บทที่ 2
ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กวาวเครือขาว

กวาวเครือขาว [*Pueraria candollei* Grah. var. *mirifica* (Airy Shaw et. Suvatabandhu) Niyomdham] (ชวลิต นิยมธรรม, 2538) หรือ ตานจอมทอง กวาวหัว ตาลานเครือ เป็นพืชในวงศ์ Leguminosae อนุวงศ์ papilionoideae (วุฒิ วุฒิธรรมเวช, 2540).

2.1.1 นิเวศวิทยา

ชวลิต นิยมธรรม (2538) รายงานว่าพบได้มากตามป่าเบญจพรรณในภาคเหนือที่จังหวัดเชียงใหม่และลำปาง ในพื้นที่ที่มีความสูง 300-800 เมตรจากระดับน้ำทะเล จรัญ ดิษฐ์ไชยวงศ์ และคณะ (2550)

2.1.2 พันธุ์ และลักษณะทางพฤกษศาสตร์

กรมวิชาการเกษตร (2548) รายงานว่า หัวหรือรากสะสมอาหาร (tuberous roots) ลักษณะค่อนข้างกลม ขนาดใหญ่และคอดยาวเป็นตอน ๆ ต่อเนื่องกัน เปลือกบางแต่แข็ง สีน้ำตาลอ่อนถึงสีน้ำตาลเข้ม ความหนาของเปลือกประมาณ 2-4 มิลลิเมตร เนื้อภายในมีสีขาวนวล เห็นวงปีลำต้นเป็นเถาเลื้อยพันกับต้นไม้อื่น เถาย่อยจะแตกแขนงออกไปจากเถาหลัก เถาแก่มีสีน้ำตาลอ่อนจนถึงสีน้ำตาลเข้ม ยอดอ่อนและกิ่งอ่อน มีสีเขียว ใบเป็นใบประกอบมีใบย่อย 3 ใบ ก้านใบประกอบยาว 10-28 เซนติเมตร หูใบเป็นรูปไข่ โคนใบมนหรือเป็นติ่งยื่นลงมา ดอกเป็นช่อเดี่ยวและช่อแขนงออกตามปลายกิ่ง ยาว 20-30 เซนติเมตร ก้านช่อดอกมีขนสั้น ๆ คล้ายดอกถั่ว ยาว 4-7 เซนติเมตร กลีบรองดอกเชื่อมติดกันเป็นรูประฆัง มีกลีบดอก 5 กลีบ ดอกออกเป็นกระจุกในระยะผลัดใบ กระจุกละ 3-5 ดอก ฝักมีลักษณะแบนรูปขอบขนาน กว้างประมาณ 7 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 3 เซนติเมตร มี 3-4 เมล็ด/ฝัก เมล็ดค่อนข้างกลม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 มิลลิเมตร (ภาพที่ 2.1)

ในประเทศไทยกวาวเครือขาวมักพบในบริเวณพื้นที่ราบเชิงเขา และพื้นที่ลาดชันของเทือกเขาต่างๆ เช่นที่จังหวัดกาญจนบุรี ประจวบคีรีขันธ์ เชียงใหม่ ตาก เลย ลำปาง และสระบุรี (Dithachaiwong *et al.*, 2005) อย่างไรก็ตามลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่หลากหลายตามแห่งที่พบกวาวเครือขาวนำไปสู่การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ด้วยวิธีใช้โมเลกุลเครื่องหมาย เช่น Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Inter Simple Sequences Repeat (ISSR), Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP), Simple Sequent Repeat (SSR) ในรายงานทั่วไป โมเลกุลเครื่องหมายถูกนำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์กวาวเครือขาว Dithachaiwong *et al.* (2550) ใช้ RAPD ซึ่งมีการร่วมกับ ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ในการจำแนกพันธุ์กวาวเครือขาวจากแหล่งพันธุ์ต่างๆ 7 แหล่ง ได้แก่ กาญจนบุรี เชียงใหม่ ตาก ประจวบคีรีขันธ์ เลย ลำปาง และ

สระบุรี อย่างไรก็ตามการจำแนกโดยใช้ RAPD มีความแตกต่างกับลักษณะทางพฤกษศาสตร์ Jamjanta (1996) ตรวจสอบชนิดของพันธุ์กวาว 5 ชนิด โดยใช้รูปแบบของไอโซไซม์และเทคนิค RAPD แบบแผนของไอโซไซม์ที่บ่งบอกความแตกต่างของกวาวเครือได้ดีที่สุด คือ esteras และ peroxidase ที่น่าสนใจคือแบบแผนของ dendrogram ที่ได้จากผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไอโซไซม์ สอดคล้องกับ dendrogram ที่ได้จากผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD Sittihiphrom (2005) ใช้เทคนิค HAT-RAPDในการจำแนก กวาวเครือ (*Pueraria* spp.)

นอกจากนี้ยังมีการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกพืชชนิดอื่นๆ เช่น Mendes *et al.* (2009) ประสบความสำเร็จในการใช้เทคนิค ISSR การจำแนกพืชสมุนไพร *Angelica lignescems* และ *Melanoselinum decipiens* Sakuanrungsirikul *et al.* (2005*a*)ได้ใช้เทคนิค ISSR ในการจำแนกพันธุ์ทุเรียน และพันธุ์เงาะ(Sakuanrungsirikul *et al.*, 2005*b*) ISSR ใช้หลักการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์โดยไพรเมอร์ที่ใช้จะจับกับส่วนที่เป็นลำดับเบสซ้ำเป็นชุดๆ ของ microsatellite และมีเบสพิเศษอีก 1-3 เบสที่ปลาย 3' หรือ 5' เพื่อเพิ่มความจำเพาะ และลดความซับซ้อนของรูปแบบของแถบ นอกจากนี้เทคนิค ISSR ไม่จำเป็นต้องทราบลำดับดีเอ็นเอใดๆของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษามาก่อน ดังนั้นจึงง่ายกว่าเทคนิคอื่นๆ (Wolfe *et al.* 1998) เทคนิคนี้ยังให้แถบที่มีความแตกต่างกันมากและทำซ้ำได้

2.1.3 การเจริญเติบโต

ประสาร ฉลาดคิด (2546) พบว่าการเจริญในรอบ 1 ปี (phenological cycle) ของกวาวเครือขาวในป่าตามธรรมชาติที่ อำเภอวังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา มีระยะแตกเครือเถาและใบอ่อนเริ่มตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ถึงมีนาคม ระยะการเจริญและพัฒนาของเครือเถาและใบเริ่มตั้งแต่เดือนมีนาคมถึงกรกฎาคม ระยะผลัดใบเริ่มตั้งแต่เดือนตุลาคมถึงกุมภาพันธ์ ระยะออกดอกเริ่มตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์และ ระยะการติดฝักจนเจริญและพัฒนาเป็นเมล็ดแก่ในเดือนเมษายน ขณะที่ในแปลงทดลองที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุนารีจะออกดอกในระหว่างเดือนพฤศจิกายนถึงมกราคม เมื่อมีอายุ 6 เดือนจำนวนช่อดอกเฉลี่ย/ต้นเท่ากับ 41.90 น้ำหนักเฉลี่ย/100 เมล็ดเท่ากับ 2.52 กรัมโดยมีระยะ เวลาตั้งแต่เริ่มออกดอกในเดือนพฤศจิกายนจนกระทั่งเมล็ดแก่ในเดือนมีนาคมหรือประมาณ 4 เดือน น้ำหนักหัวเฉลี่ยเมื่ออายุ 4 เดือนเท่ากับ 38.59 กรัม และเพิ่มขึ้นเป็น 249.88 กรัม เมื่อต้นกวาวเครือขาวอายุ 16 เดือน เปอร์เซ็นต์ความชื้นเฉลี่ยของหัวที่อายุ 4 เดือนเท่ากับ 90.29 และเพิ่มขึ้นเป็น 90.69 เปอร์เซ็นต์ เมื่อกวาวเครือขาวอายุ 16 เดือน ความหนาแน่นเฉลี่ยของหัวที่อายุ 4 เดือนเท่ากับ 0.98 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร และเพิ่มขึ้นเป็น 1.03 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร เมื่อกวาวเครือขาวอายุ 16 เดือน

