บทที่ 2
วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การทดสอบความเป็นพิษต่อผิวหนังของผลิตภัณฑ์สำหรับใช้กับผิวหนังที่มุ่งสำหรับใช้เป็นยา และเครื่องสำอางมีประโยชน์ในการประเมินผลกระทบของผลิตภัณฑ์ต่อผิวหนังทั้งในแง่พิษ อาการข้างเคียง หรือการกระตุ้นให้เกิดผลใด ๆ ต่อผิวหนัง การทดสอบมีลักษณะเฉพาะแตกต่างจากการทดสอบความเป็นพิษที่เกิดขึ้นกับร่างกายส่วนอื่นด้วยลักษณะเฉพาะของผิวหนัง การทดสอบความเป็นพิษได้มีการพัฒนาเพิ่มขึ้นเมื่อมีความตื่นตัวในการผลิตเครื่องสำอางด้วยนาโนเทคโนโลยีซึ่งคาดว่าจะผ่านเข้าผิวหนังได้มากขึ้น การทดสอบดั้งเดิมโดยใช้แผ่นปิดผิวหนัง (patch test) ของสัตว์ทดลองก่อนที่จะทำการทดสอบในคนกลับกลายเป็นเงื่อนไขการค้าระหว่างประเทศซึ่งมีห้ามการจำหน่ายเครื่องสำอางที่ทำการทดสอบในสัตว์ทดลองตั้งแต่เดือนมีนาคม พ.ศ. 2552 เป็นต้นมาโดยเฉพาะกลุ่มประเทศในสหภาพยุโรป (European Union) องค์การเพื่อความร่วมมือทางเศรษฐกิจและการพัฒนา (Organization for Economic Cooperation and Development, OECD) จึงมีบทบาทในการกำหนดแนวปฏิบัติ (guidelines) ต่าง ๆ รวมทั้งการทดสอบความเป็นพิษต่อผิวหนังซึ่งกำหนดให้ใช้เซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงด้วย การทบทวนวรรณกรรมนี้จึงเกี่ยวข้องกับผิวหนังความเป็นพิษต่อผิวหนัง การทดสอบความเป็นพิษต่อผิวหนังเน้นการใช้เซลล์เพาะเลี้ยง และสารที่ทดสอบในงานวิจัยนี้ได้แก่นาโนซีโอไลต์และแอนโทไซยานิน รวมทั้งกลไกที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างนาโนซีโอไลต์ที่ดูดซับแอนโทไซยานิน รวมทั้งวิธีการที่ใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพในการดูดซับ

2.1 นิยามที่เกี่ยวข้อง

สารพิษ (toxin, poison, toxicant หรือ toxic) หมายถึง สารใด ๆ ที่อาจก่ออันตราย หรือก่ออาการไม่พึงประสงค์ให้กับสิ่งมีชีวิตได้

ความเป็นพิษ (toxicity) หมายถึง ความสามารถ หรือคุณสมบัติเฉพาะของสารใด ๆ ที่ก่อให้เกิดอันตรายหรือการบาดเจ็บต่อสิ่งมีชีวิตได้ ซึ่งอาจทดสอบได้ทั้งในหลอดทดลอง (*in vitro*) และในสิ่งมีชีวิต (*in vivo*) โดยนัยนี้ความเป็นพิษจึงเป็นคำที่มีความหมายเชิงคุณลักษณะ (qualitative) เนื่องจากสารทุกชนิดหากได้รับมากพอล้วนอาจก่อพิษได้ทั้งสิ้น ดังนั้นความเป็นพิษของสารใด ๆ จึงไม่ควรพิจารณาจากคุณสมบัติเฉพาะของสารเพียงอย่างเดียว หากต้องพิจารณาถึงขนาด และการได้รับเข้าสู่มนุษย์ (exposure) ร่วมด้วยเสมอ

ความเป็นพิษต่อผิวหนัง (skin toxicity) หมายถึง ความสามารถ หรือคุณสมบัติเฉพาะของสารใด ๆ ที่จะก่อให้เกิดอาการข้างเคียงเมื่อทาบนผิวหนังคน วิธีการศึกษาจะมี 2 วิธี ได้แก่ การทดสอบฤทธิ์ระคายเคือง (skin/dermal irritation test) และการทดสอบฤทธิ์กัดกร่อนต่อผิวหนัง (skin/dermal corrosion test)

การระคายเคืองผิวหนัง (skin irritation) หมายถึง การทำให้ผิวหนังและเซลล์ผิวหนังเกิดความเสียหายที่อาจผันกลับมาสู่สภาพเดิมได้ (reversible) หลังจากได้สัมผัสสารเคมีที่ก่อให้เกิดการระคายเคือง

การกัดกร่อนผิวหนัง (skin corrosion) หมายถึง การเกิดความเป็นพิษต่อผิวหนัง และเซลล์ผิวหนังอย่างรุนแรง เกิดความเสียหายจนไม่อาจผันกลับมาเป็นอย่างเดิมได้ มีการเน่าเปื่อยของเนื้อเยื่อเห็นได้ชัดเจนทะลุผ่านผิวหนังชั้นบนลงไปถึงผิวหนังชั้นล่าง เมื่อได้รับการสัมผัสของสารเคมีที่ก่อให้เกิดการกัดกร่อน

2.2 ผิวหนัง (the skin)

ผิวหนังเป็นอวัยวะที่มีขนาดใหญ่ทำหน้าที่ห่อหุ้มร่างกายไว้ และป้องกันร่างกายจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ทั้งที่เป็นเชื้อจุลชีพ สารเคมี แสงหรืออุณหภูมิ ผิวหนังเป็นอวัยวะที่มีพื้นที่กว้างที่สุดในร่างกาย มนุษย์ผู้ชายจะมีพื้นที่ 1.9 ตารางเมตร หรือ 20 ตร.ฟุต ส่วนผู้หญิงมีพื้นที่ 1.6 ตารางเมตร หรือ 17 ตารางฟุต หน้าที่สำคัญหลายประการเช่น การห่อหุ้มร่างกายให้คงรูปร่างอยู่ได้ การปกป้องอวัยวะภายในจากสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ความชื้น อากาศแห้ง เชื้อจุลชีพ ฝุ่นละออง อนุภาค ไอ ควัน การควบคุมอุณหภูมิโดยการทำงานของต่อมเหงื่อและขุมขน การรับความรู้สึกได้แก่ ความรู้สึกเจ็บปวด การสัมผัส ความรู้สึกร้อนหรือหนาว ความรู้สึกว่ามีน้ำหนักกดทับ เป็นต้น การต่อต้านสิ่งแปลกปลอมจากภายนอกด้วยระบบภูมิคุ้มกันร่างกายโดยการหลั่งสารอักเสบ (inflammatory mediators) จากการที่เซลล์ได้รับการกระตุ้นจากสารแปลกปลอมจากภายนอกหรือเกิดจากกระบวนการภายในเอง (Roguet, 1999) โดยไซโตไคน์ (cytokines) เป็นกลุ่มสารอักเสบที่สำคัญที่หลั่งจากเซลล์ผิวหนังในกระบวนการอักเสบ และอินเตอร์ลิวคิน-1 แอลฟา เป็นสารในกลุ่มไซโตไคน์ตัวหลักที่เซลล์ผิวหนังหลั่งออกมาในช่วงเริ่มต้นของการที่ระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์ถูกกระตุ้น (OECD, 2008)

โครงสร้างของผิวหนังประกอบด้วยชั้นหนังกำพร้า (epidermis) ชั้นหนังแท้ (dermis) และชั้นใต้ผิวหนังซึ่งเป็นชั้นไขมัน (subcutaneous tissue)

