บทที่ 1
บทนำ (Introduction)

อนุมูลอิสระ(Free radicals) หมายถึง โมเลกุลใดๆ ที่ไม่คงตัว และมีอิเลคตรอนเดี่ยว (unpaired electron) ที่ orbital นอกสุด ทำให้สารกลุ่มนี้มีความไว (reactivity) ในการเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่น เนื่องจากการที่มีอิเลคตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระพยายามจับคู่กับอิเลคตรอนจากโมเลกุลอื่นเพื่อเพิ่มความคงตัวของมันเอง แต่ในขณะเดียวกันโมเลกุลที่สูญเสียอิเลคตรอนก็จะเกิดอิเลคตรอนอิสระและกลายเป็นอนุมูลอิสระต่อไปได้ ดังนั้นการที่โมเลกุลใดจะเกิดเป็นอนุมูลอิสระหรือไม่จึงขึ้นกับปฏิกิริยาทางเคมีที่มีการรับหรือการสูญเสียอิเลคตรอน

ออกซิเจน (O_2) เป็นธาตุที่มีความสำคัญยิ่งต่อการดำรงชีพของสิ่งมีชีวิตทั้งหลายที่ต้องใช้ในกระบวนการหายใจและการสร้างพลังงานในระดับเซลล์ การได้รับหรือสัมผัส O_2 ในความเข้มข้นที่สูงเกินขนาดก็อาจทำให้เกิดความเป็นพิษจากออกซิเจน (oxygen toxicity) ได้ ตัวอย่างที่ชัดเจนได้แก่ การเกิดตาบอดจากความเป็นพิษของ O_2 ต่อเส้นประสาทตาในทารกที่คลอดก่อนกำหนด (retinopathy of prematurity; ROP) ที่ได้รับ O_2 ปริมาณสูงเพื่อช่วยในการหายใจ การเกิดความเป็นพิษโดยปฏิกิริยาของออกซิเจนหรือที่เรียกว่า “oxidative stress” สามารถนำไปสู่การทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตได้ตั้งแต่ในสัตว์ชั้นสูง พืช หรือแม้แต่แบคทีเรีย กลไกการเกิดความเป็นพิษจากภาวะ oxidative stress นี้เกิดจากการสร้างอนุมูลอิสระที่มีความไวสูงในการทำปฏิกิริยาส่งผลให้มีการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อตามมา

อนุมูลอิสระที่พบได้บ่อยในร่างกาย คือ Reactive Oxygen Species (ROS) ได้แก่ $OH^{\bullet}$ (Hydroxyl radical) O_2 (superoxide anion radical) และ H_2O_2 (Hydrogen peroxide) ในภาวะที่ร่างกายมีการสร้างอนุมูลอิสระมากเกินกว่าปกติ กระบวนการกำจัดอนุมูลอิสระทำได้โดยใช้เอนไซม์ Superoxide dismutase Glutathione peroxidase และ Catalase หรือ การรับประทานสารต้านอนุมูลอิสระ (สารต้านออกซิเดชัน) อาทิเช่น วิตามินซี วิตามินอี สารจำพวก polyphenol เป็นต้น อนึ่งหากร่างกายมีอนุมูลอิสระสูง จะมีผลให้เกิด oxidative stress รบกวนกระบวนการทาง

metabolism ของร่างกาย และเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคต่างๆ ได้แก่ โรคถุงลมโป่งพอง โรคมะเร็งที่กระเพาะปัสสาวะ โรคมะเร็งเต้านม โรคไวรัสตับอักเสบ โรค Alzhemeir เป็นต้น

การศึกษาในเรื่องของอนุมูลอิสระและสารต้านออกซิเดชันในปัจจุบันได้รับความสนใจอย่างยิ่งจากนักวิจัยในหลายๆ แขนงวิชา ทั้งนี้เนื่องจากความเกี่ยวโยงของอนุมูลอิสระในการอธิบายสมมติฐานของโรคหรือความผิดปกติต่างๆ ในมนุษย์ นับตั้งแต่กระบวนการอักเสบไปจนถึงโรคมะเร็ง รวมถึงความพยายามในการใช้สารต้านออกซิเดชันในการป้องกันการทำลายเซลล์เพื่อหวังผลในการลดหรือชะลอการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจากอนุมูลอิสระด้วย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาคุณสมบัติต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดซึ่งแยกได้จากพืชวงศ์ *Leguminosea* และใช้เป็นสมุนไพรในจังหวัดอุบลราชธานี เนื่องจากพืชวงศ์ *Leguminosae* มีความหลากหลายทางชีวภาพ โดยพืชแต่ละชนิดอาจมีคุณสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันแตกต่างกันออกไป บางชนิดอาจยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน จึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะพบสารซึ่งมีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาที่สามารถพัฒนาเป็นยาได้ และข้อมูลที่ได้จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้จะเป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากพืชที่หาได้ง่าย อันเป็นการทดแทนการนำเข้าและเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจของทรัพยากรธรรมชาติของประเทศ นอกจากนี้ยังมีประโยชน์ในการส่งเสริมให้ประชาชนได้เลือกใช้สมุนไพรที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพเพื่อการป้องกันโรค

1.1 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาคุณสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดในพืชสมุนไพรวงศ์ *Leguminosae* ในจังหวัดอุบลราชธานี
2. ศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระ (free radical scavenging) ของสารสกัดพืชสมุนไพรวงศ์ Leguminosae ในจังหวัดอุบลราชธานี

1.2 สมมติฐานการวิจัย

1. สารสกัดในพืชสมุนไพรวงศ์ Leguminosae ในจังหวัดอุบลราชธานี มีคุณสมบัติสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน
2. สารสกัดในพืชสมุนไพรวงศ์ Leguminosae ในจังหวัดอุบลราชธานี มีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระ (free radical scavenging)

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบข้อมูลเกี่ยวกับการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสมุนไพรวงค์ Leguminosae ในจังหวัดอุบลราชธานี
2. เป็นประโยชน์ต่อวงการแพทย์ในการพัฒนาหาสารต้านอนุมูลอิสระสูงที่ได้จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เพื่อการวิจัยและพัฒนายาที่มีคุณสมบัติในการป้องกันและบำบัดโรค (chemopreventive medicine) เช่น โรคมะเร็ง โรคไขมันอุดตันในหลอดเลือด และโรคหัวใจ เป็นต้น
3. เป็นข้อมูลในการคัดเลือกหาสารต้านอนุมูลอิสระและใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนคุณค่าของพืชสมุนไพรในประเทศที่มีสรรพคุณป้องกันโรคและสามารถเผยแพร่ความรู้นี้ให้แก่ประชาชนทั่วไป
4. เป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพรเพื่อสุขภาพที่หาได้ง่ายในประเทศ ซึ่งเป็นผลดีต่อการพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศ

1.4 หน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

คณะเภสัชศาสตร์ หน่วยงานภาครัฐและเอกชนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพร หน่วยงานด้านสาธารณสุข และประชาชนทั่วไป

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรม (Literature Review)

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาคุณสมบัติต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสาร flavonoids ซึ่งแยกได้จากพืชวงศ์ *Leguminosea* และใช้เป็นสมุนไพรในจังหวัดอุบลราชธานี พืชวงศ์นี้มี isoflavones ซึ่งพบได้น้อยในพืชวงศ์อื่น ที่สำคัญคือ genistein และ daidzin ในพืชจำพวกถั่ว สารสองตัวนี้มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่น่าสนใจมากมาย อาทิ ฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ยับยั้งการเจริญเติบโตของมะเร็ง ป้องกันการเกิดไขมันอุดตันในหลอดเลือด และป้องกันโรคหัวใจ ฯลฯ นอกจากนี้ยังสามารถจับกับ estrogen receptor และมีฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนด้วย ในปัจจุบัน genistein และ daidzin เป็นสารที่ได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางในวงการแพทย์สำหรับการป้องกันโรค และนำมาใช้เป็น phytoestrogen ทดแทนฮอร์โมนเพศในสตรีที่หมดประจำเดือน

เนื่องจากพืชวงศ์ *Leguminosae* มีความหลากหลายทางชีวภาพ โดยพืชแต่ละชนิดอาจมีสาร flavonoids ต่างชนิดกันออกไป การศึกษา flavonoids ชนิดที่ยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน จึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะพบสารซึ่งมีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาที่สามารถพัฒนาเป็นยาได้ และข้อมูลที่ได้จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้จะเป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากพืชที่หาได้ง่าย อันเป็นการทดแทนการนำเข้าและเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจของทรัพยากรธรรมชาติของประเทศ นอกจากนี้ยังมีประโยชน์ในการส่งเสริมให้ประชาชนได้เลือกใช้สมุนไพรที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพเพื่อการป้องกันโรค

คณะผู้วิจัยจึงได้ทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องตามลำดับ ดังนี้

2.1 ความหมายของอนุมูลอิสระ

2.2 แหล่งที่มาของอนุมูลอิสระ

- 2.2.1 ปัจจัยภายใน
- 2.2.2 ปัจจัยภายนอก

2.3 สารต้านอนุมูลอิสระ

2.4 กลไกการต้านอนุมูลอิสระ

2.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง

2.6 พืชสมุนไพรที่นำมาศึกษา

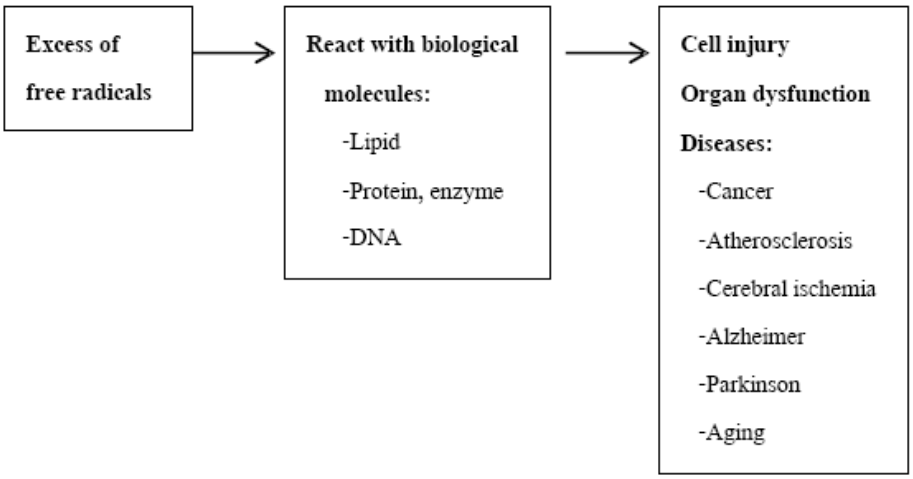
2.7 ขอบเขตของโครงการวิจัย

2.8 ทฤษฎีหรือกรอบแนวความคิด (Conceptual Framework) ของโครงการวิจัย

2.1 ความหมายของอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระเป็นโมเลกุลหรืออะตอมที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวอย่างน้อย 1 ตัวโคจรรอบวงนอกสุด อนุมูลอิสระเกิดขึ้นได้เมื่อพันธะระหว่างอะตอมแตกออกและมีอิเล็กตรอนเดี่ยวคงเหลือบนอนุมูลอิเล็กตรอนเดี่ยวนี้ทำให้อนุมูลอิสระความเสถียรต่ำและไวต่อการเกิดปฏิกิริยาสูง จึงทำปฏิกิริยากับโมเลกุลที่อยู่รอบๆ โดยดึงหรือให้อิเล็กตรอนโมเลกุลข้างเคียงเพื่อให้ตัวมันเสถียร โมเลกุลข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่ไม่เสถียรและเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นต่อไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction)

อนุมูลอิสระเป็นสารที่มีอิเล็กตรอนอิสระอยู่ในวงนอกของอะตอมหรือโมเลกุล จึงมีความว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยา โดยรับอิเล็กตรอนจากสารอื่นๆใกล้เคียงยังผลให้ตนเองเสถียรขึ้น ในขณะเดียวกันก็ชักนำให้สารที่ให้อิเล็กตรอนไปนั้นมีอิเล็กตรอนไม่ครบคู่จนอาจกลายเป็นสารที่มีความรุนแรงซึ่งถ้าเกิดขึ้นในระบบสิ่งมีชีวิต อาจทำอันตรายกับส่วนประกอบสำคัญของเซลล์รอบๆ บริเวณนั้น ไม่ว่าจะเป็นโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต หรือดีเอ็นเอ ทำให้สารชีวโมเลกุลเหล่านี้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง ทำลายสมดุลของระบบต่างๆ ในร่างกายและเสียหน้าที่การทำงาน ดังนั้นในสภาวะที่มีการสร้างอนุมูลอิสระเป็นจำนวนมาก จะก่อให้เกิดการเสียหายของเซลล์ ซึ่งเป็นกลไกสำคัญที่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่างๆ ได้ เช่น โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคพาร์คินสัน โรคอัลไซเมอร์ ไขข้ออักเสบและต้อกระจก เป็นต้น อนุมูลอิสระมีที่มาทั้งแหล่งภายนอกร่างกาย ได้แก่ มลพิษในอากาศ โอโซน ไนตรัสออกไซด์ ไนโตรเจนไดออกไซด์ ฝุ่น ควันบุหรี่ อาหารที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวหรือธาตุเหล็กมากกว่าปกติ แสงแดด ความร้อน รังสีแกมม่า ยาบางชนิด เป็นต้น ภายในร่างกาย เช่น ออกซิเจน เป็นต้น



รูปที่ 1 อนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับชีวโมเลกุลเหนี่ยวนำให้เซลล์และอวัยวะได้รับความเสียหาย เกิดเป็นโรคต่างๆ