ภาพที่ 2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกวาวเครือขาว (วิโรจน์ เชาว์วิเศษ, 2550)

2.1.4 สรรพคุณและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

สารไอโซฟลาโวนส์ในหัวทำให้กวาวเครือขาวมีคุณสมบัติเป็นไฟโตเอสโตรเจน (phytoestrogen) คือเอสโตรเจนที่ได้จากพืชและออกฤทธิ์เช่นเดียวกับเอสโตรเจนในสัตว์ทุกประการ ไฟโตเอสโตรเจนมีฤทธิ์ต่อร่างกายหลายอย่าง ทั้งกระตุ้นภูมิต้านทาน ต้านอนุมูลอิสระและทำหน้าที่คล้ายฮอร์โมน (บรรจบ ชุณหสวัสดิกุล, 2543) นอกจากนี้มีรายงานผลของกวาวเครือขาวต่อระบบต่าง ๆ ในสัตว์ทดลองดังนี้

2.1.4.1 ผลต่อระบบสืบพันธุ์ มีผลคุมกำเนิดยับยั้งการฝังตัวของตัวอ่อน การสร้างอสุจิ การหลั่งน้ำนม และการออกไข่ของสัตว์ทดลอง (นันทวัน บุญยะประภัสสร และอรนุช โชคชัยเจริญพร, 2539) ทำให้หนูทดลองที่ตั้งท้องในระยะแรกแท้ง (ยุทธนา สมิตะสิริและสันติ ศักดารัตน์, 2538) การให้ผงป่นกวาวเครือขาวขนาด 100 และ 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/ครั้ง ทำให้ขนาดและน้ำหนักของอัณฑะ ต่อมลูกหมาก และ seminal vesicle ของหนูทดลองลดลงและทำให้อสุจิหยุดการเจริญ (ยุพดี ลางคลิจันทร์, 2527)

2.1.4.2 ผลต่อระบบเลือด กวาวเครือขาวมีฤทธิ์กระตุ้นให้ตับสร้างโปรตีนที่จับแคลเซียมได้ ระบบทางเดินอาหารจึงดูดซึมแคลเซียมได้มากขึ้นและทำให้ total protein และ chloresterol ในเลือดสูงขึ้น (สมบูรณ์ อนันตลาโภชัยและสุวิทย์ เจศรีชัย, 2528) การให้กวาวเครือขาวขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน ทำให้จำนวนเม็ดเลือดแดงของหนูทดลองลดลงประมาณร้อยละ 20 (บรรจบ ชุณหสวัสดิกุล, 2543)

2.1.4.3 ผลต่อต่อมหมวกไตและตับ สารสกัดกวาวเครือจะลดการหลั่ง follicle stimulating hormone (FSH) และ luteinizing hormone (LH) จากต่อมใต้สมอง การสร้างฮอร์โมนเพศจึงลดลง ทำให้ต่อมหมวกไตทำหน้าที่สร้างฮอร์โมนแทน ต่อมหมวกไตจึงมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น และ

การป้อนผงป่นปริมาณ 100 และ 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/ครั้ง ทำให้มีเลือดคั่งในหลอดเลือดดำใหญ่ในตับ (ยุพดี ลางคลิจันทร์, 2527) หนูขาวที่กินผงกวาวเครือขาวปริมาณ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ต่อเนื่อง 14 วัน ทำให้เซลล์ตับเกิดการอักเสบมีเลือดคั่ง

2.1.5 พิษวิทยาของกวาวเครือขาว

กวาวเครือขาวมีค่า LD_{50} มากกว่า 10 กรัม/กิโลกรัม การทดสอบพิษกึ่งเรื้อรังในหนูเพศผู้ที่ได้รับกวาวเครือขาว 100 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม พบว่าทำให้หนูมีการเติบโตลดลง มีคอเลสเตอรอลลดลงจาก 70 มิลลิกรัม เหลือ 20 มิลลิกรัม มีตับโตขึ้น และอัณฑะมีอาการบวมน้ำ (ปราณี ชวลิตธำรง และคณะ, 2542)

2.2 ไอโซฟลาโวนอยด์

ไอโซฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์กลุ่มหนึ่งที่พบทั่วไปในพืชตระกูลถั่วจึงพบได้ในกวาวเครือขาว และเป็นสารกลุ่มที่ทำให้เกิดสรรพคุณและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของกวาวเครือขาวดังรายละเอียดข้างต้น สามารถแบ่งไอโซฟลาโวนอยด์ตามโครงสร้างออกเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ chromenes, isoflavones, isoflavone glycosides, coumestans และ pterocarpans (Ingham *et al.*, 1989) ดังสรุปในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 กลุ่มของสารฟลาโวนอยด์และตัวอย่างสารในแต่ละกลุ่ม (Ingham *et al.*, 1989)

กลุ่มของไอโซฟลาโวนอยด์	สารในกลุ่ม
Chromenes	-Miroestrol
	-Deoxymiroestrol
	-Isomiroestrol
Isoflavones	-Daidzein
	-Genistein
	-Kwakhurin
	-Kwakhurin hydrate
Isoflavone glycosides	-Daidzin
	-Genistin
	-Mirificin
	-Puerarin

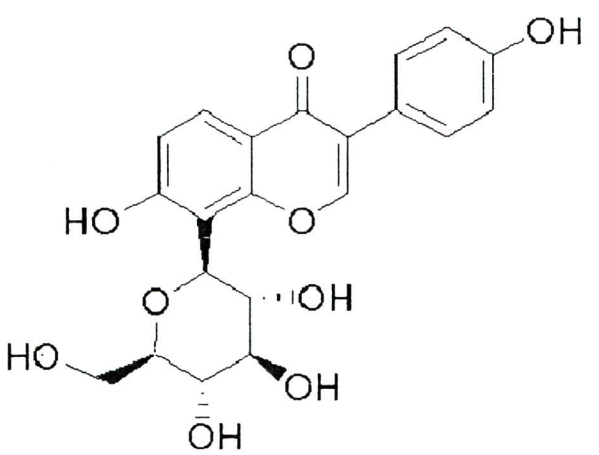
ตารางที่ 2.1 กลุ่มของสารฟลาโวนอยด์และตัวอย่างสารในแต่ละกลุ่ม (ต่อ) (Ingham *et al.*, 1989)

Coumestans	-Coumestrol
	-Mirificoumestan
	-Mirificoumestan glycol
	-Mirificoumestan hydrate
Pterocarpans	-Tuberosin
	-Puemiricarpene

