บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 มะหาด

มะหาด เป็นพืชวงศ์ขนุน (วงศ์ Moraceae) มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Artocarpus lakoocha* Roxb. มีชื่อเรียกอื่นๆ ได้แก่ กาแย ตาแป ตาแปง (มลายู-นราธิวาส) มะหาด (ภาคใต้) มะหาดใบใหญ่ (ตรัง) หาดหนุน หาด (ทั่วไป) (คมกริช หาสิตะพันธุ์, 2557)

พรรณไม้ที่จัดอยู่ในวงศ์เดียวกัน ได้แก่ สาเก (*Artocarpus altilis* (Parkison) Fosberg ExT) ไสน (*Artocarpus altissimus* J. J. Sm. T) หาดส้าน (*Artocarpus chaplasha* Roxb.) ขนุน (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) กะออก (*Artocarpus* elasticus Rienw. ex Blume T) จำปาดะ (*Artocarpus integer* (Thunb.) Merr.) มารัง (*Artocarpus odoratissimus* Blanco.) ขนุนลิง (*Artocarpus rigidus* Blume.) ขนุนแอฟริกา (*Artocarpus treculianus* Elmer.) หาดรุม (*Artocarpus dadah*) หาดหนุน (*Artocarpus gomezianus*)

2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

มะหาดเป็นพันธุ์ไม้เขตร้อน มีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบทวีปเอเชียใต้ เป็นพรรณไม้ที่พบได้ตามบริเวณป่าดงดิบทางภาคตะวันออกเฉียงใต้ ภาคตะวันตกเฉียงใต้และภาคใต้ของประเทศไทย นิยมปลูกเอาไว้ใช้ประโยชน์ทุกส่วนของต้น สามารถเจริญเติบโตได้ในดินทราย ดินร่วนปนทราย ดินร่วน และดินเหนียว มีความทนทานต่อความแห้งแล้งได้ดีมาก ชอบบริเวณที่มีความชื้นสูงและแสงแดดเข้าถึงได้น้อย มักขึ้นกระจายตามป่าดิบทั่วไป มะหาดเป็นไม้ต้น มีความสูงประมาณ 15-25 เมตร ลำต้นตั้งตรง ผิวเปลือกนอกค่อนข้างขรุขระ สีน้ำตาลดำ หรือสีเทาแกมน้ำตาล บริเวณเปลือกของ ลำต้นมักมีรอยแตกและยางไหลซึมออกมาติดต้น ใบมะหาด เป็นใบเลี้ยงเดี่ยว เรียงสลับ รูปไข่ หรือรูปยาวรี ปลายแหลม โคนเว้ามน กว้าง 5-12 เซนติเมตร ยาว 8-15 เซนติเมตร ใบอ่อนมีขน ขอบใบหยัก ใบแก่ขอบมักเรียบ หูใบเรียวแหลม ดอกมะหาด ลักษณะดอกเป็นช่อกลมเล็ก ๆ สีเขียวอมเหลือง ขนาดเล็ก ออกตามง่ามใบ ดอกตัวผู้และดอกตัวเมียอยู่คนละช่อ แต่อยู่บนต้นเดียวกัน ดอกตัวเมียกลีบค่อนข้างกลมมน โคนกลีบเชื่อมติดกันเป็นหลอด ดอกตัวผู้กลีบเป็นรูปขอบขนาน ปลายกลีบหยัก ความยาว 0.5-1 เซนติเมตร ออกดอกเดือนกุมภาพันธ์ถึงเมษายน ผลมะหาดเป็นผลรวม กลมแป้นใหญ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 6-8 เซนติเมตร เปลือกนอกผิวขรุขระ เนื้อผลค่อนข้างนุ่ม เมื่อแก่สีน้ำตาลเหลือง เมล็ดแต่ละผลมี 1 เมล็ด รูปรี ติดผลเดือนมีนาคม – พฤษภาคม ดังแสดงลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมะหาดในภาพที่ 2.1 (สุดารัตน์ หอมหวน, 2559)

ภาพที่ 2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมะหาด
(อ้างอิงจาก http://www.samunpri.net สืบค้นวันที่ 26 ธันวาคม 2559)

2.1.2 สรรพคุณทางยา

- เปลือกต้น แก้ไข้ ขับพยาธิตัวตืด รักษาโรคผิวหนัง และช่วยขับปัสสาวะ
- เนื้อไม้ ขับพยาธิไส้เดือนตัวกลม พยาธิตัวแบน ขับโลหิต แก้หอบหืด
- ใบ แก้โรคบวมน้ำ
- ราก แก้พิษร้อนใน (Jagtap, et al. 2010)

2.1.3 องค์ประกอบทางเคมี

องค์ประกอบของสารที่พบในมะหาด ได้แก่ สารในกลุ่มสติลบีน (Stilbene) อนุพันธ์ของสติลบีน (Stilbene derivertive) และสารประกอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) สารดังกล่าวนี้ พบอยู่ในส่วนต่าง ๆ เช่น เปลือกต้น แก่นไม้ และเปลือกราก นอกจากนี้ยังมีรายงานการทดสอบ การออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ ได้แก่ antiglycation, antioxidant, antiviral, antimycobacterial และ anti-tyrosinase activity เป็นต้น สำหรับการออกฤทธิ์ antityrosinase activity เป็นการออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเมลานินในเม็ดสีผิว ซึ่งถ้ามีน้อยลงก็จะทำให้ผิวขาวขึ้นได้ ซึ่งพบว่าสารสกัดจากแก่นมะหาดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส สารที่พบมากในแก่นมะหาด ได้แก่ oxyresveratrol หรือ 2, 3, 4', 5'–tetrahydroxystibene

2.1.4 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

2.1.4.1 Antimycobacterial activity

สารสกัดด้วยน้ำจากมะหาด ขนาด 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว สามารถกำจัด พยาธิใบไม้ (*Stellantchasmus falcatus*) ในลำไส้หนู ระยะเวลา 24 ชั่วโมงหลังจากป้อนสารสกัด

สารสกัดด้วยน้ำจากมะหาด ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถกำจัดพยาธิตัวกลมชนิด (*Seterialabiato papillosa*) ที่พบในลำไส้วัวควายในหลอดทดลองได้ภายใน 3 ชั่วโมงหลัง จากให้สารสกัดและทำให้พยาธิตัวแบนชนิด *Fasciola gigantica*, *Paramphistomum cervi*, *Eurytrema pancreaticum* และ *Fishoederius cobboldi* เคลื่อนไหวลดลงตามลำดับในเวลา 3-12 ชั่วโมง เมื่อนำพยาธิที่ทดสอบมาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าพยาธิตัวกลม มีผนังลำตัวแตกเป็นร่องลึก ขณะที่พยาธิตัวแบนมีผนังลำตัวบวม

2.1.4.2 Antityrosinase activity

สารสกัดจากแก่นมะหาด มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ร้อยละ 92 ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (oxyresveratrol มีผลต่อการลดความเข้มของเม็ดสีเมลานินในผิวหนังโดยยับยั้งเอนไซม์ ไทโรซิเนสทำให้ผิวขาว)

2.1.4.3 Antiviral activity

สารสำคัญของมะหาด คือ oxyresveratrol มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสชนิด HSV-1 และ HSV-2 ซึ่งเป็นไวรัสที่ก่อเกิดโรคเริม ได้แก่ บริเวณผิวหนังของหนูไมซ์ ที่ระดับความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้หากใช้ oxyresveratrol ร่วมกับ acyclovir จะเสริมฤทธิ์กันทำให้มีฤทธิ์ยับยั้ง HSV-1 ได้ดีขึ้น ถ้าให้หนูกิน oxyresveratrol 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทุก ๆ 8 ชั่วโมงต่อวัน จะช่วยชะลอการเกิดรอยโรคได้หากทาครีมที่มี oxyresveratrol ร้อยละ 30 บริเวณที่ติดเชื้อวันละ 5 ครั้ง จะช่วยลดความรุนแรงของโรคและป้องกันชีวิตหนูได้ จากการศึกษาในหลอดทดลองพบว่า oxyresveratrol ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในสารสกัดมะหาดมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัส HSV-1 และ HSV-2 และไวรัสเอดส์ (HIV-1/LAI) ได้

2.2 โครมาโทกราฟี (Chromatography)

โครมาโทกราฟีเป็นวิธีการแยกองค์ประกอบต่าง ๆ ออกจากกันที่ได้ผลดีมากและนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยอาศัยความแตกต่างของการกระจายตัว (distribution of partition) ของสารตัวอย่าง (solute) ระหว่างเฟส 2 เฟส (phase) ที่ไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน คือ เฟสเคลื่อนที่ (mobile Phase) ซึ่งอาจเป็นแก๊ส (gas) หรือของเหลว (liquid) กับเฟสอีกชนิดหนึ่งซึ่งเป็นเฟสอยู่กับที่ (Stationary Phase) อาจเป็นของแข็ง (solid) หรือของเหลวที่ล้อมรอบวัสดุช่วยพยุง (supporting material) ซึ่งทำหน้าที่ในการแยกสารหรือองค์ประกอบของสารตัวอย่างออกจากกัน ขึ้นอยู่กับความจำเพาะเจาะจงของสารตัวอย่างที่มีต่อเฟสอยู่กับที่ เฟสเคลื่อนที่ทำหน้าที่ในการชะล้าง (eluent) หรือพาสารเคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่ ขณะที่เฟสเคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่องค์ประกอบหรือสารชนิดต่าง ๆ ในสารตัวอย่างจะมีการเคลื่อนที่ผ่านเข้าและออกระหว่างเฟสทั้งสองและมีการหน่วงเหนี่ยว (retention) ในเฟสอยู่กับที่ทั้งนี้ขึ้นกับคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมี (เช่นปฏิกิริยา interaction) ระหว่างตัวถูกละลาย (solute) กับเฟสเคลื่อนที่ขององค์ประกอบหรือสารแต่ละชนิดที่อยู่ในสารตัวอย่างที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเฟสทั้งสอง จากความแตกต่างนี้ทำให้สารแต่ละชนิดเคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่ในอัตราที่แตกต่างกัน ทำให้มีการแยกเกิดขึ้น ระยะเวลาที่สารแต่ละชนิดใช้ในการเคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่ (retention time) จะแสดงออกมาในรูปของตำแหน่งพีค (peck) หรือจุด (spot) บนโครมาโทแกรม (chromatogram) สามารถนำมาใช้ประโยชน์ด้านการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ (qualitative and quantitative analysis) ได้

คุณสมบัติของการแยกการด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี

1. สารต่างชนิดกันมีความสามารถในการละลายในตัวทำละลายชนิดเดียวกันได้ดีและสารที่ละลายได้ดีจะเคลื่อนที่ไปได้เร็ว
2. สารต่างชนิดกันถูกดูดซับโดยตัวดูดซับได้ไม่เท่ากันสารที่ถูกดูดซับได้ดีจะเคลื่อนที่ได้ช้า
3. สารที่ละลายในตัวทำละลายได้ดี และถูกดูดซับน้อยจะเคลื่อนที่ได้เร็วไปได้ไกล
4. สารที่ละลายในตัวทำละลายได้น้อยและถูกดูดซับมากจะเคลื่อนที่ช้าไปได้ไม่ไกล

ประโยชน์ของการทำโครมาโทกราฟี

1. ใช้แยกสารแต่ละชนิดออกจากสารผสม
2. ตรวจความสม่ำเสมอ (homogeneity) ของสารตัวอย่าง
3. ทำสารให้บริสุทธิ์ (purification)
4. ตรวจเอกลักษณ์ของสาร
5. ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ (quantitative analysis)
6. ตรวจหาสารปนเปื้อน (impurity)

2.2.1 คอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatograpy or CC)

เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการแยกสารให้ได้ปริมาณมาก โดยเฟสเคลื่อนที่จะทำหน้าที่พาสารเคลื่อนที่ไปบนเฟสอยู่กับที่ ซึ่งบรรจุในหลอดแก้วปลายเปิด (open column) จึงเกิดการกระจายตัวของสารระหว่างสองเฟสนี้ โดยใช้กลไกแอดซอฟชันโครมาโทกราฟี (Adsorption chromatography) พาร์ทิชันโครมาโทกราฟี (Partition Chromatography) ไอออนเอ็กซ์เชนจ์โครมาโทกราฟี (Ion exchange chromatography)

2.2.1.1 การบรรจุตัวดูดซับในคอลัมน์

ขนาดของคอลัมน์ที่ใช้ต้องสัมพันธ์กับปริมาณสารที่จะแยก ตัวดูดซับที่ใช้ควรมีปริมาณ 25-30 เท่าของปริมาณสารตัวอย่าง ถ้าเป็นสารผสมที่ซับซ้อนอาจใช้ 50-200 เท่าของปริมาณสารตัวอย่าง อัตราส่วนของความยาวต่อเส้นผ่าศูนย์กลางของคอลัมน์ควรเป็น 8 : 1 ก่อนบรรจุสารตัวอย่างในคอลัมน์ อุดปลายล่างของคอลัมน์ด้วยใยแก้วหรือสำลี จากนั้นใส่ทรายที่บริสุทธิ์และละเอียดลงบนสำลี เพื่อปรับระดับให้เรียบ ชั้นของทรายใช้เป็นฐานเพื่อรองรับตัวดูดซับ และป้องกันมิให้ตัวดูดซับไหลลงไปอุดปลายของคอลัมน์ ขั้นต่อไปจึงใส่ตัวดูดซับลงในคอลัมน์โดย 2 วิธีต่อไปนี้ (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2550)

1) วิธีบรรจุแบบเปียก (Wet pack or Slurry method)

บรรจุตัวทำละลายลงในคอลัมน์ ประมาณหนึ่งในสามส่วนของคอลัมน์ ใส่ตัวทำละลายในตัวดูดซับที่ผ่านกรวยลงในคอลัมน์พร้อม ๆ กับเปิดให้ตัวทำละลายไหลออกและใช้สายยางเคาะด้านข้างของคอลัมน์ การไหลของตัวทำละลายและการเคาะ จะช่วยให้ตัวดูดซับอัดแน่น ทั้งยังป้องกันการเกิดฟองอากาศ โดยคอลัมน์ที่บรรจุตัวดูดซับเรียบร้อยแล้ว ควรมีตัวทำละลายเหลืออยู่เหนือชั้นทรายเพื่อป้องกันมิให้ตัวดูดซับแห้ง ถ้าตัวดูดซับแห้งมันจะหดตัวจากผนังของคอลัมน์ เกิด

ช่องว่างให้อากาศเข้าไปแทรกได้ และทำให้เกิดรอยแยกในชั้นของตัวดูดซับ จะมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการแยกต่ำลง

2) วิธีบรรจุแบบแห้ง (Dry pack method)

