รายงานการวิจัยนักศึกษาระดับปริญญาตรี
เรื่อง

การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากย่านางแดง (*Bauhinia strychnifolia Craib.*)

The estimation of antioxidant profiles in crude extract of Ya–nang–dang *(Bauhinia strychnifolia Craib.)*

นภาลัย กุลบุตร
นุชจรี ชินภักดี
ปิยธิดา ปาปะเพ
สมฤทัย ไชยขันธ์

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

(งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดินด้านการวิจัย ปีงบประมาณ 2559)

คณะกรรมการสอบได้พิจารณาโครงการวิจัยฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรครุศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ของมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(อาจารย์ขวัญยืน เลี่ยมสำโรง)

....กรรมการ
(อาจารย์บุษยมาส รัตนดอน)

.....กรรมการ
(อาจารย์ดรรชนีย์ พลหาญ)

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอนุมัติให้รายงานโครงการวิจัยฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรครุศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ของมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ทองสุข พละมา)
ประธานสาขาวิชาเคมี

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มานิตย์ อัญญะโพธิ์)
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ของมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ อาจารย์ขวัญยืน เลี่ยมสำโรง ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่ได้ช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัยฉบับนี้ ตลอดจนการให้คำปรึกษา แนะนำ ตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ขอขอบคุณ อาจารย์ดรรชนีย์ พลหาญ และอาจารย์บุษยมาส รัตนดอน กรรมการที่ปรึกษาที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ และช่วยเหลือในการทำวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม ที่ให้ความอนุเคราะห์เรื่องสารเคมีตลอดจนวัสดุอุปกรณ์ต่างๆ ในการทดลองตลอดจนการแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณอรุณรัตน์ อุทัยคู คุณอัญชลี มาคิน และคุณนงลักษณ์ ศรีแก้ว ที่คอยช่วยเหลือและแนะนำการใช้เครื่องมือ

ขอขอบคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณในการทำงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ บิดา มารดา และทุกคนในครอบครัวที่ให้การสนับสนุนการศึกษา และเป็นกำลังใจด้วยดีเสมอมา

คณะผู้วิจัย

2559

หัวข้อวิจัย การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของย่านางแดง
ผู้ดำเนินการวิจัย นางสาวนภาลัย กุลบุตร
นางสาวนุชจรี ชินภักดี
นางสาวปิยธิดา ปาปะเพ
นางสาวสมฤทัย ไชยขันธ์
ที่ปรึกษา อาจารย์ขวัญยืน เลี่ยมสำโรง
หน่วยงาน สาขาวิชาเคมี คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
ปี 2559

บทคัดย่อ

ย่านางแดง เป็นพืชในท้องถิ่นที่นำมาใช้ทำเป็นยาสมุนไพร การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH$^{\bullet}$ และ ABTS$^{\bullet+}$ นอกจากนี้ได้ทำการวัดหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโว-นอยด์ทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteau และวิธี Aluminium chloride colorimetric ตามลำดับ จากผลการทดลอง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH$^{\bullet}$ พบว่า ย่านางแดงมีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.86 มิลลิกรัมต่อลิตร และการทดสอบการฟอกสีอนุมูลอิสระหรือ ABTS$^{\bullet+}$ พบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.24 มิลลิกรัมต่อลิตร ย่านางแดงมีทั้งปริมาณของสารฟีนอลิกและปริมาณฟลาโวนอยด์เท่ากับ 528.42 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัม น้ำหนักแห้ง และ 504.89 มิลลิกรัมเควอซิทินต่อกรัม น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ผลการวิจัยนี้สรุปได้ว่า ย่านางแดงเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี ควรได้รับการนำมาพัฒนาเป็นอาหารเสริมเพื่อสุขภาพ

คำสำคัญ: ย่านางแดง สารต้านอนุมูลอิสระ อนุมูลอิสระ

Research Title The estimation of antioxidant profiles in Ya–nang–dang *(Bauhinia strychnifolia Craib.)*

Researchers Miss Napalai Koonlaboot
Miss Nuchjaree Chinpakdee
Miss Piyathida Papaphay
Miss Somruethai Chaiyakhan

Research Consultant Miss Kwanyeun Leamsamrong

Organization Chemistry / Education / Rajabhat Maha Sarakham University

Year 2016

Abstract

Ya–nang–dang (*Bauhinia strychnifolia Craib.*) are well known as local herb. This study were aim to evaluate the antioxidant activities by using $DPPH^{\bullet}$ and $ABTS^{\bullet+}$ method. Further study, total polyphenol and flavonoids were dertermined by using Folin-ciocalteu and Aluminium assay. It was found that the extract of Ya–nang–dang (*Bauhinia strychnifolia Craib.*) showed high antioxidant activities (DPPH; IC_{50} 6.86 mg/L and $ABTS^{\bullet+}$; IC_{50} 5.24 mg/L) The total phenolic and flavonoid contents of Ya–nang–dang (*Bauhinia strychnifolia Craib.*) were reveal that 528.42 mgGAE/g DW and 168.39 mgQE/g DW respectively. The results indicated Ya–nang–dang (*Bauhinia strychnifolia Craib.*) is a good natural source of antioxidant compounds for use supplementary food.

Keyword : *Bauhinia strychnifolia Craib.*, antioxidant, Free radical

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศบทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
ตัวแปร	3
นิยามศัพท์เฉพาะ	3
สถานที่ดำเนินการวิจัย	4
ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
ข้อมูลทั่วไป	6
การป้องกันอันตรายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ	9
สารต้านอนุมูลอิสระ	10
การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	11
สมุนไพรพื้นบ้าน	17
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	19

		หน้า
บทที่ 3	**วิธีดำเนินการวิจัย**	22
	สมุนไพรตัวอย่าง	22
	อุปกรณ์ สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	22
	การเตรียมตัวอย่างและสารเคมี	24
	วิธีการทดลอง	25
	การวิเคราะห์ข้อมูล	30
บทที่ 4	**ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง**	31
	ผลการเตรียมสารสกัดจากย่านางแดง	31
	ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี $DPPH^{\bullet}$	31
	ผลการทดสอบการฟอกสีอนุมูลอิสระด้วยวิธี $ABTS^{\bullet+}$	33
	ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด	35
	ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด	36
บทที่ 5	**สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ**	37
	สรุปผลการทดลอง	37
	ข้อเสนอแนะ	37
บรรณานุกรม		38
ภาคผนวก		41
	ภาคผนวก ก การเตรียมสารสกัดตัวอย่างและการเตรียมสารเคมี	42
	ภาคผนวก ข ผลการวิจัย	46
	ภาคผนวก ค ข้อมูลจากการทดลอง	52
	ภาคผนวก ง ภาพเครื่องมือที่ใช้ในการทำวิจัย	59
	ภาคผนวก จ วัตถุดิบและขั้นตอนในการเก็บตัวอย่าง	61
	ภาคผนวก ฉ การคำนวณผลการวิจัย	64
ประวัติผู้วิจัย		72

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	แผนการดำเนินการวิจัย	5
3.1	สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	23
3.2	เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	23
3.3	ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เตรียมของวิธี $DPPH^{\bullet}$	26
3.4	ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เตรียมของวิธี $ABTS^{\bullet+}$	28
3.5	ความเข้มข้นของตัวอย่างย่านางแดงที่เตรียมของวิธี Folin-Ciocalteu	29
3.6	ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เตรียมของวิธี Aluminium chloride colorimetric	30
4.1	แสดงน้ำหนักของสารสกัดย่านางแดง	31
ค-1	แสดงน้ำหนักของสารสกัดย่านางแดง	53
ค-2	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานโทรลอก เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี $DPPH^{\bullet}$ และค่า IC_{50}	53
ค-3	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี $DPPH^{\bullet}$ และค่า IC_{50}	53
ค-4	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างจากย่านางแดง เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี $DPPH^{\bullet}$ และค่า IC_{50}	54
ค-5	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค เปอร์เซ็นการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี $ABTS^{\bullet+}$ และค่า IC_{50}	54
ค-6	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานโทรลอก เปอร์เซ็นการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี $ABTS^{\bullet+}$ และค่า IC_{50}	55
ค-7	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างจากย่านางแดง เปอร์เซ็นการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี $ABTS^{\bullet+}$ และค่า IC_{50}	55
ค-8	การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค (AEAC) และสารมาตรฐานโทรลอก (TEAC) ด้วยวิธี $DPPH^{\bullet}$ และ $ABTS^{\bullet+}$	56
ค-9	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก ด้วยวิธี Folin – ciocalteu	56
ค-10	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างจากย่านางแดง ด้วยวิธี Folin – ciocalteu	56
ค-11	เปรียบเทียบข้อมูลการคำนวณปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ด้วยวิธี Folin – ciocalteu จากสมุนไพรย่านางแดง	57
ค-12	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานเควอซิทิน ด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric	57

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ค-13	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างจากย่านางแดง ด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric	58
ค-14	เปรียบเทียบข้อมูลการคำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์ ด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric จากย่านางแดง	58

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	การทำงานของเอนไซม์ lipoxygenase (LOX) ในปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมัน	8
2.2	การสังเคราะห์วิตามินเอจากเบต้าแคโรทีน	12
2.3	สูตรโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิก	14
2.4	โครงสร้างของฟลาโวนอยด์	14
2.5	ย่านางแดง	18
4.1	กราฟความสัมพันธ์ของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคที่ความเข้มข้นต่างๆ กับ %inhibition ด้วยวิธี DPPH$^{\bullet}$	31
4.2	กราฟความสัมพันธ์ของสารมาตรฐานโทรลอกที่ความเข้มข้นต่างๆ กับ %inhibition ด้วยวิธี DPPH$^{\bullet}$	32
4.3	กราฟความสัมพันธ์ของสารสกัดจากย่านางแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ กับ %inhibition ด้วยวิธี DPPH$^{\bullet}$	32
4.4	กราฟความสัมพันธ์ของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค ที่ความเข้มข้นต่างๆ กับ %inhibition ด้วยวิธี ABTS$^{\bullet+}$	33
4.5	กราฟความสัมพันธ์ของสารมาตรฐานโทรลอกที่ความเข้มข้นต่างๆ กับ %inhibition ด้วยวิธี ABTS$^{\bullet+}$	33
4.6	กราฟความสัมพันธ์ของสารสกัดจากย่านางแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ กับ %inhibition ด้วยวิธี ABTS$^{\bullet+}$	34
4.7	แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบกับสารมาตรฐาน กรดแอสคอร์บิค (AEAC) และสารมาตรฐานโทรลอก (TEAC) ด้วยวิธี DPPH$^{\bullet}$ และ ABTS$^{\bullet+}$	34
4.8	กราฟความสัมพันธ์ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (mg/L) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu	35
4.9	กราฟความสัมพันธ์ของสารมาตรฐานเควอซิทิน (mg/L) ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric	35
4.10	ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของย่านางแดง	36
ข-1	กราฟความสัมพันธ์ของสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคที่ความเข้มข้นต่างๆ กับ %inhibition ด้วยวิธี DPPH$^{\bullet}$	47
ข-2	กราฟความสัมพันธ์ของสารมาตรฐานโทรลอกที่ความเข้มข้นต่างๆ กับ %inhibition ด้วยวิธี DPPH$^{\bullet}$	47
ข-3	กราฟความสัมพันธ์ของสารสกัดจากย่านางแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ กับ %inhibition ด้วยวิธี DPPH$^{\bullet}$	48
ข-4	กราฟความสัมพันธ์ของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค ที่ความเข้มข้นต่างๆ กับ %inhibition ด้วยวิธี ABTS$^{\bullet+}$	48

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
ข-5	กราฟความสัมพันธ์ของสารมาตรฐานโทรลอกที่ความเข้มข้นต่างๆ กับ %inhibition ด้วยวิธี $ABTS^{\bullet+}$	49
ข-6	กราฟความสัมพันธ์ของสารสกัดจากย่านางแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ กับ %inhibition ด้วยวิธี $ABTS^{\bullet+}$	49
ข-7	แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค (AEAC) และสารมาตรฐานโทรลอก (TEAC) ด้วยวิธี $DPPH^{\bullet}$ และ $ABTS^{\bullet+}$	50
ข-8	กราฟความสัมพันธ์ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (mg/L) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu	50
ข-9	กราฟความสัมพันธ์ของสารมาตรฐานเควอซิทิน (mg/L) ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric	51
ข-10	ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของย่านางแดง	51
ง-1	เครื่อง UV-Vis spectrophotometer Magnetic Stirrer	60
ง-2	เครื่อง Hot Plate	60
ง-3	เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง	60
ง-4	เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	60
ง-5	ตู้อบความร้อน	60
จ-1	ย่านางแดง	62
จ-2	ย่านางแดงที่บดหยาบ	62
จ-3	การสกัดย่านางแดง	62
จ-4	การกรองสารสกัดย่านางแดง	62
จ-5	การเคี่ยวย่านางแดง	62
จ-6	นำใส่ขวดและปิดด้วยกระดาษฟอยด์	62
จ-7	นำไปอบ	63
จ-8	เก็บในโถดูดความชื้น	63

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ปัจจุบันมนุษย์เราได้ให้ความสำคัญเกี่ยวกับเรื่องสุขภาพกันมากขึ้นเนื่องจากการรับประทานอาหารของมนุษย์พบว่ามีความเสี่ยงต่อโรคต่างๆมากมาย เช่น การรับประทานอาหารประเภทเนื้อสัตว์เป็นประจำจะมีความเสี่ยงต่อโรคหัวใจ หลอดเลือดแข็งตัว และมะเร็ง ขณะที่ผู้รับประทานอาหารประเภทพืชผัก ผลไม้ หรือแม้กระทั่งสมุนไพรเป็นประจำมีความเสี่ยงน้อยกว่า ซึ่งผู้ที่รับประทานอาหารประเภทเนื้อสัตว์จะมีของเสียที่เกิดจากกระบวนการเผาผลาญอาหารที่เรียกว่า “อนุมูลอิสระ” (free radical) เป็นจำนวนมาก โดยอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุที่เกิดจากกระบวนการเผาผลาญอาหารในร่างกาย รวมถึงจากมลพิษต่างๆ เช่น มลพิษจากการติดเชื้อโรครังสียูวี (UV-ray) โอโซน (ozone) ควันจากท่อไอเสียรถยนต์และบุหรี่ โดยอนุมูลอิสระมีความไวสูงในการจู่โจมสารชีวโมเลกุลในร่างกาย เช่น ไขมัน โปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ซึ่งจะทำลายโครงสร้าง และหน้าที่ของผนังเซลล์ ก่อให้เกิดความผิดปกติต่างๆ เช่น โรคชรา โรคหลอดเลือดและหัวใจขาดเลือด ผนังหลอดเลือดแข็งตัว (atherosclerosis) โรคเสื่อมของระบบต่างๆในร่างกาย รวมถึงการกลายพันธุ์ (mutation) ของเซลล์ ซึ่งอาจพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็งได้ ดังนั้นร่างกายจึงจำเป็นต้องมีระบบป้องกันไม่ให้อนุมูลอิสระทำลายได้ โดยจะมีกลไกในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยใช้สาร 2 ชนิด ได้แก่ สารที่เป็นเอนไซม์และสารที่ไม่ใช่เอนไซม์ ซึ่งเอนไซม์ในร่างกายเราที่ใช้ในการกำจัดอนุมูลอิสระมีอยู่อย่างจำกัด เราจึงต้องรับประทานสารกำจัดอนุมูลอิสระพวกที่ไม่ใช่เอนไซม์ สารดังกล่าว ได้แก่ สารต้านอนุมูลอิสระ หรือมีอีกชื่อว่า “Antioxidant”

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) คือ สารปริมาณน้อยที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ของอนุมูลอิสระได้ (Halliwell, B., 2009) สารเหล่านี้มีกลไกในการต้านอนุมูลอิสระหลายแบบ เช่น ดักจับ (scavenge) อนุมูลอิสระโดยตรง ยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระหรือเข้าจับ (chelate) กับโลหะ เพื่อป้องกันการสร้างอนุมูลอิสระ เป็นต้น ปกติร่างกายของคนเรานั้นจะมีสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติหลากหลายชนิดทั้งที่เป็นเอนไซม์ เช่น superoxide dismutase, catalase และ glutathione peroxidase เป็นต้น และสารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่เอนไซม์ เช่น urate, bilirubin และ transferrin เป็นต้น เนื่องจากสารเหล่านี้มีจำนวนจำกัด ดังนั้นเมื่อใดก็ตามที่มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นเกินกว่าจะกำจัดได้หมด อาจก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกายได้ นอกจากนี้พวกวิตามินบางชนิด เช่น บีตาแคโรทีน (β-carotene) วิตามินซี (vitamin C) วิตามินอี (vitamin E) รวมทั้งสารประกอบกลุ่ม polyphenols ต่างๆ ซึ่งมีรายงานพบมากในพืช ผัก ผลไม้ และสมุนไพรทั่วไป โดยจัดเป็นสารที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากแหล่งธรรมชาติที่ดีอีกกลุ่มหนึ่ง (Sies, S., 1991)

พืชและสมุนไพรเป็นแหล่งพฤกษเคมี (phytochemicals) ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญที่สุด ตัวอย่างของสารพฤกษศาสตร์เคมีที่สำคัญ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน แอนทราควิโนนไกลโคไซด์ (anthroquinone glycoside) มีฤทธิ์เป็นยาระบาย ต้านอักเสบและเพิ่มภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย แอลคาลอยด์มีฤทธิ์ต้านอักแสบและต้านมะเร็ง เป็นต้น ดังนั้น การศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากพืชและสมุนไพร จึงมีความสำคัญไม่เพียงแต่ให้ประโยชน์ในด้านการรักษาโรคเท่านั้น แต่ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับพืชและสมุนไพรชนิดนั้นด้วย ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ของสมุนไพรย่านาแดง เป็นสมุนไพรพื้นถิ่น ที่พบได้มากในเขตพื้นที่ จังหวัดกาฬสินธุ์ โดยพบว่า สมุนไพรย่านางแดงนี้ ถูกนำมาใช้เป็นวัตถุดิบของสูตรยาสมุนไพรที่ชาวบ้านใช้ต้มเป็นยารักษาโรคต่างๆ ที่มีการสืบทอดกันมายาวนานและใช้กันอย่างแพร่หลาย เช่น ใช้เป็นยาบำรุงโลหิตสำหรับสตรีหลังคลอด ขณะอยู่ไฟ ช่วยให้มดลูกเข้าอู่เร็วขึ้น เป็นต้น

เมื่อผู้วิจัยสอบถามชาวบ้านเกี่ยวกับการใช้สมุนไพรในชีวิตประจำวัน พบว่า สมุนไพรมีส่วนสำคัญในการนำมาใช้รักษาโรคเป็นอย่างมาก เนื่องจากชาวบ้านพบว่าเมื่อรับประทาน ยาสมุนไพรแล้วอาการป่วยจะทุเลาลงอย่างเห็นได้ชัด ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเห็นว่า สมุนไพรย่านางแดงนี้ อาจมีสารที่มีผลต่อสุขภาพ จึงสนใจนำมาศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

การศึกษาครั้งนี้ใช้วิธีการศึกษาสมบัติต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดังนี้คือ 1,1 diphenenyl-2-picryhydrazyl ($DPPH^{\bullet}$) radical scavenging activity การทดสอบหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธีโฟลิน-ซิโอแคลทู Folin – ciocalteu การทดสอบหาปริมาณฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี colorimetric aluminium chloride และทดสอบการฟอกสีอนุมูลอิสระหรือ $ABTS^{\bullet+}$ ซึ่งทดสอบกับสารสกัดจากสมุนไพรย่านางแดง *(Bauhinia strychnifolia Craib)*

1.2 วัตถุประสงค์งานวิจัย

เพื่อศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบโดยวิธี Diphenyl picrylhydrazyl scanvenging assay ($DPPH^{\bullet}$ assay) การทดสอบการฟอกสีอนุมูลอิสระหรือ $ABTS^{\bullet+}$ การทดสอบหาหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin – ciocalteu และการทดสอบหาปริมาณฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric ของสารสกัดที่ได้จากย่านางแดง *(Bauhinia strychnifolia Craib.)*

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 สมุนไพรที่ใช้ในการวิจัยคือ ย่านางแดง *(Bauhinia strychnifolia Craib.)*

1.3.2 สกัดตัวอย่างสมุนไพรโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย ซึ่งใช้เวลาและอุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

1.3.3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธี Diphenyl picrylhydrazyl scanvenging assay ($DPPH^{\bullet}$ assay) การทดสอบการฟอกสีอนุมูลอิสระหรือ $ABTS^{\bullet+}$ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโทรลอก และสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก การทดสอบหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin – ciocalteu เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก และการทดสอบหาปริมาณฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานเควอซิติน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ทราบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ของสารที่ได้จากตัวอย่างย่านางแดง

1.5 ตัวแปร

1.5.1 ตัวแปรต้น

- ย่านางแดง

1.5.2 ตัวแปรควบคุม

- ปริมาตรตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด
- ระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด
- วิธีทดสอบสมบัติทางชีวภาพ

1.5.3 ตัวแปรตาม

- ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$
- ปริมาณการฟอกสีอนุมูลอิสระหรือ $ABTS^{\bullet+}$
- ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก
- ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์