ตัวอย่างของสารไอโซฟลาโวนอยด์ในกลุ่มต่าง ๆ ที่มีการใช้ประโยชน์และได้รับความสนใจในปัจจุบัน มีดังนี้

2.2.1 Puerarin

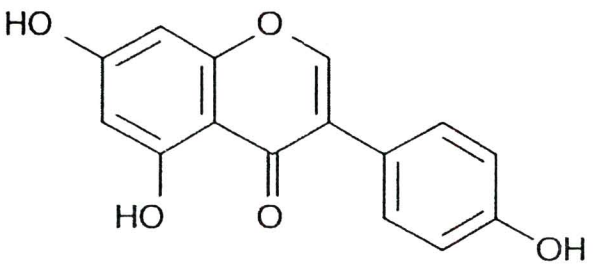
พิวรารินเป็นสารประกอบไอโซฟลาโวนอยด์ สูตรโมเลกุลคือ $C_{21}H_{20}O_9$ และสูตรโครงสร้างดังแสดงในภาพ 2.2 มีผลต่อการรักษาภาวะอ้วน (obesity) ภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance) ความดันโลหิตสูง ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติและภาวะหลอดเลือดแข็งตัว (Xu *et al.*, 2005) ลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูทดลองที่เป็นเบาหวาน (Chen *et al.*, 2004) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ต้านการเกิดโรคมะเร็ง (John *et al.*, 2004) พิวรารินแยกได้จาก *Pueraria lobota* (Guo *et al.*, 2001) มีผลให้การไหลเวียนเลือดดีขึ้น (Zhu *et al.*, 2004; Cervellati, 2002) และป้องกันการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ (Benlhabib, 2004)



ภาพที่ 2.2 สูตรโครงสร้างของ พิวราริน (Sigma-aldrich, 2009a)

2.2.2 Genistein

จีนิสทีอิน มีสูตรโครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 2.3 มีคุณสมบัติเป็นสารที่ออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน (William and Harbone, 1989) จึงมีผลต่อร่างกายหลายประการ เช่น ลดภาวะกระ ดูกพรุน (Knight and Eden, 1996) ลดไขมันอุดตันในเส้นเลือด (Antony *et al.*, 1996) ยับยั้งกระ บวนการเกิดมะเร็งหลายประการ เช่น antimutagenic, antiproliferative, antiestrogenic และ antioxidant (Frank *et al.*, 1994)



ภาพที่ 2.3 สูตรโครงสร้างของ จีนิสทีอิน (Sigma-aldrich, 2009b)

2.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในกวาวเครือขาว

2.3.1 อนุมูลอิสระ

คืออะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนที่ไม่เข้าคู่อย่างน้อย 1 อิเล็กตรอนจึงเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียร และว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาทางเคมี (ไมตรี สุทธจิตต์ และคณะ, 2545) อนุมูลอิสระอาจเกิดจากการสลายตัวของโมเลกุลที่ถูกกระตุ้นโดยรังสีเอ็กซ์ รังสีอิเล็กตรอน รังสีแกรมมา และความร้อน หรืออาจเกิดจากกระบวนการย่อยสลายสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ เกิดจากการออกซิเดชั่นของลิปิดในอาหารเนื่องจากความร้อน แสง และโลหะหนัก เช่น เหล็กและแมงกานีส และเกิดจากมลภาวะ เช่น ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ไนโตรเจนไดออกไซด์ ควันบุหรี่ ในสภาวะปกติร่างกายจะสร้างอนุมูลอิสระในอัตราที่ปกติ และเป็นไปในแนวทางที่เป็นประโยชน์ แต่ในสภาวะที่มีการสร้างมากเกินไป จะเกิดภาวะความเครียดเนื่องจากออกซิเดชัน (oxidative stress) จึงเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ พิษของอนุมูลอิสระต่อพืช เมื่อพืชอยู่ในสภาวะเครียดจะสร้างอนุมูลอิสระของ reactive oxygen species (ROS) ขึ้น (Polle and Rennenberg, 1993) ดังแสดงในตารางที่ 2.2 จึงทำให้สรีรวิทยาและการแสดงออกของยีนของพืชเปลี่ยนแปลงไป (Sharma and Davis, 1997)

ตารางที่ 2.2 สาเหตุของความเครียดในพืชที่เป็นสาเหตุของการเกิดอนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆ

Stressor	ROS
Drought	$O_2^{\circ -}$
Nutrient deficiency	$O_2^{\circ -}$
Pathogens	H_2O_2

2.3.2 สารต้านอนุมูลอิสระ

คือสารที่มีโครงสร้างที่สามารถจับอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวของอนุมูลอิสระ ทำให้ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและปฏิกิริยาลูกโซ่ได้ จึงลดอัตราการเกิดโรคร้ายแรงต่าง ๆ ที่เกิดจากอนุมูลอิสระเป็นต้นเหตุ (Gutteridge and Halliwell, 1994)

2.3.3 วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

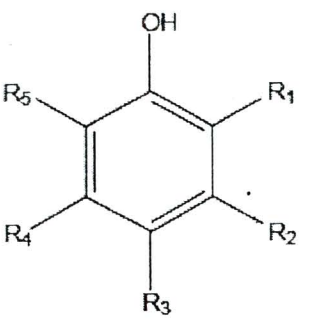
2.3.3.1 วัดความสามารถในการจับสารอนุมุลอิสระ 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH) เป็นการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่ใช้ reagent คือ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl ซึ่งเป็นอนุมูลิสระที่เสถียรในตัวทำละลายเมทานอล สารละลายนี้มีสีม่วง ดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ถ้าตัวอย่างมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้สูง ความเข้มของสารละลายสีม่วงก็จะลดลง รายงานผลเป็นค่า 50 เปอร์เซ็นต์ effective concentration (EC_{50}) ซึ่งหมายถึงปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ความเข้มข้นของ DPPH เหลืออยู่ 50 เปอร์เซ็นต์ หรือรายงานในรูปของค่า IC_{50} ด้วย ซึ่งทำโดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระกับความเข้มข้นของสารตัวอย่าง เพื่อหาค่า IC_{50} วิธี DPPH มีข้อดีคือ สะดวก รวดเร็ว ง่ายต่อการวิเคราะห์ ให้ความถูกต้อง และมี reproducibility สูง แต่มีข้อเสียคือ ไม่สามารถใช้วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเลือดได้เพราะต้องวัดในปฏิกิริยาที่เป็น alcohol ซึ่งทำให้โปรตีนตกตะกอนได้

2.3.3.2 วิธี ferric reducing/antioxidant power (FRAP) เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการตรวจสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยอาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์ และติดตามการเปลี่ยนแปลงสีของสารประกอบเชิงซ้อนคือ เมื่อสารประกอบเชิงซ้อน ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+}-TPTZ) ได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านออกซิเดชัน แล้วจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อน ferrous tripyridyltriazine (Fe^{2+}-TPTZ) ที่มีสีม่วงน้ำเงิน วิธี FRAP สามารถติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร จากนั้นศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันในสารตัวอย่าง โดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ferrous sulfate แล้วรายงานเป็นค่า FRAP value ข้อดีของวิธีนี้ก็คือ เสียค่าใช้จ่ายน้อย สะดวก รวดเร็ว มีขั้นตอนในการทดลองไม่ยุ่งยากซับซ้อนและมี reproducibility ดี