ใส่ตัวทำละลายในคอลัมน์ประมาณ 3 ใน 4 ส่วนของคอลัมน์ค่อย ๆ เทตัวดูดซับลงไปในคอลัมน์ทีละน้อยอย่างต่อเนื่องพร้อมกับปล่อยตัวทำละลายให้ไหลออกช้า ๆ ใช้สายยางเคาะด้านข้างคอลัมน์ขณะที่ตัวดูดซับผ่านตัวทำละลายลงไป เพื่อให้ตัวดูดซับอัดแน่นและไม่มีฟองอากาศ หลังจากใส่ตัวดูดซับลงไปหมดแล้วเกลี่ยผิวบนของตัวดูดซับให้เรียบปิดทับด้วยทรายละเอียดอีกชั้นหนึ่ง ควรมีตัวทำละลายเหลืออยู่ด้านบนของทรายเพื่อป้องกันไม่ให้คอลัมน์แห้งก่อนใส่สารตัวอย่าง

การเตรียมคอลัมน์ทำได้โดยเทตัวทำละลายลงในคอลัมน์ ซึ่งปลายคอลัมน์นี้อุดด้วยสำลีที่บริเวณเหนือก๊อกปิดเปิด (stop cock) จากนั้นใส่ทรายละเอียดและตัวทำละลายอินทรีย์ ปรับผิวหน้าทรายให้เรียบ จากนั้นเปิดก๊อกให้ระบบตัวทำละลายไหลผ่านเพื่อไล่ฟองอากาศออก จากนั้นเทแอดซอร์เบนท์ (adsorbate) ที่อยู่ในตัวทำละลายลงในคอลัมน์ หลังจากที่แอดซอร์เบนท์นอนก้นแล้วให้ใส่ทราย เพื่อจะหลีกเลี่ยงมิให้แอดซอร์เบนท์ถูกรบกวนในขณะที่เติมตัวทำละลายลงไปยังคอลัมน์ ปล่อยตัวทำละลายที่อยู่เหนือระดับแอดซอร์เบนท์ออกไปจนระดับตัวทำละลายเหลืออยู่เหนือแอดซอร์เบนท์ประมาณ 1 ซม. ระดับของตัวทำละลายต้องไม่ต่ำกว่าระดับบนของแอดซอร์เบนท์ ไม่เช่นนั้นแอดซอร์เบนท์จะแตก (crack) ทำให้ประสิทธิภาพการแยกไม่ดี เนื่องจากตัวทำละลายจะไหลผ่านรอยแตกมากกว่าอนุภาคแอดซอร์เบนท์ในการเตรียมแอดซอร์เบนท์ให้กระจายตัวในตัวทำละลายก่อนที่จะเทลงในคอลัมน์อาจทำได้โดยเทผงของแอดซอร์เบนท์ลงในภาชนะที่บรรจุตัวทำละลาย คนหรือแกว่งภาชนะให้เข้ากันเพื่อช่วยกำจัดฟองอากาศหรืออาจใช้ผงแอดซอร์เบนท์แห้งบรรจุลงในคอลัมน์ แล้วให้ตัวทำละลายไหลผ่านโดยเปิดก๊อก จนกระทั่งระดับตัวทำละลายลดลงมาอยู่เหนือแอดซอร์เบนท์ 1 เซนติเมตร ปริมาณของแอดซอร์เบนท์ที่ใช้ขึ้นกับปริมาณสารที่ต้องการแยก โดยทั่วไปใช้อัตราส่วนของแอดซอร์เบนท์ : สารตัวอย่าง 30 : 1 และอัตราส่วนของความยาวของคอลัมน์ : เส้นผ่าศูนย์กลางของคอลัมน์ 10–15 : 1

เมื่อเตรียมคอลัมน์เรียบร้อยแล้วให้ใส่สารละลายตัวอย่าง ซึ่งละลายในสารละลายอินทรีย์ที่มีขั้วน้อยที่สุดที่สามารถละลายสารตัวอย่างได้และต้องมีปริมาตรน้อย ๆ ปล่อยให้สารละลายตัวอย่างค่อยๆ เคลื่อนผ่านชั้นทรายและแอดซอร์เบนท์ โดยค่อย ๆ เปิดก๊อกเติมตัวทำละลายอีกเล็กน้อยเพื่อล้างสารตัวอย่าง จากนั้นจึงค่อย ๆ เพิ่มปริมาณตัวทำละลายมากขึ้นเพื่อให้เกิดการแยกสารตามกลไกของชนิดแอดซอร์เบนท์ เก็บสารละลายที่แยกออกมาจากคอลัมน์เป็นส่วน ๆ ในภาชนะที่เหมาะสม สำหรับตัวทำละลายตัวอย่างที่มีสีอาจสังเกตได้ด้วยตาเปล่า แต่ในกรณีที่สารไม่มีสีอาจตรวจหาได้ด้วยตาถ้าเรืองสาร (fluoresce) ได้เช่น ควินิดีน (quinidine) เป็นต้น

กลไกที่ใช้แยกองค์ประกอบสำคัญจากพืชสมุนไพรด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีส่วนใหญ่จะเป็นการดูดซับ ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ ตัวทำละลายไม่มีขั้ว (non-polar solvent) เช่น ปิโตรเลียมอีเทอร์ เบนซิน โทลูอีน และคลอโรฟอร์ม เป็นต้น และสามารถใช้สารละลายเดี่ยว ๆ ในการชะสารสำคัญออกจากคอลัมน์ อัตราการเลื่อนที่ของสารในคอลัมน์สามารถเพิ่มได้โดยการเติม

ตัวทำละลายตัวที่สองไปยังเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งตัวทำละลายตัวที่สอง มักจะมีขั้วมากกว่าตัวทำละลายตัวแรก

2.2.1.2 การบรรจุคอลัมน์

วิธีการบรรจุคอลัมน์ที่นิยม ได้แก่ การนำวัฏภาคนิ่งมาเตรียมเป็นสารแขวนลอยที่มีลักษณะข้นเหลว ในตัวทำละลายที่จะใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ตัวแรกก่อนบรรจุคอลัมน์ ควรหาภาชนะมารองรับใต้คอลัมน์แก้วเพื่อป้องกันการหกลงบนโต๊ะปฏิบัติการหากเกิดการรั่วไหลระหว่างการบรรจุคอลัมน์ แล้วค่อย ๆ เทลงในคอลัมน์ที่มีสำลีอุดอยู่ที่ปลายด้านในโดยระวังไม่ให้ตัวทำละลายไหลออกไปจนแห้ง ควรเคาะคอลัมน์เบา ๆ เพื่อไล่ฟองอากาศ หรือใช้แท่งแก้วคนกวนเบา ๆ เพื่อไล่ฟองอากาศออกให้หมด ปล่อยให้วัฏภาคนิ่งนอนก้น (โดยทำจนได้ความสูงของตัวดูดซับเมื่อนอนก้นแล้วตามต้องการ) แล้วจึงเปิดให้ตัวทำละลายไหลออกไปบ้างจนมีระดับอยู่เหนือวัฏภาคนิ่งเล็กน้อย (อาจเติมผงทรายละเอียดเล็กน้อยลงบนผิวหน้าของวัฏภาคนิ่ง เพื่อรักษาผิวหน้าของวัฏภาคนิ่งให้เรียบอยู่เสมอ) แล้วเปิดให้ตัวทำละลายไหลออกไปจนเหลือเพียงปริ่มพอดี ควรพยายามทำให้ผิวหน้าของตัวดูดซับหรือวัฏภาคนิ่งเรียบ (อาจใช้แท่งแก้วช่วยคนเล็กน้อยบริเวณด้านบนของคอลัมน์) เพื่อการแยกจะได้แถบสารที่อยู่ในแนวตั้งฉากขวางคอลัมน์ เมื่อบรรจุสารตัวอย่างลงคอลัมน์แล้วเปิดให้ไหลลงจนผิวหน้าเกือบแห้ง แล้วชะล้างคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายเพียงเล็กน้อย (ใช้ปิเปตหรือหลอดหยดเติมลงด้านบนเบา ๆ หรือชะไปด้านในของผิวแก้วของคอลัมน์) ทำจนแน่ใจว่าสารตัวอย่างถูกล้างลงสู่วัฏภาคนิ่งหมดแล้วจึงค่อยเติมตัวทำละลายได้มาก ๆ ในการเติมตัวทำละลายนั้นอาจจัดตั้งกรวยแยกไว้ด้านบนคอลัมน์เพื่อเปิดให้ตัวทำละลายไหลลงคอลัมน์ ซึ่งชั้นทรายจะป้องกันไม่ให้ตัวดูดซับแห้ง ถ้าตัวดูดซับแห้งมันจะหดตัวจากผนังของคอลัมน์เกิดช่องว่างให้อากาศเข้าไปแทรกได้ และทำให้เกิดรอยแตกแยกในชั้นของตัวดูดซับ จะมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการแยกต่ำลง

2.2.1.3 การใส่สารตัวอย่างในคอลัมน์

สารตัวอย่างที่จะนำเข้าสู่คอลัมน์ควรอยู่ในรูปสารละลายเข้มข้นและมีปริมาตรน้อยก่อนจะใส่สารตัวอย่าง และไขตัวทำละลายที่เหลืออยู่บนชั้นทรายออกจนปริ่มชั้นทราย ใช้ปิเปตดูดสารตัวอย่างทั้งหมดใส่ที่ด้านบนของคอลัมน์ แล้วปล่อยให้ไหลลงไปจนปริ่มชั้นทรายอีกครั้งหนึ่ง ใช้ปิเปตที่สะอาด และแห้งดูดตัวทำละลายที่ใช้ชะสารลงไปทีละน้อย เพื่อผลักดันให้สารตัวอย่างผ่านเข้าไปในตัวดูดซับ เมื่อตัวทำละลายไหลลงจนปริ่มชั้นทรายแล้วจึงใส่ตัวชะเพิ่มเติมอีกทีละน้อย สังเกตสีของตัวทำละลายที่อยู่เหนือทรายจะค่อย ๆ จางลงทำเช่นนี้จนกระทั่งตัวทำละลายใสไม่มีสี แสดงว่าสารตัวอย่างทั้งหมดได้ถูกนำเข้าสู่ตัวดูดซับแล้วจากนั้น จึงใส่ตัวทำละลายในปริมาณมากลงไป

2.2.1.4 ขบวนการชะสาร (elution process)

หลักของการเลือกตัวทำละลายที่ใช้เป็นตัวชะ (eluent) มีดังนี้

1. ตัวทำละลายที่ใช้ในโครมาโทกราฟีควรเป็นตัวทำละลายบริสุทธิ์ (reagent grade) ถ้าเป็นตัวทำละลายแบบ commercial grade ควรทำการกลั่นใหม่ก่อนนำไปใช้

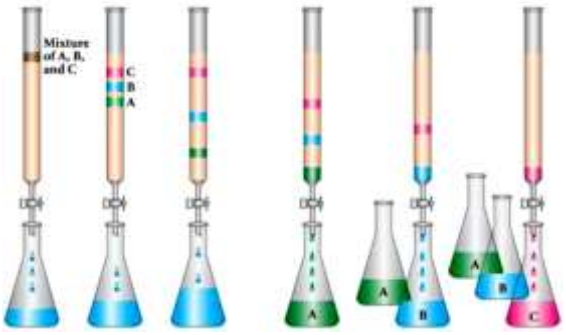
2. ควรเลือกตัวทำละลายที่ให้ผลการแยกที่ดีบนแผ่น TLC

3. ตัวชะสารควรเป็นตัวทำละลายเดี่ยวหรือตัวทำละลายผสม และหลีกเลี่ยงการเปลี่ยนตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วต่างกันอย่างกะทันหัน เช่น การเปลี่ยนจาก hexane

เป็น ether ทันทีในระหว่างชะสารเพราะจะเกิดความร้อนขึ้นและความร้อนที่เกิดเพียงพอที่จะทำให้ ether เดือด และเกิดฟองอากาศขึ้นในคอลัมน์ อนึ่งอัตราการไหลของตัวทำละลายไม่ควรจะเร็วเกินไปจะทำให้สารตัวอย่างไม่มีเวลาเพียงพอที่จะอยู่ในสมดุลกับตัวดูดซับขณะที่มันผ่านตัวดูดซับ แต่ถ้าอัตราการไหลของตัวทำละลายช้าเกินไปจะเกิดปัญหาการแพร่ของแถบของสารไปได้ทุกทิศทาง ดังนั้น ไม่ว่าจะเป็นกรณีไหนใน 2 กรณีดังกล่าว จะทำให้การแยกไม่ได้ผลและเพื่อป้องกันการแพร่ของแถบไม่ควรตั้งคอลัมน์ทิ้งไว้ข้ามคืน

2.2.1.5 ตัวทำละลายที่พัฒนาแถบ (Developing solvent) หรือ ตัวชะ (eluent)

การเลือกตัวทำละลายที่ใช้ชะสาร คือ ตัวทำละลายอาจถูกดูดซับบนตัวดูดซับเช่นเดียวกับสาร จึงเกิดการแข่งขันกับสารในการแย่งตำแหน่งดูดซับ ถ้าตัวทำละลายมีสภาพขั้วสูงกว่าสารที่ต้องการแยก ตัวทำละลายนั้นสามารถไล่หรือขยับสารออกจากตำแหน่งที่มันถูกดูดซับอยู่และถูกตัวทำละลายพาเคลื่อนที่ไปอย่างรวดเร็ว ดังนั้นตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วสูงจึงไม่เพียงแต่ละลายสารยังสามารถไล่ที่และพาสารเคลื่อนที่ไปด้วยกัน ทำให้การแยกสารไม่ได้ผล ส่วนตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วต่ำ และถ้าสารที่จะแยกทั้งหมดมีสภาพขั้วสูงกว่าตัวทำละลาย สารเหล่านี้จะถูกดูดซับไว้แน่นและเคลื่อนที่ช้าหรือไม่เคลื่อนที่เลย เช่น การแยกสารผสม A, B และ C เมื่อทำการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบการชะจะสามารถพาสารเคลื่อนที่ไปได้แตกต่างกัน โดยสารที่ละลายได้ดีจะออกมาก่อนและสารที่ดูดซับได้น้อยจะออกมาได้หลังสุด ดังแสดงในภาพที่ 2.2 จะพบว่าสาร A จะถูกดูดซับได้น้อย จึงแยกออกมาก่อน ในขณะที่สาร C ถูกดูดซับได้มากจึงแยกออกมาได้หลังสุด



ภาพที่ 2.2 แสดงการแยกสารด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี
(Fox & White sell. 2004)

ความสามารถของตัวทำละลายในการชะสารเรียงลำดับจากขั้วต่ำไปขั้วสูง Hexane > Petroleum ether > Cyclohexane > Toluene > Benzene > Dichloromethane > Chloroform > Diethyl ether > Ethyl acetate > Acetone > Propanol > Ethanol > Methanol > น้ำ

