บทที่ 2

ทฤษฎีแนวคิดและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (free radical) คือ โมเลกุลหรือไอออนที่มีอิเล็คตรอนอิสระอยู่รอบนอก เป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียร มีความว่องไวต่อปฏิกิริยาเคมี (เจนจิราและประสงค์, 2554) อนุมูลอิสระเกิดจากการใช้ออกซิเจนของกระบวนการเมทาบอลิซึม (metabolism) ของเซลล์ ตัวอย่างอนุมูลอิสระที่พบในสิ่งมีชีวิต เช่น hydroxyl radical ($OH^{\bullet}$) superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) และ hydroperoxyl radical ($HOO^{\bullet}$) เป็นต้น อนุมูลอิสระเหล่านี้สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่างๆทำให้เกิดความเสียหายแก่เซลล์ภายในร่างกาย เช่น การทำลายโครงสร้างดีเอ็นเอ (DNA) การเปลี่ยนสภาพโปรตีนและไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ หรือการสร้างพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) กับโปรตีน หรือเอนไซม์บางชนิดจนทำให้การทำงานของโปรตีนหรือเอนไซม์เหล่านั้นผิดปกติ (ปณัฐฐา, 2547)

แหล่งกำเนิดอนุมูลอิสระ

การเกิดอนุมูลอิสระมีสาเหตุจากปัจจัยภายในและภายนอกร่างกาย ดังนี้

1. ปัจจัยภายในร่างกาย

กระบวนการเมทาบอลิซึมในร่างกายจะมีการสร้างและการสลายโมเลกุลของสาร ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ตัวอย่างปฏิกิริยาการของเกิดอนุมูลอิสระ ได้แก่

<u>ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นเอง (Auto-oxidation)</u> เช่น การเกิดออกซิเดชันของไขมัน แบ่งได้ 3 ระยะ คือ

1. ระยะเหนี่ยวนำเริ่มต้น (Initiation) เป็นระยะที่กรดไขมันแตกตัวเป็นอนุมูลอิสระโดยมีแสงหรืออุณหภูมิเป็นตัวเร่ง

$$RH + \text{initiator} \xrightarrow{\text{Light/ T}} R^{\bullet} + H^{\bullet}$$

2. ระยะเพิ่มจำนวน (Propagation) เป็นระยะที่อนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับออกซิเจนแล้วเกิดเป็นอนุมูลเปอร์ออกซี่ (peroxy radical) และ อนุมูลอิสระ อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นสามารถทำปฏิกิริยากับออกซิเจนได้ต่อเนื่องไปเรื่อยๆ ดังสมการ

$$R^{\bullet} + O_2 \longrightarrow ROO^{\bullet}$$

$$ROO^{\bullet} + RH \longrightarrow ROOH + R^{\bullet}$$

3. ระยะสิ้นสุด (Termination) เป็นระยะที่อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นรวมตัวกันกลายเป็นโมเลกุลที่เสถียร ดังสมการ

$$R^{\bullet} + R^{\bullet} \longrightarrow RR$$

$$ROO^{\bullet} + ROO^{\bullet} \longrightarrow ROOR + O_2$$

<u>กระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว</u> เป็นการทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย โดยเซลล์เม็ดเลือดขาวจะดึงโมเลกุลออกซิเจน (O_2) มาใช้ในการผลิตเป็นอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\bullet-}$) โดยการทำงานของเอนไซม์ NADPH oxidase ดังสมการ

$$2O_2 + NADPH \longrightarrow 2O_2^{\bullet-} + NADP^{+} + H^{+}$$

2. ปัจจัยภายนอกร่างกาย

ปัจจัยภายนอกร่างกายที่มีผลต่อการสร้างอนุมูลอิสระ ตัวอย่างเช่น

<u>ยารักษาโรค</u> ยาบางชนิดที่รับประทานเข้าไป สามารถสร้างอนุมูลอิสระได้ พบในยากลุ่มต้านจุลชีพและต้านมะเร็ง เช่น bleomycin และ antracyclines โดยสารกลุ่มนี้มีฤทธิ์เสริมปฏิกิริยาออกซิเดชัน