สารต้านอนุมูลอิสระในพืชที่สำคัญ ได้แก่ วิตามินอี พบมากในเมล็ดทานตะวัน ถั่วเหลือง และน้ำมันรำข้าว สารประกอบฟีนอลิค (phenolic compound) มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดสี กลิ่นและรสชาดในพืชผักและผลไม้ เช่น ฟลาโวนอยด์ (flavonoids compound) ซึ่งมีประมาณ 8,000 ชนิด (ปวีณา ช่วงทิพย์, 2546; นวลศรี รักอริยะธรรม และอัญชนา เจนวิถีสุข, 2545)

2.3.4 สารประกอบฟีนอล

เป็นอนุพันธ์ของเบนซีนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลต่ออยู่เป็นแกนหลักและอาจมีหมู่แทนที่มาแทนที่ตำแหน่ง ortho meta หรือ para ได้อีก R1 ถึง R5 เป็นหมู่แทนที่ การแทนที่ตำแหน่งต่าง ๆ เหล่านี้ทำให้สารประกอบฟีนอลในพืชมีโครงสร้างแตกต่างกันไป ดังภาพที่ 2.4 สารประกอบฟีนอลเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่สำคัญในพืช สังเคราะห์จากกรดอะมิโน ฟีนิลอะลานิน (phenylalanine) และไทโรซีน (tyrosine) อนุพันธ์ของสารประกอบฟีนอลที่พบในพืชได้แก่ ฟลาโวนอยด์ แทนนิน ลิกนิน เป็นต้น ดังแสดงในภาพที่ 2.5

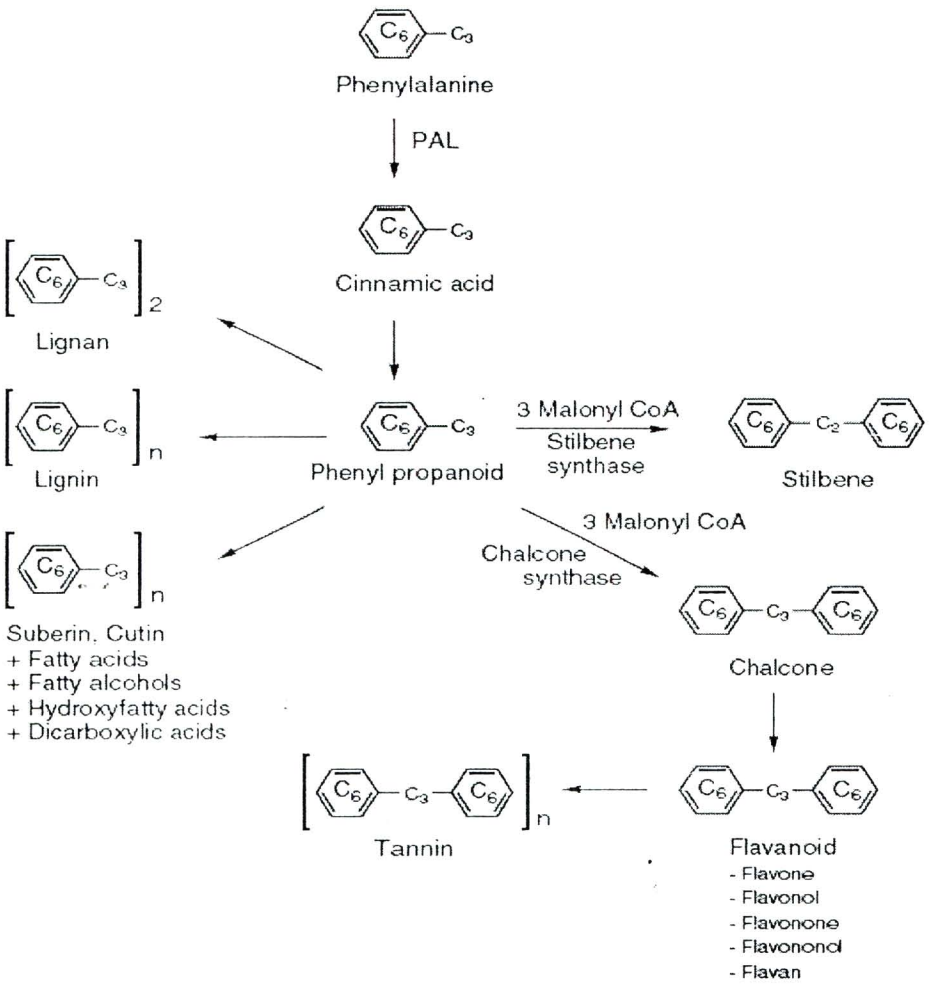


ภาพที่ 2.4 โครงสร้างพื้นฐานของสารประกอบฟีนอล

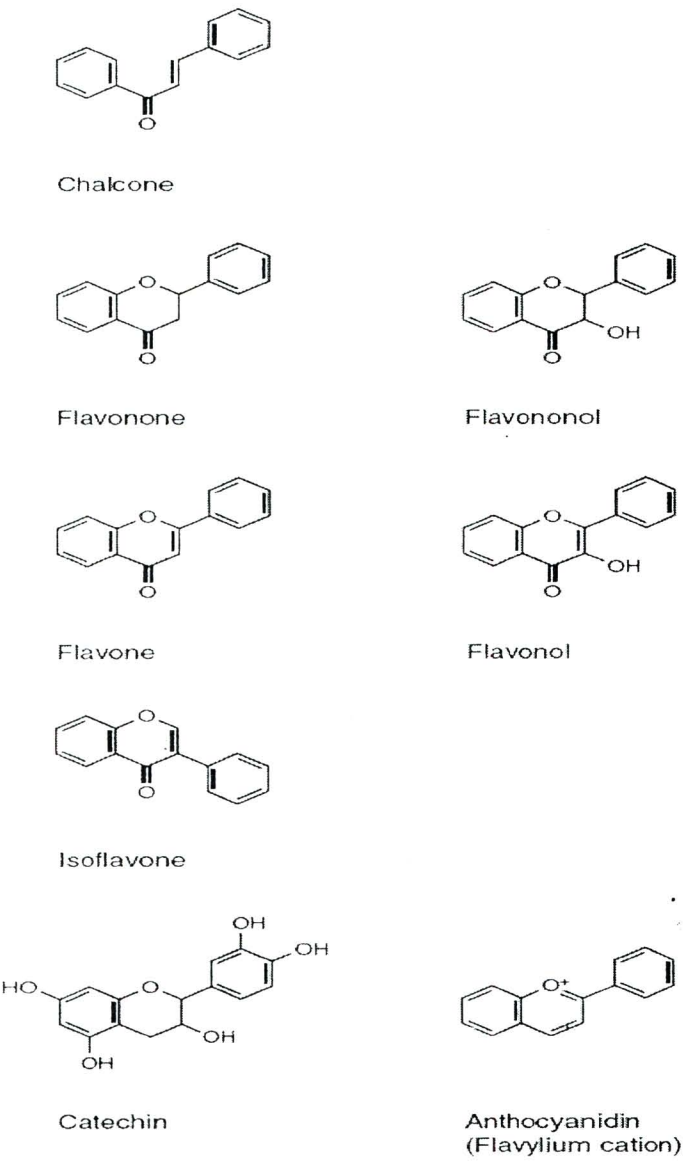
2.3.5 สารประกอบฟลาโวนอยด์

เป็นสารกลุ่มหนึ่งของสารประกอบฟีนอล เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง p-cumaryl Co A (C6-C3) กับ malonyl Co A 3 โมเลกุล ได้เป็น chalcones แล้วทำการปิดวงในสภาวะที่เป็นกรด โครงสร้างของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์จึงเป็น diphenylpropane (C6-C3-C6) ความแตกต่างของสารกลุ่มนี้จะขึ้นอยู่กับหมู่แทนที่และความไม่อิ่มตัวของสารแต่ละชนิด ตัวอย่างสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ดังแสดงในภาพที่ 2.6