2.2 แหล่งของอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระเกิดขึ้นในร่างกายจากการขนถ่ายอิเล็กตรอนในกระบวนการเผาผลาญอาหารให้เกิดเป็นพลังงานโดยใช้ออกซิเจนในไมโทคอนเดรีย อิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นจะถูกจับโดยออกซิเจนเกิดเป็นอนุมูลของออกซิเจนที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเรียกว่า reactive oxygen species (ROS) ตัวอย่างเช่น อนุมูลอิสระของ hydroxyl superoxide และ peroxyl อนุมูลอิสระชนิดอื่นที่เกิดขึ้นในร่างกาย เช่น reactive nitrogen species ตัวอย่างเช่น nitric oxide nitrogen dioxide และอนุมูลอิสระ glutathiyl และ methyl นอกจากการเผาผลาญอาหารที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระแล้วแหล่งอื่นในร่างกายที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ได้แก่ ปฏิกิริยาทางเอนไซม์ เช่น xanthine oxidase prostaglandin synthase lipoxygenase aldehyde oxidase ปฏิกิริยาเพอร์ออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation) โดยกรดไขมันไม่อิ่มตัว สภาวะทางอารมณ์ เช่น ความเครียด และพยาธิสภาพของร่างกาย เช่น การมีไข้ การติดเชื้อ เป็นต้น แหล่งอนุมูลอิสระจากภายนอกร่างกาย ได้แก่ รังสี โอโซน ควันบุหรี่ อนุภาคอนินทรีย์ ตัวทำละลายอินทรีย์และมลภาวะต่างๆ

ตารางที่ 1 อนุมูลอิสระและสัญลักษณ์

อนุมูลอิสระ	สัญลักษณ์
Hydrogen atom	$H^{\bullet}$
Hydroxyl radical	$HO^{\bullet}$
Hydroperoxyl radical	$HOO^{\bullet}$
Alkyl radical	$R^{\bullet}$
Alkoxyl radical	$RO^{\bullet}$
Alkylperoxyl radical	$ROO^{\bullet}$
Glutathiyl radical	$GS^{\bullet}$
Methyl radical	$^{\bullet}CH_3$
Nitric oxide	$^{\bullet}NO$
Nitrogen dioxide	$^{\bullet}NO_2$

2.2.1 ปัจจัยภายใน

1. ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นเอง (Auto-oxidation)

ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระจัดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (free radical chain reaction) แบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ

ระยะเหนี่ยวนำ (Initiation step) เป็นระยะที่กรดไขมันแตกตัวเป็นอนุมูลอิสระ ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระในเซลล์ มักเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการสลายพันธะด้วยน้ำ (hydrolysis) แสง (photolysis) รังสี (radiolysis) หรือปฏิกิริยารีดอกซ์ (redox reaction) นอกจากนี้ก็ยังมีเอนไซม์อื่นๆ อีกหลายชนิดที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในเซลล์ รวมถึงโมเลกุลที่มีความไวสูงในการทำปฏิกิริยา เช่น nitric oxide (NO) และ singlet oxygen ($^1O_2$) ซึ่งหมายถึง ออกซิเจนในสถานะที่ถูกกระตุ้น

(excited state) สิ่งเหล่านี้ล้วนทำให้เกิดขั้นตอนอินนิทิเอชั่นของปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระ ดังสมการที่ 1

$$RH \longrightarrow R^{\bullet} \qquad \text{สมการที่ 1}$$

Singlet oxygen เมื่อทำปฏิกิริยากับไขมัน (RH) จะทำให้เกิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์ ดังสมการที่ 2

$$RH + {}^{1}O_2 \longrightarrow ROOH \qquad \text{สมการที่ 2}$$

นอกจากนี้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ยังเกิดขึ้นได้ในปฏิกิริยาที่มีออกซิเจนในสถานะ ground state ซึ่งเรียกว่า triplet oxygen ($^{3}O_2$) และมีเอนไซม์ lipoxygenase อยู่ด้วย ดังสมการที่ 3

$$RH + {}^{3}O_2 \xrightarrow{\text{lipoxygenase}} ROOH \qquad \text{สมการที่ 3}$$

พันธะ O-O ในโมเลกุลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นพันธะที่อ่อนจึงถูกสลายได้ง่าย ทำให้เกิดเป็นอนุมูลอิสระซึ่งถือเป็นขั้นตอนอินนิทิเอชั่นของปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระ ดังสมการที่ 4-6

$$ROOH \longleftrightarrow ROO^{\bullet} + H^{\bullet} \qquad \text{สมการที่ 4}$$

$$ROOH \longleftrightarrow RO^{\bullet} + OH^{\bullet} \qquad \text{สมการที่ 5}$$

$$ROOH \longleftrightarrow RO^{\bullet} + H_2O + ROO^{\bullet} \qquad \text{สมการที่ 6}$$

ในปฏิกิริยาที่มีโลหะไอออน เช่น เหล็กและทองแดง พบว่า จะเป็นการช่วยเร่งการสลายโมเลกุลของไฮโดรเปอร์ออกไซด์ ทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้น ดังสมการที่ 7 และ 8

$$ROOH + M^{N+} \longrightarrow RO^{\bullet} + OH^{-} + M^{(N+1)+} \qquad \text{สมการที่ 7}$$

$$ROOH + M^{(N+1)+} \longrightarrow ROO^{\bullet} + H^{+} + M^{N+} \qquad \text{สมการที่ 8}$$

ระยะเพิ่มจำนวน (Propagation) อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในขั้นตอนอินนิทิเอชั่นจะดำเนินปฏิกิริยาต่อไปในขั้นตอนพรอพาเกชัน โดยเกิดปฏิกิริยาขึ้น 2 ทาง คือ โดยการดึงเอาอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลข้างเคียง หรือโดยการทำปฏิกิริยากับโมเลกุลออกซิเจนที่อยู่ในสถานะ ground state ทำให้ได้อนุมูลอิสระตัวใหม่ ดังสมการ 9-11

$$RH + R^{1\bullet} \longleftrightarrow R^{\bullet} + R^{1}H \qquad \text{สมการที่ 9}$$

$R^{\bullet} + {}^{3}O_2 \longleftrightarrow ROO^{\bullet}$ สมการที่ 10

$ROO^{\bullet} + RH \longleftrightarrow ROOH + R^{\bullet}$ สมการที่ 11

ระยะเทอร์มิเนชัน (Termination) ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น 2 อนุมูล มารวมกันได้เป็นสารที่มีความเสถียร จึงการหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระ ดังสมการที่ 12 และ 13

$ROO^{\bullet} + ROO^{\bullet} \longleftrightarrow ROOR + O_2$ สมการที่ 12

$ROO^{\bullet} + R^{\bullet} \longleftrightarrow ROOR$ สมการที่ 13

2. ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง

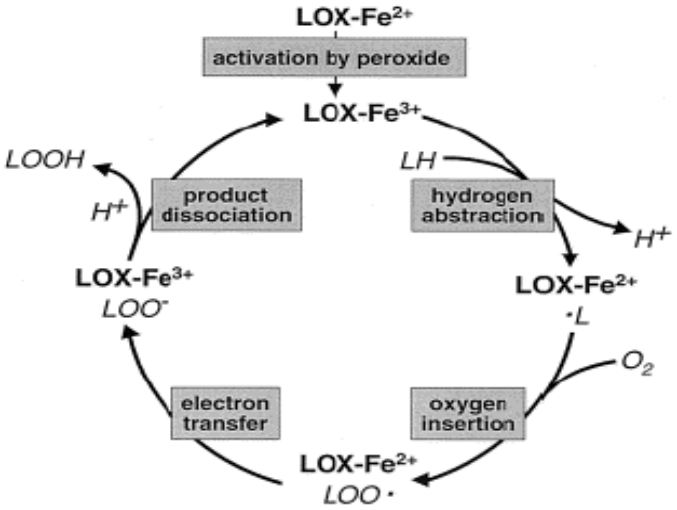
การทำงานของเอนไซม์สำคัญ 2 ชนิดที่มีผลกระตุ้นการสร้างอนุมูลอิสระภายในร่างกาย ได้แก่

1) เอนไซม์ xanthine oxidase (XO) ทำหน้าที่สำคัญในการสลายเบสพิวรีน (purine) โดยเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน hypoxanthine เป็น xanthine และ xanthine เป็น uric acid พร้อมๆ กับการขนถ่ายอิล็กตรอนให้ออกซิเจนเกิดเป็นอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\bullet -}$) ดังสมการ 14-15

$Hypoxanthine + O_2 + H_2O \xrightarrow{xo} xanthine + H_2O + O_2^{\bullet -}$ สมการที่ 14

$Xanthine + O_2 + H_2O \xrightarrow{xo} uric\ acid + H_2O_2 + O_2^{\bullet -}$ สมการที่ 15

2) เอนไซม์ lipoxygenase (LOX) ทำหน้าที่เร่งการออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (polyunsaturated fatty acid) โมเลกุลของเอนไซม์นี้มีเหล็ก (Fe^{2+}) เป็นส่วนประกอบอยู่ทำหน้าที่ดึงอะตอมไฮโดรเจนจากกรดไขมันและเติมออกซิเจนให้กับกรดไขมันเกิดเป็น hydroperoxide ซึ่งจะสลายตัวเป็นอนุมูลของกรดไขมันต่อไปได้ ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 การทำงานของเอนไซม์ lipoxygenase ในปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมัน

3. กระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว

ในขั้นตอนทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยเฉพาะเชื้อโรคที่ถูกกลืนกินเข้ามาภายในเซลล์เม็ดเลือดขาวจะมีการดึงโมเลกุลออกซิเจน (O_2) มาใช้เป็นจำนวนมากเพื่อผลิตเป็นอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\bullet-}$) จากปฏิกิริยาของเอนไซม์ NADPH oxidase ที่อยู่บนเยื่อบุชั้นนอก (outer membrane) ของเม็ดเลือดขาว ดังสมการที่ 16

$$2O_2 + NADPH \xrightarrow{\text{NADPH oxidase}} 2\,O_2^{\bullet-} + NADP^+ + H^+ \qquad \text{สมการที่ 16}$$

นอกจากนี้ในเม็ดสี (granule) ของเม็ดเลือดขาวยังมีเอนไซม์ myeloperoxidase ทำให้เกิดอนุมูลไฮโปรคลอรัส (hypochlorus,$HOCl^{\bullet}$) ซึ่งเป็นสารที่ทำลายจุลชีพได้ ดังสมการที่ 17

$$H_2O_2 + Cl^- \xrightarrow{\text{myeloperoxidase}} HOCl^{\bullet} + OH^- \qquad \text{สมการที่ 17}$$

4. โลหะทรานสิชัน (Transition metal)

โลหะทรานสิชัน 2 ชนิด คือ เหล็ก (Fe^{2+}) และ ทองแดง (Cu^{2+}) ที่มีอยู่ทั่วไปในร่างกายสามารถเร่งการสร้างอนุมูลไฮดรอกซิล ($OH^{\bullet}$) จากซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\bullet-}$) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซม์ (hydrogen peroxide, H_2O_2) ในปฏิกิริยา Fenton ดังสมการ 18

$$H_2O_2 + O_2^{\bullet -} \xrightarrow{Fe^{2}/Cu^{2+}} HO^{\bullet} + OH^{-} + O_2$$ สมการที่ 18

2.2.2 ปัจจัยภายนอก

1. ยารักษาโรค

ยาบางชนิดสามารถก่อให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นภายในร่างกายได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ยาใน กลุ่มต้านจุลชีพและต้านมะเร็ง ตัวอย่างเช่น bleomycin antracyclines และ methotrexate เนื่องจากมีฤทธิ์เสริมออกซิเดชัน (pro-oxidation)

2. รังสี

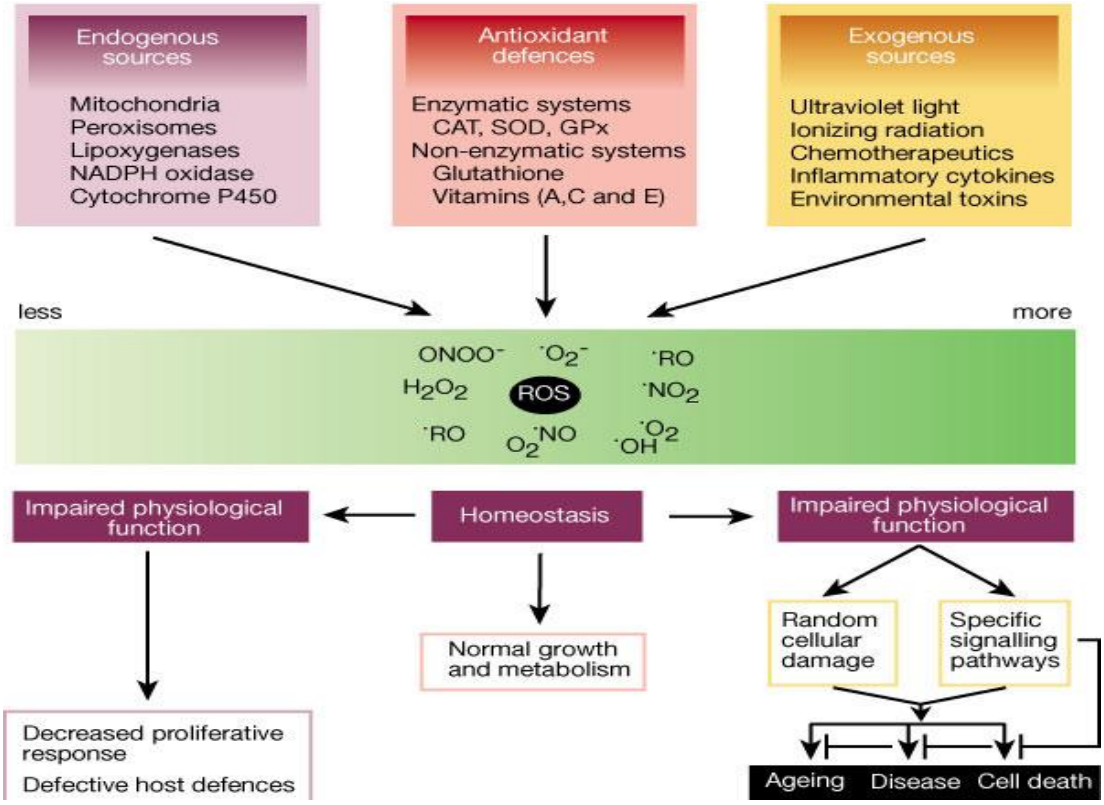
การใช้รังสีรักษาโรค เช่น รังสีเอ็กซ์ รังสีแกรมมา เป็นต้น อาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในร่างกายจากการถ่ายทอดพลังงานให้กับน้ำซึ่งเป็นส่วนประกอบของเซลล์แล้วก่อให้เกิดปฏิกิริยาขั้นต่อไป secondary reaction กับออกซิเจนที่ละลายอยู่ในเซลล์นั้นได้อนุมูลอิสระเกิดขึ้น