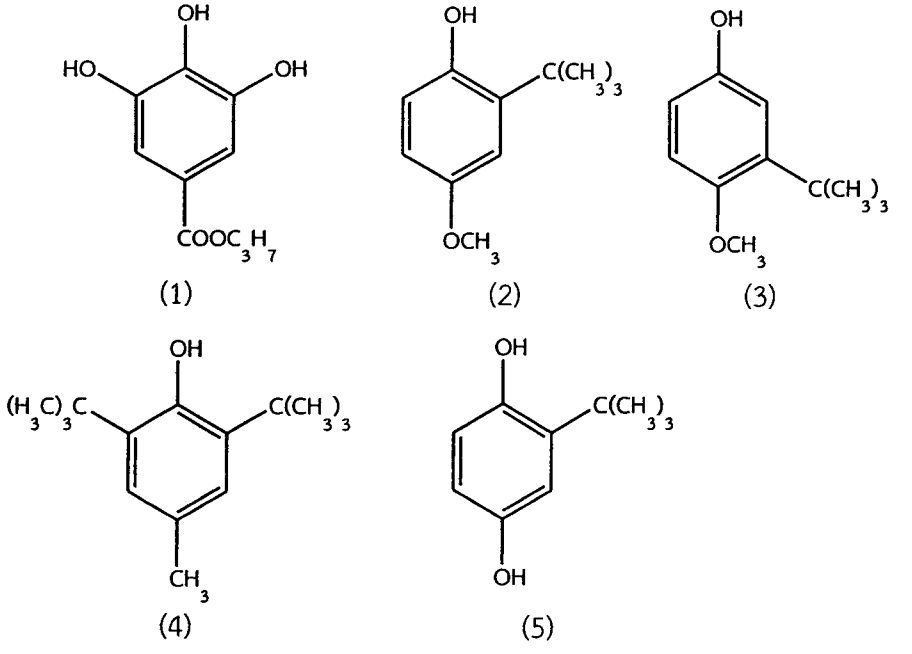
<u>รังสี</u> การใช้รังสีรักษาโรค เช่น รังสี X-ray หรือ รังสีแกมมา อาจทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นได้ในร่างกายจากการถ่ายทอดพลังงานให้กับน้ำ ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเซลล์แล้วก่อให้เกิดปฏิกิริยาขั้นต่อไปกับออกซิเจนที่ละลายอยู่ในเซลล์ ทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้น

2.2 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารปริมาณน้อยที่สามารถป้องกันหรือชะลอปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระได้ (เจนจิราและประสงค์, 2554) กลไกในการต้านอนุมูลอิสระมีหลายแบบ เช่น ดักจับ (scavenge) อนุมูลอิสระโดยตรง หรือเข้าจับกับโลหะเพื่อป้องกันการสร้างอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในธรรมชาติหลายชนิด เช่น สารประกอบฟีนอลลิค (phenolic compounds) สารประกอบไนโตรเจน (nitrogen compounds) และ แคโรทีนอยด์ (catotinoids) สารต้านอนุมูลอิสระมีความสำคัญ คือ ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกาย ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคชนิดต่างๆ และป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่เป็นต้นเหตุทำให้อาหารเสื่อมคุณภาพ

สารต้านอนุมูลอิสระแบ่งได้ 2 ประเภท (เจนจิราและประสงค์, 2554) คือ

1. สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (Synthetic antioxidants) สารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มนี้ คือ สารประกอบฟีนอลลิคสังเคราะห์ 5 ชนิด ได้แก่ propyl gallate (1), 2-butylated hydroxyanisole (2), 3-butylated hydroxyanisole (3), BHT (butylated hydroxytoluene) (4) และ tertiary butylhydroquinone (5) สารเหล่านี้มีโครงสร้างดังแสดง สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้นำมาใช้ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้อาหารมีกลิ่น สี รสชาติที่เปลี่ยนไป



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (เจนจิราและประสงค์, 2554)

2. สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (Natural antioxidants) สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ พบในพืช สัตว์ และจุลชีพ มีทั้งที่เป็นวิตามินเช่น วิตามิน A, C และ E สารที่ไม่ให้คุณค่าทางโภชนาการ (non-nutrient) เช่น สารประกอบในกลุ่ม ฟีนอลลิค (phenolic compounds) แซนโธน (xanthones) และ ฟลาโวนอยด์ (flavonoids)

กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ ตัวอย่างกลไกของการต้านอนุมูลอิสระ

