะห์แร่ธาตุ (หน่วยเป็น mg/100 g) ดังนี้ แคลเซียม 467.80-673.40 โซเดียม 142.80-209.70 แมกนีเซียม 82.80-97.80 โพแทสเซียม 5.00-8.00 ฟอสฟอรัส 0.50-5.20 เหล็ก 0.80-2.10 สังกะสี 0.70-1.50 ทองแดง 0.40-0.60 ปรอท 0.01 สารหนู 0.01 แคดเมียม 0.01 (Norhayati et al., 2010; Quek et al., 2018) พบว่า รังนก

ของประเทศมาเลเซีย มีแคลเซียมปริมาณมากที่สุด รองลงมาเป็น โซเดียม และแมกนีเซียม ในขณะที่ วราศรี แสงกระจ่าง (2554) ได้ศึกษาแร่ธาตุชนิดต่าง ๆ ในรังนกบ้านจากแหล่งต่าง ๆ ของประเทศไทย พบว่า โซเดียม มีปริมาณมากที่สุด รองลงมาเป็น แคลเซียมและแมกนีเซียม ดังแสดงใน ตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ปริมาณแร่ธาตุต่าง ๆ ในรังนกบ้านของประเทศไทย (วราศรี แสงกระจ่าง, 2554)

		ปริมาณแร่ธาตุ (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักรังนกแห้ง)				
		ตราด	เพชรบุรี	นครศรีธรรมราช	สตูล	นราธิวาส
โซเดียม	Sodium (Na)	1987.61	1508.85	1418.54	1233.78	1494.33
แคลเซียม	Calcium (Ca)	674.18	628.05	696.70	814.36	749.03
แมกนีเซียม	Magnesium (Mg)	142.13	143.79	148.09	143.80	147.27
โพแทสเซียม	Potassium (K)	38.19	23.05	27.15	42.84	21.08
เหล็ก	Iron (Fe)	0.83	0.48	0.63	1.08	0.66
ซีลีเนียม	Selenium (Se)	0.39	0.54	0.38	0.40	0.51
ทองแดง	Copper (Cu)	0.29	0.24	0.37	0.31	0.25
แมงกานีส	Manganese (Mn)	0.04	0.02	0.04	0.06	0.25

2.5.6 การศึกษาสารอาหารในรังนกบ้านของประเทศไทย

ประเทศไทยมีรังนกที่บริโภคได้ทั้ง 2 ชนิด คือ รังนกถ้ำและรังนกบ้าน สำหรับรังนกถ้ำของไทยมีการศึกษาสารอาหารชนิดต่าง ๆ อาทิเช่น โปรตีน กรดอะมิโน รวมทั้งแร่ธาตุต่าง ๆ (บังอร บุญชู, 2547) แต่ไม่ได้นำเสนอในรายงานนี้ สำหรับรังนกบ้าน วราศรี แสงกระจ่าง (2554) ศึกษาเรื่องสารอาหารในรังนกบ้านของประเทศไทยโดยใช้ตัวอย่างรังนกบ้านจากบ้านรังนกในภาคต่าง ๆ ของไทยคือ ตัวอย่างรังนกบ้านจังหวัดตราด เป็นตัวแทนของรังนกบ้านภาคตะวันออก รังนกบ้านจังหวัดเพชรบุรี เป็นตัวแทนรังนกบ้านภาคกลาง ตัวอย่างรังนกจากจังหวัดนครศรีธรรมราช เป็นตัวแทนรังนกบ้านภาคใต้ฝั่งตะวันออก (ฝั่งอ่าวไทย) รังนกบ้านจังหวัดสตูล เป็นตัวแทนของรังนกบ้านภาคใต้ฝั่งตะวันตก (อันดามัน) และรังนกบ้านจังหวัดนราธิวาส เป็นตัวแทนของรังนกบ้านที่ติดชายแดนประเทศมาเลเซีย และรายงานผลการศึกษาเรื่อง สารอาหารในรังนกบ้านของประเทศไทย พบว่า โปรตีนเป็นสารอาหารที่มีปริมาณมากที่สุด รองลงมา คือ คาร์โบไฮเดรต ดังแสดงตาม ตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ผลการศึกษาสารอาหารในรังนกบ้านประเทศไทย (วราศรี แสงกระจ่าง, 2554)

	ปริมาณสารอาหาร (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักฐานแห้ง)					
แหล่งรังนก	โปรตีน	คาร์โบไฮเดรต	ไขมัน	ความชื้น	เถ้า	เยื่อใย
ตราด	66.89	25.39	0.83	24.28	6.78	0.11
เพชรบุรี	61.01	31.04	1.10	17.84	6.73	0.13
นครศรีธรรมราช	60.85	30.40	1.27	19.16	7.37	0.12
สตูล	61.46	31.40	1.19	19.01	5.86	0.10
นราธิวาส	62.59	30.12	0.40	18.80	6.75	0.14

2.5.7 การศึกษากรดอะมิโนในรังนกบ้านของไทย

วราศรี แสงกระจ่าง (2554) ได้วิเคราะห์สารอาหารต่าง ๆ ในรังนกบ้านสีขาวของประเทศไทย และได้วิเคราะห์กรดอะมิโนรวมที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนในรังนกบ้าน พบว่า มีกรดอะมิโนไม่ต่ำกว่า 18 ชนิด มีทั้งกรดอะมิโนจำเป็นและกรดอะมิโนไม่จำเป็น แสดงตาม ตารางที่ 2.4

2.5.8 เปรียบเทียบปริมาณกรดอะมิโนในรังนกกับอาหารชนิดอื่น

โปรตีนเป็นสารอาหารที่มีความจำเป็นต่อร่างกายเพื่อการเจริญเติบโต และซ่อมแซมร่างกายส่วนที่สึกหรอ โปรตีนยังทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ต่าง ๆ และเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน แต่สารอาหารที่ร่างกายต้องการนำไปใช้จริง ๆ คือ กรดอะมิโน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของโปรตีน กรดอะมิโนจำแนกได้ 2 ชนิด คือ กรดอะมิโนจำเป็น (essential amino acids) และกรดอะมิโนไม่จำเป็น สำหรับกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายมีด้วยกัน 8 ชนิดได้แก่ ทรีโอนีน ไอโซลิวซีน ลิวซีน ไลซีน เมไทโอนีน ฟีนิลอะลานีน ทริปโตเฟน และวาลีน สำหรับเด็กยังต้องการกรดอะมิโนจำเป็นอีก 2 ชนิด คือ อาร์จีนีน และฮีสทิดีน Chua et al. (2015) ได้ศึกษาวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่ปรากฏในรังนก เปรียบเทียบกับกรดอะมิโนในอาหารอื่น คือ น้ำนม ไข่แดง ไข่ขาวของไข่ไก่ ผลการวิเคราะห์พบว่า ปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นในรังนก มีมากกว่ากรดอะมิโนจำเป็นที่พบใน น้ำนม และไข่ไก่ ดังแสดงใน ตารางที่ 2.5 (Y. G. Chua et al., 2015)

ตารางที่ 2.4 ผลวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนจำเป็น และ กรดอะมิโนไม่จำเป็น ที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนของรังนกบ้านไทย (วราศรี แสงกระจ่าง, 2554)

ชนิดของกรดอะมิโน		ปริมาณกรดอะมิโน (มิลลิกรัมต่อรังนกแห้ง 100 กรัม)				
		จ. ตราด	จ. เพชรบุรี	จ.นครศรีธรรมราช	จ. สตูล	จ. นราธิวาส
กรดอะมิโนจำเป็น(สำหรับผู้ใหญ่)						
1. เมทไธโอนีน	Methionine	5.13	4.78	4.66	5.63	4.48
2. ซิสเทอีน	Cysteine	1504.31	649.57	1592.18	716.11	761.68
3. ทรีโอนีน	Threonine	86.12	77.29	68.37	88.83	66.74
4. วาลีน	Valine	69.74	64.16	62.27	73.04	69.44
5. ฟีนิลอะลานีน+ไทโรซีน	Phenylalanine+Tyrosine	68.54	62.36	76.21	76.27	52.22
6. ไอโซลิวซีน	Iso-leucine	64.50	66.60	64.32	78.38	63.99
7. ฮิสทีดีน	Histidine	7.82	3.08	0.41	13.88	0.92
8. ไลซีน	Lysine	50.01	48.52	52.44	48.58	49.20
9. ทริปโตเฟน	Tryptophan	0.67	0.21	0.88	0.82	0.20
กรดอะมิโนไม่จำเป็น (สำหรับผู้ใหญ่)						
1. กลูตามีน	Glutamine	803.75	948.35	760.02	1228.62	796.96
2. แอสพาราจีน	Asparagine	232.44	329.88	230.58	255.34	215.00
3. ซีรีน	Serine	124.56	101.29	107.82	154.37	94.49
4. ไกลซีน	Glycine	122.96	82.50	88.66	108.92	76.85
5. กรดแอสพาร์ติก	Aspartic acid	76.68	77.61	73.53	82.58	83.69
6. กรดกลูตามิก	Glutamic acid	65.31	66.09	68.28	65.83	71.86
7. โพรลีน	Proline	58.14	57.02	62.90	65.00	61.17
8. อะลานีน	Alanine	55.31	49.81	68.43	69.23	50.53
9. ซิสทีน	Cystine	20.74	21.18	17.68	22.02	19.20

ตารางที่ 2.5 ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนในรังนก น้ำนม ไข่แดง และไข่ขาวของไข่ไก่ รวมทั้งสูตรอาหารของทารก (Y. G. Chua et al., 2015)

		concentration of amino acid for different food items (mg/g of sample)						
no.	compd name	EBN	milk	chicken egg yolk	chicken egg white	quail egg yolk	quail egg white	infant formula
1	alanine	14.70 ± 0.93	0.97 ± 0.02	11.24 ± 0.93	7.15 ± 0.99	7.52 ± 0.80	6.67 ± 0.33	3.59 ± 0.15
2	glycine	19.95 ± 1.39	0.51 ± 0.03	6.38 ± 0.46	3.91 ± 0.38	4.73 ± 0.40	4.25 ± 0.11	2.72 ± 0.16
3	valine	36.43 ± 4.56	1.92 ± 0.04	12.08 ± 0.84	8.39 ± 0.82	9.03 ± 0.77	7.56 ± 0.08	6.25 ± 0.29
4	leucine	35.53 ± 2.30	2.86 ± 0.03	16.96 ± 1.26	10.17 ± 0.78	12.94 ± 1.04	9.27 ± 0.16	0.00 ± 0.00
5	isoleucine	15.23 ± 1.76	1.38 ± 0.04	9.97 ± 0.72	5.58 ± 0.50	7.35 ± 0.55	5.19 ± 0.11	10.18 ± 0.64
6	threonine	41.01 ± 2.96	1.01 ± 0.06	9.96 ± 1.81	4.47 ± 1.02	6.91 ± 1.35	6.34 ± 0.72	5.40 ± 0.26
7	serine	37.20 ± 4.16	0.94 ± 0.04	13.67 ± 3.90	5.83 ± 2.22	9.78 ± 2.33	6.60 ± 1.23	6.16 ± 0.35
8	proline	43.56 ± 3.74	3.58 ± 0.12	9.39 ± 0.85	3.91 ± 0.41	6.41 ± 0.53	3.62 ± 0.07	5.22 ± 0.30
9	aspartic acid	53.86 ± 5.09	2.53 ± 0.10	20.32 ± 2.82	13.65 ± 2.10	13.98 ± 2.37	13.32 ± 1.20	9.11 ± 0.33
10	methionine	3.86 ± 0.54	0.82 ± 0.03	2.91 ± 0.16	4.94 ± 0.41	4.19 ± 0.31[a]	3.69 ± 0.08[a]	10.51 ± 0.33
11	4-hydroxyproline	4.57 ± 2.86	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	2.04 ± 0.13
12	glutamic acid	34.15 ± 2.73	8.28 ± 0.20	23.87 ± 4.04	19.08 ± 4.70	19.82 ± 4.01	19.68 ± 2.92	0.00 ± 0.00
13	phenylalanine	29.46 ± 2.34	1.52 ± 0.04	8.57 ± 0.76	7.89 ± 0.63	6.79 ± 0.69	6.59 ± 0.28	16.82 ± 0.60
14	lysine	16.22 ± 2.54	1.44 ± 0.09	9.74 ± 2.94	5.99 ± 0.94	7.04 ± 0.80	6.67 ± 1.28	4.60 ± 0.35
15	hydroxylysine	5.57 ± 0.57	0.00 ± 0.00	2.37 ± 0.25	4.59 ± 0.58	2.27 ± 0.19	2.46 ± 0.20	8.05 ± 0.52
16	tyrosine	31.41 ± 2.38	1.31 ± 0.07	7.27 ± 0.83	5.57 ± 0.85	6.05 ± 0.52	4.26 ± 0.27	0.00 ± 0.00
17	cystine	16.42 ± 1.93	0.00 ± 0.00	4.96 ± 0.82	6.77 ± 0.71	4.30 ± 0.51	4.74 ± 0.17	5.27 ± 0.47
	total EAA	177.75 ± 13.76	10.95 ± 0.67	70.21 ± 4.18	47.44 ± 2.09	54.26 ± 2.69	45.31 ± 1.75	53.76 ± 5.38
	total amino acid	439.15 ± 14.95	29.08 ± 1.96	169.69 ± 6.24	117.91 ± 4.29	129.11 ± 4.66	110.92 ± 4.46	95.93 ± 4.41

[a]No significance difference, $p > 0.05$.

2.6 การบริโภครังนกเป็นทั้งการป้องกันและรักษาโรค

สารสำคัญในรังนกออกฤทธิ์ทางชีวภาพและเภสัชวิทยา สารสำคัญทั้งหมดที่มีอยู่ในรังนกหรือเรียกว่า เมแทบอไลต์ (metabolites) มีทั้งสารอาหารและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ นับตั้งแต่ปี 2464 ที่ได้มีการศึกษาวิเคราะห์สารสำคัญในรังนก โดยเริ่มจาก Wang (1921) ได้แยกและวิเคราะห์สารไกลโคโปรตีนในรังนกเป็นครั้งแรก (Wang, 1921) ต่อจากนั้นได้มีการศึกษาสารสำคัญในรังนกอย่างแพร่หลาย โดย Chua et al.(2014) ได้ใช้เทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี/แมสสเปกโตกราฟี (GC/MS) ร่วมกับเทคนิคของเหลวโครมาโตกราฟี/แมสสเปกโตกราฟี (LC/MS) เพื่อศึกษาเมแทบอไลต์ที่มีอยู่ในรังนก และรายงานเป็นเมแทบอโลมิกส์โปรไฟล์ (metabolomic profiles) รังนก โดยรายงานว่า ในรังนกมีเมแทบอไลต์มากกว่า 78 ชนิด ซึ่งเป็นสารประกอบที่หลากหลาย ได้แก่ กรดอินทรีย์ กรดอะมิโน ฮอร์โมน น้ำตาล น้ำตาลแอลกอฮอล์ กรดไขมัน และสเตียรอยด์ เป็นต้น ซึ่งเมแทบอไลต์รังนกทั้งหมดนี้ เป็นทั้งสารอาหาร (nutritional contents) ที่มีประโยชน์ และเป็นสารประกอบทางชีวภาพ (bioactive compounds) ที่มีศักยภาพในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactivities) และด้านเภสัชวิทยา (pharmacological effects) ต่อมา Chua et al. (2014) รายงานว่า เมแทบอไลต์ในรังนกได้รับการพิสูจน์ทางวิทยาศาสตร์สมัยใหม่แล้วว่า มีผลทางด้านเภสัชวิทยา ซึ่งผลทางเภสัชวิทยานี้ เกิดจากสารสำคัญที่มีอยู่ในรังนก คือ ทั้งสารอาหารและสารประกอบทางชีวภาพ จึงยืนยันได้ว่า รังนกมีสรรพคุณทางการแพทย์ การบริโภครังนกจึงส่งผลดีต่อสุขภาพของมนุษย์ (Y. G. Chua et al., 2014)

รังนกเป็นโภชนเภสัชคือเป็นทั้งอาหารและยา ในชีวิตประจำวันของคนเรา มีการใช้ยารักษาโรคหรือใช้สารเคมีบำบัดโรคเป็นประจำ ซึ่งในระยะยาวเชื่อว่า ฤทธิ์ของยาและสารเคมีที่นำเข้าสู่ร่างกายอาจส่งผลข้างเคียงต่อสุขภาพของคนเรา Akmal et al. (2017) รายงานว่ารังนกเป็นหนึ่งในผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่ใช้เป็นทั้งอาหารเสริมสุขภาพและอาหารยา ใช้เพื่อการรักษาโรคทางเลือกได้ (alternative foods) เนื่องจากนอกจากรังนกเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการที่เป็นเลิศแล้ว ยังพบว่า รังนกเป็นทั้งยาป้องกันและยารักษาโรคไปพร้อม ๆ กัน รังนกจึงเป็นตัวแทนผลิตภัณฑ์อาหารที่ใช้เพื่อการบำรุงร่างกาย การป้องกันโรค และรักษาโรคไปพร้อม ๆ กัน (prophylactic and therapeutic agents) ดังนั้น Akmal et al. (2017) สรุปว่า การบริโภครังนก โดยคำนึงถึงสารอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการ และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ทำหน้าที่ทางชีวภาพ (biological functions) และการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (pharmacological activities) จึงเป็นการเกิดใหม่ของอุตสาหกรรม “โภชนเภสัช” (nutraceutical products) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณค่าทั้งทางโภชนาการและทางการแพทย์ไปพร้อม ๆ กัน (Akmal et al., 2017) ดังนั้น การบริโภครังนกแบบวิทยาศาสตร์ นับเป็นวิธีการเสริมสร้างสุขภาพร่างกายแบบองค์รวม ที่มีประสิทธิภาพ และปลอดภัย การบริโภครังนกเสริมสร้างสุขภาพร่างกายแบบองค์รวมกล่าวคือ (1) รังนกกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (2) รังนกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (3) รังนกต้านริ้วรอย ชะลอการแก่ชราภาพและชะลอวัย (4) รังนกต้านไวรัสไข้หวัดใหญ่ (5) รังนกเสริมสร้างกระดูกให้แข็งแรง และรักษาโรคข้อเสื่อม (6) รังนกมีฮอร์โมนเพศ และ (7) รังนกสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซิน-คอนเวอร์ติง (ACE)

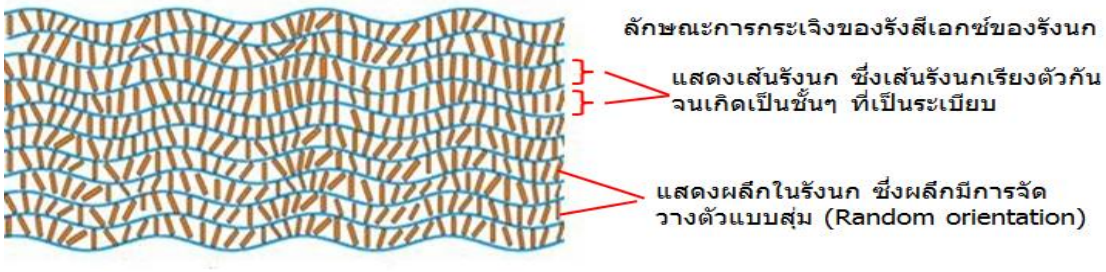
2.6.1 การบริโภครังนกกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน

ไกลโคโปรตีนในรังนกออกฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน องค์ประกอบหลักและสำคัญของรังนก คือ ไกลโคโปรตีน (glycoprotein) การศึกษาวิจัยไกลโคโปรตีนในรังนกเกิดขึ้นครั้งแรก ต้องย้อนไปปี 2464 เมื่อนักวิทยาศาสตร์ที่เมืองชิคาโก สหรัฐอเมริกา ชื่อ Wang (1921) ได้ศึกษาวิเคราะห์สารไกลโคโปรตีนในรังนกเป็นครั้งแรก และสรุปว่า รังนกที่กินได้จากประเทศจีน ประกอบด้วยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ซึ่งสารอาหารทั้งสองตัวนี้จะเชื่อมโยงกันเป็นไกลโคโปรตีน (Wang, 1921) ต่อมามีคณะนักวิทยาศาสตร์ Howe et al. (1961) เป็นคณะที่สองที่ได้ศึกษาวิธีการสกัดไกลโคโปรตีนของรังนก และได้แยกกรดเซียลิกออกมาจากสารสกัดไกลโคโปรตีนรังนก (Howe et al., 1961) ต่อมาได้มีนักวิทยาศาสตร์หลายท่าน ได้ทำการสกัดสารไกลโคโปรตีนออกจากรังนก โดยเรียกสารที่สกัดได้ว่า *Collocalia* mucoid หรือ *Collocalia* glycoprotein หรือ *Collocalia* mucin ซึ่งปัจจุบันเรียกว่า สารสกัดรังนก (edible bird’s nest extract) (Shim et al., 2016; Wieruszeski et al., 1987) ไกลโคโปรตีนรังนกประกอบด้วยโปรตีนเชื่อมโยงกับคาร์โบไฮเดรต จึงมีการศึกษาปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต Shi et al. (2017) ศึกษา

ปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตของไกลโคโปรตีนรังนก โดยใช้จำนวนรังนกถึง 60 ตัวอย่าง และรายงานว่า ในรังนก 60 ตัวอย่าง มีปริมาณโปรตีนหรือสายโปลีเปปไทด์อยู่ในช่วง 45-65% และคาร์โบไฮเดรตอยู่ในช่วง 20-45% ของรังนกแห้ง (Shi et al., 2017)

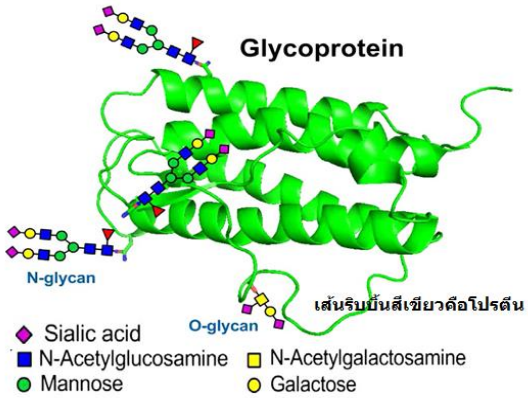
น้ำหนักโมเลกุลของไกลโคโปรตีนรังนก มีการศึกษาว่า ไกลโคโปรตีนรังนก มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 40-130 kDa (Wieruszeski et al., 1987) Utomo et al. (2014) รายงานว่า โปรตีนในรังนกมีน้ำหนักโมเลกุล 140.8, 64.8 และ 21.2 kDa และไกลโคโปรตีนรังนกมีน้ำหนักโมเลกุล 140.8 และ 64.8 kDa (Utomo et al., 2014) ต่อมา You et al. (2015) รายงาน ไกลโคโปรตีนรังนกมีน้ำหนักโมเลกุล 128 kDa (19.1%) 106 kDa (18.5%) และ 43 kDa (29.4%) (You et al., 2015)

โครงสร้างของไกลโคโปรตีนรังนก ไกลโคโปรตีนนับว่าเป็นองค์ประกอบหลักของรังนก มีการศึกษาโครงสร้างของไกลโคโปรตีนรังนกกันจำนวนมาก สำหรับประเทศไทย ผศ.ดร.นิรันดร มาแทน และคณะนักวิทยาศาสตร์จากมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ร่วมกับสถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน จังหวัดนครราชสีมา ได้ศึกษาโครงสร้างของไกลโคโปรตีนรังนกด้วยแสงซินโครตรอน โดยแสดงตาม ภาพที่ 2.1 และโครงสร้างไกลโคโปรตีนรังนกแสดงดัง ภาพที่ 2.2A และ การศึกษารังนกโดย Guo et al. (2006) และ Yagi et al. (2008) รายงานว่า โครงสร้างไกลโคโปรตีนรังนกจาก ภาพที่ 2.2B ประกอบด้วยโปรตีนหรือเส้นโปลีเปปไทด์ เชื่อมโยงกับไกลแคนหรือโอลิโกแซคคาร์ไรด์ (น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว) ซึ่งการเชื่อมโยงมี 2 แบบคือ แบบ โอ-ไกลโคซิลโปรตีน (O- glycosylproteins) และ เอ็น-ไกลโคซิลโปรตีน (N-glycosylproteins) (Guo et al., 2006; Yagi et al., 2008)

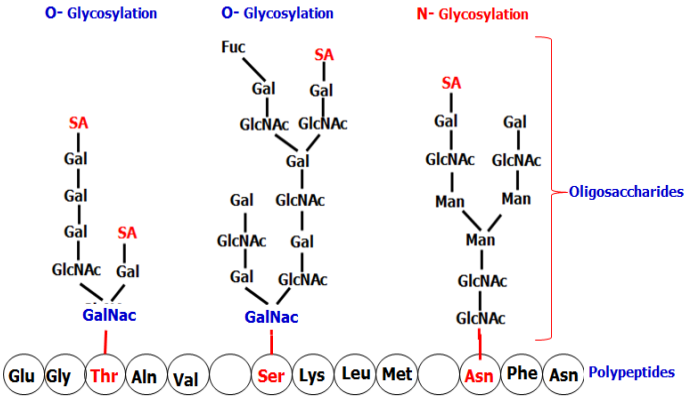


ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของไกลโคโปรตีนรังนกที่ศึกษาด้วยแสงซินโครตรอน (นิรันดร มาแทน, 2555)

(A)



(B)



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างไกลโคโปรตีนรังนก

(A) โครงสร้างแบบริบบิ้นของไกลโคโปรตีน แสดงให้เห็น โอลิโกแซคคาร์ไรด์ (โอลิโอไกลแคน) เชื่อมโยงกับโปรตีนหรือสายโปลีเปปไทด์; (B) โครงสร้างไกลโคโปรตีนของรังนกแสดงให้เห็นว่า โอลิโกแซคคาร์ไรด์เชื่อมโยงกับโปลีเปปไทด์ 7โดยมีโครงสร้าง 2 แบบ คือ O- และ N-glycosylproteins (SA: sialic acid หรือ *N*-acetylneuraminic acid**,** GalNAc: N-acetylgalactosamine, GlcNAc: N-acetylglucosamine), Gal: galactose, Man: manose (Shim et al., 2016)

ไกลโคโปรตีนรังนกกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immune-enhancing property) ไกลโคโปรตีนทำหน้าที่สำคัญและหลากหลายในสิ่งมีชีวิต กล่าวคือ ไกลโคโปรตีนทำหน้าที่เป็นโครงสร้าง เช่น คอลลาเจน ทำหน้าที่สำหรับขนส่ง เช่น แลคโตเฟอริน เป็นเอนไซม์ เช่น โปรตีเอส เป็นสารคัดหลั่งต่าง ๆ เช่น มูซิน ทำหน้าที่เป็นฮอร์โมน และไกลโคโปรตีนเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน ในส่วนของไกลโคโปรตีนของรังนก มีการศึกษามากมายรายงานว่า ไกลโคโปรตีนรังนกออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดย Ng et al. (1986) และ Kong et al. (1987) ได้รายงานว่า ไกลโคโปรตีนรังนกสามารถออกฤทธิ์เป็นไมโตเจน (mitogen) หรือไมโตซิสฮอร์โมน (mitogenic hormone) ซึ่งสามารถออกฤทธิ์กระตุ้นการเจริญเติบโต

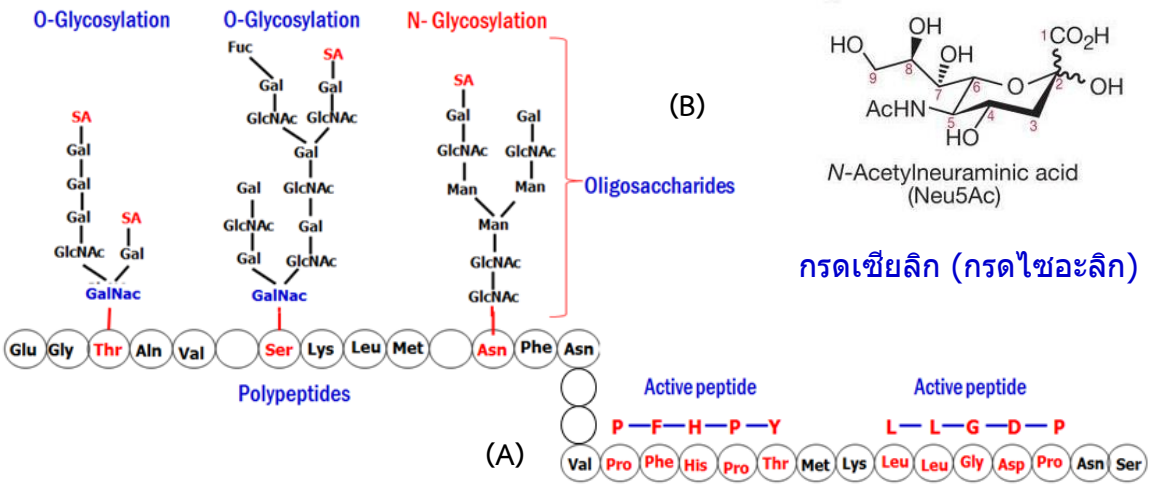
ของเซลล์เม็ดเลือดขาว (monocytes) สรุปว่า ไกลโคโปรตีนรังนกมีบทบาทสำคัญและออกฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน และ Kong et al. (1987) ยังรายงานในเบื้องต้นว่า ไกลโคโปรตีนรังนกสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนัง แสดงว่ารังนกมีคุณสมบัติช่วยชะลอวัยได้อีกด้วย (Y. C. Kong et al., 1987; Ng et al., 1986) การศึกษาในหนูทดลอง (*in vivo*) เพื่อแสดงว่า ไกลโคโปรตีนรังนกสามารถออกฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน Zhao et al. (2016) รายงานว่า รังนกสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูที่ได้รับรังนกโดยมีกลไกพื้นฐานเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการเจริญเติบโต (proliferation) และการกระตุ้น (activation) การทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ (lymphocyte) ชนิดบีเซลล์ (B-cells) และการหลั่งแอนติบอดีของเซลล์ (Zhao et al., 2016) ผลการศึกษาข้างต้นสรุปได้ว่า ไกลโคโปรตีนรังนกสามารถออกฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูทดลองที่ได้รับรังนก และการบริโภครังนกจึงสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกาย เมื่อเปรียบเทียบกับการบริโภคไข่ไก่ โดยไข่ไก่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้เหมือนกัน โดยสารอาหารในไข่ไก่ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันให้ร่างกาย ได้แก่ ไลโปโปรตีนความหนาแน่นสูง (HDL) ซึ่งประกอบด้วยกรดไขมันชนิดโอเมก้า 3,6,9 (Omega 3,6,9) และรวมทั้งกลุ่มวิตามินต่าง ๆ ได้แก่ วิตามินเอ วิตามินดี วิตามินบี 5 และวิตามินบี 12 ที่มีในไข่ไก่ก็สามารถตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน

2.6.2 รังนกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งภาวะเครียดออกซิเดชัน

การบริโภครังนกปกป้องและรักษาโรคที่มีสาเหตุจากภาวะเครียดออกซิเดชัน

รังนกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) อนุมูลอิสระ (free radicals) คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่อิเล็กตรอนวงรอบนอกสุด มีอิเล็กตรอน 1 ตัว (เป็นอิเล็กตรอนที่ไร้คู่) อนุมูลอิสระจึงไม่มีความเสถียรและมีปฏิกิริยาเคมีว่องไวมาก สามารถทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับโมเลกุลอื่น ๆ ทันที เพื่อดึงเอาอิเล็กตรอนหนึ่งตัวจากโมเลกุลอื่นมาจับคู่กับอิเล็กตรอนที่ไร้คู่ของมัน ทำให้มันมีความเสถียรขึ้น ในขณะเดียวกัน ก็จะทำให้เกิดอนุมูลอิสระตัวใหม่ขึ้นมาแทน อนุมูลอิสระตัวใหม่ซึ่งไม่เสถียร ก็ต้องดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่น ๆ ที่เสถียรมาไว้กับมัน ต่อไปอีกเรื่อย ๆ จนเกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ออกซิเดชันอย่างต่อเนื่อง อนุมูลอิสระที่สำคัญในร่างกาย เป็นกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ เรียกว่า ออกซิเจนที่ไวต่อการทำปฏิกิริยา (reactive oxygen species: ROS) ได้แก่ อนุมูลอิสระของไฮดรอกซิล และอนุมูลอิสระของซูเปอร์ออกไซด์ ในขณะที่สารต้านอนุมูลอิสระ เป็นสารที่สามารถยับยั้งหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระ เช่น การยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ออกซิเดชันของอนุมูลอิสระที่กระทำต่อไขมัน โปรตีน ดีเอ็นเอ และ เซลล์ประสาท กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระมี 3 แบบ คือ (1) ดักจับเก็บกลืนกินทำลายอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น (free radicle scavengers) (2) การยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ออกซิเดชัน และป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระใหม่ และ (3) ทำให้ปฏิกิริยาลูกโซ่

ออกซิเดชันของการเกิดอนุมูลอิสระสิ้นสุดลง (กนกวรรณ และ คณะ, 2557; โกสินทร์ และ คณะ, 2557) ในส่วนของรังนก มีรายงานมากมายแสดงให้เห็นว่า สารสกัดรังนกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ (Daud et al., 2019; Hou et al., 2015; Kim et al., 2012; Yida et al., 2014) สารต้านอนุมูลอิสระสำคัญที่พบในรังนก ได้แก่ (1) กรดเซียลิก (2) กรดอะมิโนอะโรมาติกและกรดอะมิโนไม่ชอบน้ำ (3) แอคทีฟไกลโคเปปไทด์ และ (4) แลคโตเฟอร์ริน (LF) และ โอโวทรานสเฟอร์ริน (OVF) ดังแสดงใน ภาพที่ 2.3A และ ภาพที่ 2.3B



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างไกลโคโปรตีนและโครงสร้างของกรดเซียลิกของรังนก

(A) โครงสร้างไกลโคโปรตีนของรังนก ตำแหน่งของไกลโคโปรตีนที่แสดงคุณสมบัติต่อต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการตายแบบอะพอพโทซิส คือ (1) กรดเซียลิก (SA) ซึ่งอยู่ที่ส่วนปลายของโอลิโกแซคคาร์ไรด์ (2) แอคทีฟเปปไทด์ (active peptides) และกรดอะมิโนที่แอคทีฟ ซึ่งอยู่ในสายโปลีเปปไทด์ และ (3) แลคโตเฟอร์รินและโอโวทรานสเฟอร์ริน ซึ่งอยู่ในไกลโคโปรตีนรังนก (Hou et al., 2015) แต่ภาพที่ 2.3A ไม่ได้แสดงโครงสร้างของแลคโตเฟอร์รินและโอโวทรานสเฟอร์ริน (SA: sialic acid or N-acetyl neuraminic acid, Man: manose, GalNAc: N-acetylgalactosamine, GlcNAc: N-acetylglucosamine, Gal: galactose); (B) โครงสร้างของกรดเซียลิกหรือกรดไซอะลิก (SA: sialic acid หรือ *N*-acetylneuraminic acid)

(1) กรดเซียลิกในรังนกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

ในปี 2504 โดยการศึกษาของ Howe et al. (1961) ได้สกัดไกลโคโปรตีนรังนก จากนั้นได้แยกกรดเซียลิกออกมาจากไกลโคโปรตีนได้เป็นคณะแรก และระบุว่า กรดเซียลิกในไกลโคโปรตีนรังนกสามารถยับยั้งเชื้อไวรัสกลุ่มไข้หวัดใหญ่ได้ (Howe et al., 1961) นอกจากนี้ คุณสมบัติเบื้องต้นในการกำจัดและต้านอนุมูลอิสระของรังนก ได้มีรายงานว่า ในรังนกมีสารสำคัญที่มีศักยภาพและเป็นสารต้านอนุมูลอิสระอยู่หลายชนิด ได้แก่ กรดเซียลิก ไกลโคเปปไทด์ และกรดอะมิโนต่าง ๆ เป็นต้น กรดเซียลิกทำ

หน้าที่เป็นตัวดักจับออกซิเจนที่ไวต่อการปฏิกิริยา (reactive oxygen scavenger) และทำลายอนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์ให้หมดไปได้ Kim et al. (2012) ศึกษากลไกการกำจัดอนุมูลอิสระในระดับโมเลกุลของคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรังนก โดยศึกษาความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงคีราติโนไซต์ของมนุษย์ (human keratinocytes; HaCaT) และรายงานกลไกการกำจัดอนุมูลอิสระของรังนก โดยสามารถทำลายความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และยับยั้งภาวะความเครียดออกซิเดชันในเซลล์เพาะเลี้ยงคีราติโนไซต์ การศึกษาของ Kim et al. (2012) สรุปได้อีกว่าสารสกัดรังนกโดยกรดเซียลิกที่อยู่ในรังนก มีคุณสมบัติต่อต้านการเกิดริ้วรอย กระตุ้นให้มีการสร้างเซลล์ใหม่ ชะลอการชราภาพของเซลล์ สารสกัดรังนกยังคืนค่าความมีชีวิตของเซลล์ที่ได้รับความเสียหายจากการทำลายของอนุมูลอิสระ (Kim et al., 2012) ตำแหน่งของกรดเซียลิกในรังนกและสูตรโครงสร้างแสดงใน ภาพที่ 2.3A

ปริมาณกรดเซียลิกของรังนก (sialic acid content) กรดเซียลิก หรือกรดไซอะลิก หรือกรดเอ็น-อะเซทิลนิวรามินิก (sialic acid: SA; *N*-acetylneuraminic acid: Neu5Ac หรือ NANA, นานา) เป็นองค์ประกอบหลักที่พบในรังนก (Guo et al., 2006) มีรายงานว่า ปริมาณกรดเซียลิกในรังนก พบอยู่ในช่วง 9.08-10.55% (Yang et al., 2014) ช่วง 10.2-12.1% (Tung et al., 2008)และมีรายงานว่าปริมาณกรดเซียลิกจากตัวอย่างรังนกของประเทศไทยอยู่ในช่วง 7.2-13.6% (Tung et al., 2008) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดเซียลิกในอาหารอื่น ๆ เช่น กรดเซียลิกในน้ำนมมนุษย์ซึ่งมี 5.1 μg/mg และ ไข่ไก่ 2.2 μg/mg แสดงให้เห็นว่า กรดเซียลิกในรังนกมีปริมาณสูงกว่าในอาหารชนิดอื่น ๆ มาก (Nakano et al., 1994)

(2) กรดอะมิโนในรังนกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

มีการศึกษารายงานว่า กรดอะมิโนอะโรมาติก (aromatic amino acids) และกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic amino acids) ในรังนก สามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีหลายการศึกษาทำการศึกษาองค์ประกอบของกรดอะมิโนรังนก ที่ได้จากการย่อยไกลโคโปรตีนรังนก โดยรายงานว่ากรดอะมิโนรังนกที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คือ กรดอะมิโนอะโรมาติก เช่น ไทโรซิน ฮิสติดีน ทริปโตแฟน และฟินิลอะลานิน (Babji et al., 2018; Y. G. Chua et al., 2015) นอกจากนี้ Nurul Nadia et al. (2014) รายงานว่า การออกฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระของไกลโคเปปไทด์ มีความสัมพันธ์อย่างมากกับกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ ได้แก่ ซิสเทอีน โปรลีน ฟินิลอะลานิน เมไธโอนีน ฮิสติดีน ทริปโตแฟน และไลซิน (Nurul Nadia et al., 2017) ดังแสดงใน ภาพที่ 2.3A