2.2.1 ชั้นหนังกำพร้า (epidermis) เป็นผิวหนังชั้นนอกสุดประกอบด้วยเนื้อเยื่อบุผิวชนิดสแตรทิฟายด์สแควมัส (stratified squamous epithelium) มีเซลล์รูปแบนซ้อนกันหลายชั้น ผิวหนังชั้นนี้ไม่มีหลอดเลือดมาเลี้ยง อาหารจะส่งไปด้วยการแพร่ (diffusion) จากหลอดเลือดในชั้นหนังแท้ เซลล์ส่วนใหญ่ของชั้นนี้เป็นเคอราติโนไซต์ (keratinocyte cell) เจริญมาจากชั้นเอกโทเดิร์ม (ectoderm) เป็นเซลล์สำหรับสร้างผิวและมีการสร้างโปรตีนเคอราติน (keratins) นอกจากนี้ยังมีเมลาโนไซต์ (melanocytes) ทำหน้าที่สร้างเม็ดสีของผิวหนัง หน้าที่สำคัญของหนังกำพร้าคือเป็นด่านปกป้องสารหรือเชื้อจุลชีพรวมทั้งอนุภาคเข้าสู่ร่างกาย และป้องกันของเหลวภายในไหลออกนอกร่างกาย เมื่อมีอันตรายเกิดขึ้นกับผิวหนัง เช่นถูกของมีคมบาดเป็นแผล จะทำให้ผิวหนังฉีกขาดหรือถูกตัดขาดออกจากกัน ทำให้เชื้อโรคเข้าสู่ร่างกายได้ ถ้าบาดแผลลึกตัดเส้นเลือดฝอยขาดก็จะทำให้มีโลหิตไหลออกจากร่างกายได้ เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ดูชั้นผิวหนังกำพร้าที่ตัดขวางจะเห็นชั้นย่อย ๆ อีก 5 ชั้นได้แก่ชั้นสตราตัม คอร์เนียม (stratum corneum) ชั้นสตราตัม ลูซิดัม (stratum lucidum) ชั้นสตราตัม แกรนูโลซัม (stratum granulosum) ชั้นสตราตัม สไปโนซัม (stratum spinosum) และชั้นสตราตัม เจอร์มินาติวัม (stratum germinativum) ถัดจากนี้เข้าไปเป็นชั้นหนังแท้

2.2.2 ชั้นหนังแท้ (dermis) เป็นชั้นของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันอยู่ตอนล่างถัดจากชั้นของหนังกำพร้า ความหนาของชั้นหนังแท้ ประมาณ 0.5 มิลลิเมตร ที่ชั้นของหนังแท้จะพบเซลล์ได้แก่ เซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast cell) และเซลล์มาสท์ (mast cell) มีต่อมเหงื่อ (sweat glands) ต่อมไขมัน (sebaceous glands) เส้นเลือด (blood vessels) เส้นประสาท (nerve fibers) ถุงรากขน (hair follicles) และมีเซลล์ประสาท (nerve cells)

รับความรู้สึกอยู่ ผิวหนังชั้นนี้เป็นโปรตีนโครงสร้างเป็นส่วนใหญ่ประกอบด้วยโปรตีนเส้นใย (fibrous proteins) ชนิดต่าง ๆ และพอลิแซกคาไรด์ (polysaccharides) มีคุณสมบัติช่วยอุ้มน้ำ โปรตีนดังกล่าวได้แก่ เส้นใยคอลลาเจน (collagens) และอีลาสติน (elastin) ซึ่งสร้างจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เส้นใยเหล่านี้เป็นโครงสร้างที่ให้ความแข็งแรงและความยืดหยุ่นแก่ผิวหนัง

2.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อผิวหนัง

วิธีการที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อผิวหนังมีหลายวิธี วิธีการที่นิยมใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อผิวหนังเบื้องต้นก็คือวิธีการทดสอบด้วยปิดผิวหนัง (patch test) การทดสอบในสัตว์ทดลอง ได้แก่ กระต่าย หรือ หนูตะเภา ทำได้โดยการใช้แผ่นสำลีนำมาชุบสารทดสอบหรือทาผลิตภัณฑ์ที่ต้องการทดสอบ แล้วนำแผ่นสำลีปิดทับลงบนผิวหนังทิ้งไว้ประมาณ 2 - 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาแล้วเปิดแผ่นสำลีออกเพื่อทำการบันทึกลักษณะของผิวหนัง ภายหลังจากรับสัมผัสกับสารทดสอบ สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่อาจพบได้ เช่น ผื่นแดง บวม อีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้กันมากทำในกระต่าย โดยการโกนขนบริเวณที่จะใช้ทดสอบซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นส่วนหลังของสัตว์ทดลอง แล้วนำแผ่นเทปกาวที่ได้ทาสารที่ต้องการทดสอบไว้ก่อนแล้วนำไปปิดที่ผิวหนัง (Draize et al., 1944)

ในการทดสอบความเป็นพิษต่อผิวหนังเพื่อหลีกเลี่ยงข้อจำกัดทางด้านจริยธรรม และข้อจำกัดในการแปรผลมาสู่มนุษย์ รวมทั้งข้อห้ามใช้สัตว์ทดลองในการทดสอบความเป็นพิษต่อผิวหนังของสารที่ใช้เตรียมรวมถึงผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางเพื่อการจำหน่าย ตามข้อกำหนดการค้าระหว่างประเทศของกลุ่มประเทศในสหภาพยุโรป ซึ่งมีผลตั้งแต่เดือนมีนาคม พ.ศ. 2552 เป็นต้นมาเป็นผลให้ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่ต้องการทดสอบความระคายเคืองหรือความเป็นพิษต่อผิวหนังต้องเลี่ยงการทดสอบโดยใช้สัตว์ทดลอง (Chunthapong et al., 2008) และมีการพัฒนาวิธีการใช้เซลล์เพาะเลี้ยงทดแทนการทดสอบความเป็นพิษโดยใช้สัตว์ทดลอง

องค์การเพื่อความร่วมมือทางเศรษฐกิจและการพัฒนา (Organization for Economic Cooperation and Development) หรือ OECD เป็นองค์กรที่เกิดจากความร่วมมือระหว่างประเทศต่าง ๆ 30 ประเทศ ได้แก่ ออสเตรเลีย ออสเตรีย เบลเยียม แคนาดา สาธารณรัฐเช็ค เดนมาร์ก ฟินแลนด์ ฝรั่งเศส เยอรมนี กรีซ ฮังการี ไอร์แลนด์ ไอซ์แลนด์ อิตาลี ญี่ปุ่น สาธารณรัฐเกาหลี ลักเซมเบิร์ก เม็กซิโก เนเธอแลนด์ นิวซีแลนด์ นอร์เวย์ โปแลนด์ โปรตุเกส สาธารณรัฐสโลวัก สเปน สวีเดน สวิตเซอร์แลนด์ ตุรกี สหราชอาณาจักร และสหรัฐอเมริกา และยังได้มีความร่วมมือและข้อตกลงกับประเทศที่ไม่ได้เป็นสมาชิกจำนวนกว่า 70 ประเทศ ณ ปี พ.ศ. 2553 ประเทศไทยอยู่ในฐานะผู้สังเกตการณ์ในคณะกรรมการต่าง ๆ ขององค์การนี้ ซึ่งทำงานในการให้แนวทางการทดสอบความเป็นพิษของสารเคมีต่าง ๆ

ในการทดสอบความเป็นพิษต่อผิวหนังโดยใช้เซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงนั้น องค์การเพื่อความร่วมมือทางเศรษฐกิจและการพัฒนา ได้กำหนดให้มีการทดสอบความเป็นพิษด้วยการทดสอบฤทธิ์ระคายเคืองต่อผิวหนัง (skin/dermal irritation test) และการทดสอบฤทธิ์กัดกร่อนต่อผิวหนัง (skin/dermal corrosion test) โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง (OECD, 2008)