1.6 นิยามศัพท์เฉพาะ

ย่านางแดง (*Bauhinia strychnifolia Craib.*) คือ สมุนไพรพื้นบ้าน ที่ใช้ในการทำวิจัย

อนุมูลอิสระ (free radicals) หมายถึง อะตอม โมเลกุล หรือสารประกอบที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวอยู่ในออร์บิทัลวงนอกสุดที่มีระดับพลังงานสูง มีความว่องไวต่อปฏิกิริยาออกซิเดชันภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิต อันจะก่อให้เกิดความเสียหายต่อไขมัน โปรตีน และดีเอ็นเอที่ก่อให้เกิดโรค

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) หมายถึง สารที่ทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้อนุอิสระก่อตัวโดยจะทำการยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ และหยุดการก่อตัวใหม่ของอนุมูลอิสระช่วย ซ่อมแซมความเสียหายที่เกิดจากตัวอนุมูลอิสระที่ไปทำลายเซลล์ในร่างกาย รวมทั้งช่วยกำจัดและแทนที่โมกุลที่ถูกทำลาย

ตัวทำละลาย หมายถึง สารที่มีความสามารถในการทำให้สารต่างๆ ละลายได้โดยไม่ทำปฏิกิริยาเคมีกับสารนั้น

IC_{50} (50% Inhibitory Concentration) หมายถึง ปริมาณของสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ DPPH เหลืออยู่ 50% ซึ่งค่าที่มีค่าน้อยแสดงถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าค่าที่มีค่ามาก

สัญลักษณ์คำย่อ

g	กรัม
N	นอร์มอล
mg	มิลลิกรัม
mL	มิลลิลิตร
%w/v	ร้อยละโดยมวลต่อปริมาตร
%v/v	ร้อยละโดยปริมาตร
nm	นาโนเมตร
µg	ไมโครกรัม
mM	มิลลิโมลาร์
mg/L	มิลลิกรัมต่อลิตร
mg GEA/100 g Dw	มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อ 100 กรัม (น้ำหนักแห้ง)
mg QE/100 g Dw	มิลลิกรัมสมมูลเควอซิตินต่อ 100 กรัม (น้ำหนักแห้ง)
$DPPH^{\bullet}$	Diphenyl picrylhydrazyl scanvenging assay
$ABTS^{\bullet+}$	ABTS radical cation decolorization assay

1.7 สถานที่ดำเนินการวิจัย

ห้องปฏิบัติการเคมี อาคาร 10 ชั้น 3 คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏ-มหาสารคาม

1.8 ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

เริ่มทำการทดลองตั้งแต่เดือนเมษายน พ.ศ. 2558 และ สิ้นสุดการทดลองเดือนเมษายน พ.ศ. 2559

ตารางที่ 1.1 แผนการดำเนินการวิจัย

หัวข้อ	ระยะเวลาดำเนินงาน												
	เมษายน พ.ศ. 2558 – เมษายน พ.ศ. 2559												
	เมษายน	พฤษภาคม	มิถุนายน	กรกฎาคม	สิงหาคม	กันยายน	ตุลาคม	พฤศจิกายน	ธันวาคม	มกราคม	กุมภาพันธ์	มีนาคม	เมษายน
1. เขียนเค้าโครงการศึกษา	←	→											
2. เตรียมวัสดุและอุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่าง		←	—	→									
3. การเก็บตัวอย่างสมุนไพร					←	—	→						
4. วิเคราะห์ผลการศึกษา								←	—	→			
5. เขียนรายงานและทำรูปเล่ม											←	—	→

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลทั่วไป

2.1.1 อนุมูลอิสระ (free radical)

อนุมูลอิสระ (free radicals) เป็นสารที่มีโมเลกุลหรืออะตอมซึ่งมีอิเล็กตรอนอยู่เพียง 1 ตัว ในวงโคจรรอบนอกสุด ซึ่งปกติจะมีอิเล็กตรอนอยู่เป็นคู่ โครงสร้างอะตอมหรือโมเลกุลของอนุมูลอิสระจึงเขียนโดยมีจุดยกกำลัง ($^{\bullet}$) ไว้ทางด้านหน้าหรือด้านหลังอะตอมหรือโมเลกุลเสมอ จุดดังกล่าวเป็นสัญลักษณ์ของอิเล็กตรอนที่ไร้คู่ อนุมูลอิสระที่พบบ่อย เช่น hydroxyl free radical ($OH^{\bullet}$), superoxide radical ($O_2^{\bullet-}$) การมีอิเล็กตรอนไร้คู่ ทำให้โมเลกุลไม่เสถียร มีปฏิกิริยาว่องไวมาก สามารถทำปฏิกิริยาเคมีกับโมเลกุลอื่นได้ง่ายและทันที เพื่อดึงเอาอิเล็กตรอนหนึ่งตัวจากโมเลกุลหรือสารเหล่านั้นมาไว้ในตัวมันเอง ทำให้มีความคงตัวมากขึ้น ปฏิกิริยาเคมีในการลดอิเล็กตรอนหรือออกซิเดชัน (oxidation) คล้ายกับปฏิกิริยาที่เกิดสนิมเหล็ก คือ เหล็กเฟอร์รัส (Fe^{2+}) เหล็กเฟอร์ริก (Fe^{3+}) การดึงเอาอิเล็กตรอนหนึ่งตัวจากโมเลกุลใดๆ จะทำให้โมเลกุลหรือสารเหล่านั้นมีโอกาสที่จะกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่และไม่เสถียร จึงต้องหาทางดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นที่เสถียรมาไว้ต่อไปเรื่อยๆ จนเกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ออกซิเดชัน ซึ่งกระจายหรือขยายตัวออกไปมากขึ้นได้ หากขาดสารต้านอนุมูลอิสระ ปฏิกิริยาลูกโซ่จะไม่หยุดยั้ง และมีความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ปฏิกิริยาออกซิเดชันจะทำให้มีการทำลายชีวโมเลกุลต่างๆ เช่น ไขมันจะเปลี่ยนเป็น lipid peroxides โปรตีนจะเสียสภาพธรรมชาติ (denatured protein) หรือโครงร่างโพลิเมอร์โปรตีนที่ผิดปกติ พันธะจับคู่ระหว่าง DNA base pair จะเปลี่ยนการจับคู่กันและโครงสร้างเคมีของดีเอ็นเอจะแตกหักออกจากกัน เป็นต้น

2.1.2 สาเหตุการเกิดอนุมูลอิสระ

กระบวนการเผาผลาญอาหารหรือกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) มักเกิดโปร-ออกซิแดนท์ (prooxidant) ขึ้นได้ตลอดเวลา ซึ่งเป็นผลพลอยได้ของปฏิกิริยาเคมีและกิจกรรมของเซลล์ในร่างกายที่ต้องดำเนินตามปกติ โปรออกซิแดนท์ที่สำคัญคือ สารประกอบที่มีออกซิเจนในโมเลกุล เรียกว่า reactive oxygen species (ROS) ซึ่งเกิดขึ้นในกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนในระบบหายใจ เกิดออกซิเจนที่มีประจุลบเป็นผลผลิตสุดท้าย ในระบบสร้างภูมิคุ้มกันโรค เมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย เซลล์เม็ดเลือดขาวจะจับกินและออกซิไดซ์ออกซิเจน ให้ได้ออกซิเจนที่มีประจุลบ เพื่อใช้ในการสร้างสารที่มีฤทธิ์ทำลายสิ่งแปลกปลอมและ ROS ที่เกิดขึ้นในกลไกการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบ (นัยนา บุญทวียุวัฒน์, 2546 : อนันต์ สกุลกิม, 2551) สาร ROS ที่จัดอยู่ในประเภทของสารอนุมูลอิสระ ได้แก่ ซูเปอร์ออกไซด์ เรดิเคิล (superoxide radical; $O_2^{\bullet-}$), ไฮดรอกซิล เรดิเคิล (hydroxyl radical; $OH^{\bullet}$), อัลโคซิล เรดิคัล (alkoxyl radical; $RO^{\bullet}$) และไนตริกออกไซด์ เรดิเคิล (nitric oxide radical; $NO^{\bullet}$) สารประกอบเหล่านี้เป็นสารประกอบที่มีอิเล็กตรอนที่วงพลังงานรอบนอกของอะตอมออกซิเจนเป็นเลขคี่ จึงไม่คงตัวและไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับสารอื่น

2.1.2.1 ปัจจัยภายในร่างกาย

ในร่างกายของสิ่งมีชีวิตจะมีปฏิกิริยามากมายที่เกี่ยวข้องกับทั้งการสร้างและการสลายโมเลกุลของ สารที่เรียกว่ากระบวนการเมทาบอลิซึมซึ่งถือเป็นสาเหตุหลักอย่างหนึ่งที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ตัวอย่างปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระได้แก่

ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นเอง (auto-oxidation) (Nawar, W.W., 1996) เช่น การเกิดออกซิเดชันของไขมัน ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ

1) ระยะเหนี่ยวนำเริ่มต้น (initiation) เป็นระยะที่กรดไขมันแตกตัวเป็นอนุมูลอิสระโดยมีแสง หรืออุณหภูมิเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังสมการ

$$RH + \text{initiator} \xrightarrow[T]{\text{light}} R^{\bullet} + H^{\bullet} \qquad (1)$$

2) ระยะเพิ่มจำนวน (propagation) เป็นระยะที่อนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับออกซิเจนเกิดเป็นอนุมูลเปอร์ออกซี (peroxy radical) แล้วทำปฏิกิริยาต่อกับกรดไขมันเกิดเป็นไฮโดรเปอร์-ออกไซด์ (hydro peroxide) และอนุมูลอิสระ ซึ่งถ้ามีแสงและความร้อนเป็นตัวเร่งก็จะเกิดปฏิกิริยาต่อทำให้อนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น แล้วอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นก็สามารถทำปฏิกิริยากับออกซิเจนใหม่ได้ต่อเนื่องไปเรื่อยๆ ดังสมการ

$$RO^{\bullet} + O_2 \longrightarrow ROO^{\bullet} \qquad (2.1)$$

$$ROO^{\bullet} + RH \longrightarrow ROOH + R^{\bullet} \qquad (2.2)$$

3) ระยะสิ้นสุด (Termination) เป็นระยะที่อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นรวมตัวกันกลายเป็นโมเลกุลที่เสถียร ดังสมการ

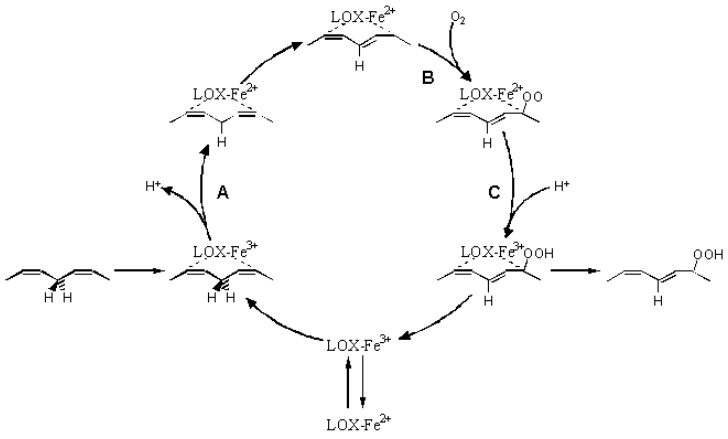
$$R^{\bullet} + R^{\bullet} \longrightarrow RR \qquad (3.1)$$

$$ROO^{\bullet} + ROO^{\bullet} \longrightarrow ROOR + O_2 \qquad (3.2)$$

ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง (Halliwell, B., 1995) การทำงานของเอนไซม์สำคัญ 2 ชนิด ที่มีผลกระตุ้นการสร้างอนุมูลอิสระภายในร่างกาย ได้แก่

1) เอนไซม์แซนธีนออกซิเดส (xanthine oxidase: XO) ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการสลายเบสพิวรีน (purine) โดยเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนไฮโพแซนธีน (hypoxanthine) เป็นแซนธีน (xanthine) และแซนธีนเป็นกรดยูริก (uric acid) พร้อมๆ กับเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนให้ออกซิเจนเกิดเป็นอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\bullet-}$)

2) เอนไซม์ไลโพออกซีจีเนส (lipoxygenase: LOX) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (polyunsaturated fatty acid) ภายในโมเลกุลของเอนไซม์นี้มีเหล็ก (Fe^{2+}) เป็นส่วนประกอบอยู่ ทำหน้าที่ดึงอะตอมไฮโดรเจนจากกรดไขมัน และเติมออกซิเจนให้กับกรดไขมันเกิดเป็นไฮโดรเพอรอกไซด์ ซึ่งจะสลายตัวเป็นอนุมูลของกรดไขมันต่อไป ดังแสดงในภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 การทำงานของเอนไซม์ lipoxygenase (LOX) ในปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมัน

กระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว (Konstan, M.W., 1993) ในขั้นตอนการทำลายสิ่งแปลกปลอม โดยเฉพาะเชื้อโรคที่ถูกกลืนกินเข้ามาภายในร่างกาย เซลล์เม็ดเลือดขาวจะมีการดึงโมเลกุลออกซิเจน (O_2) มาใช้เป็นจำนวนมาก เพื่อผลิตเป็นอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\bullet-}$) โดยการทำงานของเอนไซม์ NADPH ออกซิเดส (NADPH oxidase) ที่อยู่บนเยื่อบุชั้นนอก (outer membrane) ของเม็ดเลือดขาว ดังสมการ

$$2O_2 + NADPH \longrightarrow 2O_2^{\bullet-} + NADP^+ + H^+ \qquad (4)$$

นอกจากนี้ในเม็ดสี (granule) ของเม็ดเลือดขาวยังมีเอนไซม์ไมอีโลเทอรอกซีเดส (myeloperoxidase) ทำให้เกิดอนุมูลไฮโปคลอรัส (hypochlorus, $HOCl^{\bullet}$) ซึ่งเป็นสารที่ทำลายจุลชีพได้ ดังสมการ

$$H_2O_2 + Cl^- \longrightarrow HOCl^{\bullet} + OH^- \qquad (5)$$

โลหะทรานซิชัน (transition metal) (Halliwell, 1995) โลหะทรานซิชัน 2 ชนิด คือ เหล็ก (Fe^{2+}) และทองแดง (Cu^{2+}) ที่มีอยู่ทั่วไปในร่างกาย สามารถเร่งการสร้างอนุมูลไฮดรอกซิลจากซูเปอร์ออกไซด์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide, H_2O_2) ในปฏิกิริยา Fenton (Fenton's reaction) ดังสมการ

$$H_2O_2 + O_2^{\bullet-} + Fe^{2+} + / Cu^{2+} \longrightarrow OH^{\bullet} + OH^- + O_2 \qquad (6)$$

2.1.2.2 ปัจจัยภายนอกร่างกาย

ยารักษาโรค ยาบางชนิดที่รับประทานเข้าไป ในร่างกายสามารถก่อให้เกิดอนุมูลอิสระได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งยาในกลุ่มต้านจุลชีพและต้านมะเร็ง เช่น บลีโอไมซิน (bleomycin) แอนทราไซคลินส์ (antracyclines) (Voest, E.E., 1994) และเมโธทรีเสต (methotrexate) (Gressier, B., 1994) เนื่องจากมีฤทธิ์เสริมปฏิกิริยาออกซิเดชัน (prooxidation)

รังสี การใช้รังสีรักษาโรค เช่น รังสีเอกซ์และรังสีแกมมา เป็นสาเหตุทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในร่างกายจากการถ่ายทอดพลังงานให้กับน้ำ ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเซลล์แล้วก่อให้เกิด

ปฏิกิริยาขั้นต่อไป (secondary reaction) กับออกซิเจนที่ละลายอยู่ในเซลล์นั้นได้อนุมูลอิสระเกิดขึ้น (Halliwell, B., 1995)

ควันบุหรี่ ในควันบุหรี่มีส่วนประกอบของไนตริกออกไซด์ (NO) ไนโตรเจนออกไซด์ (NO_2) และเพอรอกซีไนไตรท์ ($ONOO^-$) รวมทั้งสารมลพิษ ได้แก่ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) และคาร์บอนเตรทตระคลอไรด์ (CCl_4) ซึ่งจะถูกกำจัดออกจากร่างกาย โดยการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครม P-450 ไฮดรอกซีเจส (cytochrome P-450 hydroxylase) ที่มีอยู่มากในเซลล์ตับ และพบได้บ้างในเซลล์ปอดและลำไส้เล็ก ทำให้เป็นสาเหตุของการสร้างอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ภายในเซลล์ดังกล่าว (Bast, A., 1991)

โอโซน โอโซนไม่ได้เป็นอนุมูลอิสระแต่จัดเป็นสารออกซิไดซ์แรงสูงซึ่งสามารถเปลี่ยนรูปเป็นอนุมูลไฮดรอกซิลได้จากการกระตุ้นของคลื่นแสง (Valacchi, G., 2004)

2.2 การป้องกันอันตรายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ

โดยธรรมชาติแล้วจะมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในเซลล์และร่างกายหลายชนิด มีทั้งที่เป็นประโยชน์และให้โทษ อันประกอบด้วยอนุมูลอิสระที่หลุดรอดออกมาจากการเผาผลาญออกซิเจนเป็นพลังงาน อนุมูลอิสระที่ทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณต่อเซลล์และอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์ต่อการทำงานของเซลล์หรืออวัยวะ ในกรณีหลังจะมีประโยชน์แต่ออกฤทธิ์ในปริมาณที่ต่ำมากไม่เกิดอันตรายต่อเซลล์และร่างกาย แต่จะเป็นอันตรายและเสียหาย หากมีอนุมูลอิสระในปริมาณมากเกินสมดุล ดังนั้นเซลล์และร่างกายจึงมีกลไกเพื่อควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระไม่ให้สูงจนเกิดอันตราย กลไกสำคัญที่ทำหน้าที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระมีกลไกหลักอยู่สามกลไก ทำหน้าที่ลดผลกระทบที่เป็นอันตรายของอนุมูลต่อเซลล์ ในสภาวะปกติกลไกเหล่านี้ถือว่าเพียงพอต่อการรักษาปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุลได้ กล่าวคือ สามารถควบคุมได้แม้ว่าจะมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้น อย่างไรก็ตาม หากเกิดภาวะผิดปกติที่ทำให้กลไกการป้องกันเหล่านี้บกพร่องจนไม่สามารถที่จะควบคุมภาวะสมดุลได้ จะนำไปสู่การเกิดภาวะที่อนุมูลและสารออกซิแดนทมีมากเกินสมดุล (Oxidative stress) และเกิดโรคต่างๆขึ้นในร่างกายได้

2.2.1 เอนไซม์ในระดับเซลล์

เอนไซม์เป็นกลไกสำคัญขั้นแรกที่ทำหน้าที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุล เอนไซม์ที่สำคัญ ได้แก่ เอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (SOD) เอนไซม์ SOD จะทำหน้าที่ขจัดอนุมูลอิสระเริ่มต้นที่เกิดขึ้นในร่างกายคือ อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน โดยเร่งปฏิกิริยาดิสมิวเตส ในการเปลี่ยนอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออนให้เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะถูกกำจัดต่อโดยเอนไซม์คาตาเลส และเอนไซม์กลูตาไทโอน-เปอร์ออกซิเดส SOD ในร่างกายมีหลายอโวฟอร์ม ลักษณะโครงสร้างที่สำคัญของเอนไซม์ SOD ทุกชนิดคือ มีโลหะทรานซิชันที่บริเวณที่ใช้จับซับสเตรท ทำหน้าที่โดยการออกซิไดส์และรีดิวซ์กลับไปกลับมา นอกจากนี้เอนไซม์ SOD ยังทำหน้าที่ปกป้องเอนไซม์ในกลุ่มดีไฮเดรส ได้แก่ เอนไซม์ไดไฮโดรแอซิดดีไฮเดรส เอนไซม์อะโคไนเตส เอนไซม์ฟอสโฟกลูโคเนตดีไฮเดรส เอนไซม์ฟูมาเรส-เอ และเอนไซม์ฟูมาเรส-บี ไม่ให้เอนไซม์เหล่านี้ถูกอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออนทำลาย

เอนไซม์คาตาเลส (CAT) เอนไซม์คาตาเลส เป็นเอนไซม์ซึ่งอยู่ในเปอร์ร็อกซิโซม มีฮีม คือ ferriprotoporphtrin เป็นองค์ประกอบ โครงสร้างเอนไซม์คาตาเลสประกอบด้วยหน่วยย่อยของ

โปรตีนฮีม 4 หน่วยย่อยที่เหมือนกัน แต่ละหน่วยมีขนาด 60 กิโลดาลตัน การจัดกรียงตัวของหน่วยทั้ง 4 เป็นแบบเตตระฮีดรัล ดังนั้นเอนไซม์นี้จึงมีฮีมจำนวน 4 กลุ่มต่อ 1 โมเลกุลของเอนไซม์ มีน้ำหนักโมเลกุลรวมเท่ากับ 240 กิโลดาลตัน เอนไซม์คาตาเลสทำหน้าที่เปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นโมเลกุลของน้ำและออกซิเจน โดยใน 1 นาที สามารถเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 1 ล้านโมเลกุลไปเป็นน้ำและออกซิเจน

เอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส (GPx) เอนไซมส์เปอร์ออกซิเดสจะมีธาตุซิลิเนียมเป็นองค์ประกอบสำคัญอยู่ในโครงสร้างของเอนไซม์ เอนไซม์ GPx ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยารีดักชันของสารประกอบไฮโดรเปอร์ออกไซด์ ได้แก่ ลิพิดเปอร์ออกไซม์ (ROOH) และไอโดรเจนเปอร์ไซม์ โดยมีการออกซิไดส์กลูตาไทโอน (GSH) ร่วมในปฏิกิริยาเฟนตัน ซึ่งเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ เอนไซม์นี้ปกป้องเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมไม่ให้ถูกทำลายหรือเสียหายจากภาวะที่ร่างกายถูกออกซิไดส์หรือมีอนุมูลอิสระมากเกินไป

2.3 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants)

สารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารที่เข้ามามีบทบาทช่วยต่อต้านสารที่เกิดขึ้นในขบวนการปฏิกิริยาชีวเคมีที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย ซึ่งจะมีการขับของเสียที่ร่างกายได้รับ ได้แก่ ควันบุหรี่ แอลกอฮอลล์ รังสี UV เอ็กซเรย์ ซึ่งสิ่งเหล่านี้เป็นอนุมูลอิสระที่มีอันตรายต่อเซลล์ในร่างกายที่อาจส่งผลให้เกิดโรคมะเร็ง โรคหัวใจ ภาวะข้อต่ออักเสบ และการเสื่อมของอวัยวะต่างๆ อนุมูลอิสระจะทำลายเนื้อเยื่อเซลล์ เปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ DNAs ด้วยเหตุนี้จึงเป็นการเพิ่มความเสี่ยงของการมีเซลล์มะเร็ง และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่นำไปสู่ขบวนการเกิดโรคมะเร็ง ในทางเคมีสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) คือ สารประกอบที่สามารถป้องกันหรือชะลอกระบวนการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้

กระบวนการออกซิเดชัน มีได้หลายรูปแบบ เช่น กระบวนการออกซิเดชันที่ทำให้เหล็กกลายเป็นสนิม ทำให้แอปเปิลเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล หรือทำให้น้ำมันพืชเหม็นหืน และกระบวนการออกซิเดชันที่เกิดในร่างกาย เช่น การย่อยสลายโปรตีนและไขมันจากอาหารที่กินเข้าไป มลพิษทางอากาศ การหายใจ ควันบุหรี่ รังสียูวี ล้วนแต่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในร่างกายของเราซึ่งสร้างความเสียหายต่อร่างกายได้ ในความเป็นจริงแล้ว ไม่มีสารประกอบสารใดสารหนึ่งสามารถป้องกันการเกิดออกซิเดชันได้ทั้งหมด แต่ละกลไกอาจต้องใช้สารต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันในการหยุดกระบวนการออกซิเดชันนั้นๆ เอาไว้ได้

2.3.1 ความสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระ

มีงานวิจัยมากมายที่สามารถบ่งชี้ว่า สารต้านอนุมูลอิสระสามารถลดความเสี่ยงต่อโรคต่างๆ โดยเฉพาะโรคเรื้อรังที่สัมพันธ์กับอาหาร เช่น โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคหัวใจ โรคสมอง (อัลไซ-เมอร์) เป็นต้น รวมทั้งช่วยชะลอกระบวนการบางขั้นตอนที่ทำให้เกิดความแก่ โดยปกติแล้วร่างกายสามารถกำจัดอนุมูลอิสระก่อนที่มันจะทำอันตรายต่อร่างกายเรา แต่ถ้ามีการสร้างอนุมูลอิสระเร็วหรือมากเกินกว่าร่างกายจะกำจัดทัน อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะสร้างความเสียหายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อได้ ซึ่งส่งผลกระทบต่อสุขภาพ สารต้านอนุมูลอิสระลดความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระได้ 2 ทาง คือ ลดการสร้างอนุมูลอิสระในร่างกาย และลดอันตรายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ

2.3.2 ประเภทของสารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ มีทั้งสารที่มาจากธรรมชาติ (natural antioxidants) และสารสังเคราะห์ (synthetic antioxidants) สารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากธรรมชาติ ได้แก่กรด-อะมิโน (amino acid) วิตามินซี (ascorbic acid) แคโรทีนอยด์ (carotenoids) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เมลานอยดิน (melanoidin) โทโคฟีรอล (tocopherol) แทนนิน (tannins) เปบไตด์ (peptides) และกรดอินทรีย์อื่นๆ ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นสารสังเคราะห์นั้นมีมากมายหลายชนิดตัวอย่างเช่น tert-butyl-4-hydroxytoluene (BHT) และ tert-butylthioquinone (TBHQ) เป็นต้น โดยทั่วไปสารต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งได้เป็น 5ประเภท (อัญชนา เจนวิถีสุข, 2545) ดังนี้

1) Primary antioxidant ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) และโทโคฟีรอล (tocopherol) รวมถึงสารโทโคฟีรอลสังเคราะห์บางชนิด เช่น alkyl gallate, BHA, BHT และ TBHQ เป็นต้น สารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มนี้จะทำหน้าที่หยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันโดยการให้อิเล็กตรอนแก่โมเลกุลของอนุมูลอิสระ ให้เป็นสารที่มีความเสถียร

2) Oxygen scavenger ได้แก่ วิตามินซี (ascorbic acid) และอนุพันธ์ เช่น ascorbyl palmitate, erythorbic acid (isoascorbic acid) และ sodium erythorbate สารในกลุ่มนี้จะเข้าทำปฏิกิริยากับออกซิเจน ซึ่งจะเป็นการกำจัดโมเลกุลของออกซิเจนส่วนเกินในระบบปิด

3) Secondary antioxidant ได้แก่ dilauryl thiopropionate และ thiopropinic acid เป็นต้น สารในกลุ่มนี้จะทำหน้าที่สลาย lipid hydroperoxide ให้กลายเป็นสารที่มีความเสถียร

4) Enzymic antioxidant ได้แก่ เอนไซม์ต่างๆ ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระ เอนไซม์เหล่านี้แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ primary antioxidant enzyme และ ancillary antioxidant enzyme ซึ่งสารเหล่านี้จะทำหน้าที่กำจัดออกซิเจนและอนุพันธ์ โดยเฉพาะไฮโดรเจน-เพอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

5) Chelating agent หรือ Sequestrant ได้แก่ กรดซิตริก (citric acid) กรดอะมิโน (amino acid) และethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA) เป็นต้น สารกลุ่มนี้จะทำหน้าที่จับกับไอออนของโลหะเช่น เหล็กและทองแดง ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระให้กลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีความเสถียร

2.3.3 แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระ

ปัจจุบันสารต้านอนุมูลอิสระโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ได้มาจากพืชผัก เครื่องเทศ องุ่น และสมุนไพร ได้รับความสนใจ และศึกษากันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากกระแสเรื่องความปลอดภัยของสารสกัดจากธรรมชาติ สารต้านอนุมูลอิสระแบ่งตามแหล่งที่มาได้ 2 ชนิดได้แก่

1) สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (Synthetic antioxidants) สารประกอบฟีนอลิก (phenolics) สังเคราะห์ 5 ชนิด ได้แก่ propyl gallate, 2-butylated hydroxyanisole, 3-utylate hydroxyanisole, BHT (butylated hydroxytoluene) และ tertiary butylhydroquinon เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน

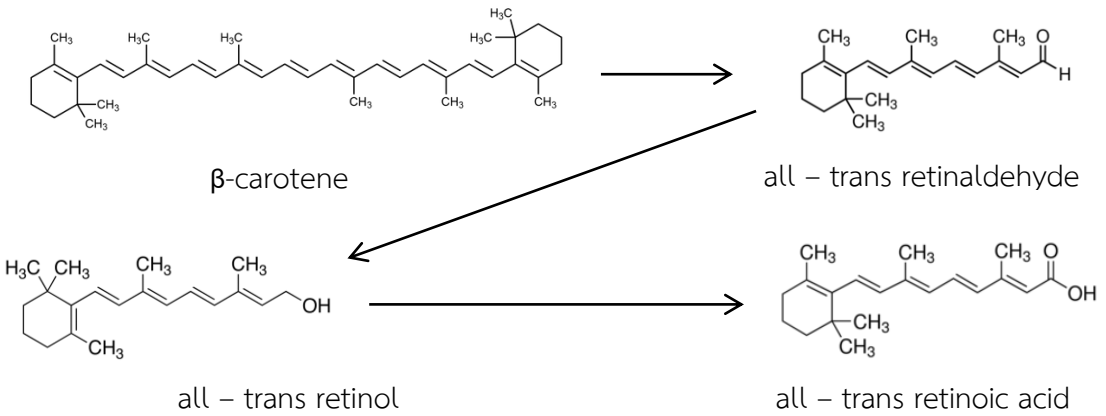
อันเป็นสาเหตุให้อาหารมีกลิ่น สี และรสชาติที่เปลี่ยนไป สารสังเคราะห์เหล่านี้มีประสิทธิภาพและความคงตัวสูงกว่าสารสกัดจากธรรมชาติ แต่มีข้อจำกัดของการใช้เนื่องจากปัญหาด้านความปลอดภัยในการบริโภค (Yang, J.H., 2000 : Pokorny, J., 2001)

2) สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (Natural antioxidants) สารกลุ่มนี้ได้รับความสนใจและมีการค้นคว้าอย่างมากในปัจจุบันเนื่องจาก ความเชื่อมั่นว่ามีความปลอดภัยในการบริโภคมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ พบได้ทั้งในจุลชีพ สัตว์ และพืช ซึ่งมีทั้งที่เป็นวิตามิน เช่น วิตามินซี วิตามินอี เบต้าแคโรทีน และสารที่ไม่ให้คุณค่าทางโภชนาการ (nonnutrient) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นสารประกอบฟีนอลิก โดยเฉพาะกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenols) เช่น แซนโธน (xanthone) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ซึ่งประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิลที่เกาะบนวงเบนซีน (aromatic hydroxyl) ตั้งแต่ 2 หมู่ขึ้นไป หมู่ฟังก์ชั่น (functional group) เหล่านี้ มีบทบาทสำคัญในการดักจับอนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้น หรือก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้โดยการให้อนุมูล $H^{\bullet}$ แก่อนุมูลอิสระเหล่านั้น นอกจากนี้สารประกอบโพลีฟีนอลที่มี โครงสร้างของ ortho-dihydroxyl phenol อยู่ในโมเลกุลยังสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูล $OH^{\bullet}$ ในปฏิกิริยาที่มีอนุมูลโลหะทรานซิชัน คือ Fe^{2+} และ Cu^{2+} เป็นตัวเหนี่ยวนำได้โดยการเข้าจับกับโลหะดังกล่าวเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (complex) (Sanchez-Moreno, C., 2000) สารประกอบกลุ่มโพลีฟีนอลซึ่งพบในพืชพรรณธรรมชาตินานาชนิด สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีทั้งในห้องปฏิบัติการ (in vitro) และในสิ่งมีชีวิต

2.1) ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติ

กลไกการยับยั้งปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระโดยสารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ จะแตกต่างกันออกไป ตามคุณสมบัติของสารนั้นๆ เช่น คุณสมบัติการละลายในน้ำหรือไขมัน (Le Prell, C.G., 2007) ดังตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ ต่อไปนี้

1) เบต้าแคโรทีน (β-carotene) เมื่อเข้าสู่เซลล์ (in vivo) เบต้าแคโรทีนจะเปลี่ยนเป็นวิตามินเอโดยการแตกหักของพันธะคู่ที่ตำแหน่งกึ่งกลางโมเลกุล ดังภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2.2 การสังเคราะห์วิตามินเอจากเบต้าแคโรทีน (อัญชนา เจนวิถีสุข, 2545)

ปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระของเบต้าแคโรทีนคือการกำจัด singlet oxygen ($^1O_2$) เพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไขมัน ดังสมการ

$$^1O_2 + {}^1\beta\text{-carotene} \longrightarrow {}^3O_2 + {}^3\beta\text{-carotene}$$

จากสมการจะเห็นว่า เมื่อเบต้าแคโรทีนทำปฏิกิริยากับ singlet oxygen ($^1O_2$) แล้วจะได้เป็น triplet oxygen ($^3O_2$) หรือออกซิเจนที่อยู่ในสภาวะพื้น (ground state) และβ-carotenyl radical ซึ่งเป็นสารที่มีความเสถียรและอยู่ในรูปเรโซแนนซ์ (อัญชนา เจนวิถีสุข, 2545)

2) วิตามินอี (tocopherols) ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต วิตามินอีจะปรากฏเป็นสารประเภทไขมัน (Le Prell, C.G., 2007) แบ่งย่อยได้ทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ α-tocopherol, β-tocopherol, ρ-tocopherol และ δ-tocopherol ขึ้นอยู่กับจำนวนและตำแหน่งของหมู่เมทิลที่ติดอยู่กับ chromane ring (อัญชนา เจนวิถีสุข, 2545) วิตามินอีมีคุณสมบัติเป็นโมเลกุลที่ให้อิเล็กตรอน (electron donor) ซึ่งจะทำปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) กับอนุมูลเพอรอกซิล (peroxyl radical) เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระในขั้นตอนโพรพาเกชั่น (propagation step) (Le Prell, C.G., 2007) ดังสมการต่อไปนี้

$$\alpha\text{-tocopherol} + LOO^{\bullet} \longrightarrow \alpha\text{-tocopherol}^{\bullet} + LOOH$$

$$\alpha\text{-tocopherol}^{\bullet} + LOO^{\bullet} \longrightarrow LOO\text{-}\alpha\text{-tocopherol}$$

จากสมการจะเห็นว่า เมื่อ α-tocopherol ทำปฏิกิริยากับอนุมูลเพอรอกซิลแล้ว จากนั้นจะเกิดอนุมูล α-tocopherol ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลเพอรอกซิลโมเลกุลอื่นและได้เป็นสารที่มีความเสถียร และหยุดปฏิกิริยาออกซิเดชันลง (อัญชนา เจนวิถีสุข, 2545)

3) วิตามินซี (ascorbic acid) สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระโดยการทำปฏิกิริยารีดักชัน ซึ่งปฏิกิริยาของวิตามินซีจะเกิดขึ้นภายในบริเวณของเซลล์ที่ประกอบไปด้วยน้ำ (aqueous phase) ซึ่งต่างกับปฏิกิริยาที่เกิดจากวิตามินอี ซึ่งเกิดขึ้นในเยื่อหุ้มองค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์ (Le Prell, C.G., 2007) ปฏิกิริยาในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระของวิตามินซีจะเกิดขึ้นดังสมการดังต่อไปนี้

$$AH^- + OH^{\bullet} \longrightarrow H_2O + A^{-\bullet}$$

$$AH^- + O_2^{-\bullet} + H^+ \longrightarrow H_2O_2 + A^{-\bullet}$$

$$AH^- + ROO^{\bullet} \longrightarrow ROOH + A^{-\bullet}$$

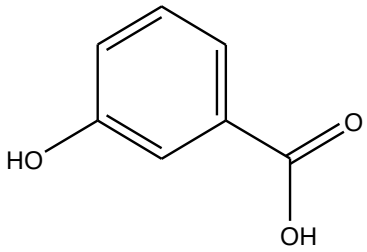
$$AH^- + H_2O_2 + H^+ \longrightarrow 2H_2O + A$$

จากสมการจะเห็นว่า วิตามินซีจะเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระและ ROS ได้สารที่เรียกว่า semidehydroascorbate ($A^{-\bullet}$) และ hydroascorbate (A) ซึ่งนอกจากวิตามินซีจะสามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระได้แล้ว ยังสามารถเสริมการทำงานของวิตามินอีได้ โดยการเข้าทำปฏิกิริยากับ α-tocopherol ทำให้อนุมูล α-tocopherol เปลี่ยนเป็น α-tocopherol เหมือนเดิม ดังสมการ (อัญชนา เจนวิถีสุข, 2545)

$$\alpha\text{-tocopherol}^{\bullet} + AH^- \longrightarrow \alpha\text{-tocopherol} + A^{-\bullet}$$

4) สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่พบได้ในพืชทั่วไป มีโครงสร้างหลักเป็นวงแหวนแอโรมาติก (aromatic ring) และมีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl

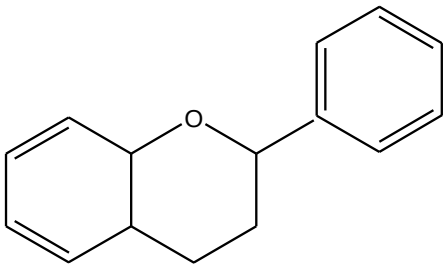
group) อยู่ในโมเลกุลอย่างน้อย 1 หมู่ มีคุณสมบัติละลายในน้ำได้ ส่วนมากพบรวมกับโมเลกุลของน้ำตาลในรูปสารประกอบไกลโคไซด์ (glycoside) สารประกอบฟีนอลิกในธรรมชาติมีหลายกลุ่ม และมีองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ลิกนิน (lignin) เมลานิน (melanin) และแทนนิน (tannin) เป็นต้น



ภาพที่ 2.3 สูตรโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิกทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระโดยเฉพาะอนุมูลเพอรอกซิล โดยทำให้อนุมูลอิสระกลายเป็นสารที่มีความเสถียร ช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาในขั้นตอนโพรพาเกชันและทำหน้าที่เป็น chelating agent ช่วยดักจับไอออนของโลหะซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) การเกิดอนุมูลอิสระไว้ในโมเลกุล อีกทั้งยังช่วยทำหน้าที่เป็นสารรีดิวซ์ ทำหน้าที่ให้ไฮโดรเจนและกำจัด ROS ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิก ขึ้นอยู่กับค่า redox potential ของหมู่ไฮดรอกซิลในโมเลกุล และคุณสมบัติเฉพาะตามโครงสร้างเคมีของสารดังกล่าว (อัญชนา เจนวิถีสุข , 2545)

5) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) สารฟลาโวนอยด์พบอยู่ทั่วไปในพืชที่มีสีเขียวและพบในทุกส่วนของพืชไม่ว่าจะเป็น ใบ ราก เนื้อไม้ เปลือกต้น ดอก ผล หรือเมล็ด ในสัตว์สามารถพบได้บ้าง โดยเชื่อว่ามาจากพืชที่บริโภคเข้าไปมากกว่าการเกิดชีวสังเคราะห์ในร่างกายของสัตว์เองฟลาโวนอยด์จัดเป็นสารสำคัญของกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenol) มีสูตรโครงสร้างหลักเป็นฟลาแวน (flavan) หรือ 2-ฟีนิลเบนโซไพแรน (2-phenylbenzopyran) ประกอบด้วยคาร์บอน 15 อะตอม ที่มีสูตรโครงสร้างพื้นฐานเป็น C_6-C_3-C_6 กล่าวคือ ประกอบด้วย substituted benzene rings จำนวน 2 หมู่ เชื่อมต่อกันด้วย aliphatic chain ของคาร์บอน 3 อะตอม และมีความแตกต่างกันตรง oxidation state ของ aliphatic chain ของอะตอมคาร์บอน 3 อะตอม



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างของฟลาโวนอยด์

2.4 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity determination)

วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสมารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ ในแต่ละประเภทจะมีหลายวิธีด้วยกัน ซึ่งแต่ละวิธีมีความจำเพาะแตกต่างกัน โดยปกติมักใช้หลายวิธีร่วมกันในการตรวจสอบและสรุปผล

2.4.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพ

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิง คุณภาพเป็นการทดสอบเพื่อหาชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในตัวอย่าง โดยอาศัยหลักการต่างๆ เช่น การทำให้เกิดสี การทำให้เกิดตะกอน ความสามารถของการละลายในตัวทำละลาย และการถูกดูดซับโดยตัวดูดซับ วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่นิยม ได้แก การตรวจวัดสารโพลีฟีนอลชนิดต่างๆ เช่น Shinoda test และ Pew test โครมาโทกราฟแบบชั้นบาง (thin layer chromatography, TLC) และการตรวจหาสารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ โดยใช้เครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC)

2.4.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ

1) การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (diphenylpicryhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay) เป็นการทดสอบด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระ ในที่นี้ก็คืออนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH$^{\bullet}$, Diphenyl-picryhydrazyl radical) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัว และมีสีม่วง สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดโดยใช้เครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เมื่อ DPPH$^{\bullet}$ ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายด้วยเอทานอล (สารที่ให้อิเล็กตรอน) จะทำให้สีม่วงจางลงๆ จนเป็นสีเหลือง ซึ่งก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงต้องตั้งทิ้งไว้ที่มืดเป็นเวลา 30 นาทีเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา ทำให้สามารถหาการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH$^{\bullet}$ สูตรคำนวณได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงจากการใส่ตัวอย่างเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น (ก่อนใส่สารตัวอย่าง) ดังนี้

$$DPPH^{\bullet} + AH \longrightarrow DPPH\text{-}H + A^{\bullet}$$

$$\text{DPPH radical scavenging (\%)} = [(A_0\text{-}A_s)/A_0] \times 100$$

โดย A_0 = คาการดูดกลืนแสงตั้งต้น

และ A_s = คาการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

2) การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS radical cation decolorization assay) เป็นวิธีการวัดความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS$^{\bullet+}$, 2,2′-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6sulfonic acid) radical) เป็นสารสังเคราะหที่มีสีเขียวปนน้ำเงิน สามารถดูดกลืนแสงไดสูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เนื่องจากสีของ ABTS$^{\bullet+}$ ปกติจะมีค่าการดูดกลืนแสงสูง จึงต้องทำการเจือจาง ABTS$^{\bullet+}$ ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นนำ ABTS$^{\bullet+}$ ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่ละลายด้วยเอทานอลเจือจางซึ่งจะทำให้สีจางลง และตั้งทิ้งไวเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา จึงสามารถหาความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างซึ่งได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS$^{\bullet+}$ โดยวิธีการคำนวณและการเทียบกับ