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 12 ก.ย. 2554
242319
ลงทะเบียน
ลงเรียกหนังสือ



ภาพที่ 2.5 แสดงสารอนุพันธ์ของสารประกอบฟีนอล

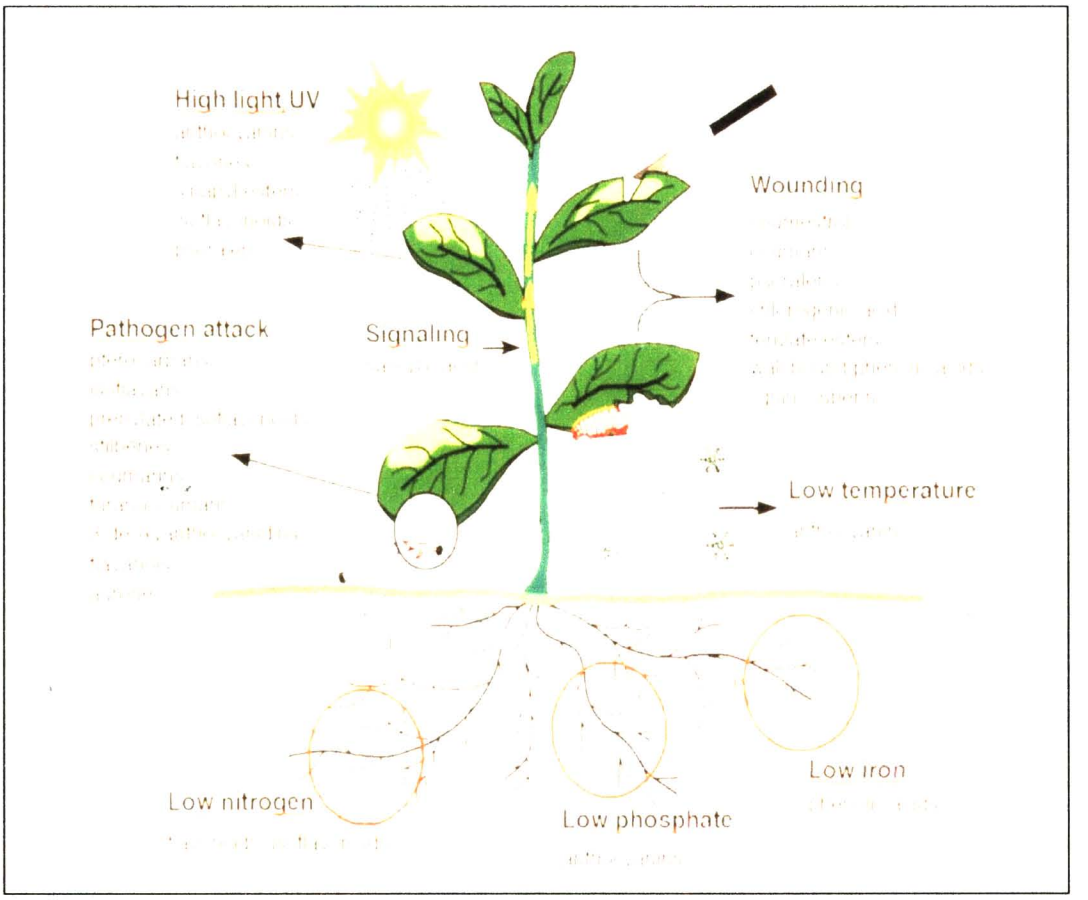


ภาพที่ 2.6 สารอนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์

2.4 สารชักนำ

สารชักนำคือโมเลกุลที่สามารถกระตุ้นกระบวนการสร้างสารทุติยภูมิ เช่น ฟีนิลโพรพานอยด์ ที่พบว่า สิ่งที่มีผลต่อสารไอโซฟลาโวนอยด์คือ ความเข้มแสง หรือ รังษียูวี การเข้าทำลายของโรคพืช การเกิดบาดแผล และปริมาณธาตุอาหารในดิน (ภาพที่ 2.7) เป็นต้น สารชักนำอาจมาภายในหรือภายนอกเซลล์ของพืชก็ได้ การจำแนกจึงขึ้นอยู่กับที่มาของสารชักนำ ได้เป็น 2 แบบ ตามลักษณะของการกำเนิด ได้แก่ปัจจัยจากสิ่งมีชีวิต เช่น สารประกอบไกลโคโปรตีน สารอินทรีย์ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ และ สารโพลีแซคคาไรด์ ที่ได้จากพืช เช่น เปกติน หรือ เซลลูโลส และที่ได้จาก

จุลินทรีย์ เช่น ไคติน ไคโตซาน หรือ กลูแคน จากสิ่งไม่มีชีวิต เช่น รังสียูวี เกลือ โลหะหนัก หรือสารเคมีที่ไปรบกวนการทำงานของเนื้อเยื่อต่าง ๆ (Heike and Dietrich, 1995)

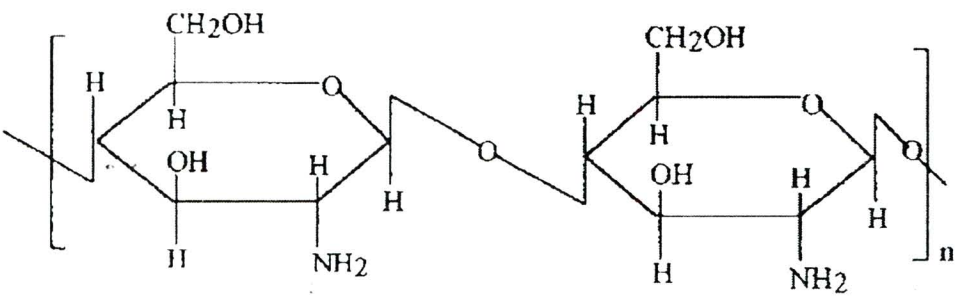


ภาพที่ 2.7 ตัวอย่างของสิ่งชักนำที่มีผลต่อการผลิตสารในวิถีการสังเคราะห์ฟีนิลโพรพานอยด์ (Dixon and Paiva, 1995)

2.4.1 ไคโตซาน (ภาพที่ 2.8)