2.3.1 ชนิดของเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงที่เลือกใช้ในการทดสอบ ในการทดสอบความเป็นพิษต่อผิวหนังโดยใช้เซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงนั้น ชนิดของเซลล์ที่เหมาะสมที่จะได้มีการนำมาใช้ในการทดสอบความ

เป็นพิษต่อผิวหนังนั้น ได้มีการนำเซลล์ที่อยู่ในชั้นผิวหนังมาพัฒนา ได้แก่ เซลล์เคอราติโนไซต์ ซึ่งเป็นเซลล์ผิวหนังที่อยู่ในชั้นหนังกำพร้า และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ซึ่งเป็นเซลล์ผิวหนังที่อยู่ในชั้นหนังแท้ ทำให้ใช้เซลล์เคอราติโนไซต์แทนผิวหนังในชั้นหนังกำพร้า และ เซลล์ไฟโบรบลาสต์แทนผิวหนังในชั้นหนังแท้ (Maria, 1992)

2.3.2 เกณฑ์ในการประเมินผลการทดสอบต้องใช้ข้อมูลหลายส่วนประกอบกัน การตัดสินผลการทดสอบจากข้อมูลเพียงส่วนเดียวอาจไม่ชัดเจนพอหรือไม่เหมาะสมที่แสดงความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ เกณฑ์ที่ใช้ประเมินความเป็นพิษต่อผิวหนัง ได้แก่

2.3.2.1 การมีชีวิตรอดของเซลล์ (cell viability) ในภาวะที่มีสารทดสอบเทียบกับเมื่อไม่มีสารทดสอบเป็นพารามิเตอร์ที่ใช้วัดจำนวนของเซลล์ที่มีชีวิตรอด การกัดกร่อนผิวหนัง (skin corrosion) เมื่อได้รับการสัมผัสของสารเคมีที่ก่อให้เกิดการกัดกร่อน จะทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังรุนแรงจนไม่สามารถกลับคืนได้ การทดสอบฤทธิ์กัดกร่อนต่อผิวหนังของสารทดสอบสามารถใช้วิธีการวัดอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงเมื่อได้รับสารทดสอบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารทดสอบ โดยการใช้วิธีการเอ็มทีที(3-(4,5-dimethylthiazoyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT) ซึ่งเป็นวิธีการทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์จากความสามารถในการทำงานของไมโทคอนเดรียโดยในเซลล์ที่มีชีวิตและมีการทำงานของไมโทคอนเดรียปกติ จะมีเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase enzyme) และโคแฟคเตอร์ในไมโทคอนเดรียที่รีดิวซ์สารเอ็มทีทีให้กลายเป็นผลึกฟอร์มาซานได้ ดังนั้นเมื่อนำสารละลายเอ็มทีทีไปบ่มในเซลล์ที่ต้องการทดสอบ เซลล์ที่มีไมโทคอนเดรียที่ทำงานปกติจะรีดิวซ์สารเอ็มทีทีให้เป็นฟอร์มาซานที่มีสีม่วง ซึ่งเมื่อนำมาละลายในตัวทำละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์จะได้สารละลายสีม่วงน้ำเงิน แต่ในเซลล์ที่ตายนั้นจะได้สารละลายที่มีลักษณะใสไม่มีสี จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท และสามารถนำมาคำนวณหาร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์

2.3.2.2 ความระคายเคือง เมื่อผิวหนังได้รับการสัมผัสสารเคมีที่ก่อให้เกิดอาการระคายเคือง สารเคมีจะสามารถซึมผ่านผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียม และจะก่อให้เกิดความเป็นพิษในระดับที่ไม่รุนแรงมาก ความเสียหายของเซลล์ผิวหนังสามารถกลับคืนมาได้ และจะเกิดการหลั่งของสารอักเสบ (inflammatory mediators) (Roguet, 1999) สารอักเสบเป็นสารที่เซลล์หลั่งเมื่อได้รับการกระตุ้นจากภายนอกหรือเกิดจากกระบวนการภายในเอง ในกรณีการทดสอบผลิตภัณฑ์หรือสารที่ใช้เป็นเครื่องสำอางควรทำการทดสอบสารอักเสบที่เซลล์ผิวหนังสร้าง เมื่อได้รับการกระตุ้นจากภายนอก โดยไซโตไคน์ที่สำคัญที่หลั่งจากเซลล์ผิวหนังในกระบวนการอักเสบที่ยอมรับว่าเป็นไซโตไคน์แรก และไซโตไคน์หลักที่เซลล์จะหลั่งออกมา ในกระบวนการเริ่มต้นของภูมิคุ้มกันของเซลล์ผิวหนัง เมื่อเซลล์ผิวหนังได้รับการกระตุ้นจากภายนอกให้เกิดการอักเสบ เช่น สารเคมี หรือยูวีบีที่มาจากแสงแดด ได้แก่ อินเตอร์ลิวคิน-1 แอลฟา (OECD, 2008) รวมทั้งการตรวจวัดระดับสารอักเสบ โดยตัวชี้วัด (endpoints) การทดสอบฤทธิ์ระคายเคืองและกัดกร่อนผิวหนังจะทำการประเมินผลจากตัวชี้วัดอย่างน้อยสองตัว ได้แก่ ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ (cell viability) โดยวิธีการเอ็มทีที การวัดระดับสารอินเตอร์ลิวคิน-1 แอลฟา (OECD, 2008)

การหาปริมาณสารอักเสบด้วยการวิเคราะห์สารอินเตอร์ลิวคิน-1 แอลฟา ซึ่งเป็นไซโตไคน์ ชนิดหนึ่งก็คือ สารน้ำต่าง ๆ ที่สร้างและหลั่งโดยเซลล์ของร่างกาย อินเตอร์ลิวคิน-1 มีรูปแบบที่สำคัญ คือ อินเตอร์ลิวคิน-1

แอลฟา ซึ่งส่วนใหญ่อยู่บนผิวของเซลล์ที่เป็นผู้สร้าง ซึ่งตรวจพบอยู่ในส่วนน้ำของร่างกาย อาทิเช่น พลาสมา ปัสสาวะ โดยเซลล์ที่มีนิวเคลียสสามารถสร้างอินเตอร์ลิวคิน-1 แอลฟาได้ ตัวอย่างเซลล์เหล่านั้น ได้แก่ นิวโตรฟิล ลิมโฟไซต์ชนิดที ลิมโฟไซต์ชนิดบี เซลล์ไฟโบรบลาสต์ เซลล์เคอราติโนไซต์ เซลล์บุผนังหลอดเลือด และเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ เป็นต้น (อิมมูโนวิทยา, 2543)