1. ดักจับอนุมูลอิสระ (Radical scavenging) โดยสารต้านอนุมูลอิสระจะเข้าไปทำให้โมเลกุลอนุมูลอิสระมีความเสถียรขึ้น โดยการให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็คตรอนแก่อนุมูลอิสระ

$$R^{\bullet} + AH \longrightarrow RH + A^{\bullet}$$

$$RO^{\bullet} + AH \longrightarrow ROH + A^{\bullet}$$

$$R^{\bullet} + A^{\bullet} \longrightarrow RA$$

$$RO^{\bullet} + A^{\bullet} \longrightarrow ROA$$

2. ยับยั้งการทำงานของ ซิงเกล็ทออกซิเจน (Singlet oxygen quenching, $^1O_2{}^{\bullet}$) สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoids) สามารถยับยั้งการทำงานของซิงเกล็ทออกซิเจน โดยเปลี่ยนให้อยู่ในรูปทริปเปร็ท (triplet oxygen ($^3O_2$))

$$1O_2{}^{\bullet} + 1Car \longrightarrow 3O_2 + {}^3Car^{\bullet}$$

3. ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (enzyme inhibition) สารประกอบฟีนอลลิค เช่น ฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลลิค (phenolic acid) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ลิโพออกซีจีเนส (lipoxygenase) โดยเข้าจับกับไอออนของเหล็ก ส่งผลให้เอนไซม์ดังกล่าวไม่สามารถทำงานได้

2.3 การสกัดและการตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

สารอนุมูลอิสระส่วนใหญ่จะเป็นสารในกลุ่มฟีนอลลิค แซนโทน และ ฟลาโวนอยด์ โดยทั่วไปการสกัดสารจากพืชตัวอย่างจะใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัด ตัวทำละลายอินทรีย์ที่นิยมใช้ เช่น เมทานอล เอธานอล อะซีโตน เฮกเซน เป็นต้น วิธีที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมีหลายวิธี เช่น 2,2-Diphenyl-1-picryhydrazyl (DPPH), Feric reducing/antioxidant power (FRAP),

Trolox equivalents antioxidant capacity (TEAC), lipid peroxidation reducing power และ metal chelating ability (เจนจิราและประสงค์, 2554)

2.4 พืชตัวอย่างที่นำมาศึกษา

กระดุมทองเลื้อย มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc. เป็นพืชในวงศ์ Asteraceae (Compositae) กระดุมทองเลื้อยเป็นไม้ล้มลุกลำต้นทอดนอน มีขนสั้นแข็งกระจายเกือบทุกส่วน ใบเป็นใบเดี่ยว เรียงตรงข้าม รูปรีหรือรูปขอบขนานแกมรูปไข่กลับ ปลายแหลมหรือเรียวแหลม ขอบจักเล็กน้อย ดอก ดอกเป็นช่อดอกแบบกระจุก ออกเดี่ยว ๆ ตามซอกใบใกล้ปลายกิ่ง มีใบประดับสีเขียว เรียงซ้อนกันเป็น 2 ชั้น รูปขอบขนาน ดอกวงนอก เพศเมีย สีเหลือง เป็นรูปลิ้น ปลายหยัก กลีบเลี้ยงจักหลายแฉก ดอกวงใน สีเหลือง กลีบเชื่อมติดเป็นหลอด ปลายหยัก ด้านในมีขนสั้น ด้านนอกมีต่อม เกสรเพศผู้ 5 อัน ติดด้านในวงกลีบดอก รังไข่อยู่ใต้วงกลีบ รูปกระบอง ปลายมีตุ่ม มี 1 ช่อง ออวุล 1 เม็ด ยอดเกสรเพศเมียแยกเป็น 2 แฉก ปลายมีขน ผลแบบผลแห้งเมล็ดล่อน สีดำ รูปไข่กลับ มักเป็นเหลี่ยม ยาวประมาณ 3 มม. ผิวมีตุ่มเล็ก ๆ ปลายผลมีวงกลีบเลี้ยงติดทน จักเป็นริ้ว ยาวประมาณ 1 มม.(กรมอุทยาน, 2555) จากการสืบค้นพบสรรพคุณทางยาคือ ใช้รักษาโรคหลอดลมอักเสบ ปวดท้อง ปวดประจำเดือนและไข้ (Taddei, A. and Rosas-Romero, A. J., 1999)