2.2.1.6 การรองรับสารที่ถูกชะออกและการแยกสาร

การตรวจหาตำแหน่งของแถบสารเพื่อรองรับสารเมื่อออกจากคอลัมน์มีวิธีการดังนี้

1) กรณีที่สารประกอบมีสี สามารถรองรับสารได้เมื่อเห็นแถบสีเคลื่อนลงมา

2) กรณีที่สารไม่มีสี หากสารเหล่านั้นเกิดฟลูออเรสเซนส์กับรังสีอัลตรา-ไวโอเลต เราสามารถมองเห็นแถบได้ภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตในที่มืด

3) กรณีที่สารประกอบไม่มีสีและไม่เกิดฟลูออเรสเซนส์ การชะสารควรใช้กลุ่มตัวทำละลายหรืออนุกรมของตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วเพิ่มขึ้นทีละน้อย โดยเริ่มจากตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วต่ำสุด อาจมีแถบหนึ่งเคลื่อนลงมาก่อนและถูกชะออกจากคอลัมน์ จากนั้นให้เปลี่ยนเป็นตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วเพิ่มจากเดิมเล็กน้อยและค่อย ๆ เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ สารจะทยอยถูกชะออกทีละตัว ในกรณีที่ใช้การเปลี่ยนสภาพขั้วของตัวทำละลายเป็นแบบก้าวกระโดดจากต่ำไปสูงทันที จะทำให้สารทั้งหมดถูกชะออกพร้อมกัน การรองรับสารละลายที่ออกมาให้รองรับเป็นส่วน ๆ แต่ละส่วนมีปริมาตรเท่ากัน นำแต่ละส่วนมาตรวจสอบด้วยเทคนิค Thin layer chromatography ส่วนใดที่พิสูจน์ด้วย TLC แล้วเป็นสารตัวเดียวกัน ให้เทรวมกันและแยกสารออก โดยระเหยตัวทำละลายออกไป

2.2.2 ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin Layer Chromatography; TLC)

เทคนิคการวิเคราะห์องค์ประกอบสารที่รวดเร็ว สะดวก และราคาไม่แพง นิยมใช้ในการตรวจการดำเนินไปของปฏิกิริยาเคมี ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารระหว่างกระบวนการแยกสารในขั้นตอนต่าง ๆ ใช้ในการยืนยันชนิดของสาร และสามารถตรวจหาจำนวนองค์ประกอบในของผสม หลักการของ TLC นั้น คล้ายคลึงกับคอลัมน์โครมาโทกราฟี จะต่างกันก็เพียงแต่ในกรณีของ TLC วัฏภาคนิ่งจะถูกเคลือบติดไว้ที่แผ่นกระจก และแผ่นอลูมิเนียม โดยสารจะถูกแต้มไว้ที่ใกล้ ๆ ปลายด้านหนึ่งของแผ่นโดยใช้หลอดแคปปิลลารี จากนั้นนำแผ่นดังกล่าวไปวางลงในภาชนะที่ใส่วัฏภาคเคลื่อนที่ไว้ตื้น ๆ เมื่อตัวทำละลายถูกดูดซึมขึ้นไปตามตัวดูดซับด้วย capillary action ก็จะพาสารตัวอย่างขึ้นไปด้วย จึงเกิดการแยกของสารเกิดขึ้นด้วยหลักการเดียวกับคอลัมน์โครมาโทกราฟี ตัวอย่างเช่น หากใช้ซิลิกาเป็นวัฏภาคนิ่ง และใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ สารที่มีขั้วน้อยจะละลายได้ดีในวัฏภาคเคลื่อนที่แต่ถูกดูดซับด้วยวัฏภาคนิ่งได้น้อยจึงเคลื่อนที่ไปได้ดีด้วยระยะที่มากกว่าสารที่มีขั้วสูงซึ่งละลายในวัฏภาคจะเคลื่อนที่ได้น้อยแต่ดูดซับบนวัฏภาคนิ่งได้ดี เนื่องจากใช้สารปริมาณน้อยมากในการแยก ซึ่งเทคนิค TLC จึงเหมาะสมเป็นเครื่องมือวิเคราะห์ มากกว่าที่จะเป็นเครื่องมือในการแยกสารเพื่อเก็บแต่ละองค์ประกอบดังในกรณีของคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งประโยชน์ของ TLC นอกเหนือจากที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว ยังรวมถึงการใช้ในการทดลองหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมก่อนการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี รวมถึงการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของสารที่ออกมาจากคอลัมน์ด้วย ซึ่งตัวดูดซับที่นิยมใช้ในเทคนิค TLC ได้แก่ อะลูมินา และซิลิกาเจล เช่นเดียวกับที่ใช้ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี ดังนั้นระบบตัวทำละลายรวมถึงความเร็วช้าของการเคลื่อนที่ของสารมีขั้วและไม่มีขั้วจึงมีแนวโน้มทำนองเดียวกันกับที่กล่าวไว้ในคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยทั่วไปแล้วนิยมใช้ตัวดูดซับเป็น

อะลูมินากับสารกลุ่มที่ไม่มีขั้วหรือมีขั้วน้อย ๆ เช่น ไฮโดรคาร์บอน อีเทอร์ และนิยมใช้ซิลิกาเจลกับสารที่ค่อนข้างมีขั้ว เช่น แอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ เป็นต้น

2.2.2.1 ขั้นตอนการทำ TLC

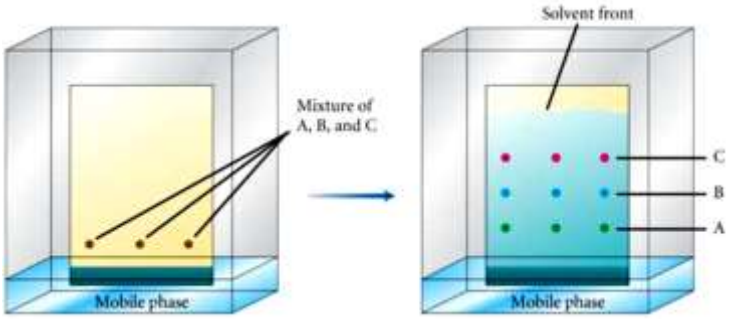
การทำ TLC ต้องเริ่มด้วยการเตรียมแผ่นที่มีวัฏภาคนิ่งเคลือบอยู่ โดยทั่วไปสามารถทำได้เองโดยจุ่มแผ่นกระจก ที่สะอาดลงในสารแขวนลอยที่ข้นเหลวของสารที่เป็นวัฏภาคนิ่งในตัวทำละลายที่เหมาะสม ยกขึ้นมาให้ได้การเคลือบที่สม่ำเสมอแล้วทิ้งให้แห้ง ในปัจจุบันมีการทำแผ่นทินเลเยอร์สำเร็จรูป ซึ่งเคลือบวัฏภาคนิ่งไว้บนแผ่นอะลูมิเนียมบาง ๆ โดยนิยมผสมสารเรืองแสง เช่น ซิงค์ซัลไฟด์ ไว้ด้วย ซึ่งจะทำให้สามารถสังเกตตำแหน่งของสารโดยใช้แสง UV ได้สะดวก

2.2.2.2 การหาระบบตัวทำละลาย

การหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสาร ด้วยเทคนิค TLC โดยนำตัวทำละลายมาผสมกันในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน แล้วนำไปใส่ใน chamber ปิดฝาทิ้งไว้ให้อิ่มตัว ซึ่งทำได้โดยแบ่งสารสกัด ออกมาเพียงเล็กน้อยใส่ใน vial แล้วเติมตัวทำละลายลงไป จากนั้นทำการ spot สารลงบนแผ่น TLC ที่เตรียมไว้ แล้วนำแผ่น TLC ไปจุ่มลงใน chamber ที่เตรียมไว้ปิดฝาแล้วปล่อยให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปจนถึงระดับที่กำหนดไว้ นำแผ่น TLC ออกมารอจนแห้งแล้วนำไปทดสอบด้วยแหล่งกำเนิดแสงยูวี ควรเตรียมสารตัวอย่างให้อยู่ในรูปสารละลายที่มีความเข้มข้นประมาณ 1% แม้ว่าตัวอย่างนั้นจะเป็นของเหลวอยู่แล้วก็ตาม แล้วแต้ม (spotting) ลงบนแผ่นทินเลเยอร์ ให้ห่างจากปลายด้านล่างขึ้นมาประมาณ 0.5-1 cm นำแผ่นดังกล่าวไปจุ่มลงในบีกเกอร์ ที่มีตัวทำละลายใส่ไว้เพียงเล็กน้อยโดยให้ระดับตัวทำละลายสูงไม่เกินระดับที่แต้มสารตัวอย่าง (อย่าให้ท่วมจุดสารตัวอย่าง) และอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย คอยสังเกตรอยเปียกของตัวทำละลายที่ซึมขึ้นด้านบนของแผ่น TLC ขอบของรอยเปียกของตัวทำละลายนี้เรียกว่า solvent front เมื่อมาเกือบถึงปลายด้านบนของแผ่น แล้วรีบเอาแผ่นออก จากนั้นใช้ดินสอขีดบ่งรอย solvent front ไว้ เพื่อใช้ในการคำนวณค่า R_f (Rate of flow) ซึ่งเป็นค่าเฉพาะตัวของสาร ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลายและตัวดูดซับ ดังนั้นการบอกค่า R_f ของสารแต่ละชนิดจึงต้องบอกชนิดของตัวทำละลาย และตัวดูดซับเสมอค่า R_f สามารถคำนวณได้จากสูตร ดังแสดงในสมการที่ 2.1

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคมีเคลื่อนที่ } (\text{cm})}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ } (\text{cm})} \quad \text{----------} \quad 2.1$$

สารต่างชนิดกันจะมีค่า R_f แตกต่างกัน เพราะฉะนั้นเราจึงสามารถใช้ค่า R_f มาใช้ในการวิเคราะห์ชนิดของสารได้ กล่าวคือ ถ้าสารใดมีความสามารถในการละลายสูงจะมีค่า R_f มาก เนื่องจากตัวทำละลายจะเคลื่อนที่เร็วกว่าสารที่จะแยก ค่า $R_f < 1$ เสมอ ถ้าใช้ตัวทำละลายและตัวดูดซับชนิดเดียวกันปรากฏว่ามีค่า R_f เท่ากัน อาจสันนิษฐานได้ว่า สารดังกล่าวเป็นสารชนิดเดียวกัน ดังแสดงในภาพที่ 2.3



ภาพที่ 2.3 Chromatoplate TLC tank
(Fox & White sell. 2004)

วิธีการหาตำแหน่งการเคลื่อนที่ของสารที่ไม่มีสีก็คือ การใช้แผ่น TLC สำเร็จรูป ที่มีการผสม fluorescent indicator อยู่กับซิลิกาเจลที่ฉาบไว้บาง ๆ ซึ่งจะทำให้แผ่น TLC เรืองแสงได้เมื่อส่องด้วยแสง UV ที่ความยาวคลื่นเหมาะสม เมื่อทำการแยกแล้วให้นำแผ่น TLC มาส่องกับแสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm (หมายเหตุ: แสง UV เป็นอันตรายต่อดวงตาและผิวหนัง จึงควรใช้เวลาสัมผัสกับแสง UV ให้สั้นที่สุด) หากสารที่จะวิเคราะห์มีสมบัติเป็นตัวเควนช์ (quencher) จะเห็นจุดสารดูดกลืนแสง UV เป็นสีม่วง สารที่มีสมบัติดังกล่าวได้แก่ สารที่มีโครโมฟอร์ (chromophore) เช่น double bond หรือ aromatic ring จึงจะใช้การตรวจสอบแบบนี้ได้ แผ่น TLC สำเร็จรูปดังกล่าวนี้สามารถนำมาใช้ตรวจสอบการดำเนินไปของปฏิกิริยาเคมี รวมทั้งตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารในกระบวนการแยกได้อย่างรวดเร็ว แต่อย่างไรก็ตาม แผ่น TLC สำเร็จรูปดังกล่าวมีราคาค่อนข้างแพงจึงควรใช้อย่างประหยัด (รัชนี ตัณฑะพานิชกุล, 2550)

2.2.3 รีเอเจนท์ที่ใช้สเปรย์บนโครมาโทแกรมเพื่อทดสอบกลุ่มสาร

1. ทดสอบสารประเภทฟลาโวนอยด์ ด้วยสารละลาย 1% อะลูมิเนียมคลอไรด์ ในเอทานอล สารจะปรากฏสีเหลืองเรืองแสงในแสง UV ความยาวช่วงคลื่น 360 nm

2. ทดสอบสารประเภทฟีนอล น้ำตาล และเทอร์พีน ด้วยสารละลาย *p*-anisaldehyde sulfuric acid และนำแผ่นโครมาโทแกรม ไปให้ความร้อน จนเห็นสีชัดเจน ซึ่งจะเห็นจุดสารบนแผ่น TLC เป็นสีม่วง น้ำ เงิน แดง เทา และเขียว

3. ทดสอบสารประเภทอัลคาลอยด์ ด้วยสารละลายดราเจนดอร์ฟ (Dragendoff) ซึ่งจะเห็นจุดสารบนแผ่น TLC เป็นสีส้มถึงสีเหลือง (Sherma, et al. 1991)

2.3 การสกัด (Extraction)

การสกัดเป็นกระบวนการที่ใช้แยกสารที่ต้องการแยกออกจากของผสมหรือสารละลาย โดยใช้ตัวทำละลาย และวิธีการที่เหมาะสม ถ้าตัวถูกละลายที่ต้องการสกัดอยู่ในสารตัวอย่างที่เป็นของแข็งสามารถทำการสกัดด้วยตัวทำละลายของเหลวได้ ซึ่งเรียกว่าวิธีการสกัดนี้ว่า Solid-liquid extraction การสกัดจะได้ผลดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับการละลายของตัวถูกละลายในตัวสกัด หรือตัวทำ

ละลายของเหลว และระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดจะขึ้นอยู่กับลักษณะของตัวถูกละลายที่อยู่ในสารตัวอย่างของแข็ง ถ้าตัวถูกละลายเพียงดูดซับที่ผิวของของแข็ง การสกัดก็จะใช้เวลาน้อย แต่ถ้าตัวถูกละลายอยู่ภายในโครงร่างของของแข็งก็ต้องใช้เวลามากกว่า และถ้าการแพร่ของตัวทำละลายสู่ภายในโครงร่างของของแข็งเกิดได้ช้ามากจำเป็นต้องบดของแข็งให้มีขนาดเล็กลงก่อนทำการสกัดเพื่อช่วยลดระยะเวลาในการสกัดให้สั้นลง การสกัดของแข็งหรือการทำ Solid-liquid extraction สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับการสกัดสารทางชีววิทยา สารอินทรีย์ ตลอดจนเกลือของสารอนินทรีย์ วิธีการสกัดของแข็งสามารถทำได้ 2 วิธี คือ

1) การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction)

การสกัดด้วยตัวทำละลายเป็นวิธีหนึ่งที่มีประโยชน์มากในเคมีอินทรีย์ สำหรับแยกสารและทำสารให้บริสุทธิ์ เช่น การสกัดแยกสารประกอบผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ การสกัดแยกสารที่เป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการออกจากของผสมในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ต่าง ๆ หลักการของการสกัดจะเป็นการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมละลายสารที่ต้องการออกมาจากของผสม

ถ้าตัวถูกละลายอยู่ในสารตัวอย่างของแข็งเพียงแต่ดูดซับที่ผิว และการละลายของตัวถูกละลายในตัวสกัดมีค่าสูง การสกัดสามารถทำได้โดยเติมตัวสกัด หรือตัวทำละลายลงไปในสารตัวอย่างภายในบีกเกอร์ หรือขวดรูปชมพู่ จากนั้นคนด้วยเครื่องคน (magnetic stirrer) หรือใช้เครื่องเขย่า (Shaker) หรืออาจใช้วิธีการแช่ (Maceration) ในตัวทำละลาย ที่อุณหภูมิห้อง จนกระทั่งตัวถูกละลายละลายในตัวสกัดหมดแล้ว ให้ใช้วิธีการกรองเอาของแข็งออกจากสารละลายจะสามารถแยกตัวถูกละลายออกมาจากสารตัวอย่างของแข็งได้

2) การสกัดด้วยเครื่องซอกเล็ต (Soxhlet extractor)

ถ้าตัวถูกละลายเป็นสารประกอบอินทรีย์ หรือสารทางชีววิทยา ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีการละลายในตัวสกัดต่ำหรือการสกัดจะสมบูรณ์ได้ต้องใช้เวลานาน จำเป็นตังใช้เทคนิคการสกัดด้วยเครื่องซอกเล็ต โดยบรรจุของแข็งที่ต้องการสกัดลงในถุงผ้า แล้วใส่ลงในหลอดแก้ว ตัวสกัดคือตัวทำละลายอินทรีย์ที่ระเหยกลายเป็นไอได้บรรจุอยู่ในขวดก้นกลม โดยการให้ความร้อนแก่ตัวสกัดในขวดก้นกลมจะทำให้ตัวสกัดระเหยกลายเป็นไอผ่านหลอดแก้วไปยังตัวควบแน่น เมื่อตัวสกัดถูกควบแน่นกลายเป็นของเหลวจะไหลตกลงมาบนของแข็งที่ต้องการสกัด เมื่อตัวถูกสกัดถูกสะสมในหลอดแก้วมากเพียงพอ ของเหลวจะเกิดการไหลกลับมายังขวดก้นกลม สารที่ถูกสกัดจะออกมากับตัวสกัด และสะสมในขวดก้นกลม ส่วนตัวสกัดจะถูกความร้อนทำให้กลายเป็นไอแล้วควบแน่นมาใช้ใหม่ได้อีกอย่างต่อเนื่อง

การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระออกจากพืช จัดเป็นการสกัดของแข็งด้วยของเหลว (Solid-liquid extraction) ซึ่งต้องทำการศึกษาตัวแปรที่มีผลต่ออัตราการสกัด และปัจจัยในการเลือกตัวทำละลายเพื่อให้ได้อัตราการสกัดสูงที่สุด

2.3.1 ตัวแปรที่มีอิทธิผลต่อการสกัด

2.3.1.1 ขนาดอนุภาค (particle size) ขนาดอนุภาคถ้ามีขนาดเล็กจะทำให้พื้นที่ผิวในการถ่ายเทมวลสารมากขึ้น และระยะทางของตัวถูกละลายที่อยู่ภายในของแข็งจะสั้นลงทำให้ตัวถูกละลายแพร่กระจากออกสู่ตัวทำละลายได้เร็วขึ้น

2.3.1.2 ตัวทำละลาย (solvent) ตัวทำละลายที่ดีควรมีขั้วที่เหมาะสมกับตัวถูกละลาย และมีความหนืดต่ำ เพื่อให้มีการไหลเวียนที่ดี โดยทั่วไปจะใช้ตัวทำละลายบริสุทธิ์ ตัวทำละลายบริสุทธิ์จะไม่มีตัวถูกละลายอยู่เลย ระหว่างการสกัดความเข้มข้นของตัวถูกละลายในตัวทำละลาย และตัวอย่างที่นำมาสกัดจะมีค่าลดลง ทำให้สกัดตัวถูกละลายได้ลดลง

2.3.1.3 อุณหภูมิของตัวทำละลาย เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้อัตราการสกัดสูงขึ้น เนื่องจากเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นสัมประสิทธิ์การแพร่กระจาย (Diffusivity) มีค่าเพิ่มขึ้น เวลาในการสกัด ถ้าใช้เวลาในการสกัดน้อย สารที่ต้องการสกัดจะถูกสกัดออกมาได้น้อย ดังนั้นจะต้องใช้เวลาในการสกัดที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ปริมาณสารสกัดมากที่สุด

2.3.1.4 การกวนของการไหล เป็นสิ่งสำคัญมาก เพราะจะช่วยเพิ่มอัตราการสกัดเนื่องจากเกิดการแพร่ในสภาวะปั่นป่วนทำให้อัตราการแพร่ ทำให้การสกัดดีขึ้น

3.2.4 ปัจจัยในการเลือกตัวทำละลาย

การเลือกตัวทำละลายในการสกัดผลิตภัณฑ์จากพืช มีปัจจัยสำคัญที่ต้องคำนึงถึงดังนี้

1. ตัวทำละลายที่ดีควรละลายสารที่ต้องการสกัดได้ดี (partition coefficient, K สูง) ซึ่งพิจารณาได้จากสภาพขั้วที่คล้ายคลึงกัน
2. ไม่ละลายปนเป็นเนื้อเดียวกันกับสารละลายของของผสมที่จะถูกสกัด
3. ไม่ควรละลายสิ่งเจือปนหรือสารที่ไม่ต้องการ
4. ควรมีจุดเดือดไม่สูงมากนัก เพื่อที่จะกำจัดออกไปจากสารที่ต้องการได้ง่ายภายหลังการสกัด
5. ต้องไม่ทำปฏิกิริยากับสารหรือตัวทำละลายอื่นๆ ที่จะใช้ร่วม
6. ตัวทำละลายควรมีราคาไม่แพง ไม่ควรมีพิษ และไม่ควรติดไฟง่าย (ถ้าจำเป็นต้องใช้ให้หลีกเลี่ยงการจุดตะเกียงหรือเครื่องทำความร้อนในขณะทำการสกัด) ตัวทำละลายที่นิยมใช้สกัดสารในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ไดเอทิลอีเทอร์ (diethyl ether) ปิโตรเลียมอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต เมธานอล และ เมทธานอล เป็นต้น (วิจิตร เอื้อประเสริฐ และคณะ, 2548)

2.4 สารต้านอนุมูลอิสระหรือแอนติออกซิแดนท์ (Antioxidant)

อนุมูลอิสระ (Free radical) เป็นสารที่มีอิสระอยู่ในวงนอกของอะตอมหรือโมเลกุล ที่มีความว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยา โดยรับอิเล็กตรอนจากสารอื่น ๆ ใกล้เคียงมีผลให้ตัวมันเองเสถียรมากขึ้น ในขณะเดียวกันก็ชักนำให้สารที่ให้อิเล็กตรอนไปนั้นมีไม่ครบคู่จนอาจกลายเป็นสารที่มี

ความรุนแรง ซึ่งถ้าเกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิตอาจทำลายส่วนประกอบสำคัญของเซลล์รอบ ๆ บริเวณนั้นไม่ว่าจะเป็นโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต หรือ ดีเอนเอ (DNA) ทำให้สารชีวโมเลกุลเหล่านั้นเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและเสียหน้าที่การทำงานไป

สารต้านอนุมูลอิสระ หรือ แอนติออกซิแดนท์ (antioxidant) คือสารเคมีที่ทำหน้าที่ต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน รวมถึงสารที่สามารถยับยั้งและควบคุมอนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน จึงช่วยยับยั้งอนุมูลอิสระไม่ให้ทำลายองค์ประกอบของเซลล์ (วัลยา เนาวรัตน์วัฒนา และพัชรี บุญศิริ, 2542) เป็นสารที่สามารถยับยั้งออกซิเดชันในสิ่งมีชีวิตจะมีระบบป้องกันการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อจากอนุมูลอิสระอยู่แล้ว ซึ่งประกอบได้ด้วยแอนติออกซิแดนท์มากมายหลายชนิดที่ทำหน้าที่แตกต่างกันไป บางตัวเป็นเอนไซม์ บางตัวเป็นสารประกอบ บางตัวเป็นสารที่ละลายในน้ำได้ บางตัวละลายได้ในไขมัน แอนติออกซิแดนท์เหล่านี้ทำหน้าที่ในการเป็นตัวป้องกันและกำจัดการก่อตัวของอนุมูลอิสระ นอกนั้นยังทำหน้าที่ซ่อมแซมส่วนที่ถูกทำลาย (สุเขตร์ ศรีบุญเรือง, 2548) สารต้านอนุมูลอิสระแบ่งได้เป็น 5 กลุ่ม ดังนี้

2.4.1 สารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิ เป็นสารที่หยุดปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระโดยการให้อนุมูลไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระโดยตรงเป็นผลให้อนุมูลนั้นกลายเป็นสารที่มีความเสถียรมากขึ้น สารที่มีสมบัติดังกล่าว เช่น สารประกอบฟีนอลิก หรือสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากการสังเคราะห์ เช่น บิวทิเลเตต ไฮดรอกซี่ โทลูอีน (Butylated hydroxy toluene, BHT) เป็นต้น

2.4.2 สารต้านอนุมูลอิสระทุติยภูมิ สารต้านอนุมูลอิสระประเภทนี้ไม่ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับอนุมูลอิสระแต่จะทำหน้าที่คล้ายไฮโดรเพอร์ออกไซด์ ของไขมันทำให้เกิดเป็นสารที่มีความเสถียร เช่น กรดไทโอโพรพิโอนิก (Thiopropionic acid) เป็นต้น

2.4.3 สารที่ทำหน้าที่ดักจับออกซิเจน เป็นสารที่ทำปฏิกิริยากับออกซิเจน แล้วกำจัดออกไปจากระบบได้ซึ่งสารจับออกซิเจนจะช่วยเสริมฤทธิ์ หรือเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) เป็นต้น

2.4.4 เอนไซม์ที่ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่กำจัดออกซิเจน เช่น กลูโคสออกซิเดส (Glucose oxidase) หรือกำจัดสารที่เกิดการออกซิเดชันได้ เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมูแทรส (Superoxide dismutase)

2.4.5 สารที่ทำหน้าที่จับอนุมูลอิสระ เป็นสารที่ทำหน้าที่จับกับอนุมูลโลหะซึ่งอนุมูลโลหะ เช่น เหล็ก ทองแดง จะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน สารที่ทำหน้าที่จับอนุมูลอิสระนี้เป็นตัวส่งเสริมการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิ ซึ่งสารเหล่านี้อาจมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเล็กน้อยหรืออาจไม่มีเลย เช่น กรดซิตริก (Citric acid) กรดอะมิโน (Amino acid) (ชัยรัตน์ พึ่งเพียร, 2552)

กลไกลการทำหน้าที่ของสารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระมีกลไกลการทำงานแบ่งออกเป็น 6 กลุ่มดังนี้

1) การดักจับอนุมูลอิสระ (Radical scavenging) สารต้านอนุมูลอิสระ (AH) เหล่านี้สามารถชะลอหรือยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของไขมันได้ในระยะเพิ่มจำนวน โดยการให้อนุมูลไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ ดังสมการ

$LOO^{\circ} + AH \longrightarrow LOOH + A^{\circ}$

$LO + AH \longrightarrow LOH + A^{\circ}$

$A^{\circ} + LOOH \longrightarrow AH + LOO^{\circ}$

$A^{\circ} + LOO^{\circ} \longrightarrow AOOL$

$A^{\circ} + A^{\circ} \longrightarrow$ non-radical products

2) การสลายเพอร์ออกไซด์ (Peroxide decomposing) สารประกอบฟีนอลิกบางชนิด สามารถทำหน้าที่สลายเพอร์ออกไซด์ของไขมัน ให้เกิดเป็นสารที่มีความเสถียร เช่น แอลกอฮอล์ คีโตน หรือแอลดีไฮด์

3) การยับยั้งการทำงานของ Singlet oxygen (Singlet oxygen quenching) โดยปกติออกซิเจนที่อยู่ในสถานะพื้น (Ground state) จะอยู่ในรูปของ Triplet oxygen ($^3O_2$) จะไม่ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับกรดไขมัน แต่เมื่อ Triplet oxygen ได้รับพลังงานกระตุ้นจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ Singlet oxygen ($^1O_2$) ซึ่งจะไวต่อการเข้าทำปฏิกิริยากรดไขมัน ซึ่งสารที่มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ Singlet oxygen อาจไปยับยั้งสารที่ไปกระตุ้นการเกิด Singlet oxygen หรืออาจเข้าจับกับ Singlet oxygen โดยไม่ทำปฏิกิริยาเคมี หรืออาจเข้าทำปฏิกิริยากับ Singlet oxygen (Meryer, et al., 2002)

4) การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Enzyme inhibiting) สารประกอบฟีนอลิกบางชนิด เช่น ฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิก และแกลเลต (Gallates) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซด์ลิพอกซีจิเนส ได้โดยการเข้าจับกับไอออนของเหล็กซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ จึงส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว (ปณัฐฐา ไชยมุติ, 2547)

5) การจับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Metal chelating) อนุมูลโลหะ เช่น เหล็ก ทองแดง เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันโดยสารที่ทำหน้าที่จับกับโลหะเหล่านี้ เช่น ฟลาโวนอยด์ กรดซิตรก เอทิลีน ไดอะมินเททรา แอซิติกแอซิด (Ethylenediamine tetraacetic acid; EDTA) นอกจากนี้ กรดอะมิโน เฟปไทด์ และแลตโตเฟอริน (Lactoferrin) ก็มีความสามารถในการจับกับอนุมูลโลหะเช่นกัน (Meryer, et al., 2002)