เป็นอนุพันธ์ของไคติน หมู่แอซีติล (-CO-CH_3) ของไคทินถูกกำจัดออกเหลือเป็นหมู่อะมิโน (-NH_2) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่สอง ด้วยปฏิกิริยาเคมีความร้อนกับสารละลายด่างเข้มข้น (ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์ และสุวลี จันทร์กระจ่าง, 2542) หรือด้วยปฏิกิริยาของเอนไซม์ในกลุ่ม chitindeacetylase ถ้าหมู่แอซีติลถูกตัด หรือหลุดออกไปประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ไคทินจะถูกเรียกว่าไคโตซาน และถ้าหมู่แอซีติลถูกตัดหรือหลุดไปประมาณ 90-100 เปอร์เซ็นต์ จะเรียกว่า fully deacetylated chitosan (เยาวภา ไหวพริบ, 2534) ไคโตซานสามารถกระตุ้นการสังเคราะห์เอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase (PAL) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในวิถีการสังเคราะห์สารประกอบฟลาโวนอยด์ในพืช (Young and Kauss, 1983) การใช้เป็นสารชักนำโดยฉีดพ่นสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตรที่ใบของถั่วเหลืองเพิ่มไอโซฟลาโวนส์ในเมล็ดถั่วเหลืองได้ถึง 16-96 เปอร์เซ็นต์

(Al-Tawaha *et al.*, 2005) และเพิ่มยังดาอิดซีอินได้ถึง 150 เปอร์เซ็นต์ ไคโตซานมีคุณสมบัติเป็น linear polyelectrolyte มีความหนาแน่นทางประจุสูงจึงยึดจับกับประจุลบและโลหะได้ดี (อัษฎาวุธ แสงนภาเพ็ญ, 2542) จึงอาจช่วยเสริมการออกฤทธิ์ของสารอื่น เมื่อใช้เป็นสารชักนำในพืชได้ ไคโตซานละลายในกรดอินทรีย์อ่อน เช่น กรดแอซีติก ซิตริก เป็นต้น ไม่ละลายน้ำที่ pH เป็นกลาง ไม่สามารถละลายได้ที่ pH สูงกว่า 6.5 ไม่ละลายในสารอินทรีย์หลายชนิดแต่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ ไคโตซานมีองค์ประกอบของไนโตรเจนอยู่จึงมีบทบาทสำคัญในด้านปุ๋ยชีวภาพ และสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช (สุวลี จันทร์กระจ่าง, 2544)

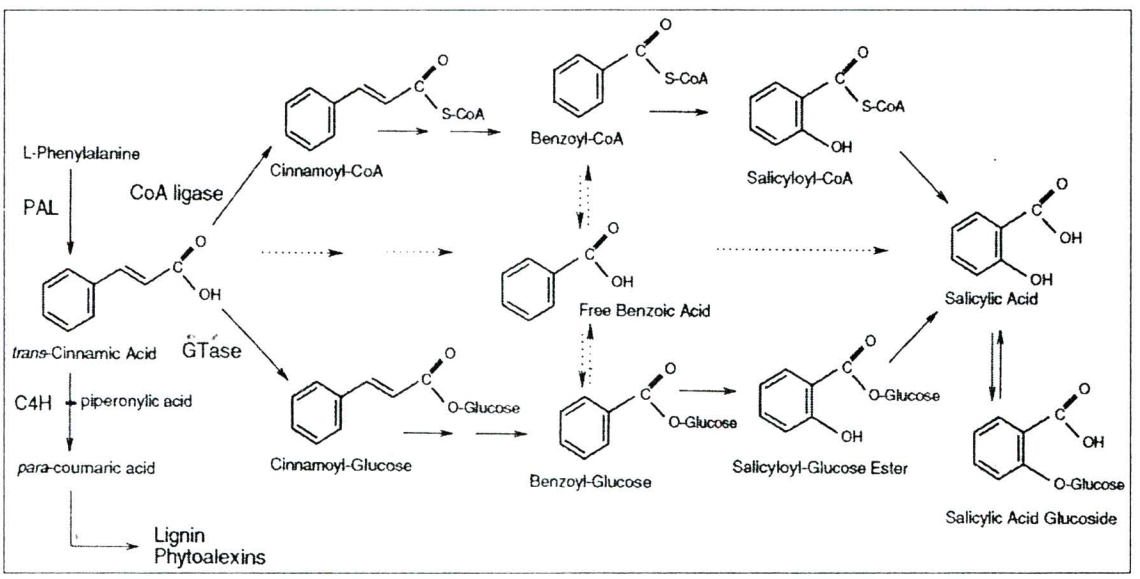


ภาพที่ 2.8 โครงสร้างของไคโตซาน จาก Muzzarelli (1973)

2.4.2 กรดซาลิไซลิก

มีสูตรโครงสร้าง และวิถีของการสังเคราะห์ แสดงในภาพที่ 2.9 กรดซาลิไซลิกสังเคราะห์มาจากกรดอมิโนฟีนิลอลานิน โดยฟีนิลอลานีนจะเปลี่ยนเป็น trancinamic acid จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็น benzoic acid และเป็น กรดซาลิไซลิกในที่สุด (Davies, 1995) กรดซาลิไซลิคเป็นผงสีขาว ไวต่อแสง มีกลิ่นฉุน (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additive, 1992) ละลายน้ำได้เล็กน้อย ละลายได้ดีในแอลกอฮอล์เข้มข้นประมาณ 15.2 กรัม/100 มิลลิลิตร เมื่อถูกความร้อนสามารถระเหิดได้ กรดซาลิไซลิกเป็นสารประกอบฟีนอลอย่างง่ายที่มีผลต่อกระบวนการเจริญเติบโตของพืช เช่น การเปิด-ปิดของปากใบ การงอกของเมล็ด การดูดซับประจุ การแสดงออกของเพศและการต้านทานการเข้าทำลายของโรค นอกจากนี้ยังยับยั้งการสังเคราะห์และการทำงานของเอธิลีน ทำให้ถูกนำมาใช้เพื่อชะลอการสุกของผลไม้ (ศิริชัย กัลยาณรัตน์, 2548) การฉีดพ่นกรดนี้ในถั่วเขียวสามารถเพิ่มจำนวนฝักและผลผลิตของถั่วเขียวได้ (Singh and Kaur, 1980) มีผลต่อการเพิ่มอัตราการสังเคราะห์แสงและปริมาณของคลอโรฟิลล์ในถั่วเหลือง (Zhao *et al.*, 1995) มีผลควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อโรคที่เข้าทำลายพืชให้จำกัดอยู่ในบริเวณเล็ก ๆ รอบ ๆ บริเวณที่เชื้อเริ่มเข้าไปในพืช เรียกว่า hypersensitive reaction (HR) ซึ่ง HR เป็นผลมาจาก systemic acquired resistance (SAR)

ซึ่งเกิดขึ้นจากการชักนำของกรดซาลิไซลิค ระบบดังกล่าวเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นให้พืชสร้างเอนไซม์ phenylalanine ammonia lyas ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์สารไอโซฟลาโวนอยด์ (Raskin, 1992) ดังนั้นการที่พืชสร้างเอนไซม์ชนิดนี้มากขึ้นอาจส่งผลทางอ้อมต่อการสังเคราะห์สารไอโซฟลาโวนอยด์เพื่อใช้ในระบบป้องกันตัวแบบ SAR ของพืชได้



ภาพที่ 2.9 สูตรโครงสร้างของกรดซาลิไซลิคและวิถีการสังเคราะห์ (Joint FAO/WHO Expert Committe on Food Additive, 1992)