3. ควันบุหรี่

ในควันบุหรี่มีส่วนประกอบของ nitric oxide (NO) nitrogen dioxide (NO_2) และ peroxynitrite ($ONOO^-$) และสารมลพิษ ได้แก่ sulfur dioxide (SO_2) และ carbontetrachloride (CCl_4) ซึ่งจะถูกกำจัดออกจากร่างกายโดยการทำงานของเอนไซม์ cytochrome P_{450} hydroxylase ที่มีอยู่มากในเซลล์ตับและพบได้บ้างในเซลล์ปอดและลำไส้เล็ก ทำให้เป็นสาเหตุของการสร้างอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ภายในเซลล์ดังกล่าว

4. โอโซน

โอโซนไม่ได้เป็นอนุมูลอิสระแต่จัดเป็นสารออกซิไดส์แรงสูงซึ่งสามารถเปลี่ยนรูปเป็นอนุมูลไฮดรอกซิลได้จากการกระตุ้นของคลื่นแสงยูวี



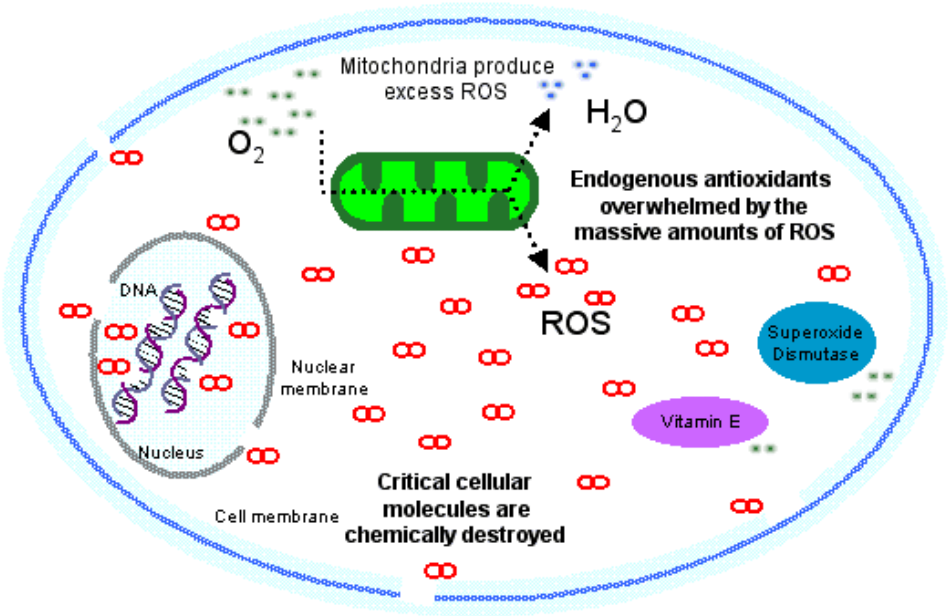
รูปที่ 3 แหล่งที่มาของอนุมูลอิสระ

สิ่งมีชีวิตทุกชนิดไม่ว่าจะเป็นพืชหรือสัตว์ต่างก็มีระบบที่เรียกว่า Antioxidant defense system ดังรูปที่ 3 เพื่อธำรงไว้ซึ่งสมดุลของอนุมูลอิสระภายในร่างกายทั้งสิ้น ระบบกำจัดอนุมูลอิสระดังกล่าวเกิดจากการทำงานของสารต่างๆ ที่รวมเรียกว่า สารต้านออกซิเดชัน (antioxidants) ซึ่งอาศัยสารต่างๆ ที่มีในร่างกายหรือได้รับจากภายนอกที่สำคัญ ได้แก่

- *Nutrient-derived antioxidant:* คือ สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ได้จากอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืช ผัก และผลไม้ เช่น ascorbic acid, α-tocopherols, carotenoids, lipoic acid และสารจากพืชอีกมากมายหลายชนิด โดยเฉพาะ polyphenolic compounds เช่น flavonoids, ubiquinone ฯลฯ
- *Antioxidant enzymes* เอนไซม์ที่มีหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาสลาย ROS ได้แก่ superoxide dismutase และ glutathione reductase

- *Metal binding proteins* โปรตีนซึ่งทำหน้าที่จับเหล็กและทองแดง ซึ่งเป็นโลหะหนักที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ได้แก่ ferritin albumin metalothionine ceruloplasmin transferrin lactoferrin เป็นต้น

สารเหล่านี้มีหน้าที่คอยควบคุมอนุมูลอิสระต่างๆ ให้อยู่ในระดับพอเหมาะ แต่เมื่อใดที่มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นมากเกินกว่าที่ระบบป้องกันจะยับยั้งได้หมด จะทำให้เกิดสภาวะที่เรียกว่า “Oxidative stress” ทำให้มีปริมาณ reactive oxygen species (ROS) มากเกินกว่าที่ร่างกายจะกำจัดได้ทัน จนก่อให้เกิดอันตรายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อ ดังแสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 4 Reactive oxygen species (ROS) ก่อให้เกิดการทำลายเซลล์

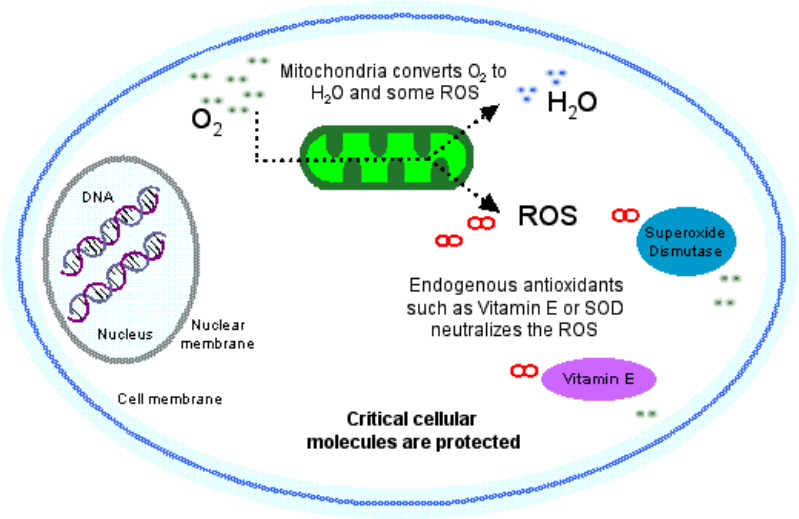
Reactive oxygen species (ROS) หมายถึง โมเลกุลที่มีอะตอมออกซิเจนในโครงสร้าง ซึ่งมีความสามารถสูงในการทำปฏิกิริยา ซึ่งรวมถึงอนุมูลอิสระ (free radicals) ได้แก่ hydroxyl radical, superoxide anion radical, hydrogen peroxide, singlet oxygen, nitric oxide radical และ lipid peroxides เป็นต้น ROS เหล่านี้สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกับสารชีวโมเลกุลต่างๆ เช่น ไขมันบนเยื่อหุ้มเซลล์ โปรตีน และดีเอ็นเอ ก่อให้เกิดการทำลายเซลล์หรือทำให้เซลล์ตาย (Percival ,1998) ร่างกายได้รับ ROS จากหลายทาง เช่น เกิดจากการเผาผลาญอาหารเป็นพลังงาน

หรือได้จากเมตาบอลิซึมของสารต่างๆ ซึ่งได้รับเข้าไปในร่างกาย เช่น ยาและสารพิษ และได้จากเม็ดเลือดขาวสร้างขึ้นในขณะที่มีการเก็บกินสิ่งแปลกปลอม

ROS เป็นปัจจัยสำคัญอันหนึ่งที่ทำให้เกิดการเสื่อมหน้าที่ของเซลล์และเนื้อเยื่อ ซึ่งนำไปสู่ความแก่ (aging) และการเกิดโรคหลายชนิด ปัจจุบันมีหลักฐานชี้ว่า ROS มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคในมนุษย์มากกว่า 50 โรค (Halliwell, 1992, Halliwell, 1994) เช่น โรคมะเร็ง โรคระบบหัวใจและหลอดเลือด โรคความเสื่อมของระบบประสาทส่วนกลาง โรคระบบภูมิคุ้มกันเสื่อม และการอักเสบเรื้อรัง เป็นต้น

2.3 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารปริมาณน้อยที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ ได้ ร่างกายมนุษย์สามารถผลิตสารต้านอนุมูลอิสระได้ปริมาณหนึ่ง สารเหล่านั้น ได้แก่ เอนไซม์และโปรตีนที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione (GSH) พืชผักผลไม้เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ ได้แก่ วิตามินต่างๆ เช่น วิตามินอี วิตามินซี วิตามินเอ และเบตาแคโรทีน รวมทั้งโคเอนไซม์ ซีลีเนียม ทองแดง แมงกานีสและเหล็ก ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งเป็น 2 ประเภทตามลักษณะการออกฤทธิ์ คือ

1. สารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิ

สารในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิค (phenolic substance) ทำหน้าที่หยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระในปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน โดยการให้อนุมูลไฮโดรเจน ($H^{\bullet}$) หรืออิเล็คตรอนแก่อนุมูลอิสระโดยตรง เป็นผลให้อนุมูลนั้นกลายเป็นสารที่มีความเสถียรขึ้น สารออกฤทธิ์ในลักษณะดังกล่าว เช่น สารที่ละลายในไขมัน tocopherols ubiquinols และ carotenoids สารที่ละลายในน้ำ ascorbate, glutathione และ uric acid เป็นต้น

2. สารต้านอนุมูลอิสระทุติยภูมิ

สารต้านอนุมูลอิสระประเภทนี้ไม่ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับอนุมูลอิสระแต่จะช่วยการทำงานของสารต้านอนุมูลสระปฐมภูมิในลักษณะต่างๆ เช่น จับกับ Fe^{2+} ดักจับออกซิเจน ดูดซับรังสียูวีไว้ เป็นต้น

2.4 กลไกการต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระทำลายอนุมูลอิสระโดยการให้หรือรับอิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระ ทำให้ปฏิกิริยาลูกโซ่สิ้นสุดลง สารต้านอนุมูลอิสระโดยตัวเอง จะไม่กลายเป็นอนุมูลอิสระ เมื่อทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ เนื่องจากตัวมันเองมีความคงตัวทั้งในรูปอิเล็กตรอนครบและอิเล็กตรอนขาดหรือเกิน กลไกการต้านอนุมูลอิสระแบ่งได้เป็น 2 กลไก ตามลักษณะการออกฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ คือ ฤทธิ์ป้องกันอนุมูลอิสระ (preventive antioxidant activity) และฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ (free-radical scavenging antioxidant activity)

สารต้านอุมูลอิสระมีกลไกการทำงานแบ่งได้เป็น 6 แบบใหญ่ๆ คือ

1. ดักจับอนุมูลอิสระ (Radical scavenging) โดยการให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ ดังสมการที่ 19-22

$$R^{\bullet} + AH \longrightarrow RH + A^{\bullet} \qquad \text{สมการที่ 19}$$

$$RO^{\bullet} + AH \longrightarrow ROH + A^{\bullet} \qquad \text{สมการที่ 20}$$

$$R^{\bullet} + A^{\bullet} \longrightarrow RA \qquad \text{สมการที่ 21}$$

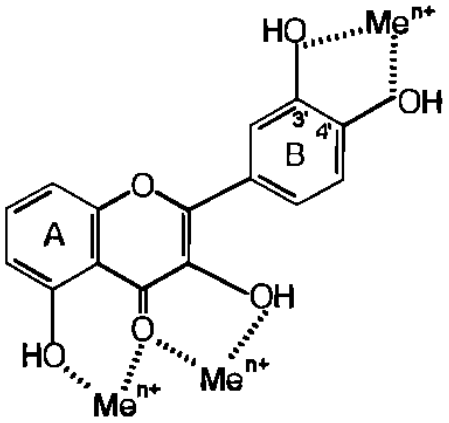
$$RO^{\bullet} + A^{\bullet} \longrightarrow ROA \qquad \text{สมการที่ 22}$$

2. ยับยั้งการทำงานของ singlet oxygen (Singlet oxygen quenching) สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoids) สามารถยับยั้งการทำงานของ singlet oxygen โดยการเปลี่ยน singlet oxygen ($^1O_2$*) ให้อยู่ในรูป triplet oxygen ($^3O_2$) และปลดปล่อยพลังงานที่ได้รับสารออกไปในรูปความร้อน โดยที่แคโรทีนอยด์ (Car) 1 โมเลกุลสามารถทำปฏิกิริยากับ singlet oxygen ได้ถึง 1,000 โมเลกุล ดังสมการที่ 23-24

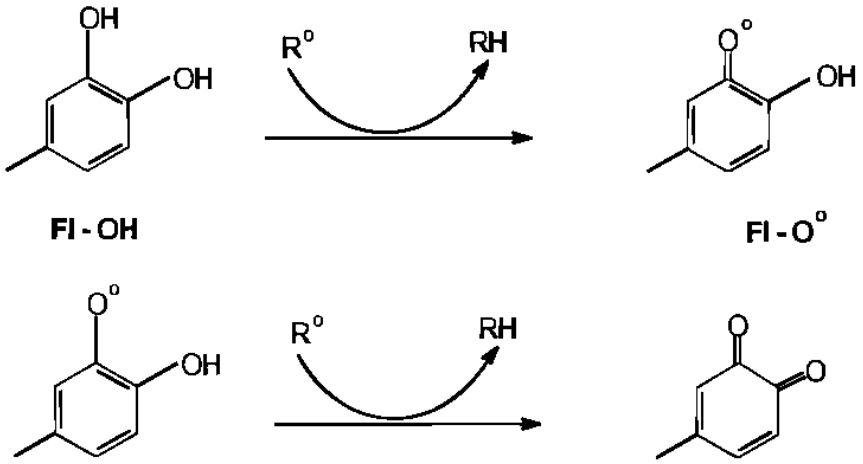
$$^1O_2^* + {}^1Car \longrightarrow {}^3O_2^* + {}^3Car^* \qquad \text{สมการที่ 23}$$

$$^3Car^* \longrightarrow {}^1Car^* + \text{thermal energy} \qquad \text{สมการที่ 24}$$

3. จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (Metal chelation) สารที่สามารถจับโลหะที่สำคัญเหล่านี้ คือ Fe^{2+}และ Cu^{2+} ได้แก่ flavonoids, phosphoric acid และ citric acid เป็นต้น สำหรับกลไกการจับโลหะของสารประกอบ flavonoids ดังแสดงในรูปที่ 6-7

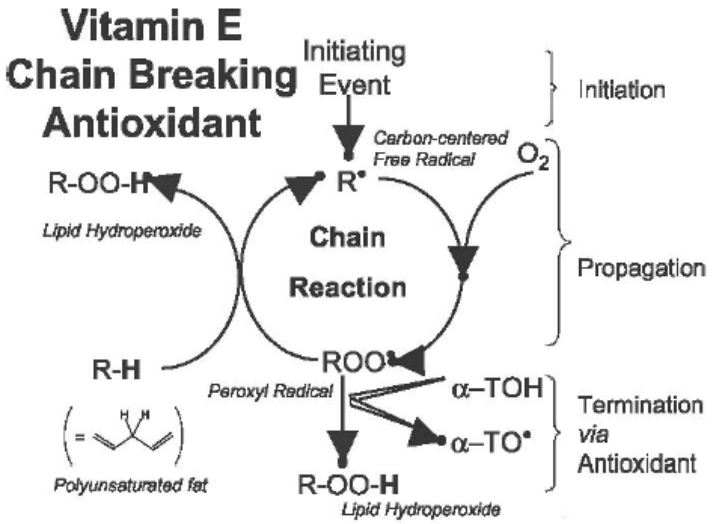


รูปที่ 6 Binding sites for trace metals



รูปที่ 7 Scavenging of ROS ($R^{\bullet}$) by flavonoids

4. หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (Chain breaking) วิตามินอี (α-tocopherol; Toc-OH) สามารถป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (lipid autooxidation) โดยทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็คตรอน electron-acceptor antioxidants จากอนุมูล peroxyl ($ROO^{\bullet}$) ดังแสดงในรูปที่ 8



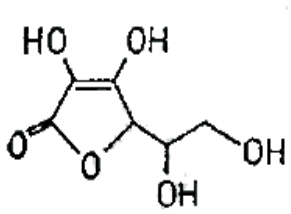
รูปที่ 8 การทำงานของวิตามินอีในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน

5. เสริมฤทธิ์ (Synergism) สารชนิดนี้จะช่วยสนับสนุนให้สารต้านอนุมูลอิสระทำงานได้ดีขึ้น ตัวอย่างเช่น การทำงานระหว่างกัน α-tocopherol กับ ascorbic acid โดยที่ ascorbic acid ไม่สามารถทำงานในระบบ hydrophobic ได้เหมือนกับ α-tocopherol แต่จะให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูล α-tocopherol peroxyl ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง α-tocopherol กับอนุมูล peroxyl ($ROO^{\bullet}$) เปลี่ยนรูปกลับไปเป็น α-tocopherol ที่สามารถทำงานได้

6. ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (enzyme inhibition) สารประกอบ phenolic บางชนิด เช่น flavonoids phenolic acid และ gallates สามารถยับยั้ง lipoxygenase โดยสามารถเข้าจับกับไอออนของเหล็กซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ ยังผลต่อการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว

ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระ อาทิเช่น

1. วิตามินซี (Ascorbic acid) (รูปที่ 9) วิตามินซีเป็นสารที่ละลายน้ำได้ ลักษณะเป็นผงสีขาว ไม่มีกลิ่น วิตามินซีมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมตาบอลิสมของกรดอะมิโนและทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ของปฏิกิริยาทางชีวเคมีต่างๆ ในร่างกาย นอกจากนี้วิตามินซียังเป็นส่วนหนึ่งของกลุ่มสารชีวเคมีที่สร้างคอลลาเจน (collagen) ซึ่งเป็นโปรตีนส่วนหนึ่งของโครงสร้างกระดูกมนุษย์ วิตามินซีเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญชนิดหนึ่งในกระบวนการเมตาบอลิสมในร่างกาย โดยพบว่า วิตามินซีจะเข้าทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อนุมูล hydroxyl อนุมูล peroxyl และ singlet oxygen ได้เป็นสารที่เรียกว่า semidehydroascorbate และ dehydroascorbate

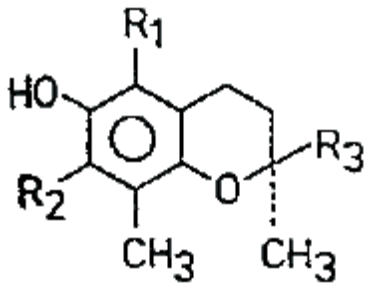


รูปที่ 9 โครงสร้างวิตามินซี (Ascorbic acid)

นอกจากวิตามินซีสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระแล้ว ยังทำหน้าที่เป็นตัวส่งเสริมประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระของวิตามินอีด้วย โดยทำให้อนุมูล α-tocopherol ($TO^{\bullet}$) เปลี่ยนกลับไปเป็น α-tocopherol (TOH) ดังเดิม ดังสมการที่ 25

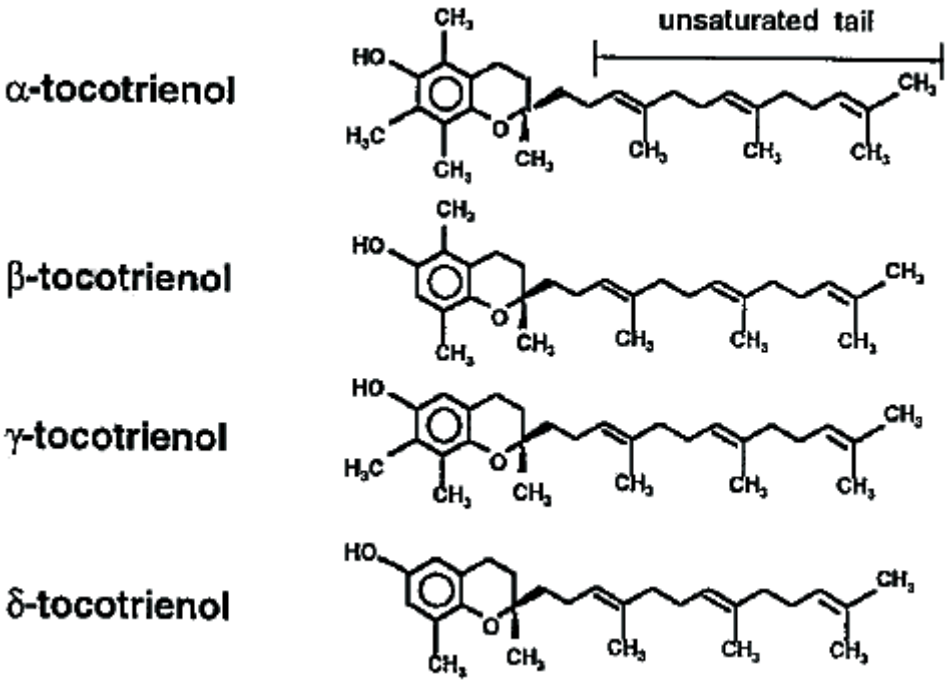
$$TO^{\bullet} + AH^{-} \xrightarrow{K = 2x\ 10^{5}M^{-1}S^{-1}} TOH + A^{-\bullet} \quad \text{สมการที่ 25}$$

2. วิตามินอี (α-Tocopherol) เป็นวิตามินที่ละลายในไขมัน มีลักษณะเป็นของเหลวหนืด ในช่วงแรกมีการตั้งชื่อวิตามินอีว่า วิตามินป้องกันการเป็นหมัน (antisterility vitamin) เนื่องจากพบว่า วิตามินอีเป็นสารที่จำเป็นสำหรับการสืบพันธุ์ในหนูตัวเมีย ถ้าขาดวิตามินอีจะทำให้ลูกอ่อนตายในครรภ์และแท้งลูก ในธรรมชาติมีวิตามินอีอยู่หลายชนิด ปัจจุบันแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ โทโคฟีรอล (รูปที่ 10) และโทโคไทรอินอล (tocotrienol) (รูปที่ 11)



	R1	R2	R3
α-Tocopherol	CH_3	CH_3	$C_{16}H_{33}$
β-Tocopherol	CH_3	H	$C_{16}H_{33}$
γ-Tocopherol	H	CH_3	$C_{16}H_{33}$
δ-Tocopherol	H	H	$C_{16}H_{33}$

รูปที่ 10 โครงสร้างวิตามินอี โทโคฟีรอล (α-Tocopherol)



รูปที่ 11 โครงสร้างวิตามินอี โทโคไทรอินอล (Tocotrienol)

วิตามินอีทำหน้าที่เป็นตัวให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูล peroxyl ดังสมการที่ 26

α-Tocopherol + $LOO^{\bullet}$ $\longrightarrow$ α-$Tocopherol^{\bullet}$ + LOOH สมการที่ 26

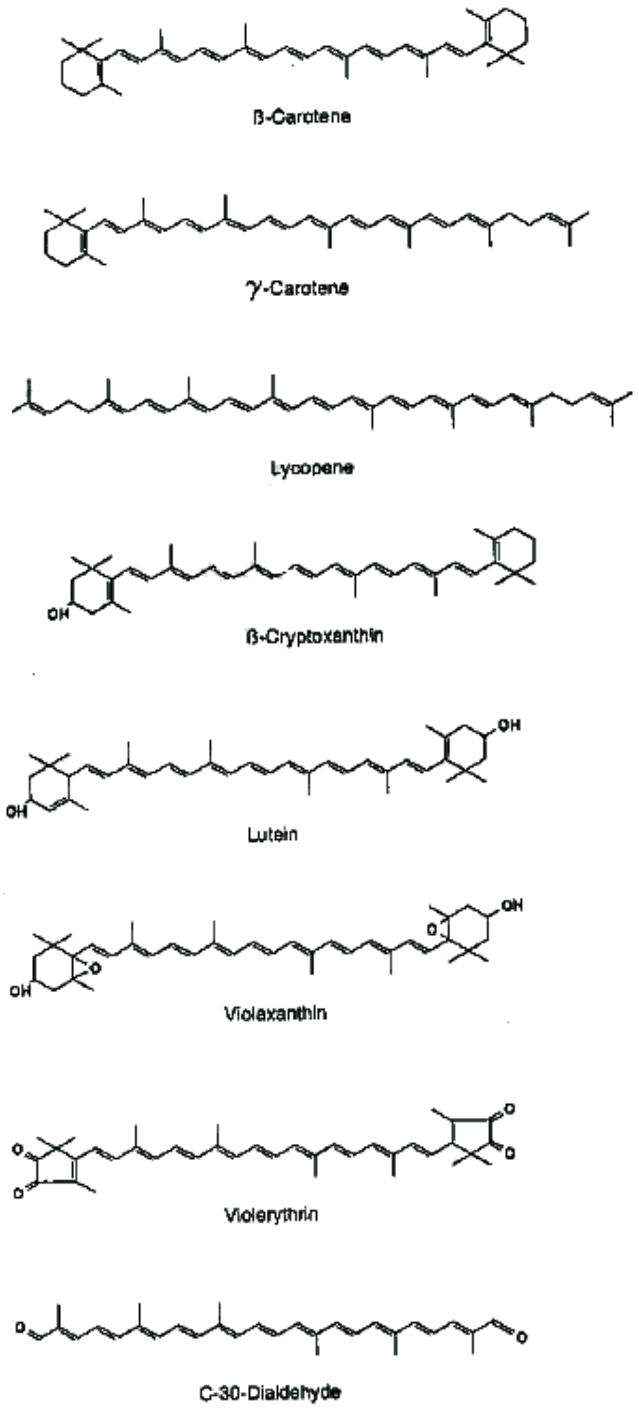
อนุมูล α-$Tocopherol^{\bullet}$ ที่เกิดขึ้นในสมการ สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูล peroxyl ตัวอื่น ทำให้ได้สารที่มีความเสถียร (LOO-α-Tocopherol) สมการที่ 27 เป็นผลให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันหยุดลง

α-$Tocopherol^{\bullet}$ + $LOO^{\bullet}$ $\longrightarrow$ LOO-α-Tocopherol สมการที่ 27

3. แคโรทีนอยด์ เป็นรงควัตถุที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เป็นสารสำคัญที่พบในคลอโรพลาสต์ของพืช มีบทบาทในการสังเคราะห์แสงเช่นเดียวกับคลอโรฟิลล์ ทำหน้าที่ช่วยคลอโรฟิลล์ในการรับพลังงานแสง ในผักและผลไม้ที่ยังไม่สุก จะพบแคโรทีนอยด์น้อยกว่าผักและผลไม้ที่สุกแล้ว เนื่องจากปกติผักใบเขียวหรือผักและผลไม้ที่ยังดิบอยู่ แคโรทีนอยด์จะอยู่ในส่วนของคลอโรพลาสต์ ในขณะที่ผักหรือผลไม้สุกแคโรทีนอยด์จะถูกสังเคราะห์ขึ้นในโครโมพลาสต์เป็นปริมาณมาก เนื่องจากเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์มีมากขึ้น โครงสร้างพื้นฐานของแคโรทีนอยด์ประกอบด้วยโครงสร้างหลักที่เรียกว่า tetraterpene skeleton ซึ่งอาจมีวงแหวนที่บริเวณปลายด้านใดด้านหนึ่งหรือทั้งสองด้านของโมเลกุล วงแหวนนี้อาจเป็นห้าเหลี่ยมหรือหกเหลี่ยมก็ได้ แคโรทีนอยด์สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ตามองค์ประกอบของโครงสร้างในโมเลกุล (ดังรูปที่ 12) ดังนี้

   a. แคโรทีน (carotene) เป็นแคโรทีนอยด์ที่โครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยคาร์บอนและไฮโดรเจนเท่านั้น เช่น เบต้า-แคโรทีน (β-carotene), อัลฟา-แคโรทีน (α-carotene), แกมม่า-แคโรทีน (γ-carotene), ไลโคปีน (lycopene) เป็นต้น
   b. ออกโซแคโรทีนอยด์ (oxocarotenoid) หรือแซนโทฟิลล์ (xanthophyll) เป็นแคโรทีนอยด์ที่โครงสร้างโมเลกุลบริเวณวงแหวนประกอบด้วยกลุ่มอื่นนอกเหนือจากคาร์บอนและไฮโดรเจน เช่น เบต้า-คริบโทแซนทิน (β-

crytoxanthin) และลูทีน (lutein) มี hydroxyl group violerythrin มี keto group และ violaxanthin มี epoxy group เป็นต้น