สารมาตรฐาน trolox กระทำเช่นเดียวกับวิธี DPPH$^{\bullet}$ ข้อดีของวิธีการนี้ คือ $ABTS^{\bullet+}$ ละลายไดดีในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ จึงทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว และทำปฏิกิริยาไดดีในช่วง pH กว้าง สวนข้อเสีย คือ $ABTS^{\bullet+}$ ไม่เป็นสารธรรมชาติที่พบในร่างกายหรือในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต และต้องมีการทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อนถึงจะเกิด เป็นอนุมูลอิสระ

$$ABTS^{\bullet+} + AH\ (antioxidant) \longrightarrow ABTS\ (สีจางลง) + A^{\bullet}$$

3) การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (ferricion reducing antioxidant power (FRAP) assay) วิธีการนี้อาศัยหลักการของสารต้านอนุมูลอิสระสามารถถ่ายเทอิเล็กตรอนให้กับสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe(III)\ (TPTZ)_2]^{3+}$ ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปเป็น $[Fe(II)\ (TPTZ)_2]^{2+}$ ซึ่ง $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ มีความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร วิธีการนี้เป็นวิธีที่ง่าย ใช้เวลาน้อย ไม่แพง และสามารถทำซ้ำแล้วให้ผลเหมือนเดิม แต่ข้อเสียคือ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นปฏิกิริยาเคมีที่ไมเกี่ยวข้องกับสภาวะร่างกาย และสารละลายที่ใช้อ้างอิง ต้องใช้น้ำปราศจากไอออน (deionized water)

$$[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+} \longrightarrow [Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$$

4) การวัดปริมาณฟีนอลรวม โดยวิธี Folin-Ciocalteu เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลรวมในพืชผัก ผลไม้ และเครื่องดื่มต่างๆ วิธีนี้จะอาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์ในการทำให้เกิดปฏิกิริยา เนื่องจาก molybdotung-state ion วิธี Folin-Ciocalteu ได้แก่ sodiumtungstate + sodiummolybdate + phosphoric acid และ sodium carbonate ติดตามการเปลี่ยนแปลงสีจากปฏิกิริยาไอออน Mo (VI) ซึ่งมีสีเหลือง เมื่อได้รับสารต้านออกซิเดชันแล้วจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ Mo (V) ซึ่งมีสีน้ำเงินเช่นเดียวกันกับปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น คือ

$$Na_2WO_4/Na_2MoO_4 \longrightarrow (phenol\text{-}MoW_{11}O_{40})^{-4}$$

$$Mo\ (VI) + e^{-} \longrightarrow Mo\ (V)$$

สีเหลือง สีน้ำเงิน

วิธี Folin-Ciocalteu สามารถติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยวัดค่า absorbance ที่ 725 นาโนเมตร การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลรวมในสารตัวอย่างจะใช้เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก ข้อดีของวิธีนี้ก็คือ สะดวก ง่าย รวดเร็ว และมีความแม่นยำ

5) การหาปริมาณฟลาโวนอยด์ เป็นการนำเอาสารละลายตัวอย่างมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเติม 10% อลูมิเนียมคลอไรด์ และ 5% โซเดียมไนไตรท์ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร และนำค่าการการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณฟลาโฟนอยด์จากสมการของกราฟสารละลายมาตรฐาน quercetin (calibration curve)

2.5 สมุนไพรพื้นบ้าน

พืชสมุนไพรพื้นบ้าน หมายถึง พืชที่ใช้ทำเป็นเครื่องยาซึ่งหาได้ตามพื้นบ้าน นิยมใช้ในการทำยา เป็นวัตถุดิบเบื้องต้นในการสกัดสารเคมีต่างๆ เพื่อใช้ในการผลิตยาแผนโบราณใช้ในการปรุงแต่ง กลิ่น รสและสีของอาหารใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ โดยส่วนมากเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่มีอยู่แล้วซึ่งประหยัดและมีราคาถูก

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมา กระแสในเรื่องความห่วงใยสุขภาพการป้องกันและรักษาอาการเจ็บป่วยกำลังเป็นสิ่งที่ผู้บริโภคให้ความสนใจเป็นอย่างมาก ผู้บริโภคในหลายๆ ประเทศทั่วโลกได้ให้ความสนใจในการนำสมุนไพรและผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรมารับประทานหรือเพื่อใช้บำรุงรักษาสุขภาพ ในหลายงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ได้พิสูจน์ว่า สารต้านอนุมูลอิสระมีบทบาทสำคัญในการลดความเสี่ยงจากการเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง และโรคหัวใจ สารต้านอนุมูลอิสระหรือสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) เป็นสารที่สามารถชะลอหรือป้องกันปฏิกิริยา ออกซิเดชันของสารที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาไม่ให้ทาลายสารชีวโมเลกุลในร่างกาย เช่น ดีเอ็นเอ ไขมัน โปรตีน เป็นต้น ซึ่งหากเกิดปฏิกิริยาจะนาไปสู่การเกิดโรคต่างๆ

สมุนไพร ซึ่งมีสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด เช่น สารประกอบฟีโนลิก (phenolic compounds) และวิตามินซี เป็นต้น สารที่อยู่ในกลุ่มสารประกอบฟีโนลิก ได้แก่ flavonoids, flavones, gallic acid, ellagic acid, anthocyanins, carotenoids และอนุพันธ์ของ cinnamic acid สารเหล่านี้พบมากน้อยต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของพืช สารต้านอนุมูลอิสระพวกนี้ทำให้พืชมีภูมิคุ้มกันจากการติดเชื้อต่างๆ และสามารถทนต่อปฏิกิริยา photooxidation ในการสร้างอาหารได้ (วาริน แสงกิตติโกมล, 2546) สารประกอบฟีโนลิกนอกจากจะมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระแล้ว ยังมีคุณสมบัติอื่นๆ เช่น ช่วยขยายหลอดเลือด ลดการอักเสบ กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ต้านมะเร็ง ต้านโรคภูมิแพ้ ทำลายเชื้อโรคที่เข้าสู่ร่างกาย

สารเคมีที่แยกสกัดได้จากสมุนไพรนั้นได้ถูกจำแนกออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ primary metabolite และ secondary metabolite ซึ่ง primary metabolite เป็นสารที่พบได้ในพืชทุกชนิด เป็นผลิตผลที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสง (photosynthesis) เช่น คาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโนและไขมัน ส่วน secondary metabolite นั้น ในพืชแต่ละชนิดจะพบไม่เหมือนกัน secondary metabolite จะมีสารเริ่มต้นเป็นกรดอะมิโน (amino acid) อะซีเตท (acetate) มีวาโลเนท (mevalonate) ฯลฯ โดยมีเอนไซม์เข้ามาเกี่ยวข้อง ซึ่งพืชต่างชนิดกันมักจะมีเอนไซม์ที่ไม่เหมือนกัน ทำให้วิถีทางในกระบวนการชีวสังเคราะห์ (biosynthesis) ต่างกันไป และได้สารประเภท secondary metabolite ต่างกันไปในต้นไม้ต่างชนิดกันหรือต่างฤดู

ย่านางแดง

ภาพที่ 2.5 ย่านางแดง (www.phargarden.com)

ชื่อสมุนไพร ย่านางแดง

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Bauhinia strychnifolia Craib.*

ชื่อวงศ์ Craib Fabaceae (Leguminosae-Caesalpinoideae)

ชื่อสามัญ/ชื่ออื่น เครือขยัน ขยัน สยาน ขยาน

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ต้น เป็นไม้เถาเลื้อยค่อนข้างแข็ง ขนาดใหญ่มีเหง้าหัวใต้ดิน เถายาวประมาณ 4-10 เมตร สีน้ำตาลเกลี้ยงพาดตามต้นไม้อื่น กิ่งแขนแขนงแยกออกจากง่ามใบสลับกันไปเป็นระเบียบ ตามปลายกิ่งแขนงมีมือม้วนเป็นคู่ๆ ตรงข้ามกับสำหรับเกาะยึด

ใบเดี่ยว เรียงสลับมีหูใบเล็กๆ 1 คู่ๆ ใบรูปขอบขนานหรือรูปไข่มนรี ขนากกว้าง 3-6 เซนติเมตร ยาว 6-12 เซนติเมตร โคนใบหยักเว้าเล็กน้อย ปลายใบสอบแคบหรือแหลม ผิวใบเกลี้ยงและเป็นมันสีเขียว เส้นแขนงใบสีแดงคล้ำ ใบยอดอ่อนสีออกแดง

ดอก ออกเป็นช่อยาวเรียวตามปลายกิ่ง ดอกเป็นหลอดกลวงโค้งเล็กน้อย ปลายบานห้อยลงคล้ายกับดอกประทัดจีนมีจำนวนมาก ช่อหนึ่งยาว 50-100 เซนติเมตร ดอกลู่มาทางโคนช่อแผ่ออก 2 ข้างของก้านช่อ กลีบรองดอกสีแดง โคนกลีบเชื่อมติดกันเป็นกรวยปลายแยกเป็นแฉกแหลมๆ 5 แฉก กลีบดอกสีแดงคล้ำ

ผล เป็นฝักแบนๆ มีขนสีน้ำตาลนุ่มคล้ายฝักฝาง สีเขียวอ่อน

สรรพคุณยาไทย

เหง้า ใช้ฝนกับน้ำหรือน้ำซาวข้าวหรือต้มดื่ม ใช้กระทุ้งพิษไข้ กินแก้พิษยาเบื่อเมา ยาสั่ง ยาสำแดง ถอนพิษ และแก้พิษไข้ทั้งปวง ขับพิษโลหิตและน้ำเหลือง แก้ท้องผูก

เถาย่างนางแดง ใช้ดับพิษร้อน ถอนพิษไข้ แก้พิษทั้งปวง พิษเบื่อเมา ถอนพิษผิดสำแดง แก้ไข้พิษ ไข้กาฬ ไข้หัว ไข้เซื่องซึม ไข้สุกใส ไข้ป่าเรื้อรัง ไข้ทับระดู บำรุงหัวใจ แก้โรคหัวใจบวม บำรุงธาตุ แก้ท้องผูกไม่ถ่าย (ฐานข้อมูลคณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 2557)

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

นิวัติ แก้วประดับ (2548) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ความเป็นพิษของสมุนไพรขมิ้นเครือในภาคใต้ 3 ชนิด คือ *Arcangelisia flava, Coscinium blumeanum* และ *Fibraurea tinctoria* โดยสกัดสมุนไพรด้วยตัวทำลาย 4 ชนิด คือ ปิโตรอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม เมทานอล และน้ำ (เรียงจากความเป็นขั้วจากน้อยไปมาก) ได้สารสกัด 12 ตัวอย่าง ซึ่งทดสอบด้วยวิธี DPPH$^{\bullet}$ (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) scavenging assay พบว่า สารสกัดด้วยเมทานอลของ A.flava สารสกัดด้วยเมทานอลและคลอโรฟอร์มของ C. blumeanum มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี โดยมีค่า EC_{50} ในช่วง 25-55 μg/mL ในขณะที่สารสกัดด้วยคลอโรฟอร์มของพืชทั้ง 3 ชนิด และสารที่สกัดด้วยเมทานอลของ A. flava และ C. blumeanum มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง MCF-7 ซึ่งมีค่า IC_{50} ในช่วง 8-12 μg/mL จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ สามารถแยกได้ 4 ชนิด คือ palmatine, jatrorrhizine, berberine และ triacontanyl caffeate จากผลการทดลองพบว่า palmatine, jatrorrhizine, berberine แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 ได้ดี ซึ่งมีค่า IC_{50} ในช่วง 37-206 μg/mL ส่วน triacontanyl caffeate มีฤทธิ์ที่ต่ำกว่า ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 15.5 μg/mL

โสภณ เริงสำราญ (2552) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการสกัดแยกองค์ประกอบทางเคมีจากเปลือกของต้นเปล้าใหญ่จากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ พบว่า สามารถแยกสารประกอบไดเทอร์พีนอยด์ได้ 2 ชนิด คือ Kaur-16-en-19-oic acid และ (-)-hardwickiic acid จากจังหวัดราชบุรีได้ 3 ชนิด คือ acanthoic acid (3), acanthol (4) และ (–)-hardwickiic acid (2) จากจังหวัด นครสวรรค์ได้ 3 ชนิด คือ kaur-16-en-19-oic acid (1), labda-7,12(E),14-triene-17-ol (9) และ labda-7,12(E),14-triene-17-oic acid (10) ซึ่งสาร 1-4 และ 9-10 ดังกล่าวข้างต้น เป็นสารที่เคยมีการรายงานไว้แล้ว ส่วนเปล้าใหญ่จากจังหวัดน่านแยกสารประกอบไดเทอร์พีนอยด์ชนิดใหม่ได้ 2 สาร คือ (5α, 8β, 9α, 10β, 14α)-cleistantha-13 (17), 15-dien-3β-ol (5) และ 3,4-*seco*-cleistantha-4(18),13(17),15-trien-3-oic acid (6) และได้สังเคราะห์อนุพันธ์ 2 ชนิด จากสาร 6 โดยปฏิกิริยาอีพอกซิเดชัน คือ 13,17-epoxy-3,4-*seco*-cleistantha-4 (18), 15-dien-3-oic acid (7) และ 14-epoxypimara-4 (18), 15-dien-3-oic acid (8) และได้นำสาร 5-8 มาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้ง เซลล์มะเร็ง 5 ชนิด คือ KATO-3 (กระเพาะอาหาร), SW620 (ลำไส้), BT474 (เต้านม), HEP-G2 (ตับ) และ CHAGO (ปอด) พบว่าสาร 5 มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง SW620, KATO-3, HEP-G2 และ CHAGO โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.5, 6.0, 6.1 และ 5.5 μg/mL ตามลำดับ สาร 6 มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด SW620 และ KATO-3 เพียงเล็กน้อย โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.6 และ 9.6 μg/mL ตามลำดับ ส่วนสาร 7 และ 8 ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้ง 6 ชนิด

ศิริกุญญา สยมภาค (2555) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และวิเคราะห์หาปริมาณสารในกลุ่มฟีนอลจากสารกัดของใบย่านางแดงที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ โดยการนำสมุนไพรย่านางแดงมาสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอล (ร้อยละ 50 และ 95) ซึ่งสกัดด้วยวิธีดังนี้ DPPH radical assay Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay และหาปริมาณสารในกลุ่มฟีนอลด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorometric method จากการศึกษาพบว่า ใบย่านางแดงที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 50 มีปริมาณสารในกลุ่มฟีนอลสูงที่สุด (199.58 mg GAE/g) ในขณะที่ใบย่านางแดงที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ซึ่งมีค่า EC_{50} เท่ากับ 6.50 µg/mL, FRAP value เท่ากับ 1,027.00 mg Fe(II)/g และ TEAC value เท่ากับ 295.26 mg Trolox/g ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่า สารสกัดจากใบย่านางแดงมีปริมารสารในกลุ่มฟีนอลสูงและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดี ซึ่งการศึกษาครั้งนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพ และเป็นข้อมูลพื้นฐานในการวิเคราะห์หาสารที่สำคัญในใบย่านางแดงต่อไป

Muraoka, O. (2010) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูซิเดสในลำไส้-เล็กของหนูทดลองทั้งสองชนิด พบว่า สารที่สกัดด้วยน้ำจากลำต้นและรากของกำแพงเจ็ดชั้น มีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูซิเดสในลำไส้เล็กของหนูทดลองทั้งสองชนิด โดยสามารถยับยั้งเอนไซม์ซู-เครส ซึ่งมีค่า IC_{50} ของลำต้นและรากเท่ากับ 36.5, 57.9 µg/mL ตามลำดับ และสามารถยับยั้งเอนไซม์มอลเตส ซึ่งมีค่า IC_{50} ของลำต้นและรากเท่ากับ 87.3, 157.7 µg/mL ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่า ลำต้นของกำแพงเจ็ดชั้นมีฤทธิ์การยับยั้งได้ดีกว่าราก โดยพบว่าสารที่มายับยั้งคือ salacinol และ kotalanol

Chavan, J..J. (2012) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลกำแพงเจ็ดชั้น โดยนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน (เมทานอล เอทานอล อะซิโตนและน้ำ) และนำมาวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลรวม (TPC) และฟลาโวนอยด์ (TFC) ตลอดจนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (AOA) โดยใช้วิธีดังนี้ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl ($DPPH^{\bullet}$), Ferric reducing antioxidant power (FRAP) และวิธีการจับโลหะ จากผลการทดลองพบว่า ผลของกำแพงเจ็ดชั้นที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล มีปริมาณฟีนอลรวมสูงที่สุด (3.20±0.12 mg GAE/g FW) ในขณะเดียวกันผลของกำแพงเจ็ดชั้นที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงที่สุด (0.31±0.68 mg RE/g FW) และยังพบว่า สารที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ดังนี้ การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี $DPPH^{\bullet}$ (92.44%), FRAP (1.939 O.D) และวิธีการจับโลหะ (74.16%) ซึ่งจะเห็นได้ว่า การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี $DPPH^{\bullet}$ และ FRAP มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญกับปริมาณฟีนอลรวม จึงสรุปได้ว่า ผลของกำแพงเจ็ดชั้นเป็นแหล่งของสารประกอบฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติที่ดี และสามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยาได้

Sellamuthu, P.S. (2012) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์การลดระดับน้ำตาลในเลือด พบว่า สารแมงจิเฟอริน (mangiferin) ที่สกัดได้จากลำต้นของกำแพงเจ็ดชั้น มีฤทธิ์การลดระดับน้ำตาลใน

เลือด โดยทดสอบในหนูที่ถูกระตุ้นให้เป็นเยาหวานด้วยสารเคมี Streptozotocin (STZ) พบว่าสามารถเพิ่มการหลั่งอินซูลินจาก β-cell ของตับอ่อน ทำให้ระดับอินซูลินในกระแสเลือดเพิ่มขึ้น และระดับน้ำตาลในเลือดลดลงใกล้เคียงกับยามาตรฐาน โดยศึกษาในไตของหนูทดลอง เมื่อป้อนหนูเพศผู้ที่เป็นเบาหวานด้วยสารแมงจิเฟอรินในขนาด 40 mg/kg b.wt เป็นเวลา 30 วัน พบว่าระดับน้ำตาลในเลือด 102.25 mg/dL (เทียบกับยามาตรฐาน glibenclamide วัดได้ 99.28 mg/dL) และปริมาณอินซูลินที่หลั่งออมาในพลาสมาวัดได้ 12.76 μg/mL (เทียบกับยามาตรฐาน glibenclamide วัดได้ 13.68 mg/dL)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สมุนไพรตัวอย่าง

3.1.1 ย่านางแดง (*Bauhinia strychnifolia Craib.*) (ลำต้น)

3.2 อุปกรณ์ สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

3.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

3.2.1.1 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

3.2.1.2 เครื่องบดสมุนไพร

3.2.1.3 ถุงซิปล็อก

3.2.1.4 ผ้าขาวบาง

3.2.1.5 ไม้พาย

3.2.1.6 หม้อ

3.2.1.7 Hot Plate

3.2.1.8 แท่งแก้ว (stirring rod)

3.2.1.9 ขวดสีชา

3.2.1.10 กรวยกรอง

3.2.1.11 กระบอกตวง

3.2.1.12 ขวดสีชา 45 mL

3.2.1.13 ตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ -4 °C

3.2.1.14 โถดูดความชื้น (desiccator)

3.2.1.15 บีกเกอร์ (Beakers) ขนาด 50, 150, 600 mL

3.2.1.16 ไมโครปิเปตขนาด 1000 µL

3.2.1.17 หลอดทดลอง (test tube)

3.2.1.18 ช้อนตักสาร (spatula)

3.2.1.19 อลูมิเนียมฟอยด์ (aluminium foil)

3.2.1.20 ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 25, 50, และ 100 mL

3.2.1.21 ปิเปต (pipette) ขนาด 5, 10 และ 25 mL

3.2.1.22 กระดาษชำระ

3.2.1.23 จุกยาง

3.2.1.24 หลอดหยด

3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย แสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมี	สูตรโมเลกุล	มวลโมเลกุล (g/mol)	บริษัท
เอทานอล	C_2H_6O	46.07	Carlo erba
2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH$^{\bullet}$)	$C_{18}H_{12}N_5O_6$	394.99	Fluka
กรดแกลลิก	$C_7H_6O_5$	170.12	J.T.Baker
โฟลิน – ซิโอแคลทู	-	270.30	Fluka
กรดแอสคอร์บิค	$C_6H_8O_6$	176.14	Carlo erba
โซเดียมคาร์บอเนต	Na_2CO_3	106.0	Carlo erba
เควอซิทิน	$C_{15}H_{10}O_7$	302	Carlo erba
โซเดียมไนไตรด์	$NaNO_2$	84.99	Carlo erba
อลูมิเนียมคลอไรด์	$AlCl_3 \cdot 6H_2O$	240	Carlo erba
Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethy lchlorman-2-carboxylic acid)	$C_{14}H_{18}O_4$	250	Carlo erba
2,2'-azino-bis(3-thylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS$^{\bullet+}$)	$C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$	514.62	Sigma