(3) ไกลโคเปปไทด์ในรังนก มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ

แอคทีฟไกลโคเปปไทด์ (active peptides) ที่มีการเรียงลำดับกรดอะมิโนเป็นแบบ PFHPY และแบบ LLGDP สามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ไกลโคเปปไทด์ของรังนก (glycopeptides) หรือไฮโดรไลเสตของรังนก (hydrolysates) เป็นส่วนของรังนกที่ผ่านการสกัดหรือการย่อยด้วยเงื่อนไขที่เหมาะสม สามารถทำงานหรือออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ (active peptides) Babji et al. (2018) รายงานว่า สารสกัดรังนกหรือรังนกที่ผ่านการย่อยแล้ว คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระมีค่าที่สูงกว่ารังนกที่ไม่ได้ผ่านการย่อย (Babji et al., 2018) อย่างไรก็ตาม ได้มีการตั้งสมมติฐานว่า เมื่อมีการบริโภครังนก และรังนกถูกย่อยในระบบทางเดินอาหาร สารต้านอนุมูลอิสระหลาย ๆ ตัวของรังนกจะถูกปลดปล่อยออกมาในร่างกายได้หรือไม่ ดังนั้น Yida et al. (2014) ศึกษาการย่อยรังนกในหลอดทดลอง โดยใช้เงื่อนไขเหมือนกับการย่อยในร่างกาย (human gastro-intestinal digestion) ได้รายงานว่า ภายใต้เงื่อนไขและวิธีการต่าง ๆ ที่เหมาะสม การแยกสารสกัดรังนกหรือย่อยรังนก จะได้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพปริมาณค่อนข้างสูง และออกฤทธิ์ทางชีวภาพแบบเฉพาะเจาะจง (Yida et al., 2014) จากภาพที่ 2.3A Ghassem et al. (2017) ได้รายงานว่า แอคทีฟเปปไทด์ เป็นเปปไทด์ที่มีฤทธิ์สูงมากในการต้านอนุมูลอิสระ และรายงานว่า แอคทีฟเปปไทด์ที่มีการเรียงลำดับกรดอะมิโนแบบ PFHPY และ LLGDP เป็นเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (โดย PFHPY คือ ลำดับการเรียงกรดอะมิโนแบบ proline-phenylalanine-histidine-proline-tyrosine และ LLGDP คือ ลำดับการเรียงกรดอะมิโนแบบ leucine-leucine-glycine-aspartic acid-proline ซึ่งเป็นไกลโคเปปไทด์ที่มีความสามารถสูงมากในการกำจัดอนุมูลอิสระ) (Ghassem et al., 2017) ดังแสดงใน ภาพที่ 2.3A

(4) แลคโตเฟอร์รินและโอโวทรานสเฟอร์รินในรังนก เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

แลคโตเฟอร์ริน (lactoferrin: LF) และ โอโวทรานสเฟอร์ริน (ovotransferrin: OVF) เป็นสารไกลโคโปรตีน จัดอยู่ในกลุ่มของทรานสเฟอร์ริน มีรายงานว่า สารทั้งสองตัวนี้ พบอยู่ในไกลโคโปรตีนรังนกด้วย และสามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ชะลอความชราภาพของเซลล์ และป้องกันภาวะดื้ออินซูลิน โดยการศึกษาของ Hou et al. (2015) ศึกษาหน้าที่ทางชีวภาพของแลคโตเฟอร์รินและโอโวทรานสเฟอร์รินในไกลโคโปรตีนรังนก พบว่า สารทั้งสองมีศักยภาพในการป้องกันเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง (SH-SY5Y) จากความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สามารถลดความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง (SH-SY5Y) และเพิ่มการออกฤทธิ์ในการจับกลืนกินออกซิเจนที่ไวต่อการทำปฏิกิริยา (ROS) นอกจากนี้ แลคโตเฟอร์รินและโอโว-ทรานสเฟอร์ริน รวมถึงสารสำคัญตัวอื่น ๆ ในสารสกัดรังนก เช่น กรดเซียลิก เป็นต้น ยังสามารถส่งสัญญาณให้เพิ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านอนุมูลอิสระ

ซึ่งเป็นยีนที่มีแนวโน้มออกฤทธิ์ป้องกันระบบประสาท (Hou et al., 2015) สรุปว่า การบริโภครังนกได้ประโยชน์ในการป้องกันระบบประสาท (neuroprotective) ซึ่งเป็นผลจากคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของรังนก และ ยังสรุปว่า รังนกเป็นแหล่งที่ดีของอาหารฟังก์ชั่น (functional foods) มีรายงานว่า ความเข้มข้นของแลคโตเฟอร์รินและโอโวทรานสเฟอร์รินในรังนก มีประมาณ 0.5 และ 1% ตามลำดับ ดังแสดงใน ตารางที่ 2.6 (Hou et al., 2015)

ตารางที่ 2.6 ปริมาณของแลคโตเฟอร์รินและโอโวทรานสเฟอร์รินในรังนก

	Lactoferrin	Ovotransferrin
House white EBN (Sabah)	4.68 ± 0.57 μg/mg EBN	10.23 ± 0.72 μg/mg EBN
Cave white EBN (Sabah)	4.27 ± 0.49 μg/mg EBN	10.63 ± 0.90 μg/mg EBN
Cave black EBN (Sabah)	2.80 ± 0.21 μg/mg EBN	1.31 ± 0.07 μg/mg EBN
Cave red EBN (Sabah)	3.43 ± 0.07 μg/mg EBN	3.13 ± 0.58 μg/mg EBN
Cave red EBN (Sarawak)	3.13 ± 0.07 μg/mg EBN	8.40 ± 0.56 μg/mg EBN
Human milk	2 g/l[32)]	NA
Cow milk	1 g/l[32)]	NA
Human tears	0.9 g/l[32,33)]	NA
Rat/rabbit/dog milk	<50 mg/l[32)]	NA
Hen egg	NA	130 mg/g egg albumen[19)]

พบว่ามีประมาณ 4.68 μg/mg และ 10.23 μg/mg ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสารอาหารจากแหล่งอื่น ๆ ได้แก่ น้ำนมคน น้ำนมโค และ ไขไก่ พบว่า ปริมาณแลคโตเฟอร์รินและโอโวทรานสเฟอร์รินในรังนกมีปริมาณน้อยกว่ามาก (Hou et al., 2015)

2.6.3 รังนกต้านภาวะเครียดออกซิเดชันและยับยั้งอะพอพโทซิส

การบริโภครังนกปกป้องระบบประสาทและต้านภาวะดื้ออินสุลิน

รังนกเป็นสารต้านภาวะเครียดออกซิเดชัน (anti-oxidative stress) ภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress: OS) เป็นภาวะขาดสมดุลภายในร่างกาย เกิดจากร่างกายมีอนุมูลอิสระ หรือมีออกซิเจนที่ไวต่อการทำปฏิกิริยาสะสมมากเกินไป และทำให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ออกซิเดชันอย่างต่อเนื่อง เป็นผลทำให้ร่างกายเกิดสภาวะที่เรียกว่า ภาวะเครียดออกซิเดชัน ซึ่งการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ออกซิเดชันต่อเนื่องที่กระทำกับไขมัน โปรตีน ดีเอ็นเอ และเซลล์ประสาท จนร่างกายเข้าสู่ภาวะเครียดออกซิเดชันอาจจะเป็นความเสี่ยงต่อการเกิดโรคต่าง ๆ ได้ เช่น โรคระบบภูมิคุ้มกัน โรคความดันเลือดสูง โรคเบาหวาน โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคระบบประสาทเสื่อม (โรคอัลไซเมอร์และโรคพากินสัน) โรคมะเร็ง และการเสื่อมชราภาพของเซลล์ เป็นต้น (กนกวรรณ และคณะ, 2557; โกสินทร์ และคณะ, 2557) สำหรับรังนก มีรายงานว่า สารสกัดรังนกสามารถบรรเทาภาวะเครียดออกซิเดชันได้ (Yew et al., 2014)

สารสกัดรังนกยับยั้งอะพอพโทซิส (anti-apoptosis) เมื่อมีอนุมูลอิสระหรือออกซิเจนที่ไวต่อการทำปฏิกิริยา มากระทำต่อเซลล์ต่าง ๆ จนเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน ทำให้เซลล์จะต้องตอบสนองต่อภาวะเครียดออกซิเดชันนั้น ๆ ซึ่งเป็นไปตามขั้นตอน ดังต่อไปนี้ การปรับตัวของเซลล์ (cellular adaptation) การบาดเจ็บของเซลล์ (cell injury) การแก่ของเซลล์ (cellular aging) และการตายของเซลล์ในที่สุด ซึ่งการตายของเซลล์แบ่งเป็น การตายแบบเนโครซิส (necrosis) และ การตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) การตายแบบเนโครซิสของเซลล์ จะเริ่มต้นที่เซลล์เมมเบรนก่อนแล้ว จากนั้นเกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ โดยที่ไลโซโซมจะหลั่งเอนไซม์เข้าสู่ไซโทพลาสซึม แล้วย่อยสลายโปรตีนและส่วนอื่น ๆ ภายในเซลล์ในที่สุด ส่วนการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสจะเริ่มต้นที่ดีเอ็นเอ (DNA) ซึ่งอยู่ภายในนิวเคลียสของเซลล์ก่อน เมื่อดีเอ็นเอและนิวเคลียสเสียสภาพ จนไม่สามารถจะซ่อมแซมได้ เซลล์จะเริ่มทำลายตนเอง จากนั้น เซลล์จะแตกออกเป็นส่วน ๆ สุดท้ายเซลล์ที่แตกเป็นส่วนจะถูกกลืนกิน (ฟาโกไซโตซิส (phagocytosis) โดยเม็ดเลือดขาวแมคโครฟาจ (macrophages) การตายแบบอะพอพโทซิสเป็นปฏิกิริยาที่ชักนำให้เซลล์ทำลายตัวเองอย่างต่อเนื่อง หรือเรียกว่า โปรแกรมจบชีวิตของเซลล์ (programmed cell death) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า สารสกัดรังนกสามารถยับยั้งการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ได้ (Yew et al., 2014)

(1) รังนกต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งอะพอพโทซิส

การบริโภครังนกสามารถปกป้องและรักษาโรคระบบประสาทเสื่อม

การดำรงชีวิตในประจำวันของคนเราในปัจจุบัน ทำให้เกิดออกซิเจนที่ไวต่อการทำปฏิกิริยา และภาวะเครียดออกซิเดชันภายในร่างกายได้ง่าย ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ประสาทสมองและเกิดการเสื่อมของเซลล์ประสาทสมอง ซึ่งเป็นสาเหตุการเกิดโรคเกี่ยวกับระบบประสาทสมองเสื่อม (neurodegenerative diseases) ได้แก่ โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) และ โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) เป็นต้น มีรายงานผลของสารสกัดรังนกสามารถลดระดับความเป็นพิษของสารนิวโรทอกซินได้ (neurotoxin; เป็นสารพิษต่อเซลล์และเนื้อเยื่อประสาท) โดย Yew et al. (2014) ได้ศึกษาคุณสมบัติปกป้องระบบประสาทของสารสกัดรังนก ในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาท SH-SY5Y ในอาหารที่ผสมสารสกัดรังนก แล้วเติมสารพิษที่ทำลายเซลล์ประสาท คือ 6-OHDA (6-hydroxydopamine) ลงในเซลล์เพาะเลี้ยง SH-SY5Y ที่เติมสารสกัดรังนก ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดรังนกสามารถลดระดับความเป็นพิษของ 6-OHDA ต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง และพบว่าเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง SH-SY5Y ที่มีสารสกัดรังนก มีการตายของเซลล์แบบอะพอพโตซิสลดลง และสารสกัดรังนกยังทำให้เซลล์เพาะเลี้ยง SH-SY5Y ทำงานดีขึ้น สรุปว่า สารสกัดรังนกสามารถยับยั้งการ

ตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง SH-SY5Y ที่เกิดจากสารพิษ และสารสกัดรังนกมีคุณสมบัติปกป้องระบบประสาท (neuroprotective) สรุปว่า การบริโภครังนกปกป้องและรักษาการเสื่อมของเซลล์ประสาทที่มีสาเหตุมาจากภาวะความเครียดออกซิเดชัน และซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคพาร์กินสันและโรคอัลไซเมอร์ได้ (Yew et al., 2014)

(2) รังนกต้านภาวะดื้ออินซูลิน โดยแลคโตเฟอร์รินและโอโวทรานสเฟอร์ริน

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีอยู่ในรังนก ได้แก่ แลคโตเฟอร์ริน (LF) และโอโวทรานสเฟอร์ริน (OVF) รวมถึงสารตัวอื่น ๆ ด้วย ได้แก่ กรดเซียลิก เป็นต้น สารทั้งหมดมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและลดภาวะเครียดออกซิเดชัน และยับยั้งการตายแบบอะพอพโทซิส มีรายงานอีกว่า สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งหมดที่กล่าวมานี้ สามารถออกฤทธิ์ต้านภาวะดื้ออินซูลิน (anti-insulin resistance) ได้ด้วย โดย Yida et al. (2015) รายงานว่า รังนกมีศักยภาพต้านภาวะดื้ออินซูลิน โดยการศึกษากับหนู 2 กลุ่ม หนูกลุ่มแรกกินอาหารมีไขมันสูงอย่างเดียว (high fat diet: HFD) และ หนูกลุ่ม 2 กินอาหารไขมันสูงผสมรังนก เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า หนูที่กินอาหารไขมันสูงอย่างเดียว จะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะดื้ออินซูลิน โดยผ่านการส่งสัญญาณอินซูลิน (insulin signaling genes) ในขณะที่หนูกลุ่มกินอาหารไขมันสูงผสมรังนกสามารถต้านการเกิดภาวะดื้ออินซูลินได้ โดยการยับยั้งการส่งสัญญาณของอินซูลิน อาจเนื่องจาก สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรังนก ที่ยับยั้งการเกิดภาวะดื้ออินซูลินในหนู ได้แก่ กรดเซียลิก แลคโตเฟอร์ริน และโอโวทรานสเฟอร์ริน โดยทั้ง 3 ตัวจะทำงานร่วมกัน เพื่อต่อต้านภาวะดื้ออินซูลินในหนู (Yida et al., 2015)

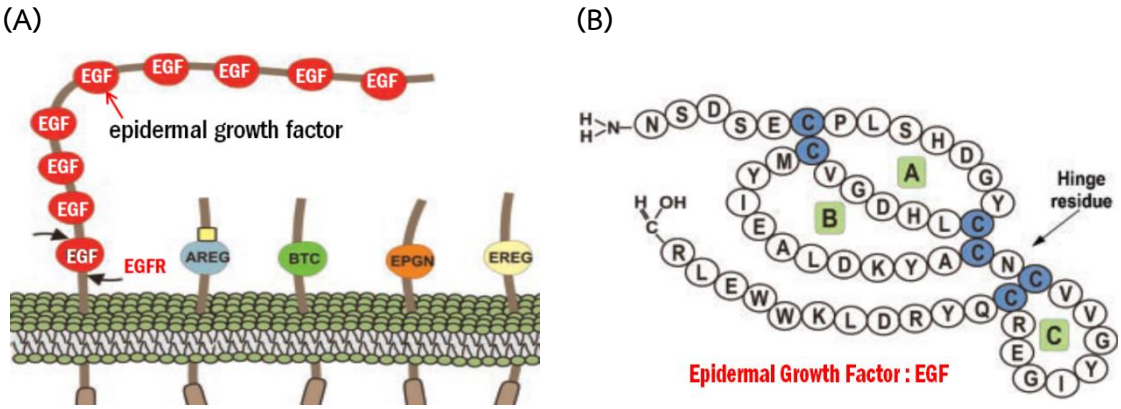
2.6.4 รังนกมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนัง การบริโภครังนกชลอความแก่ชราภาพและเพิ่มอายุขัย

กระบวนการเสื่อมสภาพของเซลล์และเนื้อเยื่อ ส่งผลทำให้เกิดความแก่ชราภาพของชั้นหนังนั้น มีสาเหตุมาจาก (1) อนุมูลอิสระหรือออกซิเจนที่ว่องไวต่อปฏิกิริยา (ROS) ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน และส่งผลต่อการทำให้เกิดการเสื่อมของเซลล์และเนื้อเยื่อ (2) การลดลงของฮอร์โมนเอสโตรเจนในสตรีวัยหมดประจำเดือน (3) การลดลงของเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix: ECM) ในชั้นหนังแท้ เมทริกซ์ที่อยู่นอกเซลล์ มีองค์ประกอบหลักคือ คอลลาเจน อิลาสติน และไกลโคสะมิโนไกลแคน (4) การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์เมทริกเมทัลโลโปรติเอส (matrix metalloproteinases: MMP-1 หรือ colagenase-1 ซึ่งทำหน้าที่ตัดเส้นใยคอลลาเจน) จะทำให้เมทริกซ์นอกเซลล์ คือ คอลลาเจน อิลาสติน และไกลโคสะมิโนไกลแคน ในชั้นหนังแท้ลดลง ทั้งหมดนี้เป็นที่สาเหตุของความแก่ชราภาพของเซลล์และเนื้อเยื่อ (ธรรมนูญ รุ่งสังข์, 2559)

การบริโภครังนกนั้นสามารถต้านริ้วรอย ลบรอยย่น ชะลอความแก่ และชะลอวัยได้ ซึ่งคุณสมบัติในการชะลอความชราภาพ (anti-ageing properties) ของรังนก ขึ้นอยู่กับสารสำคัญในรังนก ดังนี้ (1) EGF หรือสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนัง (epidermal growth factor: EGF) ซึ่งสามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์ของเซลล์ไฟโบรบลาสท์และสร้างคอลลาเจน (2) กรดเซียลิก ซึ่งมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งภาวะเครียดออกซิเดชัน และยับยั้งการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส และ (3) สารแลคโตเฟอร์ริน (LF) และโอโวทรานสเฟอร์ริน (OVF) มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ และสามารถต้านความชราภาพของเซลล์

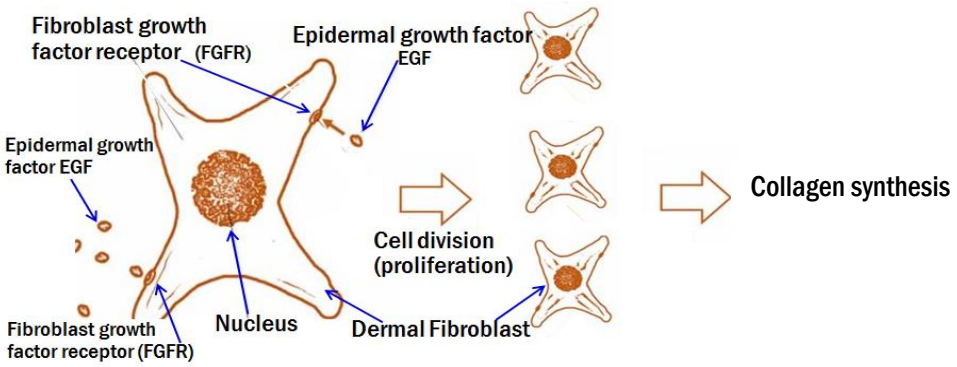
(1) รังนกมีสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนัง

การบริโภครังนก สามารถต้านริ้วรอย และชะลอความแก่ชราภาพนั้น เป็นความเชื่อที่มีมานานเป็นเวลาหลายร้อยปี จนกระทั่งปี 2530 มีรายงานการศึกษาทางวิทยาศาสตร์เป็นครั้งแรก เพื่อยืนยันสรรพคุณของรังนกที่สามารถต้านริ้วรอยและชะลอความแก่ โดยการศึกษาของ Kong et al. (1987) ได้รายงานเป็นครั้งแรกว่า สารสกัดรังนกที่สกัดด้วยน้ำร้อน มีสารชนิดหนึ่งเรียกว่า สารกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนัง (epidermal growth factor: EGF; ภาพที่ 2.4) สารกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนัง (EGF) ที่พวกเขาแยกได้จากรังนกนั้น มีคุณสมบัติกระตุ้นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA) ของเซลล์เพาะเลี้ยง 3T3 ไฟโปรบลาสท์ สรุปว่าสาร EGF กระตุ้นการแบ่งเซลล์ (cell division) และการเจริญเติบโต (proliferation) ของเซลล์ไฟโปรบลาสท์ (ภาพที่ 2.5) ซึ่งเซลล์ไฟโปรบลาสท์ทำหน้าที่สร้างคอลลาเจน และคอลลาเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญของโครงสร้างผิวหนัง ทำให้ผิวหนังเต่งตึงและมีความยืดหยุ่น เขาสรุปว่า สารกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนัง (EGF) ในรังนก สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อและการเจริญใหม่ของเนื้อเยื่อ (regeneration) นี่เป็นเหตุผลหนึ่งที่ Kong et al. (1987) สรุปว่ารังนกมีคุณสมบัติการชะลอความชราภาพ และคืนความอ่อนเยาว์ให้แก่เซลล์ผิวหนัง (Y. C. Kong et al., 1987) สำหรับการศึกษาปริมาณ EGF ของรังนก โดย Yang et al. (2014) รายงานว่าสาร EGF อยู่ในช่วง 3.27-3.78 mg/g โปรตีนรังนก (Yang et al., 2014) (ดังแสดงในตารางที่ 2.1) ในขณะที่ Hwang et al. (2020) รายงานว่า สาร EFG ในรังนกมีปริมาณ 31,823 และ 43,885 ng/mL สำหรับรังนกที่ได้จากเมืองจาวา และเมืองสุมาตรา/บันกา ตามลำดับ (Hwang et al., 2020) ต่อมาการศึกษาของ Guo et al. (2006) และ Yagi et al. (2008) ยืนยันว่า สารสกัดรังนกกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยการกระตุ้นการทำงานของเม็ดเลือดขาวโมโนไซต์ (monocytes) และสารสกัดรังนกกระตุ้นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA) ของเซลล์เพาะเลี้ยง 3T3 ไฟโบรบลาสท์ ซึ่งสนับสนุนรังนกมีคุณสมบัติต่อต้านความชราภาพของเซลล์ผิวหนัง (Guo et al., 2006; Yagi et al., 2008)



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างของสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของผิวหนัง

(A) โครงสร้างของสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของผิวหนัง (epidermal growth factor: EGF) และตัวรับสารกระตุ้นการเจริญเติบโต (epidermal growth factor receptor: EGFR) ของผิวหนัง และ (B) โครงสร้างของสายโปลิเปปไทด์ของสาร EGF



ภาพที่ 2.5 การเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสท์หลังจากสัมผัสกับสาร EGF

การเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสท์ เมื่อสาร EGF เข้าจับกับตัวรับการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสท์ (EGFR) แล้ว จะทำให้เกิดปฏิกิริยาที่ส่ง ผลในการเปิดการทำงานของยีนส์ในนิวเคลียส และจะกระตุ้นการตอบสนองของเซลล์ไฟโบรบลาสท์ เช่น การแบ่งเซลล์ หรือการเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสท์

สำหรับการศึกษากลไกการต้านความชราภาพของสารสกัดรังนก โดย Roh et al. (2012) ได้ศึกษาการเจริญเติบโต (proliferation) และการเพิ่มจำนวนเซลล์เพาะเลี้ยง hADSCs (human adipose-derived stem cell: hADSCs) ในหลอดทดลอง พบว่า สารสกัดรังนกสามารถกระกระตุ้นการสร้างสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของผิวหนัง (EGF) กระตุ้นการเจริญเติบโตของเส้นเลือดที่เนื้อเยื่อบุโพรง (vascular endothelial growth factor: VEGF) และสร้างสารไซโตไคน์ (cytokines) เช่น สารอินเตอร์ลิวคิน-6 (interleukin-6: IL-6) ซึ่งไซโตไคน์ดังกล่าว มีบทบาทสำคัญในกระบวนการสร้างเม็ด

เลือด การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และ ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ และการพัฒนาของเซลล์ (cell development) การต่อต้านความเสื่อมและความชราภาพของเซลล์ และรายงานว่า สารสกัดรังนกไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ปกติ ไม่กระตุ้นการเติบโตของเซลล์มะเร็ง (Roh et al., 2012)

(2) กรดเซียลิกออกฤทธิ์ชลอความชราภาพของเซลล์

คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของกรดเซียลิกในรังนก ส่งผลให้กรดเซียลิกมีคุณสมบัติชะลอความชราภาพของเซลล์ด้วย โดย Kim et al. (2012) ได้ศึกษากลไกระดับโมเลกุลของคุณสมบัติต่อต้านอนุมูลอิสระของรังนก โดยการศึกษากับเซลล์เพาะเลี้ยงคีราติโนไซต์ (human HaCaT keratinocytes) และรายงานว่า สารสกัดรังนก (โดยกรดเซียลิกในรังนก) สามารถดักจับและกลืนกินออกซิเจนที่ไวต่อการทำปฏิกิริยา และบรรเทาภาวะความเครียดออกซิเดชัน ลดความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และกำจัดความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงคีราติโนไซต์ (HaCaT) แสดงว่า สารสกัดรังนกมีคุณสมบัติต้านริ้วรอย ชะลอความชราภาพของเซลล์ คืนค่าความมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงคีราติโนไซต์ (HaCaT) ที่ได้รับความเสียหายจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Kim et al., 2012)

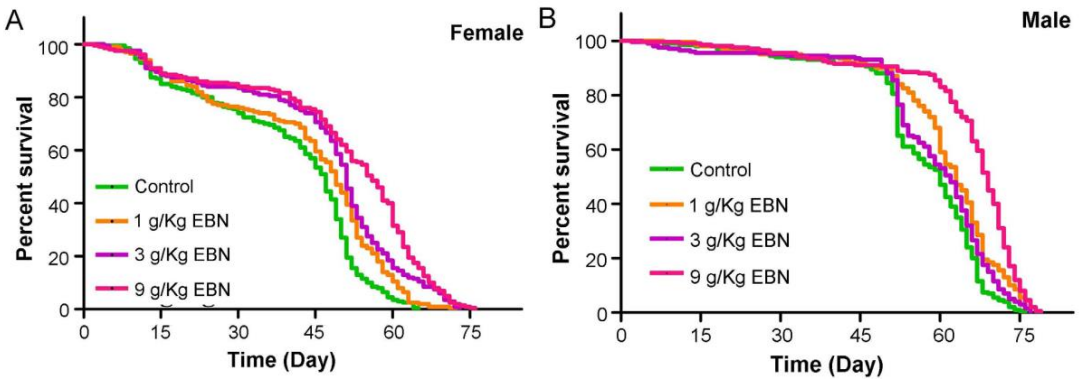
(3) แลคโตเฟอรินและโอโวทรานสเฟอร์รินต่อต้านความชราภาพของเซลล์

คุณสมบัติต่อต้านอนุมูลอิสระของแลคโตเฟอรินและโอโวทรานสเฟอร์รินในรังนก สามารถต้านความชราภาพของเซลล์นั้น Hou et al. (2015) ได้ศึกษากลไกคุณสมบัติต้านความชราภาพของรังนกในหลอดทดลอง รายงานว่า กระบวนการเมตาบอลิซึมต่าง ๆ ภายในร่างกาย จะมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เกิดขึ้น และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นภายในร่างกายของคน มีความเป็นพิษ ทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน และทำให้เซลล์เสื่อมสภาพและตายในที่สุด ในขณะที่สารสกัดรังนกมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ คือ แลคโตเฟอริน (LF) และโอโวทรานสเฟอร์ริน (OVF) ซึ่งมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ สามารถกำจัดพิษจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ โดย Hou et al. (2015) รายงานว่า แลคโตเฟอรินและโอโวทรานสเฟอร์รินในรังนก สามารถบรรเทาความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง (SH-SY5Y) และสามารถดักจับกลืนกินออกซิเจนที่ว่องไวต่อปฏิกิริยา (ROS) (Hou et al., 2015) เพื่อให้เข้าใจกลไกระดับโมเลกุลดีขึ้นของคุณสมบัติการต้านริ้วรอยและชะลอความชราภาพของสารสกัดรังนก การศึกษาในหลอดทดลองของ Kim et al. (2012) โดยการศึกษากับเซลล์เพาะเลี้ยงคีราติโนไซต์ (human HaCaT keratinocytes) ที่เติมสารสกัดรังนกและเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงไป พบว่า สารสกัดรังนกสามารถลดระดับของเอนไซม์เมทริกเมทัลโลโปรติเอส (MMP-1) โดยสารสกัดรังนกสามารถดักจับออกซิเจนที่ไวต่อการทำปฏิกิริยา และยับยั้งภาวะเครียดออกซิเดชัน นอกจากนั้น สารสกัดรังนกยัง

สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน MMP-1 mRNA ที่ถูกชักนำจากความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Kim et al., 2012)

2.6.5 รังนกมีคุณสมบัติต่อต้านอนุมูลอิสระ การบริโภครังนกสามารถเพิ่มอายุขัย

ปี 2557 องค์การอนามัยโลก (WHO) ได้รายงานว่า อายุขัยเฉลี่ยของประชากรโลกคือ 66.26 ปี สำหรับเพศชายมีอายุขัยเฉลี่ย 64.30 ปี และ มีอายุขัยเฉลี่ย 68.35 ปี สำหรับเพศหญิง ผลการศึกษาประสิทธิภาพของรังนกต่อการเพิ่มอัตราการรอดชีวิต และการขยายอายุขัย (increases lifespan) โดย Hu et al. (2016) ได้ศึกษาผลของการบริโภครังนกต่อประสิทธิภาพการต้านริ้วรอยและการชะลอความชรา การเพิ่มอายุขัย รวมทั้งอัตรารอดชีวิตและอัตราการตายของแมลงวันผลไม้ (*Drosophila melanogaster*; ภาพที่ 2.6) โดยการทดสอบในสภาวะเครียดจากความร้อน (Hu et al., 2016)



ภาพที่ 2.6 อัตราการตายของแมลงวันผลไม้

Hu et al. (2016) รายงานว่า แมลงวันผลไม้ (*Drosophila melanogaster*) ที่ได้รับรังนกความเข้มข้นต่าง ๆ มีอัตราการตายลดลง มีอัตรารอดชีวิตสูงขึ้น และมีช่วงอายุขัยเพิ่มขึ้น (แสดงโดยเส้นกราฟ สีส้ม สีม่วง สีชมพู) เมื่อเทียบกับกลุ่มทดลองที่ไม่ได้รับรังนก (แสดงด้วยเส้นกราฟสีเขียว) แสดงว่า คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของรังนกสามารถชะลอกระบวนการชราภาพและเพิ่มอายุขัยของแมลงวันผลไม้ (Hu et al., 2016)

พบว่า แมลงวันกลุ่มทดลองที่ได้รับรังนก แสดงอัตราการตายลดลง และอัตรารอดชีวิตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัย สำคัญ และมีค่ามัธยฐานของอายุขัยเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มควบคุม ความดกของไข่ในกลุ่มที่ได้รับรังนกเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่า รังนกสามารถยืดอายุขัยของแมลงวัน ลดอัตราการตาย และเพิ่มอัตราการรอดชีวิต และสรุปว่า การบริโภครังนกสามารถชะลอความแก่ และเพิ่มอายุขัยของแมลงวันผลไม้ ซึ่งเป็นผลมาจากคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของรังนก

2.6.6 กรดเซียลิกและแลคโตเฟอรินในรังนกมีคุณสมบัติต้านไวรัสไข้หวัดใหญ่

การบริโภครังนกเป็นยาต้านไวรัสและยับยั้งเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่

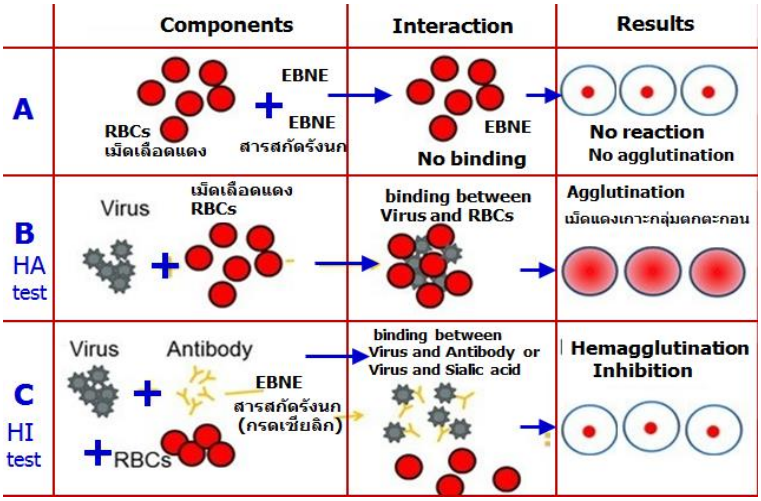
มีรายงานว่า สารสกัดรังนกมีคุณสมบัติต้านไวรัสไข้หวัดใหญ่ การบริโภครังนกสามารถใช้เป็นยาเสริมหรือใช้ทดแทนยาต้านไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้ โดยสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรังนกที่มีคุณสมบัติต้านไวรัสไข้หวัดใหญ่ และยับยั้งเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในรังนก คือ (1) กรดเซียลิก (Aminuddin et al., 2016; Guo et al., 2006; Howe et al., 1961) และ (2) แลคโตเฟอรินในรังนก (Akmal et al., 2017)

(1) กรดเซียลิกในรังนก ยับยั้งปฏิกิริยาฮีแมกกลูติเนชันของไวรัสไข้หวัดใหญ่

การศึกษาเกี่ยวกับกรดเซียลิกในรังนก เริ่มตั้งแต่ปี 2504 เมื่อ Howe et al. (1961) ได้ศึกษาวิธีการสกัดสารไกลโคโปรตีนของรังนก จากนั้นได้แยกกรดเซียลิกออกจากสารสกัดไกลโคโปรตีนได้เป็นคณะแรก และรายงานว่า กรดเซียลิกในรังนกสามารถยับยั้งเชื้อไวรัสกลุ่มไข้หวัดใหญ่ได้ โดยออกฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาฮีแมกกลูติเนชันของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงในหลอดทดลอง (Howe et al., 1961) ต่อมามีการศึกษาโดย Biddle & Belyavin (1963) ยืนยันว่ากรดเซียลิกในรังนกสามารถยับยั้งปฏิกิริยาฮีแมกกลูติเนชั่นของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง (Biddle & Belyavin, 1963) สำหรับการศึกษาของ Pozsgay et al. (1987) เป็นคณะแรกที่ได้สรุปว่า กรดเซียลิกหรือกรดไซอะลิก ที่แยกมาได้จากไกลโคโปรตีนรังนก เป็นสารตัวเดียวกับกรดเอ็น-อะเซทิลนิวรามินิก (*N*-acetylneuraminic acid: NANA) (Pozsgay et al., 1987) นอกจากนี้ ยังการศึกษาอื่น ๆ ที่สนับสนุนว่า สารสกัดรังนกสามารถยับยั้งปฏิกิริยาฮีแมกกลูติเนชั่นของไวรัสไข้หวัดใหญ่ต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ (Guo et al., 2006; Haghani et al., 2016; Yagi et al., 2008) โดยสรุปว่า สารสำคัญในรังนกที่ออกฤทธิ์จับกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่คือ กรดเซียลิก ซึ่งอยู่ในไกลโคโปรตีนรังนกนั่นเอง ผลการศึกษาทั้งหมดสรุปได้ว่า รังนกเป็นแหล่งอาหารจากธรรมชาติที่ปลอดภัย สำหรับการบริโภคเพื่อต้านการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้

กรดเซียลิกในรังนกเป็นตัวรับฮีแมกกลูตินินของไวรัส สารฮีแมกกลูตินิน (hemagglutinin: HA) เป็นไกลโคโปรตีนของเชื้อไวรัส ฮีแมกกลูตินิน (HA) อยู่ที่บริเวณเปลือกหุ้มชั้นนอกของอนุภาคไวรัสและฮีแมกกลูตินินของไวรัสทำหน้าที่จับกับกรดเซียลิกซึ่งเป็นตัวรับ (viral receptor) บนผิวเซลล์ของเจ้าบ้านหรือโฮสต์ (host) มีการศึกษาว่า กรดเซียลิกหรือกรดไซอะลิก ซึ่งเป็นองค์ประกอบของไกลโคโปรตีนรังนก สามารถจับกับฮีแมกกลูตินินของไวรัสได้เหมือนกัน ดังนั้น กรดเซียลิกในรังนกจึงทำหน้าที่เป็นตัวรับไวรัสได้เช่นเดียวกัน (Howe et al., 1961; Pozsgay et al., 1987; Wieruszeski et al., 1987)

ปฏิกิริยาฮีแมกกลูติเนชันและปฏิกิริยายับยั้งฮีแมกกลูติเนชัน สำหรับการศึกษาปฏิกิริยาระหว่างเชื้อไวรัสทั่วไปกับเซลล์เม็ดเลือดแดง มี 2 ปฏิกิริยา คือ ปฏิกิริยาฮีแมกกลูติเนชัน (hemagglutination: HA) และปฏิกิริยายับยั้งฮีแมกกลูติเนชัน (hemagglutination inhibition: HI) ดังแสดงในภาพที่ 2.7



ภาพที่ 2.7 ปฏิกิริยาฮีแมกกลูติเนชัน (HA-test) และปฏิกิริยายับยั้งฮีแมกกลูติเนชัน (HI-test)
แถว A ใช้สำหรับทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดรังนกต่อเม็ดเลือดแดง ถ้าไม่มีการจับกลุ่มตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง แสดงว่าสารสกัดรังนกไม่เป็นพิษต่อเซลล์; แถว B เป็นปฏิกิริยาฮีแมกกลูติเนชัน (HA test) ถ้าพบว่าเชื้อไวรัสสามารถจับกับเซลล์เม็ดเลือดแดงแล้ว ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มตกตะกอน แสดงว่าเชื้อไวรัสเป็นพิษต่อเซลล์; แถว C เป็นปฏิกิริยายับยั้งฮีแมกกลูติเนชัน (HI test) แสดงให้เห็นว่า แอนติบอดีและสารสกัดรังนก (โดยกรดเชียลิก) สามารถจับกับเชื้อไวรัสอย่างเฉพาะเจาะจง ทำให้เชื้อไวรัสรวมกลุ่มตกตะกอนและไม่สามารถออกฤทธิ์ต่อเซลล์ ในขณะที่เซลล์เม็ดเลือดแดงไม่ตกตะกอน อาจเรียกว่าเป็น ปฏิกิริยาทำให้เชื้อไวรัสเป็นกลาง (neutralization test)

โดยปฏิกิริยาฮีแมกกลูติเนชัน (HA test) เป็นปฏิกิริยาการจับกันอย่างจำเพาะระหว่างเชื้อไวรัสกับตัวรับไวรัสบนผิวของเม็ดเลือดแดง ทำให้เกิดการจับกลุ่มตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง (agglutination) ปฏิกิริยาฮีแมกกลูติเนชัน (HA test) เป็นปฏิกิริยาที่ใช้ทดสอบเพื่อแสดงว่าเชื้อไวรัสเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงหรือไม่ ส่วนปฏิกิริยายับยั้งฮีแมกกลูติเนชัน (HI test) เป็นปฏิกิริยาที่มีสารไปยับยั้งเชื้อไวรัสไม่ให้จับกับเม็ดเลือดแดง จึงไม่เกิดการจับกลุ่มตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง ปฏิกิริยายับยั้งฮีแมกกลูติเนชัน (HI test) เป็นปฏิกิริยาใช้ทดสอบว่า สารใด ๆ สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสได้หรือไม่ โดยสารที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสได้ อาจจะเป็นยาต้านไวรัส หรือแอนติบอดี และมีการศึกษาว่ากรดเชียลิกรังนก เป็นสารยับยั้งปฏิกิริยาฮีแมกกลูติเนชันของไวรัสกับเม็ดเลือดแดงได้เหมือนกัน (Biddle & Belyavin, 1963; Guo et al., 2006; Howe et al., 1961)