2.4.3 คอปเปอร์คลอไรด์

คอปเปอร์คลอไรด์มีธาตุทองแดงที่เป็นจุลธาตุอาหารของพืช ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์เร่งปฏิกิริยารีดอกซ์ และกระบวนการถ่ายโอนอีเล็กตรอนในพืช มีผลต่อกระบวนการสร้างโปรตีน สร้างคลอฟิลล์ เพิ่มความสมบูรณ์ของการพัฒนาเมล็ดและผลอ่อน และช่วยในการ ตรึงคาร์บอนไดออกไซด์มาใช้สังเคราะห์แสง (ยงยุทธ โอสถสภา, 2543) การฉีดพ่นสารละลายที่มีส่วนผสมของทองแดงให้กับกวาวเครือขาว ทำให้ปริมาณสารสำคัญแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสารละลายของทองแดงความเข้มข้น 300 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้ดาอิดซีอินมีค่าเฉลี่ยสูงที่สุด 44.69 มิลลิกรัม/ลิตร และทำให้จีนิสทีอินมีค่าเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 28.45 มิลลิกรัม/ลิตร (ประสาร ฉลาดคิด, 2546)

2.5 โรคเบาหวาน (diabetes mellitus, DM)

คือภาวะที่ร่างการมีระดับกลูโคสในเลือดหลังอดอาหาร 12-14 ชั่วโมงแล้วยังสูงกว่า 140 มิลลิกรัม/เดซิลิตร เนื่องจากการหลั่งฮอร์โมนอินซูลินจากเซลล์บีตา (beta cell) ในไอเลตส์ออฟแลง-เกอร์แฮนส์ของตับอ่อนลดลง หรือขาดฮอร์โมนอินซูลินจากการที่เซลล์บีตาถูกทำลาย หรือการตอบสนองของเนื้อเยื่อเป้าหมายต่อการทำงานของฮอร์โมนอินซูลินลดลง ทำให้การเผาผลาญคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีนผิดปกติ องค์การอนามัยโลกแบ่งโรคเบาหวานตามสาเหตุเป็น 4 ชนิด แต่ที่เป็นปัญหาและมีผู้สนใจศึกษามากมี 2 ชนิด คือ เบาหวานชนิดที่ 1 หรือเบาหวานชนิดพึ่งฮอร์โมนอินซูลิน (type 1 diabetes mellitus หรือ insulin dependent diabetes mellitus, IDDM) เกิดจากตับอ่อนผลิตฮอร์โมนอินซูลินไม่ได้หรือผลิตได้ไม่เพียงพอ เนื่องจากเซลล์บีตาถูกทำลายจากระบบภูมิคุ้มกันที่ทำงานผิดปกติมักพบในเด็ก อาการของโรคที่มักพบได้แก่ ปัสสาวะบ่อย กระหายน้ำบ่อย น้ำหนักลด และอ่อนเพลีย โรคเบาหวานชนิดที่ 2 หรือเบาหวานชนิดไม่พึ่งฮอร์โมนอินซูลิน (type 2 diabetes mellitus หรือ non insulin dependent diabetes mellitus, NIDDM) โดยเซลล์บีตาในตับอ่อนสามารถผลิตฮอร์โมนอินซูลินได้ แต่ฮอร์โมนไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ เซลล์ไม่ตอบสนองต่อฮอร์โมน เกิดภาวะดื้อต่อฮอร์โมนอินซูลิน (insulin resistance) เป็นโรคเบา หวานชนิดที่พบได้มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 90 ของเบาหวานที่พบทั่วโลก อาการในระยะแรก ๆ ไม่เด่นชัด ผู้ป่วยทราบว่าตนเป็นโรคก็ต่อเมื่อมีอาการของภาวะแทรกซ้อนเกิดขึ้น (ณัฐธัญ แสนบัวผัน, 2545)

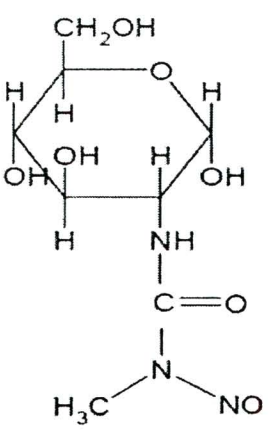
การรักษาโรคเบาหวานของแพทย์แผนปัจจุบันยังคงใช้ฮอร์โมนอินซูลินและยาสังเคราะห์ในรูปของยาเม็ดเป็นยาหลักในการรักษา เช่น ยา glibenclamides, biguanides, sulfonylureas และ thiazoledinediones เป็นต้น แต่ยาเหล่านี้มักมีผลข้างเคียง และไม่สามารถป้องกันโรคแทรกซ้อนได้ (Rang and Dale, 1991) การใช้พืชสมุนไพรในการรักษาโรคนี้จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจและมีรายงานถึงความสามารถในการใช้ลดระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์ทดลองอยู่อย่างต่อเนื่อง

2.5.1 การทำให้สัตว์ทดลองเป็นเบาหวานด้วยสเตรปโตโซโทซิน (streptozotocin)

สเตรปโตโซโทซินเป็นยาปฏิชีวนะที่สังเคราะห์ได้จาก *Streptomyces achromogenes* และสามารถสังเคราะห์ได้ในห้องปฏิบัติการ และมีสูตรโครงสร้างดังภาพที่ 2.10 มีลักษณะเป็นผงสีเหลืองอ่อน มีความเสถียรที่อุณหภูมิต่ำ สามารถละลายน้ำได้ ค่า pH ประมาณ 4-4.5 (Elias *et al.*, 1994) ใช้ชักนำเบาหวานโดยฉีดเข้าหลอดเลือดดำ (intravenous, i.v.) ของหนูวัยเจริญพันธุ์เพื่อชักนำเบาหวานชนิดพึ่งฮอร์โมนอินซูลินต้องใช้ในขนาดระหว่าง 40-60 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว (Ganda *et al.*, 1976) การฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal, i.p.) ต้องใช้ขนาดเท่ากันหรือสูงกว่า แต่ถ้าใช้ต่ำกว่า 40 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว และใช้ชักนำเพียงครั้งเดียงอาจจะไม่ได้ผล (Katsumata *et*