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการสืบค้นด้วยฐานข้อมูล SciFinder พบรายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากกระดุมทองเลื้อย โดยพบองค์ประกอบทางเคมีในกลุ่มเทอร์พีน (Balekar, N., *et al.*, 2012), สเตียรอยด์, ฟลาโวนอยด์ และอนุพันธ์เบนซีน (Qiang, Y., *et al.*, 2011) และรายงานการตรวจสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระทางชีวภาพจากกระดุมทองเลื้อย ดังนี้

ในปี ค.ศ. 2012 Li และคณะ (Li, D., *et al.*, 2012) ทำการแยกองค์ประกอบทางเคมีและศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากลำต้นกระดุมทองเลื้อย พบว่าน้ำมันหอมระเหยแสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

ในปี ค.ศ. 2011 Govindappa และคณะ (Govindappa, M., *et at.*, 2011) ทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนสกัดหยาบน้ำจากใบ ลำต้น ดอกของกระดุมทองเลื้อย พบว่าส่วนสกัดหยาบน้ำจากกระดุมทองเลื้อยสดและแห้ง แสดงฤทธิ์การต้านจุลชีพ ต้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ

ในปี ค.ศ. 2011 Jayakumar และคณะ (Jayakumar, D., *et at.*, 2011) ทำการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและจุลชีพของส่วนสกัดหยาบเมทานอลจากกระดุมทองเลื้อย พบว่า ส่วนสกัดหยาบเมทานอลแสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

นอกจากนี้ยังพบรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชกระดุมทองเลื้อยดังนี้

ในปี ค.ศ. 2012 Balekar และคณะ (Balekar, N., *et al.*, 2012) ทำการศึกษาฤทธิ์การต้านจุลชีพ ของสาร ent-kaura-9(11), 16-dien-19-oic acid ที่แยกจากได้จากใบกระดุมทองเลื้อย พบว่าสารดังกล่าวแสดงฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย *staphylococcus epidermidis*

ในปี ค.ศ. 2011 Lin และ Huang (Lin, B. and Huang, Z., 2011) ทำการแยกองค์ประกอบทางเคมีและศึกษาฤทธิ์การต้านจุลชีพของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากกระดุมทองเลื้อย พบว่าน้ำมันหอมระเหยแสดงฤทธิ์การต้านจุลชีพ

ในปี ค.ศ. 2008 Jiang และคณะ (Jiang, G-B., *et at.*, 2008) ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์การต้านจุลชีพ และยาปฏิชีวนะจากน้ำมันหอมระเหยจากกระดุมทองเลื้อย

ในปี ค.ศ. 2007 Sureshkumar และคณะ (Sureshkumar, S., *et at.*, 2008) ทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชในสกุล *Wedellia* พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากกระดุมทองเลื้อยสดและแห้ง แสดงฤทธิ์การต้านจุลชีพ

ในปี ค.ศ. 2005 Nirmal และคณะ (Nirmal, S., *et at.*, 2005) ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์การต้านจุลชีพของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากใบกระดุมทองเลื้อย พบว่าน้ำมันหอมระเหยแสดงฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus*

ในปี ค.ศ. 2000 Koheil (Koheil, M. A., 2000) ทำการศึกษาฤทธิ์การต้านจุลชีพของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากดอกกระดุมทองเลื้อย พบว่า น้ำมันหอมระเหยแสดงฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Sarcina lutea*, *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus*

ในปี ค.ศ.1999 Taddei และ Rosas-Romero (Taddei, A. and Rosas-Romero, A. J., 1999) ทำการศึกษาฤทธิ์การต้านจุลชีพของส่วนสกัดหยาบจากดอกกระดุมทองเลื้อย พบว่าส่วนสกัดหยาบเฮกเซนแสดงฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *Bacillus subtilis, Mycobacterium smegmatis*, *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis* นอกจากนี้ ส่วนสกัดหยาบจากเอทิลอะซีเตตแสดงฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียในกลุ่ม *Salmonella*

ในปี พ.ศ. 2553 วิมลพรรณ รุ่งพรหมและคณะ (วิมลพรรณ, 2553) ศึกษาสารยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดสจากพืชสมุนไพรเพื่อใช้บำบัดโรคเบาหวาน พบว่า ส่วนสกัดจากเมทานอลของใบกระดุมทองเลื้อยสด สามารถแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสได้ดีที่ความเข้มข้น 1.0 mg/ml

ในปี พ.ศ. 2552 สร้อยสุดา อุตระกูล และคณะ (สร้อยสุดา, 2552) ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากใบกระดุมทองเลื้อยต่อการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus flavas* พบว่า น้ำมันหอมระเหยแสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยและการงอกสปอร์ของเชื้อรา *A. flavas* และ *A. niger* ที่ความเข้มข้น 10,000 ppm.