รูปที่ 12 โครงสร้างโมเลกุลของแคโรทีนอยด์บางชนิด

แคโรทีนอยด์ โดยเฉพาะเบต้า-แคโรทีนเป็นสารที่มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัด singlet oxygen ดังนั้นจึงมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยป้องกันการเกิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์ในสภาวะที่มี singlet oxygen ดังสมการที่ 28

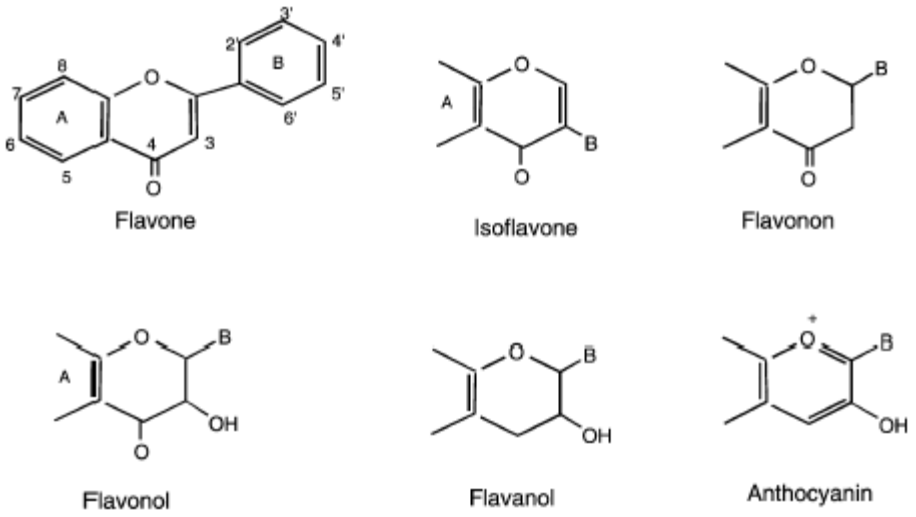
$$^1O_2 + {}^1\beta\text{-carotene} \longrightarrow {}^3O_2 + {}^3\beta\text{–carotene} \qquad \text{สมการที่ 28}$$

นอกจากนี้เบต้า-แคโรทีนยังสามารถดักจับอนุมูลอิสระเข้าไว้ในโมเลกุล โดยมีประสิทธิภาพมากกว่าอัลฟ่า-โทโคฟีรอล ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อเบต้า-แคโรทีนดักจับอนุมูลอิสระไว้แล้ว โมเลกุลของเบต้า-แคโรทีนจะอยู่ในลักษณะเรโซแนนซ์ที่มีความเสถียร

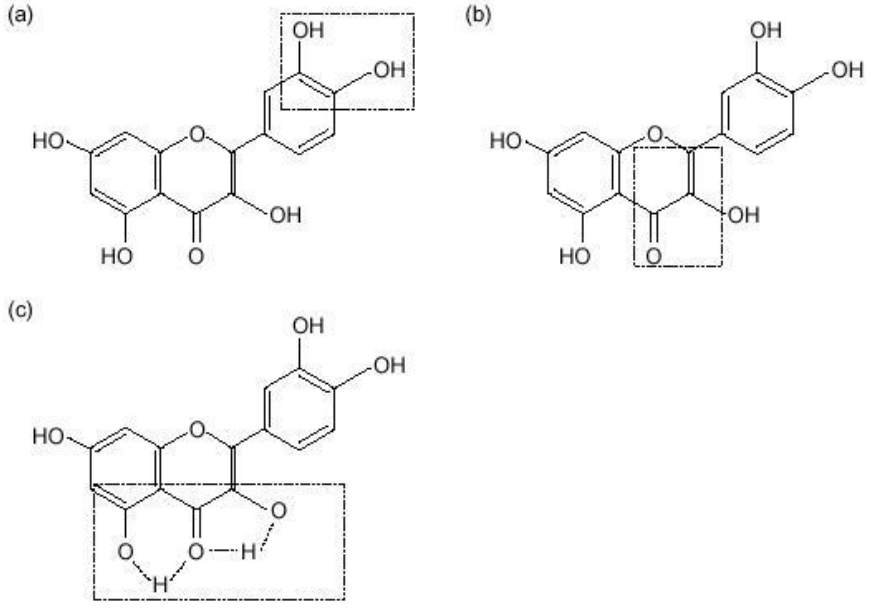
4. สารประกอบฟีนอลิค เป็นสารที่พบได้ในพืชทั่วไป มีคุณสมบัติเป็นสารอินทรีย์ที่มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนอะโรมาติก (aromatic ring) ที่มีจำนวน hydroxyl group อย่างน้อยหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งโมเลกุล สามารถละลายได้ในน้ำในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ (glycoside) สารประกอบฟีนอลิคที่พบในธรรมชาติมีหลายกลุ่มและมีลักษณะโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน กลุ่มใหญ่ที่พบจะเป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ดังแสดงในรูปที่ 13 นอกจากนี้ยังมีสารประกอบต่างๆ เช่น simple monocyclic phenol, phenyl propanoid, phenolic quinine และ polyphenolic ซึ่งได้แก่ พวกลิกนิน (lignin) เมลานิน (melanin) และแทนนิน (tannin) เป็นต้น รวมทั้งยังพบว่า มีสารประกอบที่มีกลุ่มฟีนอล (phenolic unit) รวมอยู่ในโมเลกุลของอัลคาลอยด์ (alkaloids) และเทอร์พีนอยด์ (terpenoids) เป็นต้น

การที่ flavonoids มีคุณสมบัติต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้นั้น เนื่องจากภายในสูตรโครงสร้างสามารถเกิดการเคลื่อนย้ายอิเล็คตรอนได้ดี ตำแหน่งสำคัญสำหรับคุณสมบัติอันนี้ ได้แก่ catechol structure ใน ring B ตำแหน่ง 2,3 double bond ซึ่ง conjugated กับ 4-keto ใน ring B และ hydroxyl groups ที่ตำแหน่ง 3 และ 5 ใน ring B (รูปที่ 14) (Croft et al.,1999) นอกจากนี้ flavonoids ยังสามารถจับกับโลหะหนักเช่น Fe^{2+} และ Cu^{2+} ซึ่งมีความสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันชนิด Fenton-type reaction (Halliwell et al., 1995) ดังนี้

$$H_2O_2 + Cu^+ \rightarrow \cdot OH + OH^- + Cu^{2+}$$
$$Cu^{2+} + O_2^{-}\cdot \rightarrow Cu^+ + O_2$$



รูปที่ 13 Flavonoids subclasses



รูปที่ 14 ตำแหน่งบนสูตรโครงสร้างของ flavonoids ที่สำคัญสำหรับคุณสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน

มีการศึกษาวิจัยจำนวนมากแสดงให้เห็นว่า flavonoids หลายชนิด เช่น catechin ในชาเขียว genistein และ daidzin ในถั่วเหลือง quercetin kempferol myricetin apigenin ฯลฯ มีประสิทธิภาพสูงในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Haslam, 1996, Middleton, 2000, Narayana, 2001) และหลักฐานที่ได้จากการศึกษาทางระบาดวิทยา การศึกษาในผู้ป่วยและในสัตว์ทดลองชี้ชัดว่า catechin และ genistein สามารถป้องกันโรคมะเร็ง (Middleton, 2000) โรคระบบหัวใจและหลอดเลือด (Moj"I-Ová and Kuchta, 2001) และโรคความเสื่อมของระบบประสาทส่วนกลาง เช่น Alzheimer's Huntington's และ Parkinson's diseases ได้

2.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง

วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีหลายวิธี เช่น การทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ (free radical scavenging assay) การตรวจวัดปริมาณอนุมูลอิสระโดยตรงจากอิเล็กตรอนเดี่ยวโดยใช้สนามแม่เหล็กไฟฟ้า (electron spin resonance, ESR) การทดสอบความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเพอร์ออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation inhibition assay) และการทดสอบความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์ (cell viability assay) เป็นต้น

1. การทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ เป็นการทดสอบการกำจัดอนุมูลอิสระของสารทดสอบโดยอนุมูลอิสระต้นแบบที่ใช้ในการทดสอบได้แก่ 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) หรือ 2,2-azino-bis[3-ethylbenz-thiazoline-6-sulphonate] (ABTS) การทดสอบทำโดยการวัดปริมาณอนุมูลอิสระเริ่มต้นจากค่าการดูดกลืนแสงด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี หากสารที่นำมาทดสอบมีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระก็จะทำให้ค่าการดูดกลืนแสงของอนุมูลอิสระนั้นๆ ลดลง อนุมูลอิสระ DPPH มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ABTS มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระคำนวณได้จากสมการที่ 29

$$\text{Scavenging activity (\%)} = 1 - \frac{\text{absorbance in presence of test sample}}{\text{absorbance in absence of test sample}} \times 100 \quad \text{สมการที่ 29}$$

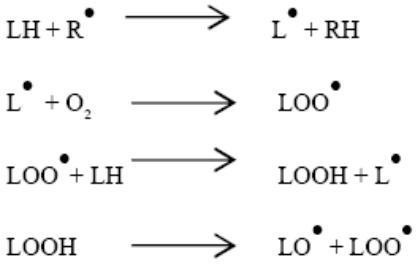
2. Electronspinresonance (ESR) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ESR อาศัยการเปลี่ยนแปลงสัญญาณคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าโดยอิเล็กตรอนเดี่ยว อิเล็กตรอนของอนุมูลอิสระจะถูกจับด้วยตัวจับอิเล็กตรอน (spin trap) เกิดเป็นอนุมูลอิสระที่คงตัว (spin adduct) และสามารถถูกตรวจจับได้ ในสนามแม่เหล็กไฟฟ้าเกิดเป็นสัญญาณแม่เหล็กไฟฟ้า spin trap เป็นสารที่มีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ทำให้ครึ่งชีวิตของอนุมูลอิสระยาวขึ้นมีความคงตัวและถูกตรวจจับได้

ในสนามแม่เหล็กไฟฟ้าในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ESR เริ่มจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารทดสอบกับอนุมูลอิสระต้นแบบเช่น $OH^{\bullet}$ $O_2^{\bullet-}$หรือ DPPH หลังจากนั้นนำมาจับกับ spin trap และตรวจวัดภายใต้สนามแม่เหล็กไฟฟ้า สารทดสอบที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะลดความเข้มของสัญญาณแม่เหล็กไฟฟ้า เนื่องจากอนุมูลอิสระถูกกำจัดด้วยสารทดสอบความเข้มของสัญญาณแม่เหล็กไฟฟ้าที่เกิดขึ้น ความสามารถในการออกฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากสมการที่ 30

$$\text{Antioxidant activity (\%)} = 1 - \frac{h \text{ in presence of test sample}}{h \text{ in absence of test sample}} \times 100 \qquad \text{สมการที่ 30}$$

h = ความเข้มของสัญญาณแม่เหล็กไฟฟ้า

3. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเพอร์ออกซิเดชันของไขมัน อนุมูลอิสระสามารถทำปฏิกิริยากับชีวโมเลกุล เช่น ไขมัน โปรตีน และดีเอนเอ ในปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลอิสระกับไขมันมีลักษณะเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ และทำให้ไขมันเสื่อมสลายเป็นสารกลุ่มอัลดีไฮด์ คีโตนและเพอร์ออกไซด์ของไขมัน (lipidperoxide, LOOH) ดังรูปที่ 15



รูปที่ 15 ปฏิกิริยาเพอร์ออกซิเดชันของไขมันที่เกิดจากอนุมูลอิสระ

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเพอร์ออกซิเดชันของไขมัน โดยอาศัยการวัดปริมาณของเพอร์ออกไซด์ของไขมันที่เกิดขึ้นหลังจากปฏิกิริยาเพอร์ออกซิเดชัน หากสารทดสอบมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจะทำให้เพอร์ออกไซด์ของไขมันที่เกิดจากปฏิกิริยาลดลง

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) เป็นตัวทดสอบตัวหนึ่งที่ใช้วัดปริมาณเพอร์ออกไซด์ของไขมันเนื่องจากมีความไวในการเกิดปฏิกิริยาสามารถเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนและวัดปริมาณได้ด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี ความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเพอร์ออกซิเดชันของไขมันคำนวณได้จากสมการที่ 31

$$\%\ \text{Lipid peroxidation inhibition} = 1 - \frac{\text{absorbance in presence of test sample}}{\text{absorbance in absence of test sample}} \times 100 \qquad \text{สมการที่ 31}$$

4. การทดสอบความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์ เป็นการทดสอบความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์หลังจากเหนี่ยวนำให้เกิด reactive oxygen species (ROS) ขึ้นในเซลล์ สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอาจลดการตายของเซลล์ เนื่องจากภาวะเครียดจากออกซิเดชัน โดยนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell) และเซลล์ที่ตาย (dead cell) หรือทดสอบจากการทำงานของไมโทคอนเดรีย และคำนวณเซลล์ที่มีชีวิตเป็นร้อยละของ

ความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) วิธีที่นิยมทดสอบ คือ Dye exclusion method และ MTT reduction assay

4.1 Dye exclusion method เป็นการจำแนกเซลล์มีชีวิตและไม่มีชีวิตด้วยการย้อมสีเซลล์ที่ตายเยื่อหุ้มเซลล์จะแตกออกทำให้สีผ่านเข้าไปดูดซับโปรตีนในเซลล์และติดสี เซลล์ที่มีชีวิตและสุขภาพดีจะมีลักษณะกลม ไม่ติดสี สีที่นิยมใช้คือ trypan blue ซึ่งเป็น acid azo dye ที่มีความสามารถในการติดสี เซลล์สัตว์ที่ตายเซลล์จะดูดซับสีปรากฏเป็นสีฟ้า สามารถนับจำนวนเซลล์ตายและเซลล์มีชีวิตด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้ hemocytometer และคำนวณ % cell viability จากสมการที่ 32

$$\%\ \text{Cell viability} = \frac{\text{viablecell}}{\text{viablecell + dead cell}} \times 100 \qquad \text{สมการที่ 32}$$