3.2.3 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย แสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือ	รุ่น	บริษัท
เครื่อง UV-Vis spectrophotometer	Lambda 12	Perkin Elmer
เครื่อง Hot Plate Magnetic Stirrer	Jenway 1103	THERMO FISHER SCIENTIFIC INC, UK
เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง	OHAUS PA4102	OHAUS CORPORATION, USA
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	OHAUS MODEL PA214	PRECISA Co.,Ltd
ตู้อบความร้อน (hot air oven)	model UNE 500	Scilution Co.,Ltd

3.3 การเตรียมตัวอย่างและสารเคมี

3.3.1 การเตรียมอุปกรณ์และห้องสำหรับการทดลอง
ทำความสะอาดห้องและเตรียมอุปกรณ์สำหรับการทดลองให้เรียบร้อย

3.3.2 วิธีการเก็บตัวอย่าง
ย่านางแดง ที่เก็บได้จาก เขาภูสิงห์ อำเภอสหัสขันธ์ จังหวัดกาฬสินธุ์ ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียม ดังนี้

3.3.2.1 นำย่านางแดง มาล้างด้วยน้ำสะอาด นำไปตากให้แห้งจนน้ำหนักคงที่ จากนั้นนำไปบดหยาบด้วยเครื่องบดสมุนไพรแล้วเก็บย่านางแดงที่บดใส่ถุงซิปล็อก

3.3.2.2 นำไปชั่งน้ำหนักและจดบันทึกไว้

3.3.3 การเตรียมสารสกัดหยาบของย่านางแดง

3.3.3.1 การเตรียมย่านางแดงที่สกัดด้วยน้ำ

1) นำย่านางแดง ไปต้มด้วยน้ำสะอาด เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองสารโดยใช้ผ้าขาวบาง แล้วนำน้ำที่กรองได้ มาเคี่ยวเป็นเวลา 8 ชั่วโมง จนได้สารสกัดที่มีลักษณะข้นหนืด และเก็บสารสกัดย่านางแดงที่ได้ในขวดสีชาขนาด 45 mL

2) ปิดขวดสารสกัดย่านางแดงที่ได้ด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ที่เจาะรูรอบๆ จากนั้นนำไปอบในตู้อบความร้อน ที่อุณหภูมิ 60 ˚C เป็นเวลา 2 วัน เพื่อให้น้ำที่เหลือระเหยไปจนหมด จะได้สารสกัดหยาบของย่านางแดง นำไปเก็บไว้ในโถดูดความชื้น เพื่อให้สารตัวอย่างเย็นลง

3) นำไปชั่งน้ำหนักบันทึกค่าไว้ ทำเหมือนกันในทุกตัวอย่างและนำสารสกัดหยาบย่านางแดงมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -4 °C เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

3.3.3.2 การเตรียมตัวอย่างเพื่อทำการวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่างมา 0.1 กรัม ความเข้มข้น 1,000 mg/L ละลายด้วยน้ำ DI และปรับปริมาตรเป็น 100 mL เพื่อเป็น Stock ที่จะใช้นำไปวิเคราะห์

3.3.3.3 การเตรียมสารที่ใช้ในการทดลอง

1) เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่มีความเข้มข้น 100 mg/L โดยการ ชั่งกรดแกลลิกมา 0.0050 g ละลายในน้ำกลั่น 10 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI จนครบ 50 mL

2) การเตรียมสารละลายโฟลิน-ซิโอแคลทู (Folin-Ciocalteu) ความเข้มข้น 0.2 N โดยการปิเปตสารละลายโฟลิน-ซิโอแคลทู จากความเข้มข้น 2 N มา 10 mL และปรับปริมาตรเป็น 100 mL ด้วยน้ำ DI

3) การเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 10 %w/v โดยการชั่งโซเดียมคาร์บอเนตมา 10 g ละลายด้วยน้ำ DI และปรับปริมาตรเป็น 100 mL

4) การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 100 mg/L โดยการชั่งกรดแอสคอร์บิค มา 0.0100 g ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI เป็น 100 mL

5) การเตรียมสารละลาย DPPH$^{\bullet}$ ความเข้มข้น 0.1 mM โดยการชั่ง DPPH$^{\bullet}$ มา 0.039 g ละลายในเอทานอล และปรับปริมาตรเป็น 1000 mL ด้วยเอทานอล

6) การเตรียมสารลายมาตรฐานเควอซิทินความเข้มข้น 500 mg/L โดยการชั่งเควอเซติน มา 0.025 g ละลายด้วยเอทานอลและปรับปริมาตรเป็น 50 mL ด้วยเอทานอล

7) การเตรียมโซเดียมไนไตรด์ ($NaNO_2$) 5 %w/v โดยการชั่งโซเดียมไนไตรด์ มา 12.5 g ละลายด้วยน้ำ DI และปรับปริมาตรเป็น 250 mL

8) การเตรียมอะลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3 \cdot 6H_2O$) 10 %w/v โดยการชั่งอลูมิเนียมคลอไรด์ 10 g ละลายด้วยน้ำ DI และปรับปริมาตรเป็น 100 mL

9) การเตรียมสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) โดยผสม 7 mM $ABTS^{\bullet+}$ กับ 2.45 mM $K_2S_2O_8$ (Dipotassium peroxodisulphate) ให้เข้ากัน แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน $ABTS^{\bullet+}$: น้ำ เท่ากับ 1 : 4.2 วัดค่าการดูดกลืนแสงให้อยู่ในช่วง 0.7-0.9 ที่ความยาวคลื่น 734 nm

10) การเตรียมสารละลายมาตรฐานโทรลอก 100 mg/L โดยการชั่งโทรลอกมา 0.01 g ปรับปริมาตรด้วยเอทานอลให้เป็น 100 mL

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 วิธีการวัดฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจากย่านางแดงเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคและสารมาตรฐานโทรลอก ด้วยวิธี $DPPH^{\bullet}$ (Diphenyl picrylhydrazyl canvenging assay) (ดัดแปลงมาจากวิธีของ Zhang *et al*., 2007)

3.4.1.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างย่านางแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ มา 1.5 mL ใส่ลงในหลอดทดลองความเข้มข้นละ 3 หลอด

3.4.1.2 เติมสารละลาย $DPPH^{\bullet}$ 0.1 mM 1.5 mL ลงในหลอดทดลอง

3.4.1.3 เขย่าให้เข้ากันและเก็บไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที

3.4.1.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer บันทึกค่าที่ได้จากการทดลอง

3.4.1.5 สร้างกราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค และกราฟมาตรฐานโทรลอก

1) ปิเปตสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคที่ความเข้มข้น 100 mg/L (stock standard solution) มาเพื่อเตรียมสารละลายเข้มข้นดังนี้ 0, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5 และ 10 mg/L โดยแต่ละความเข้มข้นเตรียมที่ปริมาตร 100 mL จากนั้นปิเปตสารละลายที่ความเข้มข้นต่างๆ* มา 1.5 mL

2) ปิเปตสารมาตรฐานโทรลอกที่ความเข้มข้น 100 mg/L (stock standard solution) มาเพื่อเตรียมสารละลายเข้มข้นดังนี้ 0, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5 และ 10 mg/L โดยแต่ละความเข้มข้นเตรียมที่ปริมาตร 100 mL จากนั้นปิเปตสารละลายที่ความเข้มข้นต่างๆ มา 1.5 mL

3) เติมสารละลาย $DPPH^{\bullet}$ 0.1 mM 1.5 mL ลงในหลอดทดลอง

4) เขย่าให้เข้ากันและเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที

5) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer บันทึกค่าที่ได้จากการทดลอง จากนั้นนำค่าที่ได้ไปหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%inhibition) โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคและสารมาตรฐานโทรลอก คำนวณดังสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (\%inhibition)} = \left[\frac{(A_0-A_S)}{A_0}\right] \times 100$$

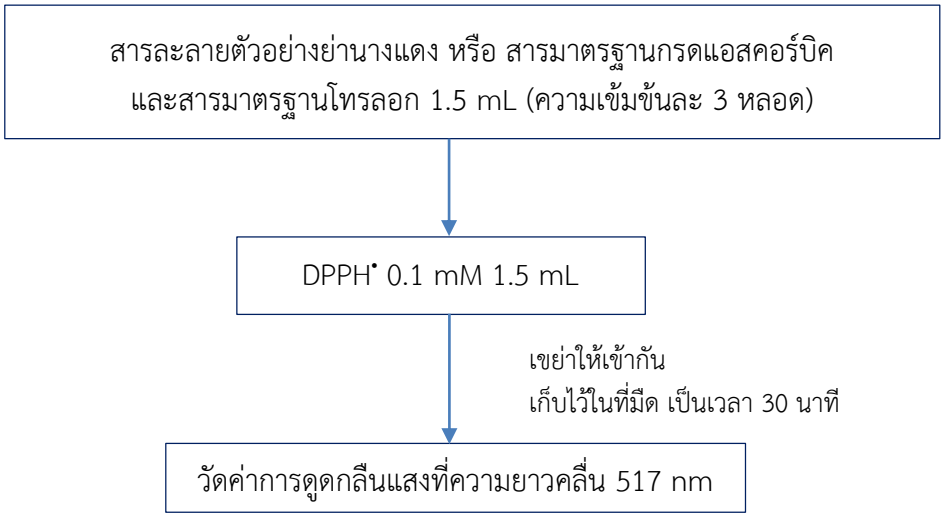
เมื่อ

A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงของแบลงค์ (เอทานอล + อนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$)

A_S = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง (สารตัวอย่าง + อนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$)

แล้วรายงานผลเป็นค่า IC_{50} เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคและสารมาตรฐานโทรลอก

สรุป วิธีการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดย่านางแดงเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคและสารมาตรฐานโทรลอก ด้วยวิธี $DPPH^{\bullet}$ (Diphenyl picrylhydrazyl scanvenging assay)



ตารางที่ 3.3 ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เตรียมของวิธี $DPPH^{\bullet}$

Sample	ความเข้มข้น (mg/L) ที่เตรียม
ย่านางแดง	0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 และ 15
กรดแอสคอร์บิค	0, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5 และ 10
โทรลอก	0, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5 และ 10

3.4.2 วิธีการทดสอบการฟอกสีอนุมูลอิสระจากสารสกัดย่านางแดงเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคและสารมาตรฐานโทรลอก ด้วยวิธี $ABTS^{\bullet+}$ (ABTS radical cation decolorization assay) (ดัดแปลงมาจากวิธีของ Roberta *et al.*, 1999)

3.4.2.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างย่ายางแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ มา 1.5 mL ใส่ลงในหลอดทดลอง ความเข้มข้นละ 3 หลอด

3.4.2.2 เติมสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ เจือจาง 1.5 mL ลงในหลอดทดลอง

3.4.2.3 เขย่าให้เข้ากันและเก็บไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที

3.4.2.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer บันทึกค่าที่ได้จากการทดลอง

3.4.2.5 สร้างกราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค และกราฟมาตรฐานโทรลอก

1) ปิเปตสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคที่มีความเข้มข้น 100 mg/L (stock standard solution) มาเพื่อเตรียมสารละลายเข้มข้นดังนี้ 0, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5 และ 10 mg/L โดยแต่ละความเข้มข้นเตรียมที่ปริมาตร 100 mL จากนั้นปิเปตสารละลายที่ความเข้มข้นต่างๆ มา 1.5 mL

2) ปิเปตสารมาตรฐานโทรลอกที่มีความเข้มข้น 100 mg/L (stock standard solution) มาเพื่อเตรียมสารละลายเข้มข้นดังนี้ 0, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5 และ 10 mg/L โดยแต่ละความเข้มข้นเตรียมที่ปริมาตร 100 mL จากนั้นปิเปตสารละลายที่ความเข้มข้นต่างๆ*มา 1.5 mL

3) เติมสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ 10 เจือจาง 1.5 mL ลงในหลอดทดลอง

4) เขย่าให้เข้ากันและเก็บไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที

5) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer บันทึกค่าที่ได้จากการทดลอง

นำค่าที่วัดได้ไปหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%inhibition) โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคและสารมาตรฐานโทรลอก คำนวณดังสมการ

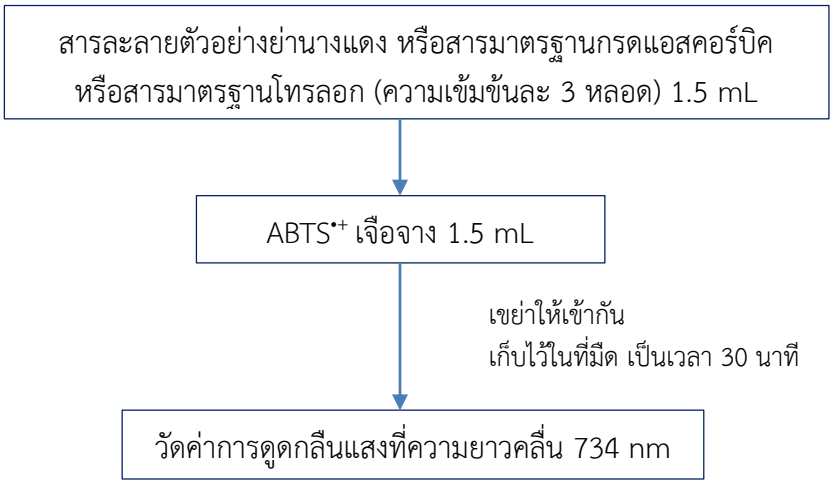
$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (\%inhibition)} = \left[\frac{(A_0-A_S)}{A_0}\right] \times 100$$

เมื่อ A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงของแบลงค์ (เอทานอล + อนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$)

A_S = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดย่านางแดง (สารตัวอย่าง + อนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$)

แล้วรายงานผลเป็นค่า IC_{50} เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคและสารมาตรฐานโทรลอก

สรุป วิธีการทดสอบการฟอกสีอนุมูลอิสระจากสารสกัดย่านางแดงเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคและสารมาตรฐานโทรลอก ด้วยวิธี $ABTS^{\bullet+}$ (ABTS radical cation decolorization assay)



ตารางที่ 3.4 ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เตรียมของวิธี $ABTS^{\bullet+}$

Sample	ความเข้มข้น (mg/L) ที่เตรียม
ย่านางแดง	0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 และ 15
กรดแอสคอร์บิค	0, 0.1, 0.5, 1, 2.5 ,5, 7.5 และ 10
โทรลอก	0, 0.1, 0.5, 1, 2.5 ,5, 7.5 และ 10

3.4.3 การหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดจากสารสกัดย่านางแดงเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu (ดัดแปลงมาจากวิธีของ Chidambara et al., 2002)

3.4.3.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างย่านางแดง ที่ความเข้มข้นต่างๆ* มา 0.1 mL ลงในหลอดทดลอง ความเข้มข้นละ 3 หลอด

3.4.3.2 เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ความเข้มข้น 0.2 N จำนวน 0.5 mL และเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 10 %w/v 0.4 mL ลงในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน เก็บไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30-60 นาที

3.4.3.3 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่นที่ 760 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer บันทึกค่าที่ได้จากการทดลอง

3.4.3.4 คำนวณหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดย่านางแดง โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายแกลลิก

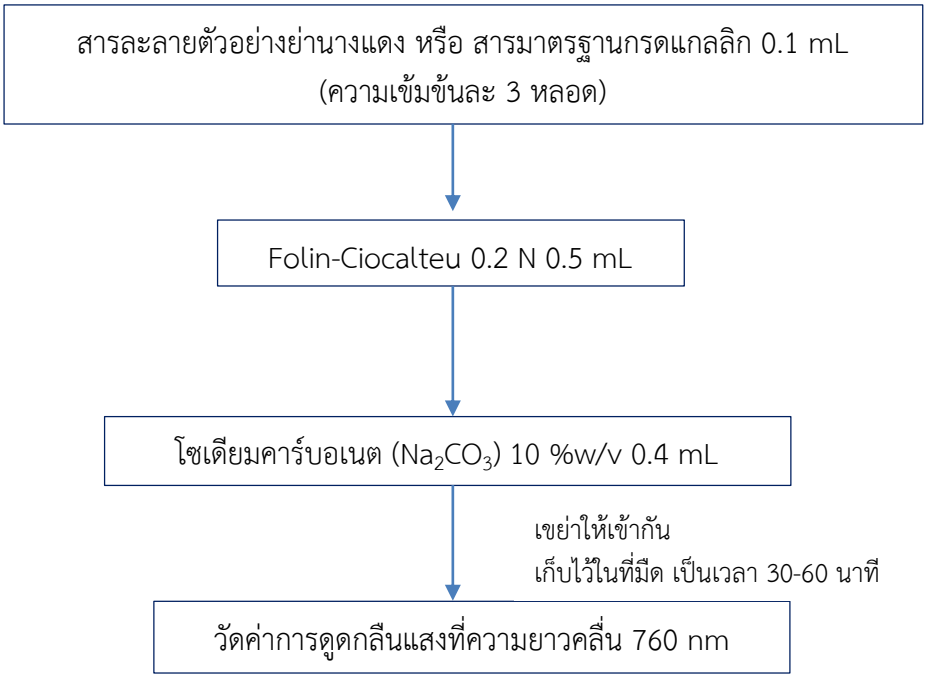
3.4.3.5 สร้างกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

1) ปิเปตสารมาตรฐานกรดแกลลิกที่มีความเข้มข้น 100 mg/L (stock standard solution) มาเพื่อเตรียมสารละลายเข้มข้นดังนี้ 0, 5, 10, 20, 40, 80 และ 100 mg/L โดยแต่ละความเข้มข้นเตรียมที่ปริมาตร 50 mL จากนั้นปิเปตสารละลาย ที่ความเข้มข้นต่างๆ* มา 0.1 mL แล้วเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ความเข้มข้น 0.2 N จำนวน 0.5 mL และเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 10 %w/v จำนวน 0.4 mL

2) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer บันทึกค่าที่ได้จากการทดลอง

3) นำมาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายกรดแกลลิก

สรุป วิธีการหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดจากสารสกัดย่านางแดงเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu



ตารางที่ 3.5 ความเข้มข้นของตัวอย่างย่านางแดง ที่เตรียมของวิธี Folin-Ciocalteu

Sample	ความเข้มข้น (mg/L) ที่เตรียม
ย่านางแดง	0, 100, 200, 300, 400 และ 500

3.4.4 การหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจากสารสกัดย่านางแดงเทียบกับสารมาตรฐานเควอซิทิน ด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric (ดัดแปลงมาวิธีของ Pourmorad, Hosseinimehr and Shahabimajd, 2006)

3.4.4.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างย่านางแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ* มา 0.15 mL ลงในหลอดทดลอง ความเข้มข้นละ 3 หลอด

3.4.4.2 เติมโซเดียมไนไตรต์ ($NaNO_2$) 5 %w/v 1 mL แล้วเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที

3.4.4.3 เติมอลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3 \cdot 6H_2O$) 10 %w/v 1.5 mL แล้วเขย่าให้เข้ากัน

3.4.4.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer บันทึกค่าที่ได้จากการทดลอง

3.4.4.5 สร้างกราฟมาตรฐานเควอซิทิน

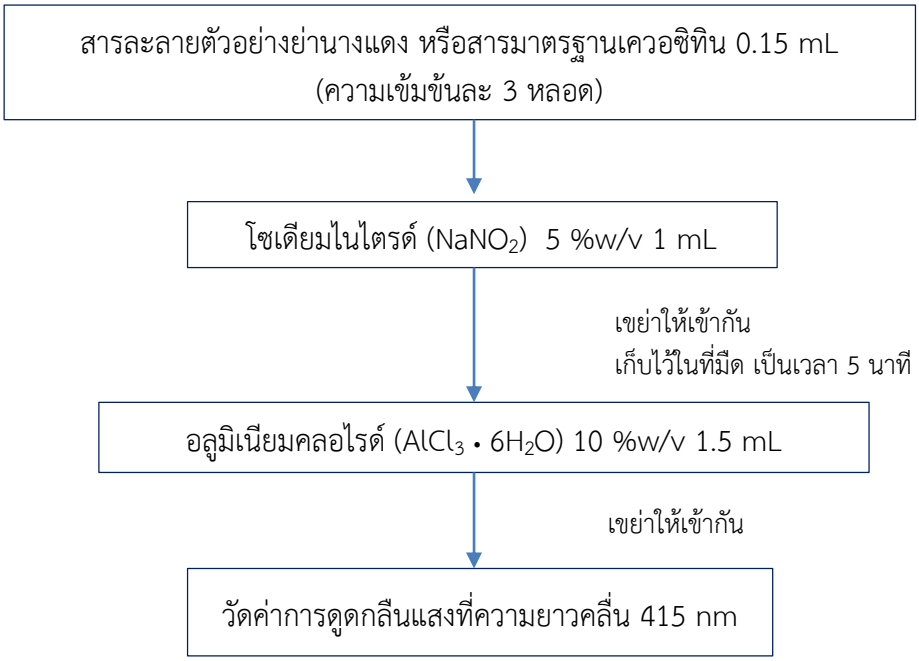
1) ปิเปตสารมาตรฐานเควอซิทินที่มีความเข้มข้น 500 mg/L (stock standard solution) มาเพื่อเตรียมสารละลายเข้มข้นดังนี้ 0, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 200, 300, 400 และ 500 mg/L โดยแต่ละความเข้มข้นเตรียมที่ปริมาตร 50 mL จากนั้นปิเปตสารละลายที่ความ

