

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย

อนุมูลอิสระคือ อะตอม โมเลกุล หรือสารประกอบที่มีอิเล็กตรอนไม่ครบคู่ ทำให้มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน เมื่อเกิดอนุมูลอิสระในร่างกายจะทำให้เซลล์ต่างๆ ถูกทำลายทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์อันเป็นที่มาของโรคต่างๆ มากมายได้แก่ โรคแก่ก่อนวัย โรคหัวใจ และโรคมะเร็ง เป็นต้น สารต้านอนุมูลอิสระจึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่ได้รับความสนใจจากนักวิจัย (Mittler, 2002) โดยในพืช ผักและผลไม้หลาย ๆ ชนิดโดยเฉพาะสมุนไพรในประเทศไทยก็มักจะอุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระเช่น โพลีฟีนอล วิตามินเอ วิตามินอี และวิตามินซี เป็นต้น

การประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจะเป็นแนวทางในการคิดค้นหาตัวยาใหม่ ๆ (Drug discovery) ในการรักษาโรค นอกจากนี้การตรวจหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายไม่ว่าจะเป็นในตัวอย่างเลือด (Blood samples) ซีรัม (Serum) หรือน้ำปัสสาวะ (Urine) ยังเป็นพารามิเตอร์ที่ใช้ในการเฝ้าระวังภาวะ Oxidative stress หรือการที่ร่างกายมีอนุมูลอิสระที่มากเกินไปจนเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่าง ๆ ซึ่งการประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างประเภทต่าง ๆ สามารถทำได้หลายวิธีเช่น การวิเคราะห์หาปริมาณสารชนิดใดชนิดหนึ่งหรือกลุ่มใดกลุ่มหนึ่ง ที่พบว่ามีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ เช่น วิตามินซี หรือสารประกอบฟีนอลิก (Zulueta, Esteve, Frasquet, & Frigola, 2007) แต่ในความเป็นจริงสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายหนึ่งๆ มักจะประกอบไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระหลาย ๆ ชนิดผสมกันอยู่ ซึ่งรวมถึงสารต้านอนุมูลอิสระที่ทราบว่าเป็นสารชนิดใดแน่นอน และสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระแต่ยังไม่ทราบโครงสร้างของสารจนระบุได้ว่าคือสารใด นอกจากนี้บางชนิดอาจส่งผลเสริมหรือหักล้างฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระกันได้ ดังนั้นการที่จะประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยการวัดและแยกวิเคราะห์ว่ามีสารชนิดใดบ้างจึงเป็นการยากและไม่จำเป็น ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (Total antioxidant capacity, TAC) จะเป็นการวัดความสามารถโดยรวมของตัวอย่างในการต้านอนุมูลอิสระโดยไม่สนใจว่ามีสารต้านอนุมูลอิสระชนิดใดและปริมาณเท่าใดผสมอยู่ในตัวอย่าง แต่จะวัดเป็นความสามารถของตัวอย่างในการที่จะดักจับกับอนุมูลอิสระ ซึ่งการประเมินค่า TAC นี้เป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมเพราะสามารถแสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างที่ใกล้เคียงความเป็นจริงมากกว่า (Wang, Cao, & Prior, 1996)

การวิเคราะห์ค่า TAC โดยทั่วไปจะมีการสร้างอนุมูลอิสระที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน และวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งหรือขจัดอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างที่สนใจวัด โดยวัดปริมาณอนุมูลอิสระที่ลดลงหรือที่เหลือก็ได้ สารที่นิยมใช้เป็นตัวกำเนิดอนุมูลอิสระมักจะใช้

สารประกอบกลุ่มเอโซ เช่น 2,2'-Azobis 2-Amidopropane (ABTS) ทำให้เกิดอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ ในการวิเคราะห์จะวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลง ข้อดีของวิธีนี้คือทำได้ง่าย การวิเคราะห์ทำได้ทั้งในน้ำ และตัวทำละลายอินทรีย์ แต่ ABTS ไม่เป็นสารตามธรรมชาติที่ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระในร่างกาย และต้องมีการทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อนถึงจะเกิดเป็นอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ ซึ่งทำให้การวิเคราะห์มีความยุ่งยากมากยิ่งขึ้น สารอีกตัวที่นิยมใช้เช่นกันคือ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) การวิเคราะห์ก็จะทำในทำนองเดียวกับการวิเคราะห์ $ABTS^{\bullet+}$ แต่อนุมูล DPPH ไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลที่เกิดในร่างกายจริง ๆ ทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ช้า ทำให้การประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้น้อยกว่าความเป็นจริง (วัชรคุปต์, 2550) ถึงแม้ว่าเทคนิคทั้งสองจะทำได้ง่ายแต่มีปัญหาที่สำคัญอีกประการคือสีของตัวอย่างอาจจะรบกวนการวิเคราะห์ได้โดยเฉพาะสีม่วงของ $DPPH^{\bullet}$ ซึ่งเป็นสีของตัวอย่างที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงได้แก่ องุ่นและไวน์ชนิดต่างๆ

ในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นพัฒนาชุดทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอย่างง่ายขึ้น โดยการต่อยอดจากงานวิจัยเดิมซึ่งศึกษาปฏิกิริยาของอิมพลามีนเป็นชุดทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งยังไม่มีผลผลิตในประเทศไทย และเพื่อทดแทนชุดทดสอบที่นำเข้ามาจากต่างประเทศซึ่งมีราคาแพง โดยมีวัตถุประสงค์หลักอยู่ 2 แนวทางด้วยกันคือ 1. ใช้ทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติซึ่งจะมีตัวอย่าง (Samples) ในจำนวนมาก แต่มีปริมาณจำกัดที่แต่ละส่วนแยก (Fraction) โดยเฉพาะสารสกัดบริสุทธิ์ซึ่งมีปริมาณน้อยมาก ดังนั้นวิธีที่นำมาวิเคราะห์ควรจะสามารถในการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว สะดวก มีความไวในการวิเคราะห์ เพื่อตอบสนองข้อจำกัดดังกล่าว 2. เพื่อนำไปทดสอบสถานะ Oxidative stress จากตัวอย่างเลือด (Blood samples) ซีรัม (Serum) หรือน้ำปัสสาวะ (Urine) โดยงานวิจัยชิ้นนี้มุ่งพัฒนาต่อยอดจากงานวิจัยเดิมซึ่งได้ทำการคิดค้นปฏิกิริยาใหม่โดยใช้สารประกอบซึ่งมีชื่อว่า “อิมพลามีน” ซึ่งง่ายต่อการทำให้เป็นอนุมูล สีของอนุมูลอิมพลามีนเป็นสีฟ้า ซึ่งเป็นสีที่ไม่ค่อยพบในตัวอย่างจึงไม่รบกวนการวิเคราะห์ นอกจากนี้อิมพลามีนยังไม่เป็นอันตรายต่อผู้วิจัย สิ่งแวดล้อมและราคาไม่แพง สามารถทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้อย่างหลากหลายเช่น ตัวอย่างน้ำผลไม้ เครื่องดื่ม สารสกัดจากสมุนไพร ตัวอย่างเลือด ซีรัม น้ำปัสสาวะ ซึ่งเมื่อพัฒนาเป็นชุดทดสอบแล้วจะส่งผลต่อการวิเคราะห์คือวิธีทดสอบง่าย ไม่ต้องใช้ผู้ที่ชำนาญ ให้ผลน่าเชื่อถือ สะดวกและรวดเร็ว

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อต่อยอดงานวิจัยเดิมที่คิดค้นปฏิกิริยาใหม่ ที่ใช้ในการตรวจสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยรวมที่ยังไม่เคยมีใครทำมาก่อน(จากการสืบค้นจากฐานข้อมูล Scienedirect และ Scopus ณ วันที่ 15 กันยายน พ.ศ.2553) มาทำเป็นชุดทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

1.2.2. พัฒนาชุดทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ให้มีความสามารถในการวิเคราะห์ได้แม่นยำ สะดวก รวดเร็ว และมีค่าใช้จ่ายต่อการวิเคราะห์ที่ไม่สูง

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 พัฒนาชุดทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้วิตามินเป็นตัวกำเนิดอนุมูลอิสระเพื่อนำไปพัฒนาตรวจสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวม

1.4 กรอบแนวความคิดของการวิจัย

ทฤษฎี

การวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวมโดยการวัดการเปลี่ยนสี สามารถทำได้โดยใช้สารที่สามารถเกิดเป็นอนุมูลอิสระได้แล้วให้สี หลังจากนั้นเมื่อสารดังกล่าวทำปฏิกิริยากับสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระดังกล่าวจะไปจับกับอนุมูลอิสระแล้วทำให้ปริมาณของอนุมูลลดลงซึ่งสามารถตรวจวัดได้โดยการติดตามสีที่ลดลงจากการหายไปของอนุมูลอิสระดังกล่าว โดยทำการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ Trolox, Ascorbic acid และ Gallic acid เป็นต้น

วิธีการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยการวัดการเปลี่ยนสีเป็นวิธีที่ง่ายและมีแนวโน้มที่จะสามารถพัฒนาเป็นชุดทดสอบได้ โดยเมื่อสารต้านอนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับอนุมูลวิตามินแล้วทำให้สีของวิตามินเปลี่ยนแปลงไปหรือจางลง เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับแถบสีที่ได้จากสารมาตรฐานก็จะสามารถบอกความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างได้ ซึ่งการพัฒนาเป็นชุดทดสอบนี้มีข้อดีคือ การวิเคราะห์ทำได้ง่าย ไม่ต้องอาศัยผู้ที่มีความชำนาญ สะดวก และรวดเร็ว

สมมุติฐาน

อิมิพลามีนเป็นสารที่เมื่อละลายน้ำและเติมออกซิไดส์ซึ่งเอเจนต์แล้วจะเกิดเป็นอนุมูลอิสระซึ่งมีสีฟ้า เมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระจะทำให้ปริมาณของอนุมูลอิสระซึ่งมีสีฟ้าลดลง ดังนั้นอิมิพลามีนจึงน่าจะมีแนวโน้มนำมาใช้ในการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระแทนสารที่ใช้ในการกำเนิดอนุมูลอิสระที่ใช้กันอยู่ดั้งเดิม และพัฒนาเป็นชุดทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้

กรอบแนวความคิดของงานวิจัย

ตัวแปรอิสระ

1. สภาวะของปฏิกิริยาอิมิพลามีนและตัวอย่างในการทำเป็นชุดทดสอบ

2. เทคนิคการทำชุดทดสอบ

ตัวแปรตาม

ชุดทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระซึ่งมีคุณสมบัติดังนี้

- แม่นยำ
- สะดวก
- รวดเร็ว
- ประหยัด
- วิเคราะห์ตัวอย่างได้หลากหลาย