4.2 MTT Reduction assay ทดสอบการทำงานของเซลล์จากความสามารถในการทำงานของไมโทคอนเดรียในการรีดักชันสาร 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) เซลล์ที่มีชีวิตและมีการทำงานของไมโทคอนเดรียปกติเอนไซม์ dehydrogenase และ cofactor ในไมโทคอนเดรียจะรีดิวซ์ MTT ให้กลายเป็น formazan การทดสอบทำโดยละลาย MTT ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แล้วเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์นำสารละลาย MTT ไปบ่มในเซลล์ที่ต้องการทดสอบเซลล์ที่ไมโทคอนเดรียทำงานปกติจะรีดิวซ์ MTT ให้เป็น formazan ซึ่งเมื่อนำมาละลายในตัวทำละลาย เช่น DMSO หรือ isopropanol/HCl ได้สารละลายสีม่วงน้ำเงิน สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้โดยใช้ microplate reader ด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี ในช่วงความยาวคลื่น 550-595 นาโนเมตร คำนวณ % cell viability จากสมการที่ 33

$$\%\text{Cell viability} = \frac{\text{absorbanceof treated cell}}{\text{absorbanceof controlcell}} \times 100 \qquad \text{สมการที่ 33}$$

2.6 พืชสมุนไพรที่นำมาศึกษา

2.6.1 กาสามปีก

ชื่อท้องถิ่น เกล็ดปลาช่อน (สระบุรี); เกล็ดลิ่นใหญ่ (นครราชสีมา); ลิ่นต้น, หญ้าสองปล้อง (ภาคกลาง); ลูกหนีบต้น (ปราจีนบุรี); หญ้าเกล็ดลิ่น (ภาคเหนือ,ภาคใต้); หางลิ่น (สุราษฎร์ธานี)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Desmodium pulchellum* (L.) Benth.

ชื่อวงศ์ Leguminosae-Papilionoideae

ลักษณะพืช เป็นไม้พุ่ม (shrub) ขนาดเล็ก อายุหลายปี ปลายยอดค่อนข้างตั้ง ต้นสูง 102.19-113.57 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น 32.4 – 37.2 มิลลิเมตร ลำต้นสีน้ำตาลแดงมีขนปกคลุมปานกลาง

ใบ ใบเป็นใบประกอบแบบขนนกเรียงสลับ มีใบย่อย 3 ใบย่อยและมีก้านใบ (pinnately-trifoliate) รูปร่างใบย่อยแบบรูปไข่แกมใบหอก (ovate lanceolate) โคนค่อนข้างกลม แผ่นกลางใบกว้างโค้งไปปลายใบ ปลายใบค่อนข้างมน (obtuse) ใบกลางยาว 9.9-13.1 เซนติเมตร กว้าง 4.3-7.3 เซนติเมตร ใบย่อยข้างขอบใบล่างโค้งเบี้ยวเล็กน้อย ใบข้างยาว 5.51-8.67 เซนติเมตร กว้าง 2.47-5.09 เซนติเมตร ซอกใบมีกิ่งใบย่อย เกิดซ้อนใบสีเขียวเข้ม หน้าใบและหลังใบมีขนสั้นๆปริมาณปานกลาง ขอบใบเรียบมีสีน้ำตาลแดง ผิวใบค่อนข้างหยาบเล็กน้อย หน้าใบมีผิวมัน นูนขึ้นเล็กน้อยและย่น (rugose) หลังใบผิวค่อนข้างสากซึ่งแตกต่างจากต้นเกล็ดปลาหมอ (Phyllodium elegan) ที่มีผิวใบนุ่ม มีขนละเอียดปกคลุมหนาแน่นทั้งหน้าใบและหลังใบ มีปลายใบสอบเรียว ขอบใบสีน้ำตาลเหลือง ต้นเกล็ดปลาช่อนมีก้านใบสีน้ำตาลแดง มีขนละเอียดปกคลุมมาก ก้านใบยาว 0.88-1.02 เซนติเมตร หูใบค่อนข้างแข็งเรียวแบบหนาม (spinous)

ดอก ออกดอกประมาณเดือนตุลาคม-ธันวาคม ดอกออกตามซอกใบและปลายยอด ความยาวช่อดอกรวม 9.13-13.93 เซนติเมตร ลักษณะดอกออกเป็นกระจุกมี

ใบประดับลักษณะคล้ายเกล็ดปลาประกบไว้สองใบ ดอกเดี่ยวรูปดอกถั่ว กลีบดอกสีเหลืองนวล อับเรณู (anther) สีเหลือง ในแต่ละช่อมี 21-36 ช่อดอกย่อย

ผลและเมล็ด รูปฝักแบนคอดเป็นข้อๆ ฝักแก่สีดำอมน้ำตาล มีขนปกคลุม ฝักยาว 0.88-1.06 เซนติเมตร กว้าง 0.27-0.41 เซนติเมตร มี 1-3 ข้อ มี 2-5 ฝักต่อช่อ

ประโยชน์ รากต้มน้ำดื่มแก้ตับพิการ รากกาสามปีกผสมกับรากกระดูกอึ่ง รากกาสามปีก รากโมกมัน รากหางหมาจอก ต้มน้ำดื่มแก้คุณไสย (อาการผอมแห้ง ใจสั่น)

2.6.2 แคบ้าน

ชื่อท้องถิ่น แคขาว แคแดง (เหนือ) แคดอกแดง แคดอกขาว

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Sesbania grandiflora* Desv.

ชื่อวงศ์ Papilionaceae

ลักษณะพืช เป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็ก สูง 3-10 เมตร โตเร็ว มีกิ่งก้านสาขามาก กิ่งเปราะง่าย เปลือกมีสีน้ำตาล มีรอยขรุขระหนา เปลือกในมีสีชมพู มีรสฝาด

ใบ ใบเป็นใบประกอบแบบขนนก ใบย่อยมีขนาดเล็กเรียงคู่เป็นใบย่อยมี 30-50 ใบ

ดอก ดอกออกเป็นกระจุกออกที่ซอกใบมีสีขาวคล้ายดอกถั่วแต่ละช่อมี 2-4 ดอก ยาว 6-10 ซม. กลีบเกลี้ยงเป็นรูประฆังหรือถ้วย

ผล ผลเป็นฝักแบนยาวประมาณ 8-15 เมตร ฝักแก่จะแตกออกเป็น 2 ซีก มีเมล็ดเรียงอยู่ตรงกลางแถวเดียว

เมล็ด เมล็ดคล้ายเมล็ดถั่ว ขนาดเล็กประมาณ 5 มม. ลักษณะกลมแบน สีน้ำตาลอ่อน หนึ่งผลมีหลายเมล็ด เมล็ดแข็ง

ประโยชน์ ยอดอ่อน ใบอ่อน ดับพิษร้อนถอนพิษไข้ ดอก มีรสหวานออกขมเล็กน้อย สรรพคุณแก้ไข้หัวลม เปลือกต้นมีรสฝาดรักษาอาการท้องเดินแต่ถ้ากินมากๆ จะทำให้อาเจียนได้ ราก น้ำจากรากนำมาผสมกับน้ำผึ้งเป็นยาขับเสมหะ

2.6.3 จานเครือ

ชื่อท้องถิ่น กว้างผู้ เครือเขาผู้ ตาลานเครือ (เหนือ); เครือเขาคู้ (ประจวบคีรีขันธ์); คานเครือ (ตะวันออกเฉียงเหนือ); เถาทองเลื่อย (ราชบุรี)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Spatholobus parviflorus* (DC.) Kuntze

ชื่อวงศ์ Fabaceae

ลักษณะพืช ไม้เถาเนื้อแข็งเลื้อยพันขนาดใหญ่ ยาวได้ถึง 20 เมตร

ใบ ใบประกอบแบบขนนก มีใบย่อย 3 ใบ เรียงสลับ ใบย่อยที่ปลายรูปไข่หรือรูปไข่แกมใบหอก ใบย่อยด้านข้างรูปไข่แกมสี่เหลี่ยม กว้าง 6-10 ซม. ยาว 9-14 ซม.

ดอก ดอกช่อออกที่ซอกใบ ดอกย่อยจำนวนมาก กลีบดอกสีแดงเข้มรูปดอกถั่ว

ผลและเมล็ด ผลเป็นฝักแบน รูปขอบขนาน มีขนละเอียดสีน้ำตาล เมล็ดเดียว

ประโยชน์ ชาวเขาเผ่าอีก้อ แม้ว กระเหรี่ยง ใช้ ต้น ใบ ต้มน้ำดื่ม แก้ปวดท้อง อาหารไม่ย่อย อาหารเป็นพิษ โรคกระเพาะอาหาร กระตุ้นกำหนัด ช่วยให้มีบุตรง่าย บำรุงเลือด แก้ปวดประจำเดือน เลือดลมเดินไม่สะดวก ตำคั้นน้ำทาหรือพอก แก้โรคผิวหนัง ผื่นคัน หูด ต้มน้ำให้สตรีหลังคลอดอาบ ยาพื้นบ้านใช้เปลือกต้น 1 กำมือต้มน้ำดื่ม แก้ตกเลือด ยาพื้นบ้านอีสานใช้ ลำต้น ผสมลำต้นชะเอมไทยและเปลือกต้นหรือรากเต็งหนาม ต้มน้ำดื่มหรือปรุงเป็นยาลูกกลอนกินแก้ผื่นคัน

2.6.4 หญ้ามดลิ่น

ชื่อท้องถิ่น ขวงคันนาแดง (เชียงใหม่); หญ้าตืดหมา (ลำปาง); พึงฮวย (ชุมพร); อีเหนียวใหญ่ (ชัยภูมิ)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Desmodium heterocarpon (L.)*

ชื่อวงศ์ Leguminosae

ลักษณะพืช ไม้ล้มลุกฤดูเดียว ลำต้นตั้งตรง สูงได้ถึง 2 เมตร

ใบ ใบประกอบแบบขนนก มีใบย่อย 3 ใบ เรียงสลับ ใบย่อยรูปวงรี รูปวงรีแกมขอบขนาน รูปวงรีแกมไข่กลับหรือรูปไข่แกมใบหอกกว้าง 1.5-3 ซม. ยาว 2.8 ซม. แผ่นใบด้านล่างมีขน

ดอก ดอกช่อออกที่ซอกใบ กลีบดอกสีม่วง รูปดอกถั่ว

ผลและเมล็ด ผลเป็นฝักยาว มีขนคอดเป็นข้อๆ แตกตามตะเข็บล่าง

ประโยชน์ ยาพื้นบ้านล้านนาใช้ใบและลำต้นต้มน้ำอาบแก้บวมพอง ตำรายาไทยระบุว่ามีรสเมาเฝื่อนเป็นยาขับปัสสาวะแก้กาฬมูตร แก้เด็กตัวร้อน ดับพิษตานซาง แก้โรคลำไส้ ขับพยาธิทุกชนิด ยาพื้นบ้านใช้ ราก ผสมสมุนไพรต้มน้ำดื่ม ครั้งละ1 ช้อนโต๊ะ วันละ 3 ครั้ง เป็นยาถ่ายพยาธิ

2.6.5 ดูกอึ่ง

ชื่อท้องถิ่น แกลบหนู แกลบหูหนู แปรงหูหนู (ปราจีนบุรี); กระดูกเขียด (นครพนม); กระดูกอึ่ง (ราชบุรี บุรีรัมย์); กระดูกอึ่งใหญ่ (นครราชสีมา); อึ่งใหญ่ (กลาง ตะวันออกเฉียงเหนือ)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Dendrolobium Lanceolatum* (Dunn) Schindl.

ชื่อวงศ์ Leguminosae-Papilionoidea

ลักษณะพืช เป็นไม้พุ่มสูง 2.5-4.5 เมตร พบยอดทรงพุ่มสองลักษณะ คือ ปลายยอดค่อนข้างตั้งและปลายยอดของทรงพุ่มห้อยย้อยลงพื้น ลำต้นมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.7-22.0 มิลลิเมตร

ใบ ใบประกอบแบบขนนกมี 3 ใบย่อย (trifoliate) รูปร่างแบบรูปไข่กลับ (obovate) รูปขอบขนาน (oblong) ถึงรูปขอบขนานแกมไข่กลับ (obovate-oblong) ใบสีเขียวค่อนข้างเข้มถึงเขียวเข้ม ใบบนกว้าง 0.8-1.4 เซนติเมตร ยาว 2.7-4.3 เซนติเมตร ใบข้างกว้าง 0.6-1.2 เซนติเมตร ยาว 1.4-3.4 เซนติเมตร ก้านใบยาว 0.5-1.5 เซนติเมตร หน้าใบมีขนสั้นๆ เล็กน้อย หลังใบมีขนสั้นๆ มากกว่าหน้าใบ

ดอก ดอกช่อออกที่ซอกใบ รูปดอกถั่ว กลีบดอกมีสีเหลืองอ่อน ออกดอกที่ซอกใบหรือตาข้าง กลีบดอกมีสีเหลืองอ่อน อับเรณู (anther) และเกสรเพศเมีย (stigma) มีสีเหลืองอ่อนออกเขียวตองอ่อน

ผลและเมล็ด ผลเป็นฝักแบนมีเมล็ดเดียวผลเป็นฝักแบนมี 1 เมล็ด ขนาดฝักกว้าง 0.4-0.5 เซนติเมตร ยาว 0.7-0.8 เซนติเมตร ในแต่ละช่อมี 3-7 ฝัก ออกดอกช่วงเดือนกันยายนถึงเดือนพฤษภาคม

ประโยชน์ รากต้มดื่ม แก้ไตพิการ ผสมกับรากโมกมันรากกาสามปีกใหญ่ รากเกล็ดปลาหมอและรากหางหมาจอกต้มดื่มแก้คุณไสย (อาการผอมแห้ง ใจสั่น บางเวลาร้องไห้) (วงศ์สถิตย์ ฉั่วสกุลและคณะ, 2543)