6) การดักจับออกซิเจน (Oxygen scavenging) กรดแอสคอร์บิกมีสมบัติในการจับกับออกซิเจน สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับซุปเปอร์ออกไซด์ ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (Hydrogenperoxide) อนุมูลไฮดรอกซิล อนุมูลเพอร์รอกซิล และ Singlet oxygen กรดแอสคอร์บิกทำหน้าที่เป็นรีดิวซิง (Reducing agent) ซึ่งจะถ่ายไฮโดรเจนอะตอม (H) ให้กับออกซิเจน จึงทำให้ออกซิเจนไม่สามารถทำปฏิกิริยาต่อไป นอกจากนี้กรดแอสคอร์บิกยังทำหน้าที่เป็นตัวเสริมฤทธิ์

(Synergist) ให้กับโทโคฟีรอล (Tocopherols) โดยจะช่วยให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลแอลฟา-โทโคฟีรอล เพอร์รอกซิล เปลี่ยนรูปกลับไปเป็นแอลฟาโทโคฟีรอล ซึ่งมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระได้อีกครั้ง (ปณัฐฐา ไชยมุติ, 2547)

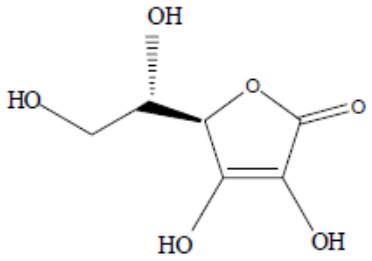
แหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มดังนี้

1. สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (Natural antioxidants) เป็นสารที่พบได้ในธรรมชาติไม่ว่าจะมาจากพืช จุลินทรีย์ หรือเนื้อเยื่อของสัตว์ แบ่งกลุ่มสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มโมเลกุลเล็ก เช่น กรดแอสคอร์บิก โทโคฟีรอล แคโรทีนอยด์ และโพลีฟีนอล กลุ่มของเอนไซม์ เช่น ซุปเปอร์ออกไซด์ ดิสมูเทรส กลูทาไทโอนเพอร์ออกซิเดส (Glutathaione peroxidase) กลุ่มสารโมเลกุลใหญ่ เช่น อัลบูมิน (Albumin) เฟอติน (Ferritin) เป็นต้น

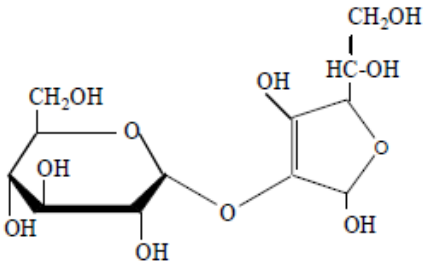
สารในธรรมชาติที่มีสมบัติเป็นสารแอนติออกซิแดนท์ได้จะเกี่ยวข้องกับความสามารถในการให้ไฮโดรเจนของหมู่ OH ในสารประกอบฟีนอล ความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของสาร (antioxidant activity, AOA) ขึ้นอยู่กับตำแหน่งและจำนวนของหมู่ OH รวมทั้งโครงสร้างอื่น ๆ ของโมเลกุล สารแอนติออกซิแดนท์ในธรรมชาติที่สำคัญมีดังนี้ (สุภามาส อินทฤทธิ์, 2547)

1.1 วิตามินซี (Ascorbic Acid)

วิตามินซีเป็นสารที่ละลายน้ำได้ ลักษณะเป็นผลึกสีขาว ไม่มีกลิ่น มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่ากรดแอสคอร์บิค (ascorbic acid) ในธรรมชาติจะพบ 2 รูปแบบ คือ Ascorbic acid (Reduced Form) และ Dehydro-ascorbic acid (Oxidized Form) สะสมมากที่บริเวณต่อมหมวกไต รองลงมา คือ ตับและม้าม ตามลำดับ วิตามินซีมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมตาบอลิซึมของกรดอะมิโน และทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ของปฏิกิริยาทางชีวเคมีต่าง ๆ ในร่างกาย นอกจากนี้วิตามินซียังเป็นส่วนหนึ่งของกลุ่มสารชีวเคมีที่สร้างคอลลาเจน (collagen) ซึ่งเป็นโปรตีนส่วนหนึ่งของโครงสร้างกระดูกมนุษย์ วิตามินซีเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญชนิดหนึ่งในกระบวนการเมตาบอลิซึมในร่างกายเป็นสารสำคัญในปฏิกิริยาสายโซ่ของเอนไซม์ที่สำคัญ นอกจากนี้ยังเป็นตัวที่ทำให้วิตามินอีนั้นกลับคืนมาได้ใหม่อีกครั้ง วิตามินซีเป็นตัวก่อให้เกิดและปกป้องคอลลาเจน เสริมสร้างหน้าที่ของระบบภูมิคุ้มกันให้ดีขึ้น เป็นตัวปรับน้ำตาลในเลือด ปกป้องดวงตาจากการทำลายของแสงอัลตราไวโอเลต ป้องกันการก่อตัวของคลอเลสเตอรอลในผนังเลือดแดง ป้องกันการแข็งตัวของเลือด ช่วยทำให้ปอดทำงานได้ดีขึ้น ช่วยให้มีการดูดซึมเหล็กได้ดีขึ้นที่ลำไส้เล็ก ป้องกันการเปลี่ยนรูปของสารไนไตรท์เป็นสารไนโตรซามีน ซึ่งเป็นสารก่อตัวมะเร็ง และเป็นตัวร่วมในการสร้างฮอร์โมนที่เป็นตัวลดระดับภาวะตึงเครียดและภาวการณ์อักเสบ (สุเขตร์ ศรีบุญเรือง, 2548)



ภาพที่ 2.4 แสดงโครงสร้างของวิตามินซี (Ascorbic Acid)

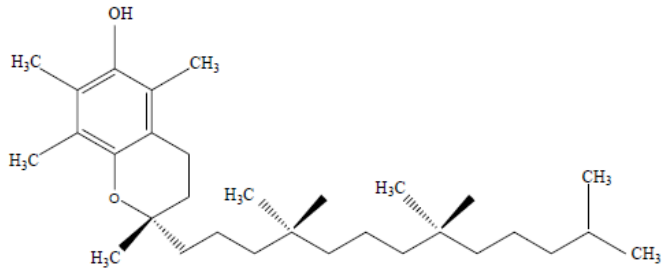


ภาพที่ 2.5 แสดงโครงสร้างของวิตามินซี (Ascorbic Acid-2-Glucoside)

1.2 วิตามินอี (α -Tocopherol)

เป็นโมเลกุลที่ละลายได้ดีในน้ำมันหรือลิพิด ดังนั้นจึงสามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าได้ วิตามินอีช่วยปกป้องผนังเซลล์จากอนุมูลอิสระ การสะสมวิตามินอีบนผิวหนัง พบว่าช่วยปกป้องผิวจากแสงแดด และป้องกันมะเร็งจากผิวหนัง รวมทั้งช่วยซ่อมแซมผิวและให้ภูมิคุ้มกันผิวหนังอีกด้วย (โอภา วัชระคุปต์ และมาลีรักษ์ อัตต์สินทอง, 2549) ซึ่งปริมาณวิตามินอีในเลือดของคนปกติมีค่า 1.0 mg ต่อ 90% ของวิตามินอีในเนื้อเยื่อซึ่งจะอยู่ในรูป Tocopherol สะสมในอวัยวะต่าง ๆ เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์ทั่ว ๆ ไป คือ ตับ กล้ามเนื้อ เนื้อเยื่อไขมันและต่อมต่าง ๆ วิตามินอีมีประสิทธิภาพในการทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิแดนท์ได้ดีมากจะป้องกันกระบวนการออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัว ซึ่งเป็นส่วนประกอบของฟอสโฟลิปิดของแมมเบรนของออร์แกนเนล เนื่องจากวิตามินอีละลายในไขมันได้ดีจะแทรกตัวอยู่ตามแมมเบรน โดยเมื่อเกิด Liquid Peroxidation จะมีการสร้าง Peroxyl Radicals และ Alkoxyl Radicals ขึ้น วิตามินอีจะเข้าจับกับสารดังกล่าวก่อนที่ Peroxyl Radicals และ Alkoxyl Radicals จะไปจับกับกรดไขมันอื่นในช่วงของ Propagation อีกทั้งวิตามินอียังทำงานร่วมกับ Glutathione Peroxidase และธาตุ Selenium โดยในช่วงแรก ๆ มีการตั้งชื่อวิตามินอีว่า วิตามินป้องกันการเป็นหมัน (anti-sterility vitamin) เนื่องจากพบว่าวิตามินอีเป็นสารที่จำเป็นสำหรับการสืบพันธุ์ในหนูตัวเมีย ถ้าขาดวิตามินอีจะทำให้ลูกอ่อนตายในครรภ์และแท้งลูก นอกจากนี้ยังพบมีการเรียกวิตามินอีว่า โทโคฟีรอล (tocopherol) ในธรรมชาติมีวิตามินอีอยู่หลายชนิด ปัจจุบันแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ โทโคฟีรอลและโทโคไทรอินอล (tocotrienol) แต่ละกลุ่มยังแยกเป็นวิตามินย่อย ๆ อีก 4 ชนิด มีชื่อเรียกตามพยัญชนะในภาษาละตินว่า แอลฟา (α) เบต้า (β) แกมมา (γ) และเดลต้า (δ) ขึ้นอยู่กับจำนวนและ

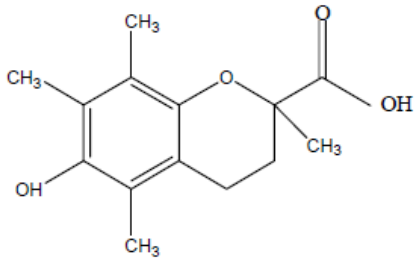
ตำแหน่งของหมู่เมธิลที่ติดกับวงแหวนโครเมน (chromane ring) โทโคฟีรอลแตกต่างจากโทโค-ไทรอินอลที่โครงสร้างของโทโคฟีรอลมีแขนงข้างเป็น 4’, 8’, 12’- trimethyltridecyl เรียกว่า phytol หรือ phytyl side chain ส่วนโทโคไทรอินอลมีแขนงข้างที่มีพันธะคู่ที่ตำแหน่ง 3’, 7’ และ 11’ เรียกว่า unsaturated side chain (Cadenas and Packer, 1996)



ภาพที่ 2.6 แสดงโครงสร้างวิตามินอี (α -Tocopherol)

1.3 โทรลอก (trolox)

เป็นอนุพันธ์ของวิตามินอีที่ดัดแปลงโครงสร้างโดยการเปลี่ยนสายอัลเคนเป็นหมู่คาร์บอกซิลิก (-COOH group) ทำให้สามารถละลายได้ดีในน้ำ แต่เนื่องจากความสามารถในการละลายน้ำได้ดี จึงทำให้ออกฤทธิ์เร็วกว่าวิตามินอี โดยวิตามินอีต้องใช้เวลานานเป็นชั่วโมงหรือเป็นวัน ในขณะที่ trolox ออกฤทธิ์เกือบจะทันทีในหลายโมเดล (โอภา วัชระคุปต์ และมาลีรักษ์ อัตต์สินทอง, 2549) trolox เป็นแอนติออกซิแดนท์ที่กำจัดพวกเปอร์ออกซิล และอัลคอกซิล เรดิคัล จากนั้นจะเปลี่ยนรูปเป็น trolox radical โดยมีวิตามินซี เป็นตัวช่วยให้คืนรูปกลับมา (สุเขตร์ ศรีบุญเรือง, 2548)



ภาพที่ 2.7 แสดงโครงสร้างของโทรลอก (trolox)

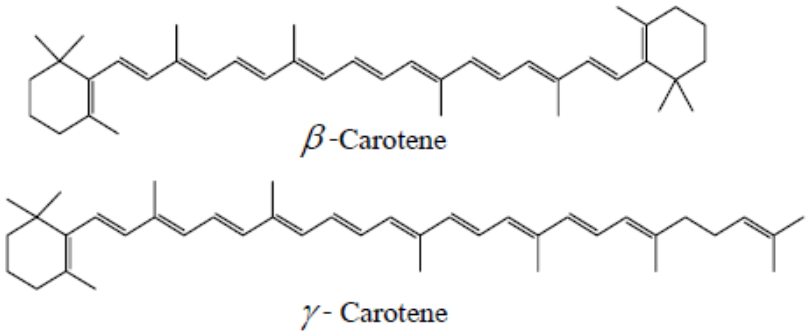
1.4 สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (Carotenoid)

แคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เป็นสารสำคัญที่พบในคลอโรพลาสต์ของพืชมีบทบาทในการสังเคราะห์แสงเช่นเดียวกับคลอโรฟิลล์ โดยทำหน้าที่ช่วยคลอโรฟิลล์ในการดักรับพลังงานแสง ในผักและผลไม้ที่ยังไม่สุกจะพบแคโรทีนอยด์น้อยกว่าผักและผลไม้ที่สุกแล้ว เนื่องจากปกติผักใบเขียวหรือผักและผลไม้ที่ยังดิบอยู่ แคโรทีนอยด์จะอยู่ในส่วนของคลอโรพลาสต์ ในขณะที่ผักหรือผลไม้สุกแคโรทีนอยด์จะถูกสังเคราะห์ขึ้นในโครโมพลาสต์เป็น

ปริมาณมากเนื่องจากเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์มีมากขึ้น โครงสร้างพื้นฐานของแคโรทีนอยด์ประกอบด้วยโครงสร้างหลักที่เรียกว่า tetraterpene skeleton ซึ่งอาจมีวงแหวนที่บริเวณปลายด้านใดด้านหนึ่งหรือทั้งสองข้างของโมเลกุล วงแหวนนี้อาจเป็นวงแหวนห้าหรือหกเหลี่ยมก็ได้ แคโรทีนอยด์สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ตามองค์ประกอบของโครงสร้างในโมเลกุล ดังนี้

1.4.1 แคโรทีน (Carotene) เป็นแคโรทีนอยด์ที่โครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยคาร์บอนและไฮโดรเจนเท่านั้น เช่น เบต้า-แคโรทีน (β-carotene) แอลฟา-แคโรทีน (α-carotene) แกมมา-แคโรทีน (γ-carotene) และไลโคพีน (lycopene) เป็นต้น

1.4.2 ออกโซแคโรทีนอยด์ (Oxocarotenoid) หรือแซนโทฟิลล์ (xanthophylls) เป็นแคโรทีนอยด์ที่โครงสร้างโมเลกุลบริเวณวงแหวนประกอบด้วยกลุ่มอื่นนอกเหนือจากคาร์บอนและไฮโดรเจน เช่น เบต้า-คริบโทแซนทิน (β-cryptoxanthin) และลูทีน (lutein) มี hydroxyl group, Violerythrin มี keto group และ Violaxanthin มี epoxy group เป็นต้น



ภาพที่ 2.8 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของแคโรทีนอยด์บางชนิด