al., 1992) โดยยาจะกระจายไปยังตับอ่อน ลำไส้ ไปที่ตับ และไตมากที่สุด แต่ไม่เข้าสู่สมอง (Karunanayake *et al.*, 1974) สเตรปโตโซโทซินเป็นสารกลุ่ม methylnitrosourea จึงออกฤทธิ์โดยจับที่ glucosetransporter (GLUT2) และผ่านเข้าไปในเซลล์บีตาในตับอ่อน (Schnedl *et al.*, 1994) ทำให้เกิดการเติมหมู่ alkyl ที่สายดีเอนเอ จึงทำให้สายดีเอนเอเสียหาย (Elsner *et al.*, 2000) นอกจากนี้ยังทำให้เกิด nitric oxide (NO) ซึ่งก็มีผลทำลายเซลล์บีตา (Szkudelski, 2001) ทำให้เซลล์บีตาตาย และมีการทำงานที่ผิดปกติ จึงมีการสังเคราะห์ proinsulin ลดลง จึงหลั่งอินซูลินได้ลดลงเกิดเป็นโรคเบาหวาน (Nakatsuka *et al.*, 1990)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเบาหวานโดยสเตรปโตโซโทซินได้แก่ 1) อาหารถ้าหนูกินอาหารที่มีปริมาณโปรตีนสูง และคาร์โบไฮเดรตต่ำ (โปรตีน 63 เปอร์เซ็นต์, คาร์โบไฮเดรต 6 เปอร์เซ็นต์) ก่อนการฉีดสเตรปโตโซโทซินโอกาสเกิดโรคเบาหวานจะลดลง (Schmidt *et al.*, 1980) 2) ขนาดของสเตรปโตโซโทซินและชนิดของสัตว์ทดลอง ความรุนแรงของการเกิดโรคเบาหวานจะขึ้นอยู่กับขนาดของสารที่มากขึ้น ขนาดที่นิยมใช้จะอยู่ระหว่าง 25-200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ทดลอง ขนาดที่เหมาะสมต่อหนูแรทคือ 50-65 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (Karunanayake *et al.*, 1974) 4) อายุ เมื่อให้สเตรปโตโซโทซินในสัตว์ทดลองที่อายุน้อยโอกาสเกิดโรคเบาหวานก็จะน้อยลง Wong and Wu (1994) รายงานว่าการให้สเตรปโตโซโทซินขนาด 60 มิลลิกรัม/กิโลกรัม แบบ i.v. ในหนูอายุ 8 สัปดาห์ จะเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเบาหวานดีกว่าการให้ในหนูอายุ 4 และ 6 สัปดาห์

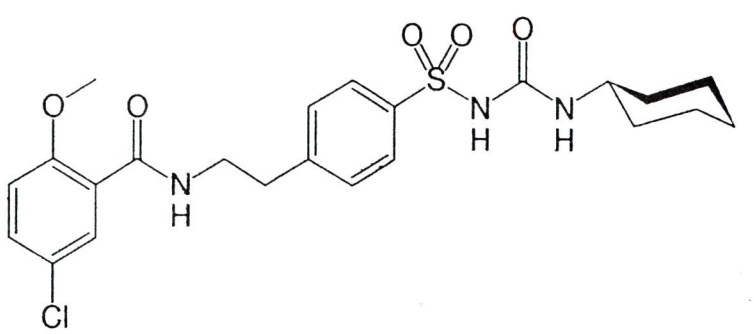


ภาพที่ 2.10 สูตรโครงสร้างของสเตรปโตโซโทซิน (Elias *et al.*, 1994)

2.5.2 ยารักษาโรคเบาหวานชนิดกลัยเบนคลาไมด์

กลัยเบนคลาไมด์เป็นยา กลุ่ม second generation sulfonylurea เป็นยาเม็ดลดน้ำตาลในเลือดชนิดหลักที่ใช้มาเกือบ 40 ปีแล้ว และยังคงใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน เพราะเทียบตามน้ำหนักยาแล้วจะมีความแรงกว่า first generaton sulfonylurea ถึง 50-100 เท่า และมีสูตรโครงสร้าง คือ 1-{4-[2-(5-chloro-2-methoxybenzamido) ethyl] benzensulfonyl}-3-cyclohexylurea (Davis and Gramer, 1999) (ภาพที่ 2.11) กลัยเบนคลาไมด์เป็นกรดอ่อน ดูดซึมในระบบทางเดินอาหารได้ประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์ (Ferner and Neil, 1988) กลัยเบนคลาไมด์กระตุ้นเซลล์บีตาให้หลั่งอินซูลิน แต่ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างอินซูลินได้ ยาออกฤทธิ์โดยจับกับรีเซพเตอร์ที่ผนังเซลล์เรียกว่า sulfonylurea receptor (SUR) และทำให้เกิดการปิดกั้น ATP sensitive potassium channels ที่ผนังของเซลล์บีตาจึงเกิด membrane depolarization ขึ้นและทำให้ calcium channels ที่ผนังเซลล์เปิดทางให้แคลเซียมเคลื่อนย้ายจากภายนอกเข้าสู่เซลล์ได้ การเพิ่มขึ้นของแคลเซียมภายในเซลล์ทำให้มีการเคลื่อนย้าย insulin granule มาที่ผนังเซลล์และหลั่งอินซูลินออกมา (Schmid-Antomarchi *et al.*, 1987; Luzi and Pozza, 1997) ปัจจุบันพบว่า SUR เป็นส่วนหนึ่งของ ATP sensitive potassium channels ซึ่งอยู่บนผนังเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่ามีอยู่ที่ผนังเซลล์ของกล้ามเนื้อหัวใจและหลอดเลือด ซึ่งทำให้ยามีผลต่อการเต้นและการบีบตัวของหัวใจได้ (Ashcroft and Gribble, 1999)

กลัยเบนคลาไมด์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ในระยะที่ยังไม่เกิดภาวะ ketoacidosis และสามารถลดระดับของ glucagon ในเลือดได้จึงมีผลช่วยลดการเกิดภาวะ ketoacidosis (อรพรรณ มาตังคสมบัติ, 2544) ฤทธิ์ที่ไม่พึงประสงค์ของยาพบในเดือนแรกที่ใช้ยา เช่น เกิดผื่นคัน คลื่นไส้ อาเจียน เบื่ออาหาร ตัวเหลือง เป็นต้น (Harrigan *et al.*, 2001)



ภาพที่ 2.11 สูตรโครงสร้างของกลัยเบนคลาไมด์ (Davis and Gramer, 1999)

ความเป็นประโยชน์ของกวาวเครือขาวเกิดจากการมีสารสำคัญสะสมอยู่ในส่วนหัวที่เป็นส่วนสะสมอาหาร ในธรรมชาตินั้นสารที่สะสมอยู่มีความแปรปรวนไปตามสภาพแวดล้อมและการควบคุมโดยพันธุกรรม และการปลูกเพื่อใช้ประโยชน์นั้นยังเป็นที่ถกเถียงในวงวิชาการ และยังไม่ค่อยได้รับความเชื่อถือในด้านคุณภาพของผลผลิตเท่าที่ควร ดังนั้นการปลูกให้ได้คุณภาพดี ควรได้สารสำคัญไม่น้อยกว่าที่เก็บจากป่า และต้องมีความสม่ำเสมอของสารสำคัญ หรือสามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารสำคัญได้ การใช้สารชักนำชนิดต่าง ๆ ในพืชตะกูลเดียวกัน และถูกพัฒนาไปในเชิงอุตสาหกรรม โดยอาศัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วกระตุ้นให้พืชสร้างสารสำคัญ แต่มีข้อจำกัดในด้านต้นทุนสูง การชักนำในแปลงปลูกจึงเป็นแนวทางที่น่าสนใจ จากการทดลองที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี พบว่าธาตุโลหะหนักบางอย่าง เช่น เหล็ก ทองแดง และสังกะสี ทำให้กวาวเครือขาวสร้างสารสำคัญมากขึ้น ดังนั้นการใช้สารชนิดอื่น ๆ เช่น ไคโตซาน กรดซาลิไซลิก และคอปเปอร์คลอไรด์ ทั้งที่เป็นชนิดเดี่ยว ๆ หรือใช้ร่วมกันน่าจะให้ผลที่ดีขึ้น และอาจเป็นแนวทางให้เกิดการผลิตเป็นสารชักนำสำเร็จรูปขึ้นมาให้ผู้ปลูกกวาวเครือหรือสมุนไพรที่มีสารสำคัญคล้าย ๆ กัน ได้