2.6.6 ตองหมอง

ชื่อท้องถิ่น ไชหิน (สุรินทร์); การะ (ส่วย สุรินทร์); เรียะเรียง (เขมร สุรินทร์); ต่างหมอง ไม้ไชหิน (ชัยภูมิ); ตองหมอง (อุบลราชธานี)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Tadehagi godefroyanum* (Kuntze) Ohashi

ชื่อวงศ์ Papilionoideae

ลักษณะพืช เป็นไม้พุ่ม ลำต้นตั้งตรงสูง 2-3 เมตร ลำต้นมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.3-5.4 เซนติเมตร

ใบ หลังใบมีขนสีขาวปกคลุมหนาแน่นมาก ใบด้านหน้าไม่มีขน การจัดเรียงตัวของใบเป็นแบบใบเดี่ยว (simple) ใบมีรูปร่างรูปไข่แกมใบหอก (ovate-lanceolate) มีสีเขียวค่อนข้างเข้มถึงเขียวเข้ม ใบกว้าง 6.1-8.9 เซนติเมตร ยาว 12.3-18.4 เซนติเมตร ก้านใบยาว 1.7-2.9 เซนติเมตร ก้านใบและกิ่งมีขนละเอียดสีขาวปกคลุมหนาแน่นมาก ใบค่อนข้างหนา

ดอก ออกดอกที่ตาข้างและที่ปลายยอดกิ่ง การออกดอกเป็นแบบ Indeterminate ช่อดอกยาว 92-114.8 เซนติเมตร กลีบดอกด้านหน้า มีสีม่วงบานเย็นหรือม่วงแดง ด้านหลังกลีบดอกสีม่วงหม่นปนขาว

ผลและเมล็ด ฝักยาว 3.9-4.5 เซนติเมตร กว้าง 0.5-0.7 เซนติเมตร แต่ละฝักมีเมล็ด 2-5 เมล็ด ปลายฝักมีตะของอ

ประโยชน์ ยาพื้นบ้านใช้รากต้มน้ำดื่มแก้อาเจียนมีเลือดออกทั้งทางปากและทวารหนัก (วงศ์สถิตย์ ฉั่วสกุลและคณะ, 2543)

2.6.7 หนามหัน

ชื่อท้องถิ่น หนามตะหนิน; หนามหัน

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Acacia comosa* Gagnep.

ชื่อวงศ์ Fabaceae (Mimosaceae)

ลักษณะพืช ไม้เลื้อย สูงถึง 10 เมตร เปลือกลำต้นมี lenticel ตามขวางลำต้น ยอดอ่อนมีขนปกคลุมเล็กน้อย ต้นแก่สีเทา-น้ำตาล เปลือกนอกมีหนาม prickle ปลายหนามแหลมงุ้มลงโคนกิ่ง หนามยาว 0.5-2 มม.

ใบ ใบประกอบ bipinnate ก้านใบรวม rachis ยาว 3.5-12 ซม. เรียงตัวแบบสลับ โคนก้านใบมีหูใบ ลักษณะเป็นเส้น 2 อัน ยาว 2-4 มม. ร่วงก่อนใบกางเต็มที่ บนก้านใบห่างจากโคนก้าน 4-7 มม. มีต่อมเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-3 มม. บนก้าน rachis ที่ตำแหน่งเกิด pinnae คู่ที่ 1 และ 2-3 คู่จากปลายก้าน มีต่อมรูปร่างกลมแบน เส้นผ่าศูนย์กลาง 1-2 มม. pinna เกิดเป็นคู่แบบตรงข้ามกันจำนวน 3-7 คู่ ก้านใบรวม rachilla ยาว 2-10 ซม. ใบย่อยเรียงตัวแบบสลับ จำนวน 6-17 คู่ ก้านใบย่อยสั้นมาก 0.1-0.2 มม. ใบย่อยรูปขอบขนาน โคนใบ oblique ปลายใบแหลมหรือมนเล็กน้อย แผ่นใบสองข้างเส้นกลางใบไม่เท่ากัน ขอบใบเรียบ ผิวใบเรียบและเลื่อมเป็นมัน ใบกว้าง 2-5 มม. ยาว 4-12 มม. ก้านใบอ่อนมีขนปกคลุมเล็กน้อย

ดอก ดอกช่อ panicle of globose head เกิดที่ซอกใบใกล้ปลายกิ่งหรือที่ปลายกิ่ง ก้านช่อดอกยาวถึง 30 ซม. ก้านช่อ head ยาว 15-25 มม. เส้นผ่าศูนย์กลาง head ของดอกบาน 12-15 มม. ดอกย่อยอัดแน่นบนฐานรองดอกรูปโดม ไม่มีก้านดอกย่อย ดอกย่อยมีใบประดับเป็นเส้นสีเขียว ยาว 3-5 มม. ระยะดอกตูม

เจริญยาวกว่าดอกย่อย ประมาณ 1 เท่า ดอกย่อยมี กลีบเลี้ยง 5 กลีบติดกันเป็นรูปถ้วย ยาว 1.2-2 มม. สีเขียวแกมขาว ปลายแยก 5 แฉกตื้นๆ กลีบดอก 5 กลีบสีขาวหรือเขียวแกมขาวติดกันเล็กน้อย ที่ฐานกลีบยาว 2.5-3.5 มม. เกสรเพศผู้ จำนวนมาก ก้านชู อับเรณูเป็นเส้นสีขาวแยกกันยาว 4-5 มม. อับเรณูสีเหลือง ก้านชูอับเรณูคดงอ เกสรเพศเมีย 1 อัน รังไข่ superior ovary สีเขียวลักษณะแบนมีขนปกคลุมเล็กน้อย ยาว 1-1.5 มม. มีก้านชูรังไข่ยาว 1-1.5 มม. ก้านเกสรเพศเมียสีขาวยาว 4-7 มม. ยอดเกสรเพศเมียเป็นตุ่มเล็กๆ marginal placentation

ผลและเมล็ด ผลแห้ง legume ลักษณะแบน กว้าง 1.5-2 ซม. ยาว 10-15 ซม. เมล็ดแบน กว้าง 3.5-5 มม. ยาว 5-7 มม.

ประโยชน์ ราก รสฝาด แก้ไข้ทับระดู แก้ระดูทับไข้

2.6.8 บ้าบน

ชื่อท้องถิ่น บ้าบน (อุบลราชธานี)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Entada reticulata* Gagnep.

ชื่อวงศ์ Fabaceae

ลักษณะพืช ไม้พุ่มเลื้อยพัน

ใบ ใบประกอบแบบขนนกสองชั้นเรียงสลับ มีช่อใบย่อย 2 คู่ใบประกอบคู่ปลายเปลี่ยน รูปร่างเป็นมือเกาะ ใบย่อยเรียงตรงข้าม รูปขอบขนานแคบ กว้าง 0.2-0.5 ซม. ยาว 0.6-1.6 ซม.

ดอก ดอกช่อกระจะเชิงลด ออกที่ซอกใบ ดอกย่อยจำนวนมาก กลีบดอกสีเขียวหรือแดงเข้ม

ผลและเมล็ด ผลเป็นฝัก รูปขอบขนาน โค้งงอ สีน้ำตาล หักเป็นท่อนๆ แต่ละท่อนมี 1 เมล็ด เมล็ดรูปทรงกลม เปลือกแข็งสีน้ำตาล

ประโยชน์ ทั้งต้น ยาพื้นบ้านอีสานใช้ทำเป็นลูกประคบ แก้ปวดข้อ ราก ฝนน้ำทา แก้ฝีแผลพุพอง

2.6.9 ส้มเสี้ยว

ชื่อท้องถิ่น คังโค; แดงโคว; เสี้ยวส้ม; เสี้ยวใหญ่

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Bauhinia malabarica* Roxb.

ชื่อวงศ์ Fabaceae

ลักษณะพืช ไม้ยืนต้น สูง 5-10 เมตร

ใบ ใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปไข่กว้างแยกเป็นสองพู กว้างและยาว 10 -15 ซม. ใบมีรสเปรี้ยว

ดอก ดอกช่อออกที่ซอกใบใกล้ปลายกิ่ง กลีบดอกสีชมพูอ่อน

ผลและเมล็ด ผลเป็นฝักรูปดาบ

ประโยชน์ รากและลำต้นใช้แก้ไอขับเสมหะดอกแก้เสมหะพิการ ใบ มีรสเปรี้ยวฝาด ใช้แก้ไอและฟอกโลหิตเอาใบส้มเสี้ยวมาต้มเป็นยาดื่มแก้ท้องผูกระบายท้องได้ดีเป็นยาขับปัสสาวะขับเมือกที่ปนอยู่กับอุจจาระออกไปหรือนำเอาไปใช้กับยาบำรุงโลหิตระดูที่ออกมาเป็นก้อนๆ มีกลิ่นเหม็นเพื่อให้หายไปและเป็นปกติในที่สุด

กาสามปีก

Desmodium pulchellum (L.) Benth.

แคบ้าน

Sesbania grandiflora Desv.

จานเครือ

Spatholobus parviflorus (DC.) Kuntze

หญ้ามดลิ่น

Desmodium heterocarpon (L.)

ดูกอึ่ง

Dendrolobium Lanceolatum (Dunn) Schindl.

ตองหมอง

Tadehagi godefroyanum (Kuntze) Ohashi

หนามหัน

Acacia comosa Gagnep.

บ้าบน

Entada reticulata Gagnep.

ส้มเสี้ยว

Bauhinia malabarica Roxb.

รูปที่ 16 พืชสมุนไพรทั้ง 9 ชนิดที่นำมาศึกษา

2.7 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในไขมันของสารสกัดจากพืชสมุนไพรวงศ์ *Leguminosae* ในจังหวัดอุบลราชธานี โดยวิธีDPPH free radical scavenging และLipid peroxidation assay (TBA assay) พืชสมุนไพรที่นำมาศึกษาได้แก่ กาสามปีก (*Desmodium pulchellum* (L.) Benth.) แคบ้าน (*Sesbania grandiflora* Desv.) จานเครือ (*Spatholobus parviflorus* (DC.) Kuntze) หญ้ามดลิ่น (*Desmodium heterocarpon (L.)*) ดูกอึ่ง (*Dendrolobium Lanceolatum* (Dunn) Schindl.) ตองหมอง (*Tadehagi godefroyanum* (Kuntze) Ohashi) หนามหัน (*Acacia comosa* Gagnep.) บ้าบน *(Entada reticulata* Gagnep.) และส้มเสี้ยว (*Bauhinia malabarica* Roxb.)

2.8 ทฤษฎีหรือกรอบแนวความคิด (Conceptual Framework) ของโครงการวิจัย

อนุมูลอิสระเป็นสารที่มีความไวในการทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลอื่นๆ แล้วก่อให้เกิดพยาธิสภาพตามมา เช่น Alzheimer disease, Myocardial infarction, Atherosclerosis, Parkinson's disease, Autoimmune disease ซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้อาจเกิดจากขบวนการขนส่งอิเล็คตรอนในการหายใจ การเผาผลาญพลังงานหรือการทำลายสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว ในภาวะปกติร่างกายจะมีกลไกในการป้องกันตนเอง เช่น เอนไซม์ Superoxide dismutase catalase และ glutathione (GSH) peroxidase ซึ่งทำหน้าที่ในการกำจัดสารเหล่านี้แต่ในสภาวะที่มีการสร้างอนุมูลอิสระมากเกินกว่าที่ร่างกายจะกำจัดได้ อนุมูลอิสระส่วนเกินจะทำปฏิกิริยาออกซิเดชันก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อในร่างกาย เช่น Hydroxyl radical สามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์และสารกลุ่ม lipoproteins โดยผ่านกระบวนการที่เรียกว่า lipid peroxidation ซึ่งเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ นอกจากนี้อนุมูลอิสระยังเกิดปฏิกิริยากับโปรตีนก่อให้เกิดการเสียสภาพและสูญเสียประสิทธิภาพของเอนไซม์ในร่างกาย

สารที่มีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสามารถป้องกันการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อโดยยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ ซึ่งการศึกษาคุณสมบัติดังกล่าวสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การใช้เทคนิค hydrate (DPPH) free radical scavenging เป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในการทดสอบฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระของสาร

ตัวอย่าง หลักการของปฏิกิริยานี้ คือ สาร 2,2-Diphenyl-1-picryhydrazyl (DPPH) ซึ่งเป็นสารที่มีสีม่วงและดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 515 nm เมื่ออยู่ในสารละลายจะสามารถปลดปล่อยอิเล็คตรอนอิสระได้เองและเปลี่ยนไปเป็น 2,2-Diphenyl-1-picryhydrazine ซึ่งมีคุณสมบัติดูดกลืนแสงเปลี่ยนไป กรณีสารตัวอย่างที่นำมาทดสอบมีฤทธิ์ free radical scavenging จะสามารถยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของ DPPH ได้ การวัดผลจึงเป็นการวัดปริมาณ DPPH ที่ลดลงและแปลผลเป็น % inhibition ส่วนการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันใช้เทคนิค Lipid peroxidation assay (TBA assay) ซึ่งอาศัยหลักการการทำปฏิกิริยาระหว่าง hydroxyl radical กับสารประกอบไขมันทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีสี ซึ่งสามารถวัดการดูดกลืนแสงได้ กรณีที่สารตัวอย่างซึ่งนำมาทดสอบมีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันจะสามารถยับยั้งปฏิกิริยานี้ได้ การวัดผลจึงเป็นการวัดความสามารถในการยับยั้ง % inhibition

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย (Methodology)

3.1 ตัวอย่างพืช

พืชที่ใช้ศึกษา มี 9 ชนิด เก็บในเขตจังหวัดอุบลราชธานี ช่วงเดือนกันยายน 2546 – กันยายน 2547