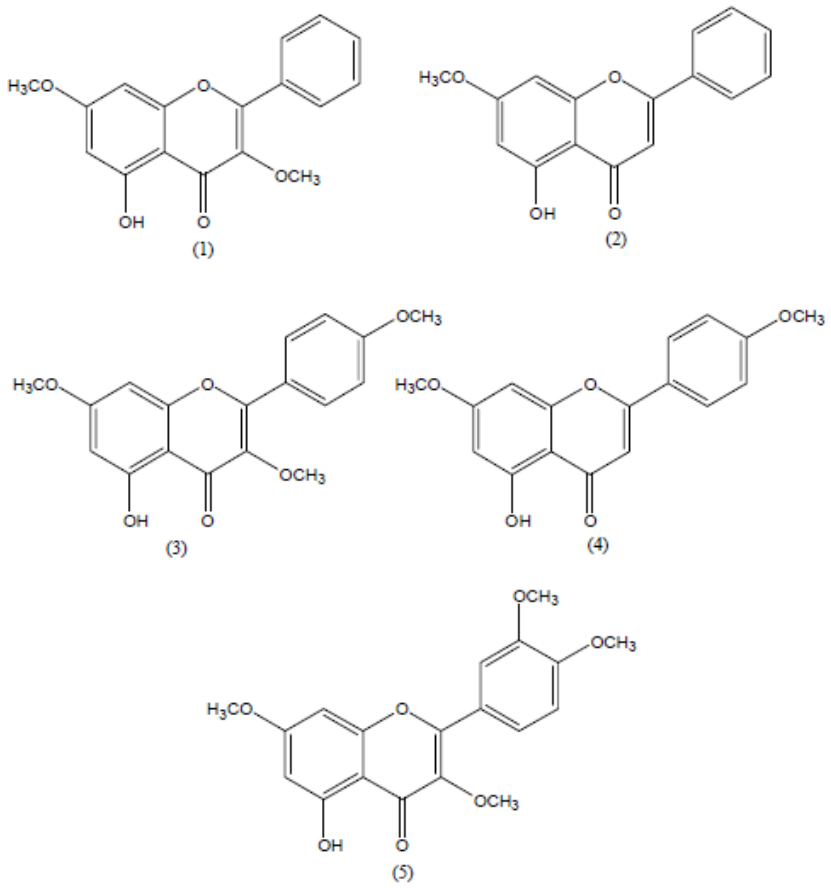
1.5 สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

เป็นสารกลุ่มที่พบมากที่สุดในธรรมชาติ พบอยู่ทั่วไปในพืชที่มีสีเขียว และพบในทุกส่วนของพืช ไม่ว่าจะเป็นใบ ราก เนื้อไม้ เปลือกต้น ดอก ผล หรือเมล็ด เป็นสารที่ให้สี (pigments) ในสัตว์สามารถพบได้บ้าง โดยเชื่อว่ามาจากพืชที่บริโภคเข้าไปมากกว่าการเกิดชีวสังเคราะห์ในร่างกายของสัตว์เอง ฟลาโวนอยด์จัดเป็นสารสำคัญของกลุ่มโพลีฟีนอล (ปรีชา บุญจูง, 2549)

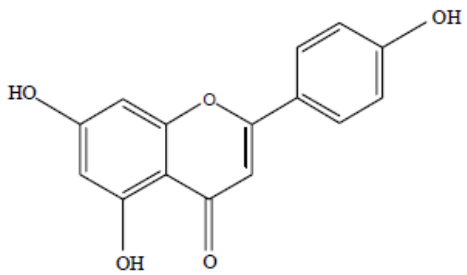
สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ นอกจากจะเป็นสารที่ทำให้ดอกหรือผลมีสีสวย เช่น สีเหลือง ชมพู แดง ฟ้า หรือม่วง ซึ่งมีประโยชน์ใช้ล่อแมลง นก หรือผึ้งเข้ามาผสมเกสรเพื่อแพร่กระจายพันธุ์แล้ว มีรายงานการยืนยันถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารฟลาโวนอยด์ที่ใช้ป้องกันและรักษาโรคต่าง ๆ เช่นโรคเกี่ยวกับหัวใจและหลอดเลือด ฤทธิ์ต้านมะเร็ง การต้านแบคทีเรีย ต้านการอักเสบ ต้านแพ้ ต้านไวรัส เป็นต้น คุณสมบัติเหล่านี้มีความสัมพันธ์กับคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของฟลาโวนอยด์ (ปรีชา บุญจูง, 2549)

ฟลาโวนอยด์ที่มีความสำคัญทางเภสัชกรรมและการแพทย์แผนปัจจุบันในขณะนี้ เช่น รูทิน (rutin) ที่มีฤทธิ์ช่วยเพิ่มความต้านทานของหลอดเลือดฝอย และสารสกัดจากใบ

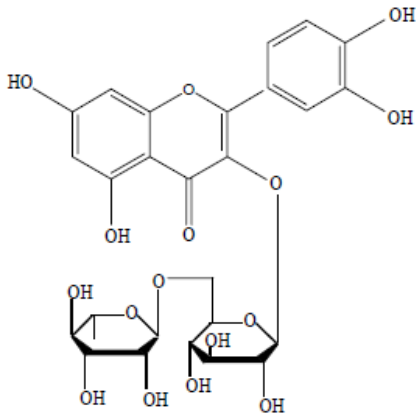
แป๊ะก้วยช่วยเพิ่มการไหลเวียนของโลหิตไปสมองและช่วยทำลายอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดความเสื่อมของเนื้อเยื่อในร่างกายมนุษย์ ฟลาโวนอยด์เป็นสารที่มีสมบัติในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ดีมากในอาหารประเภทไขมันและไขมันผสมน้ำ



ภาพที่ 2.9 แสดงโครงสร้างของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)



ภาพที่ 2.10 แสดงโครงสร้างของโพลีฟีนอล (Polyphenol)

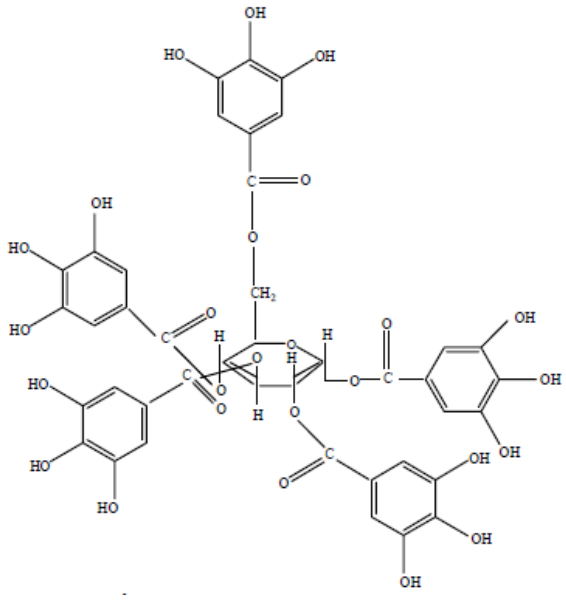


ภาพที่ 2.11 แสดงโครงสร้างของรูทิน (Rutin)

1.6 สารกลุ่มแทนนิน (Tannins)

แทนนิน คือ กลุ่มของสารประกอบที่ได้มาจากส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น เปลือก ใบ ผล เปลือกผล ซึ่งมีคุณสมบัติละลายได้ดีในน้ำ สามารถรวมตัวกับโปรตีนในหนังสัตว์ ในปัจจุบันได้มีการนิยามว่า แทนนิน คือ สารประกอบฟีนอลิคที่ได้จากธรรมชาติที่มีน้ำนักโมเลกุลระหว่าง 500 และ 3,000 ทั้งยังมีหมู่ฟีนอลิคไฮดรอกซี (phenolic hydroxyl) อิสระอยู่จำนวนหนึ่ง (1-2 หมู่ต่อ 100 หน่วยน้ำหนักโมเลกุล) ที่สามารถเกิดการเชื่อมโยงได้กับสารโปรตีนและสารไบโอโพลิเมอร์ (biopolymer) เช่น เซลลูโลส (cellulose) และ เพคติน (pectin) ได้สารใหม่ที่มีคุณสมบัติคงตัว

ธรรมชาติของแทนนินนั้น พบว่ามีการกระจายตัวอยู่ในอาณาจักรของพืชเกือบทุกวงศ์ และเกิดเป็นองค์ประกอบที่สำคัญที่เด่นมากในพืชใบเลี้ยงคู่จำนวนมากมาย แต่ในพืชชั้นต่ำ เช่น เชื้อรา สาหร่าย มอสส์ ลิฟเวอร์เวิร์ท (liverworts) ตลอดจนพวกหญ้าทั้งหลาย พบว่า มีแทนนินเป็นองค์ประกอบอยู่น้อยมาก บทบาททางนิเวศวิทยาของแทนนินที่พบอยู่ในพืชยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดและโดยทั่วไปแล้วพืชทั้งหลายมักจะมีแทนนินเป็นองค์ประกอบ (สุเขตร์ ศรีบุญเรือง, 2548)



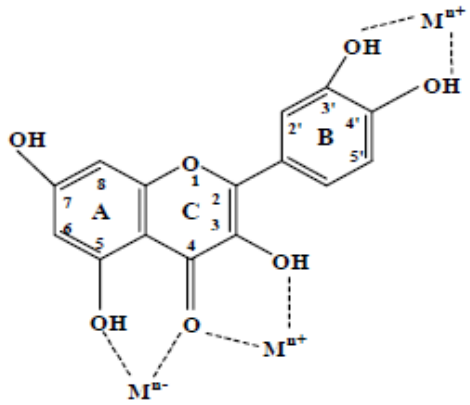
ภาพที่ 2.12 แสดงโครงสร้างของแทนนิน (Tannins)

1.7 สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compound)

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่พบได้ในพืชทั่วไป พบได้มากในธรรมชาติอัน ได้แก่ ผักสีเขียว ผลไม้ ชาเขียว ชาดำ ชอกโกแลต และไวน์แดง เป็นต้น ในปัจจุบันสารประกอบฟีนอลิกมากกว่า 8,000 ชนิด ในธรรมชาติ (ปรีชา บุญจูง, 2549) มีคุณสมบัติเป็นสารอินทรีย์ที่มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนอะโรมาติก (aromatic ring) ที่มีจำนวน hydroxyl group อย่างน้อยหนึ่งโมเลกุล สามารถละลายได้ในน้ำ ส่วนใหญ่สารประกอบฟีนอลิกมักพบอยู่รวมกับน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ (glycoside) สารประกอบฟีนอลิกที่พบในธรรมชาติมีหลายกลุ่ม และมีลักษณะสูตรโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกัน กลุ่มใหญ่ที่พบจะเป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์ (flovonoid) นอกจากนั้นยังมีสารประกอบต่าง ๆ เช่น simple monocyclic phenol, phenyl propanoid, phenolic, quinine และ polyphenolic ซึ่งได้แก่ ลิกนิน (lignin) เมลานิน (melanin) และแทนนิน (tannin) รวมทั้งยังพบว่ามีสารประกอบที่มีกลุ่มฟีนอล (phenolic unit) รวมอยู่ในโมเลกุลของโปรตีนอัลคาลอยด์ (alkaloid) และเทอร์ฟีนอยด์ (terpenoid) เป็นต้น

สารประกอบฟีนอลิกมีคุณสมบัติที่หลากหลายตามชนิดของสารนั้น ๆ เช่น ลิกนิน ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างให้ความแข็งแรงแก่ผนังเซลล์ของพืช สารในกลุ่มแอนโธไซยานิน (anthocyanin) เป็นสารที่ให้สีในดอกไม้ สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์มีความสำคัญในการควบคุมการเจริญของพืชจำพวกถั่ว เป็นต้น นอกจากนี้พบว่าสารประกอบฟีนอลิกหลายชนิดมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น ฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิก และแทนนิน เป็นต้น สารประกอบฟีนอลิกทำหน้าที่เป็นตัวขับไล่อนุมูลอิสระ ที่สำคัญคืออนุมูล peroxyl โดยมีกลไก 2 แบบ คือ เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นต่ำเมื่อเทียบกับสารออกซิไดซ์ สารประกอบฟีนอลิกจะหน่วงเหนี่ยวหรือป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน นอกจากนี้อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาจะถูกทำให้เป็นสารที่มีความเสถียร ดังนั้นจึงสามารถป้องกันการเกิดขั้นตอน propagation ได้ (Basu et. al., 1999) นอกจากนี้

สารประกอบฟีนอลิกบางชนิดยังทำหน้าที่เป็น chelating agent ดักจับไอออนของโลหะเข้าไว้ในโมเลกุล เช่น เคอร์ซิทิน (quercetin) โดยโครงสร้างของเคอร์ซิทินมีตำแหน่ง (binding site) ที่สามารถดักจับไอออนของโลหะ เช่น ทองแดง ได้ 3 บริเวณ คือบริเวณ 3',4'-dihydroxyl ของวงแหวน B บริเวณ 3-hydroxyl, 4-ketoของวงแหวน C และบริเวณระหว่างตำแหน่ง 5-hydroxy ของวงแหวน A กับตำแหน่ง 4-keto ของวงแหวน C ดังรูปภาพที่ 2.13



ภาพที่ 2.13 แสดงบริเวณ bingding site ของเคอร์ซิทินที่จับกับไอออนของโลหะ

สารประกอบฟินอลิกยังทำหน้าที่เป็นสารรีดิวซ์ เป็นตัวให้ไฮโดรเจนและกำจัดออกซิเจนที่อยู่ในรูปแอคทีฟ ด้วยทำหน้าที่ต่าง ๆ ดังกล่าวจึงทำให้สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญชนิดหนึ่งในพืชทั่วไป

1.8 เอนไซม์ และโปรตีนบางชนิด

เมื่อร่างกายอยู่ในสภาวะเครียด (oxidative stress) ซึ่งเป็นสภาวะที่ร่างกายไม่สามารถควบคุมและป้องกันปริมาณของอนุมูลอิสระให้อยู่ในระดับปกติที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ได้ ร่างกายจะมีระบบป้องกันอนุมูลอิสระที่เรียกว่า antioxidant defense system ซึ่งได้แก่ สารในกลุ่มของเอนไซม์ โปรตีน และสารอาหารต่างๆ เช่น วิตามินซี และวิตามินอี (วัลยา เนาวรัตน์วัฒนา และพัชรี บุญศิริ, 2542) สารต้านอนุมูลอิสระในระบบดังกล่าวจะทำหน้าที่ยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ ยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระและซ่อมแซมเซลล์ที่ได้รับความเสียหายเนื่องจากอนุมูลอิสระ

1.8.1 สารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มของเอนไซม์

เอนไซม์ primary antioxidant เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีหลายชนิด เช่น