2.3.2.3 การตายแบบอะพอพโทซิส เป็นแบบแผนการตายของเซลล์ (program cell death) ที่ควบคุมโดยยีนโดยเกิดจากการชักนำหรือสัญญาณจากภายในเซลล์หรือจากเซลล์อื่น ๆ มีบทบาทสำคัญในการพัฒนาและรักษาสมดุลของสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์โดยใช้พลังงาน กลไกนี้จะทำให้เซลล์ตายอย่างแท้จริง (Susin et al., 2000) กระบวนการเริ่มต้นขึ้นเมื่อเอนไซม์แคสเปส (caspase enzyme) ถูกกระตุ้นเกิดการย่อยสลายส่วนต่าง ๆ ทำให้เซลล์หดตัว เยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนรูป (bleb) จนแตกออกเป็นสารบางตัว เช่น ฟอสฟาติดิลเซอรีน (phosphatidyl serine, PS) แยกตัวออกมา โครมาตินหดตัว นิวเคลียสหดตัวมีการย่อยดีเอ็นเอเป็นส่วนย่อย ๆ และเซลล์แตกเป็นชิ้นส่วนเรียกว่า อะพอพโทติกบอดี (apoptotic bodies) จากนั้นจะถูกแมคโครฟาจ (macrophage) จับกิน เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นต่อเนื่องและจำเป็นต่อการดำรงชีวิต ในคนที่โตเต็มวัยมีการตายของเซลล์ถึง 10^9 เซลล์ต่อวัน นอกจากการตายแบบอะพอพโทซิสซึ่งต้องใช้พลังงานยังมีการตายแบบเนโครซิส (necrosis) ซึ่งไม่อาศัยพลังงาน การตรวจวัดอะพอพโทซิสทำได้หลายวิธี เช่น วิธีตรวจรูปสัณฐานเซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิส ด้วยการสังเกตลักษณะของเซลล์หรือหน่วยย่อยต่าง ๆ รวมถึงการเกิดอะพอพโทติกบอดีดังกล่าวแล้ว

วิธีตรวจการจับของแอนเนกซินไฟว์และโพรพิเดียมไอโอไดด์ (Annexin V/PI binding) อาศัยหลักการจับกันของประจุตรงข้ามระหว่างแอนเนกซินไฟว์ (ประจุบวก) กับสารที่เกิดจากการย่อยสลายของเซลล์ตัวหนึ่ง คือ ฟอสฟาติดิลเซอรีน (phosphatidyl serine, PS) ซึ่งมีประจุลบ ผลของกระบวนการอะพอพโทซิสระยะเริ่มแรก (early apoptotic cell) ทำให้ฟอสฟาติดิลเซอรีนที่เยื่อหุ้มพลาสมาเคลื่อนที่ออกมานอกเซลล์ ทำให้แอนเนกซินไฟว์ซึ่งสามารถจับกับประจุลบของฟอสฟาติดิลเซอรีน ซึ่งทำให้เมื่อเชื่อมเข้ากับฟลูออเรสซิน (fluorescein) ทำให้เรืองแสงสีเขียวได้ ส่วนโพรพิเดียมไอโอไดด์เป็นสารที่ไม่สามารถผ่านเข้าเซลล์ในระยะแรกของการเกิดอะพอพโทซิสได้เนื่องจากพลาสมาเมมเบรนยังไม่สูญเสียคุณสมบัติ แต่เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะสุดท้ายของอะพอพโทซิส (late apoptotic cell) จะมีการหดตัว ผนังเซลล์โป่งพอง โครมาตินจับตัวแน่น และมีการแตกย่อยของดีเอ็นเอ เซลล์ในระยะนี้จะสามารถย้อมนิวเคลียสด้วยสารโพรพิเดียมไอโอไดด์ จะได้แสงเรืองแสงสีแดง จึงสามารถแยกแยะระหว่างเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ เซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิสในระยะเริ่มแรก และเซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิสในระยะสุดท้าย หรือแม้แต่การเกิดเนโครซิสได้ เมื่อมีการใช้โฟลไซโทเมทรี (flow cytometry) ในการแยกความเข้มของแสงหรือขนาดของเซลล์ ซึ่งมีหลักการที่ใช้ในการวิเคราะห์เซลล์ด้วยการฉายแสงเลเซอร์ลงสู่เซลล์แล้ววัดการเรืองแสงที่เกิดขึ้นบนผิวเซลล์หรือภายในเซลล์และไหลผ่านเครื่อง เทคนิคนี้มีความไวสูง สามารถวัดเซลล์จำนวนมากได้อย่างรวดเร็ว และมีความแม่นยำ

นอกจากนี้ยังมีวิธีตรวจการแตกหักของดีเอ็นเอ (DNA fragmentation) เซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิส จะเกิดการแตกหักของจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) ซึ่งเป็นลักษณะที่พบอะพอพโทซิสระยะแรก เมื่อเกิดการย่อยแยกดีเอ็นเอจะขาดเป็นชิ้นส่วนเล็ก ๆ ของดีเอ็นเอสายคู่ (double-stranded) ชิ้นส่วนดีเอ็นเอน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (LMW-DNA fragments) เช่นเดียวกับการแตกเป็นสายเดี่ยว (single stand breaks) ในดีเอ็นเอน้ำหนักโมเลกุลสูง (HMW-DNA) ตรวจสอบได้โดยการแทรกนิวคลีโอไทด์ดัดแปลง (modified nucleotides) ที่ติดฉลาก (X-dUTP, โดย X

จะเป็นส่วนที่ติดฉลาก เช่น X=biotin, DIG หรือ สารเรืองแสง) เข้ากับปลายด้านไฮดรอกไซด์ (3'-OH termini) และวิธีอื่น ๆ อะพอพโทซิสถูกควบคุมโดยยีน มีการสร้างสารชีวเคมีต่างๆ เช่น โปรตีน เอนไซม์ ตัวรับ (receptors) และตัวควบคุมอื่น ๆ การตรวจสารชีวเคมีที่เกี่ยวกับอะพอพโทซิส จึงระบุวิถีการเกิดอะพอพโทซิสได้ การตรวจจึงมีหลายวิธี เช่น การตรวจความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ (catalytic enzyme) ต่อสารตั้งต้นที่ถูกเร่งปฏิกริยาให้เป็นสารเรืองแสงสามารถตรวจวัดการเรืองแสงได้ เพื่อบอกถึงปริมาณการทำงานของเอนไซม์ การใช้แอนติบอดี้เชื่อมต่อกับสารเรืองแสงในการจับกับโปรตีนจำเพาะ การใช้เทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์แอสเซ (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) การวิเคราะห์เอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่แบบย้อนกลับ (reverse transcriptase-polymerase chain reaction: RT-PCR) รวมทั้งเทคนิคทางโฟลไซโตเมทรีที่สามารถวิเคราะห์การตายในเชิงปริมาณได้

2.3.3 ตัวชี้วัดที่บ่งบอกว่าสารทดสอบนั้นเป็นพิษต่อผิวหนังขึ้นกับความเข้มข้นของสารทดสอบเป็นสำคัญอาจแบ่งเป็น 4 ลักษณะดังนี้ คือ (Maria, 1992)

2.3.3.1 ความเข้มข้นสูงสุดของสารทดสอบที่ไม่ทำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลง (highest tolerated dose, HTD) ความเข้มข้นของสารทดสอบที่เริ่มทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ (toxic threshold concentration, TTC)

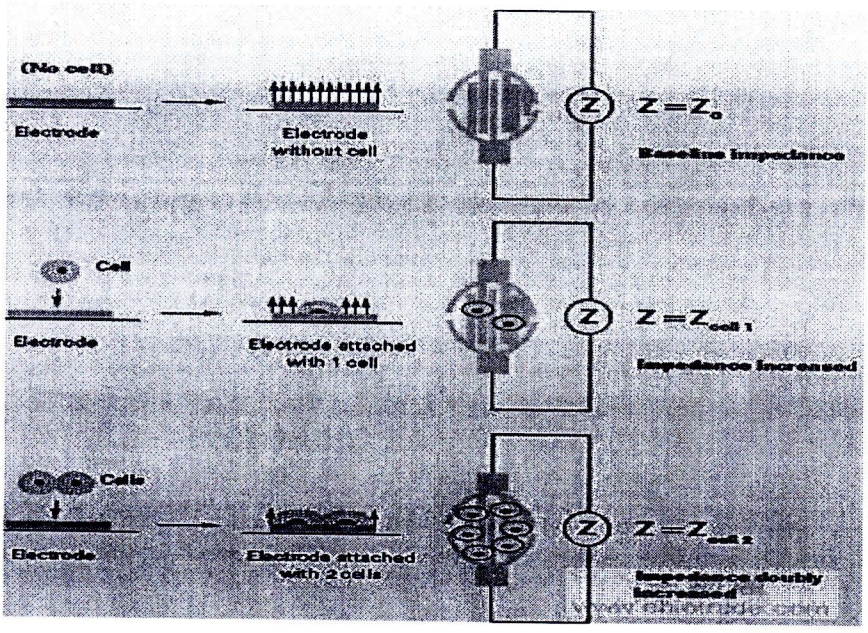
2.3.3.2 ความเข้มข้นของสารทดสอบที่เหนี่ยวนำให้เกิดการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์จำนวนร้อยละ 50 ของเซลล์ทั้งหมด (the half maximal inhibitory concentration, IC_{50})