(2) แลคโตเฟอรินในรังนกมีคุณสมบัติต่อต้านไวรัส

การศึกษาที่ผ่านมาพบว่า สารสกัดรังนกมีคุณสมบัติต้านไวรัสไข้หวัดใหญ่ โดยมีกรดเซียลิกเป็นตัวรับหรือเป็นตัวจับกับไวรัส แล้วทำให้เชื้อไวรัสตกตะกอน นอกจากนี้ Akmal et al. (2017) รายงานว่า แลคโตเฟอรินซึ่งพบได้ในรังนก มีคุณสมบัติต้านเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้ โดยกลไกการยับยั้งเชื้อไวรัสของแลคโตเฟอริน คือ แลคโตเฟอรินสามารถเพิ่มการดูดซึมธาตุเหล็ก ทำให้เชื้อไวรัสขาดแคลนธาตุเหล็กจนไม่อาจเจริญเติบโตได้ต่อไป นอกจากนี้ แลคโตเฟอรินยังทำหน้าที่ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา ต้านการอักเสบ และต้านการลุกลามของเซลล์มะเร็งได้เช่นเดียวกัน (Akmal et al., 2017)

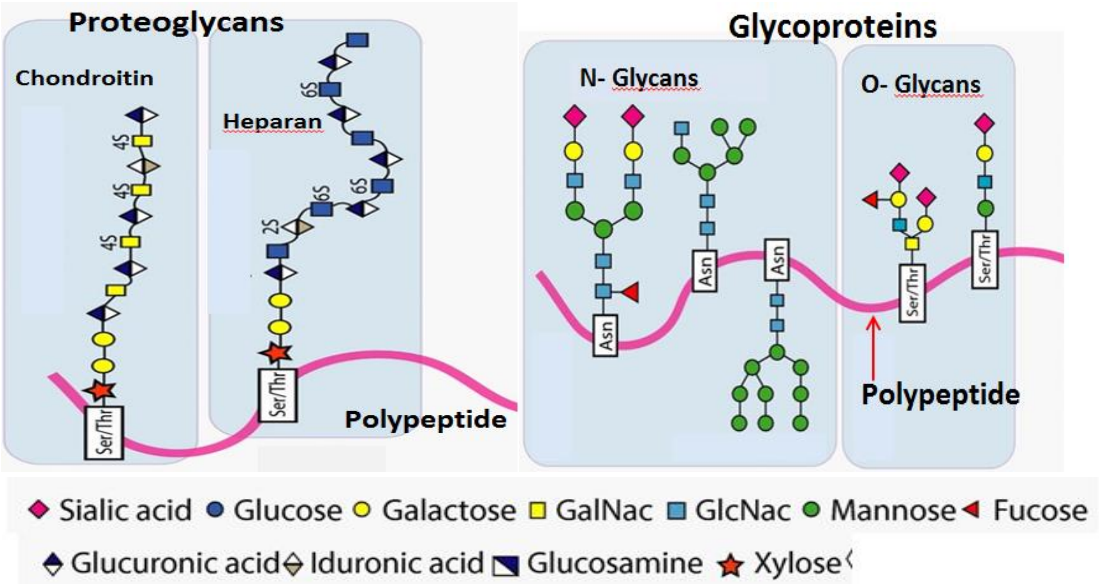
รังนกต้านอะพอพโทซิสที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส การติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ทำให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส โดย Nur et al. (2016a) รายงานการศึกษาผลของรังนกต่อการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (H1N1) ที่กระทำต่อเซลล์เพาะเลี้ยง MDCK (Madin darby canine kidney) รายงานว่า เซลล์เพาะเลี้ยงที่เติมสารสกัดรังนก พบว่า ความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) มีค่าสูงกว่าเซลล์เพาะเลี้ยงที่ไม่เติมสารสกัดรังนกอย่างชัดเจน การศึกษายืนยันโดย Nur et al. (2016b) และ Nur et al. (2017) แสดงให้เห็นว่า สารสกัดรังนกเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ และสามารถยับยั้งการตายแบบอะพอพโทซิส โดยมีขั้นตอนการออกฤทธิ์ยับยั้งการตายแบบอะพอพโทซิสดังนี้ (1) ป้องกันและยับยั้งการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์เพาะเลี้ยง นับตั้งแต่เซลล์เพาะเลี้ยงเริ่มติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (2) สารสกัดรังนกสามารถลดการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ติดเชื้อไวรัสแล้วได้อย่างมีนัยสำคัญ (3) ภายหลังที่เซลล์เพาะเลี้ยงถูกทำให้ติดเชื้อไวรัสแล้ว เติมสารสกัดรังนกลงไปรักษา พบว่า สารสกัดรังนกสามารถเพิ่มการชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง (improving cell viability) ได้อย่างมีนัยสำคัญ การศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดรังนกต่อการต้านเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่โดยศึกษากับเซลล์เพาะเลี้ยง MDCK ในหลอดทดลองของ Haghani et al. (2016) และ Haghani et al. (2017) ได้สรุปผลว่า (1) สารสกัดรังนกที่ทำการสกัดด้วยเอนไซม์ มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (2) พบว่าสารสกัดรังนกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ เทียบเท่ากับยาต้านไวรัสที่มีในท้องตลาด เช่น อะมานทาดีน และโอเซลทามิเวียร์ แต่กลไกในการต่อต้านเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ไม่เหมือนกัน (3) กรดเซียลิกหรือกรดไซอะลิกเป็นตัวรับหรือจับไวรัส (viral receptor) การศึกษาวิจัยนี้สรุปว่า การบริโภครังนกเป็นทั้งยาป้องกันโรคและรักษาโรคที่มีศักยภาพ สามารถใช้เป็นยาเสริมหรือใช้ทดแทนยาต้านไวรัส ในการยับยั้งเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้

สารสกัดรังนกต้านการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดนกและไวรัสโคโรนาของสัตว์ การศึกษาผลของสารสกัดรังนกต่อการต้านไวรัสไข้หวัดนก (H5N1) โดย Nuradji et al. (2018) ได้ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดรังนกต่อการยับยั้งปฏิกิริยาฮีแมกกลูติเนชันของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกต่อเม็ดเลือดแดงในหลอดทดลอง ได้รายงานว่า คุณสมบัติต้านไวรัสไข้หวัดนกมีความสัมพันธ์กับกรดเซียลิกที่อยู่ในรังนก เช่นเดียวกับการศึกษาอื่นที่ผ่านมา ดังนั้นสรุปว่า สารสกัดรังนกสามารถใช้เป็นทางเลือกในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (H1N1) และการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดนก (H5N1) โดยการออกฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาฮีแมกกลูติเนชันของไวรัสต่อเม็ดเลือดแดง นอกจากนี้ Derwin et al. (2012) ศึกษาเบื้องต้นและรายงานว่า สารสกัดรังนกมีคุณสมบัติต่อต้านเชื้อไวรัสโคโรนาของสัตว์ (animal coronavirus) ในหลอดทดลองได้ด้วย ได้แก่ ไวรัสเยื่อบุช่องท้องอักเสบติดเชื้อในแมว (feline infectious peritonitis virus: FIPV)

2.6.7 ในรังนกมีสารคอนดรอยทินโปรตีโอไกลแคนที่ไม่มีซัลเฟต

การบริโภครังนกเสริมสร้างกระดูกแข็งแรง รักษาโรคข้อเข่าเสื่อม

รังนกประกอบด้วยโปรตีโอไกลแคน (proteoglycans: PG) คือ คอนดรอยทิน ไกลโคสะมิโนไกลแคนที่ไม่มีซัลเฟต (non-sulfated chondroitin glycosaminoglycan) จากการศึกษาของ Nakagawa et al. (2007) ซึ่งศึกษาสารสกัดรังนกที่ทำการสกัดด้วยน้ำร้อน พบว่า สารสกัดรังนกด้วยน้ำที่เตรียมได้ ประกอบด้วยโปรตีโอไกลแคนชนิดหนึ่งคือ คอนดรอยทิน ไกลโคสะมิโนไกลแคนที่ไม่มีซัลเฟต และรายงานว่า ในรังนกมีสารคอนดรอยทิน ไกลโคสะมิโนไกลแคนที่ไม่มีซัลเฟต 2 mg/g (Nakagawa et al., 2007) ต่อมา Chua et al. (2013) รายงานว่า สารดังกล่าวมีคุณสมบัติคล้ายกับเมทริกซ์กระดูกอ่อน (cartilage matrix) และสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโต (proliferation) ของเซลล์ข้อต่อของกระดูกอ่อนของมนุษย์ (articular chondrocytes) สรุปว่า การบริโภครังนกได้ประโยชน์คือ (1) เสริมสร้างกระดูกให้แข็งแรง และ (2) สามารถป้องกันและรักษาโรคข้อเสื่อม นอกจากนี้ยังกระตุ้นการสร้างเซลล์กระดูกอ่อนขึ้นมาใหม่ (K.-H. Chua et al., 2013) ภาพที่ 2.8 แสดงโครงสร้างทั่วไปของโปรตีโอไกลแคนเปรียบเทียบกับไกลโคโปรตีน



ภาพที่ 2.8 โครงสร้างทั่วไปของโปรตีโอไกลแคนเปรียบเทียบกับไกลโคโปรตีน

โครงสร้างของโปรตีโอไกลแคนที่มีคาร์โบไฮเดรตเชื่อมโยงกับสายโปรตีน โดยมีสายโปรตีนเป็นแกน และคาร์โบไฮเดรตที่อยู่ในโปรตีโอไกลแคนเรียกว่า ไกลโคสะมิโนไกลแคน ซึ่งประกอบด้วยกาแล็กโทซามีนเชื่อมโยงกับกรดกลูคูโรนิกโปรตีโอไกลแคน เป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน ที่เรียกว่า “เมทริกซ์” (extracellular matrix)

(1) การบริโภครังนกเสริมสร้างกระดูกให้แข็งแรง

การศึกษาในหนูเพศเมียที่ถูกตัดรังไข่ (*in vivo*) โดย Matsukawa et al. (2011) การศึกษาให้หนูเพศเมียถูกตัดรังไข่และให้กินสารสกัดรังนกติดต่อเป็นเวลา 10 สัปดาห์ ผลการศึกษาพบว่า กระดูกโคนขาของหนูเพศเมียถูกตัดรังไข่และกินสารสกัดรังนก มีปริมาณแคลเซียม ฟอสฟอรัส ไฮดรอกซีโพรลีน และมวลกระดูกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ความหนาเฉลี่ยของเส้นใยคอลลาเจนที่บริเวณผิวหนังของหนูเพศเมียถูกตัดรังไข่และกินสารสกัดรังนก มีความหนาขึ้นชัดเจน ผลศึกษานี้แสดงว่า ศักยภาพของสารสกัดรังนกนอกจากสามารถลดการสูญเสียมวลกระดูกแล้ว ยังสามารถเพิ่มปริมาณแคลเซียม ฟอสฟอรัส และเพิ่มมวลกระดูก ได้อย่างมีประสิทธิภาพ รังนกเสริมสร้างกระดูกให้มีความแข็งแกร่งขึ้น นอกจากนี้ สารสกัดรังนกยังทำให้เส้นใยคอลลาเจนที่ผิวหนังเพิ่มขึ้นและหนาขึ้น สามารถลบริ้วรอยย่นได้ สรุปว่า การบริโภครังนกได้รับประโยชน์สำหรับสตรีวัยหมดประจำเดือน จะทำให้กระดูกมีความแข็งแกร่ง และลบริ้วรอยย่นของผิวหนัง ชะลอความแก่ และอาจเป็นประโยชน์ในการลดความเสี่ยงการโรคกระดูกพรุนที่เกิดได้บ่อยในสตรีวัยหมดประจำเดือน

(2) รังนกป้องกันและรักษาโรคข้อเสื่อมและกระตุ้นการสร้างเซลล์กระดูกอ่อนใหม่

Chua et al. (2013) ศึกษาผลของสารสกัดรังนกต่อเซลล์เพาะเลี้ยงข้อต่อกระดูกอ่อนของคน (human articular chondrocytes: HACs) ซึ่งแยกได้จากข้อต่อหัวเข่าของคนไข้ที่เป็นโรคข้อเข่าเสื่อม ผลการศึกษาแสดงว่า สารสกัดรังนกสามารถยับยั้งการลุกลามของโรคข้อเข่าเสื่อมและ ส่งเสริมการงอกใหม่ของเซลล์กระดูกอ่อน โดยเพิ่มการสังเคราะห์เมทริกซ์ของเซลล์กระดูกอ่อน ได้สรุปว่า รังนกเป็นยาที่มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อม และรักษาการอักเสบของข้อเข่าที่เกิดจากการเสื่อมของข้อต่อกระดูกอ่อน และจากการศึกษาในหนูตัวเมียตัดรังไข่ (*in vivo*) โดย Hou ZP. et al. (2019) เพื่อศึกษากลไกการบริโภครังนกสามารถบรรเทาของการเสื่อมของกระดูก การทดลองให้หนูตัวเมียถูกตัดรังไข่และให้กินรังนกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ผลการศึกษาพบว่า หนูตัวเมียที่ถูกตัดรังไข่ที่ได้รับรังนก มีระดับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกระดูก คือ ออสติโอแคลซิน (osteocalcin) และออสติโอโปรทีเจอริน (osteoprotegerin) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ระดับแคลเซียม แมกนีเซียม และสังกะสีเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ความหนาแน่นของมวลกระดูกก็เพิ่มขึ้น สรุปว่า การบริโภครังนก สามารถเป็นการรักษาทางเลือกที่ปลอดภัย ในการบำบัด และ ทดแทนฮอร์โมนในสตรีวัยหมดประจำเดือน เช่น โรคเสื่อมของกระดูก เป็นต้น

2.6.8 ฮอร์โมนเพศในรังนก

การบริโภครังนกเสริมสร้างสมรรถภาพทางเพศ

ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้หันมาสนใจเรื่อง ฮอร์โมนเพศในรังนกมากขึ้น จากการศึกษาพบว่า ในรังนกมีฮอร์โมนเพศ ทั้งฮอร์โมนเพศชายและฮอร์โมนเพศหญิง แม้ว่ามีปริมาณน้อยมาก แต่ก็สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ การศึกษาฮอร์โมนในรังนกโดย Ma. F. & Liu D. (2012) รายงานว่า พบฮอร์โมน 6 ชนิด ในรังนก คือ ฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน (testosterone) ปริมาณ 4.293-12.148 ng/g ฮอร์โมนเอสตราไดออล (estradiol: E2) ปริมาณ 802.333-906.086 pg/g ฮอร์โมนโพรเจสเตอโรน (progesterone) ปริมาณ 24.966-37.724 ng/g ฮอร์โมนลูไทไนซิ่ง (luteinizing hormone: LH) ปริมาณ 1.42-11.16 mIU/g ฮอร์โมนฟอลลิเคิลสติมิวเลติง (follicle-stimulating hormone) ปริมาณ 0-0.149 mIU/g และฮอร์โมนโพรแลคติน (prolactin) ปริมาณ 0-0.392 ng/g

(1) การบริโภครังนกเสริมสร้างสมรรถภาพทางเพศ

การศึกษาในหนูเพศผู้ที่ทำหมัน (*in vivo*) โดย Ma FC et al. (2012) รายงานผลของรังนกต่อหน้าที่การทำงานทางเพศของรังนกในหนูเพศผู้ทำหมัน โดยให้หนูทดลองเพศผู้ทำหมันกินรังนกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 10 วัน ผลการศึกษาพบว่า รังนกสามารถกระตุ้นการสร้างฮอร์โมนขึ้นใหม่ในหนู

ทำหมันที่กินรังนก โดยพบว่า ค่าดัชนีองคชาตและค่าดัชนีต่อมลูกหมากและถุงสร้างน้ำเลี้ยงอสุจิเพิ่มขึ้น รังนกสามารถกระตุ้นให้หนูทำหมันกินรังนก สามารถหลั่งฮอร์โมนเพศ คือ ฮอร์โมนเทสโทสเทอโรน และฮอร์โมนลูไทไนซิงในระดับที่สูงกว่าหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ผลการศึกษาสรุปว่า รังนกสามารถเสริมสร้างหน้าที่การทำงานทางเพศของหนูเพศผู้ที่ทำหมันได้ โดยกระตุ้นการสร้างฮอร์โมนเทสโทสเทอโรน และแนะนำว่าการบริโภครังนก อาจเป็นจะเป็นยาที่มีประสิทธิภาพ สำหรับใช้รักษาอาการหย่อนสมรรถภาพทางเพศ (erectile dysfunction: ED)

(2) ผลของการกินรังนกในหนูเพศเมียที่ตัดรังไข่

การศึกษาฮอร์โมนในหนูตัวเมียที่ตัดรังไข่ (*in vivo*) เป็นตัวแทนของสตรีวัยหมดประจำเดือน การศึกษาของ Hou et al. (2015b) ให้หนูตัวเมียที่ตัดรังไข่กินรังนกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ รายงานว่า หนูตัวเมียตัดรังไข่ที่กินรังนก พบว่า คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของรังนกและเอสโตรเจน (estrogen) เพิ่มขึ้น อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงสรุปว่า การบริโภครังนกลดความเสี่ยงต่อการขาดฮอร์โมนเอสโตรเจนที่เกี่ยวข้องกับโรคหัวใจ และโรคหลอดเลือดหัวใจ (cardiometabolic diseases) ในสตรีวัยหมดประจำเดือน การศึกษาในหนูเพศเมียของ Hou et al. (2015a) โดยให้หนูเพศเมียรับประทานรังนกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ผลการศึกษาในหนูเพศเมียกลุ่มกินอาหารผสมรังนก พบว่า มดลูกมีน้ำหนักและความยาวเพิ่มขึ้น แสดงว่ามีการเพิ่มจำนวนเซลล์ของมดลูก (proliferation) นอกจากนี้พบว่า คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น และพบว่าภาวะเครียดออกซิเดชันลดลง และการศึกษาทำนองเดียวกันของ Hou et al. (2015b) ได้รายงานว่า หนูเพศเมียกลุ่มกินอาหารผสมรังนก พบว่า รังนกสามารถกระตุ้นการทำงานของมดลูก และระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในระบบสืบพันธุ์ในหนูเพศเมียที่กินรังนกเพิ่ม

การศึกษาในหนูเพศเมียที่ถูกตัดรังไข่ โดย Hou et al. (2019) ศึกษาฮอร์โมนหนูเพศเมียที่ถูกตัดรังไข่กินอาหารปกติและกินอาหารผสมรังนก เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า ระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนของหนูเพศเมียตัดรังไข่กินอาหารปกติมีค่าลดลง ในขณะที่ระดับเอสโตรเจนของหนูตัวเมียตัดรังไข่และได้รับรังนกมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ สรุปว่า ระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนที่เพิ่มขึ้นในหนูเพศเมียตัดรังไข่และได้รับรังนก เป็นเอสโตรเจนที่ได้มาจากรังนก ไม่ใช่เอสโตรเจนสังเคราะห์จากรังไข่ และเอสโตรเจนจากรังนกยังแสดงให้เห็นว่าสามารถทำงานออกฤทธิ์ได้เช่นเดียวกับเอสโตรเจนที่สร้างจากรังไข่ ดังนั้นสรุปว่า รังนกสามารถใช้เป็นอาหารเสริมทางเลือกที่ปลอดภัยในการบำบัดทดแทนฮอร์โมน เพื่อจัดการภาวะแทรกซ้อนในสตรีวัยหมดประจำเดือน

2.6.9 สารสกัดรังนกออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซิน-คอนเวอร์ติง (ACE) การบริโภครังนกลดความดันในหลอดเลือด

จากรายงานการศึกษาของ Nurfatin et al. (2016) พบว่า สารสกัดรังนกออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซิน-คอนเวอร์ติง (angiotensin-converting enzyme: ACE) สารสกัดรังนกจึงมีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งเอซีอี หรือ เอซีอีไอ (ACE inhibitors: ACEI) เอซีอีไอ (ACEI) เป็นกลุ่มยาใช้รักษาโรคความดันโลหิตสูง (hypertension) และหัวใจล้มเหลวแบบเลือดคั่ง (congestive heart failure) ยากลุ่มนี้ ได้แก่ ยาอินาลาพริล (enalapril) และยาแคปโตพริล (captopril) เป็นต้น ยากลุ่มนี้ถูกนำมาใช้รักษาโรคความดันโลหิตสูง โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เอซีอี (ACE) แต่ตัวยามีผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ เช่น อาการไอ อาการแพ้ และเกิดผื่นที่ผิวหนัง จากการศึกษาของ Nurfatin et al. (2016) รายงานว่า ไกลโคเปปไทด์รังนกที่เตรียมได้จากการไฮโดรไลซ์รังนกด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (alcalase) เป็นสารยับยั้งเอซีอี (เอซีอีไอ-ACEI) ที่มีศักยภาพ ดังนั้น สารสกัดรังนกจึงใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพเพื่อลดความดันในหลอดเลือดได้ การพัฒนาสารยับยั้งเอซีอี ที่เป็นธรรมชาติและปลอดภัย สำหรับใช้เป็นตัวยารักษาความดันโลหิตสูงของคนในอนาคต โดย Babji et al.(2018) ได้ทำการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และเป็นสารยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซิน-คอนเวอร์ติง (ACE) ที่มีอยู่ในรังนก โดยใช้กระบวนการไฮโดรไลซิสรังนกด้วยเอนไซม์ รายงานว่า ไกลโคเปปไทด์หรือไฮโดรไลเสตสารสกัดรังนกเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ และสารยับยั้งเอซีอี ผลการศึกษา Babji et al. (2018) ได้สรุปว่าไกลโคเปปไทด์ของสารสกัดรังนก สามารถใช้แทนยาสังเคราะห์เพื่อยับยั้งเอนไซม์เอซีอี (ACEI) ได้

2.7 ผลิตภัณฑ์อาหารรังนกและเครื่องดื่มรังนก

Daud et al. (2019) รายงานว่า ในปัจจุบันผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปที่เกี่ยวข้องกับรังนกได้เกิดขึ้นเป็นจำนวนมากและมีความหลากหลาย ทั้งนี้เกิดจากความรู้ความเข้าใจเรื่องสารสกัดรังนกและความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีด้านอาหาร รังนกถูกนำไปใช้เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์อาหาร และทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารธรรมดากลายเป็นอาหารเสริมสุขภาพ อาหารฟังก์ชัน (functional foods) และอาหารบำรุงกำลัง (tonic foods) เป็นต้น หลายปีที่ผ่านมา มีการประยุกต์ใช้รังนกที่ต้มสุกแล้ว นำไปผสมในผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ เพื่อปรับปรุงความหลากหลาย คุณภาพ รสชาติ และส่งผลให้ผลิตภัณฑ์อาหารดังกล่าวมีมูลค่าเพิ่มขึ้น เช่น เครื่องดื่มต่าง ๆ โยเกิร์ต ไอศครีม บะหมี่ และช็อคโกแลต เป็นต้น จากการศึกษาของ Babji et al. (2014) นำไกลโคเปปไทด์รังนกไปผสมในเครื่องดื่มเพื่อพัฒนาคุณภาพและเพิ่มมูลค่า โดยรายงานว่า เครื่องดื่มที่ผสมไกลโคเปปไทด์รังนก ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับเครื่องดื่มที่

ไม่ได้ผสมรังนก และการศึกษาของ Khan et al.(2014) โดยการนำรังนกที่ต้มด้วยความร้อนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ไปผสมในเครื่องดื่มน้ำกระเจี๊ยบแดง พบว่า เครื่องดื่มน้ำกระเจี๊ยบที่เติมรังนกต้มสุก สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซิน-คอนเวอร์ติง (angiotensin-converting enzyme: ACE) ได้สูงกว่าเครื่องดื่มน้ำกระเจี๊ยบแดงที่ไม่ได้เติมรังนก การศึกษาแสดงให้เห็นว่า การนำไกลโคเปปไทด์รังนกไปผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม เป็นการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการและเสริมสุขภาพสำหรับผู้บริโภค

2.8 ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางรังนก เวชสำอางรังนก และโภชนเภสัชภัณฑ์

Daud et al. (2019) รายงานว่า ในปัจจุบันผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับสารสกัดรังนก ได้เกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก และมีความหลากหลาย เป็นผลจากความก้าวหน้าของการศึกษาวิจัยเรื่องสารสกัดรังนกและเกี่ยวกับเทคโนโลยีการผลิตเครื่องสำอาง และเวชสำอาง (cosmeceutical products) และผลิตภัณฑ์รังนกนับเป็นผลิตภัณฑ์บำรุงสุขภาพ และเสริมความงามพร้อม ๆ กัน (healthy/beauty) หรืออาจกล่าวว่า ผลิตภัณฑ์รังนกเป็นโภชนเภสัชภัณฑ์ (nutraceutical products) คือเป็นทั้งผลิตภัณฑ์อาหาร เวชสำอาง และเป็นผลิตภัณฑ์ยา (pharmaceutical products) ไปพร้อม ๆ กัน ปัจจุบันนี้ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางรังนกที่มีจำหน่ายในท้องตลาด ได้แก่ เซรั่มรังนก ครีมรังนก โลชั่นรังนก สบู่รังนก เป็นต้น ซึ่งประกาศสรรพคุณต่าง ๆ ดังนี้ สามารถปกป้องและบำรุงผิวพรรณ ป้องกันผิวหนังจากแสงแดด จ้าและมลภาวะ (อ้างอิงคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของรังนก) สามารถต้านริ้วรอย ลบรอยย่นบนผิวหนัง ทำให้ผิวหนังยืดหยุ่น ผิวกระชับเต่งตึง กระตุ้นการสร้างเซลล์ผิวหนังใหม่ กระตุ้นการสร้างคอลลาเจน ทำให้ดูอ่อนเยาว์ และชะลอวัย (อ้างอิงคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและ สารกระตุ้นการเจริญเติบโตของผิวหนังหรือ EGF ของรังนก) เครื่องสำอางรังนกบำรุงผิวให้กระจ่างใส และยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินจุดด่างดำ โดยอ้างอิงว่า สารสกัดรังนกเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase inhibitor) ซึ่งเอนไซม์ไทโรซิเนส เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สร้างเม็ดสีของผิวหนัง (melanin) ซึ่งตามการศึกษาของ Chan et al. (2015) รายงานว่า สารสำคัญของรังนก ที่ทำหน้าที่ช่วยให้ผิวกระจ่างใส คือ กรดเซียลิก (NANA) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ครีมรังนกยังมีคุณสมบัติช่วยสมานแผล (wound healing) โดยการศึกษาของ Zainal Abidin et al. (2010) รายงานว่า สารสกัดรังนกกระตุ้นการเจริญเติบโต (proliferation) ของเซลล์เพาะเลี้ยงคีราโทไซต์ (keratocytes) ของกระจกตาในหนูทดลอง แสดงให้เห็นว่า เซรั่มรังนกเป็นยาสมานแผลภายในกระจกตาที่มีประสิทธิภาพและปลอดภัย ต่อมา Ofiwijayanti et al. (2017) รายงานว่า การแตกของบาดแผลฝีเย็บเกิดขึ้นบ่อยมากกับมารดาที่คลอดลูก และการแตกของฝีเย็บมีความเสี่ยงที่จะติดเชื้อได้ จึงทำการศึกษาผลของครีมสารสกัด

รังนกต่อการรักษาแผลฝีเย็บในหนูทดลอง พบว่าครีมสารสกัดรังนก 70% มีประสิทธิภาพสมานแผลได้ดีกว่าสารสารละลายไอโอดีน 10% เป็นการยืนยันว่า สารสกัดรังนกมีคุณสมบัติเป็นยาช่วยสมานแผลที่ดี

ญี่ปุ่นและเกาหลีใต้ เป็นประเทศที่ผลิตเครื่องสำอางและเวชสำอางรังนก ออกมาจำหน่ายในตลาดโลกเป็นจำนวนมาก ประเทศทั้งสองไม่ใช่แหล่งผลิตรังนก จึงต้องสั่งซื้อสารสกัดรังนกจากประเทศไทย ตัวอย่างเช่น Oryza Oil & Fat Chemical Co., Ltd. ซึ่งเป็นบริษัทญี่ปุ่นที่ประกาศว่า สั่งซื้อสารสกัดรังนกจากประเทศไทย สำหรับภายในประเทศไทย มีการผลิตและจำหน่ายเครื่องสำอางรังนกเช่นกัน แต่เป็นเครื่องสำอางรังนกที่ไม่สามารถระบุชนิดและปริมาณของสารสำคัญในผลิตภัณฑ์ เนื่องจากปัจจุบันประเทศไทยยังไม่มีห้องปฏิบัติการที่ตรวจกรดเซียลิกและสารสำคัญอื่น ๆ ในรังนก

บทที่ 3
วิธีการทดลองและผลการทดลอง

ในบทที่ 3 นี้ ได้เริ่มจากการเตรียมและศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพสารสกัดรังนกที่ได้จากบริษัทขวัญมุย เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในของการนำสารสกัดรังนกมาใช้เป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอาง โดยหลังจากเตรียมสารสกัดรังนกแล้ว จึงได้นำสารสกัดรังนกมาตรวจสอบหาปริมาณสารฟีนอลิกรวม ตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ตรวจสอบหาปริมาณโปรตีนในสารสกัดรังนกที่ได้ และตรวจสอบความเป็นพิษของสารสกัดรังนกในเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ หลังจากนั้น จึงศึกษาเปรียบเทียบสารสกัดรังนกที่เก็บได้จากจังหวัดต่าง ๆ ในทั่วทุกภาคของประเทศไทย โดยตรวจสอบหาปริมาณสารฟีนอลิกรวม ตรวจสอบหาปริมาณกรดเซียลิก ตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ตรวจสอบหาปริมาณโปรตีน และตรวจสอบความเป็นพิษของสารสกัดรังนกในเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสท์ (primary human dermal fibroblasts) และการนำสารสกัดรังนกมาใช้เป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอาง

3.1 สารสกัดรังนกจากบริษัทขวัญมุย

3.1.1 การเตรียมสารสกัดรังนกจากบริษัทขวัญมุย

นำตัวอย่างรังนกแห้ง 100 g ปรับให้เป็นอุณหภูมิห้อง นำตัวอย่างรังนกแช่น้ำกลั่นเป็นเวลา 10 นาที นำตัวอย่างรังนกขึ้นจากน้ำ มาเก็บในภาชนะ แล้วเก็บแช่ในตู้เย็น เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำตัวอย่างรังนกซึ่งพองตัวแล้วไปทำความสะอาด วิธีทำความสะอาดรังนก ให้พนักงานใช้แหนบ ดึงขนนก และสิ่งแปลกปลอมอื่น ๆ ออกจากรังนกให้หมด จนกระทั่งรังนกตัวอย่างสะอาด ขั้นตอนต่อไปจึงนำตัวอย่างรังนกที่ทำความสะอาดแล้ว ไปทำการสกัดสารสกัดรังนก วิธีการสกัดใช้วิธีของบริษัทขวัญมุย เมื่อได้สารสกัดรังนกแล้ว นำสารสกัดรังนกไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C ต่อจากนั้น ส่งสารสกัดรังนกที่แช่แข็งไปที่ห้องปฏิบัติการ ของหลักสูตร วท.บ. จุลชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา จังหวัดสงขลา เพื่อทำการศึกษาต่อไป

3.1.2 การทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดรังนกจากบริษัทขวัญมุย

หลังจากเตรียมสารสกัดรังนกด้วยวิธีในข้อ 3.1.1 จึงนำสารสกัดรังนกที่ได้ มาตรวจสอบหาปริมาณสารฟีนอลิกรวม ปริมาณกรดเซียลิก ปริมาณโปรตีน และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดรังนกที่ได้ ดังนี้

(1) การตรวจสอบปริมาณสารฟีนอลิกรวมในสารสกัดรังนกขวัญมุย

เจือจางสารสกัดรังนกให้ได้ความเข้มข้นที่ 15 mg/mL และบ่มสารสกัดรังนกปริมาตร 100 µL กับสารละลาย Folin-Ciocalteau reagent (10%v/v) ปริมาตร 200 µL และสารละลาย sodium carbonate (700 mM) ปริมาตร 800 µL เพื่อตรวจสอบปริมาณสารฟีนอลิกรวม (total phenolic content) ในสารสกัดรังนก โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific, Evolution 201, China) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ gallic acid ที่ความเข้มข้น 2.5 ถึง 50 µg/mL และรายงานผลเป็น mg gallic acid equivalent per g dried edible bird's nest (mg GAE/g รังนกแห้ง)

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า ปริมาณสารฟีนอลิกรวมในสารสกัดรังนกจากบริษัทขวัญมุย มีค่าเป็น 4.44 ± 0.42 mg GAE/g รังนกแห้ง ดังแสดงในตารางที่ 3.1

(2) การตรวจสอบปริมาณกรดเซียลิกในสารสกัดรังนกขวัญมุย

การตรวจสอบสอบปริมาณกรดเซียลิก (sialic acid) ในสารสกัดรังนก ได้ทำตามวิธีของ Jourdian et al. (1971) ดังนี้ ผสมสารสกัดรังนกปริมาตร 500 µL ให้เข้ากับสารละลาย periodic acid (0.04 mM) ปริมาตร 100 µL บ่มใน ice box เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงเติม resorcinol reagent (0.6 g/dL) ปริมาตร 1,250 µL และบ่มที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 15 นาที เติม 95% tert-butyl alcohol ปริมาตร 1,250 µL และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 นาที หลังจากนั้น วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 630 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific, Evolution 201, China) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดเซียลิกปริมาณ 2-10 µg (Jourdian et al., 1971)

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า สารสกัดรังนกที่ได้จากบริษัทขวัญมุย มีปริมาณกรดเซียลิกเป็น 8.32 ± 0.08 g/100 g รังนกแห้ง ดังแสดงในตารางที่ 3.1

(3) การตรวจสอบปริมาณโปรตีนในสารสกัดรังนกขวัญมุย

ปริมาณโปรตีนในสารสกัดรังนกตรวจสอบโดยใช้ Bradford reagent ดังนี้ เจือจางสารสกัดรังนกให้ได้ความเข้มข้นที่ 15 mg/mL และผสมสารสกัดรังนกปริมาตร 1 µL กับ Bradford reagent ปริมาตร 100 µL ใน 96-well plate บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm

ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific, Evolution 201, China) เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในสารสกัดรังนกกับโปรตีน BSA มาตรฐาน ที่ปริมาณ 0-10 µg

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า สารสกัดรังนกที่ได้จากบริษัทขวัญมุย มีปริมาณโปรตีนเป็น 6.98 ± 0.05 mg/g รังนกแห้ง ดังแสดงในตารางที่ 3.1

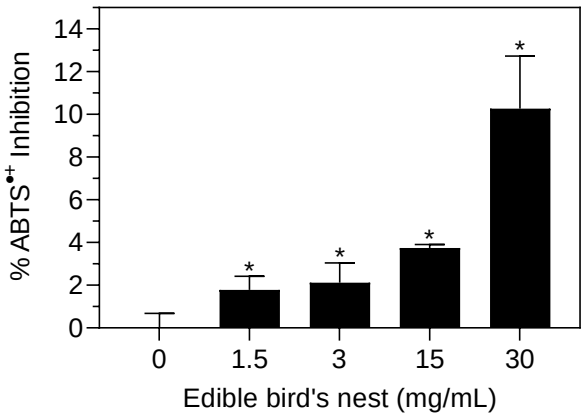
(4) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

(4.1) การยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$

เตรียมสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ โดยบ่มสารละลาย $ABTS^{\bullet}$ (7mM) ปริมาตร 1 mL กับสารละลาย potassium persulfate (4.9 mM) ปริมาตร 1 mL เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง หลังจากนั้นเจือจางสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm เป็น 0.70 (±0.02) และบ่มสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ ที่เจือจางแล้วปริมาตร 1 mL กับสารสกัดรังนกที่ความเข้มข้น 1.5, 3, 15 และ 30 mg/mL ปริมาตร 10 µL วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific, Evolution 201, China) หลังจากบ่มที่ 6 นาที ค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ (% $ABTS^{\bullet+}$ inhibition) คำนวณได้ดังแสดงในสมการที่ 3.1 ดังนี้

$$\%\ \mathrm{ABTS}^{\bullet+}\ \mathrm{inhibition} = \frac{(\mathrm{Abs}_{\mathrm{control}} - \mathrm{Abs}_{\mathrm{sample}})}{\mathrm{Abs}_{\mathrm{control}}} \times 100 \qquad \text{สมการที่ 3.1}$$

จากผลการทดลองพบว่า เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดรังนกเพิ่มขึ้น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ เพิ่มขึ้นเช่นกัน โดยค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ของสารสกัดรังนกที่ความเข้มข้นมากกว่า 1.5 mg/mL มีค่ามากกว่าที่ความเข้มข้นที่ 0 mg/mL อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ของสารสกัดรังนกที่ความเข้มข้น 1.5, 3, 15 และ 30 mg/mL มีค่าเป็น 1.79 ± 0.63, 2.12 ± 0.92, 3.74 ± 0.17 และ 10.27 ± 2.47 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 3.1



ภาพที่ 3.1 ค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ของสารสกัดรังนกขวัญมุย

เจือจางสารสกัดรังนกให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัดรังนกเป็น 1.5, 3, 15 และ 30 mg/mL หลังจากนั้นบ่มกับสารละลายอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm; * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $P<0.05$ หลังจากตรวจสอบด้วย One-Way ANOVA โดยใช้ Dunnett's multiple comparisons test เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดรังนกที่ความเข้มข้น 0 mg/mL (GraphPad Prism version 8.4.3)

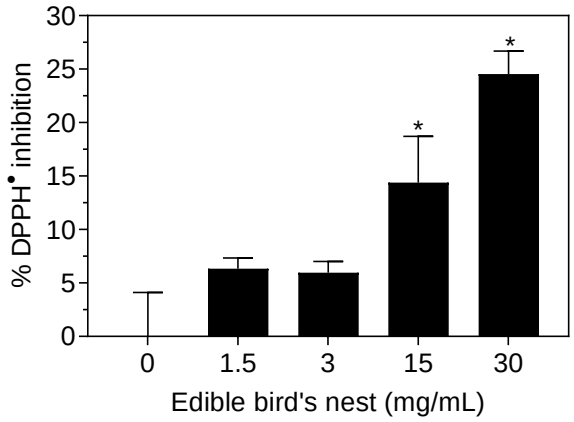
นอกจากนี้ หลังจากเตรียมสารสกัดรังนกที่ 15 mg/mL และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ trolox ที่ความเข้มข้น 0.5 ถึง 2.5 mM และรายงานผลเป็น mg trolox equivalent per g dried edible bird's nest (mg TE/g รังนกแห้ง) พบว่ามีค่าเป็น 3.85 ± 0.06 mg TE/g รังนกแห้ง ดังแสดงในตารางที่ 3.1

