บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

สารต้านอนุมูลอิสระที่พัฒนาสังเคราะห์ขึ้นส่วนใหญ่จะออกแบบให้มีขนาดโมเลกุลเล็ก โดยใช้โครงสร้างของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในธรรมชาติ และสมุนไพร มาดัดแปลงโครงสร้างให้มีคุณสมบัติทางเคมี และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาดีขึ้นกว่าสารตั้งต้นที่พบตามธรรมชาติ สารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารที่ทำหน้าที่ชะลอ หรือป้องกันการเกิดขบวนการ oxidation ได้ ในวงการแพทย์ยอมรับว่าพยาธิสภาพของการเกิดโรคหลายชนิด เช่น โรคในระบบหัวใจและหลอดเลือด หรือโรคมะเร็ง มีความเกี่ยวข้องสัมพันธ์กับการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกาย ดังนั้นการทำลายหรือควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระดังกล่าว จะช่วยในการป้องกัน หรือรักษาโรคต่างๆ ที่เกิดขึ้น จากการศึกษาทางระบาดวิทยาจำนวนมากยืนยันถึงการชะลออัตราการเสี่ยง และเพิ่มอัตราการป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง โรคของระบบประสาทและการส่งสัญญาณสื่อ โรคที่เกี่ยวกับระบบอิมมูน และโรคในระบบหัวใจและหลอดเลือด รวมถึงโรคอื่นๆที่มีความสัมพันธ์กับอนุมูลอิสระ[2] ซึ่งผลดังข้างต้นพบว่ามาจากการแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบประเภท vitamine C, vitamine E, beta-carotene, flavonoids และสารกลุ่ม phenolics อื่นๆ เช่น phenolic acid, alkaloid, iridoids, terpenoids และ coumarins[9-14] เป็นต้น

coumarins เป็นสารที่พบในพืชจำนวนมาก ทั้งพืชที่พบในประเทศไทยและต่างประเทศ มีรายงานว่าสารกลุ่ม coumarins เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเบื้องต้นพบว่ามีฤทธิ์เป็น สารต้านมะเร็ง[4-5,18] antimalaria[6,7], antimicrobial[6-7], antifungal[8] และ anti-inflammatory[19-20] จากรายงานดังกล่าว ถือเป็นข้อมูลเบื้องต้นให้มีการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างทางเคมีของสาร coumarins ต่อการแสดงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาดังกล่าว รวมถึงการพัฒนาดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีบางส่วนของสารกลุ่ม coumarin เพื่อหวังผลให้ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาดีขึ้นกว่าสารต้นแบบ ดังเช่น การศึกษาดัดแปลงโครงสร้างสาร xanthyletin ซึ่งมีโครงสร้างหลักเรียกว่า coumarin พบว่าสาร xanthyletin เมื่อนำมาทดสอบทดสอบกับเซลล์มะเร็ง L-1210 พบว่าเมื่อเปลี่ยนหมู่ hydroxyl ให้เป็นหมู่ acetate ซึ่งยังคงสามารถแสดงฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งได้ดีด้วยค่า IC_{50} 6.5 และ 5.0 μM ตามลำดับ[5] และยังได้สังเคราะห์อนุพันธ์ ester ต่างๆ ด้วย[15-17] นอกจากการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของหมู่ hydroxyl บนโครงสร้างหลักของสาร coumarins แล้วยังได้ศึกษาหมู่อื่นๆที่แทนที่บนโครงสร้างของสาร coumarins ด้วยเช่นการศึกษาหมู่ dimethylpropyl บนโครงสร้างของสาร pyranocoumarins ต่อการออกฤทธิ์เป็นสารต้านมะเร็ง พบว่าสาร กลุ่ม pyranocoumarins และอนุพันธ์ที่มีการดัดแปลงตรงสาย dimethylpropyl ได้แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง A459, MCF7, KB c และ KB-VIN รวมทั้งสามารถต้านเชื้อไวรัส HBV ได้ด้วย[18]

ในประเทศไทยมีรายงานการค้นพบสาร dentatin และ nordentatin ใน ต้นสันโศก (*Clausena excavate*, Rutaceae) พบสารกลุ่ม แสดงฤทธิ์ antimicrobial และ antifungal[8] และจากต้นส่องฟ้า (*Clausena harmandiana*, Rutaceae) เนื่องจากการแยกสกัดสาร dentatin จากต้นส่องฟ้าสามารถทำได้ง่ายไม่ยุ่งยากรวมถึงสามารถแยกสารได้ในปริมาณสูง ทำให้มีสารตั้งต้นจากธรรมชาติปริมาณเพียงพอที่จะสามารถนำมาศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเบื้องต้นอื่นๆ รวมถึงฤทธิ์ใน

การต้านอนุมูลอิสระ และทำการดัดแปลงโครงสร้างทางเคมี โดยสารที่แยกได้จากธรรมชาติ และที่สังเคราะห์ขึ้นมาได้ในครั้งนี้จะไดทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นด้วยวิธี DPPH assay และ TBAR assay ดังนี้