2.3.3.3 ความเข้มข้นของสารทดสอบที่เหนี่ยวนำให้เกิดการปลดปล่อยเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ เช่น เอนไซม์แลคเตตดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase enzyme) เพิ่มขึ้นร้อยละ 50 (the half maximal effective concentration, EC_{50})

2.3.3.4 ความเข้มข้นของสารทดสอบที่เหนี่ยวนำให้เกิดการหลั่งสารไซโตไคน์ (cytokine) ของเซลล์เพิ่มขึ้นร้อยละ 50

2.4 การติดตามเซลล์ที่มีชีวิตทุกช่วงเวลาหรือแบบต่อเนื่อง (real-time cell analysis, RTCA)

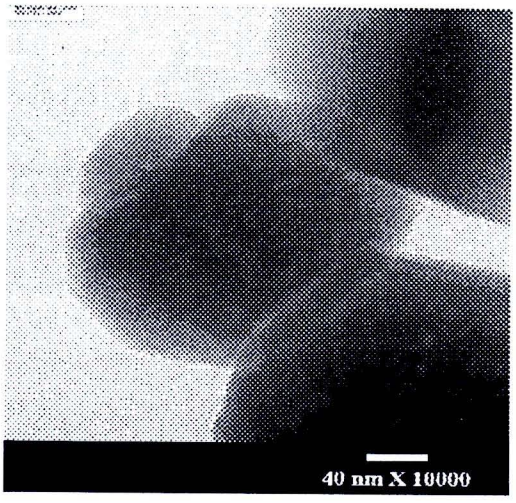
การติดตามวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเซลล์ทุกช่วงเวลาเป็นหลักการที่เป็นประโยชน์ในการอธิบายกลไกของความเป็นพิษของสารทดสอบ การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของเซลล์ที่เรียงกันเป็นชั้นเดียวบนพื้นผิวเรียบทำให้ความต้านทานกระแสไฟฟ้าเปลี่ยนไปด้วย การวัดความต้านทานไฟฟ้าบนพื้นผิวเรียบที่เพาะเลี้ยงเซลล์อาศัยทองคำเป็นโลหะที่นำไฟฟ้าได้ดีที่สุดซึ่งใช้เคลือบพื้นผิวของถาดเลี้ยงเซลล์ เมื่อมีเซลล์เกาะอยู่บนถาดเลี้ยงเซลล์จะมีแรงต้านทานเกิดขึ้น มีการวัดสัญญาณด้วยการใช้อุปกรณ์พร้อมอิเล็กโทรด (electrode) รับสัญญาณไฟฟ้าบนถาดเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วยทองคำ ระบบที่พัฒนาขึ้นมามีชื่อเรียกว่า ระบบเอ็กเซลลิเจนซ์ (xCELLigence system) ตามรูปที่ 2.1 เมื่อไม่มีเซลล์เกาะพื้นผิวแรงต้านทานที่เกิดขึ้นจะเท่ากับศูนย์ ($Z=Z_0$) เมื่อมีเซลล์ที่มีชีวิตเกาะอยู่ 1 เซลล์ แรงต้านก็จะเพิ่มขึ้น ($Z=Z_{cell\ 1}$) และเมื่อมีเซลล์มีชีวิตที่เกาะอยู่เพิ่มเป็นสองเซลล์ แรงต้านที่เกิดขึ้นก็จะเพิ่มขึ้น ($Z=Z_{cell\ 2}$)แรงต้านทานที่เกิดขึ้นนั้นแปรตามจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่เกาะอยู่บนถาดเลี้ยงเซลล์



ภาพที่ 2.1 กลไกการเกิดความต้านทานของระบบขึ้นที่อิเล็กโทรดของระบบเอ็กเซลลิเจนซ์ (Urcan et al., 2009)

2.5 นาโนซีโอไลต์ (nanozeolite)

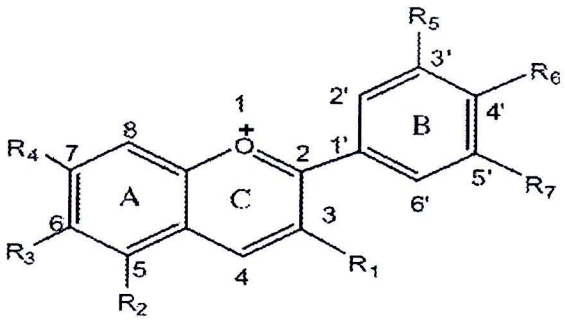
ซีโอไลต์เป็นสารที่เกิดขึ้นได้เองจากธรรมชาติหรือสังเคราะห์ขึ้นเองได้ การสังเคราะห์ด้วยปฏิกิริยาทางเคมีทำให้สามารถผลิตขึ้นเป็นวัสดุที่นำไปประยุกต์ใช้ในงานต่าง ๆได้ ซีโอไลต์สังเคราะห์ประกอบไปด้วยอะตอมของซิลิคอน หรืออะลูมิเนียม 1 อะตอม และออกซิเจน 4 อะตอม (SiO_4 หรือ AlO_4) สร้างพันธะกันเป็นรูปสามเหลี่ยมสี่หน้า (tetrahedral) โดยอะตอมของซิลิคอนหรืออะลูมิเนียมอยู่ตรงกลาง ล้อมรอบด้วยอะตอมของออกซิเจนที่มุมทั้งสี่ ซึ่งโครงสร้างสามเหลี่ยมสี่หน้านี้จะเชื่อมต่อกันที่มุม (ใช้ออกซิเจนร่วมกัน) ทำให้ซีโอไลต์เป็นผลึกแข็ง มีรูพรุนและช่องว่างหรือโพรงที่ต่อเชื่อมกันอย่างเป็นระเบียบในสามมิติ นาโนซีโอไลต์ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นซีโอไลต์ที่สังเคราะห์ขึ้นและสร้างเงื่อนไขให้มีขนาดของรูพรุนที่เล็กในระดับนาโนเมตร ทำให้มีพื้นผิวของรูพรุนเพิ่มขึ้นและเพิ่มความสามารถในการเป็นตัวดูดซับและแลกเปลี่ยนไอออน (Song, Justice, Jones, & Grassian, 2004)นาโนซีโอไลต์ที่เกิดจากการสังเคราะห์ทางเคมีขึ้นมานั้น มีขนาดของรูพรุนได้หลากหลาย แต่ในการทำงานวิจัยครั้งนี้ได้เลือกประเภทนาโนซีโอไลต์ที่มีรูพรุนขนาดกลาง (mesoporous) มีขนาดรูประมาณ 2-50 นาโนเมตร (nm) แสดงในภาพที่ 2.2 เพื่อนำมาใช้กักเก็บสารสำคัญ