(4.2) การยับยั้งอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$

บ่มสารสกัดรังนกที่ความเข้มข้น 1.5, 3, 15 และ 30 mg/mL ปริมาตร 400 µL กับ สารละลาย DPPH (0.1 mM) ปริมาตร 800 µL ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific, Evolution 201, China) ค่า % การยับยั้งอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ (% $DPPH^{\bullet}$ inhibition) คำนวณได้ดังแสดงในสมการที่ 3.2 ดังนี้

$$\%\ DPPH^{\bullet}\ \text{inhibition} = \frac{(Abs_{control} - Abs_{sample})}{Abs_{control}} \times 100 \qquad \text{สมการที่ 3.2}$$

จากผลการทดลองพบว่า เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดรังนกเพิ่มขึ้น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ เพิ่มขึ้นเช่นกัน โดยค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ ของสารสกัดรังนกที่ความเข้มข้นมากกว่า 15 mg/mL มีค่ามากกว่าที่ความเข้มข้นที่ 0 mg/mL อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ ของสารสกัดรังนกที่ความเข้มข้น 1.5, 3, 15 และ 30 mg/mL มีค่าเป็น 6.33 ± 1.01, 5.95 ± 1.05, 14.38 ± 4.34 และ 24.54 ± 2.16 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 3.2



ภาพที่ 3.2 ค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH• ของสารสกัดรังนกขวัญมุย

เจือจางสารสกัดรังนกให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัดรังนกเป็น 1.5, 3, 15 และ 30 mg/mL และบ่มกับสารละลายอนุมูลอิสระ DPPH• ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm; * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า P<0.05 หลังจากตรวจสอบด้วย One-Way ANOVA โดยใช้ Dunnett's multiple comparisons test เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดรังนกที่ความเข้มข้น 0 mg/mL (GraphPad Prism version 8.4.3)

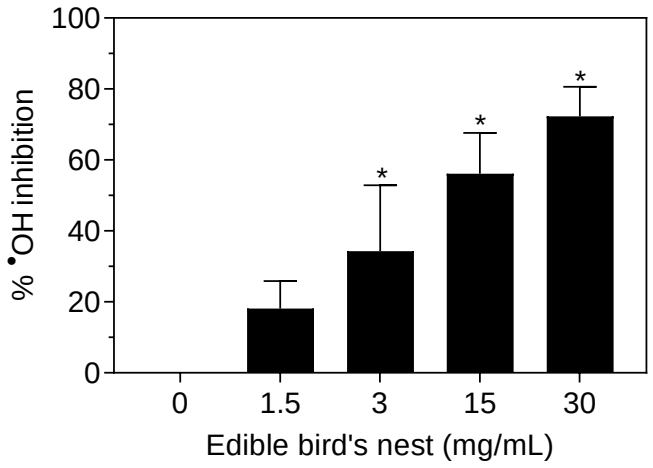
นอกจากนี้ หลังจากเตรียมสารสกัดรังนกที่ 15 mg/mL และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ trolox ที่ความเข้มข้น 1 ถึง 250 µM และรายงานผลเป็น mg trolox equivalent per g dried edible bird's nest (mg TE/g รังนกแห้ง) พบว่ามีค่าเป็น 0.38 ± 0.23 mg TE/g รังนกแห้ง ดังแสดงในตารางที่ 3.1

(4.3) การยับยั้งอนุมูลอิสระ •OH

การทดสอบการยับยั้งอนุมูลอิสระ •OH ทำโดยวิธี deoxyribose method (Halliwell et al., 1987; Ramakrishna et al., 2012) ดังนี้ ผสม 2-deoxy-D-ribose (28 mM) ปริมาตร 100 µL กับ สารสกัดรังนกที่ความเข้มข้น 1.5, 3, 15 และ 30 mg/mL ปริมาตร 500 µL รวมทั้ง สารผสมระหว่าง $FeCl_3$ (200 µM) และ EDTA (1.04 mM) ปริมาตร 200 µL หลังจากนั้น เติม hydrogen peroxide (1 mM) ปริมาตร 100 µL และกรดแอสคอร์บิก (1 mM) ปริมาตร 100 µL บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามด้วยบ่มที่ 80°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงเติมสารละลาย TBA (1 %w/v) ปริมาตร 1 mL และสารละลาย TCA (2.8 %w/v) ปริมาตร 1 mL บ่มที่ 100°C เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific, Evolution 201, China) ค่า % การยับยั้งอนุมูลอิสระ •OH (% •OH inhibition) คำนวณได้ดังแสดงในสมการที่ 3.3 ดังนี้

$$\%\ {}^{\bullet}\mathrm{OH\ inhibition} = \frac{(\mathrm{Abs_{control}} - \mathrm{Abs_{sample}})}{\mathrm{Abs_{control}}} \times 100 \qquad \text{สมการที่ 3.3}$$

จากผลการทดลองพบว่า เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดรังนกเพิ่มขึ้น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ •OH เพิ่มขึ้นเช่นกัน โดยค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ •OH ของสารสกัดรังนกที่ความเข้มข้นมากกว่า 3 mg/mL มีค่ามากกว่าที่ความเข้มข้นที่ 0 mg/mL อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ •OH ของสารสกัดรังนกที่ความเข้มข้น 1.5, 3, 15 และ 30 mg/mL มีค่าเป็น 18.12 ± 7.76, 34.29 ± 18.56, 56.11 ± 11.54 และ 72.31 ± 8.33 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 3.3



ภาพที่ 3.3 ค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ •OH ของสารสกัดรังนกขวัญมุย

การทดสอบการยับยั้งอนุมูลอิสระ •OH ทำโดยวิธี deoxyribose method; * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $P<0.05$ หลังจากตรวจสอบด้วย One-Way ANOVA โดยใช้ Dunnett's multiple comparisons test เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดรังนกที่ความเข้มข้น 0 mg/mL (GraphPad Prism version 8.4.3)

นอกจากนี้ หลังจากคำนวณค่าความเข้มข้นของสารสกัดรังนกที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ •OH ที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) พบว่ามีค่าเป็น 16.64 ± 4.10 mg/mL ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 คุณสมบัติของสารสกัดรังนกจากบริษัทขวัญมุย

ค่าพารามิเตอร์	ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
ปริมาณสารฟีนอลิกรวม (mg GAE/g รังนกแห้ง)	4.44 ± 0.42
ปริมาณกรดเซียลิก (g/100 g รังนกแห้ง)	8.32 ± 0.08
ปริมาณโปรตีน (mg/g รังนกแห้ง)	6.98 ± 0.05
ค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{•+}$ (mg TE/g รังนกแห้ง)	3.85 ± 0.06
ค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ $DPPH^{•}$ (mg TE/g รังนกแห้ง)	0.38 ± 0.23
ค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ •OH (IC_{50}; mg/mL)	16.64 ± 4.10

3.1.3 การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ของสารสกัดรังนกขวัญมุย

(1) การเพาะเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์

สั่งซื้อ เซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ (ATCC® CCL-1™) จากประเทศสหรัฐอเมริกา แล้วเก็บที่ห้องปฏิบัติการของหลักสูตร วท.บ. จุลชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา จังหวัดสงขลา เพื่อทำการศึกษาต่อไป

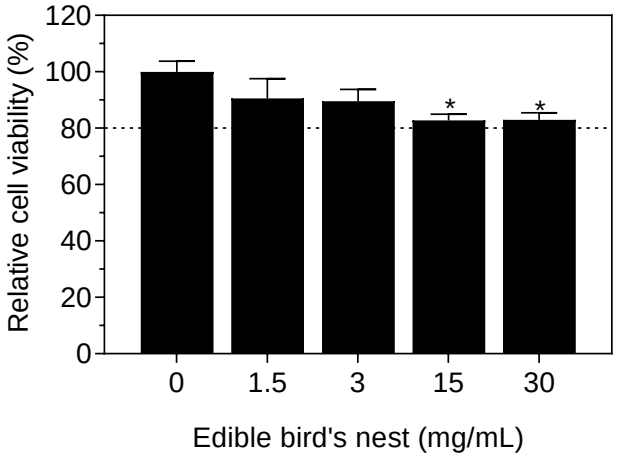
เลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ modified eagle's medium (MEM) ที่ประกอบด้วย fetal bovine serum (FBS; 10 %v/v) ยาปฏิชีวนะ penicillin (100 U/mL) และ streptomycin (100 µg/mL) และเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ 37°C, 5% CO_2

(2) การตรวจสอบความเป็นพิษของสารสกัดรังนกขวัญมุยต่อเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์

ความเป็นพิษของสารสกัดรังนกต่อเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ ตรวจสอบด้วยวิธี MTT assay หลังจากบ่มสารสกัดรังนกที่ความเข้มข้น 1.5, 3, 15 และ 30 mg/mL กับเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดสารสกัดรังนกทิ้ง และบ่มเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ กับสารละลาย MTT (0.5 mg/mL) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ละลายตะกอน formazan crystal ด้วย DMSO และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 nm ด้วย microplate reader (EZ Read 800 Plus Research, Biochrom, England) ค่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต (% relative cell viability) คำนวณได้ดังแสดงในสมการที่ 3.4 ดังนี้

$$\text{Relative cell viability (\%)} = \frac{\text{Abs of treated cells}}{\text{Abs of control cells}} \times 100 \qquad \text{สมการที่ 3.4}$$

ความเป็นพิษของสารสกัดรังนกต่อแซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ (ภาพที่ 3.4) พบว่า ในช่วงความเข้มข้นของสารสกัดรังนกที่ทดสอบ (1.5, 3, 15 และ 30 mg/mL) เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิตยังคงมากกว่า 80% ซึ่งบ่งบอกถึงความไม่เป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ ในช่วงความเข้มข้นของสารสกัดรังนกที่ทดสอบ

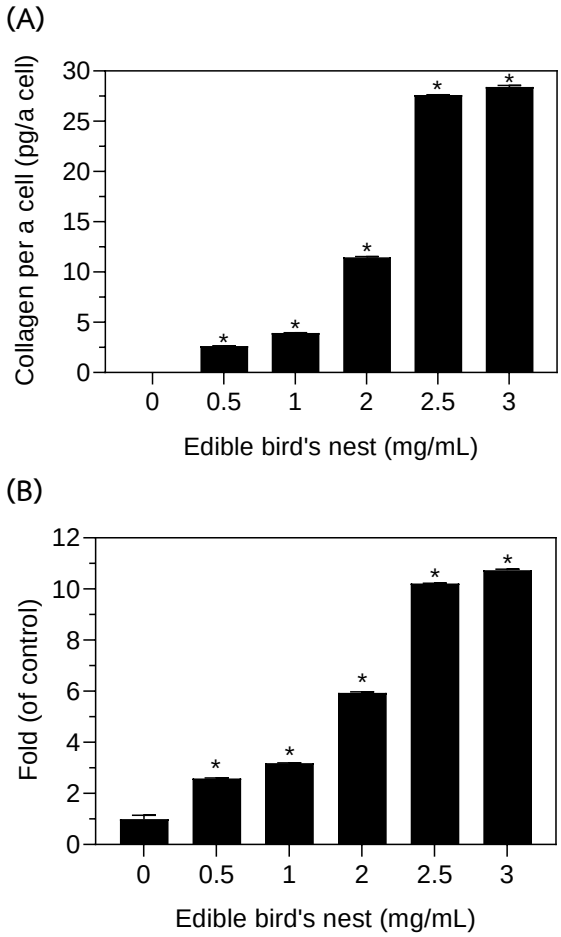


ภาพที่ 3.4 ค่าร้อยละของเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ที่มีชีวิตหลังจากบ่มด้วยสารสกัดรังนกขวัญมุย ความเป็นพิษของสารสกัดรังนกต่อเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ ตรวจสอบด้วยวิธี MTT assay หลังจากบ่มสารสกัดรังนกที่ความเข้มข้น 1.5, 3, 15 และ 30 mg/mL กับเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง; * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $P<0.05$ หลังจากตรวจสอบด้วย One-Way ANOVA โดยใช้ Dunnett's multiple comparisons test เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดรังนกที่ความเข้มข้น 0 mg/mL (GraphPad Prism version 8.4.3)

3.1.4 การตรวจสอบการสร้างคอลลาเจนในเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ของสารสกัดรังนกขวัญมุย

การตรวจสอบการสร้างคอลลาเจนในเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ หลังจากบ่มกับสารสกัดรังนกที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 2.5 และ 3 mg/mL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบได้ด้วยการใช้ชุดทดสอบ Soluble Collagen Assay Sircol™ ซึ่งเป็นการตรวจสอบคอลลาเจนชนิดละลายน้ำได้ และอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 nm สามารถตรวจสอบปริมาณคอลลาเจนได้ โดยเปรียบเทียบกับกราฟคอลลาเจนมาตรฐาน (ปริมาณ 0-30 µg)

จากการทดลองพบว่า เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดรังนกเพิ่มขึ้น ปริมาณคอลลาเจนต่อเซลล์ (pg/a cell) เพิ่มขึ้นเช่นกัน โดยที่ความเข้มข้นของสารสกัดรังนกเป็น 3 mg/mL ส่งผลให้เซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ ผลิตคอลลาเจนได้สูงสุดที่ 28.42 ± 0.13 pg/a cell (ภาพที่ 3.5A) ส่งผลให้มีการผลิตคอลลาเจนเพิ่มขึ้นมากกว่าเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ ที่ไม่ได้บ่มกับสารสกัดรังนก (0 mg/mL) ถึง 10.73 ± 0.04 เท่า (ภาพที่ 3.5B)



ภาพที่ 3.5 ปริมาณคอลลาเจนในเซลล์ L929 fibroblasts หลังจากบ่มกับสารสกัดรังนกขวัญมุยเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปริมาณคอลลาเจนในเซลล์ L929 fibroblasts หลังจากบ่มกับสารสกัดรังนกที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 2.5 และ 3 mg/mL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบด้วยชุดทดสอบ Soluble Collagen Assay Sircol™ และอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 nm; (A) ปริมาณคอลลาเจนต่อเซลล์ L929 fibroblasts (pg/a cell); (B) จำนวนเท่าของปริมาณคอลลาเจนที่ตรวจพบในเซลล์ L929 fibroblasts เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (0 mg/mL); * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $P<0.05$ หลังจากตรวจสอบด้วย One-Way ANOVA โดยใช้ Dunnett's multiple comparisons test เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดรังนกที่ความเข้มข้น 0 mg/mL (GraphPad Prism version 8.4.3)

3.2 รังนกบ้านและสารสกัดรังนกบ้านตัวอย่าง

3.2.1 แหล่งเก็บตัวอย่างรังนกบ้าน

เนื่องจากปัจจุบัน นกแอ่นกินรังได้แพร่กระจายและอาศัยอยู่ในบ้านนก ทั่วทุกภาคของประเทศ การเก็บตัวอย่างรังนก จึงเลือกเก็บจากบ้านรังนกในจังหวัดต่าง ๆ กระจายทั่วทุกภาคของประเทศ โดยแบ่งเก็บตัวอย่างรังนกบ้านทั้งหมด 6 แหล่ง ด้วยกัน ได้แก่

(1) ภาคใต้ตอนบน เก็บตัวอย่างรังนกจากจังหวัดกระบี่

(2) ภาคใต้ตอนล่าง เก็บตัวอย่างรังนกจากจังหวัดนราธิวาส ยะลา นครศรีธรรมราช

(3) ภาคกลาง เก็บตัวอย่างรังนกจากจังหวัดสมุทรสงคราม

(4) ภาคตะวันออก เก็บตัวอย่างรังนกจากจังหวัดระยอง

(5) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เก็บตัวอย่างรังนกจากจังหวัดอุดรธานี

(6) ภาคเหนือ เก็บตัวอย่างรังนกจากจังหวัดเชียงใหม่

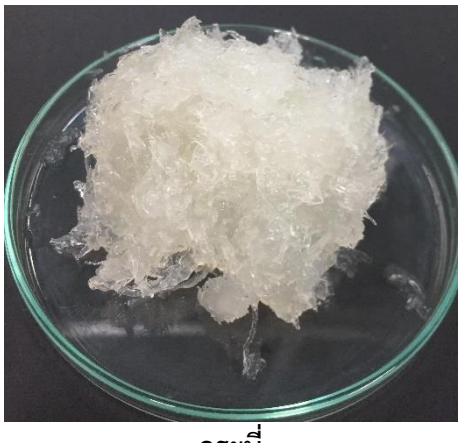
วิธีการเก็บรังนก ทำการเก็บรังนกจากบ้านนกทุกแหล่งพร้อมกัน ประมาณกลางเดือนมกราคม ปี พ.ศ. 2562 เก็บรังนกดิบจากแหล่งละ 70 รัง น้ำหนักประมาณ 500 g แล้วบรรจุรังนกในถุงพลาสติก ใส่กล่องโฟม จัดส่งไปเก็บไว้ที่ ห้องปฏิบัติการของหลักสูตร วท.บ.จุลชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา โดยเก็บรังนกดิบทั้งหมดไว้ในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ -8 ℃ จากจำนวนรังนกดิบแหล่งละ 70 รัง ทำการคัดเลือกออกมาเป็นรังนกดิบตัวอย่างแหล่งละ 10 รัง โดยเลือกรังนกให้มี ขนาด รูปทรง ความสะอาด ปริมาณขนนก ใกล้เคียงกัน นั้นนำรังนกตัวอย่างจำนวน 10 รัง ทั้ง 6 แหล่ง ไปทำความสะอาด จะได้ รังนกตัวอย่างที่ทำความสะอาดแล้ว จากนั้นนำรังนกตัวอย่างทั้ง 6 แหล่ง ที่ทำความสะอาดแล้ว ไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80℃ เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

3.2.2 ลักษณะทางกายภาพของรังนกตัวอย่าง หลังจากทำความสะอาดรังนกแล้ว

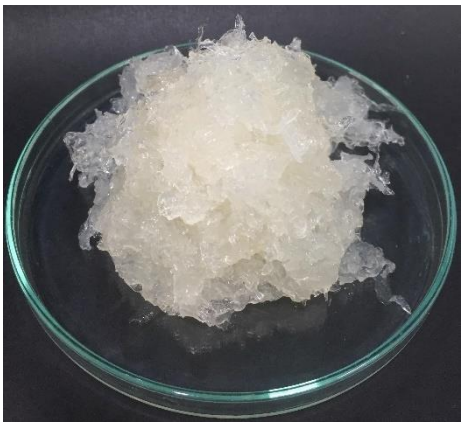
ในเบื้องต้น ได้เก็บรังนกจากจังหวัดต่าง ๆ ในประเทศไทย ได้แก่ ภาคใต้ตอนบน (กระบี่) ภาคใต้ตอนล่าง (นราธิวาส) ภาคกลาง (สมุทรสงคราม) ภาคตะวันออก (ระยอง) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (อุดรธานี) และภาคเหนือ (เชียงใหม่) โดยค่าสีของรังนกตัวอย่างแสดงดังตารางที่ 3.2 และลักษณะของรังนกตัวอย่างแสดงในภาพที่ 3.6

ตารางที่ 3.2 ค่าสีของรังนกตัวอย่าง

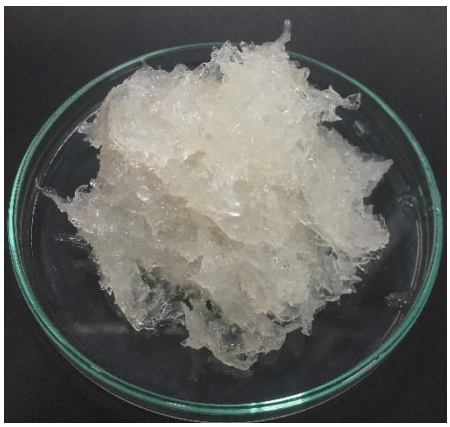
จังหวัด	L*	a*	b*
กระบี่	53.36 ± 0.88	-0.81 ± 0.06	6.32 ± 0.08
นราธิวาส	53.65 ± 1.48	-0.70 ± 0.12	8.23 ± 0.60
สมุทรสงคราม	53.49 ± 0.26	-0.87 ± 0.05	6.63 ± 0.19
ระยอง	53.65 ± 0.81	-0.71 ± 0.07	8.53 ± 0.42
อุดรธานี	51.67 ± 0.48	0.18 ± 0.10	11.49 ± 0.26
เชียงใหม่	55.78 ± 1.37	-0.36 ± 0.11	2.77 ± 0.55



กระบี่

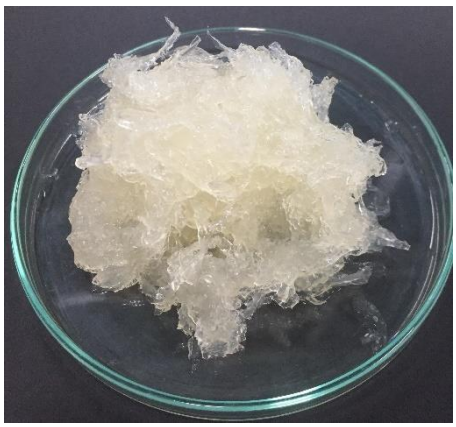


นราธิวาส

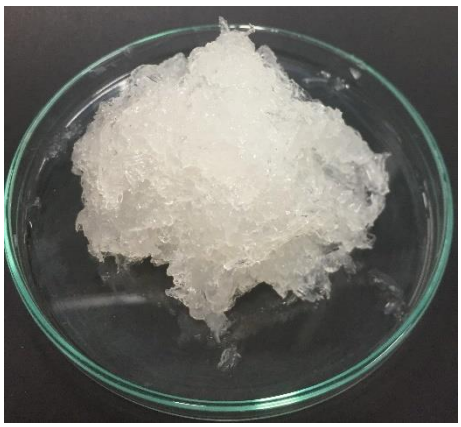


สมุทรสงคราม

ระยอง



อุดรธานี



เชียงใหม่

ภาพที่ 3.6 ตัวอย่างรังนกจากจังหวัดต่าง ๆ ในประเทศไทย

รังนกที่เก็บจากจังหวัดต่าง ๆ ในประเทศไทย ได้แก่ ภาคใต้ตอนบน (กระบี่) ภาคใต้ตอนล่าง (นราธิวาส) ภาคกลาง (สมุทรสงคราม) ภาคตะวันออก (ระยอง) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (อุดรธานี) และภาคเหนือ (เชียงใหม่)

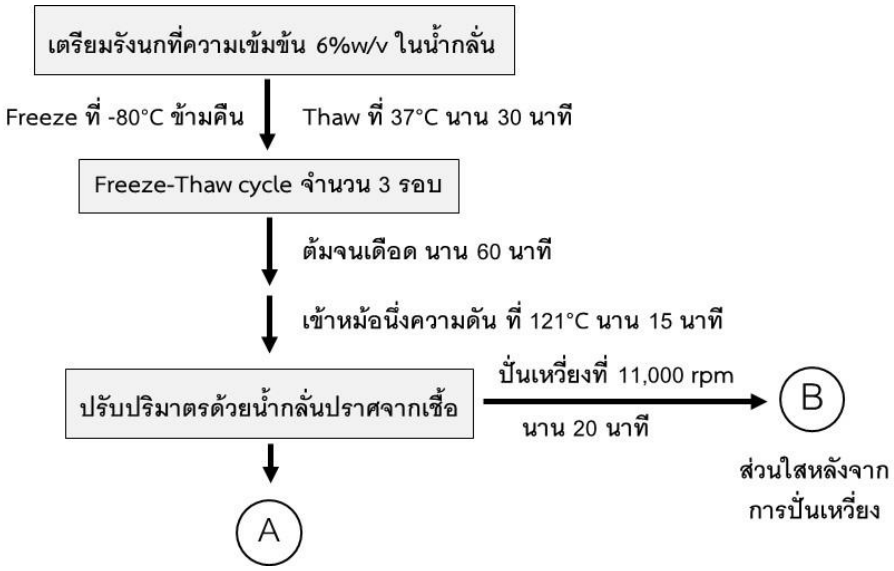
จากตารางที่ 3.2 และภาพที่ 3.6 พบว่า หลังจากทำความสะอาดรังนกแล้ว รังนกจากจังหวัดอุดรธานีมีค่า L* น้อยที่สุด (51.67 ± 0.48) และมีค่า a* (0.18 ± 0.10) และค่า b* (11.49 ± 0.26) สูงที่สุด โดยค่า L* บ่งบอกความสว่าง ค่า a* บ่งบอกความเป็นสีแดง และค่า b* บ่งบอกความเป็นสีเหลือง และรังนกที่ได้จากจังหวัดเชียงใหม่มีค่า L* สูงที่สุด (55.78 ± 1.37) และค่า b* น้อยที่สุด (2.77 ± 0.55) เมื่อเปรียบเทียบกับรังนกจากจังหวัดอื่น ๆ สำหรับรังนกที่ได้จากจังหวัดอื่น ๆ ได้แก่ จังหวัดกระบี่ นราธิวาส สมุทรสงคราม และระยอง มีสีใกล้เคียงกัน

3.2.3 การเตรียมสารสกัดรังนกตัวอย่าง

หลังจากเก็บตัวอย่างรังนกจากจังหวัดที่เป็นตัวแทนภาคต่าง ๆ แล้ว ให้เตรียมรังนกด้วยวิธีที่แตกต่างกัน 5 วิธี ก่อนนำไปวิเคราะห์ในลำดับถัดไป ดังนี้

(1) วิธีที่ 1

เตรียมสารสกัดรังนกตัวอย่างที่ความเข้มข้น 6%w/v ในน้ำกลั่น หลังจากนั้น นำเข้าตู้ -80°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที (freeze-thaw cycle) ทำเช่นนี้จำนวน 3 รอบ หลังจากนั้น ต้มจนเดือดเป็นเวลา 60 นาที แล้วจึงนำเข้าหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที และปรับปริมาตร โดยส่วน A คือ สารสกัดรังนกก่อนนำไปปั่นเหวี่ยง และส่วน B คือ สารสกัดรังนกหลังจากปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที (ภาพที่ 3.7)

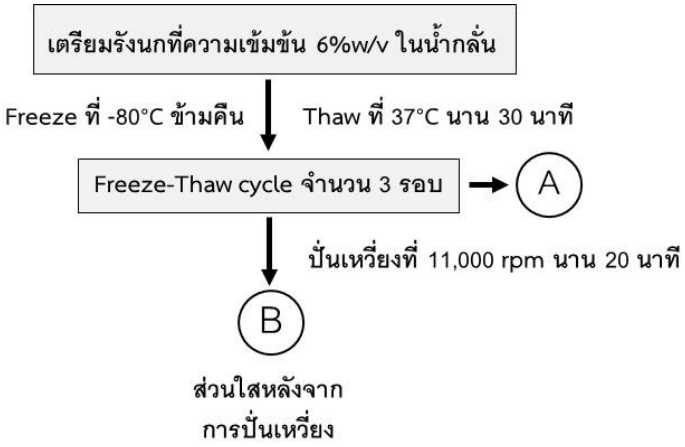


ภาพที่ 3.7 การเตรียมสารสกัดรังนกตัวอย่างด้วยวิธีที่ 1

ส่วน A คือ สารสกัดรังนกตัวอย่างก่อนนำไปปั่นเหวี่ยง และส่วน B คือ สารสกัดรังนกตัวอย่างหลังจากปั่นเหวี่ยง

(2) วิธีที่ 2

เตรียมสารสกัดรังนกตัวอย่างที่ความเข้มข้น 6%w/v ในน้ำกลั่น หลังจากนั้น นำเข้าตู้ -80°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที (freeze-thaw cycle) ทำเช่นนี้จำนวน 3 รอบ โดยส่วน A คือ สารสกัดรังนกก่อนนำไปปั่นเหวี่ยง และส่วน B คือ สารสกัดรังนกหลังจากปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที (ภาพที่ 3.8)

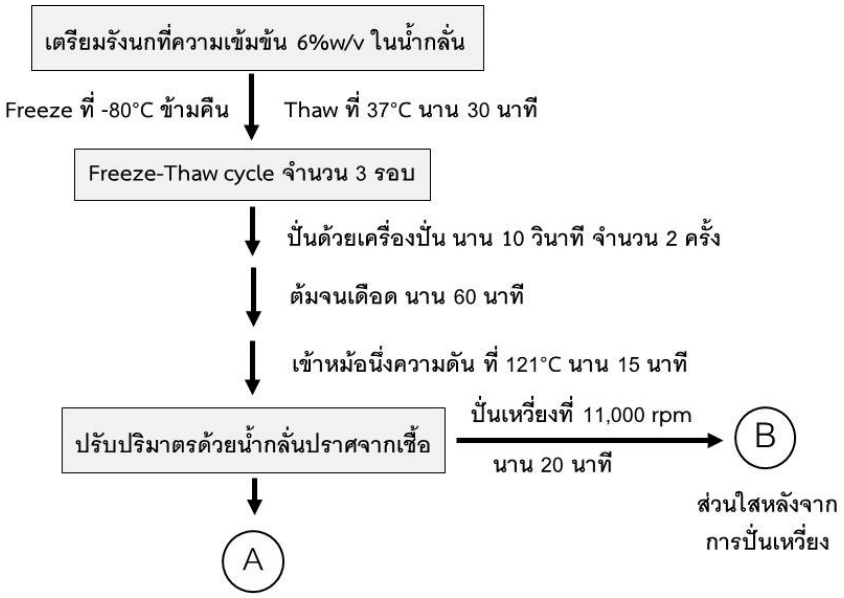


ภาพที่ 3.8 การเตรียมสารสกัดรังนกตัวอย่างด้วยวิธีที่ 2

ส่วน A คือ สารสกัดรังนกตัวอย่างก่อนนำไปปั่นเหวี่ยง และส่วน B คือ สารสกัดรังนกตัวอย่างหลังจากปั่นเหวี่ยง

(3) วิธีที่ 3

เตรียมสารสกัดรังนกตัวอย่างที่ความเข้มข้น 6%w/v ในน้ำกลั่น หลังจากนั้น นำเข้าตู้ -80°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที (freeze-thaw cycle) ทำเช่นนี้จำนวน 3 รอบ หลังจากนั้น ปั่นด้วยเครื่องปั่นเป็นเวลา 10 วินาที จำนวน 2 ครั้ง แล้วจึงนำมาต้มจนเดือดเป็นเวลา 60 นาที นำเข้าหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที และปรับปริมาตร ส่วน A คือ สารสกัดรังนกก่อนนำไปปั่นเหวี่ยง และส่วน B คือ สารสกัดรังนกหลังจากปั่นเหวี่ยง (ภาพที่ 3.9)

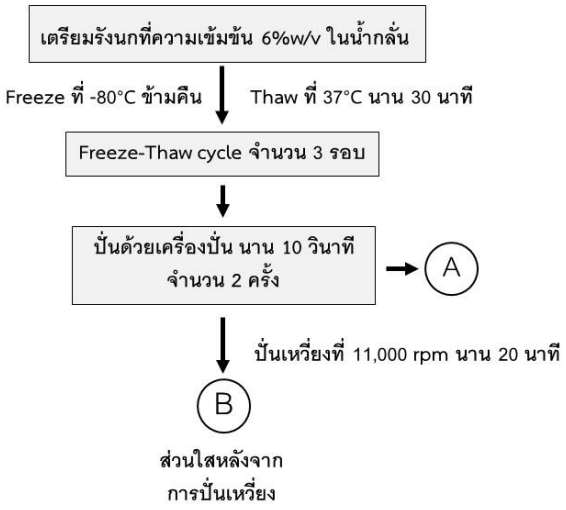


ภาพที่ 3.9 การเตรียมสารสกัดรังนกตัวอย่างด้วยวิธีที่ 3

ส่วน A คือ สารสกัดรังนกตัวอย่างก่อนนำไปปั่นเหวี่ยง และส่วน B คือ สารสกัดรังนกตัวอย่างหลังจากปั่นเหวี่ยง

(4) วิธีที่ 4

เตรียมสารสกัดรังนกตัวอย่างที่ความเข้มข้น 6%w/v ในน้ำกลั่น หลังจากนั้น นำเข้าตู้ -80°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที (freeze-thaw cycle) ทำเช่นนี้จำนวน 3 รอบ หลังจากนั้น ปั่นด้วยเครื่องปั่นเป็นเวลา 10 วินาที จำนวน 2 ครั้ง โดยส่วน A คือ สารสกัดรังนกก่อนนำไปปั่นเหวี่ยง และส่วน B คือ สารสกัดรังนกหลังจากปั่นเหวี่ยง (ภาพที่ 3.10)



ภาพที่ 3.10 การเตรียมสารสกัดรังนกตัวอย่างด้วยวิธีที่ 4

ส่วน A คือ สารสกัดรังนกตัวอย่างก่อนนำไปปั่นเหวี่ยง และส่วน B คือ สารสกัดรังนกตัวอย่างหลังจากปั่นเหวี่ยง

(5) วิธีที่ 5

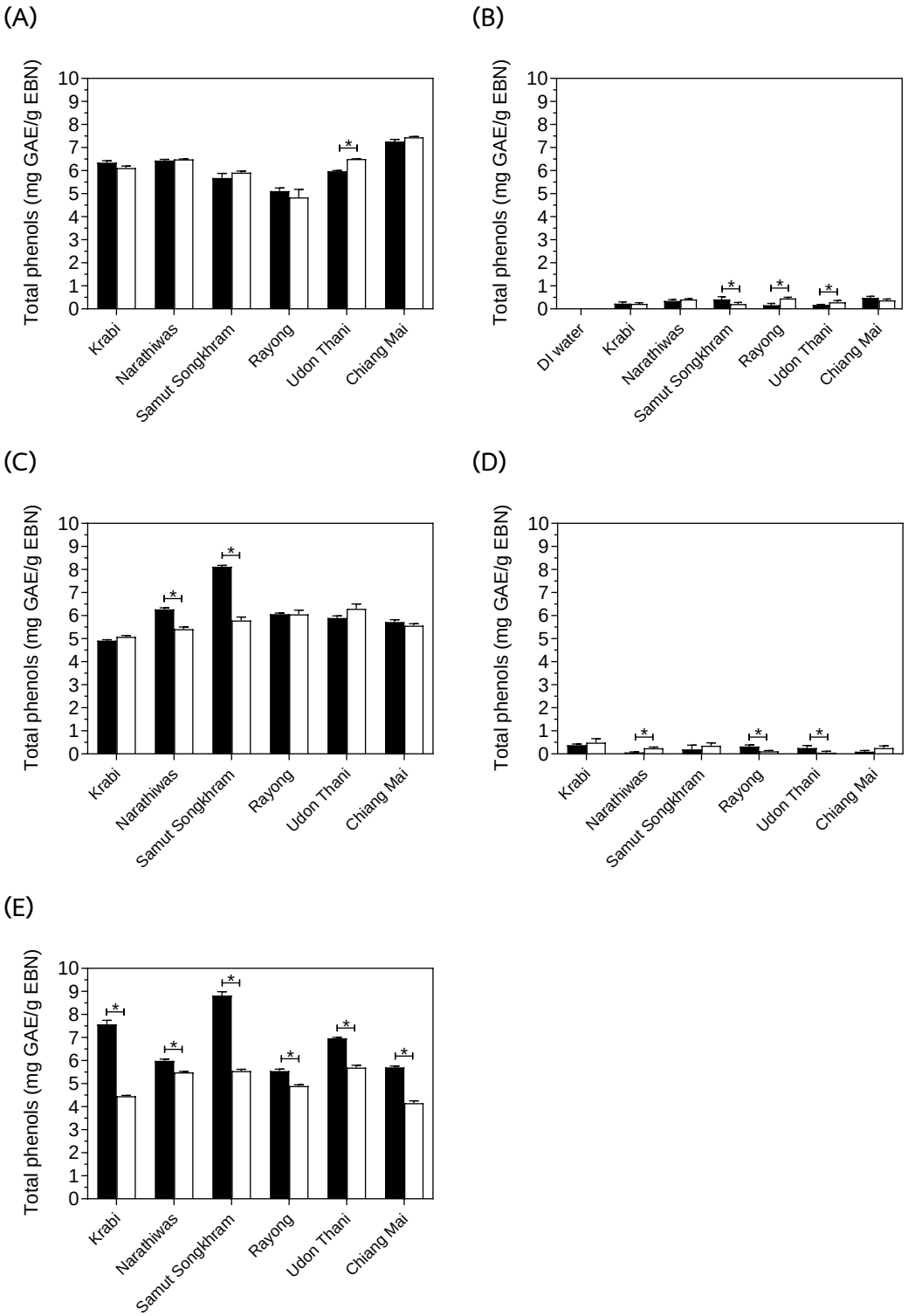
เตรียมสารสกัดรังนกตัวอย่างที่ความเข้มข้น 6%w/v ในน้ำกลั่น หลังจากนั้น ต้มจนเดือด เป็นเวลา 60 นาที แล้วจึงนำเข้าหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที และปรับปริมาตร โดยส่วน A คือ สารสกัดรังนกก่อนนำไปปั่นเหวี่ยง และส่วน B คือ สารสกัดรังนกหลังจากปั่นเหวี่ยง (ภาพที่ 3.11)

ภาพที่ 3.11 การเตรียมสารสกัดรังนกตัวอย่างด้วยวิธีที่ 5

ส่วน A คือ สารสกัดรังนกตัวอย่างก่อนนำไปปั่นเหวี่ยง และส่วน B คือ สารสกัดรังนกตัวอย่างหลังจากปั่นเหวี่ยง

หลังจากนั้น จึงนำสารสกัดรังนกตัวอย่างที่เตรียมได้ด้วยวิธีต่าง ๆ มาตรวจสอบหาปริมาณสารฟีนอลิกรวม ซึ่งทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1.2 (1) เพื่อเลือกวิธีที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการเตรียมสารสกัดรังนกตัวอย่างเพื่อทดสอบต่อไป ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 3.12

จากผลการทดลองพบว่า การเตรียมสารสกัดรังนกตัวอย่างด้วยวิธีที่ 1 (ภาพที่ 3.12A) วิธีที่ 3 (ภาพที่ 3.12C) และวิธีที่ 5 (ภาพที่ 3.12E) ซึ่งเป็นการเตรียมสารสกัดรังนกตัวอย่างโดยการใช้ความร้อนด้วยการต้มจนเดือด เป็นเวลา 60 นาที ให้ปริมาณสารฟีนอลิกรวมในปริมาณสูงกว่าการเตรียมสารสกัดรังนกตัวอย่างแบบไม่ใช้ความร้อนช่วย ได้แก่ วิธีที่ 2 (ภาพที่ 3.12B) และวิธีที่ 4 (ภาพที่ 3.12D) โดยปริมาณสารฟีนอลิกรวมในสารสกัดรังนกตัวอย่างที่เตรียมด้วยวิธีที่ 1, 3 และ 5 มีปริมาณใกล้เคียงกัน และอยู่ในช่วง ~ 4-9 mg GAE/g รังนกแห้ง และปริมาณสารฟีนอลิกรวมในสารสกัดรังนกตัวอย่างที่เตรียมด้วยวิธีที่ 2 และ 4 มีปริมาณอยู่ในช่วง 0-1 mg GAE/g รังนกแห้ง ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า ในการเตรียมสารสกัดรังนก ควรใช้ความร้อนช่วยในการสกัด โดยควรให้ความร้อนเป็นเวลานานอย่างน้อย 60 นาที



ภาพที่ 3.12 ปริมาณสารฟีนอลิกรวมจากสารสกัดรังนกตัวอย่างที่เตรียมด้วยวิธีที่แตกต่างกัน