ตารางที่ 2 ข้อมูลพืช 9 ชนิดและส่วนที่ใช้ในการศึกษา

ชื่อท้องถิ่น	ชื่อวิทยาศาสตร์	วงศ์	ส่วนที่ใช้
1. กาสามปีก	*Desmodium pulchellum* (L.) Benth.	Leguminosae - Papilionoideae	ใบ
2. แคบ้าน	*Sesbania grandiflora* Desv.	Papilionoideae	ใบ
			ต้น
3. จานเครือ	*Spatholobus parviflorus* (DC.) Kuntze	Fabaceae	ใบ
			ต้น
4. หญ้ามดลิ่น	*Desmodium heterocarpon* (L.)	Leguminosae	ใบ,ต้น
5. ดูกอึ่ง	*Dendrolobium Lanceolatum* (Dunn) Schindl.	Leguminosae-Papilionoidea	ใบ
			ต้น
6. ตองหมอง	*Tadehagi godefroyanum* (Kuntze) Ohashi.	Papilionoideae	ใบ
			ต้น
7. หนามหัน	*Acacia comosa* Gagnep.	Fabaceae (Mimosaceae)	ใบ
			ต้น
8. บ้าบน	*Entada reticulata* Gagnep.	Fabaceae	ใบ,ต้น
9. ส้มเสี้ยว	*Bauhinia malabarica* Roxb.	Fabaceae	ใบ
			ต้น

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี

รายการสารเคมีที่ใช้

1. Ethyl alcohol absolute (ITALMAR CO LTD)
2. L(+)-Ascorbic acid (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH)
3. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (Fluka Chemie GmbH)
4. Dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH)
5. (±)-α-Tocopherol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
6. Thiobarbituric acid (TBA)
7. 4 mM phosphate buffer pH 7.4
8. 467 mM potassium chloride
9. 35% perchloric acid
10. 50% glacial acetic acid

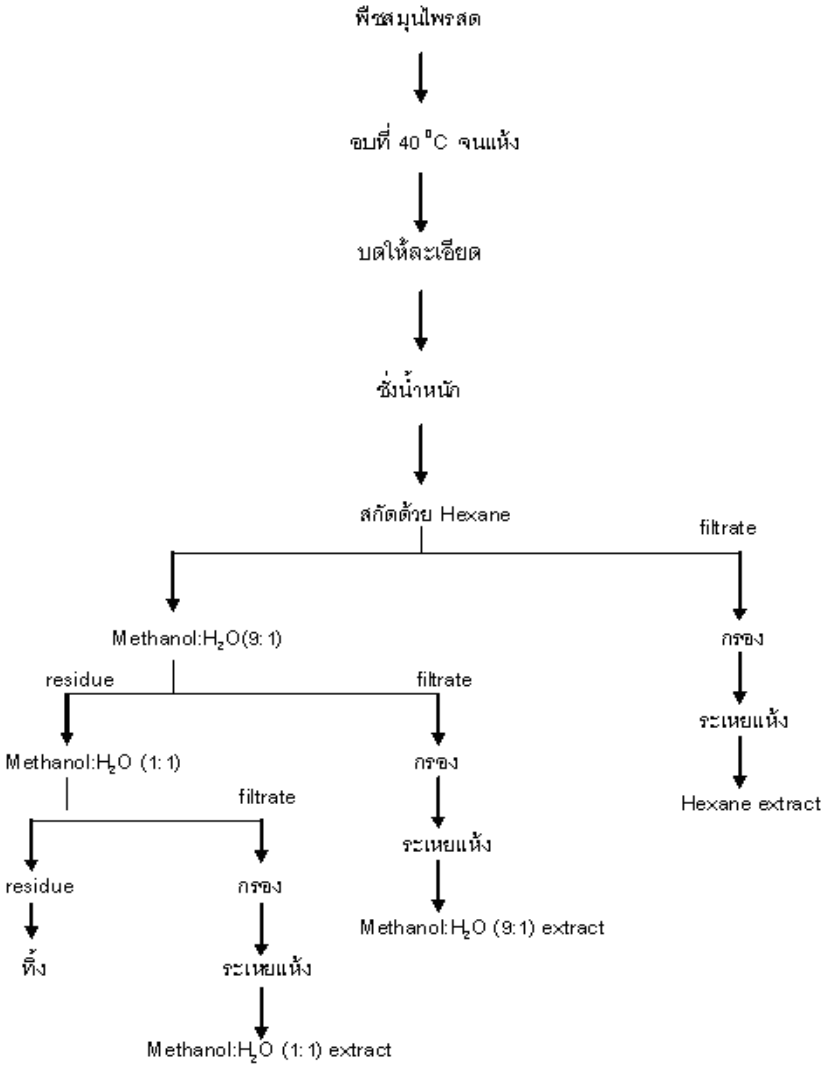
อุปกรณ์

1. เครื่องวัดการดูดกลืนแสงชนิดช่วงคลื่นสั้น (UV/Vis Spectrophotometer) รุ่น Shimadzu/UV2101
2. Quartz cell ของบริษัท Shimadzu
3. อ่างปรับอุณหภูมิ รุ่น Heto
4. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Water bath shaker) รุ่น Julabo/SW23/USA
5. เครื่องปั่นเซลล์แบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Eppendroff
6. Homogenizer
7. Analytical balance
8. Micropipetts
9. Vortex
10. Glasswares และ plasticwares
11. กรงเลี้ยงสัตว์ทดลอง

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การสกัด

ชั่งสมุนไพรส่วนต่างๆ บันทึกน้ำหนักไว้ สกัดด้วยวิธี Soxhlet extraction โดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด ตามความมีขั้ว คือ Hexane, Methanol:H_2O (9:1) และ Methanol:H_2O (1:1) ตามลำดับ จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ตามตารางที่ 3 ไปกรองด้วยระบบ Vacuum filtration และระเหยแห้งด้วยเครื่อง Rotary evaporator เก็บสารสกัดในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดังแสดงในรูปที่ 17



รูปที่ 17 ขั้นตอนในการสกัดพืช

ตารางที่ 3 รหัสสารสกัด

ตัวอย่างพืช	**สกัดด้วย Hexane**	**สกัดด้วย Methanol:H_2O (9:1)**	**สกัดด้วย Methanol:H_2O (1:1)**
กาสามปีก (ใบ)	PLH	PLM	PLMH
กาสามปีก (ต้น)	PSH	PSM	PSMH
แคบ้าน (ใบ)	SGLH	SGLM	SGLMH
แคบ้าน (ต้น)	SGSH	SGSM	SGSMH
จานเครือ (ใบ)	SSPLH	SSPLM	SSPLMH
จานเครือ (ต้น)	SSPSH	SSPSM	SSPSMH
หญ้ามดลิ่น (ส่วนเหนือดิน)	DHLH	DHLM	DHLMH
ดูกอึ่ง (ใบ)	DLLH	DLLM	DLLMH
ดูกอึ่ง (ต้น)	DLSH	DLSM	DLSMH
ตองหมอง (ใบ)	TLH	TLM	TLMH
ตองหมอง (ต้น)	TSH	TSM	TSMH
หนามหัน (ใบ)	ALH	ALM	ALMH
หนามหัน (ต้น)	ASH	ASM	ASMH
บ้าบน (ใบ)	EGLH	EGLM	EGLMH
ส้มเสี้ยว (ใบ)	BLH	BLM	BLMH
ส้มเสี้ยว (ต้น)	BSH	BSM	BSMH

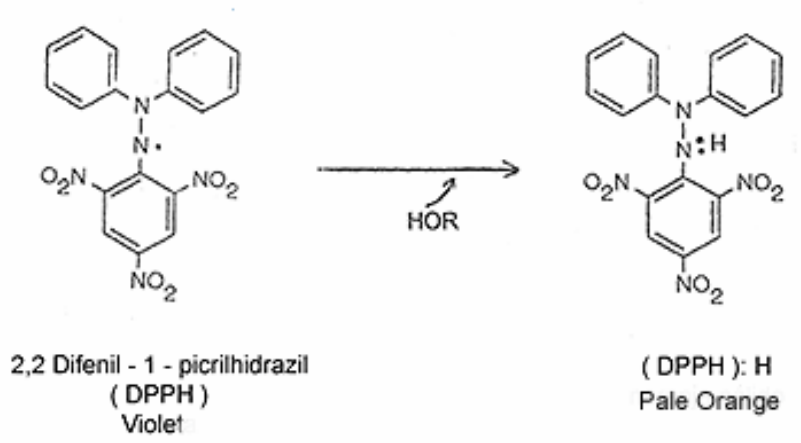
3.3.2 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH free radical scavenging

การเตรียม Stable Free Radical

เตรียมสารละลาย DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) ความเข้มข้น100 μM ใน Ethanol โดยชั่ง DPPH 1.972 mg และปรับปริมาตรให้ครบ 50 ml ใน Volumetric flask ห่อด้วย Aluminium foil เพื่อป้องกันแสง

วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน

วัดความสามารถของสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant activity) โดยอาศัยการจับ (scavenge) กับ stable radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกและให้ผลเร็ว สารที่เป็นสารต้านออกซิเดชันจะมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยจะถ่ายเทอิเล็คตรอน 1 ตัวให้ DPPH-radical (DPPH) และเปลี่ยนให้อยู่ในรูป DPPH-H ที่มีความคงตัว ซึ่ง DPPH จะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองอ่อน ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm ลดลง (รูปที่ 18)



รูปที่ 18 สมการการเกิดปฏิกิริยาของ DPPH

เตรียมสารทดสอบโดยละลายใน Ethanol ความเข้มข้น 25 mg/ml กรองสารละลายด้วย Whatmann paper No 4. (20 μm) pipette สารที่ต้องการทดสอบ 25

μl ไปใส่ใน cuvett pipette 100 μM DPPH in ethanol ใส่ลงไปในสารที่ต้องการทดสอบ ให้ได้ปริมาตรรวม 1 ml นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 515 nm (OD_{515}) ณ เวลาที่ 0 นาที และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ 515 nm (OD_{515}) ณ เวลา 5 นาที โดยใช้ ascorbic acid เป็น standard solution

การแปลผล

$$\% \text{ inhibition} = [(OD_{control} - OD_{sample}) / OD_{control}] * 100$$

$OD_{control}$ = absorbance at time 0

OD_{sample} = absorbance at time 5 min

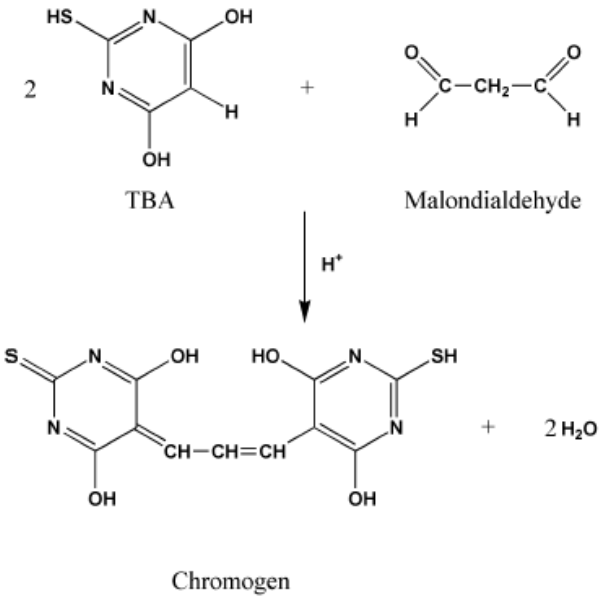
3.3.3 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี Lipid peroxidation assay (TBA assay)

การเตรียมสมองหนูบด

เตรียมสมองหนูบด (mice brain homogenate) โดยการนำสมองหนู mice (ICR) เพศผู้ที่ได้จากการทำ Cervical dislocation มาบดใน iced-cold phosphate buffer 4 mM pH 7.4 (1:19 w/v) และเก็บไว้ใน ice bath

วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเพอร์ออกซิเดชันของไขมันจะวัดปริมาณของเพอร์ออกไซด์ของไขมันที่เกิดขึ้นหลังจากปฏิกิริยาเพอร์ออกซิเดชัน โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาของ malondialdehyde (MDA) กับ Thiobarbituric acid (TBA) ดังแสดงในรูปที่ 19 เกิดเป็น Thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) ซึ่งเป็นสารที่มีสีชมพู หากสารทดสอบมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน จะทำให้เพอร์ออกไซด์ของไขมันที่เกิดจากปฏิกิริยาลดลง ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 nm ลดลง วัดผลเป็นความสามารถในการยับยั้ง % inhibition



รูปที่ 19 สมการการเกิดปฏิกิริยาของ TBA

เตรียมสารสกัดที่ต้องการทดสอบโดยละลายใน DMSO ความเข้มข้น 50 μg/ml เตรียมหลอดทดลองซึ่งมีสาร ดังนี้ diluted mice brain homogenate 0.3 ml 467 mM potassium chloride 0.6 ml 4 mM phosphate buffer pH 7.4 1.05 ml แบ่งหลอดทดลองเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 ใส่สารสกัดที่ต้องการทดสอบ 0.05 ml กลุ่มที่ 2 และ 3 ใส่ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด 0.05 ml เป็น basal control และnegative control ตามลำดับ โดยใช้ α-Tocopherol เป็น positive control และใช้ DMSO เป็น basal control นำหลอดทดลองกลุ่มที่ 2 (basal control) ไปแช่ใน ice bath โดยไม่ต้องนำไป incubate เพื่อมิให้เกิด lipid peroxidation นำหลอดทดลองกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 3 (negative control) ไป incubate ใน shaking water bath อุณหภูมิ 37°C นาน 45 นาที จากนั้นนำไปไว้ใน ice bath เติม 35% perchloric acid 0.4 ml เพื่อหยุดปฏิกิริยา lipid peroxidation นำไปปั่นที่ 3000xg นาน 10 นาที เพื่อกำจัดโปรตีนที่ตกตะกอน ดูดส่วนใสมา 1.5 ml. ใส่ในหลอดใหม่และเติม 1% thiobarbituric acid (TBA) in 50% glacial

acetic acid 0.5 ml นำไป incubate ใน water bath ที่อุณหภูมิ 100°C นาน 15 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 532 nm (OD_{532})

การแปลผล

$$\% \text{ inhibition} = [1- (OD_{sample} / OD_{control})] *100$$

$$OD_{control} = OD_{negative}-OD$$

$$OD_{sample} = OD_{sample}-OD_{basal}$$

3.4 วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ Program SPSS version 11

ใช้ Program SPSS version 11 ในการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติ One-Way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมัน 95% เพื่อเปรียบเทียบร้อยละการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในไขมัน โดยวิธี Lipid peroxidation assay และร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH free radical scavenging