ภาพที่ 2.2 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (transmission electron microscope, TEM) ของนาโนซีโอไลต์ที่สังเคราะห์ได้ (พิบูลย์ พันธุ, 2547)

2.6 แอนโทไซยานิน (anthocyanin)

สารกลุ่มแอนโทไซยานินเป็นสารประกอบหลายชนิดที่พบได้ทั่วไปในพืชเกือบทุกชนิดมากบ้างน้อยบ้าง พืชหรือส่วนของพืชที่มีสีเขียวเป็นหลักพบสารนี้น้อยกว่าพืชหรือดอกหรือผลที่มีสีเข้มจัด ตามระดับความเข้มของสี ผลไม้หรือดอกไม้ที่มีรายงานว่าพบสารนี้ได้มากส่วนใหญ่เป็นพืชต่างประเทศ เช่น ผลบลูเบอร์รี่ (blueberry) แครนเบอรี่ (cranberry) เชอรี่ (cherry) ราสเบอรี่ (raspberry) รวมทั้งดอกอัญชัน เป็นต้น พืชใบได้แก่ หัวใจม่วง (purple heart) กะหล่ำปลีแดง (red cabbage) ผักกาดแดง (red radish) อัญชัน (Butterfly pea) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Clitoria ternatea* Linn. อยู่ในวงศ์ Papilionaceae เป็นพืชล้มลุกที่ขึ้นได้ตลอดทั้งปี ดอกอัญชันสีน้ำเงินให้รงควัตถุสีน้ำเงินเป็นสารแอนโทไซยานิน (anthocyanins) และฟลาโวนัลกลัยโคไซด์ (flavonal glycosides) แอนโทไซยานินเป็นอนุพันธ์ของฟลาไวเลียม (flavylium) ดังแสดงในภาพที่ 2.3 แอนโทไซยานินที่พบในธรรมชาติมักจะอยู่ในรูปกลัยโคไซด์ซึ่งมีน้ำตาลในโครงสร้างโมเลกุลด้วย เมื่อตัดหมู่น้ำตาลออกด้วยการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ในภาวะกรดจะได้แอนโทไซยานิดิน (anthocyanidins) ซึ่งละลายน้ำได้น้อยกว่าในรูปแอนโทไซยานินกลัยโคไซด์



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ภาพที่ 2.3 ฟลาไวเลียม (flavylium) เป็นโครงสร้างพื้นฐานของแอนโทไซยานิน (Jin-Ming, Lian-Sai, Ngoh-Khang, & Tet-Fatt Ch, 2003)

เภสัชวิทยาของส่วนอื่น ๆ ของต้นอัญชันในสัตว์ทดลองแสดงฤทธิ์เพิ่มความจำและการเรียนรู้ การลดความกังวล ต้านอาการซึมเศร้า ยับยั้งการแข็งตัวของเลือด ลดไข้ (Mukherjee, Kumara, Kumar, & Heinrich, 2008) แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของแอนโทไซยานินจากดอกอัญชันโดยตรง มีรายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของแอนโทไซยานินต่าง ๆ เช่น malvidin, delphidin, cyanidin และ pelargonin ต่อ human low-density lipoprotein (LDL) พบว่าทุกตัวมีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระได้แต่มีฤทธิ์ไม่เท่ากัน (Teresa Satue´-Gracia, Heinonen, & Frankel, 1997) จึงมีการนำสารสกัดจากดอกอัญชันมาผสมในเครื่องสำอางเพื่อทำเป็นเจลลบริ้วรอยรอบดวงตาและเมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่ามีประสิทธิภาพปานกลาง (Kamkaen & Wikinson, 2009)

ตารางที่ 2.1 สารแอนโทไซยานินจากธรรมชาติบางตัวที่มีหมู่แทนที่ต่างกันทำให้มีสีต่างกัน

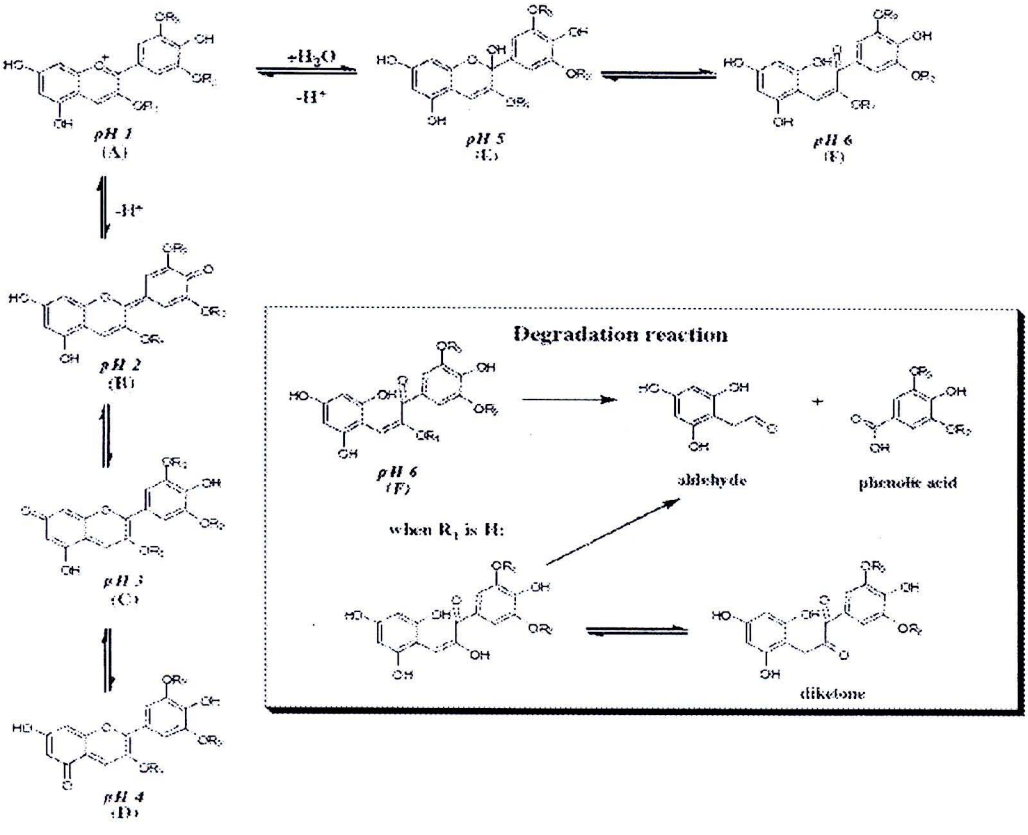
	หมู่แทนที่ที่ตำแหน่งต่าง ๆ ในภาพที่ 2.3							
ชื่อ	**R3**	**R5**	**R6**	**R7**	**R3**	**R4**	**R5**	**สี**
Apigeninidin	H	OH	H	OH	H	OH	H	ส้ม
Cyanidin	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	ส้ม - แดง
Delphinidin	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	น้ำเงิน - แดง
Malvidin	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OMe	น้ำเงิน - แดง
Pelargonidin	OH	OH	H	OH	H	OH	H	ส้ม
Ternatin	Malonyl glucoside	OH	H	OH	OR	OH	OR	น้ำเงิน

(Castaneda-O et al., 2009; Jin-Ming et al., 2003)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 12 ก.ย. 2555
เลขทะเบียน 249526
เลขเรียกหนังสือ