เตรียมสารสกัดรังนกตัวอย่างแบบไม่ปั่นเหวี่ยง (■) และแบบปั่นเหวี่ยง (□) ; (A) การเตรียมสารสกัดรังนกด้วยวิธีที่ 1, (B) การเตรียมสารสกัดรังนกด้วยวิธีที่ 2, (C) การเตรียมสารสกัดรังนกด้วยวิธีที่ 3, (D) การเตรียมสารสกัดรังนกด้วยวิธีที่ 4, (E) การเตรียมสารสกัดรังนกด้วยวิธีที่ 5; * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $P<0.05$ หลังจากตรวจสอบด้วย student t-test (GraphPad Prism version 8.4.3)

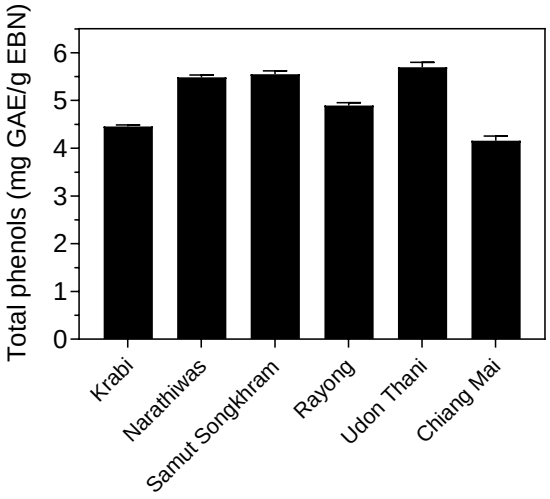
มีหลายการศึกษา ได้เตรียมสารสกัดรังนกโดยใช้ความร้อนช่วยในการสกัด Chan et al. (2015) ได้เตรียมสารสกัดรังนกโดยการตุ๋น (stew) รังนกที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 6-9 ชั่วโมง จนกระทั่งรังนกหลอมละลายอย่างสมบูรณ์ หลังจากนั้นจึงตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง (G. K. L. Chan et al., 2015) นอกจากนี้ Wong et al. (2018) ได้เตรียมสารสกัดรังนกโดยการตุ๋นรังนกที่อุณหภูมิ 98 ± 2°C โดยใช้เวลาในการตุ๋นรังนกขาว (white EBN) เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ใช้เวลาในการตุ๋นรังนกเหลือง (yellow EBN) เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และใช้เวลาในการตุ๋นรังนกแดง (red EBN) เป็นเวลา 40 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงกรองสารสกัดรังนก แล้วจึงนำสารสกัดรังนกไปทำแห้งแบบเยือกแข็ง และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C จนกว่าใช้งานต่อไป (Wong et al., 2018)

3.2.4 การทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดรังนกตัวอย่าง

จากผลการทดลองที่ได้ในข้อ 3.2.4 พบว่า วิธีที่เหมาะสมในการนำมาเตรียมสารสกัดรังนกตัวอย่าง คือวิธีที่ 5B ซึ่งเตรียมโดยการใช้ความร้อนช่วยและปั่นเหวี่ยงในขั้นตอนสุดท้ายเพื่อให้ได้สารละลายใส ซึ่งหลังจากเตรียมสารสกัดรังนกตัวอย่างด้วยวิธีดังกล่าว จึงนำสารสกัดรังนกตัวอย่างที่ได้มาตรวจสอบหาปริมาณสารฟีนอลิกรวม ปริมาณกรดเซียลิก ปริมาณโปรตีน ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและตรวจสอบความเป็นพิษของสารสกัดรังนกในเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสท์ (human dermal fibroblasts)

(1) การตรวจสอบปริมาณสารฟีนอลิกรวม

การตรวจสอบปริมาณสารฟีนอลิกรวม ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1.2 (1) โดยบ่มสารละลาย Folin-Ciocalteau reagent (10%v/v) ปริมาตร 200 µL และ สารละลาย sodium carbonate (700 mM) ปริมาตร 800 µL กับสารสกัดรังนกตัวอย่าง และเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก โดยผลการทดลองที่ได้แสดงดังภาพที่ 3.13



ภาพที่ 3.13 ปริมาณสารฟีนอลิกรวมของสารสกัดรังนกตัวอย่าง

จากการทดลองพบว่า ปริมาณสารฟีนอลิกรวมในสารสกัดรังนกตัวอย่างมีค่าอยู่ในช่วง ~4.16 ถึง 5.70 mg GAE/g รังนกแห้ง โดยปริมาณสารฟีนอลิกรวมในสารสกัดรังนกตัวอย่างจากจังหวัดเชียงใหม่มีค่าน้อยที่สุด (4.16 ± 0.10 mg GAE/g รังนกแห้ง) ตามด้วยจังหวัดกระบี่ (4.45 ± 0.03 mg GAE/g รังนกแห้ง) จังหวัดระยอง (4.90 ± 0.06 mg GAE/g รังนกแห้ง) จังหวัดนราธิวาส (5.48 ± 0.05 mg GAE/g รังนกแห้ง) จังหวัดสมุทรสงคราม (5.55 ± 0.07 mg GAE/g รังนกแห้ง) และจังหวัดอุดรธานี (5.70 ± 0.10 mg GAE/g รังนกแห้ง) ตามลำดับ นอกจากนี้ ปริมาณสารฟีนอลิกรวมในสารสกัดรังนกตัวอย่างจากจังหวัดที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$; One-Way ANOVA, GraphPad Prism version 8.4.3)

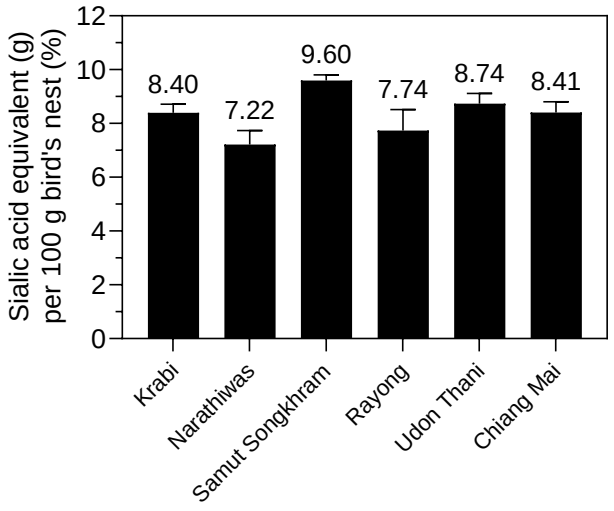
(2.) การตรวจหาปริมาณกรดเซียลิกในรังนกและสารสกัดรังนกตัวอย่าง

คุณภาพของรังนกไม่ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณโปรตีนในรังนก ค่าที่ใช้กำหนดคุณภาพของรังนกคือปริมาณกรดเซียลิกที่อยู่ในรังนก (Chan et al., 2013 และ Chan et al., 2015) ปริมาณกรดเซียลิกในรังนกจะใช้เป็นตัวกำหนดคุณภาพของรังนกและกำหนดราคาซื้อขายรังนก ตัวอย่างเช่น โรงงานผลิตรังนกสำเร็จรูปของบริษัทไทยเนส คอร์เปอร์เรชัน จำกัด ได้ยึดถือเอาปริมาณกรดเซียลิกในรังนกเป็นตัวชี้วัดคุณภาพและกำหนดราคาซื้อขายของรังนก โดยรังนกที่มีปริมาณกรดเซียลิก 8-10% จัดเป็นรังนกคุณภาพดีมาก จะซื้อขายในราคาสูง และผลิตภัณฑ์รังนกของบริษัทฯ

(2.1) การหาปริมาณกรดเซียลิกในสารสกัดรังนก

การทดสอบหาปริมาณกรดเซียลิกในสารสกัดรังนก ได้ทำตามวิธีของ Jourdian et al. (1971) ดังนี้ ผสมสารสกัดรังนก หรือ สารมาตรฐานกรดเซียลิก (2-10 µg) ปริมาตร 500 µL ให้

เข้ากับสารละลาย periodic acid (0.04 mM) ปริมาตร 100 µL บ่มใน ice box เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงเติม resorcinol reagent (0.6 g/dL) ปริมาตร 1,250 µL และบ่มที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 15 นาที เติม 95% tert-butyl alcohol ปริมาตร 1,250 µL และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 นาที หลังจากนั้น วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 630 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Jourdian et al., 1971) โดยผลการทดลองที่ได้แสดงดังภาพที่ 3.14



ภาพที่ 3.14 ปริมาณกรดเซียลิกที่ได้จากสารสกัดรังนกตัวอย่าง

จากการทดลองพบว่า ปริมาณกรดเซียลิกในสารสกัดรังนกตัวอย่างมีค่าอยู่ในช่วง ~7.22 ถึง 9.60 g/100 g รังนกแห้ง โดยปริมาณกรดเซียลิกในสารสกัดรังนกตัวอย่างจากจังหวัดนราธิวาสมีค่าน้อยที่สุด (7.22 ± 0.52 g/100 g รังนกแห้ง) ตามด้วยจังหวัดระยอง (7.74 ± 0.78 g/100 g รังนกแห้ง) จังหวัดกระบี่ (8.40 ± 0.32 g/100 g รังนกแห้ง) จังหวัดเชียงใหม่ (8.41 ± 0.40 g/100 g รังนกแห้ง) จังหวัดอุดรธานี (8.74 ± 0.38 g/100 g รังนกแห้ง) และจังหวัดสมุทรสงคราม (9.60 ± 0.21 g/100 g รังนกแห้ง) ตามลำดับ นอกจากนี้ ปริมาณกรดเซียลิกในสารสกัดรังนกตัวอย่างจากจังหวัดที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$; One-Way ANOVA, GraphPad Prism version 8.4.3)

(2.2) การทดสอบกรดเซียลิกในรังนกล้างสะอาดแห้งของบริษัทไทยเนสคอร์เปอร์เรชัน จำกัด

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ตรวจวัดค่า กรดเซียลิกในรังนกบ้านของไทย แต่เนื่องจากปัจจุบันประเทศไทย ยังไม่มีห้องปฏิบัติการตรวจกรดเซียลิกโดยเฉพาะ แม้แต่ บริษัทห้องปฏิบัติ

การกลาง (ประเทศไทย) จำกัด ก็กำลังอยู่ในขั้นตอนเตรียมห้องปฏิบัติการตรวจกรดเซียลิก ดังนั้น ผู้วิจัยได้ส่งตัวอย่างรังนกแห้งไปตรวจที่ บริษัทไทยเนส คอร์เปอร์เรชัน จำกัด โดยวิธีการตรวจกรดเซียลิกของบริษัทไทยเนส ใช้วิธีโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (HPLC Plus Isocratic Liquid Chromatograph system; STI501, China) ซึ่งเป็นวิธีการที่มี ความละเอียด ถูกต้องและความแม่นยำสูง และเป็นไปตามค่ามาตรฐานปริมาณกรดเซียลิกในรังนก (Chan et al., 2013) และเป็นที่ยอมรับในการซื้อขายรังนกในประเทศจีนซึ่งอ้างอิงกรดเซียลิกเป็นเกณฑ์ แต่เนื่องจากการตรวจที่บริษัทไทยเนส คอร์เปอร์เรชัน จำกัด มีค่าใช้จ่ายสูงมาก เพราะว่า กรดเซียลิกมาตรฐานที่ใช้อ้างอิงมีราคาแพงมาก ดังนั้น ผู้วิจัย จึงนำตัวอย่างรังนกแห้ง สะอาด จากทั้งหมด 6 ตัวอย่าง มารวมกันเป็นตัวอย่างเดียว แล้วส่งไปตรวจที่ บริษัทไทยเนส ดังแสดงในตารางที่ 3.3 โดยตัวอย่างที่ 9 คือ รังนกแห้งสะอาด 6 ตัวอย่างที่รวมกันแล้วเป็น 1 ตัวอย่าง ผลการตรวจปริมาณกรดเซียลิกในรังนกตัวอย่างที่ 9 ได้ค่ากรดเซียลิก 10.325 % ซึ่งเป็นค่ากรดเซียลิก ในรังนกบ้านไทย ส่วนตัวอย่างรังนก ที่ 1 - 8 เป็นตัวอย่างรังนกแห้งที่ผู้ประกอบการในประเทศส่งไปขายให้บริษัทไทยเนส คอร์เปอร์เรชัน จำกัด ซึ่งทางบริษัทฯ จะซื้อรังนกในราคาที่ไม่เท่ากัน กล่าวคือ ราคาซื้อขายรังนกจะขึ้นกับปริมาณกรดเซียลิกในรังนก

ตารางที่ 3.3 ผลการตรวจหาปริมาณกรดเซียลิจากบริษัทไทยเนส คอร์เปอร์เรชัน จำกัด

ตัวอย่างรังนก	กรดเซียลิกรวม (%)	คุณภาพรังนก	ราคาซื้อขาย
1	2.237	ต่ำที่สุด	ถูกที่สุด
2	3.412	ต่ำที่สุด	ถูกที่สุด
3	4.235	ปานกลาง	ปานกลาง
4	4.520	ปานกลาง	ปานกลาง
5	6.496	ปานกลาง	ปานกลาง
6	10.289	สูงที่สุด	แพงที่สุด
7	10.566	สูงที่สุด	แพงที่สุด
8	10.613	สูงที่สุด	แพงที่สุด
9	10.325	สูง	-

(2.3) ปริมาณกรดเซียลิกจากบริษัทห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ส่งตัวอย่างรังนกบ้านก่อนล้าง (รังนกดิบ) และหลังล้าง (รังนกสะอาด) ทดสอบที่บริษัทห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด ดังแสดงในตารางที่ 3.4

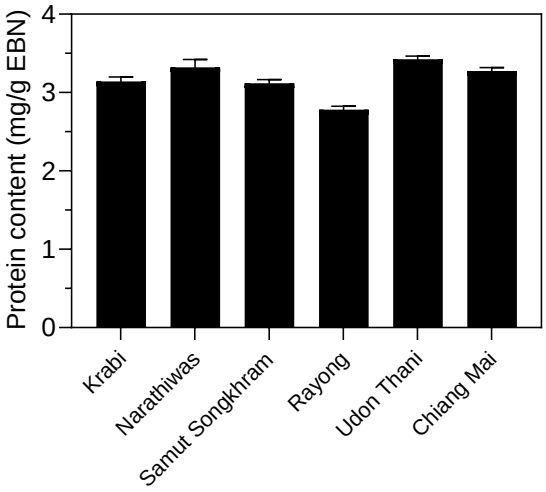
ผลการตรวจปริมาณกรดเซียลิกในรังนกตัวอย่าง สรุปว่า วิธีการตรวจกรดเซียลิกของบริษัทไทยเนส คอร์เปอร์เรชัน จำกัด ซึ่งใช้วิธีโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (HPLC Plus Isocratic Liquid Chromatograph system; STI501, Chaina) ได้ค่า 10.325 ซึ่งนับว่าเป็นค่าที่สูง และเป็นไปตามค่ามาตรฐานปริมาณกรดเซียลิกในรังนกคุณภาพดี (G. K. Chan et al., 2013) ส่วนผลการตรวจปริมาณกรดเซียลิกในรังนกตัวอย่าง ที่ห้องปฏิบัติการหลักสูตร วท.บ.จุลชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ซึ่งใช้วิธี Jourdian et al. (1971) พบว่า ได้ค่ากรดเซียลิกต่ำกว่าของบริษัทไทยเนส คอร์เปอร์เรชัน จำกัด เนื่องจากว่าเป็นการตรวจกรดเซียลิกในส่วนใส (supernatant) และอาจจะมีกรดเซียลิกที่ยังไม่ละลายตกค้างอยู่ในส่วนตะกอน ในขณะที่ผลการตรวจกรดเซียลิกที่ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด ซึ่งตรวจตามวิธี Characterization and Standardization of Edible Birds Nest (EBN)-Determination of Sialic acid นั้นได้ค่าต่ำกว่าเกณฑ์ทั่วไป

ตารางที่ 3.4 ผลการตรวจหาปริมาณกรดเซียลิกจากบริษัทห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด

ตัวอย่าง	**ปริมาณกรดเซียลิก (g/100 g)**	
	ตัวอย่างรังนกดิบที่ไม่ได้ผ่านการทำความสะอาด	ตัวอย่างรังนกที่ผ่านการทำความสะอาด ทำให้สุก และบดให้เป็นผง
กระบี่	0.56	2.09
นราธิวาส	0.69	2.45
สมุทรสงคราม	0.54	1.9
ระยอง	0.57	1.77
อุดรธานี	0.74	1.56
เชียงใหม่	0.57	1.81

(3) การตรวจหาปริมาณโปรตีน

การตรวจสอบปริมาณโปรตีน ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1.2 (3) โดยใช้ Bradford reagent และเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในสารสกัดรังนกกับโปรตีน BSA มาตรฐาน ที่ปริมาณ 0-10 µg โดยผลการทดลองที่ได้แสดงดังภาพที่ 3.15



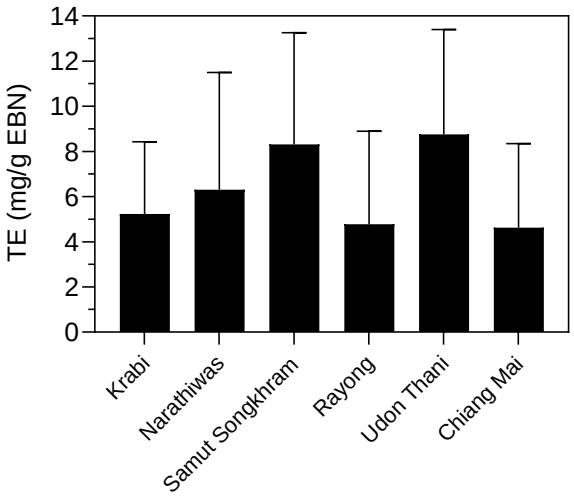
ภาพที่ 3.15 ปริมาณโปรตีนที่ได้จากสารสกัดรังนกตัวอย่าง

จากการทดลองพบว่า ปริมาณโปรตีนในสารสกัดรังนกตัวอย่างมีค่าอยู่ในช่วง ~2.78 ถึง 3.42 mg/g รังนกแห้ง โดยปริมาณโปรตีนในสารสกัดรังนกตัวอย่างจากจังหวัดระยองมีค่าน้อยที่สุด (2.78 ± 0.04 mg/g รังนกแห้ง) ตามด้วยจังหวัดสมุทรสงคราม (3.12 ± 0.05 mg/g รังนกแห้ง) จังหวัดกระบี่ (3.14 ± 0.06 mg/g รังนกแห้ง) จังหวัดเชียงใหม่ (3.28 ± 0.04 mg/g รังนกแห้ง) จังหวัดนราธิวาส (3.32 ± 0.10 mg/g รังนกแห้ง) และจังหวัดอุดรธานี (3.42 ± 0.04 mg/g รังนกแห้ง) ตามลำดับ นอกจากนี้ ปริมาณโปรตีนในสารสกัดรังนกตัวอย่างจากจังหวัดที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$; One-Way ANOVA, GraphPad Prism version 8.4.3)

(4) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

(4.1) $ABTS^{\bullet+}$ scavenging assay

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1.2 (4.1) เตรียมสารละลาย $ABTS^{\bullet}$ (7mM) ปริมาตร 1 mL กับสารละลาย potassium persulfate (4.9 mM) ปริมาตร 1 mL เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรังนกด้วยวิธี $ABTS^{\bullet+}$ scavenging assay และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน trolox และรายงานผลเป็นปริมาณ trolox (mg TE) ต่อกรัมรังนกแห้ง (mg TE/g รังนกแห้ง) ผลการทดลองที่ได้แสดงดังภาพที่ 3.16 และตารางที่ 3.5

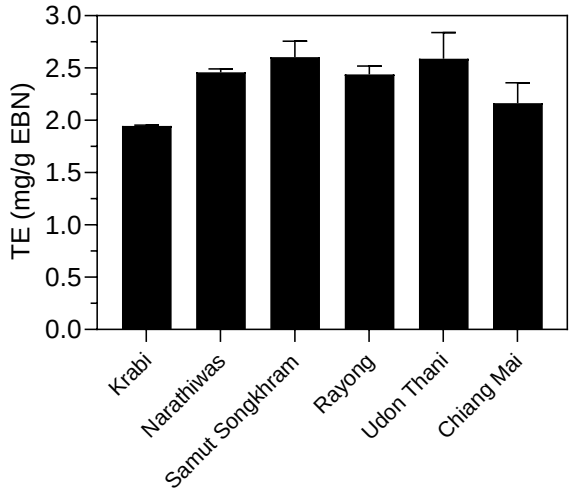


ภาพที่ 3.16 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ของสารสกัดรังนกตัวอย่าง

จากการทดลองพบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ของสารสกัดรังนกตัวอย่างมีค่าอยู่ในช่วง ~4.63 ถึง 8.76 mg TE/g รังนกแห้ง โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ของสารสกัดรังนกตัวอย่างจากจังหวัดเชียงใหม่มีค่าน้อยที่สุด (4.63 ± 3.71 mg TE/g รังนกแห้ง) ตามด้วยจังหวัดระยอง (4.78 ± 4.11 mg TE/g รังนกแห้ง) จังหวัดกระบี่ (5.23 ± 3.20 mg TE/g รังนกแห้ง) จังหวัดนราธิวาส (6.31 ± 5.19 mg TE/g รังนกแห้ง) จังหวัดสมุทรสงคราม (8.31 ± 4.94 mg TE/g รังนกแห้ง) และจังหวัดอุดรธานี (8.76 ± 4.64 mg TE/g รังนกแห้ง) ตามลำดับ นอกจากนี้ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ของสารสกัดรังนกตัวอย่างจากจังหวัดที่แตกต่างกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$; One-Way ANOVA, GraphPad Prism version 8.4.3)

(4.2) $DPPH^{\bullet}$ scavenging assay

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1.2 (4.2) บ่มสารสกัดรังนกตัวอย่างปริมาตร 400 µL กับ สารละลาย $DPPH^{\bullet}$ (0.1 mM) ปริมาตร 800 µL ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน trolox และรายงานผลเป็นปริมาณ trolox ต่อกรัมรังนกแห้ง (mg TE/g รังนกแห้ง) ผลการทดลองที่ได้แสดงดังภาพที่ 3.17 และตารางที่ 3.5

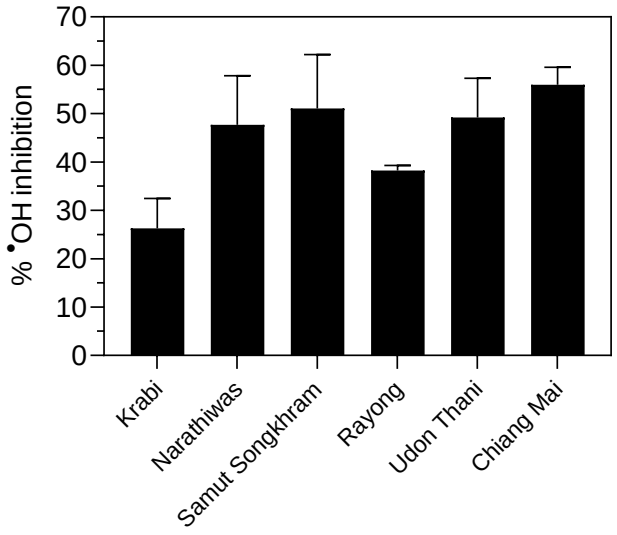


ภาพที่ 3.17 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH• ของสารสกัดรังนกตัวอย่าง

จากการทดลองพบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH• ของสารสกัดรังนกตัวอย่างมีค่าอยู่ในช่วง ~1.95 ถึง 2.60 mg TE/g รังนกแห้ง โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH• ของสารสกัดรังนกตัวอย่างจากจังหวัดกระบี่มีค่าน้อยที่สุด (1.95 ± 0.01 mg TE/g รังนกแห้ง) ตามด้วยจังหวัดเชียงใหม่ (2.16 ± 0.20 mg TE/g รังนกแห้ง) จังหวัดระยอง (2.44 ± 0.08 mg TE/g รังนกแห้ง) จังหวัดนราธิวาส (2.46 ± 0.03 mg TE/g รังนกแห้ง) จังหวัดอุดรธานี (2.59 ± 0.25 mg TE/g รังนกแห้ง) และจังหวัดสมุทรสงคราม (2.60 ± 0.15 mg TE/g รังนกแห้ง) ตามลำดับ นอกจากนี้ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH• ของสารสกัดรังนกตัวอย่างจากจังหวัดที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$; One-Way ANOVA, GraphPad Prism version 8.4.3)

(4.3) •OH scavenging assay

การทดสอบด้วยวิธี •OH scavenging assay ทำโดยวิธี deoxyribose method (Halliwell et al., 1987; Ramakrishna et al., 2012) ดังนี้ ผสม 2-deoxy-D-ribose (28 mM) ปริมาตร 100 µL กับ สารสกัดรังนกตัวอย่าง ปริมาตร 500 µL รวมทั้ง สารผสมระหว่าง $FeCl_3$ (200 µM) และ EDTA (1.04 mM) ปริมาตร 200 µL หลังจากนั้น เติม hydrogen peroxide (1 mM) ปริมาตร 100 µL และกรดแอสคอร์บิก (1 mM) ปริมาตร 100 µL บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามด้วย บ่มที่ 80°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงเติมสารละลาย TBA (1 %w/v) ปริมาตร 1 mL และสารละลาย TCA (2.8 %w/v) ปริมาตร 1 mL บ่มที่ 100°C เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 nm ผลที่ได้แสดงดัง ภาพที่ 3.18 และตารางที่ 3.5



ภาพที่ 3.18 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ •OH ของสารสกัดรังนกตัวอย่าง

จากการทดลองพบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ •OH ของสารสกัดรังนกตัวอย่างมีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ ~26.27 ถึง 56.00 IC_{50}; mg/mL โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ •OH ของสารสกัดรังนกตัวอย่างจากจังหวัดกระบี่มีค่าน้อยที่สุด (ร้อยละ 26.27 ± 6.19) ตามด้วยจังหวัดระยอง (ร้อยละ 38.26 ± 1.04) จังหวัดนราธิวาส (ร้อยละ 47.69 ± 10.12) จังหวัดอุดรธานี (ร้อยละ 49.18 ± 8.14) จังหวัดสมุทรสงคราม (ร้อยละ 51.09 ± 11.12) และจังหวัดเชียงใหม่ (ร้อยละ 56.00 ± 3.58) ตามลำดับ นอกจากนี้ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ •OH ของสารสกัดรังนกตัวอย่างจากจังหวัดที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$; One-Way ANOVA, GraphPad Prism version 8.4.3)

ตารางที่ 3.5 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรังนกตัวอย่าง

Assay	กระบี่	นราธิวาส	สมุทรสงคราม	ระยอง	อุดรธานี	เชียงใหม่
$ABTS^{\bullet+}$	5.23	6.31	8.31	4.78	8.76	4.63
$DPPH^{\bullet}$	1.95	2.46	2.60	2.44	2.59	2.16
•OH	26.27	47.69	51.09	38.26	49.18	56.00

(5) การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสท์

(5.1) การเพาะเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสท์

ในโครงการวิจัยฯ นี้ ได้สั่งซื้อเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสท์ (primary human dermal fibroblasts; ATCC® PCS-201-012™) จากประเทศสหรัฐอเมริกา และเก็บไว้ที่ห้องปฏิบัติการของ

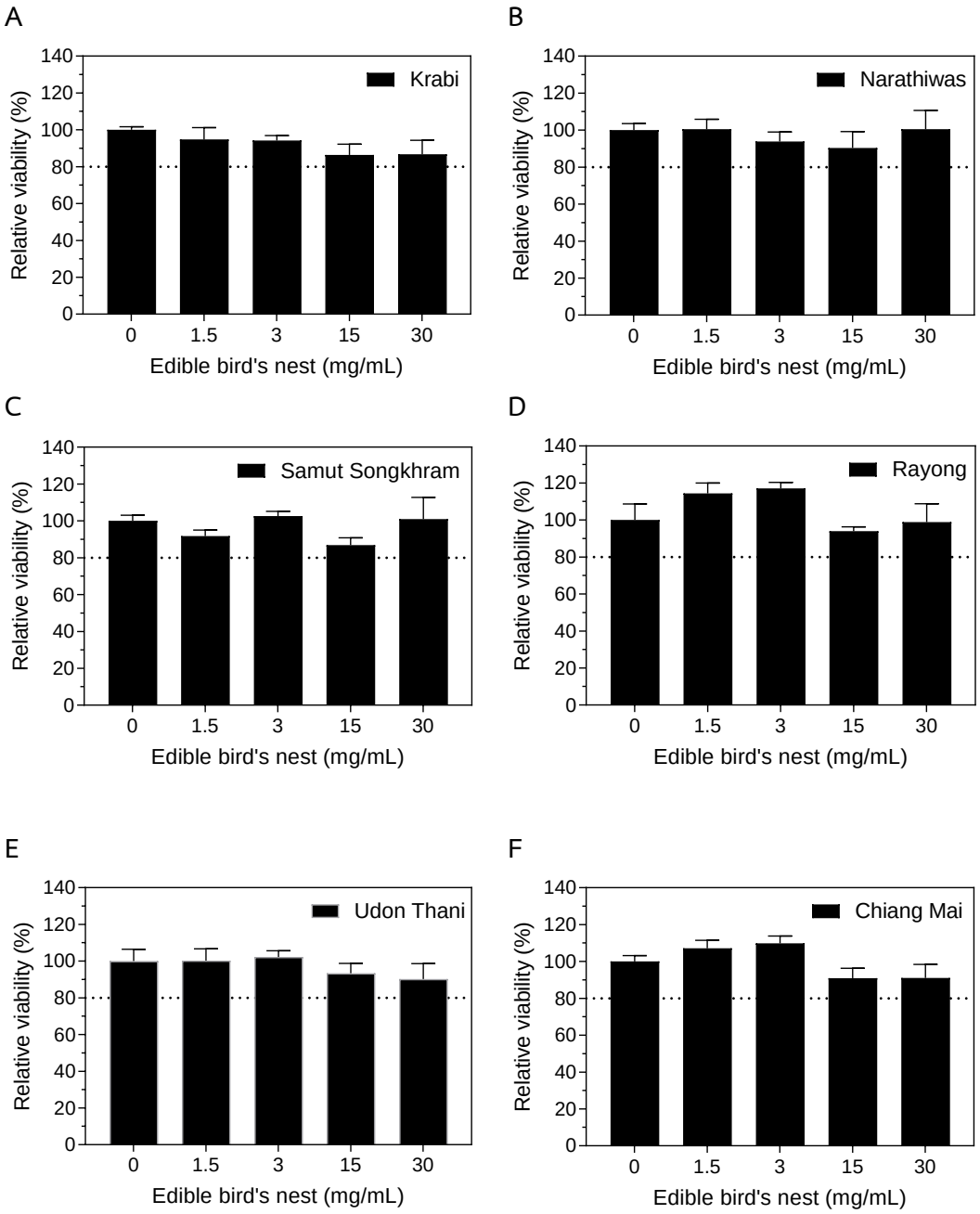
หลักสูตร วท.บ.จุลชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา จังหวัดสงขลา เพื่อทำการศึกษาต่อไป

เลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสท์ใน Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ที่ประกอบด้วย fetal bovine serum (FBS; 10 %v/v) ยาปฏิชีวนะ penicillin (100 U/mL) และ streptomycin (100 µg/mL) และเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ 37°C, 5% CO_2

(5.2) การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสท์

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดรังนกตัวอย่างต่อเซลล์ primary human dermal fibroblasts ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1.3 (2) ด้วยวิธี MTT assay หลังจากบ่มสารสกัดรังนกตัวอย่างกับเซลล์ primary human dermal fibroblasts เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บ่มเซลล์ primary human dermal fibroblasts กับสารละลาย MTT (0.5 mg/mL) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ละลายตะกอน formazan crystal ด้วย DMSO และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 nm ด้วย microplate reader โดยค่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต (% relative cell viability) แสดงดังภาพที่ 3.19

พบว่า หลังจากบ่มสารสกัดรังนกตัวอย่างในช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ (1.5, 3, 15 และ 30 mg/mL) กับเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสท์ ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตยังคงมากกว่า 80% บ่งบอกถึงความไม่เป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสท์ ในช่วงความเข้มข้นของสารสกัดรังนกตัวอย่างที่ทดสอบ



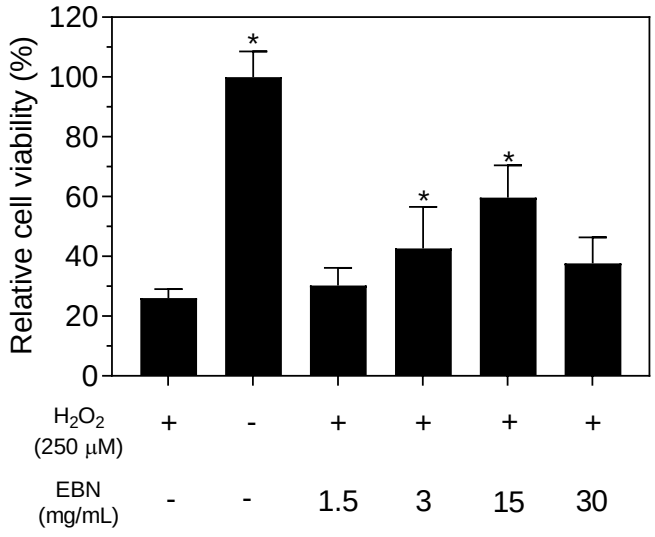
<u>ภาพที่</u> 3.19 ความเป็นพิษของสารสกัดรังนกตัวอย่างต่อเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสท์

ความเป็นพิษของสารสกัดรังนกตัวอย่างต่อเซลล์ primary human dermal fibroblasts ตรวจสอบด้วยวิธี MTT assay หลังจากบ่มสารสกัดรังนกที่ความเข้มข้น 1.5, 3, 15 และ 30 mg/mL กับเซลล์ primary human dermal fibroblasts เป็นเวลา 24 ชั่วโมง; * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $P<0.05$ หลังจากตรวจสอบด้วย One-Way ANOVA โดยใช้ Dunnett's multiple comparisons test เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดรังนกที่ความเข้มข้น 0 mg/mL (GraphPad Prism version 8.4.3)

(5.3) ผลการปกป้องเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ ของสารสกัดรังนกตัวอย่างจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

(1) วิธี MTT assay

การศึกษาผลของสารสกัดรังนกตัวอย่างต่อการลดการตายของเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ จากการกระตุ้นด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เพื่อดูความเป็นไปได้ในการปกป้องเซลล์จากอนุมูลอิสระไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ได้ทำการทดลองดังนี้ บ่มสารสกัดรังนกตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1.5, 3, 15 และ 30 mg/mL กับเซลล์ L929 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนด จึงเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 250 μM หลังจากนั้น หาค่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต (% relative cell viability) โดยทำการทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 3.1.3 (2) (Hamid et al., 2012) แสดงดัง ภาพที่ 3.20



ภาพที่ 3.20 ผลการปกป้องเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ จากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยวิธี MTT assay

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า P<0.05 หลังจากตรวจสอบด้วย One-Way ANOVA โดยใช้ Dunnett's multiple comparisons test เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่บ่มด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (250 μM; positive control) (GraphPad Prism version 8.4.3)

จากผลการทดลองพบว่า ร้อยละของเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ ที่มีชีวิตหลังจากบ่มกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 250 μM มีค่าเป็น 26.06 ± 2.97 % ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ ที่ไม่ได้บ่มกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งมีค่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเป็น 100 ± 8.56 % (P<0.05) แต่หลังจากบ่มสารสกัดรังนกตัวอย่างที่

ความเข้มข้นตั้งแต่ 1.5 ถึง 15 mg/mL ร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 250 µM ค่าร้อยละของเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ ที่มีชีวิตมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยมีค่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเป็น 30.23 ± 5.91, 42.67 ± 13.89 และ 59.62 ± 10.82 % สำหรับสารสกัดรังนกตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1.5, 3 และ 15 mg/mL ตามลำดับ และเฉพาะที่ความเข้มข้นของสารสกัดรังนกตัวอย่างเป็น 3 และ 15 mg/mL ที่ส่งผลให้ค่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเพิ่มขึ้นมากกว่าที่บ่มด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพียงอย่างเดียว อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) นอกจากนี้ เมื่อบ่มเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ กับสารสกัดรังนกตัวอย่างที่ความเข้ม 30 mg/mL ร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 250 µM ส่งผลให้ค่าร้อยละของเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ ที่มีชีวิต มีแนวโน้มลดลง (37.67 ± 8.68 %)

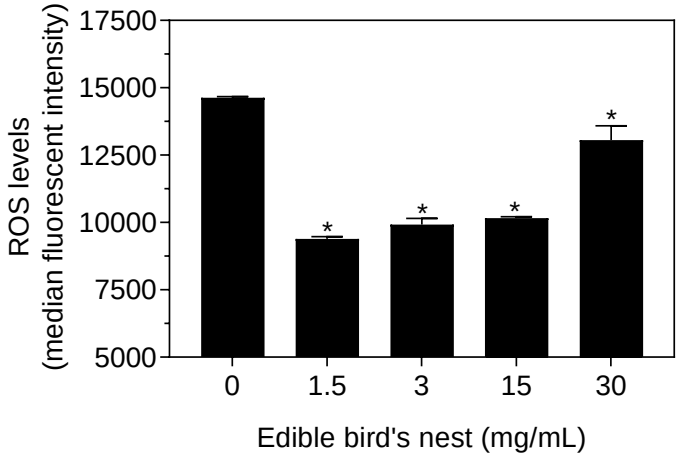
(2) วิธี flow cytometry

(2.1) การตรวจสอบออกซิเจนที่ไวต่อการทำปฏิกิริยา

ในการตรวจสอบออกซิเจนที่ไวต่อการทำปฏิกิริยา (reactive oxygen species: ROS) ในเซลล์ที่มีชีวิต (live cells) ได้ตรวจสอบด้วยวิธี flow cytometry (Amnis® imaging flow cytometer, part of EMD Millipore) โดยใช้ใช้ชุด kit (CellROX™ Green flow cytometry assay kits, C10492) ในการตรวจสอบ หลังจากบ่มเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ กับสารสกัดรังนกตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1.5, 3, 15 และ 30 mg/mL เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จึงเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 250 µM และบ่มต่ออีกเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง จึงเก็บเกี่ยวเซลล์ บ่มตะกอนเซลล์กับ CellROX® Green reagent ที่ 37°C, 5%CO_2 เป็นระยะเวลา 60 นาที หลังจากนั้น ตรวจสอบระดับออกซิเจนที่ไวต่อการทำปฏิกิริยาในเซลล์โดยใช้แหล่งกำเนิดแสงเลเซอร์ที่ความยาวคลื่น 488 nm สำหรับ excitation ของ CellROX® Green reagent และตรวจวัด single cells จำนวน 10,000 events ต่อ 1 ตัวอย่าง ระดับออกซิเจนที่ไวต่อการทำปฏิกิริยาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม IDEAS version 6.2 และรายงานผลเป็นค่าความเข้มของการเรืองแสง (median fluorescence intensity; MFI) ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 3.21 และภาพที่ 3.22