1) เอนไซม์ Superoxide Dismutase (SOD) แบ่งเป็นชนิดย่อยได้ 3 ชนิด คือ ชนิดที่มีแมงกานีสในโมเลกุล เรียกว่า manganese containing enzyme (MnSOD) ชนิดที่มีเหล็กในโมเลกุล เรียกว่า iron containing enzyme (FeSOD) และชนิดที่มีทั้งทองแดงและสังกะสีในโมเลกุล เรียกว่า copper/zinc containing enzyme (CuZnSOD) ทั้ง MnSOD และ FeSOD เป็นเอนไซม์ที่พบในสิ่งมีชีวิตพวกโปรคาริโอต ส่วน CuZnSOD พบในสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอต เอนไซม์ SOD มีบทบาทสำคัญในการกำจัดอนุมูล superoxide ($O_2^{-\cdot}$) ดังสมการ

$$2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + {}^3O_2$$

2) เอนไซม์ Catalase (CAT) เอนไซม์ CAT พบในสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอตเป็นส่วนใหญ่มีบทบาทสำคัญในการสลายโมเลกุลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ไปเป็นน้ำและออกซิเจน ดังสมการ

$$2H_2O_2 \xrightarrow{CAT} 2H_2O + {}^3O_2$$

$$H_2O_2 + 2GSH \xrightarrow{GPOX} 2H_2O + GSSG$$

$$ROOH + 2GSH \xrightarrow{GPOX} H_2O + ROH + GSSG$$

3) เอนไซม์ Aauxiliary Aantioxidant เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีหลายชนิด เช่น NAD(P)H dehydrogenase (quinine) หรือ DT-diaphorase ascorbate reclying enzyme และ antioxidant protease เป็นต้น

1.8.2 สำหรับโปรตีนบางชนิดที่แสดงสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระมีหลายชนิดและมีหน้าที่ที่แตกต่างกันไป

1) อัลบูมิน (Albumin) โปรตีนอัลบูมินเป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญมาก ที่พบในพลาสมา โดยโปรตีนอัลบูมินสามารถเข้าจับกับไอออนทองแดงได้อย่างรวดเร็ว จึงเป็นการขับไล่ไอออนทองแดงทางอ้อม เป็นผลให้อนุมูลอิสระเกิดขึ้นน้อยลง

2) ทรานส์เฟอริน (Transferrin) โปรตีนทรานส์เฟอรินเป็นกลไกโคโปรตีนที่พบในพลาสมา เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่งเหล็ก (iron transporting protein) และมีบทบาทหน้าที่ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระร่วมกับโปรตีนเฟอริติน

3) เฟอริติน (Ferritin) เฟอริตินเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่สะสมเหล็ก เฟอริตินที่พบในพืชจะเรียกว่า phyto ferritinในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะพบเฟอริตินสะสมในส่วนของไซโตซอลและในซีรัม

4) เมทัลโลไธโอนีน (Metallothionein) โปรตีนเมทัลโลไธโอนีนไม่สามารถที่จะทำหน้าที่กำจัดโลหะไอออนดังเช่นโปรตีนชนิดอื่น แต่โปรตีนนี้สามารถทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระได้โดยตรง

5) เซรูโลพลาสมิน (Ceruloplassmin) เซรูโลพลาสมินเป็นโปรตีนที่มีไอออนทองแดงอยู่ในโมเลกุล (Copper containing protein) มีสมบัติเป็นเอนไซม์ ferrioxidase ซึ่งจะออกซิไดส์ Fe^{2+} ไปเป็น Fe^{3+} เป็นการส่งเสริมให้เหล็กรวมเข้าไปในโมเลกุลของโปรตีนเฟอริตินได้ เซรูโลพลาสมินจึงมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเพราะช่วยกำจัดไอออนของเหล็กให้รวมกับโปรตีนเฟอริติน

6) Heat shock protein เป็นโปรตีนที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยสัมพันธ์กับความเครียด (stress) และความร้อนอย่างฉับพลัน (heat shock) ของเซลล์ บทบาทของโปรตีนชนิดนี้ คือ สามารถกำจัด Hg^{2+} ซึ่งเป็นไอออนที่ทำให้เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

2. สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (Synthesis antioxidants)

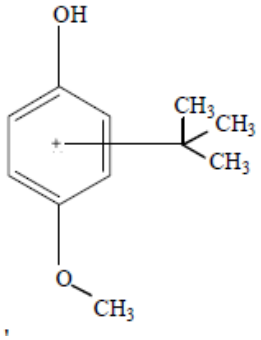
เป็นสารประกอบฟีนอลิกที่สังเคราะห์ขึ้น โดยในโครงสร้างจะมีการเติมหมู่แอลคิล เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติให้เหมาะสมกับการละลายในไขมัน นำไปใช้เพื่อป้องกันการเกิดออกซิเดชันของไขมัน สารสังเคราะห์เหล่านี้ เช่น บีเอชเอ บีเอชที และบีเอชคิว โดยในปริมาณไม่เกิน 0.02%

สารแอนติออกซิแดนท์ที่ได้จากการสังเคราะห์มีโครงสร้างได้หลายแบบและยับยั้งการเกิดออกซิเดชันด้วยกลไกที่แตกต่างกันดังนี้ (สุภามาส อินทฤทธิ์, 2547)

สารแอนติออกซิแดนท์สังเคราะห์ชนิด proper antioxidants คือสารที่มีสมบัติเป็นตัวยับยั้งที่มีกลไกการป้องกันการเกิดออกซิเดชันด้วยตัวของมันเอง เป็นสารที่เติมลงไปเพื่อรับเอาอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นหลังจากสารอินทรีย์เสียไฮโดรเจนไปแล้ว เพื่อให้เกิดเป็นสารใหม่ที่เสถียรกว่าจึงสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ได้ ซึ่งมีด้วยกัน 4 ชนิด คือ

2.1 Butylated Hydroxyanisole (BHA)

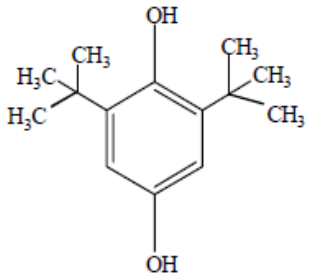
เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่นิยมใช้กันมากชนิดหนึ่งโดยเฉพาะอย่างยิ่งในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทที่มีไขมันและน้ำมันเป็นส่วนประกอบ มีลักษณะเป็นของแข็งมันวาวสีขาว ละลายได้ในไขมันแต่ไม่ละลายในน้ำ



ภาพที่ 2.14 แสดงโครงสร้างของสาร Butylated Hydroxyanisole (BHA)

2.2 Butylated Hydroxytoluene (BHT)

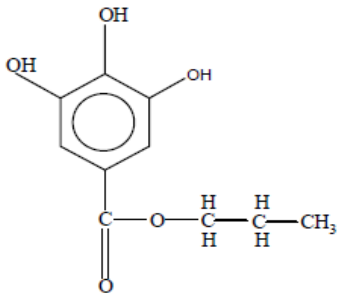
มีลักษณะเป็นผลึกสีขาวเป็นสารต้านอนุมูลอิสระอีกชนิดหนึ่งที่นิยมใช้กันเช่นเดียวกับ BHA แต่มีประสิทธิภาพดีกว่าเล็กน้อย



ภาพที่ 2.15 แสดงโครงสร้างของสาร Butylated Hydroxytoluene (BHT)

2.3 Propyl Gallate (PG)

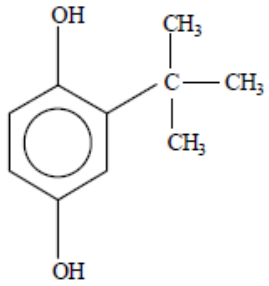
เป็นเอสเทอร์ของกรดแกลลิค มีลักษณะเป็นผงสีขาวละลายน้ำ เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพดีมาก ช่วยป้องกันการเกิดเพอร์ออกไซด์ได้ดี



ภาพที่ 2.16 แสดงโครงสร้างของสาร Propyl Gallate (PG)

2.4 Tertiary Butylhydroquinone (TBHQ)

มีลักษณะเป็นผงสีขาวคล้ำ เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดสำหรับผลิตภัณฑ์อาหารประเภททอด ช่วยป้องกันเรื่องการเปลี่ยนแปลงของสีและการเกิดออกซิเดชัน นอกจากนี้ยังละลายได้ดีในน้ำมันและไขมัน สารบางชนิดต้องทำงานร่วมกับสารแอนติออกซิแดนท์ชนิดอื่น ๆ จึงจะมีสมบัติในการป้องกันการเกิดออกซิเดชันได้ เช่น กรดซิทริก กรดทาร์ทาริก และกรดแอสคอร์บิก เป็นต้น



ภาพที่ 2.17 แสดงโครงสร้างของสาร Tertiary Butylhydroquinone (TBHQ)

2.5 การวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

ปัจจุบันได้มีผู้คิดค้นและพัฒนาวิธีการวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระไว้หลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธีมีหลักการที่แตกต่างกันออกไป เช่น

1. trolox equivalent antioxidanct capacity (TEAC) assay
2. total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) assay
3. enhanced chemiluminescence (ECL)
4. thiobarbituric acid assay (TBA)
5. 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothazoline-6-sulphonic acid) diasonium salt (ABTS)
6. N,N-diphynyl-p-phenylenediamine (DMPD) assay
7. ferric reduce ability of plasma (FRAP) assay
8. oxygen radical abssorpton capacity (ORAC) assay
9. 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay

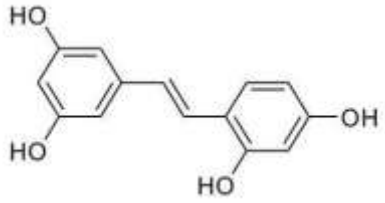
สำหรับในการวิจัยในครั้งนี้ ใช้วิธี DPPH assay ในการวัดฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก ใช้เวลาไม่นาน และให้ผลเร็ว DPPH assay เป็นวิธีการวัดความสามารถของสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant activity) โดยอาศัยการจับ (scavenge) กับ stable radical DPPH (2,2 Diphenyl-1-picrylhydrazyl) จัดเป็นวิธีการที่ง่ายและให้ผลเร็ว ซึ่งสามารถแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารต้านออกซิเดชันได้ เนื่องจากเมื่อสารต้านออกซิเดชันนั้นถ่ายเทอิเล็กตรอน 1 ตัว ให้แก่ DPPH radical (DPPH $^{\circ}$) และเปลี่ยนให้อยู่ในรูป DPPH-H ที่มีความคงตัวทำให้ DPPH $^{\circ}$ ซึ่งมีสีม่วงถูกเปลี่ยนให้มีสีเหลืองอ่อนและทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่นในช่วง 515-520 นาโนเมตร ลดลง (สุเขตร์ ศรีบุญเรือง, 2548)

2.6 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Kondo และคณะ (1998) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดที่ได้จากพืช 22 ชนิด ได้แก่ *Artocarpus lakoocha* Roxb., *Streblus asper* Lour., *Blumea balsamifera* DC., *Pluchea indica* (L.) Less., *Coccinia indica* Wight & Arnott, *Coccinia grandis* Voight, *Gloriosa superba* L., *Heliotropium indicum* R. Br., *Hibiscus sabdariffa* L., *Mammea siamensis Kosterm*., *Michelia champaca* L., *Murraya paniculata* Jack, *Mitragyna speciosa* (Korth.) Havil., *Morinda citrifolia* L., *Randia siamensis* Craib., *Solanum trilosatum* L., *Diospyros mollis* Griff., *Elephantopus scber* L., *Mesua ferrea* L., *Micromelum minutum* Seem., *Orthosiphon stamineus*, และ *Solanum violaceum* Ortega. พบว่า สารสกัดทั้ง 22 ชนิดมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพ มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ยับยั้งการเกิดเม็ดสี (melanin generation) และมีฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation จากผลการทดลองดังกล่าวสามารถนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับผิวพรรณได้

Sang Yoon Choi และ (2006) ได้ศึกษาการสังเคราะห์และการค้นคว้ากลไกของ 2,6-dimethoxy-N-(4-methoxyphenyl) benzamide ในฐานะของสารลดเม็ดสีผิว สารลดเม็ดสีผิวชนิดใหม่อย่าง 2,6-dimethoxy-N-(4-methoxyphenyl) benzamide (DMPB) ได้ถูกสังเคราะห์ขึ้นมา โดยใช้การรวมตัวกันระหว่าง benzoic acid กับ aniline สาร DMPB แสดงถึงความสามารถในการลดเม็ดสีที่มีต่อการเพิ่มการผลิตเม็ดสีอันเกิดจาก UVB ในผิวของหนูตะเภาสีน้ำตาล นอกจากนี้การรักษาด้วยประกอบชนิดนี้ 100 ppm จะการออกฤทธิ์ยับยั้งการเกิดเม็ดสีเมลานินได้ 30% โดยไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ผลการทดลองว่าอนุพันธ์ของ oxyresveratrol ที่มีความสามารถในการควบคุมการสร้างเม็ดสี และมีความเป็นพิษต่ำ ด้วยการดัดแปลงโครงสร้างทางเคมี อนุพันธ์ของ oxyresveratrol 3 กลุ่มได้ถูกสังเคราะห์ขึ้นมา และความสามารถในการลดเม็ดสีของสารดังกล่าว ได้ถูกนำมาศึกษาโดยใช้ เม็ดสีเมลามินในระหว่างทำการทดสอบนั้น อนุพันธ์ของ biaryl amide จำนวนมาก ได้แสดงให้เห็นผลในการยับยั้งการผลิตเม็ดสีเมลานินในซึ่งกลุ่ม biaryl amide

Tengamnuay และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากแก่นต้นมะหาด (*Artocarpus lakoocha* Roxb.) พบว่า จะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสในระดับหลอดทดลอง และมีผลต่อการสร้างเม็ดสีของคน โดยทำการศึกษาในระดับสัตว์ทดลอง จากการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบและสาร oxyresveratrol ซึ่งเป็นสารหลักที่พบในแก่นมะหาดจะแสดงค่า IC_{50} เท่ากับ 0.76 and 0.83 µg/mL ตามลำดับ