เข้มข้นต่างๆ มา 0.15 mL แล้วเติมโซเดียมไนไตรต์ ($NaNO_2$) 5 %w/v 1 mL เขย่าให้เข้ากัน เก็บไว้ในที่มืด 5 นาที เติมอลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3 \cdot 6H_2O$) 10 %w/v 1.5 mL จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน

2) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer บันทึกค่าที่ได้จากการทดลอง

3) นำมาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายเควอซิทิน

สรุป การหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจากสารสกัดย่านางแดงเทียบกับสารมาตรฐานเควอซิทิน ด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric



ตารางที่ 3.6 ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เตรียมของวิธี Aluminium chloride colorimetric

Sample	ความเข้มข้น (mg/L) ที่เตรียม
ย่านางแดง	0, 25, 50, 150, 250, 500 และ 700
เควอซิทิน	0, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 200, 300, 400 และ 500

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

ในการทดลองจะทำการสกัดย่านางแดงตัวอย่างละ 3 ซ้ำ และนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH$^{\bullet}$และการฟอกสีอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ จากนั้นนำมาหาปริมาณสารฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยและคำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการเตรียมสารสกัดจากย่านางแดง

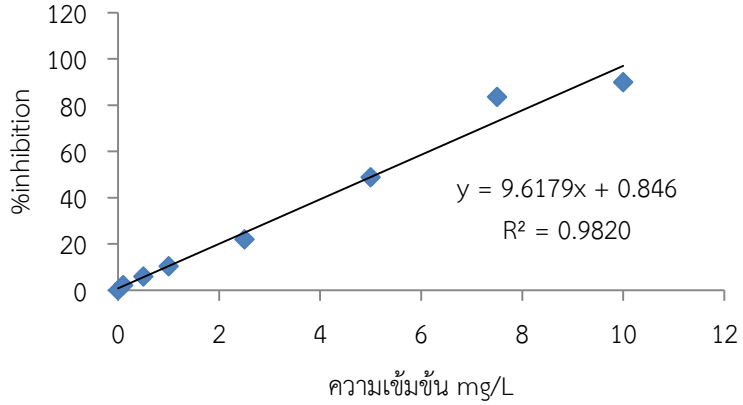
จากการวิจัย นำย่านางแดง มาทำการสกัดด้วยน้ำ แล้วนำสารสกัดไประเหยแห้ง ผลของการสกัดย่านางแดงที่ได้ แสดงดังข้อมูลในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงน้ำหนักของสารสกัดย่านางแดง

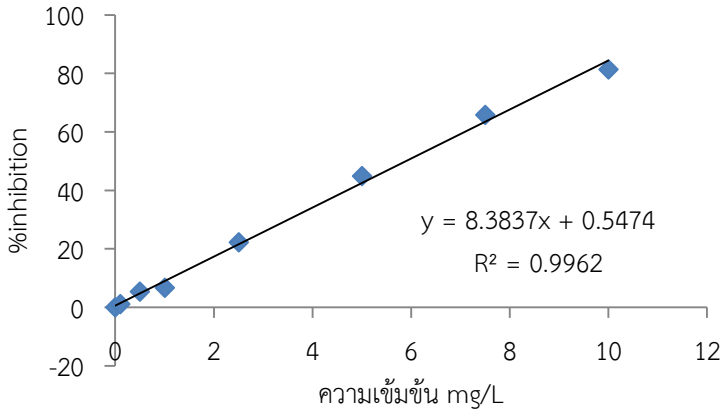
ตัวอย่าง	น้ำหนักแห้งก่อนนำไปสกัด (กรัม)	น้ำหนักสารสกัดหยาบ (กรัม)	% yield
ย่านางแดง *(Bauhinia strychnifolia Craib.)*	182.92	34.20	18.70

4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH•

เมื่อวัดการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค และสารมาตรฐานโทรลอก ที่ความยาวคลื่น 517 nm โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย ในความเข้มข้นต่างกัน จากนั้นนำไปหา %Inhibition แล้วนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่าง %Inhibition กับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาค่า IC_{50} พบว่า สารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค มีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.35 mg/L และสารมาตรฐานโทรลอก มีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.41 mg/L

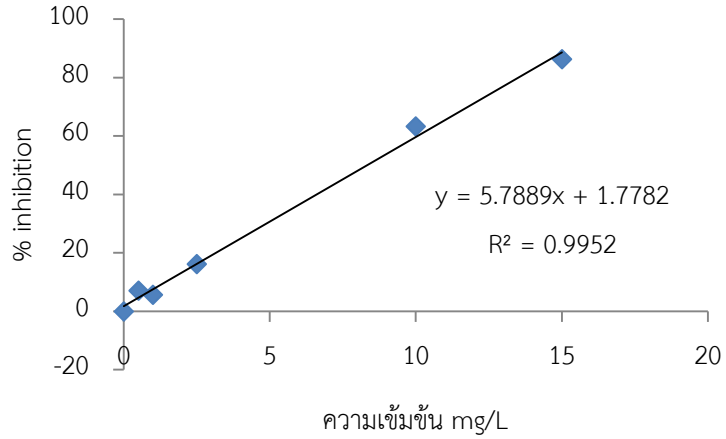


ภาพที่ 4.1 กราฟความสัมพันธ์ของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคที่ความเข้มข้นต่างๆ กับ %inhibition ด้วยวิธี DPPH•



ภาพที่ 4.2 กราฟความสัมพันธ์ของสารมาตรฐานโทรลอกที่ความเข้มข้นต่างๆ กับ %inhibition ด้วยวิธี DPPH•

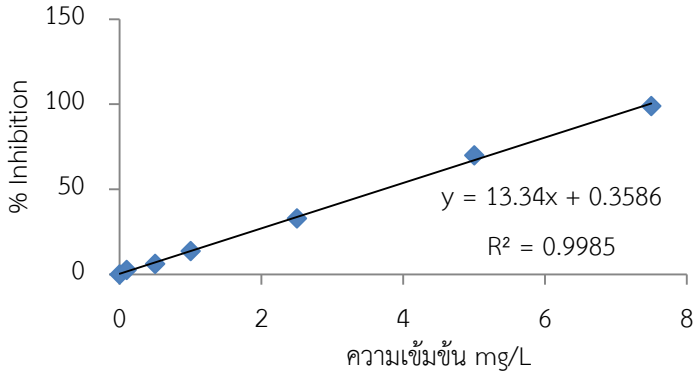
การทดสอบนี้เป็นการทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH• ของสารสกัดจากย่านางแดง พบว่า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยทำการศึกษาที่ความเข้มข้น ที่อยู่ในช่วง 0 ถึง 500 mg/L ซึ่งพบว่า ค่า IC_{50} เท่ากับ 6.86 mg/L



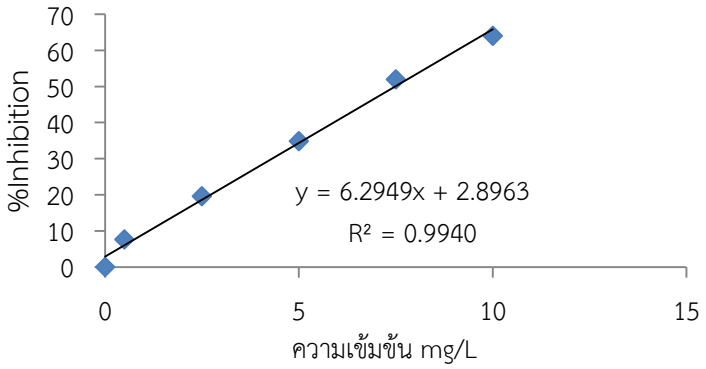
ภาพที่ 4.3 กราฟความสัมพันธ์ของสารสกัดจากย่านางแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ กับ %inhibition ด้วยวิธี DPPH•

4.3 ผลการทดสอบการฟอกสีอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS$^{\bullet+}$

เมื่อวัดการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค และสารมาตรฐานโทรลอก ที่ความยาวคลื่น 734 nm โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย ในความเข้มข้นต่างกัน จากนั้นนำไปหา %Inhibition แล้วนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่าง %Inhibition กับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาค่า IC_{50} พบว่า สารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค มีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.39 mg/L และสารมาตรฐานโทรลอก มีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.05 mg/L

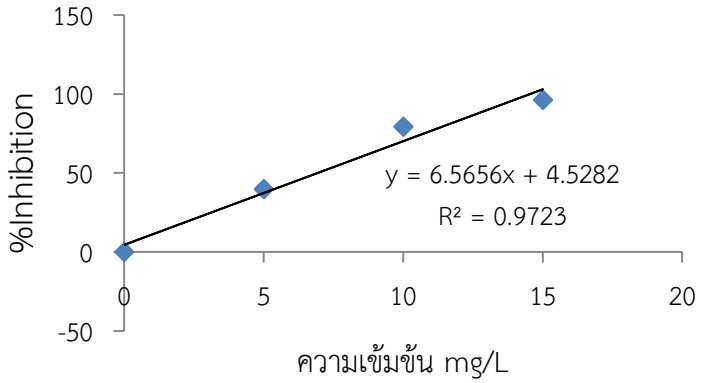


ภาพที่ 4.4 กราฟความสัมพันธ์ของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค ที่ความเข้มข้นต่างๆ กับ %inhibition ด้วยวิธี ABTS$^{\bullet+}$

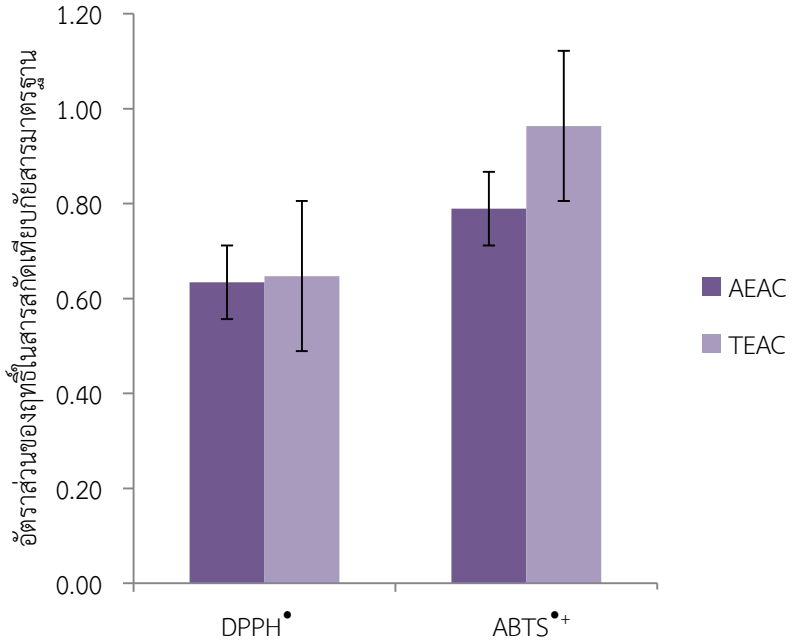


ภาพที่ 4.5 กราฟความสัมพันธ์ของสารมาตรฐานโทรลอกที่ความเข้มข้นต่างๆ กับ %inhibition ด้วยวิธี ABTS$^{\bullet+}$

การทดสอบนี้เป็นการทดสอบฤทธิ์ในการฟอกสีอนุมูล ABTS$^{\bullet+}$ ของสารสกัดจากย่านางแดง พบว่า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เมื่อทำการศึกษาที่ความเข้มข้นในช่วง 0 ถึง 700 mg/L พบว่า ค่า IC_{50} ของสารสกัดย่านางแดง เท่ากับ 5.24 mg/L



ภาพที่ 4.6 กราฟความสัมพันธ์ของสารสกัดจากย่านางแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ กับ %inhibition ด้วยวิธี $ABTS^{\bullet+}$



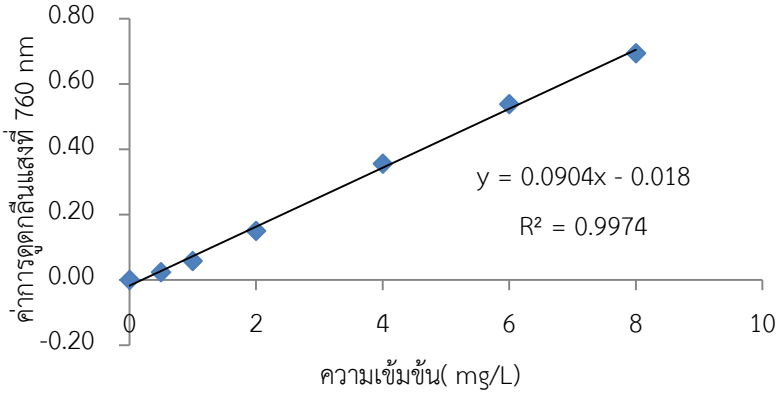
ภาพที่ 4.7 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบกับสารมาตรฐาน กรดแอสคอร์บิค (AEAC) และสารมาตรฐานโทรลอก (TEAC) ด้วยวิธี $DPPH^{\bullet}$ และ $ABTS^{\bullet+}$

จากภาพที่ 4.7 แสดงค่าการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคและสารมาตรฐานโทรลอกด้วยวิธี $DPPH^{\bullet}$ และ $ABTS^{\bullet+}$ เมื่อนำค่า IC_{50} ของทั้ง 2 ชนิดมาเปรียบเทียบ สามารถนำเสนอผลในรูปของ AEAC (Ascorbic acid equivalent antioxidant capacity) และ TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของย่านางแดง ด้วยวิธี $DPPH^{\bullet}$ มีค่า AEAC เท่ากับ 0.63 หมายถึง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของย่านางแดง 1 g เทียบเท่ากับกรดแอสคอร์บิค 0.63 g และ มีค่า TEAC เท่ากับ 0.79 หมายถึง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของย่านางแดง 1 g เทียบเท่ากับโทรลอก 0.79 g ส่วน วิธี $ABTS^{\bullet+}$ พบว่า มีค่า AEAC เท่ากับ 0.65

หมายถึง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของย่านางแดง 1 g เทียบเท่ากับกรดแอสคอร์บิค 0.65 g และ มีค่า TEAC เท่ากับ 0.96 หมายถึง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของย่านางแดง 1 g เทียบเท่ากับโทรลอก 0.96 g

4.4 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu

จากการศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu โดยคำนวณปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก ซึ่งได้ผลการทดลองดังนี้

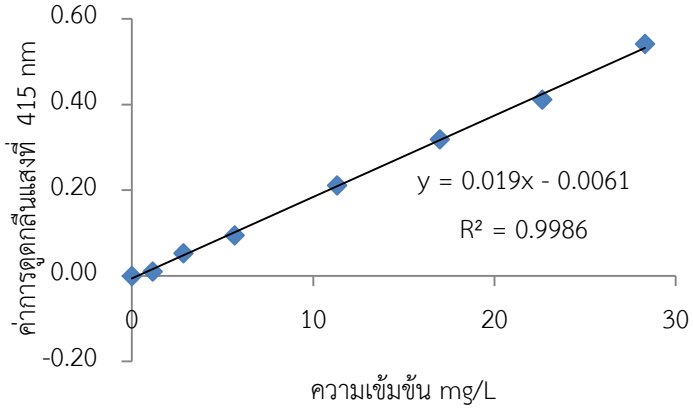


ภาพที่ 4.8 กราฟความสัมพันธ์ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (mg/L) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu

จากภาพที่ 4.8 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดได้จากการคำนวณจากสมการ y = 0.0904x - 0.018 ของกราฟความสัมพันธ์ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (mg/L) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

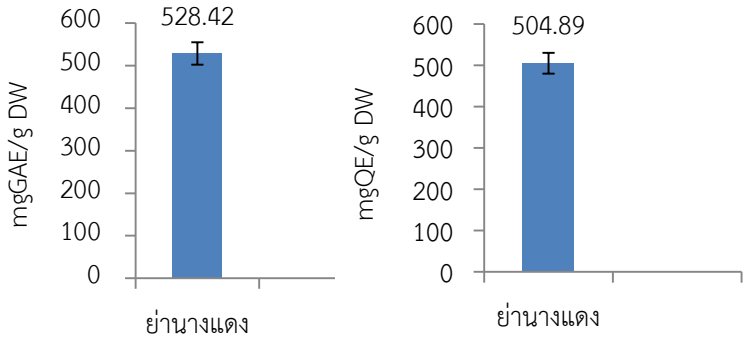
4.5 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoids content) ด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric

จากการศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric โดยคำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจากกราฟมาตรฐานเควอซิทิน ซึ่งได้ผลการทดลองดังนี้



ภาพที่ 4.9 กราฟความสัมพันธ์ของสารมาตรฐานเควอซิทิน (mg/L) ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric

จากภาพที่ 4.9 ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่ได้จากการคำนวณจากสมการ y = 0.019x - 0.0061 ของกราฟความสัมพันธ์ของสารมาตรฐานเควอซิทิน (mg/L) ที่ความเข้มข้นต่างๆ



ภาพที่ 4.10 ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของย่านางแดง ตามลำดับ

จากภาพที่ 4.10 พบว่า ย่านางแดงมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเมื่อคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก เท่ากับ 528.42 mgGAE/g DW และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด เมื่อคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานเควอซิทิน เท่ากับ 504.89 mgQE/g DW

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

ในการทดลองศึกษาและเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของย่านางแดง โดยใช้วิธีการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH$^{\bullet}$ (Diphenyl picrylhydrazyl scanvenging assay) และวิธี ABTS$^{\bullet+}$ (ABTS radical cation decolorization assay) การหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu และการหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเทียบกับสารมาตรฐานเควอซิทินด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH$^{\bullet}$ (Diphenyl picrylhydrazyl scanvenging assay) ของย่านางแดง พบว่า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.86 mg/L และการทดสอบฤทธิ์การฟอกสีอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS$^{\bullet+}$ (ABTS radical cation decolorization assay) พบว่า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.24 mg/L

จากผลการทดสอบการหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu พบว่า มีปริมาณของสารฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 528.42 mgGAE/g DW และการทดสอบการหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเทียบกับสารมาตรฐานเควอซิทินด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric พบว่า มีปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด เท่ากับ 504.89 mgQE/g DW

จากผลการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค (AEAC) และสารมาตรฐานโทรลอก (TEAC) ด้วยวิธี DPPH$^{\bullet}$ และ ABTS$^{\bullet+}$ พบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของย่านางแดง ด้วยวิธี DPPH$^{\bullet}$ มีค่า AEAC และ TEAC เท่ากับ 0.63 และ 0.79 ตามลำดับ ส่วนวิธี ABTS$^{\bullet+}$ พบว่า มีค่า AEAC และ TEAC เท่ากับ 0.65 และ 0.96 ตามลำดับ

ในการศึกษาสมุนไพรย่านางแดงครั้งนี้ นับเป็นข้อมูลเบื้องต้น เพื่อนำไปศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับสูง และสามารถต่อยอดในทางเภสัชกรรมต่อไป

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับวิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบด้วยวิธีอื่นเพื่อนำมาเปรียบเทียบกับวิธีการเดิม

2. ควรมีการศึกษาว่าสมุนไพรย่านางแดงที่นำมาศึกษานั้น มีสารชนิดใดอยู่บ้างและเปรียบเทียบว่ามีปริมาณมากน้อยเพียงใด

3. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อต่อยอดการทำเป็นสูตรตำรับยาจากสมุนไพรที่หาได้ตามท้องถิ่นเพื่อใช้รักษาโรคต่างๆ

บรรณานุกรม

นัยนา บุญทวียุวัฒน์. (2546). *ชีวเคมีทางโภชนาการ.* ซิกม่า ดีไซน์กราฟฟิก จำกัด, กรุงเทพ-มหานคร

นิวัติ แก้วประดับ, สุกัญญา เดชอดิศัย และ สุปรียา ยืนยงสวัสดิ์. (2548). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสมุนไพรไทยชื่อขมิ้นเครือ. *วารสารสงขลานครินทร์.* หน้า 455-467

วาริน แสงกิตติโกมล. (2546). การเปรียบเทียบปริมาณสารโพลีฟีโนลิกและปริมาณรวมการต้านสารอนุมูลอิสระในผักและสมุนไพร. *วารสารสหเวชศาสตร์* 3: 91-99.

สุดารัตน์ หอมหวน. (2012). ย่านางแดง. *ฐานข้อมูลคณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.* สืบค้น 4 สิงหาคม 2558, จาก http://www.phargarden.com

โสภณ เริงสำราญ, ธนพงษ์ กรีธาดำรงเดช และ จำเรียง ธรรมธร. (2552). *สารที่มีฤทธิ์ในการรักษาโรคมะเร็งจากเปล้าใหญ่.* กรุงเทพฯ: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

อนันต์ สกุลกิม. (2551). อนุมูลอิสระ สารอันตรายต่อสุขภาพและร่างกาย. *ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์.* 8 (1): 28-33.