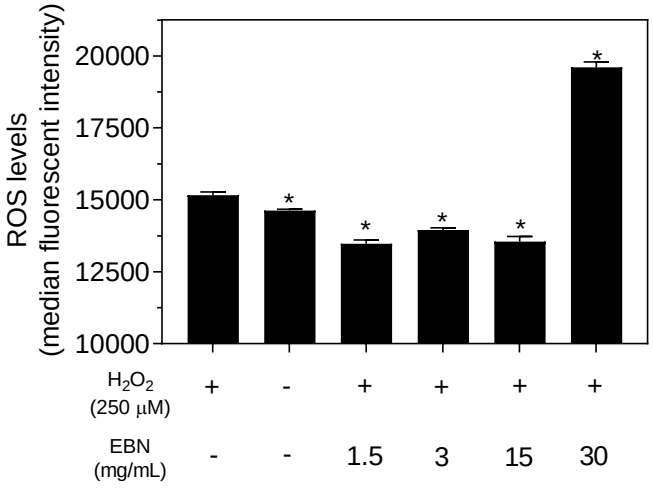
จากภาพที่ 3.21 พบว่า ระดับออกซิเจนที่ไวต่อการทำปฏิกิริยาในเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ หลังจากบ่มด้วยสารสกัดรังนกตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1.5 ถึง 30 mg/mL มีระดับออกซิเจนที่ไวต่อการทำปฏิกิริยา ซึ่งรายงานผลเป็นค่า MFI น้อยกว่าในเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ที่ไม่ได้บ่มด้วยสารสกัดรังนกตัวอย่าง (ความเข้มข้น 0 mg/mL) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยค่า MFI มีค่าเป็น 14628.08 ± 45.63, 9393.99 ± 82.76, 9920.15 ± 235.60, 10164.34 ± 51.23 และ

13058.02 ± 533.70 สำหรับที่ความเข้มข้นของสารสกัดรังนกตัวอย่าง เป็น 0, 1.5, 3, 15 และ 30 mg/mL ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า สารสกัดรังนกตัวอย่างที่ความเข้มข้น 30 mg/mL มีค่า MFI ที่มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นมากกว่าสารสกัดรังนกตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1.5, 3 และ 15 mg/mL



ภาพที่ 3.21 ระดับออกซิเจนที่ไวต่อการทำปฏิกิริยาในเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ หลังจากบ่มด้วยสารสกัดรังนกตัวอย่าง

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า P<0.05 หลังจากตรวจสอบด้วย One-Way ANOVA โดยใช้ Dunnett's multiple comparisons test เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ 0 mg/mL (GraphPad Prism version 8.4.3)



ภาพที่ 3.22 ระดับออกซิเจนที่ไวต่อการทำปฏิกิริยาในเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ หลังจากบ่มด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และสารสกัดรังนกตัวอย่าง

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า P<0.05 หลังจากตรวจสอบด้วย One-Way ANOVA โดยใช้ Dunnett's multiple comparisons test เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่บ่มด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (250 μM; positive control) (GraphPad Prism version 8.4.3)

จากภาพที่ 3.22 พบว่า ระดับออกซิเจนที่ไวต่อการทำปฏิกิริยาในเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ หลังจากบ่มกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 250 µM มีค่า MFI เป็น 15162.03 ± 107.13 ซึ่งมีค่าสูงกว่าเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ ที่ไม่ได้บ่มกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (ค่า MFI เป็น 14628.08 ± 45.63) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) แต่หลังจากบ่มสารสกัดรังนกตัวอย่างที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 1.5 ถึง 15 mg/mL ร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 250 µM ค่า MFI มีแนวโน้มลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ ที่บ่มด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพียงอย่างเดียว ($P<0.05$) โดยมีค่า MFI เป็น 13468.91 ± 140.14, 13954.61 ± 75.84 และ 13549.44 ± 179.44 สำหรับสารสกัดรังนกตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1.5, 3 และ 15 mg/mL ตามลำดับ นอกจากนี้ เมื่อบ่มเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ กับสารสกัดรังนกตัวอย่างที่ความเข้ม 30 mg/mL ร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 250 µM ส่งผลให้ค่า MFI มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น (19604.26 ± 191.63)

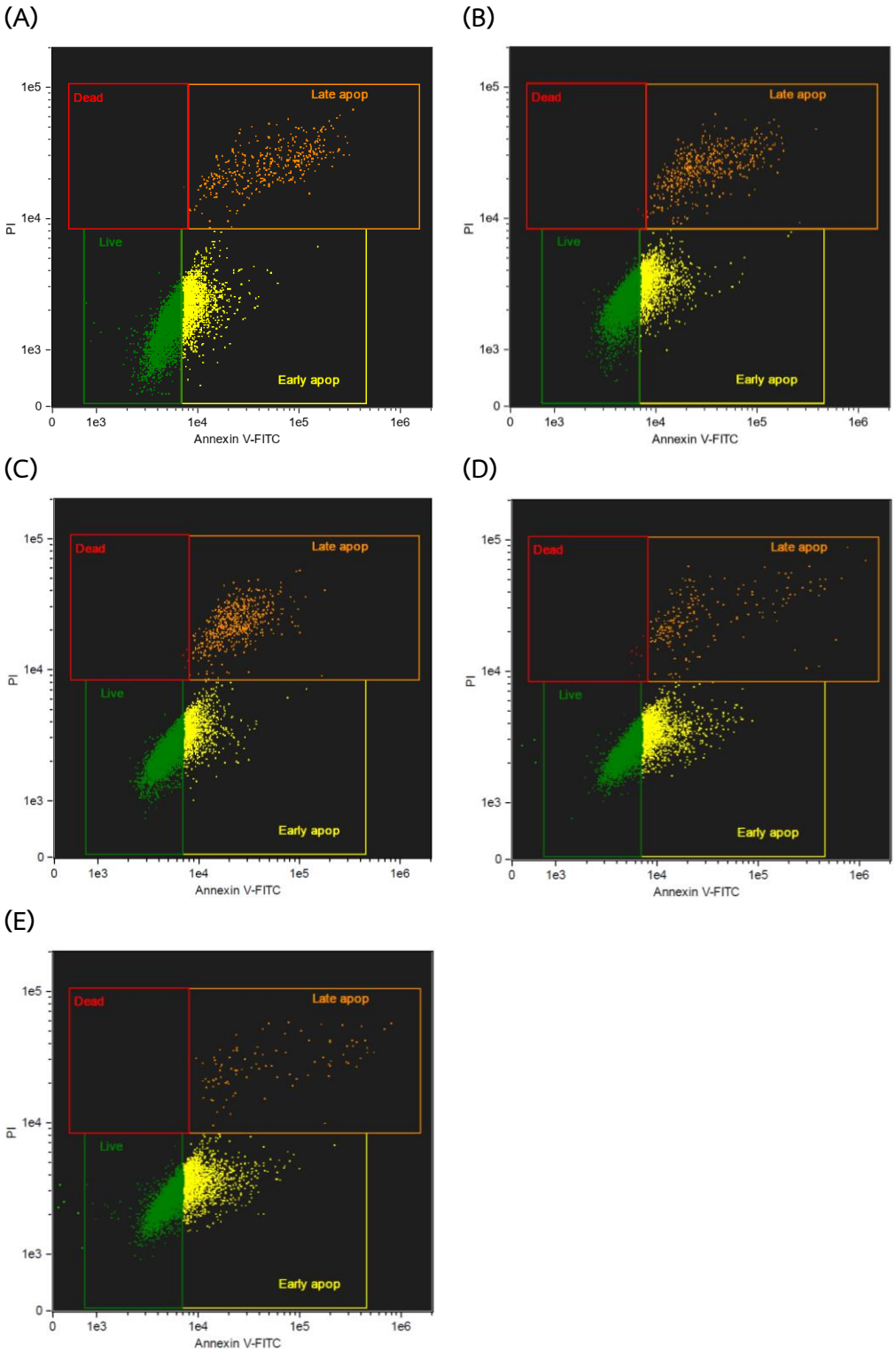
(2.2) การตรวจสอบอะพอพโทซิส

การตรวจสอบอะพอพโทซิส (apoptosis) ได้ตรวจสอบด้วยวิธี flow cytometry (Amnis® imaging flow cytometer, part of EMD Millipore) โดยใช้ชุด kit (Dead cell apoptosis kit with annexin V FITC and PI, V13242) ในการตรวจสอบ ซึ่งชุด kit นี้ประกอบด้วยโปรตีน annexin V ที่เชื่อมต่อกับสี FITC (annexin V-FITC; เรืองแสงสีเขียว) และสี propidium iodide (PI; เรืองแสงสีแดง) ในเซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิส (apoptotic cells) phosphatidylserine ซึ่งอยู่ที่เยื่อหุ้มพลาสมา (plasma membrane) ชั้นใน (inner side) จะย้ายมาอยู่ในชั้นนอก (outer side) ของเยื่อหุ้มพลาสมา ทำให้สามารถจับกับโปรตีน annexin V ซึ่งเป็นโปรตีนที่จับกับ phosphatidylserine ได้อย่างจำเพาะเจาะจง (Pietkiewicz et al., 2015; Vermes et al., 1995) สำหรับสี PI เป็นสีที่สามารถจับได้อย่างจำเพาะเจาะจงกับกรดนิวคลีอิกภายในเซลล์ แต่สี PI ไม่สามารถผ่านเยื่อหุ้มพลาสมาได้ (Pietkiewicz et al., 2015) หลังจากย้อมเซลล์ด้วยสี annexin V-FITC และ PI ในเซลล์มีชีวิต (live cells) ซึ่งมีรูปร่างกลม (round morphology) หลังจากตรวจสอบในช่อง bright field channel ของเครื่อง imaging flow cytometer ให้ผลลบของทั้งสี annexin V-FITC และ PI สำหรับเซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิสในระยะเริ่มต้น (early apoptotic cells) ซึ่งไม่มีรูปร่างกลม ให้ผลบวกของสี annexin V-FITC และให้ผลลบของสี PI เซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิสในระยะหลัง (late apoptotic cells) และเซลล์ตาย ให้ผลบวกของทั้งสี annexin V-FITC และ PI

หลังจากบ่มเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ กับสารสกัดรังนกตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1.5, 3, 15 และ 30 mg/mL เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จึงเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 250 µM และบ่มต่ออีกเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง จึงเก็บเกี่ยวเซลล์ บ่มตะกอนเซลล์กับสี annexin V-FITC และ PI ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้น ตรวจสอบอะพอพโทซิสโดยใช้แหล่งกำเนิดแสงเลเซอร์ที่ความยาวคลื่น 488 nm สำหรับ excitation ของสี annexin V-FITC และ PI และตรวจวัด single cells จำนวน 10,000 events ต่อ 1 ตัวอย่าง วิเคราะห์ผลอะพอพโทซิสโดยใช้โปรแกรม IDEAS version 6.2 และรายงานผลเป็นจำนวน (count) เซลล์มีชีวิต เซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิสในระยะเริ่มต้น เซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิสในระยะหลัง และเซลล์ตาย ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 3.23 ภาพที่ 3.24 ภาพที่ 3.25 และภาพที่ 3.26

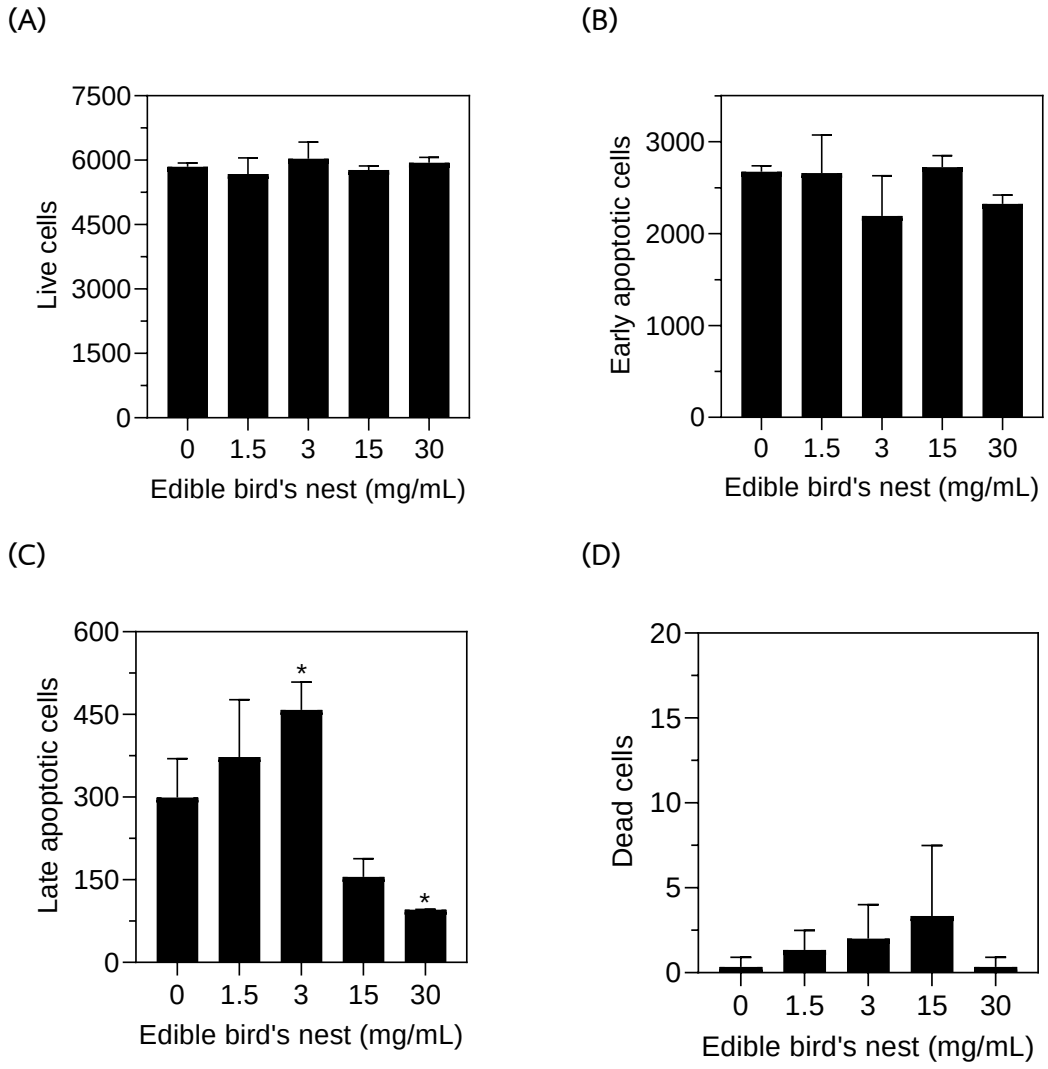
พบว่า ผลการตรวจสอบอะพอพโทซิสด้วยวิธี flow cytometry หลังจากบ่มเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ ด้วยสารสกัดรังนกตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0 mg/mL (ภาพที่ 3.23A) 1.5 mg/mL (ภาพที่ 3.23B) 3 mg/mL (ภาพที่ 3.23C) 15 mg/mL (ภาพที่ 3.23D) และ 30 mg/mL (ภาพที่ 3.23E) โดยเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดรังนกตัวอย่างเพิ่มขึ้น ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของจำนวนเซลล์มีชีวิต (ภาพที่ 3.24A) เซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิสในระยะเริ่มต้น (ภาพที่ 3.24B) และเซลล์ตาย (ภาพที่ 3.24D) เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดรังนกตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0 mg/mL ($P<0.05$) แต่พบว่า สารสกัดรังนกตัวอย่างที่ความเข้มข้น 15 และ 30 mg/mL มีแนวโน้มลดจำนวนเซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิสในระยะหลังลง โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นที่ 30 mg/mL ที่ลดจำนวนเซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิสในระยะหลังลงได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดรังนกตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0 mg/mL (ภาพที่ 3.24C; $P<0.05$)

นอกจากนี้ ภาพที่ 3.25 แสดงผลการตรวจสอบอะพอพโทซิสด้วยวิธี flow cytometry หลังจากบ่มเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 250 µM อย่างเดียว (ภาพที่ 3.25B) และบ่มร่วมกับสารสกัดรังนกตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1.5 mg/mL (ภาพที่ 3.25C) 3 mg/mL (ภาพที่ 3.25D) 15 mg/mL (ภาพที่ 3.25E) และ 30 mg/mL (ภาพที่ 3.25F) พบว่า เฉพาะสารสกัดรังนกตัวอย่างที่ความเข้มข้น 15 และ 30 mg/mL สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์มีชีวิต (ภาพที่ 3.26A) และลดจำนวนเซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิสในระยะเริ่มต้น (ภาพที่ 3.26B) เซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิสในระยะหลัง (ภาพที่ 3.26C) และเซลล์ตาย (ภาพที่ 3.26D) ลงได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ ที่บ่มด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 250 µM เพียงอย่างเดียว



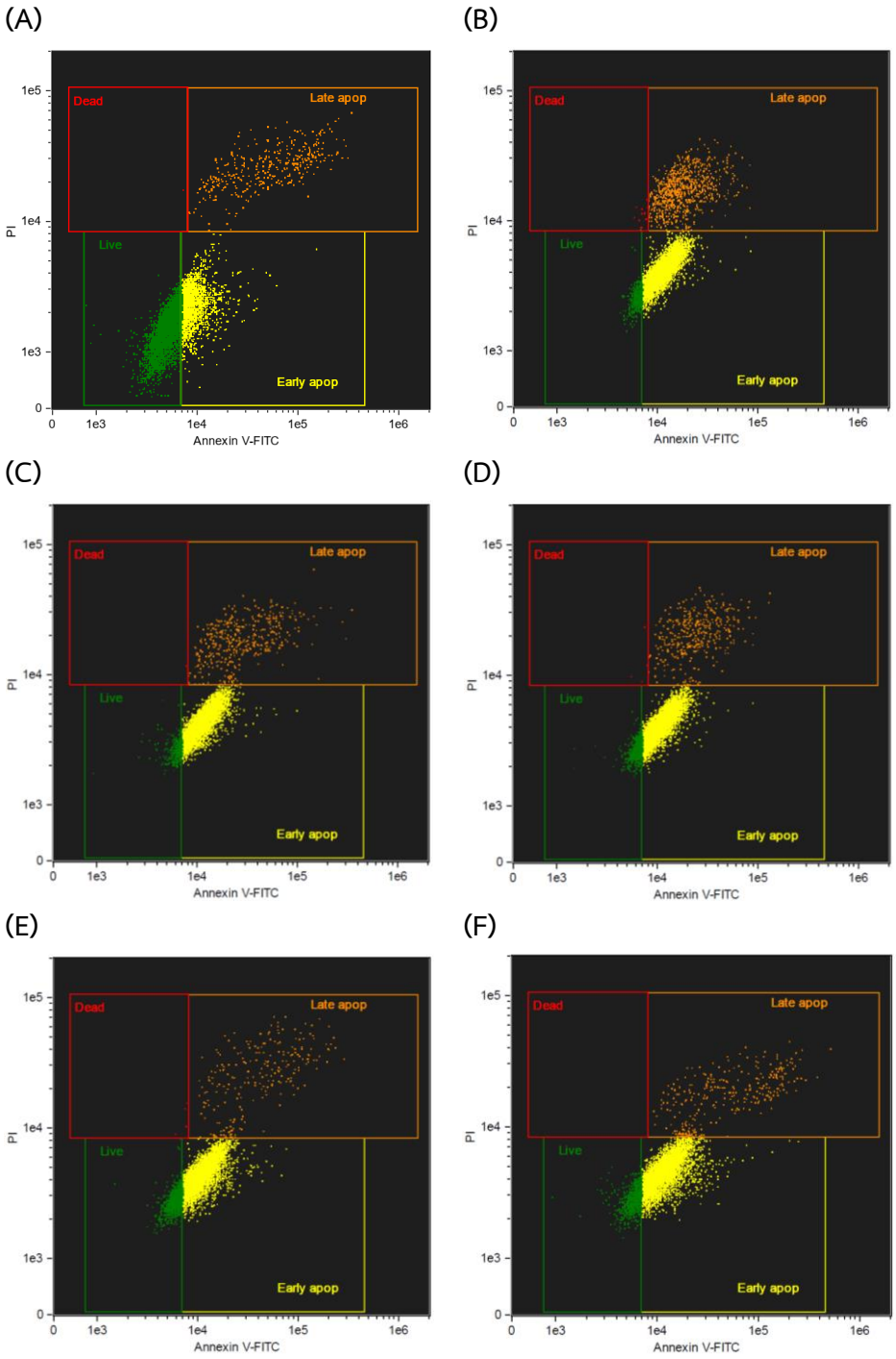
<u>ภาพที่</u> 3.23 ผลการตรวจสอบอะพอพโทซิสด้วยวิธี flow cytometry หลังจากบ่มด้วยสารสกัดรังนกตัวอย่าง

การตรวจสอบอะพอพโทซิสด้วยวิธี flow cytometry หลังจากบ่มเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ กับสารสกัดรังนกตัวอย่างที่ความเข้มข้น (A) 0 mg/mL (B) 1.5 mg/mL (C) 3 mg/mL (D) 15 mg/mL และ (E) 30 mg/mL และตรวจสอบอะพอพโทซิสด้วย dead cell apoptosis kit (V13242) ซึ่งย้อมเซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิสด้วยสีย้อม annexin V-FITC และย้อมเซลล์ตายด้วยสีย้อม propidium iodide (PI)



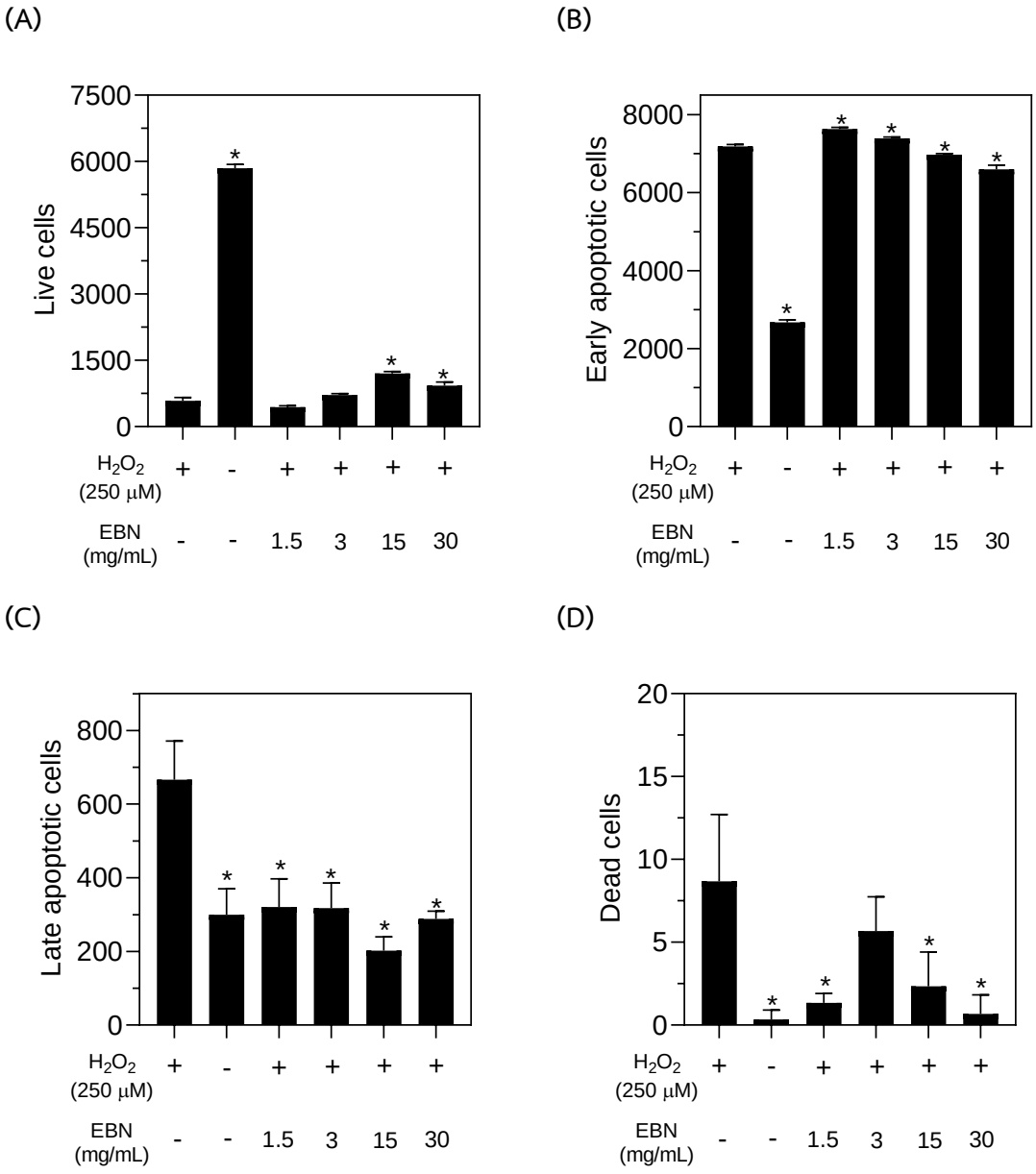
<u>ภาพที่</u> 3.24 จำนวนเซลล์มีชีวิต เซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิสในระยะเริ่มต้น เซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิสในระยะหลัง และเซลล์ตายหลังจากบ่มด้วยสารสกัดรังนกตัวอย่าง

จำนวน (A) เซลล์มีชีวิต (B) เซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิสในระยะเริ่มต้น (C) เซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิสในระยะหลัง และ (D) เซลล์ตาย หลังจากบ่มด้วยสารสกัดรังนกตัวอย่าง; * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $P<0.05$ หลังจากตรวจสอบด้วย One-Way ANOVA โดยใช้ Dunnett's multiple comparisons test เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่บ่มที่ความเข้มข้น 0 mg/mL (GraphPad Prism version 8.4.3)



ภาพที่ 3.25 ผลการตรวจสอบอะพอพโทซิสด้วยวิธี flow cytometry หลังจากบ่มด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และสารสกัดรังนกตัวอย่าง

การตรวจสอบอะพอพโทซิสด้วยวิธี flow cytometry หลังจากบ่มเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และสารสกัดรังนกตัวอย่าง โดย (A) 0 mg/mL EBN (B) 250 µM H_2O_2 (C) 1.5 mg/mL EBN + 250 µM H_2O_2 (D) 3 mg/mL EBN + 250 µM H_2O_2 (E) 15 mg/mL EBN + 250 µM H_2O_2 และ (F) 30 mg/mL EBN + 250 µM H_2O_2 เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง และตรวจสอบอะพอพโทซิสด้วย dead cell apoptosis kit (V13242) ซึ่งย้อมเซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิสด้วยสีย้อม annexin V-FITC และย้อมเซลล์ตายด้วยสีย้อม propidium iodide (PI)

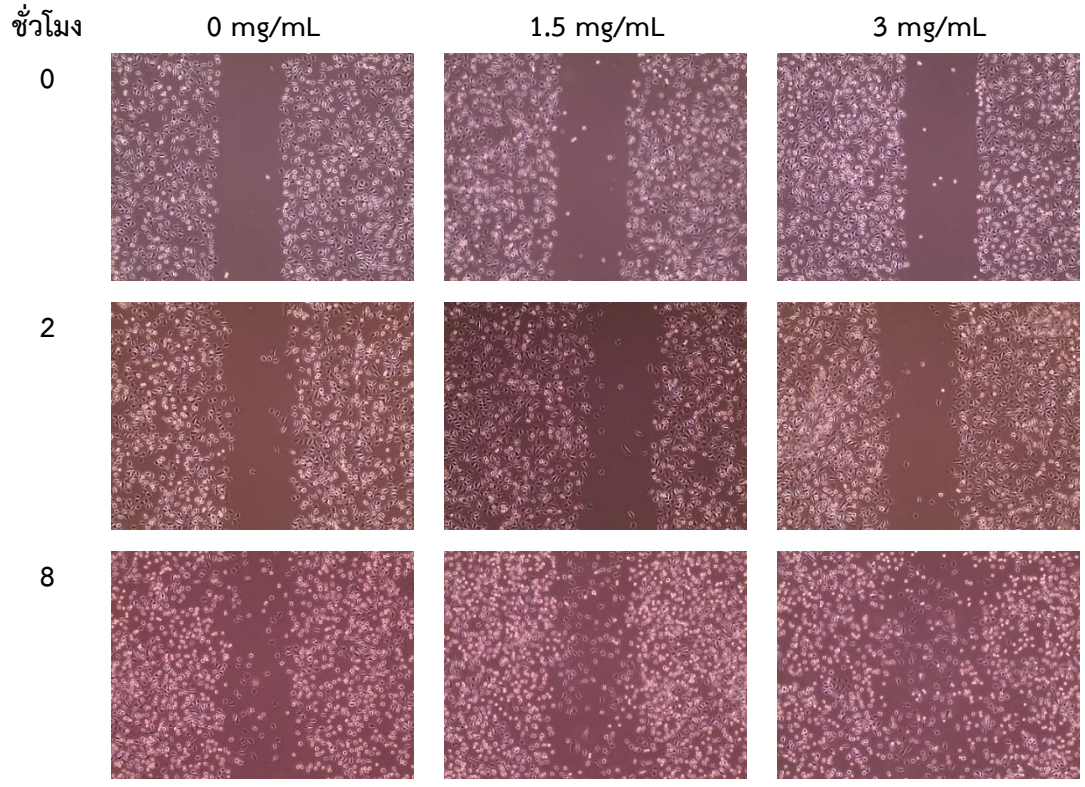


<u>ภาพที่</u> 3.26 จำนวนเซลล์มีชีวิต เซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิสในระยะเริ่มต้น เซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิสในระยะหลัง และเซลล์ตายหลังจากบ่มด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และสารสกัดรังนกตัวอย่าง

จำนวน (A) เซลล์มีชีวิต (B) เซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิสในระยะเริ่มต้น (C) เซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิสในระยะหลัง และ (D) เซลล์ตาย หลังจากบ่มเซลล์ L929 fibroblasts ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 250 μM และสารสกัดรังนกตัวอย่าง; * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $P<0.05$ หลังจากตรวจสอบด้วย One-Way ANOVA โดยใช้ Dunnett's multiple comparisons test เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่บ่มด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (250 μM; positive control) (GraphPad Prism version 8.4.3)

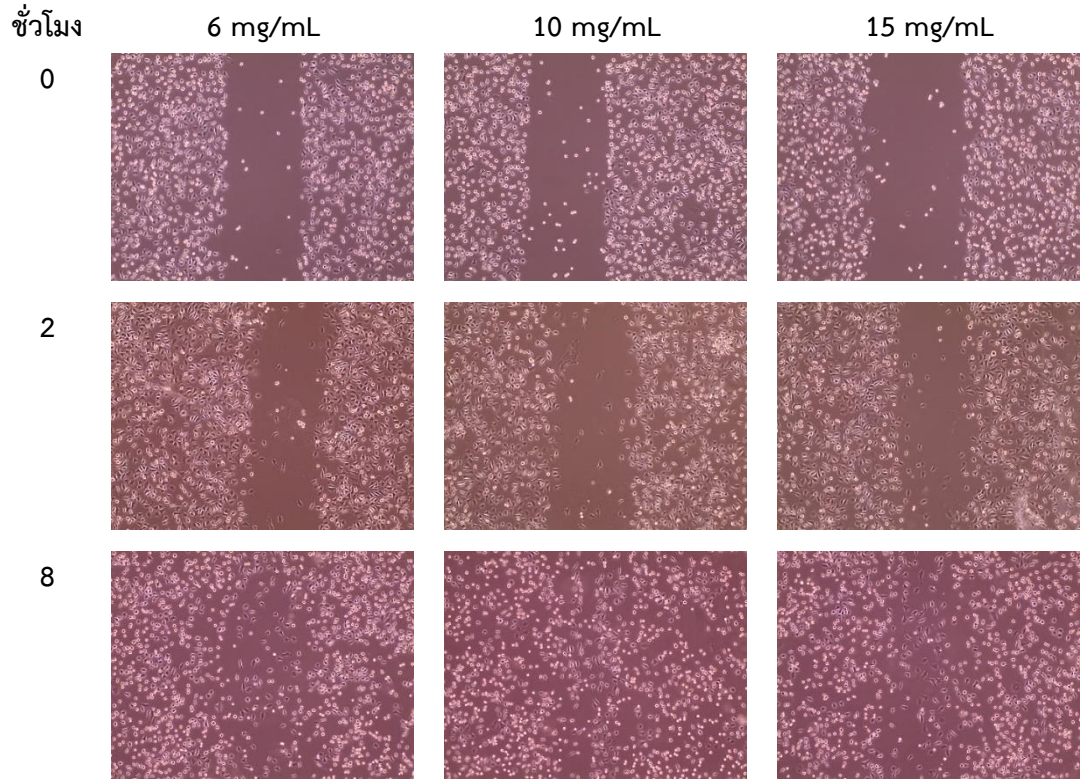
(6) การตรวจสอบผลการสมานแผลในเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบบลาสท์ โดยวิธี *in vitro* scratch assay

การตรวจสอบผลการสมานแผล (wound healing) ในเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบบลาสท์ ได้ทำตามวิธี *in vitro* scratch assay ของ Liang et al. (2007) ดังนี้ หลังจากเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบบลาสท์ ที่ 37°C, 5% CO_2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำให้เซลล์เกิดรอยขีด (scratch) โดยการใช้ทิป ขนาด 200 µL ขีดเป็นแนวยาวลงบนเซลล์ ล้างเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 1 mL จำนวน 1 ครั้ง หลังจากนั้นบ่มเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบบลาสท์ กับสารสกัดรังนกตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1.5, 3, 6, 10 และ 15 mg/mL ถ่ายรูปรอยขีดที่เวลาเริ่มต้น เปรียบเทียบกับรอยขีดที่เวลา 2 และ 8 ชั่วโมง (Liang et al., 2007) ดังแสดงใน<u>ภาพที่</u> 3.27



<u>ภาพที่</u> 3.27 การตรวจสอบผลการสมานแผลในเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบบลาสท์ โดยวิธี *in vitro* scratch assay

ผลการสมานแผลของสารสกัดรังนกตัวอย่างในเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบบลาสท์ ได้ทำตามวิธี *in vitro* scratch assay หลังจากทำให้เซลล์ L929 fibroblasts เกิดรอยขีด จึงบ่มเซลล์กับสารสกัดรังนกตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1.5, 3, 6, 10 และ 15 mg/mL และถ่ายรูปรอยขีดที่เวลาเริ่มต้น เปรียบเทียบกับที่เวลา 2 และ 8 ชั่วโมง



ภาพที่ 3.27 การตรวจสอบผลการสมานแผลในเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบบลาสท์ โดยวิธี *in vitro* scratch assay (ต่อ)

พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 8 ชั่วโมง เซลล์ที่ขอบของรอยขีดจะเคลื่อนตัวเข้าหาช่องว่างในรอยขีดเพื่อปิดช่องว่างของรอยขีด โดยเฉพาะเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบบลาสท์ ที่บ่มด้วยสารสกัดรังนกตัวอย่างที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 1.5 mg/mL มีแนวโน้มปิดช่องว่างของรอยขีดได้ชัดเจนกว่าเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบบลาสท์ ที่ไม่ได้บ่มด้วยสารสกัดรังนกตัวอย่าง (0 mg/mL)

3.2.5 การเตรียมเครื่องสำอางที่ประกอบด้วยสารสกัดรังนก

จากการทดลองข้างต้นพบว่า ความเข้มข้นของสารสกัดรังนกที่เหมาะสม ในการนำมาเตรียมผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง โดยอ้างถึงผลการทดสอบการออกฤทธิ์ของรังนกตัวอย่าง คือ ช่วง 10-15 mg/mL โดยในการศึกษาครั้งนี้ ได้เตรียมผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ได้แก่ สบู่กลีเซอรีนสารสกัดรังนก เซรั่มสารสกัดรังนก และครีมสารสกัดรังนก ซึ่งมีวิธีการเตรียม ดังนี้

(1) สบู่กลีเซอรีนสารสกัดรังนก

สูตรสบู่กลีเซอรีนสารสกัดรังนก (ตารางที่ 3.6) และวิธีเตรียมสูตรสบู่กลีเซอรีนสารสกัดรังนกมีดังนี้

ตารางที่ 3.6 สูตรสบู่กลีเซอรีนสารสกัดรังนก

ส่วนประกอบ	%
Part A	
1. water	2.4
2. สารสกัดรังนก (60 mg/mL)	25
3. sodium chloride	2
Part B	
1. glycerin soap	70
Part C	
1. fragrance	0.6

วิธีเตรียม

1. ละลายส่วนประกอบใน Part A เข้าด้วยกัน
2. หลอมส่วนประกอบใน Part B จนละลาย
3. เทส่วนประกอบใน Part A ลงใน Part B และคนให้เข้ากัน
4. เทส่วนประกอบใน Part C ลงในข้อ 3 และคนให้เข้ากัน
5. เทสารผสมในข้อ 4 ลงเบ้าที่เตรียมไว้
6. ทิ้งไว้จนเย็น แล้วจึงแกะสบู่กลีเซอรีนออกจากเบ้า
7. ผลิตภัณฑ์ต้นแบบสบู่กลีเซอรีนสารสกัดรังนก แสดงดังภาพที่ 3.28

ภาพที่ 3.28 ผลิตภัณฑ์ต้นแบบสบู่กลีเซอรีนสารสกัดรังนก

(2) เซรั่มสารสกัดรังนก

ในการเตรียมเซรั่มสารสกัดรังนก ได้เตรียมด้วยวิธี cold process ซึ่งขึ้นรูปด้วยโพลิเมอร์กึ่งสำเร็จรูปที่มีความสามารถเพิ่มความหนืดให้กับสูตร สามารถประสานน้ำกับน้ำมันได้ และช่วยเพิ่มความคงตัวให้กกับสูตรตำรับ ทำให้ได้เนื้อเซรั่มที่มีเนื้อเนียน ลักษณะขาวขุ่น ซึ่งมีสูตรเซรั่มสารสกัดรังนก (ตารางที่ 3.7) และวิธีเตรียมสูตรเซรั่มสารสกัดรังนก ดังนี้

ตารางที่ 3.7 สูตรเซรั่มสารสกัดรังนก

ส่วนประกอบ	%
Part A	
1. water	67.6
2. สารสกัดรังนก (60 mg/mL)	25
3. glycerin	2
4. sodium hyaluronate	1
5. disodium EDTA	0.2
Part B	
1. viscolam AT 100P	2
2. caprylic/capric triglyceride	1
3. fragrance	0.6
Part C	
1. preservative	0.6

วิธีเตรียม

1. ชั่งส่วนผสมใน Part A ใส่ในภาชนะและคนให้เข้ากัน
2. ผสมส่วนผสมใน Part B ใส่ในอีกภาชนะและคนให้เข้ากัน
3. ค่อย ๆ เท Part B ลงใน Part A ทีละนิด พร้อมกับค่อย ๆ กวนให้ Part B เข้ากับ Part A ทีละนิดไปเรื่อย ๆ
4. เติม Part C ลงในข้อ (3) พร้อมคนให้เข้ากัน
5. ผลิตภัณฑ์ต้นแบบเซรั่มสารสกัดรังนก แสดงดังภาพที่ 3.29

ภาพที่ 3.29 ผลิตภัณฑ์ต้นแบบเซรั่มสารสกัดรังนก

(3) ครีมสารสกัดรังนก

ในการเตรียมครีมสารสกัดรังนก ได้เตรียมด้วยวิธี hot process ซึ่งมีสูตรครีมสารสกัดรังนก (ตารางที่ 3.8) และวิธีเตรียมสูตรครีมสารสกัดรังนก ดังนี้