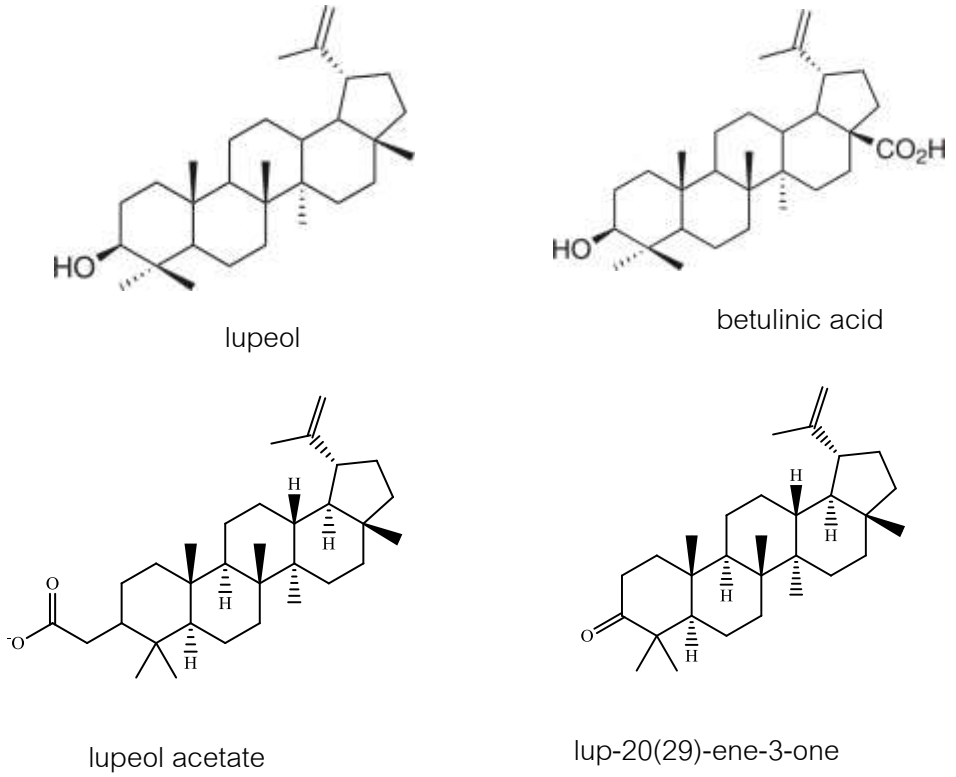


ภาพ**ที่ 2.18** แสดงโครงสร้างสาร oxyresveratrol

Chuanasa และคณะ (2008) ทำการศึกษาสารประกอบ Oxyresveratrol ที่แยกได้จากมะหาดในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส HSV-1 (Herpes simplex virus 1) เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์กับยา Acyclovir โดยจะแสดงฤทธิ์ต้านไวรัสเท่ากับ 30 µg/ml

Nguyen และคณะ (2010) ได้ทำการแยกสารจากส่วนสกัดชั้นเฮกเซนและเอทธิลอะซิเตรตของมะหาดที่เก็บจากจังหวัดสงขลา สามารถแยกสารประเภท triterpene ได้ทั้งหมด 4 ชนิดคือ lupeol หรือ lup-20(29)-ene-3β-ol, lupeol acetate หรือ lup-20(29)-ene-3β-acetate, lup-20(29)-ene-3-one และ betulinic acid หรือ 3β-hydroxylup-20(29)-en-28-oic acid โดยทำ

การวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี และเปรียบเทียบข้อมูลกับผู้วิจัยที่เคยรายงานไว้แล้ว



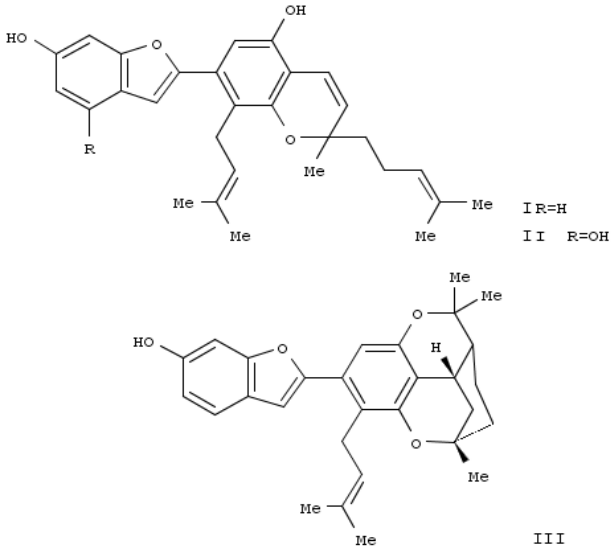
ภาพที่ 2.19 แสดงโครงสร้างสาร lupeol, lupeol acetate, lup-20(29)-ene-3-one และ betulinic acid

Povicit และคณะ (2010) สามารถแยกสาร oxyresveratrol ได้จากแก่นของมะหาด (*Artocarpus lakoocha* Roxb.) เมื่อนำสารดังกล่าวไปทดสอบฤทธิ์ต้านการเกิดไกลเคชัน (antiglycation) และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ พบว่า สาร oxyresveratrol จะแสดงฤทธิ์ต้านการเกิดไกลเคชัน มีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.0 ± 0.03 µg/mL และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.1 ± 0.01 µg/mL เมื่อทดสอบวิธี DPPH และมีค่าเท่ากับ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.43 ± 0.03 µg/mL เมื่อทดสอบด้วยวิธี TBARS

Singhatong และคณะ (2010) ได้ทำการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากแก่นมะหาดด้วยวิธี ABTS (2,2-azinobis-(3-ethylbenzothazoline-6-sulphonic acid)) วิธี DPPH และวิธี H_2O_2 scavenging assay โดยใช้สาร Trolox เป็นสารมาตรฐาน นอกจากนี้ยังได้ทำการทดสอบหาปริมาณโพลีฟีนอลิก ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟราโวนอยด์ และปริมาณแทนนิน จากการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจะมีค่าเท่ากับ 128.30 ± 0.13, 55.86 ± 0.01 และ 463.49 ± 0.01 µmol Trolox/g สารสกัด เมื่อทำ

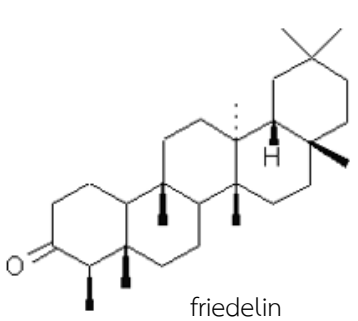
การทดสอบด้วยวิธี ABTS, DPPH และวิธี H_2O_2 scavenging assay ตามลำดับ และจากการตรวจสอบปริมาณสารพบว่าใน 1 กรัมของสารสกัดหยาบจะมีปริมาณฟีนอลทั้งหมดเท่ากับ 325.63 ± 2.99 มิลลิกรัม มีปริมาณฟราโวนอยด์เท่ากับ 521.98 ± 0.01 มิลลิกรัม และปริมาณแทนนินเท่ากับ 124.03 ± 0.46 มิลลิกรัม

Sritularak และคณะ (2010) สามารถแยกสารชนิดใหม่ 3 ชนิดจากส่วนรากของมะหาด คือ prenylated2-arylbenzofurans-artolakoochol (**I**), 4-hydroxy-artolakoochol (**II**) และ cyclo-artolakoochol (**III**) โดยทำการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี และเปรียบเทียบข้อมูลกับผู้วิจัยที่เคยรายงานไว้แล้ว

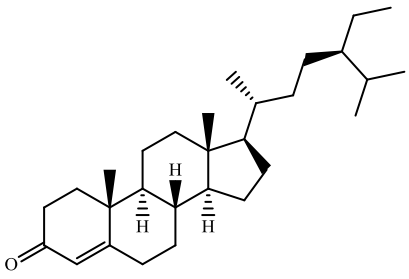


ภาพที่ 2.20 แสดงโครงสร้างของสาร prenylated-2-arylbenzofurans-artolakoochol (**I**), 4-hydroxy-artolakoochol (**II**) และ cycloartolakoochol (**III**)

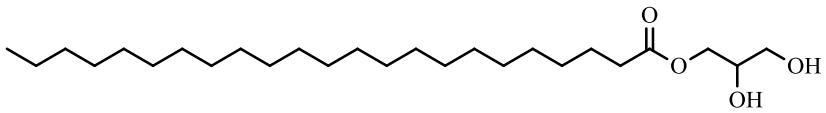
Nguyen และคณะ (2011) ได้ทำการแยกสารจากส่วนสกัดชั้นเฮกเซนและเอทธิลอะซิเตตของมะหาดทีประเทศเวียดนาม สามารถแยกสารใหม่ได้ 3 ชนิด คือ friedelin หรือ friedelan-3-one, β-sitostenone หรือ stigmast-4-en-3-one และ 1-tricosanoyl-glycerol โดยทำการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี และเปรียบเทียบข้อมูลกับผู้วิจัยที่เคยรายงานไว้แล้ว



friedelin



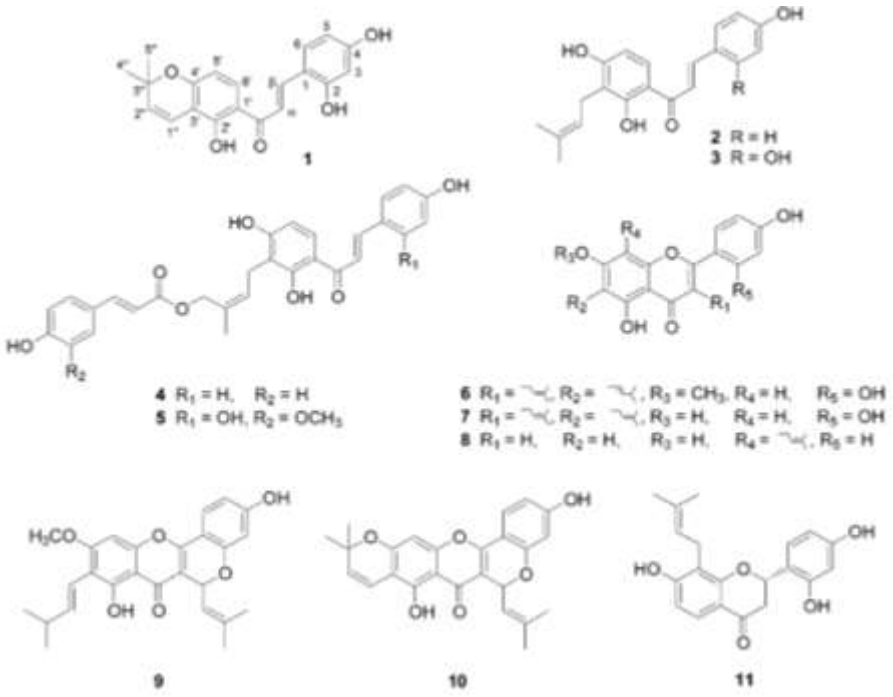
β-sitostenone



1-tricosanoyl-glycerol

ภาพที่ 2.21 แสดงโครงสร้างสาร friedelin, β-sitostenone และ 1-tricosanoyl-glycerol

Wisutsonthorn และคณะ (2016) สามารถแยกสารชนิดใหม่จากแก่นมะหาด prenylated chalcone, 3',3'-dimethylpyrano [3',4'] 2,4,2'-trihydroxychalcone **(1)** ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ทั้ง 2 ชนิด คือ cycloartocarpin **(9)** และ cudraflavone A **(10)** ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่แยกได้ นอกจากนี้ยังมีฟลาโวนอยด์ อีก 8 ชนิด คือ isobacachalcone **(2)**, morachalcone A **(3)**, gemichalcones B **(4)** และ gemichalcones C **(5)**, artocarpin **(6)**, cudraflavone C **(7)**, licoflavone C **(8)**, และ euchrenone A **(11)** ดังแสดงภาพที่ 2.22



ภาพที่ 2.22 แสดงโครงสร้างของสารที่แยกได้จากแก่นมะหาดทั้ง 11 ชนิด

โดยนำมาแยกสารประกอบและจัดเป็นพืชชนิดแรกที่มีสารประกอบ **1**–**4**, **6** และ **11** มีฤทธิ์ในการลดปริมาณไนตริกออกไซด์ โดยนำมาทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยง (macrophage cell line RAW 264.7) ที่กระตุ้นการทำงานด้วยสาร lipopolysaccharide (LPS) ซึ่งเป็นการจำลองสภาวะการอักเสบในระดับหลอดทดลอง จากผลการทดลองพบว่าสารที่แยกได้จากแก่นมะหาด มีค่า IC_{50} 18.8, 6.4, 16.4, 9.3, 18.7, และ 12.3 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ และสารประกอบที่ (**2**) และ cycloartolakoochol (**3**) **5** และ **8** จะแสดงฤทธิ์ในการยับยั้ง ที่ค่า IC_{50} 23.9 และ 20.4 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ จากการศึกษาสารประกอบที่ **7**, **9** และ **10** ไม่ได้แสดงฤทธิ์ในการยับยั้ง ซึ่งโครงสร้างของสารประกอบที่ (**1**) ได้ทำการพิสูจน์โครงสร้างของสาร โดยอาศัยข้อมูลทางสเปกโตรสโกปี ในรูปสเปคตรัมของ ^{1}H และ ^{13}C ใน 1D-NMR และสเปกตรัมแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ^{1}H -^{1}H และ ^{1}H - ^{13}C ใน 2D-NMR

บุหรัน พันธุ์สวรรค์ (2556) ได้ศึกษาประสิทธิภาพการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ โดยวิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพเป็นการทดสอบเพื่อหาชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในตัวอย่างโดยอาศัยหลักการที่ทำให้เกิดสีและเกิดตะกอนและความสามารถของการละลายในตัวทำละลายและการถูกดูดซับโดยตัวดูดซับ วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่นิยม คือ การตรวจวัดสารโพลีฟีนอล ชนิด Shinoda test และ Pew test), โครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง และการตรวจหาสารต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้เครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) และวิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ โดยการทดสอบด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระ คืออนุมูลอิสระ ดีพีพีเอช (DPPH$^{\bullet}$, diphenyl-picryhydrazyl radical) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัว

และมีสีม่วงสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดโดยใช้เครื่องสเปกโตโฟโตรมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร มาศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่าสารสกัดมีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดี

วสิษฐ์พล เตชะรุ่งโรจน์ และคณะ (2557) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดจากแก่นมะหาดกับวิตามินซีที่ใช้ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จะพบความสัมพันธ์ในการเสริมฤทธิ์ระหว่างกัน โดย oxyresveratrol 0.22 mM (% inhibition เท่ากับ 39.05) ผสมกับวิตามินซี 0.44 mM (% inhibition เท่ากับ 35.56) พบว่า % inhibition เท่ากับ 95.34 และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารผสมกับสารเดี่ยวที่ความเข้มข้นเท่ากัน พบว่ามี % inhibition มากกว่า oxyresveratrol 0.66 mM 1.32 เท่า และมากกว่าวิตามินซี 0.66 mM 1.27 เท่า จากผลการวิจัย สามารถนำไปต่อยอดโดยพัฒนาตำรับเครื่องสำอางทาผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากแก่นมะหาดและวิตามินซี ที่ช่วยให้ผิวขาวเร็วขึ้นจากการทำงานของวิตามินซี และขาวได้นานขึ้นจากการทำงานร่วมกันระหว่างสารสกัดจากแก่นมะหาดกับวิตามินซีในการยับยั้งการผลิตเม็ดสีเมลานิล