1. <u>การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay</u>

DPPH assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ซึ่งใช้ reagent คือ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) เป็น stable radical ในตัวทำละลาย methanol ซึ่งสารละลายนี้มีสีม่วง ซึ่งดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 550 nm โดย $DPPH^{\cdot}$ จะเกิดปฏิกิริยากับ antioxidant (AH) หรือกับ radical species ($R^{\cdot}$) ได้สมการคือ

$$DPPH^{\cdot} + AH \longrightarrow DPPH\text{-}H + A^{\cdot}$$

$$DPPH^{\cdot} + R^{\cdot} \longrightarrow DPPH\text{-}R$$

ถ้าตัวอย่างมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้สูง ความเข้มของสารละลายสีม่วงก็จะลดลง ซึ่งจะรายงานผลการทดลองเป็นค่า 50% effective concentration (EC50) ซึ่งหมายถึงปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ $DPPH^{\cdot}$ เหลืออยู่ 50% (10)การศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ในสารตัวอย่างนิยมรายงานเป็นค่า EC50 ทำโดยสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % Remaining $DPPH^{\cdot}$ กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน / ตัวอย่าง เพื่อหาค่า EC50 โดยคำนวณ %Remaining $DPPH^{\cdot}$ และนอกจากนี้แล้วก็ยังมีการรายงานในรูปของค่า IC50 ด้วย ซึ่งทำโดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % Inhibition $DPPH^{\cdot}$ กับความเข้มข้นของสารตัวอย่าง เพื่อหาค่า IC50 โดย คำนวณ % Inhibition $DPPH^{\cdot}$ ดังสมการ :

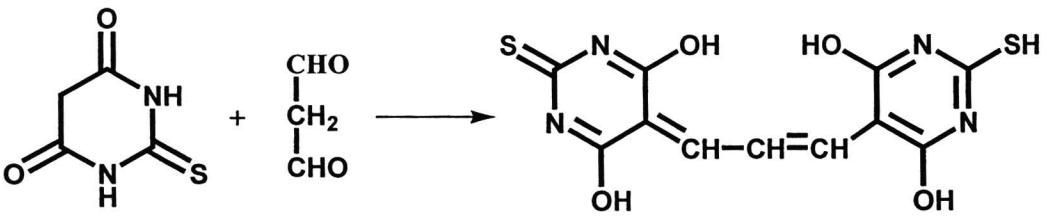
$$\%\ \text{Inhibition DPPH} = \left[\frac{Abs_{control}}{A \quad bs_{control} - Abs_{sample}} \right] \times 100$$

DPPH assay เป็นวิธีที่มีข้อดีคือ เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ง่ายต่อการวิเคราะห์ ให้ความถูกต้อง และมี reproducibility สูง แต่มีข้อเสียคือ ไม่สามารถใช้วิธีนี้วิเคราะห์ antioxidant activity ของเลือดได้เพราะต้องวัดในปฏิกิริยาที่เป็น alcohol ซึ่งทำให้โปรตีนตกตะกอนได้

2. <u>การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี lipid peroxidation (TBAR assay)</u>

Lipid peroxidation เป็นขบวนการทำลาย polyunsaturated fatty acids (PUFA) โดยปฏิกิริยา oxidation อย่างต่อเนื่อง ทำให้เกิดการผลิตสารประกอบต่างๆ ตามลำดับคือ lipid hydroperoxide, cyclic peroxides, cyclic endoperoxides และผลิตผลท้ายคือ สารประกอบ ketones และ aldehydes รวมถึง malondialdehyde (MDA) ผลิตผลจากกระบวนการ lipid peroxidation เหล่านี้ (รวมทั้ง MDA) สามารถทำปฏิกิริยากับ thiobarbituric acid (TBA) ในรูปของ

การรวมตัวเป็น adduct จึงนิยมเรียกการตรวจวัดภาวะ lipid peroxidation โดยวิธีนี้ว่า TBA test และเรียกกลุ่มของสารประกอบที่สามารถเข้าทำปฏิกิริยานี้รวมกันว่า TBA reactive a]substance (TBARS) โดยหากตรวจพบ TBARS มากก็เป็นตัวบ่งชี้ว่ามีกระบวนการ lipid peroxidation เกิดขึ้นมากได้



TBA MDA TBARS

สำหรับการประเมินภาวะ lipid peroxidation ที่เกิดขึ้นในตัวอย่างชีววัตถุ โดยนำตัวอย่างมาทำปฏิกิริยากับ TBA ภายใต้สภาวะที่มีความเป็นกรดแก่ (pH3) ที่อุณหภูมิสูง โดยสาร MDA 1 โมเลกุล สามารถทำปฏิกิริยากับ TBA ได้จำนวน 2 โมเลกุลได้สารประกอบเชิงซ้อนเป็น TBARs (TBA reactive substance) ที่มีสีชมพูและดูดกลืนแสงได้สูงสุดในช่วงความยาวคลื่น 528-551 nm สามารถนำไปวิเคราะห์เชิงปริมาณได้

สำหรับงานวิจัยในครั้งนี้ คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นของสารสกัดหยาบและสารสกัดบริสุทธิ์จากต้นส่องฟ้า ซึ่งผลการทดลองเบื้องต้นให้ผลเป็นที่หน้าพอใจ ประกอบกับข้อมูลในการดัดแปลงโครงสร้างสาร coumarins ต่อฤทธิ์อื่นๆ ทำให้คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะดัดแปลงโครงสร้างของสาร nordentatin ที่แยกได้จากสมุนไพรไทย ทั้งนี้เพื่อมุ่งหวังที่จะให้ได้สารต้านอนุมูลอิสระชนิดใหม่ที่เป็นสารอนุพันธ์ของสาร nordentatin เพื่อพัฒนาต่อเป็น neuroprotective agents ที่จะสามารถพัฒนาต่อเป็นยารักษาโรคทางระบบประสาท เช่น โรค Alzheimer และโรค Parkinson เป็นต้น ซึ่งจะทำให้ประเทศไทยสามารถผลิตยาจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีอยู่ในประเทศเองได้ จึงเป็นการลดต้นทุนในการนำเข้ายาจากต่างประเทศ และเป็นการส่งเสริมการใช้สมุนไพรไทย รวมถึงการส่งเสริมให้สมุนไพรไทยเป็นที่รู้จักและยอมรับในระดับสากลอีกด้วย