อัญชนา เจนวิถีสุข. (2545***).*** *การตรวจหาและบ่งชี้ชนิด สารต้านอนุมูลอิสระจากผักพื้นบ้านและสมุนไพรไทย.* วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต มหาวิหาวิทยาลัยเชียงใหม่

โอภา วัชระคุปต์, ปรีชา บุญจูง, จันทนา บุณยะรัตน์ และ มาลีรักษ์ อัตต์สินทอง. (2549). *สารต้านอนุมูลอิสระ.* กรุงเทพฯ: พี.เอส.พริ้นท์.

Halliwell, B. et al. (1995). *The characterization of antioxidant.* Food and Chemical Toxicology. 33: 601-617.

Bast, A., Haeren, G. and Doelmen, C. (1991). Oxidants and antioxidants: state of art. *American Journal of Medicine.* 91: 2-13.

Chavan, J.J., Nimbalkar. M.S., Gaikwad, N., Dixit, G.B., Yadav, S.R. (2012)**.** In vitro propagation of Ceropegia spiralis Wight an endemic and rare potential ornamental plant of peninsular India. *U.S.A. Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America. India Section B,* 81:120-126.

บรรณานุกรม (ต่อ)

Gressier, B., Lebegue, S. and Brunnet, C. (1994) . Proxidant porperties of methotrexate evatuation and prevention by an antioxidant drug. *Archivder Pharmazie Chemistry in Life Science.* 49: 679-681.

Konstan, M.W., and Berger, M. (1993). *Infection and inflammation of the lung in cystic fibrosis.* In P.B. Davis (Ed.), Cystic Fibrosis, (New York: Marcel Dekker, Inc.), pp. 219–276.

Le Prell, C.G., Hughes L. F., Miler, J. M. (2007). Free radical scavengers vitamins A, C and E plus magnesium reduce noise trauma. *Free Radical Biology and Medicine.* 42: 1454–1463.

Muraoka, O, Morikawa T, Miyake S, Akaki J, Ninomiya K, Yoshikawa, M. (2010). Quantitative determination of potent α-glucosidase inhibitors, salacinol and kotalanol, in Salacia species using liquidchromatography mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 52: 770-773.

Nawar, W.W. (1996). Lipid in O.R. Fennema (eds.), *Food Chemistry.* New York. 210-243.

Pokorny, J., Yanishlieva, N. and Gordon, M. (2001). *Antioxidants in food: practical applications.* New York: CRC Press. 380 pp.

Sanchez-Moreno, C., Jimenez-Escria, A. and Saura-Calixto. J. (2000). Study of low-density lipoprotein oxidizability indexes to measure the antioxidant activity of dietary polyphenols. *Nutrition Research.* 20: 941-953.

Sellamuthu. P.S., Arulselvan, P., Muniappan, B.P., Fakurazi Sand Kandasamy, M. (2012) . Mangiferin from Salacia chinensis prevents oxidative stress and protects pancreatic beta-cells in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Medicinal Food.* 16: 719-727.

บรรณานุกรม (ต่อ)

Sies, H., Stahl, W. and Sundquist, A. (1992). Antioxidant functions of vitamins, vitamin E and C, beta-carotene and other carotenoids. *Annals of the New York Academy of sciences.* 368: 7-19.

Sikarwar, M.S., Patli MB. (2012) Antihyperlipidemic activity of Salacia chinensis root extracts in triton-induced and atherogenic dietinduce hyperlipidemic rats. *Indian Journal of Pharmacology.* 44(1): 88-92.

Sirikunya Sayompark, Arunporn Itharat, Pintusorn Hansakul. (2012*). Comparative Study of Antioxidant Activities and Total Phenolic Content of Bauhinia strychnifolia Leaves Extracts.* Sci-Health, 011:50.

Valacchi, G. et al. (2004). In vivo ozone exposure induces antioxidant stress-related responses in murine lung and skin. *Free Radical Biology & Medicine.* 36: 673-681.

Voest, E.E., Vreugdenhil, G. and Marx, J. (1994). Iron-chelating agents in non-iron overload conditions. *Annals of Internal Medicine.* 120: 490-499

Yang, J.H. et al. (2000). Antioxidant and related compounds. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* 61: 1646-1649.

ภาคผนวก

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ปัจจุบันมนุษย์เราได้ให้ความสำคัญเกี่ยวกับเรื่องสุขภาพกันมากขึ้นเนื่องจากการรับประทานอาหารของมนุษย์พบว่ามีความเสี่ยงต่อโรคต่างๆมากมาย เช่น การรับประทานอาหารประเภทเนื้อสัตว์เป็นประจำจะมีความเสี่ยงต่อโรคหัวใจ หลอดเลือดแข็งตัว และมะเร็ง ขณะที่ผู้รับประทานอาหารประเภทพืชผัก ผลไม้ หรือแม้กระทั่งสมุนไพรเป็นประจำมีความเสี่ยงน้อยกว่า ซึ่งผู้ที่รับประทานอาหารประเภทเนื้อสัตว์จะมีของเสียที่เกิดจากกระบวนการเผาผลาญอาหารที่เรียกว่า “อนุมูลอิสระ” (free radical) เป็นจำนวนมาก โดยอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุที่เกิดจากกระบวนการเผาผลาญอาหารในร่างกาย รวมถึงจากมลพิษต่างๆ เช่น มลพิษจากการติดเชื้อโรครังสียูวี (UV-ray) โอโซน (ozone) ควันจากท่อไอเสียรถยนต์และบุหรี่ โดยอนุมูลอิสระมีความไวสูงในการจู่โจมสารชีวโมเลกุลในร่างกาย เช่น ไขมัน โปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ซึ่งจะทำลายโครงสร้าง และหน้าที่ของผนังเซลล์ ก่อให้เกิดความผิดปกติต่างๆ เช่น โรคชรา โรคหลอดเลือดและหัวใจขาดเลือด ผนังหลอดเลือดแข็งตัว (atherosclerosis) โรคเสื่อมของระบบต่างๆในร่างกาย รวมถึงการกลายพันธุ์ (mutation) ของเซลล์ ซึ่งอาจพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็งได้ ดังนั้นร่างกายจึงจำเป็นต้องมีระบบป้องกันไม่ให้อนุมูลอิสระทำลายได้ โดยจะมีกลไกในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยใช้สาร 2 ชนิด ได้แก่ สารที่เป็นเอนไซม์และสารที่ไม่ใช่เอนไซม์ ซึ่งเอนไซม์ในร่างกายเราที่ใช้ในการกำจัดอนุมูลอิสระมีอยู่อย่างจำกัด เราจึงต้องรับประทานสารกำจัดอนุมูลอิสระพวกที่ไม่ใช่เอนไซม์ สารดังกล่าว ได้แก่ สารต้านอนุมูลอิสระ หรือมีอีกชื่อว่า “Antioxidant”

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) คือ สารปริมาณน้อยที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ของอนุมูลอิสระได้ (Halliwell, B., 2009) สารเหล่านี้มีกลไกในการต้านอนุมูลอิสระหลายแบบ เช่น ดักจับ (scavenge) อนุมูลอิสระโดยตรง ยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระหรือเข้าจับ (chelate) กับโลหะ เพื่อป้องกันการสร้างอนุมูลอิสระ เป็นต้น ปกติร่างกายของคนเรานั้นจะมีสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติหลากหลายชนิดทั้งที่เป็นเอนไซม์ เช่น superoxide dismutase, catalase และ glutathione peroxidase เป็นต้น และสารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่เอนไซม์ เช่น urate, bilirubin และ transferrin เป็นต้น เนื่องจากสารเหล่านี้มีจำนวนจำกัด ดังนั้นเมื่อใดก็ตามที่มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นเกินกว่าจะกำจัดได้หมด อาจก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกายได้ นอกจากนี้พวกวิตามินบางชนิด เช่น บีตาแคโรทีน (β-carotene) วิตามินซี (vitamin C) วิตามินอี (vitamin E) รวมทั้งสารประกอบกลุ่ม polyphenols ต่างๆ ซึ่งมีรายงานพบมากในพืช ผัก ผลไม้ และสมุนไพรทั่วไป โดยจัดเป็นสารที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากแหล่งธรรมชาติที่ดีอีกกลุ่มหนึ่ง (Sies, S., 1991)

พืชและสมุนไพรเป็นแหล่งพฤกษเคมี (phytochemicals) ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญที่สุด ตัวอย่างของสารพฤกษศาสตร์เคมีที่สำคัญ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน แอนทราควิโนนไกลโคไซด์ (anthroquinone glycoside) มีฤทธิ์เป็นยาระบาย ต้านอักเสบและเพิ่มภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย แอลคาลอยด์มีฤทธิ์ต้านอักแสบและต้านมะเร็ง เป็นต้น ดังนั้น การศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากพืชและสมุนไพร จึงมีความสำคัญไม่เพียงแต่ให้ประโยชน์ในด้านการรักษาโรคเท่านั้น แต่ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับพืชและสมุนไพรชนิดนั้นด้วย ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ของสมุนไพรย่านาแดง เป็นสมุนไพรพื้นถิ่น ที่พบได้มากในเขตพื้นที่ จังหวัดกาฬสินธุ์ โดยพบว่า สมุนไพรย่านางแดงนี้ ถูกนำมาใช้เป็นวัตถุดิบของสูตรยาสมุนไพรที่ชาวบ้านใช้ต้มเป็นยารักษาโรคต่างๆ ที่มีการสืบทอดกันมายาวนานและใช้กันอย่างแพร่หลาย เช่น ใช้เป็นยาบำรุงโลหิตสำหรับสตรีหลังคลอด ขณะอยู่ไฟ ช่วยให้มดลูกเข้าอู่เร็วขึ้น เป็นต้น

เมื่อผู้วิจัยสอบถามชาวบ้านเกี่ยวกับการใช้สมุนไพรในชีวิตประจำวัน พบว่า สมุนไพรมีส่วนสำคัญในการนำมาใช้รักษาโรคเป็นอย่างมาก เนื่องจากชาวบ้านพบว่าเมื่อรับประทาน ยาสมุนไพรแล้วอาการป่วยจะทุเลาลงอย่างเห็นได้ชัด ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเห็นว่า สมุนไพรย่านางแดงนี้ อาจมีสารที่มีผลต่อสุขภาพ จึงสนใจนำมาศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

การศึกษาครั้งนี้ใช้วิธีการศึกษาสมบัติต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดังนี้คือ 1,1 diphenenyl-2-picryhydrazyl (DPPH$^{\bullet}$) radical scavenging activity การทดสอบหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธีโฟลิน-ซิโอแคลทู Folin – ciocalteu การทดสอบหาปริมาณฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี colorimetric aluminium chloride และทดสอบการฟอกสีอนุมูลอิสระหรือ ABTS$^{\bullet+}$ ซึ่งทดสอบกับสารสกัดจากสมุนไพรย่านางแดง *(Bauhinia strychnifolia Craib)*

1.2 วัตถุประสงค์งานวิจัย

เพื่อศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบโดยวิธี Diphenyl picrylhydrazyl scanvenging assay (DPPH$^{\bullet}$ assay) การทดสอบการฟอกสีอนุมูลอิสระหรือ ABTS$^{\bullet+}$ การทดสอบหาหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin – ciocalteu และการทดสอบหาปริมาณฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric ของสารสกัดที่ได้จากย่านางแดง *(Bauhinia strychnifolia Craib.)*

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 สมุนไพรที่ใช้ในการวิจัยคือ ย่านางแดง *(Bauhinia strychnifolia Craib.)*

1.3.2 สกัดตัวอย่างสมุนไพรโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย ซึ่งใช้เวลาและอุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

1.3.3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธี Diphenyl picrylhydrazyl scanvenging assay ($DPPH^{\bullet}$ assay) การทดสอบการฟอกสีอนุมูลอิสระหรือ $ABTS^{\bullet+}$ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโทรลอก และสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก การทดสอบหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin – ciocalteu เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก และการทดสอบหาปริมาณฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานเควอซิติน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ทราบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ของสารที่ได้จากตัวอย่างย่านางแดง

1.5 ตัวแปร

1.5.1 ตัวแปรต้น

- ย่านางแดง

1.5.2 ตัวแปรควบคุม

- ปริมาตรตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด
- ระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด
- วิธีทดสอบสมบัติทางชีวภาพ

1.5.3 ตัวแปรตาม

- ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$
- ปริมาณการฟอกสีอนุมูลอิสระหรือ $ABTS^{\bullet+}$
- ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก
- ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์

1.6 นิยามศัพท์เฉพาะ

ย่านางแดง (*Bauhinia strychnifolia Craib.*) คือ สมุนไพรพื้นบ้าน ที่ใช้ในการทำวิจัย

อนุมูลอิสระ (free radicals) หมายถึง อะตอม โมเลกุล หรือสารประกอบที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวอยู่ในออร์บิทัลวงนอกสุดที่มีระดับพลังงานสูง มีความว่องไวต่อปฏิกิริยาออกซิเดชันภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิต อันจะก่อให้เกิดความเสียหายต่อไขมัน โปรตีน และดีเอ็นเอที่ก่อให้เกิดโรค

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) หมายถึง สารที่ทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้อนุอิสระก่อตัวโดยจะทำการยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ และหยุดการก่อตัวใหม่ของอนุมูลอิสระช่วย ซ่อมแซมความเสียหายที่เกิดจากตัวอนุมูลอิสระที่ไปทำลายเซลล์ในร่างกาย รวมทั้งช่วยกำจัดและแทนที่โมกุลที่ถูกทำลาย

ตัวทำละลาย หมายถึง สารที่มีความสามารถในการทำให้สารต่างๆ ละลายได้โดยไม่ทำปฏิกิริยาเคมีกับสารนั้น

IC_{50} (50% Inhibitory Concentration) หมายถึง ปริมาณของสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ DPPH เหลืออยู่ 50% ซึ่งค่าที่มีค่าน้อยแสดงถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าค่าที่มีค่ามาก

สัญลักษณ์คำย่อ

g	กรัม
N	นอร์มอล
mg	มิลลิกรัม
mL	มิลลิลิตร
%w/v	ร้อยละโดยมวลต่อปริมาตร
%v/v	ร้อยละโดยปริมาตร
nm	นาโนเมตร
µg	ไมโครกรัม
mM	มิลลิโมลาร์
mg/L	มิลลิกรัมต่อลิตร
mg GEA/100 g Dw	มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อ 100 กรัม (น้ำหนักแห้ง)
mg QE/100 g Dw	มิลลิกรัมสมมูลเควอซิตินต่อ 100 กรัม (น้ำหนักแห้ง)
$DPPH^{\bullet}$	Diphenyl picrylhydrazyl scanvenging assay
$ABTS^{\bullet+}$	ABTS radical cation decolorization assay

1.7 สถานที่ดำเนินการวิจัย

ห้องปฏิบัติการเคมี อาคาร 10 ชั้น 3 คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏ-มหาสารคาม

1.8 ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

เริ่มทำการทดลองตั้งแต่เดือนเมษายน พ.ศ. 2558 และ สิ้นสุดการทดลองเดือนเมษายน พ.ศ. 2559

ตารางที่ 1.1 แผนการดำเนินการวิจัย

หัวข้อ	ระยะเวลาดำเนินงาน												
	เมษายน พ.ศ. 2558 – เมษายน พ.ศ. 2559												
	เมษายน	พฤษภาคม	มิถุนายน	กรกฎาคม	สิงหาคม	กันยายน	ตุลาคม	พฤศจิกายน	ธันวาคม	มกราคม	กุมภาพันธ์	มีนาคม	เมษายน
1. เขียนเค้าโครงการศึกษา	←	→											
2. เตรียมวัสดุและอุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่าง		←	—	→									
3. การเก็บตัวอย่างสมุนไพร					←	—	→						
4. วิเคราะห์ผลการศึกษา								←	—	→			
5. เขียนรายงานและทำรูปเล่ม											←	—	→

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลทั่วไป

2.1.1 อนุมูลอิสระ (free radical)

อนุมูลอิสระ (free radicals) เป็นสารที่มีโมเลกุลหรืออะตอมซึ่งมีอิเล็กตรอนอยู่เพียง 1 ตัว ในวงโคจรรอบนอกสุด ซึ่งปกติจะมีอิเล็กตรอนอยู่เป็นคู่ โครงสร้างอะตอมหรือโมเลกุลของอนุมูลอิสระจึงเขียนโดยมีจุดยกกำลัง ($^{\bullet}$) ไว้ทางด้านหน้าหรือด้านหลังอะตอมหรือโมเลกุลเสมอ จุดดังกล่าวเป็นสัญลักษณ์ของอิเล็กตรอนที่ไร้คู่ อนุมูลอิสระที่พบบ่อย เช่น hydroxyl free radical ($OH^{\bullet}$), superoxide radical ($O_2^{\bullet-}$) การมีอิเล็กตรอนไร้คู่ ทำให้โมเลกุลไม่เสถียร มีปฏิกิริยาว่องไวมาก สามารถทำปฏิกิริยาเคมีกับโมเลกุลอื่นได้ง่ายและทันที เพื่อดึงเอาอิเล็กตรอนหนึ่งตัวจากโมเลกุลหรือสารเหล่านั้นมาไว้ในตัวมันเอง ทำให้มีความคงตัวมากขึ้น ปฏิกิริยาเคมีในการลดอิเล็กตรอนหรือออกซิเดชัน (oxidation) คล้ายกับปฏิกิริยาที่เกิดสนิมเหล็ก คือ เหล็กเฟอร์รัส (Fe^{2+}) เหล็กเฟอร์ริก (Fe^{3+}) การดึงเอาอิเล็กตรอนหนึ่งตัวจากโมเลกุลใดๆ จะทำให้โมเลกุลหรือสารเหล่านั้นมีโอกาสที่จะกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่และไม่เสถียร จึงต้องหาทางดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นที่เสถียรมาไว้ต่อไปเรื่อยๆ จนเกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ออกซิเดชัน ซึ่งกระจายหรือขยายตัวออกไปมากขึ้นได้ หากขาดสารต้านอนุมูลอิสระ ปฏิกิริยาลูกโซ่จะไม่หยุดยั้ง และมีความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ปฏิกิริยาออกซิเดชันจะทำให้มีการทำลายชีวโมเลกุลต่างๆ เช่น ไขมันจะเปลี่ยนเป็น lipid peroxides โปรตีนจะเสียสภาพธรรมชาติ (denatured protein) หรือโครงร่างโพลิเมอร์โปรตีนที่ผิดปกติ พันธะจับคู่ระหว่าง DNA base pair จะเปลี่ยนการจับคู่กันและโครงสร้างเคมีของดีเอ็นเอจะแตกหักออกจากกัน เป็นต้น

2.1.2 สาเหตุการเกิดอนุมูลอิสระ

กระบวนการเผาผลาญอาหารหรือกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) มักเกิดโปร-ออกซิแดนท์ (prooxidant) ขึ้นได้ตลอดเวลา ซึ่งเป็นผลพลอยได้ของปฏิกิริยาเคมีและกิจกรรมของเซลล์ในร่างกายที่ต้องดำเนินตามปกติ โปรออกซิแดนท์ที่สำคัญคือ สารประกอบที่มีออกซิเจนในโมเลกุล เรียกว่า reactive oxygen species (ROS) ซึ่งเกิดขึ้นในกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนในระบบหายใจ เกิดออกซิเจนที่มีประจุลบเป็นผลผลิตสุดท้าย ในระบบสร้างภูมิคุ้มกันโรค เมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย เซลล์เม็ดเลือดขาวจะจับกินและออกซิไดซ์ออกซิเจน ให้ได้ออกซิเจนที่มีประจุลบ เพื่อใช้ในการสร้างสารที่มีฤทธิ์ทำลายสิ่งแปลกปลอมและ ROS ที่เกิดขึ้นในกลไกการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบ (นัยนา บุญทวียุวัฒน์, 2546 : อนันต์ สกุลกิม, 2551) สาร ROS ที่จัดอยู่ในประเภทของสารอนุมูลอิสระ ได้แก่ ซูเปอร์ออกไซด์ เรดิเคิล (superoxide radical; $O_2^{\bullet-}$), ไฮดรอกซิล เรดิเคิล (hydroxyl radical; $OH^{\bullet}$), อัลโคซิล เรดิคัล (alkoxyl radical; $RO^{\bullet}$) และไนตริกออกไซด์ เรดิเคิล (nitric oxide radical; $NO^{\bullet}$) สารประกอบเหล่านี้เป็นสารประกอบที่มีอิเล็กตรอนที่วงพลังงานรอบนอกของอะตอมออกซิเจนเป็นเลขคี่ จึงไม่คงตัวและไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับสารอื่น

2.1.2.1 ปัจจัยภายในร่างกาย

ในร่างกายของสิ่งมีชีวิตจะมีปฏิกิริยามากมายที่เกี่ยวข้องกับทั้งการสร้างและการสลายโมเลกุลของ สารที่เรียกว่ากระบวนการเมทาบอลิซึมซึ่งถือเป็นสาเหตุหลักอย่างหนึ่งที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ตัวอย่างปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระได้แก่

ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นเอง (auto-oxidation) (Nawar, W.W., 1996) เช่น การเกิดออกซิเดชันของไขมัน ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ

1) ระยะเหนี่ยวนำเริ่มต้น (initiation) เป็นระยะที่กรดไขมันแตกตัวเป็นอนุมูลอิสระโดยมีแสง หรืออุณหภูมิเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังสมการ

$$RH + \text{initiator} \xrightarrow[T]{\text{light}} R^{\bullet} + H^{\bullet} \qquad (1)$$