ตารางที่ 3.8 สูตรครีมสารสกัดรังนก

ส่วนประกอบ	%
Part A	
1. water	52.9
2. สารสกัดรังนก (60 mg/mL)	25
3. propylene glycol	3
4. sodium hyaluronate	1
5. disodium EDTA	0.2
6. tween 80	3
7. Carbopol	0.2
8. Triethanolamine	0.5
Part B	
1. mineral oil	5
2. cetearyl alcohol	5
3. white beewax	1
4. span 80	2
Part C	
1. preservative	0.6
2. fragrance	0.6

<u>วิธีเตรียม</u>

1. ชั่งส่วนผสมใน Part A ใส่ในภาชนะและละลายให้เข้ากัน
2. ละลายส่วนผสมใน Part B ในอีกภาชนะที่อุณหภูมิ 70-75°C
3. อุ่นส่วนผสมใน Part A ให้ได้อุณหภูมิ 70-75°C
4. เทส่วนผสมใน Part A ลงใน Part B และปั่นให้เข้ากัน จนอุณหภูมิลดลง 40-50°C
5. เติม Part C ลงในข้อ (4) พร้อมคนให้เข้ากัน
6. ผลิตภัณฑ์ต้นแบบครีมสารสกัดรังนก แสดงดังภาพที่ 3.30

<u>ภาพที่</u> 3.30 ผลิตภัณฑ์ต้นแบบครีมสารสกัดรังนก

บทที่ 4
อภิปรายผลการทดลอง

4.1 ลักษณะทางกายภาพของรังนกตัวอย่าง

สีของรังนกมีความสำคัญมากต่อการเลือกของผู้บริโภค ซึ่งผู้บริโภคนิยมรังนกที่มีสีแดงหรือสีเหลือง เนื่องจากเชื่อว่ามีปริมาณสารอาหารและเกลือแร่ในปริมาณสูง ส่งผลให้รังนกที่มีสีแดงหรือสีเหลืองมีราคาสูงกว่ารังนกที่มีสีขาว (Quek et al., 2018) ค่าพารามิเตอร์ที่ใช้ในการวัดค่าสี ได้แก่ ค่า L* บ่งบอกความสว่าง ค่า a* บ่งบอกความเป็นสีแดง และค่า b* บ่งบอกความเป็นสีเหลือง (Quek et al., 2018)

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า รังนกจากแหล่งต่าง ๆ จะให้ค่าสีที่แตกต่างกัน โดยรังนกที่ได้จากจังหวัดอุดรธานีมีค่า L* น้อยที่สุด (51.67 ± 0.48) และมีค่า a* (0.18 ± 0.10) และค่า b* (11.49 ± 0.26) สูงที่สุด โดยค่า L* บ่งบอกความสว่าง ค่า a* บ่งบอกความเป็นสีแดง และค่า b* บ่งบอกความเป็นสีเหลือง และรังนกที่ได้จากจังหวัดเชียงใหม่มีค่า L* สูงที่สุด (55.78 ± 1.37) และค่า b* น้อยที่สุด (2.77 ± 0.55) เมื่อเปรียบเทียบกับรังนกจากจังหวัดอื่น ๆ สำหรับรังนกที่ได้จากจังหวัดอื่น ๆ ได้แก่ จังหวัดกระบี่ นราธิวาส สมุทรสงคราม และระยอง มีสีใกล้เคียงกัน

Quek et al. (2018) ได้เก็บตัวอย่างรังนกจำนวน 11 ตัวอย่างจากบริเวณต่าง ๆ ในประเทศมาเลเซีย ในปีค.ศ. 2013 และปีค.ศ. 2014 โดยเก็บทั้งจากบ้านรังนก (house) และจากถ้ำ (cave) ซึ่งเป็นนกแอ่นกินรัง 2 สปีชีส์ ได้แก่ *Aerodramus fuciphagus* และ *Aerodramus maximus* และเก็บบริเวณแถบคาบสมุทรมลายู (Peninsular Malaysia) หรือ แถบตะวันออกของประเทศมาเลเซีย (East Malaysia) พบว่า ค่าสีของรังนกขึ้นกับแหล่งที่เก็บ ได้แก่ จากบ้านรังนกหรือจากถ้ำ ชนิดของนกแอ่นกินรัง และลักษณะทางภูมิศาสตร์ของบริเวณที่เก็บ โดยตัวอย่างรังนกที่เก็บจากบ้านรังนก นกแอ่นกินรัง *A. fuciphagus* และเก็บบริเวณแถบคาบสมุทรมลายู มีค่า L* สูงกว่าตัวอย่างรังนกที่เก็บจากถ้ำ นกแอ่นกินรัง *A. maximus* และเก็บบริเวณแถบตะวันออกของประเทศมาเลเซีย นอกจากนี้ ตัวอย่างรังนกที่เก็บจากถ้ำและบริเวณแถบตะวันออกของประเทศมาเลเซีย จะมีสีเหลืองมากกว่าตัวอย่างรังนกที่เก็บจากบ้านรังนกและเก็บแถบบริเวณแถบคาบสมุทรมลายู ในขณะที่ตัวอย่างรังนกที่ได้จากนกแอ่นกินรัง *A. fuciphagus* มีสีแดงมากกว่าตัวอย่างรังนกที่ได้จากนกแอ่นกินรัง *A. maximus* (Quek et al., 2018)

4.2 ปริมาณสารฟีนอลิกรวม

สารฟีนอลิกเป็นสารเมแทบอไลต์ธรรมชาติ (natural metabolites) ซึ่งมีโครงสร้างประกอบด้วยวงแอโรเมติก (aromatic ring) ที่ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl) จำนวน 1 หมู่ หรือมากกว่า (Vuolo et al., 2018) มีหลายการศึกษา ได้ศึกษาถึงความสามารถของสารฟีนอลิกในการลดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ซึ่งภาวะนี้เกิดจากความไม่สมดุลระหว่างระบบต้านอนุมูลอิสระทั้งที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์และไม่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ (enzymatic and non-enzymatic antioxidant system) กับการเกิดออกซิเจนที่ไวต่อการทำปฏิกิริยา (reactive oxygen species: ROS) โดยภาวะดังกล่าวนำไปสู่การทำความเสียหายให้แก่สารโมเลกุลขนาดใหญ่ที่อยู่ในระดับเซลล์และอยู่ภายนอกเซลล์ (cellular and extracellular macromolecules) และสุดท้ายก่อให้เกิดความผิดปกติได้มากมาย เช่น โรคอ้วน โรคเบาหวาน โรคที่เกี่ยวกับหัวใจและหลอดเลือด (Vuolo et al., 2018)

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า ปริมาณสารฟีนอลิกรวมในสารสกัดรังนกตัวอย่างมีค่าอยู่ในช่วง ~4.16 ถึง 5.70 mg GAE/g รังนกแห้ง โดยปริมาณสารฟีนอลิกรวมในสารสกัดรังนกตัวอย่างจากจังหวัดเชียงใหม่มีค่าน้อยที่สุด (4.16 ± 0.10 mg GAE/g รังนกแห้ง) ตามด้วยจังหวัดกระบี่ (4.45 ± 0.03 mg GAE/g รังนกแห้ง) จังหวัดระยอง (4.90 ± 0.06 mg GAE/g รังนกแห้ง) จังหวัดนราธิวาส (5.48 ± 0.05 mg GAE/g รังนกแห้ง) จังหวัดสมุทรสงคราม (5.55 ± 0.07 mg GAE/g รังนกแห้ง) และจังหวัดอุดรธานี (5.70 ± 0.10 mg GAE/g รังนกแห้ง) ตามลำดับ

จากการศึกษาของ Quek et al. (2018) ซึ่งเก็บตัวอย่างรังนกจากหลาย ๆ แหล่งในประเทศมาเลเซีย พบว่า ปริมาณสารฟีนอลิกรวมของตัวอย่างรังนกทั้ง 11 ตัวอย่าง อยู่ในช่วง 2.79 ถึง 17.29 mg GAE/g EBN ขึ้นกับแหล่งที่เก็บ ได้แก่ จากบ้านรังนกหรือจากถ้ำ ชนิดของนกแอ่นกินรัง และลักษณะทางภูมิศาสตร์ของบริเวณที่เก็บ โดยปริมาณสารฟีนอลิกรวมของรังนกที่เก็บจากบ้านรังนกมีปริมาณสูงกว่าที่เก็บจากถ้ำถึง 5 เท่า นอกจากนี้ รังนกที่ได้จากนกแอ่นกินรัง *A. fuciphagus* มีปริมาณสารฟีนอลิกรวมสูงกว่ารังนกที่ได้จากนกแอ่นกินรัง *A. maximus* ถึง 5 เท่า รวมทั้ง รังนกที่เก็บจากแถบคาบสมุทรมลายู มีปริมาณสารฟีนอลิกรวมสูงกว่ารังนกที่เก็บจากแถบตะวันออกของประเทศมาเลเซียถึง 3 เท่า (Quek et al., 2018) อย่างไรก็ตามพบว่า ปริมาณสารฟีนอลิกรวมที่ตรวจพบในรังนกมีปริมาณสูงกว่าสารฟีนอลิกรวมที่ตรวจพบในอาหารอื่น ๆ เช่น ในน้ำผึ้ง และผักอื่น ๆ นอกจากนี้ยังพบว่า ปริมาณสารฟีนอลิกในสารสกัดรังนกยังมีความสัมพันธ์โดยตรงกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรังนกอีกด้วย (Quek et al., 2018)

4.3 ปริมาณกรดเซียลิก

กรดเซียลิกมีความสำคัญมากในการทำให้รังนกคงตัว และเป็นตัวบ่งชี้สำคัญที่ใช้ในการแบ่งเกรดของรังนก โดยกรดเซียลิกหลักที่ตรวจพบในรังนก คือ *N*-actylneuramic acid (Neu5Ac หรือ NANA) ซึ่งมีมากถึงร้อยละ 99 ของปริมาณกรดเซียลิกรวมที่ตรวจพบ (Hwang et al., 2020; Quek et al., 2018) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า ปริมาณกรดเซียลิกที่ตรวจพบในสารสกัดรังนกตัวอย่าง หลังจากเตรียมด้วยการต้มและปั่นเหวี่ยง และนำเฉพาะส่วนใสมาทดสอบ มีปริมาณกรดเซียลิกรวม (total sialic acid) อยู่ในช่วง ~7.22 ถึง 9.60 g/100 g รังนกแห้ง ซึ่งตรวจสอบด้วยวิธี periodate-resorcinol method (Jourdian et al., 1971) โดยปริมาณกรดเซียลิกในตัวอย่างรังนกตัวอย่างมีปริมาณใกล้เคียงกับที่รายงานโดย Quek et al. (2018) ซึ่งรายงานว่า ปริมาณกรดเซียลิกที่ตรวจพบในตัวอย่างรังนกที่เก็บในประเทศมาเลเซียมีปริมาณ 7.2 ถึง 13.6 g/100 g EBN แต่วิธีการตรวจสอบปริมาณกรดเซียลิกของการวิจัยครั้งนี้แตกต่างจากของ Quek et al. (2018) โดย Quek et al. (2018) ได้นำตัวอย่างรังนกปริมาณ 5 mg มาย่อยด้วยสารละลาย sodium bisulfate (ความเข้มข้น 0.5 M) ที่อุณหภูมิ 80°C เป็นระยะเวลา 30 นาที และตรวจสอบปริมณกรดเซียลิกด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) แต่ในการศึกษานี้ใช้วิธี periodate-resorcinol method ซึ่งนำสารสกัดรังนกมาย่อยด้วยกรด periodic เพื่อให้ได้สารที่ไม่มีสีแต่พร้อมที่จะทำปฏิกิริยากับสาร resorcinol เพื่อให้เกิดสี และวัดการเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 630 nm

ผลการตรวจปริมาณกรดเซียลิกในรังนกตัวอย่าง สรุปว่า วิธีการตรวจกรดเซียลิกของ บริษัทไทยเนส คอร์เปอร์เรชัน จำกัด ซึ่งใช้วิธีโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (HPLC Plus Isocratic Liquid Chromatograph system; STI501, Chaina) เพื่อตรวจวัดค่ากรดเซียลิก ซึ่งได้ค่า 10.325 ซึ่งนับว่าเป็นค่าที่สูง และเป็นไปตามค่ามาตรฐานปริมาณกรดเซียลิกในรังนกคุณภาพดี (G. K. Chan et al., 2013) ส่วนผลการตรวจปริมาณกรดเซียลิกในรังนกตัวอย่าง ที่ห้องปฏิบัติการหลักสูตร วท.บ.จุลชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ซึ่งใช้วิธีของ Jourdian et al. (1971) พบว่าได้ค่ากรดเซียลิก ต่ำกว่าของบริษัทไทยเนส คอร์เปอร์เรชัน จำกัด เนื่องจาก เป็นการตรวจกรดเซียลิกในส่วนใส (supernatant) และอาจมีกรดเซียลิกที่ยังไม่ละลายตกค้างอยู่ในส่วนตะกอน ในขณะที่ผลการตรวจกรดเซียลิกที่ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด ซึ่งตรวจตามวิธี Characterization and Standardization of Edible Birds Nest (EBN)-Determination of Sialic acid นั้นได้ค่าต่ำกว่าเกณฑ์ทั่วไป แสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ผลการตรวจปริมาณกรดเซียลิกในรังนกตัวอย่าง

(A) บริษัทไทยเนส คอร์เปอร์เรชัน จำกัด				(B) มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา		(C) บริษัทห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด		
ตัวอย่างรังนก	กรดเซียลิกรวม (%)	คุณภาพรังนก	ราคาซื้อขาย	แหล่งรังนกบ้าน	กรดเซียลิกรวม (%)	แหล่งรังนกบ้าน	กรดเซียลิกอิสระ (%)	
							(1)	(2)
1	2.237	ต่ำที่สุด	ถูกที่สุด	กระบี่	8.40	กระบี่	0.56	2.09
2	3.412	ต่ำที่สุด	ถูกที่สุด	นราธิวาส	7.22	นราธิวาส	0.69	2.45
3	4.235	ปานกลาง	ปานกลาง	สมุทรสงคราม	9.60	สมุทรสงคราม	0.54	1.90
4	4.520	ปานกลาง	ปานกลาง	ระยอง	7.74	ระยอง	0.57	1.77
5	6.496	ปานกลาง	ปานกลาง	อุดรธานี	8.74	อุดรธานี	0.74	1.56
6	10.289	สูงที่สุด	แพงที่สุด	เชียงใหม่	8.41	เชียงใหม่	0.57	1.81
7	10.566	สูงที่สุด	แพงที่สุด	ค่าเฉลี่ย	8.35			
8	10.613	สูงที่สุด	แพงที่สุด					
9	10.325	สูง	-					

(A) ผลตรวจปริมาณกรดเซียลิกในรังนกแห้งสะอาดในตลาดซื้อขายรังนก ตรวจที่ห้องปฏิบัติการบริษัทไทยเนส คอร์เปอร์เรชัน จำกัด ซึ่งคุณภาพของรังนกและราคาขึ้นอยู่กับปริมาณกรดเซียลิกที่ตรวจพบในรังนก ตัวอย่างที่ 9 คือ รังนกแห้งสะอาด 6 ตัวอย่างรวมกัน; (B) ผลตรวจปริมาณกรดเซียลิกของสารสกัดรังนกจากรังนกตัวอย่างที่ห้องปฏิบัติการหลักสูตร วท.บ. จุลชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา จ.สงขลา; (C) ผลตรวจปริมาณกรดเซียลิกของตัวอย่างรังนกที่ห้องปฏิบัติการบริษัทห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด โดย (1) เป็นรังนกดิบที่ยังไม่ทำความสะอาด และ (2) เป็นรังนกล้างสะอาด ทำให้สุก และบดเป็นผง

นอกจากนี้ Wong et al. (2018) ซึ่งได้นำรังนกจากหลาย ๆ ประเทศ รวมจำนวนตัวอย่างทั้งสิ้น 25 ตัวอย่าง และเตรียมรังนกโดยใช้ความร้อนช่วยในการสกัด หลังจากนั้นกรองส่วนเนื้อที่ไม่หลอมละลายออกไป เหลือเพียงส่วนใส และนำส่วนใสมาทดสอบหาปริมาณกรดเซียลิกอิสระ (free sialic acid) ด้วยวิธี LC-MS/MS จากการทดลองพบว่า รังนกขาวที่ได้จากประเทศต่าง ๆ มีปริมาณกรดเซียลิกอิสระอยู่ในช่วง 0.14-0.68 g/100 g EBN สำหรับรังนกเหลืองมีปริมาณกรดเซียลิกอิสระอยู่ในช่วง 0.30-0.48 g/100 g EBN และรังนกแดงมีปริมาณกรดเซียลิกอิสระสูงที่สุด โดยมีปริมาณอยู่ในช่วง 3.85-4.50 g/100 g EBN (Wong et al., 2018) Quek et al. (2018) ได้เก็บตัวอย่างรังนกจำนวน 11 ตัวอย่างจากบริเวณต่าง ๆ ในประเทศมาเลเซีย ในปีค.ศ. 2013 และปีค.ศ. 2014 โดยเก็บทั้งจากบ้านรังนก (house) และจากถ้ำ

(cave) พบว่า รังนกจากสายพันธ์ *A. fuciphagus* ที่เก็บจากบ้านรังนก ในบริเวณคาบสมุทรมลายูของประเทศมาเลเซีย มีปริมาณกรดเซียลิกสูงกว่ารังนกที่เก็บจากบริเวณอื่น ๆ ในประเทศมาเลเซีย (Quek et al., 2018) Lim et al. (2018) พบว่า ปริมาณกรดเซียลิกในสารสกัดรังนกที่เก็บจากรังนกบริเวณต่าง ๆ ในประเทศมาเลเซีย มีปริมาณที่แตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเนื่องจาก ฤดูในการเก็บรังนก โดยพบว่ารังนกที่เก็บในช่วงต้นและปลายฤดูฝนจะมีคุณภาพดีที่สุด นอกจากนี้พบว่า รังนกที่เก็บในระหว่างฤดูฝนจะมีปริมาณโปรตีนสูงกว่ารังนกที่เก็บในฤดูอื่นที่ไม่ใช่ฤดูฝน ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า ส่วนประกอบที่มีคุณค่าทางโภชนาการในรังนกจะมีปริมาณแตกต่างกันขึ้นกับบริเวณที่เก็บรังนก (Lim et al., 2018)

4.4 ปริมาณโปรตีน

รังนกประกอบด้วย โปรตีน คาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน และเกลือแร่ โดยส่วนประกอบหลักของรังนกคือ ไกลโคโปรตีน (Hou et al., 2015; Lim et al., 2018) ซึ่งมีปริมาณมากถึงร้อยละ 60 โดยน้ำหนัก (H. Kong et al., 2016) ไกลโคโปรตีนสามารถจับกับสารอนุมูลอิสระหรือสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ ส่งผลให้สามารถนำรังนกมาพัฒนาเป็นอาหารสำหรับสุขภาพเพื่อป้องกันโรคต่าง ๆ ได้ต่อไป (Hou et al., 2015)

จากการศึกษานี้ ตรวจสอบปริมาณโปรตีนในสารสกัดรังนกด้วยวิธี Bradford method พบว่า ปริมาณโปรตีนในสารสกัดรังนกตัวอย่างมีค่าอยู่ในช่วง ~2.78 ถึง 3.42 mg/g รังนกแห้ง ซึ่งน้อยกว่าที่รายงานโดย Quek et al. (2018) ทั้งนี้อาจเนื่องจาก การตรวจสอบปริมาณโปรตีนในการศึกษานี้ ได้ใช้ Bradford reagent ในการทดสอบ แต่การศึกษาของ Quek et al. (2018) ได้ตรวจหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Kjeldahl method ซึ่งรายงานว่า ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างรังนกจำนวน 11 ตัวอย่าง ที่เก็บจากบริเวณต่าง ๆ ในประเทศมาเลเซีย ในปีค.ศ. 2013 และปีค.ศ. 2014 มีปริมาณ 66.1 ถึง 68.4 g/100 g EBN (Quek et al., 2018) Zulkifli et al. (2019) ได้เตรียมสารสกัดรังนก (EBN hydrolysates) โดยใช้เอนไซม์อัลคาเลส (alcalase) ปาเปน (papain) และน้ำสับปะรด (papaya juice) ย่อย เปรียบเทียบกับสารสกัดรังนกที่เตรียมโดยการต้ม (bolied EBN) และตรวจสอบปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford method พบว่า ปริมาณโปรตีนของสารสกัดรังนกที่เตรียมด้วยการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส ปาเปน ละน้ำสับปะรดที่ใช้เวลาในการย่อยนาน 3 ชม. มีปริมาณ ~450, 607 และ 381 mg/g สารสกัดรังนก ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดรังนกที่เตรียมโดยการต้มมีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง ~3.75-4.18 mg/g สารสกัดรังนก ซึ่งน้อยกว่าปริมาณโปรตีนที่ตรวจพบในสารสกัดรังนกที่เตรียมโดยการใช้เอนไซม์ ทั้งนี้ Zulkifi et al. (2019) รายงานว่า เนื่องจากการต้มรังนกนั้น ไม่สามารถช่วยย่อยพันธะเปปไทด์ (peptide bond) ได้ ซึ่งแตกต่างกับการเตรียมสารสกัดรังนกโดยใช้เอนไซม์ ที่สามารถย่อยพันธะเปปไทด์ ส่งผลให้เพิ่มปริมาณโปรตีนในสารสกัดรังนกได้ (Zulkifli et al., 2019)

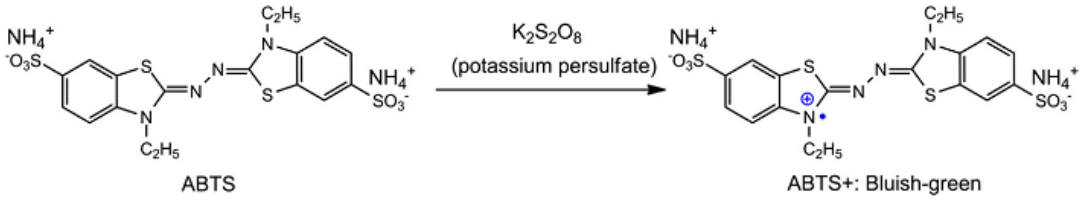
นอกจากนี้ หลาย ๆ การศึกษาได้ตรวจสอบโปรไฟล์กรดอะมิโน (amino acid profile) ของสารสกัดรังนก Chua et al. (2015) ได้วิเคราะห์กรดอะมิโนในรังนกดิบโดยใช้วิธีแกสโครมาโทกราฟฟี (gas chromatography) และใช้ flame ionization detector เป็นตัวตรวจวัด พบว่า กรดอะมิโนที่พบมากที่สุด 3 ลำดับแรก ได้แก่ กรดแอสพาร์ติก (aspartic acid) โพรลีน (proline) และทรีโอนีน (threonine) (Y. G. Chua et al., 2015) นอกจากนี้ Babji et al. (2018) ได้วิเคราะห์กรดอะมิโนของสารสกัดรังนกซึ่งเตรียมโดยการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (EBN hydrolysate) เปรียบเทียบกับรังนกดิบ พบว่า สารสกัดรังนกมีปริมาณกรดอะมิโนชนิดที่มีสารประกอบอะโรมาติก (aromatic amino acid) ได้แก่ ฮิสทิดีน (histidine) ฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) และไทโรซีน (tyrosine) และกรดมิโนอิสระ (free amino acid) เช่น วาลีน (valine) และทรีโอนีน สูงกว่าในรังนกดิบอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) (Babji et al., 2018) Zulkifli et al. (2019) รายงานว่า กรดอะมิโนไทโรซีนและฟีนิลอะลานีนมีส่วนสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ โดยโครงสร้างอินโดล (indole) และวงแหวนเบนซีน (benzene ring) ของกรดอะมิโนเหล่านี้สามารถให้โปรตอน (proton) แก่อนุมูลอิสระ ส่งผลให้อนุมูลอิสระคงตัว ดังนั้น ในสารสกัดรังนกซึ่งมีกรดอะมิโนดังกล่าว จึงมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ (Zulkifli et al., 2019) นอกจากความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของกรดอะมิโนที่ตรวจพบในรังนกแล้ว Hou et al. (2015) รายงานว่า หลังจากเตรียมสารสกัดรังนกด้วยวิธี ultrasonication แล้วจึงปั่นเหวี่ยง และนำเฉพาะส่วนใสมาทดสอบ พบว่า สารสกัดรังนกที่ความเข้มข้น 1,000 µg/mL มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ดีที่สุด เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี MTT assay และสามารถลดระดับอนุมูลออกซิเจนที่ไวต่อการทำปฏิกิริยาได้ โดยการเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส (superoxide dismutase: SOD) เมื่อตรวจสอบโดยการใช้ ELISA test ซึ่งเป็นไปได้ว่า ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรังนก เนื่องมาจากโปรตีนแลคโตเฟอร์ริน (lactoferrin) และโอโวทรานสเฟอร์ริน (ovotransferrin) ที่ตรวจพบในสารสกัดรังนก (Hou et al., 2015) ดังนั้น กรดอะมิโนและโปรตีนที่ตรวจพบในสารสกัดรังนก ส่งผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรังนก (Babji et al., 2018; Hou et al., 2015; Zulkifli et al., 2019)

4.5 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

(1) $ABTS^{\bullet+}$ scavenging assay

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรังนกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตรวจสอบด้วยวิธี $ABTS^{\bullet+}$ scavenging assay ในการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสำคัญมีวิธีการตรวจสอบได้หลายวิธี โดยในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้วิธี $ABTS^{\bullet+}$ scavenging assay เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายและใช้การวัดการ

เปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้น อนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ เกิดจากปฏิกิริยา oxidation ระหว่าง 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) และ potassium persulfate ได้สารละลายที่มีสีฟ้าเขียว ดังแสดงในภาพที่ 4.1 โดยอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 734 nm (Xiao et al., 2020) หลังจากที่อนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ รับอิเล็กตรอนจากสารต้านอนุมูลอิสระผ่านปฏิกิริยา reduction จะทำให้อนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ เปลี่ยนเป็น ABTS ซึ่งไม่มีสี หลังจากนั้น จึงวัดการเปลี่ยนแปลงของสีด้วยเครื่อง spectrophotometer (Re et al., 1999)



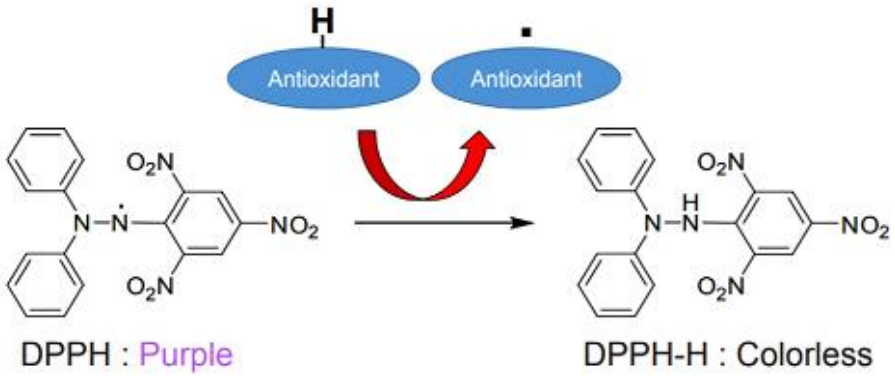
ภาพที่ 4.1 การเกิด $ABTS^{\bullet+}$ จากปฏิกิริยา oxidation ระหว่าง ABTS และ potassium persulfate ที่มา (Xiao et al., 2020)

จากผลที่ได้พบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรังนกตัวอย่างหลังจากทดสอบด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ เทียบกับสาร trolox อยู่ในช่วง ~4.63 ถึง 8.76 mg TE/g รังนกแห้ง ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับ Hou et al. (2015) (Hou et al., 2015) โดย Hou et al. (2015) รายงานว่า หลังจากเตรียมสารสกัดรังนกด้วยวิธี ultrasonication แล้วจึงปั่นเหวี่ยง และนำเฉพาะส่วนใสมาทดสอบพบว่า สารสกัดรังนกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ เทียบกับสาร trolox เป็น 5.23 ± 0.18 mg TE/g EBN

(2) $DPPH^{\bullet}$ scavenging assay

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ α,α-diphenyl-β-picrylhydrazyl ($DPPH^{\bullet}$) ถูกพัฒนาโดย Blois ในปี 1958 (Blois, 1958) วิธีนี้เป็นวิธีที่เร็ว ง่าย ไม่แพง และถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวาง (Kedare & Singh, 2011) อนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ เป็นอนุมูลอิสระที่มีความเสถียร (Blois, 1958) ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ อนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ ที่ละลายในเอทานอลได้สารละลายที่มีสีม่วงและสามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่นประมาณ 520 nm และเมื่อสารละลาย $DPPH^{\bullet}$ ผสมกับสารต้านอนุมูลอิสระ จะทำให้เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นไม่มีสีหรือสีเหลืองอ่อน ดังแสดงในภาพที่ 4.2 (Kedare & Singh, 2011; Xiao et al., 2020)

จากการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH• ของสารสกัดรังนกตัวอย่างพบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH• เทียบกับสาร trolox อยู่ในช่วง ~1.95 ถึง 2.60 mg TE/g รังนกแห้ง โดย Quek et al. (2018) ได้รายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH• เทียบกับกรดแอสคอร์บิก ซึ่งอยู่ในช่วง 1.57-3.76 mg AAE/g EBN โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH• นี้ อาจเนื่องมาจากหมู่ซัลฟ์ไฮดริล (sulfhydryl group) ในโมเลกุลกรดอะมิโนและหมู่ไฮดรอกซิลในสารประกอบฟีนอลิกที่ตรวจพบในสารสกัดรังนก (Quek et al., 2018)



ภาพที่ 4.2 ปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลอิสระ DPPH• และสารต้านอนุมูลอิสระ
ที่มา (Xiao et al., 2020)

(3) •OH scavenging assay

ในจำนวน ROS ทั้งหมดพบว่า •OH (hydroxyl radical) สามารถจับกับสายดีเอ็นเอโดยการจับกับบริเวณพันธะคู่ของเบสบนสายดีเอ็นเอ หรือโดยการแยกอะตอมไฮโดรเจนออกจากหมู่เมททิว (methyl group) ของเบสไทมีน (thymine) (Cooke et al., 2003; Evans et al., 2004) เป็นต้น โดยความเสียหายของดีเอ็นเอที่เกิดเนื่องจาก •OH (hydroxyl radical-induced DNA damage) นั้น ส่วนใหญ่จะเกิดที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 8 (C8) ของเบสกัวนีน ซึ่งจะทำให้เกิด 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-hydroxylguanine หรือ 8-oxoG) ซึ่งการเกิด 8-oxoG จะนำไปสู่การจับกันของ 8-oxoG กับเบสอะดินีน ซึ่งจะส่งผลให้เกิดเป็น G-to-T transversion mutations ต่อไป (David et al., 2007) เนื่องจาก •OH เป็นอนุมูลอิสระที่มีความรุนแรง (potent) ที่มีรายงานว่า มีความสัมพันธ์โดยตรงต่อการเกิดกระบวนการแก่ชรา (aging) (Poeggeler et al., 1993) ดังนั้น การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ •OH ของสารสกัดรังนกด้วยวิธี deoxyribose assay (Halliwell et al., 1987; Ramakrishna et al., 2012) จึงสามารถบอกได้ว่า หากสารสกัดรังนกสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ •OH ได้ ก็สามารถมีผลต้านการแก่ชราได้เช่นกัน

จากผลที่ได้พบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ •OH ของสารสกัดรังนกตัวอย่าง หลังจากทดสอบด้วยวิธี •OH scavenging assay มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ ~26.27 ถึง 56 บ่งบอกถึงความเป็นไปได้ในการนำสารสกัดรังนกมาใช้ในผลิตภัณฑ์ต้านการแก่ชราได้ต่อไป

4.6 ความเป็นพิษต่อเซลล์

ความเป็นพิษของสารสกัดรังนกตัวอย่างต่อเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสท์ (primary human dermal fibroblasts) ตรวจสอบด้วยวิธี MTT assay พบว่า เปอร์เซ็นต์ของเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสท์ที่มีชีวิตยังคงมากกว่า 80% ในช่วงความเข้มข้นของสารสกัดรังนกตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ (1.5, 3, 15 และ 30 mg/mL) บ่งบอกถึงความไม่เป็นพิษของสารสกัดรังนกตัวอย่างต่อเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสท์ในช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ

López-García et al. (2014) รายงานว่า ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตที่มากกว่าร้อยละ 80 บ่งบอกถึงความไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (non-cytotoxicity) ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตระหว่างร้อยละ 80-60 บ่งบอกถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับต่ำ (weak) ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตระหว่างร้อยละ 60-40 บ่งบอกถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับปานกลาง (moderate) และร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตที่น้อยกว่าร้อยละ 40 บ่งบอกถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับสูง (strong cytotoxicity) (López-García et al., 2014) ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่า ช่วงความเข้มข้นของสารสกัดรังนกตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ไม่ส่งผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับ Hou et al. (2015) ซึ่งได้ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดรังนกต่อเซลล์เพาะเลี้ยง human SH-SY5Y โดยพบว่า ความเข้มข้นของสารสกัดรังนกที่เตรียมด้วยวิธี ultrasonication แล้วปั่นเหวี่ยง และนำเฉพาะส่วนใสมาทดสอบ ตั้งแต่ 10-100,000 µg/mL ไม่ส่งผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง human SH-SY5Y โดยมีค่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตมากกว่าร้อยละ 80 ในช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ (Hou et al., 2015)

เอกสารข้อมูลความปลอดภัยสารเคมี (Material Safety Data Sheet: MSDS) คือ เอกสารที่ต้องระบุเกี่ยวกับความเป็นอันตราย ความเป็นพิษ วิธีใช้ การเก็บรักษาสารเคมี ฯลฯ ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดรังนกไม่เป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสท์ ดังนั้น สามารถระบุในเอกสารข้อมูลความปลอดภัยสารเคมี (MSDS) ได้ว่า สารสกัดรังนกไม่เป็นพิษ ไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ สารสกัดรังนกเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความปลอดภัย

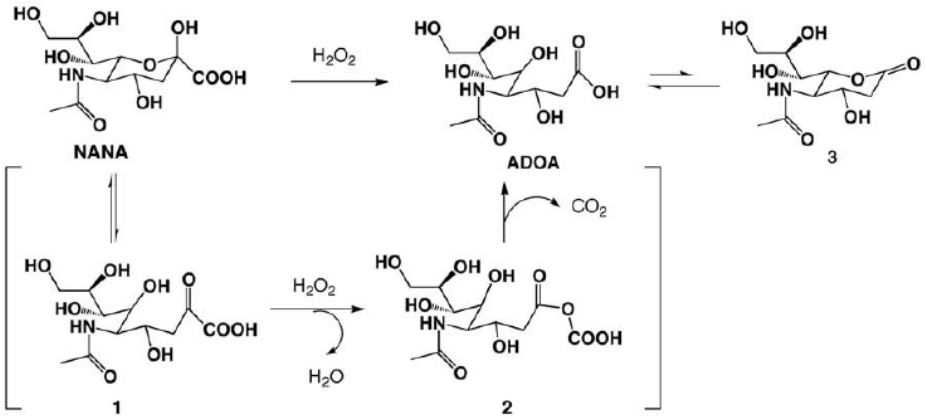
4.7 การปกป้องเซลล์

ในระหว่างกระบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน (aerobic respiration) เซลล์จะสร้างออกซิเจนที่ไวต่อการทำปฏิกิริยา (reactive oxygen species: ROS) อย่างต่อเนื่อง ได้แก่ superoxide anion (O_2^-), singlet oxygen (^1_2O), hydroxyl radicals ($^{\bullet}OH$), peroxides (ROOR′), hydroperoxides (ROOH) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หากออกซิเจนที่ไวต่อการทำปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น หลุดรอดออกมาจากสายโซ่การหายใจในไมโทคอนเดรีย (mitochondrial respiratory chain) ออกซิเจนที่ไวต่อการทำปฏิกิริยาเหล่านี้ จะทำลายเซลล์ ส่งผลให้เกิดการกลายพันธ์ (mutation) ของดีเอ็นเอ และอาจก่อให้เกิดมะเร็งในที่สุด ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นหนึ่งในออกซิเจนที่ไวต่อการทำปฏิกิริยาหลักที่เกิดขึ้นในเซลล์ โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในระดับต่ำส่งผลให้เกิดอะพอพโทซิส และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในระดับสูงส่งผลให้เกิดเนโครซิส (necrosis) หรืออะพอพโทซิสชนิดที่ไม่สัมพันธ์กับเอนไซม์เคสเปส (caspase-independent apoptosis) (Eruslanov & Kusmartsev, 2010)

การตรวจวัดระดับออกซิเจนที่ไวต่อการทำปฏิกิริยาภายในเซลล์สามารถทำได้หลายวิธี แต่วิธีที่ให้ผลที่ชัดเจนที่สุด คือการใช้โพรบฟลูออเรสเซนต์และโพรบเคมิลูมิเนสเซ็นต์ (chemiluminescence) ที่สามารถผ่านเยื่อหุ้มพลาสมาของเซลล์ได้ และตรวจวัดความเข้มแสงโดยการใช้วิธี flow cytometry หรือ fluorimetry สำหรับวิธี flow cytometry เป็นวิธีที่สามารถตรวจวัดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ภายในเซลล์มีชีวิตในขณะที่เซลล์อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้ และความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์ที่ตรวจวัดได้จากวิธี flow cytometry ขึ้นกับจำนวน (number) เซลล์ที่ปล่อยแสงฟลูออเรสเซนต์ ซึ่งแตกต่างจากการใช้วิธี fluorimetry ซึ่งผลที่ได้เป็นความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์รวมที่ได้จากเซลล์ทั้งที่ปล่อยและไม่ปล่อยแสงฟลูออเรสเซนต์ (Eruslanov & Kusmartsev, 2010)

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า สารสกัดรังนกตัวอย่างที่ความเข้มข้น 15 mg/mL มีแนวโน้มปกป้องเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์จากอนุมูลอิสระไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ดีที่สุด ซึ่งสามารถเพิ่มร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตหลังจากตรวจสอบด้วยวิธี MTT assay (ภาพที่ 3.20) ช่วยลดระดับออกซิเจนที่ไวต่อการทำปฏิกิริยาภายในเซลล์หลังจากตรวจสอบโดยใช้ CellROX® Green reagent และตรวจวัดความเข้มของการเรืองแสงด้วยวิธี flow cytometry (ภาพที่ 3.22) และสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์มีชีวิต ลดจำนวนเซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิสในระยะเริ่มต้น ลดจำนวนเซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิสในระยะหลัง และลดจำนวนเซลล์ตาย (ภาพที่ 3.26) ลงได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ที่บ่มด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 250 μM เพียงอย่างเดียว ($P<0.05$)