ในปี พ.ศ. 2548 พินิจ หวังสมนึก (พินิจ, 2548) ศึกษาการใช้สารสกัดจากพืชเพื่อควบคุมศัตรูข้าว โดยศึกษาสารสกัดจากพืช 3 ชนิดคือ ใบกระดุมทองเลื้อย ใบสาบเสื้อ ใบผักแครต ที่มีต่อแมลงศัตรูข้าวและข้าวพันธุ์ กข. 6 พบว่าข้าวที่ได้รับการฉีดสารสกัดจากใบกระดุมทองเลื้อยมีผลผลิตสูงสุด และนำสารสกัดที่ได้จากใบกระดุมทองเลื้อยมาทดสอบความเป็นพิษที่มีต่อสัตว์ต่างๆที่อาศัยในแหล่งน้ำซึ่งไม่ใช่สัตว์เป้าหมาย ได้แก่ปลานิล ไรแดง และหอยเชอรี่ พบว่า สารสกัดจากใบกระดุมทองเลื้อยสามารถฆ่าปลานิล หอยเชอรี่ และไรแดงได้ร้อยละ 50 และ 90 ที่ระดับความเข้มข้น 22.32 และ 69.65 mg/L, 135.07 และ 166.70 mg/L, 143.14 และ 257.75 mg/L ตามลำดับ

ในปี พ.ศ. 2547 ประไพพรรณ นำพันธุ์วิวัฒน์ (ประไพพรรณ, 2547) ศึกษาผลของสารสกัดจากกระดุมทองเลื้อยต่อการเจริญเติบโตของพืชและการยับยั้งเชื้อราสาเหตุของโรคพืช พบว่า สารสกัดจากต้นและดอกแสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของหญ้าข้าวนกและการเจริญของเชื้อรา *Collectotrichum glueosp*orioides Penz. ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนในมะม่วง และส่วนสกัดหยาบเอธานอล แสดงฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตและการงอกของพืช พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของรากพืชที่ทดสอบและยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytophthoia parpsitica* Dastur. ซึ่งเป็นสาเหตุของโรครากเน่าโคนเน่าในส้ม

วินัย อุดขาว (วินัย, ม.ป.ป.) ศึกษาผลของสารสกัดจากกระดุมทองเลื้อย (*Wedelia trilobata* (L.) A.S. Hitchcock) ที่มีต่อการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของต้นกล้าพืชปลูกและวัชพืชบางชนิด โดยนำส่วนสกัดหยาบเมทานอลจากกระดุมทองเลื้อยมาทดสอบผลของการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของต้นกล้าในพืช 2 กลุ่มคือ พืชปลูก ได้แก่ ข้าว (*Oryza sativa* L.) ผักบุ้ง (*Ipomoea aquatica* Forsk.) และผักกวางตุ้ง (*Brassica chinensis* L.) และวัชพืช ได้แก่ หญ้ารังนก (*Chloris barbata* Sw.) หญ้าบุ้ง (*Cenchrus echinatus* L.) ตีนตุ๊กแก (*Tridax procumbens* L.) และไมยราบ (*Mimosa pudica* L.) สำหรับพืชปลูกพบว่าสารสกัดหยาบจากเมทา

นอลไม่มีผลต่อการงอกของเมล็ดพืชปลูกทั้ง 3 ชนิด และไม่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวและผักบุ้ง สารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 1.00 และ 2.00 กรัมต่อลิตรสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของรากและส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกวางตุ้ง สำหรับวัชพืชพบว่าสารสกัดหยาบสามารถยับยั้งการงอกของเมล็ดวัชพืชได้ทั้ง 4 ชนิดและสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของรากและยอดของหญ้ารังนก ตีนตุ๊กแก และไมยราบ