แอนโทไซยานิน (anthocyanins) เป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ที่มีการนำไปใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพและเครื่องดื่มต่าง ๆ แอนโทไซยานินเป็นอนุพันธ์ของฟลาไวเลียม (flavylium) ดังโครงสร้างที่แสดงในภาพที่ 2.3 จากโครงสร้างทางเคมีพื้นฐานนี้เมื่อปรับเปลี่ยนหมู่ R ต่างๆ (ที่มีหมายเลข 1-4) เป็นไฮโดรเจนอะตอมหรือหมู่ไฮดรอกซิล หรือน้ำตาล (ซึ่งได้จากการสังเคราะห์แสง) จะทำให้ได้สารต่างๆ สารแต่ละตัวจึงมีจำนวนกับตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิล หรือน้ำตาลที่ต่อกับโครงสร้างพื้นฐานนี้แตกต่างกันไปทำให้มีคุณสมบัติทางเคมี และกายภาพที่แตกต่างกันด้วย คุณสมบัติที่แตกต่างกันนี้แสดงให้เห็นชัดเจนที่สุดด้วยสีที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 2.1 (Jin-Ming et al., 2003; Kazuma, Noda, & Suzuki, 2003) ซึ่งจะสังเกตเห็นได้ว่าถ้าไม่มีหมู่ของเมทอกซี (methoxy หรือ – OMe) ในโครงสร้างเลย และมีหมู่ไฮดรอกซิลทำให้สารแอนโทไซยานินมีสีส้มแดง หมู่เมทอกซีทำให้สารแอนโทไซยานินมีสีเข้มขึ้น ดอกอัญชันที่มีสีต่างกันประกอบไปด้วยสารต่างกันแต่เป็นอนุพันธ์ต่าง ๆ ของฟลาไวเลียม อัญชันดอกขาวไม่มีสารแอนโทไซยานินเลย (Kazuma et al., 2003) ส่วนในดอกอัญชันสีน้ำเงินจะพบเทอนาทิน (ternatins) มากกว่าสารอื่น

การสลายตัวของแอนโทไซยานินเกิดขึ้นได้ เมื่อมีการทำลายพันธะระหว่างคาร์บอนกับออกซิเจนในโครงสร้างวงแหวน (มีประจุบวกในภาพที่ 2.3) ของฟลาไวเลียม และจะทำให้เกิดปฏิกิริยาต่อ เนื่องกันไปในที่สุดเกิดอัลดีไฮด์ (aldehyde) และกรดฟีโนลิค (phenolic acid) ดังแสดงในภาพที่ 2.4 ซึ่งเป็นปฏิกิริยาไม่ย้อนกลับ ดังนั้นการนำแอนโทไซยานินมาทำการศึกษาจึงต้องระมัดระวังรักษาความเป็นกรดด่างที่ พีเอช 2-4



ภาพที่ 2.4 ผลของความเป็นกรดด่างต่อแอนโทไซยานิน (Castaneda-O et al., 2009)

อนุมูลอิสระ หมายถึง อะตอมหรือโมเลกุลใดที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวอยู่ในออร์บิทัลวงนอกสุดที่มีระดับพลังงานสูง เนื่องจากอิเล็กตรอนเดี่ยวจะไม่เสถียรและพยายามจับคู่กับอิเล็กตรอนเดี่ยวอื่น ดังนั้นอนุมูลอิสระจึงมีคุณสมบัติเฉพาะ คือมีความไวสูงในการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่น ก่อให้เกิดปฏิกิริยารุนแรง เกิดความเสียหายกับเยื่อบุผนังเซลล์ โมเลกุลของไขมัน เกิดปฏิกิริยาเป็นลูกโซ่ (โอภา วัชระคุปต์, ปรีชา บุญจูง, จันทนา บุณยะรัตน์ และมาลีรักษ์ อัตต์สินทอง, 2006)

สารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) คือสารที่ทำหน้าที่ยับยั้งหรือต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือสารที่สามารถขจัดอนุมูลอิสระออกจากร่างกาย ร่างกายมีระบบต้านออกซิเดชัน แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ ประเภทแรกป้องกันการเกิดสารอนุมูลอิสระ เช่น เอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) เอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) เอนไซม์คาตาเลส (catalase) ส่วนอีกประเภทหนึ่งคือสารต้านออกซิเดชันในกลุ่มที่ทำลายปฏิกิริยาลูกโซ่นี้ เช่นวิตามินอี เบตา - แคโรทีน วิตามินซี นอกจากวิธีนี้ยังมีสารประกอบฟีโนลิก (phenolic compounds) และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavanoids) ที่เป็นสารต้านออกซิเดชันที่น่าสนใจอีกด้วย (โอภา วัชระคุปต์ และคณะ, 2006)

ในปี ค.ศ. 1997 Hong Wang และคณะ ได้ทำการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีการโอแรค (Oxygen Radical Absorbing Capacity, ORAC) ซึ่งสัมพันธ์กับความสามารถในการต่อต้านการเกิดออกซิเดชัน โดยได้ทำการทดลองนำแอนโทไซยานิน 14 ชนิด มาวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ พบว่าแอนโทไซยานินมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิระ และแอนโทไซยานินที่ประกอบไปด้วยแอนโทไซยานิดินที่แตกต่างกัน มีน้ำตาลที่มาเอสเทอริไฟด์ (esterified) ต่างกัน จะมีผลทำให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน (Wang, Cao, & Prior, 1997)

ในปี ค.ศ. 2000 Juan Carlos Espin และคณะ ได้ทำการศึกษาความสามารถในการกำจัดอนุมูล (Radical Scavenger Capacity; RSC) ของแอนโทไซยานินซึ่งสกัดจากผลไม้ ได้แก่ แบลคโชคเบอรี (black chokeberry) แบลค-ธอน (black-thorn) และสตรอเบอร์รี เปรียบเทียบกับสีสังเคราะห์พองโซ 4 อาร์ (Ponceau 4R) สารต้านอนุมูลอิสระในธรรมชาติคือ สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ คือ บีเอชที (butylated hydroxy toluence, BHT) และบีเอชเอ (butylated hydroxy anisole, BHA) ศึกษาโดยใช้อนุมูล 2,2-ไดฟีนิล-1-ไพคริลไฮดราซิล (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical, DPPH) ในการหาค่าความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ซึ่งผลการทดลองพบว่าแอลฟาโทโคฟีรอล เป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด รองลงมาคือ แบลคโชคเบอรี บีเอชเอ แบลค-ธอน บีเอชที และ สตรอเบอร์รี ตามลำดับ ส่วนสีสังเคราะห์พองโซ 4 อาร์ ไม่มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ (Espin, Soler-Rivas, Wichers, & Garcia-Viguera, 2000)

2.7 การดูดซับ (adsorption)

กระบวนการดูดซับ หมายถึง กระบวนการที่สารในรูปโมเลกุลหรือคอลลอยด์ (สถานะของเหลวหรือก๊าซ) ที่มีอยู่ในสารละลายหรือก๊าซเกิดการเกาะอยู่บนผิวของแข็ง โดยมีสารที่เกี่ยวข้อง 2 ชนิด คือ สารถูกดูดซับ (adsorbate) กับสารดูดซับ (adsorbent) โดยสารดูดซับ เป็นสารในสถานะของแข็งจำพวกหนึ่งที่สามารถดูดซับสารถูกดูดซับ ซึ่งอาจอยู่ในสถานะก๊าซของเหลวหรือของแข็งบนผิวหรือรอยต่อระหว่างผิวของอนุภาคสารนั้น (ศิริพร โอโกโนกิ, 1987)

แรงกระทำระหว่างตัวดูดซับและตัวถูกดูดซับที่ผิวประจันของของแข็งนั้นอาจเกิดขึ้นในลักษณะปฏิกิริยาที่ผิว (surface reaction) ดังเช่นการเกิดปฏิกิริยาเคมีทั่ว ๆ ไป หรือเกิดในลักษณะแรงดึงดูดอ่อน ๆ ดังนั้นจึงสามารถแบ่งการดูดซับที่ผิวประจันของของแข็งออกตามลักษณะแรงกระทำที่เกิดขึ้นได้เป็น2ชนิด คือ กระบวนการดูดซับทางกายภาพและกระบวนการดูดซับทางเคมี กระบวนการดูดซับทั้งสองมีความแตกต่างกันในด้าน แรงและความจำเพาะ