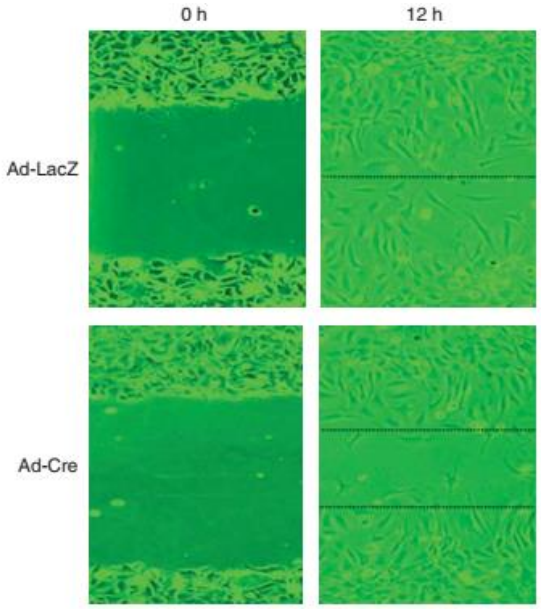
จากผลการปกป้องเซลล์ที่ได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Hou et al. (2015) ซึ่งรายงานว่า สารสกัดรังนกที่เตรียมด้วยวิธี ultrasonication แล้วปั่นเหวี่ยง และนำเฉพาะส่วนใสมาทดสอบ ที่ความเข้มข้น 10-1,000 µg/mL สามารถเพิ่มร้อยละของเซลล์เพาะเลี้ยง human SH-SY5Y ที่มีชีวิตหลังจากบ่มกับอนุมูลอิสระไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 250 µM ได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P<0.05$) โดยตรวจสอบด้วยวิธี MTT assay นอกจากนี้ยังพบว่า สารสกัดรังนกยังสามารถช่วยลดระดับอนุมูลออกซิเจนที่ไวต่อการทำปฏิกิริยา โดยการเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส โดย Hou et al. (2015) สรุปว่า ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของสารสกัดรังนก มาจากโปรตีนแลคโตเฟอร์รินและโอโวทรานสเฟอร์รินที่ตรวจพบในสารสกัดรังนก (Hou et al., 2015) นอกจากนี้ Ijima et al. (2004) รายงานว่า กรดเซียลิก โดยเฉพาะกรดเอ็น-อะเซทิลนิวรามินิก (*N*-acetylneuraminic acid: NANA) ซึ่งอยู่ที่ผิวเซลล์ (cell surface) และเยื่อเมือกบุผิว (mucosa) สามารถกำจัดอนุมูลอิสระไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ โดยกรดเอ็น-อะเซทิลนิวรามินิกทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่อัตราส่วน 1 ต่อ 1 ได้เป็นสาร 4-(-acetylamino)-2,4-di-deoxy-D-glycero-D-galacto-octonic acid (ADOA) ซึ่งถูกดีคาร์บอกซิเลท (decarboxylate) ร่วมกับน้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ ดังแสดงใน<u>ภาพที่</u> 4.3 (Iijima et al., 2004) เนื่องจากในการศึกษานี้ ตรวจพบปริมาณกรดเซียลิกรวมในสารสกัดรังนกตัวอย่างที่ ~7.22 ถึง 9.60 g/100 g รังนกแห้ง ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่า ผลการปกป้องเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์จากอนุมูลอิสระไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของสารสกัดรังนกตัวอย่าง อาจเนื่องมาจากกรดเซียลิกที่ตรวจพบในสารสกัดรังนกตัวอย่าง



<u>ภาพที่</u> 4.3 ปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันของกรดเอ็น-อะเซทิลนิวรามินิกโดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์
ที่มา (Iijima et al., 2004)

4.8 การสมานแผล

การตรวจสอบผลการสมานแผลในเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ ได้ใช้วิธี *in vitro* scratch assay ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย ค่าใช้จ่ายไม่สูง และเป็นวิธีที่สามารถใช้ในการตรวจสอบการเคลื่อนที่ของเซลล์ในหลอดทดลอง (*in vitro* cell migration) ได้ (Liang et al., 2007) ขั้นตอนสำคัญของวิธีนี้คือ การทำให้ cell monolayer เกิดรอยขีด (scratch) หลังจากนั้นถ่ายรูปรอยขีดที่เวลาเริ่มต้น และเปรียบเทียบกับรูปรอยขีดที่เวลาต่าง ๆ ดังแสดงในภาพที่ 4.4 โดยรอยขีดที่เกิดขึ้น จะทำให้ cell monolayer เกิดช่องว่างระหว่างกัน หลังจากนั้น เมื่อเวลาผ่านไป เซลล์ที่ขอบของรอยขีดจะเคลื่อนตัวเข้าหาช่องว่างในรอยขีดเพื่อปิดช่องว่างของรอยขีดนั้น ได้นำวิธีนี้มาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเซลล์กับเมทริกซ์นอกเซลล์ (cell-matrix interaction) และความสัมพันธ์ระหว่างเซลล์กับเซลล์ (cell-cell interaction) ในระหว่างการเคลื่อนที่ของเซลล์ นอกจากนี้ ยังนำมาใช้ในการจำลองการเคลื่อนที่ของเซลล์ในระหว่างกระบวนการสมานแผล (Liang et al., 2007)



ภาพที่ 4.4 การวิเคราะห์การเคลื่อนที่ของเซลล์โดยวิธี *in vitro* scratch assay ในเซลล์ primary ECs ที่มา (Liang et al., 2007)

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า สารสกัดรังนกตัวอย่างที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 1.5 mg/mL มีแนวโน้มปิดช่องว่างของรอยขีดได้ชัดเจนกว่าเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ ที่ไม่ได้บ่มด้วยสารสกัดรังนกตัวอย่าง (0 mg/mL) หลังจากบ่มสารสกัดรังนกตัวอย่างกับเซลล์เพาะเลี้ยง L929 ไฟโบรบลาสท์ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Hwang et al. (2020) โดยสกัดรังนกแห้งในน้ำปริมาตร 500 mL ที่

อุณหภูมิ 37°C เป็นระยะเวลา 3 วัน หลังจากนั้นกรองสารสกัดรังนก และระเหยน้ำออกที่อุณหภูมิ 40°C พบว่า สารสกัดรังนกที่เตรียมได้ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีมาก ลดการแสดงออกของเอนไซม์เมทัลโลโปรติเอส (metalloproteinase-1) ที่เกิดจากการกระตุ้นโดยรังสียูวีบี และเพิ่มการสังเคราะห์โปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 (procollagen type I) ส่งผลต่อการปกป้องความเสียหายของผิวหนังจากรังสียูวีบี นอกจากนี้ สารสกัดรังนกที่ความเข้มข้น 1 ถึง 10 µg/mL ยังช่วยเพิ่มการสมานแผลหลังจากตรวจสอบด้วยวิธี *in vitro* scratch assay ในเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสท์ (normal human dermal fibroblasts) โดยผลการสมานแผลเนื่องมาจาก การเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนไฮยารูแนน (hyarunan) ส่งผลต่อการเพิ่มการสร้างเมทริกซ์นอกเซลล์ขึ้นใหม่ นอกจากนี้ Hwang et al. (2020) ยังการตรวจพบกรดเซียลิกและสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนัง (epidermal growth factor: EGF) ในสารสกัดรังนก โดยตรวจพบกรดเซียลิกปริมาณ 13,084.3 ng/mL ในสารสกัดรังนกที่ได้จากเมืองจาวา (Java city) ของประเทศมาเลเซีย และพบปริมาณ 29,131.1 ng/mL ในสารสกัดรังนกที่ได้จากเมืองสุมาตรา/บันกา (Sumatra/Banka city) ของประเทศมาเลเซีย สำหรับสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนัง ตรวจพบปริมาณ 31,823 ng/mL ในสารสกัดรังนกที่ได้จากเมืองจาวา และพบปริมาณ 43,855 ng/mL ในสารสกัดรังนกที่ได้จากเมืองสุมาตรา/บันกา โดยสารสกัดรังนกจากเมืองสุมาตรา/บันกา ซึ่งมีปริมาณกรดเซียลิกและสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังสูงกว่าสารสกัดรังนกจากเมืองจาวา มีฤทธิ์ต้านการอักเสบและฤทธิ์การสมานแผลสูงกว่าสารสกัดรังนกจากเมืองจาวา ซึ่งมีปริมาณกรดเซียลิกและสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังน้อยกว่า ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่า กรดเซียลิกและสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังในสารสกัดรังนก เป็นสารสำคัญที่ส่งผลต่อผลการสมานแผล (Hwang et al., 2020)

บทที่ 5
ประโยชน์ที่ได้จากการวิจัย

5.1 ส่งเสริมความรู้และความเข้าใจเรื่องการบริโภครังนกอย่างถูกต้องและเป็นวิทยาศาสตร์ กล่าวคือ กรดเซียลิกในรังนกซึ่งมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและกระตุ้นการแบ่งเซลล์ไฟโบรบลาสท์ในร่างกาย จึงนำมาใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพ อาหารแพทย์ทางเลือก ผลิตภัณฑ์เสริมความงาม ทำให้ตลาดการบริโภครังนกเป็นที่ยอมรับและยั่งยืนมากขึ้น

5.2 ประโยชน์ที่ได้รับงานวิจัย ทำให้มีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ของรังนกบ้านไทย ซึ่งสามารถนำไปใช้พัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์รังนกได้หลากหลาย

5.3 การนำไปใช้ประโยชน์ของผู้ประกอบการ โดยการแปรรูปรังนกดิบให้เป็นผลิตภัณฑ์รังนกในรูปแบบต่าง ๆ เช่น อาหารและเครื่องดื่ม อาหารเสริมสุขภาพ อาหารแพทย์ทางเลือก และผลิตภัณฑ์เสริมความงาม เป็นผลิตภัณฑ์รังนกที่สามารถระบุชนิดและปริมาณสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เป็นการเพิ่มมูลค่ารังนกบ้านให้สูงขึ้น

5.4 ผลประเมินทางด้านเศรษฐศาสตร์ ทำให้มูลค่าตลาดที่เพิ่มขึ้น การว่าจ้างแรงงานที่เพิ่มขึ้น ผู้ประกอบการธุรกิจรังนกมีรายได้เพิ่มขึ้น เป็นการสร้างรายได้ให้แก่ประเทศชาติโดยรวม

5.5 ความเป็นไปได้ในการต่อยอดงานวิจัย เช่น จากการศึกษาของ Nurfatin et al. (2016) พบว่า สารสกัดรังนกออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซิน-คอนเวอร์ติง (angiotensin-converting enzyme: ACE) ซึ่งเป็นกลุ่มยารักษาโรคความดันโลหิตสูง (hypertension) และหัวใจล้มเหลวแบบเลือดคั่ง (congestive heart failure) สามารถผลิตเป็นอาหารและเครื่องดื่มแพทย์ทางเลือกได้

5.6 สามารถระบุใน เอกสารข้อมูลความปลอดภัยสารเคมี (Material Safety Data Sheet: MSDS) ว่า สารสกัดรังนกบ้านของไทยไม่เป็นพิษ ไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ สารสกัดรังนกของไทยเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความปลอดภัย ซึ่งสามารถนำไปใช้อ้างอิงในทางธุรกิจได้

บทที่ 6

ข้อเสนอแนะ

6.1 ภาครัฐควรจะมีห้องปฏิบัติการสำหรับตรวจรังนกทั่วทุกภาค

6.2 ภาครัฐควรประกาศมาตรฐานคุณภาพรังนกด้วยสารสำคัญที่ออกฤทธิ์

6.3 ภาครัฐควรส่งเสริมให้ผู้ประกอบการคิดพัฒนาต่อยอดผลิตภัณฑ์รังนก เช่น การผลิตกรดเซียลิกบริสุทธิ์จากรังนก

บรรณานุกรม

กิตติพัฒน์ โสภิตธรรมคุณ และ ปานทิพย์ รัตนศิลป์กัลชาญ. การสกัดและวิธีวัดความสามารถการต้านอนุมูลอิสระในพืชสมุนไพร. Extraction and determination of antioxidant activity in herbal plant. 86 ว. วิทย. เทคโน. หัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ปีที่ 3 ฉบับที่ 1 มกราคม - มิถุนายน 2560.

กฤษณะ สุกันตพงศ์. โอกาส “รังนกไทย” ในตลาดจีน เตรียมตัวไว้ก่อนเจาะตลาดจีน (ตอนที่ 3) ศูนย์บริการข้อมูลเพื่อธุรกิจไทยในจีน (Thailand Business Information Center in China) สถานกงสุลใหญ่ ณ นครหนานหนิง. 13 มกราคม 2563.

กนกวรรณ จารุกาจร, วิลัดดา สินทร และ ชรินญา พิมพ์สอน, ความสัมพันธ์ของภาวะเครียดออกซิเดชั่นและภาวะไขมันในเลือดสูง. วารสารพิษวิทยาไทย 2557 ; 29(1-2) : 57-69.

กมลศักดิ์ เลิศไพบูลย์ และ ศุภกร พัฒนวิวัฒน์ เรื่อง “ การพัฒนาการรวมกลุ่มและเชื่อมโยงอุตสาหกรรม (Cluster)” และ“บ้านนกแอ่น รังนกแอ่น ความลับ ที่ต้องเปิด” จัดโดย สมาคมส่งเสริมผู้ประกอบการวิสาหกิจขนาดกลางขนาดย่อมไทย (ATSME/คพอ.) สาขานครศรีธรรมราช วันเสาร์ที่ 21 มิย. 2551 ณ โรงแรม ทวินโลตัส จ.นครศรีธรรมราช

กมลศักดิ์ เลิศไพบูลย์ และ ศุภกร พัฒนวิวัฒน์ เรื่อง หลักการพื้นฐานในการสร้างบ้านนกแอ่นกินรัง ตอนที่ 1-2 ในงานสัมมนาวิชาการ “ The First Thailand Swiftlet Conference” จัดโดย สมาคมผู้ประกอบการธุรกิจรังนกแอ่น (ประเทศไทย) วันที่ 7-8 มีนาคม 2558 ณ โรงแรมไดมอนด์ อ. เมือง จ. สุราษฎร์ธานี

กมลศักดิ์ เลิศไพบูลย์ และ ศุภกร พัฒนวิวัฒน์ ร่วมกับ ภาควิชาเทคโนโลยีและการอุตสาหกรรม และศูนย์วิทยาศาสตร์อาหารฮาลาล ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหารและโภชนาการ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มอ. ปัตตานี เรื่อง การอบรมเชิงปฏิบัติการ การทำความสะอาดรังนกตามหลักมาตรฐานอาหารฮาลาล. 12 กรกฎาคม 2562 ณ ห้องปฏิบัติการคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา.

โกสินทร์ วิระษร, กุลธิดา กล้ารอด, ประณิธิ หงส์ประภาส และ พัชรี บุญศิริ. ภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุลและสารต้านออกซิเดชั่นกับโรคมะเร็ง. ศรีนครินทร์เวชสาร 2557; 29 (2)

เกษม จันทร์ดำ. ชาติพันธุ์ รังนก เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Birds' nests, business, and ethnicity in Southeast Asia). สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย, กรุงเทพฯ. 2560.

เกษม จันทร์ดำ.โครงการวิจัย *‘รังนกไทยในธุรกิจรังนกโลก’* (Thailand in The Global Birds' Nest Industry) 2563

ตวงรัตน์ โพธิ์เที่ยง. 2547. นิเวศวิทยาและการกระจายพันธุ์ของนกแอ่นกินรัง (Collocalia fuciphaga). ผลงานวิจัยและรายงานความก้าวหน้างานวิจัยประจำปี 2547. กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช.

ธรรมนูญ รุ่งสังข์. ความแก่ของผิวหนัง: กลไกการเกิดระดับโมเลกุล การป้องกัน/การรักษา และสารธรรมชาติที่ใช้ในการต่อต้านความแก่ของผิวหนัง. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา: ศูนย์การศึกษาต่อเนื่องทางเภสัชศาสตร์(*ccpe.pharmacycouncil.org*). 26 ธ.ค. 2559

นิรันดร มาแทน. “ การศึกษาโครงสร้างของรังนกด้วยแสงซินโครตรอน”. แสงสยามสาร. 14, 5 (ก.ย.-ต.ค. 2555) 4-5.

บังอร บุญชู - การตรวจพิสูจน์รังนกแท้. กรมวิทยาศาสตร์บริการ พ.ศ. 2547

ภควัต โพธิ์นาค. นิเวศวิทยาบางประการของนกแอ่นกินรังตะโพกขาว (*Collocalia germani* Oustalet) ในอุทยานแห่งชาติ หมู่เกาะช้าง จังหวัดตราด. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วนศาสตร์) บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน พ.ศ. 2547.

วราศรี แสงกระจ่าง. การศึกษาลักษณะทางกายภาพ คุณค่าทางโภชนาการ และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของรังนกนางแอ่นชนิดรังสีขาวในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร. มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์. 2554

ศุภกร พัฒนวิวัฒน์ และ กมลศักดิ์ เลิศไพบูลย์ เรื่อง รังนก สรรพคุณรังนก และ การเพิ่มมูลค่ารังนก ในงานสัมมนาวิชาการ “ The First Thailand Swiftlet Conference” จัดโดย สมาคมผู้ประกอบการธุรกิจรังนกแอ่น (ประเทศไทย) วันที่ 7-8 มีนาคม 2558. ณ โรงแรมไดมอนด์ อ.เมือง จ. สุราษฎร์ธานี

โอภาส ขอบเขตต์. 2542. นกในเมืองไทย เล่ม 2 สำนักพิมพ์สารคดี. กรุงเทพฯ.

อัญชลี ระวังการ, จันทร์เพ็ญ ชำนาญพูด และ ไมตรี สุทธจิตต์. การยับยั้งปฏิกิริยาฮีแมกกลูติเนชันของไวรัสไข้หวัดนก (H5N1) ด้วยสารเพอไรโอเดตในหลอดทดลอง. วารสารนเรศวรพะเยา ปีที่7 ฉบับที่1 ม.ค - เม.ย. 2557. 42-50.

Abidin, F. Z., Hui, C. K., Luan, N. S., Ramli, E. S. M., Hun, L. T., & Ghafar, N. A. (2011). Effects of Edible Bird’s Nest (EBN) on Cultured Rabbit Corneal Keratocytes. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *11*, 94–103.

Akmal, M., Intan-Shameha, A., Ajat, M., & Ideris, A. (2017). Edible Bird’s Nest (EBN) is a Potential Natural Product against Influenza Virus Infection. *Jurnal Veterinar Malaysia*, *29*, 14–19.

Aminuddin, N. A., Haghani, A., Safi, N., Omar, A. R., & Ideris, A. (2016). The Evaluation of Edible Bird Nest (EBN) Extract Reduced Influenza A Virus Induced Apoptosis on Cultured Cells In Vitro Study. *SOJ Veterinary Sciences*, *2*, 1–3.

Babji, A. S., Etty Syarmila, I. K., Nur ’Aliah, D., Nurul Nadia, M., Hadi Akbar, D., Norrakiah, A. S., Ghassem, M., Najafian, L., & Salma, M. Y. (2018). Assessment on Bioactive Components of Hydrolysed Edible Bird Nest. *International Food Research Journal*, *25*, 1936–1941.

Biddle, F., & Belyavin, G. (1963). The Haemagglutination Inhibitor in Edible Bird-Nest: Its Biological and Physical Properties. *Journal of General Microbiology*, *31*, 31–44.

Blois, M. S. (1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, *181*, 1199–1200.

Chan, G. K. L., Wong, Z. C. F., Lam, K. Y. C., Cheng, L. K. W., Zhang, L. M., Lin, H., Dong, T. T., &

Tsim, K. W. K. (2015). Edible Bird's Nest, an Asian Health Food Supplement, Possesses Skin Lightening Activities: Identification of N-Acetylneuraminic Acid as Active Ingredient. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*, *5*, 262–274.

Chan, G. K., Zheng, K. Y., Zhu, K. Y., Dong, T. T., & Tsim, K. W. (2013). Determination of Free N - Acetylneuraminic Acid in Edible Bird Nest : A Development of Chemical Marker for Quality Control. *The Journal of Ethnobiology and Traditional Medicine*, *120*, 620–628.

Chua, K.-H., Lee, T.-H., Nagandran, K., Yahaya, N. H. M., Lee, C.-T., Tjih, E. T. T., & Aziz, R. A. (2013). Edible Bird's Nest Extract as a Chondro-Protective Agent for Human Chondrocytes Isolated from Osteoarthritic Knee: In Vitro Study. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *13*, 19–27.

Chua, Y. G., Bloodworth, B. C., Leong, L. P., & Li, S. F. Y. (2014). Metabolite Profiling of Edible Bird's Nest using Gas Chromatography/Mass Spectrometry and Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *28*, 1387–1400.

Chua, Y. G., Chan, S. H., Bloodworth, B. C., Li, S. F. Y., & Leong, L. P. (2015). Identification of Edible Bird's Nest with Amino Acid and Monosaccharide Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*, 279–289.

Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Lunec, J. (2003). Oxidative DNA Damage: Mechanisms, Mutation, and Disease. *The FASEB Journal*, *17*, 1195–1214.

Cranbrook, E. O., Lim, G. W., Koon, L. C., & Rahman, M. A. (2013). The Species of White-Nest Swiftlets (Apodidae, Collocaliini) of Malaysia and the Origins of House-Farm Birds: Morphometric and Genetic Evidence. *Forktail*, *29*, 107–119.

Daud, N., Mohamad Yusop, S., Babji, A. S., Lim, S. J., Sarbini, S. R., & Hui Yan, T. (2019). Edible Bird's Nest: Physicochemical Properties, Production, and Application of Bioactive Extracts and Glycopeptides. *Food Reviews International*, 1–21.

David, S. S., O'Shea, V. L., & Kundu, S. (2007). Base-Excision Repair of Oxidative DNA Damage. *Nature*, *447*, 941–950.

Eruslanov, E., & Kusmartsev, S. (2010). Identification of ROS using Oxidized DCFDA and Flow-Cytometry. In A. D. (Ed.), *Advanced Protocols in Oxidative Stress II. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)* (pp. 57–72). Humana Press.

Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Cooke, M. S. (2004). Oxidative DNA Damage and Disease: Induction, Rrepair and Significance. In *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* (Vol. 567).

Ghassem, M., Arihara, K., Mohammadi, S., Sani, N. A., & Babji, A. S. (2017). Identification of Two Novel Antioxidant Peptides from Edible Bird's Nest (Aerodramus Fuciphagus) Protein Hydrolysates. *Food and Function*, *8*, 2046–2052.

Guo, C. T., Takahashi, T., Bukawa, W., Takahashi, N., Yagi, H., Kato, K., Hidari, K. I. P. J., Miyamoto, D., Suzuki, T., & Suzuki, Y. (2006). Edible Bird's Nest Extract Inhibits Influenza Virus Infection. *Antiviral Research*, *70*, 140–146.

Haghani, A., Mehrbod, P., Safi, N., Aminuddin, N. A., Bahadoran, A., Omar, A. R., & Ideris, A. (2016). In Vitro and In Vivo Mechanism of Iimmunomodulatory and Antiviral Activity of Edible Bird's Nest (EBN) against Influenza A Virus (IAV) Infection. *Journal of Ethnopharmacology*, *185*, 327–340. https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.03.020

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., & Aruoma, O. I. (1987). The Deoxyribose Method: A Simple "Test-Tube" Assay for Determination of Rate Constants for Reactions of Hydroxyl Radicals. *Analytical Biochemistry*, *165*, 215–219.

Hamid, M. A., Sarmidi, M. R., & Park, C. S. (2012). Mangosteen leaf extract increases melanogenesis in B16F1 melanoma cells by stimulating tyrosinase activity in vitro and by up-regulating tyrosinase gene expression. *International Journal of Molecular Medicine*, *29*(2), 209–217.

Helm, Nuradji, H., Dharmayanti, N. L. P. I., Mranata, B., Sudarnika, E., Lukman, D. W., & Wibawan, I. W. T. (2018). Antiviral Activity of Edible Bird's Nest Extract on Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1 Viral Infection In Vitro. *Human and Veterinary Medicine*, *10*, 62–68.

Hou, Z., Imam, M. U., Ismail, M., Azmi, N. H., Ismail, N., Ideris, A., & Mahmud, R. (2015). Lactoferrin and Ovotransferrin Contribute toward Antioxidative Effects of Edible Bird's Nest against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress in Human SH-SY5Y Cells. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *79*, 1570–1578.

Hou, Z., Tang, S. ying, Ji, H. ru, He, P. yuan, Li, Y. hong, Dong, X. ling, Du, M. nan, Maznah, I., & He, W. jing. (2019). Edible Bird's Nest Attenuates Menopause-Related Bone Degeneration in Rats via Increaing Bone Estrogen-Receptor Expression. *Chinese Journal of Integrative Medicine*.

Howe, C., Lee, L. T., & Rose, H. M. (1961). Collocalia Mucoid: A Substrate for Myxovirus Neuraminidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *95*, 512–520.

Hu, Q., Li, G., Yao, H., He, S., Li, H., Liu, S., Wu, Y., & Lai, X. (2016). Edible Bird's Nest Enhances Antioxidant Capacity and Increases Lifespan in Drosophila Melanogaster. *Cellular and Molecular Biology*, *62*, 116–122.

Hwang, E., Park, S. W., & Yang, J.-E. (2020). Anti-Aging, Anti-Inflammatory, and Wound Healing Activities of Edible Bird's Nest in Human Skin Keratinocytes and Fibroblasts. *Pharmacognosy Magazine*, *16*, 336–342.

Iijima, R., Takahashi, H., Namme, R., Ikegami, S., & Yamazaki, M. (2004). Novel Biological Function of Sialic Acid (N-Acetylneuraminic Acid) as a Hydrogen Peroxide Scavenger. *FEBS Letters*, *561*, 163–166.

Jourdian, G. W., Dean, L., & Roseman, S. (1971). The Sialic Acids. XI. A Periodate-Resorcinol

Method for the Quantitative Estimation of Free Sialic Acids and Their Glycosides. *Journal of Biological Chemistry*, *246*, 430–435.

Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and Development of DPPH Method of Antioxidant Assay. *Journal of Food Science and Technology*, *48*, 412–422.

Kim, K. C., Kang, K. A., Lim, C. M., Park, J. H., Jung, K. S., & Hyun, J. W. (2012). Water extract of edible bird's nest attenuated the oxidative stress-induced matrix metalloproteinase-1 by regulating the mitogen-activated protein kinase and activator protein-1 pathway in human keratinocytes. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, *55*, 335–347.

Kong, H., Wong, K.-H., & Lo, S. C. (2016). Identification of Peptides Released from Hot Water Insoluble Fraction of Edible Bird's Nest under Simulated Gastro-Intestinal Conditions. *Food Research International*, *85*, 19–25.

Kong, Y. C., Keung, W. M., Yip, T. T., Ko, K. M., Tsao, S. W., & Ng, M. H. (1987). Evidence that Epidermal Growth Factor is Present in Swiftlet's (Collocalia) Nest. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry And*, *87B*, 221–226.

Liang, C. C., Park, A. Y., & Guan, J. L. (2007). In Vitro Scratch Assay: A Convenient and Inexpensive Method for Analysis of Cell Migration In Vitro. *Nature Protocols*, *2*, 329–333.

Lim, C. T. S., Lim, C. W., Kirby, B. P., Ideris, A., Bin Basri, H., Tan, S. N., Hassan, S., Careena, S., Norhafizah, M., Sani, D., & Stanslas, J. (2018). Effect of Edible Bird's Nest Extract on Lipopolysaccharide-Induced Impairment of Learning and Memory in Wistar Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2018*, 1–7.

López-García, J., Lehocký, M., Humpolíček, P., & Sáha, P. (2014). HaCaT Keratinocytes Response on Antimicrobial Atelocollagen Substrates: Extent of Cytotoxicity, Cell Viability and Proliferation. *Journal of Functional Biomaterials*, *5*, 43–57.

Ma, F.-C., Liu, D.-C., & Dai, M.-X. (2012). The Effects of the Edible Bird's Nest on Sexual Function of Male Castrated Rats. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *6*, 2875–2879.

Ma, F.-C., & Liu, D. (2012). Sketch of the Edible Bird's Nest and Its Important Bioactivities. *Food Research International*, *48*, 559–567.

Marcone, M. F. (2005). Characterization of the Edible Bird's Nest the "Caviar of the East." *Food Research International*, *38*, 1125–1134.

Matsukawa, N., Matsumoyo, M., Bukawa, W., Chihi, H., Nakayama, K., Hara, H., & Tsukahara, T. (2011). Improvement of Bone Strength and Dermal Thickness due to Dietary Edible Bird's Nest Extract in Ovariectomized Rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *75*, 590–592.

Nakagawa, H., Hama, Y., Sumi, T., Li, S. C., Maskos, K., Kalayanamitra, K., Mizumoto, S., Sugahara, K., & Li, Y. T. (2007). Occurrence of a Nonsulfated Chondroitin Proteoglycan in the Dried Saliva of Collocalia Swiftlets (Edible Bird's-Nest). *Glycobiology*, *17*, 157–164.

Nakano, K., Nakano, T., Ahn, D. U., & Sim, J. S. (1994). Sialic Acid Contents in Chicken Eggs and Tissues. *Canadian Journal of Animal Science*, 601–606.

Ng, M. H., Chan, K. H., & Kong, Y. C. (1986). Potentiation of Mitogenic Response by Extracts of the Swiftlet's (Collocalia) Nest. *Biochemistry International*, *13*, 521–531.

Norhayati, M. K., Azman, O., & Wan Nazaimoon, W. M. (2010). Preliminary Study of the Nutritional Content of Malaysian Edible Bird's Nest. *Malaysian Journal of Nutrition*, *16*, 389–396.

Nur, A. A., Abdul, R. O., & Aini, I. (2017). Preliminary Studies of Edible Bird Nest (EBN) Extract Reduced H1N1 Virus Induced Apoptosis on Cultured Cells-In Vitro. *Journal of Infectious Diseases and Epidemiology*, *3*, 24–28.

Nurfatin, M. H., Etty Syarmila, I. K., Nur 'Aliah, D., Zalifah, M. K., Babji, A. S., & Ayob, M. K. (2016). Effect of Enzymatic Hydrolysis on Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activity in Swiftlet Saliva. *International Food Research Journal*, *23*, 141–146.

Nurul Nadia, M., Babji, A. S., Ayub, M. K., & Nur 'Aliah, D. (2017). Effect of Enzymatic Hydrolysis on Antioxidant Capacity of Cave Edible Bird's Nests Hydrolysate. *International Journal of ChemTech Research*, *10*, 1100–1107.

Ofiwijayanti, H., Hidayat, S. T., & Khafidhoh, N. (2017). Bird'S Nest Extract Cream: Treatment for Perineal Wound in Rattus Norvegicus. *Belitung Nursing Journal*, *3*, 265–271.

Petkliang, N., Gale, G. A., Brunton, D. H., & Bumrungsri, S. (2017). Wetland, Forest, and Open Paddy Land are the Key Foraging Habitats for Germain's Swiftlet (Aerodramus Inexpectatus Germani) in Southern Thailand. *Tropical Conservation Science*, *10*, 1–12.

Pietkiewicz, S., Schmidt, J. H., & Lavrik, I. N. (2015). Quantification of Apoptosis and Necroptosis at the Single Cell Level by a Combination of Imaging Flow Cytometry with Classical Annexin V/Propidium Iodide Staining. *Journal of Immunological Methods*, *423*, 99–103.

Poeggeler, B., Reiter, R. J., Tan, D., Chen, L., & Manchester, L. C. (1993). Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: A hypothesis. *Journal of Pineal Research*, *14*, 151–168.

Pozsgay, V., Jennings, H., & Kasper, D. L. (1987). 4,8-Anhydro-N-acetylneuraminic acid: Isolation from edible bird's nest and structure determination. *European Journal of Biochemistry*, *162*, 445–450. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1987.tb10622.x

Quek, M. C., Chin, N. L., Yusof, Y. A., Law, C. L., & Tan, S. W. (2018). Characterization of Edible Bird's Nest of Different Production, Species and Geographical Origins using Nutritional Composition, Physicochemical Properties and Antioxidant Activities. *Food Research International*, *109*, 35–43.

Ramakrishna, H., Murthy, S. S., & Murthy, P. G. (2012). Hydroxy Radical and DPPH Scavenging Activity of Crude Protein Extract of Leucas Linifolia: A Folk Medicinal Plant. *Asian Journal*

of Plant Science and Research, *2*, 30–35.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Biology and Medicine*, *26*, 1231–1237.

Roh, K. B., Lee, J., Kim, Y. S., Park, J., Kim, J. H., Lee, J., & Park, D. (2012). Mechanisms of Edible bird's Nest Extract-Induced Proliferation of Human Adipose-Derived Stem Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2012*, 1–11.

Shi, J., Hu, X., Zou, X., Zhao, J., Zhang, W., Holmes, M., Huang, X., Zhu, Y., Li, Z., Shen, T., & Zhang, X. (2017). A Rapid and Nondestructive Method to Determine the Distribution Map of Protein, Carbohydrate and Sialic acid on Edible Bird's Nest by Hyper-Spectral Imaging and Chemometrics. *Food Chemistry*, *229*, 235–241.

Shim, E. K. S., Chandra, G. F., Pedireddy, S., & Lee, S. Y. (2016). Characterization of Swiftlet Edible Bird Nest, a Mucin Glycoprotein, and Its Adulterants by Raman Microspectroscopy. *Journal of Food Science and Technology*, *53*, 3602–3608.

Teh, S.-S., & Ma, Z.-F. (2018). Bioactive Components and Pharmacological Properties of Edible Bird's Nest. *International Proceedings of Chemical, Biological and Environmental Engineering*, *103*, 29–34.

Tong, S. R., Lee, T. H., Cheong, S. K., & Lim, Y. M. (2020). Untargeted Metabolite Profiling on the Water-Soluble Metabolites of Edible Bird's Nest through Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Veterinary World*, *13*, 304–316.

Tung, C. H., Pan, J. Q., Chang, H. M., & Chou, S. S. (2008). Authentic Determination of Bird's Nests by Saccharides Profile. *Journal of Food and Drug Analysis*, *16*, 86–91.

Utomo, B., Rosyidi, D., Radiati, L., Puspaningsih, N., & Proborini, W. (2014). Protein Characterization of Extracted Water from Three Kinds of Edible Bird Nest Using SDS-PAGE CBB Staining and SDSPAGE Glycoprotein Staining and LC-MS/MS Analyses. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science*, *7*, 33–38.

van der Ham, M., Prinsen, B. H. C. M. T., Huijmans, J. G. M., Abeling, N. G. G. M., Dorland, B., Berger, R., de Koning, T. J., & de Sain-van der Velden, M. G. M. (2007). Quantification of Free and Total Sialic Acid Excretion by LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *848*, 251–257.

Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., & Reutellingsperger, C. (1995). A Novel Assay for Apoptosis Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on Early Apoptotic Cells using Fluorescein Labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods*, *184*, 39–51.

Vuolo, M. M., Lima, V. S., & Maróstica Junior, M. R. (2018). Phenolic Compounds: Structure,

Classification, and Antioxidant Power. In Maira Rubi Segura Campos (Ed.), *Bioactive Compounds: Health Benefits and Potential Applications* (pp. 33–50). Elsevier Inc.

Wang, C. C. (1921). The Composition of Chinese Edible Birds' Nests and the Nature of their Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, *49*, 429–439.

Wieruszeski, J. M., Michalski, J. C., Montreuil, J., Strecker, G., Peter-Katalinic, J., Egge, H., van Halbeek, H., Mutsaers, J. H., & Vliegenthart, J. F. (1987). Structure of the Monosialyl Oligosaccharides derived from Salivary Gland Mucin Glycoproteins of the Chinese Swiftlet (Genus Collocalia). *Journal of Biological Chemistry*, *262*, 6650–6657.

Wong, Z. C. F., Chan, G. K. L., Wu, K. Q. Y., Poon, K. K. M., Chen, Y., Dong, T. T. X., & Tsim, K. W. K. (2018). Complete Digestion of Edible Bird's Nest Releases Free N-Acetylneuraminic Acid and Small Peptides: An Efficient Method to Improve Functional Properties. *Food and Function*, *9*, 5139–5149.

Xiao, F., Xu, T., Lu, B., & Liu, R. (2020). Guidelines for Antioxidant Assays for Food Components. *Food Frontiers*, *1*, 60–69.

Yagi, H., Yasukawa, N., Yu, S. Y., Guo, C. T., Takahashi, N., Takahashi, T., Bukawa, W., Suzuki, T., Khoo, K. H., Suzuki, Y., & Kato, K. (2008). The Expression of Sialylated High-Antennary N-Glycans in Edible Bird's Nest. *Carbohydrate Research*, *343*, 1373–1377.

Yang, M., Cheung, S. H., Li, S. C., & Cheung, H. Y. (2014). Establishment of a Holistic and Scientific Protocol for the Authentication and Quality Assurance of Edible Bird's Nest. *Food Chemistry*, *151*, 271–278.

Yew, M. Y., Koh, R. Y., Chye, S. M., Othman, I., & Ng, K. Y. (2014). Edible Bird's Nest Ameliorates Oxidative Stress-Induced Apoptosis in SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *14*, 391–402.

Yida, Z., Imam, M. U., Ismail, M., Ooi, D. J., Sarega, N., Azmi, N. H., Ismail, N., Chan, K. W., Hou, Z., & Yusuf, N. B. (2015). Edible Bird's Nest Prevents High Fat Diet-Induced Insulin Resistance in Rats. *Journal of Diabetes Research*, *2015*, 1–11.

Yida, Z., Imam, U. U., & Ismail, M. (2014). In Vitro Bioaccessibility and Antioxidant Properties of Edible Bird's Nest following Simulated Human Gastro-Intestinal Digestion. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *14*, 468–474.

You, Y., Cao, Y., Guo, S., Xu, J., Li, Z., Wang, J., & Xue, C. (2015). Purification and Identification of α 2–3 Linked Sialoglycoprotein and α 2–6 Linked Sialoglycoprotein in Edible Bird's Nest. *European Food Research and Technology*, *240*, 389–397.

Yu-Qin, Y., Liang, X., Hua, W., Hui-Xing, Z., Xin-Fang, Z., & Bu-Sen, L. (2000). Determination of Edible Bird's Nest and Its Products by Gas Chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, *38*, 27–32.

Yusoff, N. A., Lim, V., Al-Hindi, B., Razak, K. N. A., Widyawati, T., Anggraini, D. R., Ahmad, M., &

Asmawi, M. Z. (2017). Nypa fruticans wurmb. Vinegar's aqueous extract stimulates insulin secretion and exerts hepatoprotective effect on STZ-induced diabetic rats. *Nutrients*, *9*(9), 1–12.

Zhang, H., Ha, T. M. H., Seck, H. L., & Zhou, W. (2020). Inactivation of Escherichia Coli O157:H7 and Salmonella Typhimurium in Edible Bird's Nest by Low-Energy X-Ray Irradiation. *Food Control*, *110*, 107031.

Zhao, R., Li, G., Kong, X. J., Huang, X. Y., Li, W., Zeng, Y. Y., & Lai, X. P. (2016). The Improvement Effects of Edible Bird's Nest on Proliferation and Activation of B Lymphocyte and Its Antagonistic Effects on Immunosuppression Induced by Cyclophosphamide. *Drug Design, Development and Therapy*, *10*, 371–381.

Zulkifli, A. S., Babji, A. S., Lim, S. J., Teh, A. H., Daud, N. M., & Rahman, H. A. (2019). Effect of Different Hydrolysis Time and Enzymes on Chemical Properties, Antioxidant and Antihyperglycemic Activities of Edible Bird Nest Hydrolysate. *Malaysian Applied Biology*, *48*, 149–156.