แรงดูดซับ (adsorption force) การดูดซับทางกายภาพเกิดแรงดูดซับอย่างอ่อน ๆ โมเลกุลของตัวถูกดูดซับจะอยู่ที่พื้นผิวของตัวดูดซับ โดยอาศัยแรงวันเดอร์วาลล์ ส่วนการดูดซับทางเคมีนั้น ตัวดูดซับและตัวถูกดูดซับมีแรงดึงดูดมากระทำต่อกันโดยมีปฏิกิริยาเคมีและเกิดพันธะทางเคมี มีการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนหรือใช้อิเล็กตรอนร่วมกันระหว่างตัวถูกดูดซับและตัวดูดซับ

ความจำเพาะ (specificity) การดูดซับทางกายภาพเป็นการดูดซับที่เกิดขึ้นอย่างไม่เฉพาะเจาะจง กล่าวคือ สารต่าง ๆ สามารถถูกดูดซับบนผิวของตัวดูดซับได้ ส่วนการดูดซับทางเคมีเป็นการดูดซับที่เกิดขึ้นอย่างเฉพาะเจาะจง กล่าวคือ จะเกิดได้ต่อเมื่อตัวถูกดูดซับและตัวดูดซับสามารถทำปฏิกิริยากันได้เท่านั้น

การผันกลับ (reversibility) การดูดซับทางกายภาพสามารถเปลี่ยนกลับไปกลับมาได้ กล่าวคือ การแยกเอาสารถูกดูดซับออกจากสารดูดซับทำได้ง่าย เช่นอาจทำโดยการเพิ่มอุณหภูมิหรือลดความดันซึ่งจะเกิดการปล่อยหรือคายเอาตัวถูกดูดซับออกมา (desorption) การเกิดการปล่อยดังกล่าวนี้จะไม่มีผลทำให้ตัวดูดซับหรือตัวถูกดูดซับเปลี่ยนแปลงแต่ประการใด การดูดซับทางเคมีไม่สามารถเปลี่ยนกลับไปกลับมาได้ คือ เมื่อเกิดการดูดซับแล้วจะไม่มีการปล่อยเกิดขึ้นหรือถ้าเกิดการปล่อยก็อาจทำได้โดยวิธียุ่งยากซับซ้อนและมักมีการเปลี่ยนรูปไป เช่น การปล่อยก๊าซออกซิเจนซึ่งถูกดูดไว้โดยผงถ่านจะถูกเปลี่ยนออกมาในรูปของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์แทน

อุณหภูมิ (temperature) กระบวนการดูดซับทางกายภาพเป็นกระบวนการให้ความร้อนออกมาเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น การดูดซับจะลดลง และบางครั้งเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นเรื่อย ๆ สามารถเปลี่ยนเป็นกระบวนการดูดซับทางเคมีได้ ส่วนกระบวนการดูดซับทางเคมีเป็นการเกิดปฏิกิริยาที่ผิว ดังนั้นจึงเกิดได้ที่อุณหภูมิพอเหมาะเท่านั้น

จำนวนชั้นของตัวถูกดูดซับ (number of adsorbated layer) กระบวนการดูดซับทางกายภาพนั้น โมเลกุลของสารถูกดูดซับจะถูกดูดซับไว้เป็นแบบชั้นเดียวที่สภาวะความดันต่ำ และจะเป็นแบบหลายชั้นที่สภาวะความดันสูง ส่วนกระบวนการดูดซับทางเคมี สารถูกดูดซับสามารถถูกดูดซับอยู่บนผิวของสารดูดซับได้เพียงชั้นเดียว

อัตราเร็วในการดูดซับ (rate of adsorption) กระบวนการดูดซับทางกายภาพมีการดูดซับเกิดขึ้นได้เร็วในทุก ๆ อุณหภูมิ ส่วนกระบวนการดูดซับทางเคมีจะเกิดขึ้นในอัตราคงที่ที่อุณหภูมิหนึ่ง และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้น

กระบวนการดูดซับ มีการดูดซับภายในวัสดุอยู่ 3 ลักษณะ คือ การดูดซับระหว่างช่องว่างขนาดใหญ่ (macro-transport adsorption) การดูดซับระหว่างช่องว่างขนาดเล็ก (micro-transport adsorption) การดูดซับที่ผิวภายในของตัวดูดซับ (sorption)

สมการที่ใช้ในการทำนายกลไกของการดูดซับนั้นสามารถบอกให้ทราบได้ว่าประสิทธิภาพของกระบวนการดูดซับมีค่าเท่าใด ซึ่งจะใช้อธิบายความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นในกระบวนการดูดซับระหว่างปริมาณของ

สารดูดซับ และสารที่ถูกดูดซับ จึงเรียกว่า ไอโซเทอร์ม (isotherm) ที่นิยมใช้มี 3 สมการ คือ (Matin, Swarbrick, & Cammarata, 1983)

1. ฟรุนดริก ไอโซเทอร์ม (Freundlich Isotherm) สามารถเขียนสมการทั่วได้ดังนี้

$$Y = kC^{1/n} \quad (1)$$

เมื่อ Y = ปริมาณของของเหลวที่ถูกดูดซับต่อหน่วยน้ำหนักของของแข็ง

k และ n = ค่าคงที่

C = ความเข้มข้นสมดุลของตัวถูกละลายในสารละลาย

2. แลงเมียร์ ไอโซเทอร์ม (Langmuir Isotherm) ไอโซเทอร์มนี้มีสมมติฐานที่ว่า กระบวนการดูดซับจะเกิดขึ้นที่ผิวของตัวดูดซับเพียงชั้นเดียว ไม่มีการเคลื่อนที่อิสระของสารถูกดูดซับบนผิวของตัวดูดซับ ไอโซเทอร์มดังกล่าวนี้แสดงได้ดังสมการ

$$\frac{C}{Y} = \frac{1}{bY_m} + \frac{C}{Y_m} \quad (2)$$

เมื่อ Y = ปริมาณของของเหลวที่ถูกดูดซับต่อหน่วยน้ำหนักของของแข็ง

C = ความเข้มข้นสมดุลของตัวถูกละลายในสารละลาย

Y_m = ปริมาณของของเหลวที่ของแข็งหนึ่งหน่วยน้ำหนักสามารถดูดซับไว้เพื่อให้เกิดการดูดซับแบบชั้นเดียวอย่างสมบูรณ์

b = ค่าคงที่ที่ขึ้นกับความแรงของการดูดซับ

3. เบต ไอโซเทอร์ม (Brunauer-Emmett-Teller Isotherm: BET Isotherm) สามารถเขียนสมการทั่วไปได้ดังนี้

$$\frac{C}{Y(C_0 - C)} = \frac{1}{bY_m} + \frac{(b+1)C}{bY_m C_0} \quad (3)$$

เมื่อ Y = ปริมาณของของเหลวที่ถูกดูดซับต่อหน่วยน้ำหนักของของแข็ง

C = ความเข้มข้นสมดุลของตัวถูกละลายในสารละลาย

C_0 = ความเข้มข้นของสารละลายอิ่มตัว

Y_m = ปริมาณของของเหลวที่ของแข็งหนึ่งหน่วยน้ำหนักสามารถดูดซับไว้เพื่อให้เกิดการดูดซับแบบชั้นเดียวอย่างสมบูรณ์

B = ค่าคงที่ที่ขึ้นกับความแรงของการดูดซับ