2) ระยะเพิ่มจำนวน (propagation) เป็นระยะที่อนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับออกซิเจนเกิดเป็นอนุมูลเปอร์ออกซี (peroxy radical) แล้วทำปฏิกิริยาต่อกับกรดไขมันเกิดเป็นไฮโดรเปอร์-ออกไซด์ (hydro peroxide) และอนุมูลอิสระ ซึ่งถ้ามีแสงและความร้อนเป็นตัวเร่งก็จะเกิดปฏิกิริยาต่อทำให้อนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น แล้วอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นก็สามารถทำปฏิกิริยากับออกซิเจนใหม่ได้ต่อเนื่องไปเรื่อยๆ ดังสมการ

$$RO^{\bullet} + O_2 \longrightarrow ROO^{\bullet} \qquad (2.1)$$

$$ROO^{\bullet} + RH \longrightarrow ROOH + R^{\bullet} \qquad (2.2)$$

3) ระยะสิ้นสุด (Termination) เป็นระยะที่อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นรวมตัวกันกลายเป็นโมเลกุลที่เสถียร ดังสมการ

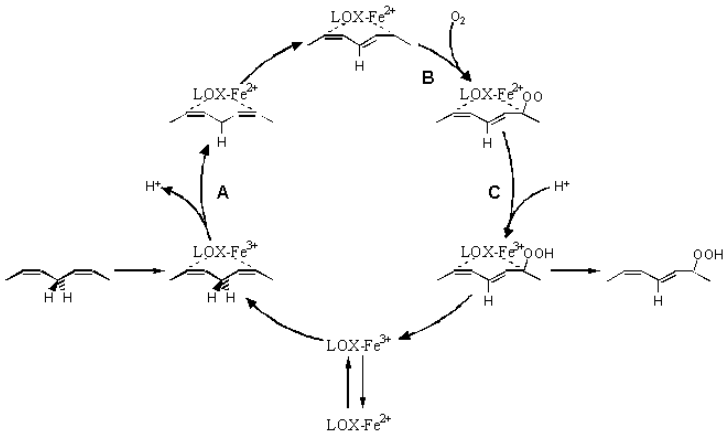
$$R^{\bullet} + R^{\bullet} \longrightarrow RR \qquad (3.1)$$

$$ROO^{\bullet} + ROO^{\bullet} \longrightarrow ROOR + O_2 \qquad (3.2)$$

ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง (Halliwell, B., 1995) การทำงานของเอนไซม์สำคัญ 2 ชนิด ที่มีผลกระตุ้นการสร้างอนุมูลอิสระภายในร่างกาย ได้แก่

1) เอนไซม์แซนธีนออกซิเดส (xanthine oxidase: XO) ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการสลายเบสพิวรีน (purine) โดยเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนไฮโพแซนธีน (hypoxanthine) เป็นแซนธีน (xanthine) และแซนธีนเป็นกรดยูริก (uric acid) พร้อมๆ กับเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนให้ออกซิเจนเกิดเป็นอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\bullet-}$)

2) เอนไซม์ไลโพออกซีจีเนส (lipoxygenase: LOX) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (polyunsaturated fatty acid) ภายในโมเลกุลของเอนไซม์นี้มีเหล็ก (Fe^{2+}) เป็นส่วนประกอบอยู่ ทำหน้าที่ดึงอะตอมไฮโดรเจนจากกรดไขมัน และเติมออกซิเจนให้กับกรดไขมันเกิดเป็นไฮโดรเพอรอกไซด์ ซึ่งจะสลายตัวเป็นอนุมูลของกรดไขมันต่อไป ดังแสดงในภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 การทำงานของเอนไซม์ lipoxygenase (LOX) ในปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมัน

กระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว (Konstan, M.W., 1993) ในขั้นตอนการทำลายสิ่งแปลกปลอม โดยเฉพาะเชื้อโรคที่ถูกกลืนกินเข้ามาภายในร่างกาย เซลล์เม็ดเลือดขาวจะมีการดึงโมเลกุลออกซิเจน (O_2) มาใช้เป็นจำนวนมาก เพื่อผลิตเป็นอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\bullet-}$) โดยการทำงานของเอนไซม์ NADPH ออกซิเดส (NADPH oxidase) ที่อยู่บนเยื่อบุชั้นนอก (outer membrane) ของเม็ดเลือดขาว ดังสมการ

$$2O_2 + NADPH \longrightarrow 2O_2^{\bullet-} + NADP^+ + H^+ \qquad (4)$$

นอกจากนี้ในเม็ดสี (granule) ของเม็ดเลือดขาวยังมีเอนไซม์ไมอีโลเทอรอกซีเดส (myeloperoxidase) ทำให้เกิดอนุมูลไฮโปคลอรัส (hypochlorus, $HOCl^{\bullet}$) ซึ่งเป็นสารที่ทำลายจุลชีพได้ ดังสมการ

$$H_2O_2 + Cl^- \longrightarrow HOCl^{\bullet} + OH^- \qquad (5)$$

โลหะทรานซิชัน (transition metal) (Halliwell, 1995) โลหะทรานซิชัน 2 ชนิด คือ เหล็ก (Fe^{2+}) และทองแดง (Cu^{2+}) ที่มีอยู่ทั่วไปในร่างกาย สามารถเร่งการสร้างอนุมูลไฮดรอกซิลจากซูเปอร์ออกไซด์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide, H_2O_2) ในปฏิกิริยา Fenton (Fenton's reaction) ดังสมการ

$$H_2O_2 + O_2^{\bullet-} + Fe^{2+} + / Cu^{2+} \longrightarrow OH^{\bullet} + OH^- + O_2 \qquad (6)$$

2.1.2.2 ปัจจัยภายนอกร่างกาย

ยารักษาโรค ยาบางชนิดที่รับประทานเข้าไป ในร่างกายสามารถก่อให้เกิดอนุมูลอิสระได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งยาในกลุ่มต้านจุลชีพและต้านมะเร็ง เช่น บลีโอไมซิน (bleomycin) แอนทราไซคลินส์ (antracyclines) (Voest, E.E., 1994) และเมโธทรีเสต (methotrexate) (Gressier, B., 1994) เนื่องจากมีฤทธิ์เสริมปฏิกิริยาออกซิเดชัน (prooxidation)

รังสี การใช้รังสีรักษาโรค เช่น รังสีเอกซ์และรังสีแกมมา เป็นสาเหตุทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในร่างกายจากการถ่ายทอดพลังงานให้กับน้ำ ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเซลล์แล้วก่อให้เกิด

ปฏิกิริยาขั้นต่อไป (secondary reaction) กับออกซิเจนที่ละลายอยู่ในเซลล์นั้นได้อนุมูลอิสระเกิดขึ้น (Halliwell, B., 1995)

ควันบุหรี่ ในควันบุหรี่มีส่วนประกอบของไนตริกออกไซด์ (NO) ไนโตรเจนออกไซด์ (NO_2) และเพอรอกซีไนไตรท์ ($ONOO^-$) รวมทั้งสารมลพิษ ได้แก่ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) และคาร์บอนเตรทตระคลอไรด์ (CCl_4) ซึ่งจะถูกกำจัดออกจากร่างกาย โดยการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครม P-450 ไฮดรอกซีเจส (cytochrome P-450 hydroxylase) ที่มีอยู่มากในเซลล์ตับ และพบได้บ้างในเซลล์ปอดและลำไส้เล็ก ทำให้เป็นสาเหตุของการสร้างอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ภายในเซลล์ดังกล่าว (Bast, A., 1991)

โอโซน โอโซนไม่ได้เป็นอนุมูลอิสระแต่จัดเป็นสารออกซิไดซ์แรงสูงซึ่งสามารถเปลี่ยนรูปเป็นอนุมูลไฮดรอกซิลได้จากการกระตุ้นของคลื่นแสง (Valacchi, G., 2004)

2.2 การป้องกันอันตรายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ

โดยธรรมชาติแล้วจะมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในเซลล์และร่างกายหลายชนิด มีทั้งที่เป็นประโยชน์และให้โทษ อันประกอบด้วยอนุมูลอิสระที่หลุดรอดออกมาจากการเผาผลาญออกซิเจนเป็นพลังงาน อนุมูลอิสระที่ทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณต่อเซลล์และอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์ต่อการทำงานของเซลล์หรืออวัยวะ ในกรณีหลังจะมีประโยชน์แต่ออกฤทธิ์ในปริมาณที่ต่ำมากไม่เกิดอันตรายต่อเซลล์และร่างกาย แต่จะเป็นอันตรายและเสียหาย หากมีอนุมูลอิสระในปริมาณมากเกินสมดุล ดังนั้นเซลล์และร่างกายจึงมีกลไกเพื่อควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระไม่ให้สูงจนเกิดอันตราย กลไกสำคัญที่ทำหน้าที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระมีกลไกหลักอยู่สามกลไก ทำหน้าที่ลดผลกระทบที่เป็นอันตรายของอนุมูลต่อเซลล์ ในสภาวะปกติกลไกเหล่านี้ถือว่าเพียงพอต่อการรักษาปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุลได้ กล่าวคือ สามารถควบคุมได้แม้ว่าจะมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้น อย่างไรก็ตาม หากเกิดภาวะผิดปกติที่ทำให้กลไกการป้องกันเหล่านี้บกพร่องจนไม่สามารถที่จะควบคุมภาวะสมดุลได้ จะนำไปสู่การเกิดภาวะที่อนุมูลและสารออกซิแดนทมีมากเกินสมดุล (Oxidative stress) และเกิดโรคต่างๆขึ้นในร่างกายได้

2.2.1 เอนไซม์ในระดับเซลล์

เอนไซม์เป็นกลไกสำคัญขั้นแรกที่ทำหน้าที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุล เอนไซม์ที่สำคัญ ได้แก่ เอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (SOD) เอนไซม์ SOD จะทำหน้าที่ขจัดอนุมูลอิสระเริ่มต้นที่เกิดขึ้นในร่างกายคือ อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน โดยเร่งปฏิกิริยาดิสมิวเตส ในการเปลี่ยนอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออนให้เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะถูกกำจัดต่อโดยเอนไซม์คาตาเลส และเอนไซม์กลูตาไทโอน-เปอร์ออกซิเดส SOD ในร่างกายมีหลายอโวฟอร์ม ลักษณะโครงสร้างที่สำคัญของเอนไซม์ SOD ทุกชนิดคือ มีโลหะทรานซิชันที่บริเวณที่ใช้จับซับสเตรท ทำหน้าที่โดยการออกซิไดส์และรีดิวซ์กลับไปกลับมา นอกจากนี้เอนไซม์ SOD ยังทำหน้าที่ปกป้องเอนไซม์ในกลุ่มดีไฮเดรส ได้แก่ เอนไซม์ไดไฮโดรแอซิดดีไฮเดรส เอนไซม์อะโคไนเตส เอนไซม์ฟอสโฟกลูโคเนตดีไฮเดรส เอนไซม์ฟูมาเรส-เอ และเอนไซม์ฟูมาเรส-บี ไม่ให้เอนไซม์เหล่านี้ถูกอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออนทำลาย

เอนไซม์คาตาเลส (CAT) เอนไซม์คาตาเลส เป็นเอนไซม์ซึ่งอยู่ในเปอร์ร็อกซิโซม มีฮีม คือ ferriprotoporphtrin เป็นองค์ประกอบ โครงสร้างเอนไซม์คาตาเลสประกอบด้วยหน่วยย่อยของ

โปรตีนฮีม 4 หน่วยย่อยที่เหมือนกัน แต่ละหน่วยมีขนาด 60 กิโลดาลตัน การจัดกรียงตัวของหน่วยทั้ง 4 เป็นแบบเตตระฮีดรัล ดังนั้นเอนไซม์นี้จึงมีฮีมจำนวน 4 กลุ่มต่อ 1 โมเลกุลของเอนไซม์ มีน้ำหนักโมเลกุลรวมเท่ากับ 240 กิโลดาลตัน เอนไซม์คาตาเลสทำหน้าที่เปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นโมเลกุลของน้ำและออกซิเจน โดยใน 1 นาที สามารถเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 1 ล้านโมเลกุลไปเป็นน้ำและออกซิเจน

เอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส (GPx) เอนไซมส์เปอร์ออกซิเดสจะมีธาตุซิลิเนียมเป็นองค์ประกอบสำคัญอยู่ในโครงสร้างของเอนไซม์ เอนไซม์ GPx ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยารีดักชันของสารประกอบไฮโดรเปอร์ออกไซด์ ได้แก่ ลิพิดเปอร์ออกไซม์ (ROOH) และไอโดรเจนเปอร์ไซม์ โดยมีการออกซิไดส์กลูตาไทโอน (GSH) ร่วมในปฏิกิริยาเฟนตัน ซึ่งเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ เอนไซม์นี้ปกป้องเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมไม่ให้ถูกทำลายหรือเสียหายจากภาวะที่ร่างกายถูกออกซิไดส์หรือมีอนุมูลอิสระมากเกินไป

2.3 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants)

สารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารที่เข้ามามีบทบาทช่วยต่อต้านสารที่เกิดขึ้นในขบวนการปฏิกิริยาชีวเคมีที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย ซึ่งจะมีการขับของเสียที่ร่างกายได้รับ ได้แก่ ควันบุหรี่ แอลกอฮอลล์ รังสี UV เอ็กซเรย์ ซึ่งสิ่งเหล่านี้เป็นอนุมูลอิสระที่มีอันตรายต่อเซลล์ในร่างกายที่อาจส่งผลให้เกิดโรคมะเร็ง โรคหัวใจ ภาวะข้อต่ออักเสบ และการเสื่อมของอวัยวะต่างๆ อนุมูลอิสระจะทำลายเนื้อเยื่อเซลล์ เปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ DNAs ด้วยเหตุนี้จึงเป็นการเพิ่มความเสี่ยงของการมีเซลล์มะเร็ง และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่นำไปสู่ขบวนการเกิดโรคมะเร็ง ในทางเคมีสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) คือ สารประกอบที่สามารถป้องกันหรือชะลอกระบวนการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้

กระบวนการออกซิเดชัน มีได้หลายรูปแบบ เช่น กระบวนการออกซิเดชันที่ทำให้เหล็กกลายเป็นสนิม ทำให้แอปเปิลเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล หรือทำให้น้ำมันพืชเหม็นหืน และกระบวนการออกซิเดชันที่เกิดในร่างกาย เช่น การย่อยสลายโปรตีนและไขมันจากอาหารที่กินเข้าไป มลพิษทางอากาศ การหายใจ ควันบุหรี่ รังสียูวี ล้วนแต่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในร่างกายของเราซึ่งสร้างความเสียหายต่อร่างกายได้ ในความเป็นจริงแล้ว ไม่มีสารประกอบสารใดสารหนึ่งสามารถป้องกันการเกิดออกซิเดชันได้ทั้งหมด แต่ละกลไกอาจต้องใช้สารต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันในการหยุดกระบวนการออกซิเดชันนั้นๆ เอาไว้ได้

2.3.1 ความสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระ

มีงานวิจัยมากมายที่สามารถบ่งชี้ว่า สารต้านอนุมูลอิสระสามารถลดความเสี่ยงต่อโรคต่างๆ โดยเฉพาะโรคเรื้อรังที่สัมพันธ์กับอาหาร เช่น โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคหัวใจ โรคสมอง (อัลไซ-เมอร์) เป็นต้น รวมทั้งช่วยชะลอกระบวนการบางขั้นตอนที่ทำให้เกิดความแก่ โดยปกติแล้วร่างกายสามารถกำจัดอนุมูลอิสระก่อนที่มันจะทำอันตรายต่อร่างกายเรา แต่ถ้ามีการสร้างอนุมูลอิสระเร็วหรือมากเกินกว่าร่างกายจะกำจัดทัน อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะสร้างความเสียหายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อได้ ซึ่งส่งผลกระทบต่อสุขภาพ สารต้านอนุมูลอิสระลดความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระได้ 2 ทาง คือ ลดการสร้างอนุมูลอิสระในร่างกาย และลดอันตรายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ

2.3.2 ประเภทของสารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ มีทั้งสารที่มาจากธรรมชาติ (natural antioxidants) และสารสังเคราะห์ (synthetic antioxidants) สารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากธรรมชาติ ได้แก่กรด-อะมิโน (amino acid) วิตามินซี (ascorbic acid) แคโรทีนอยด์ (carotenoids) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เมลานอยดิน (melanoidin) โทโคฟีรอล (tocopherol) แทนนิน (tannins) เปบไตด์ (peptides) และกรดอินทรีย์อื่นๆ ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นสารสังเคราะห์นั้นมีมากมายหลายชนิดตัวอย่างเช่น tert-butyl-4-hydroxytoluene (BHT) และ tert-butylthioquinone (TBHQ) เป็นต้น โดยทั่วไปสารต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งได้เป็น 5ประเภท (อัญชนา เจนวิถีสุข, 2545) ดังนี้

1) Primary antioxidant ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) และโทโคฟีรอล (tocopherol) รวมถึงสารโทโคฟีรอลสังเคราะห์บางชนิด เช่น alkyl gallate, BHA, BHT และ TBHQ เป็นต้น สารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มนี้จะทำหน้าที่หยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันโดยการให้อิเล็กตรอนแก่โมเลกุลของอนุมูลอิสระ ให้เป็นสารที่มีความเสถียร

2) Oxygen scavenger ได้แก่ วิตามินซี (ascorbic acid) และอนุพันธ์ เช่น ascorbyl palmitate, erythorbic acid (isoascorbic acid) และ sodium erythorbate สารในกลุ่มนี้จะเข้าทำปฏิกิริยากับออกซิเจน ซึ่งจะเป็นการกำจัดโมเลกุลของออกซิเจนส่วนเกินในระบบปิด

3) Secondary antioxidant ได้แก่ dilauryl thiopropionate และ thiopropinic acid เป็นต้น สารในกลุ่มนี้จะทำหน้าที่สลาย lipid hydroperoxide ให้กลายเป็นสารที่มีความเสถียร

4) Enzymic antioxidant ได้แก่ เอนไซม์ต่างๆ ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระ เอนไซม์เหล่านี้แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ primary antioxidant enzyme และ ancillary antioxidant enzyme ซึ่งสารเหล่านี้จะทำหน้าที่กำจัดออกซิเจนและอนุพันธ์ โดยเฉพาะไฮโดรเจน-เพอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

5) Chelating agent หรือ Sequestrant ได้แก่ กรดซิตริก (citric acid) กรดอะมิโน (amino acid) และethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA) เป็นต้น สารกลุ่มนี้จะทำหน้าที่จับกับไอออนของโลหะเช่น เหล็กและทองแดง ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระให้กลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีความเสถียร

2.3.3 แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระ

ปัจจุบันสารต้านอนุมูลอิสระโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ได้มาจากพืชผัก เครื่องเทศ องุ่น และสมุนไพร ได้รับความสนใจ และศึกษากันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากกระแสเรื่องความปลอดภัยของสารสกัดจากธรรมชาติ สารต้านอนุมูลอิสระแบ่งตามแหล่งที่มาได้ 2 ชนิดได้แก่

1) สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (Synthetic antioxidants) สารประกอบฟีนอลิก (phenolics) สังเคราะห์ 5 ชนิด ได้แก่ propyl gallate, 2-butylated hydroxyanisole, 3-utylate hydroxyanisole, BHT (butylated hydroxytoluene) และ tertiary butylhydroquinon เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน

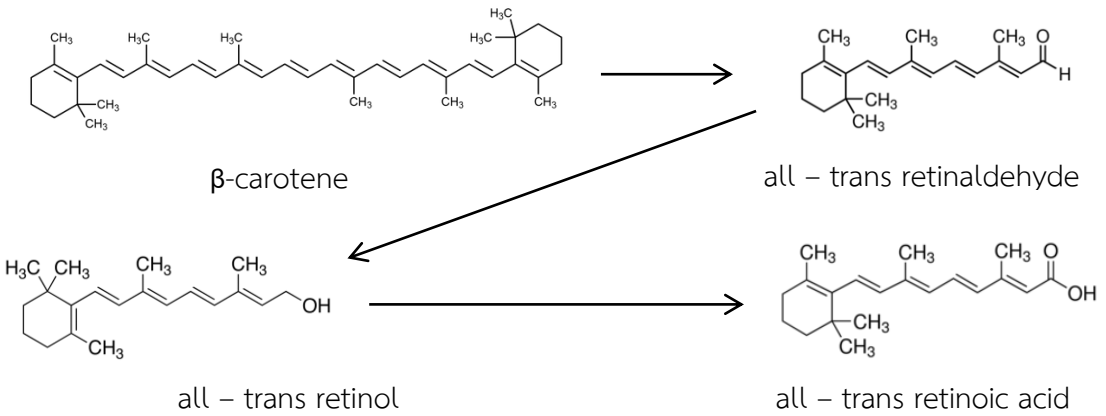
อันเป็นสาเหตุให้อาหารมีกลิ่น สี และรสชาติที่เปลี่ยนไป สารสังเคราะห์เหล่านี้มีประสิทธิภาพและความคงตัวสูงกว่าสารสกัดจากธรรมชาติ แต่มีข้อจำกัดของการใช้เนื่องจากปัญหาด้านความปลอดภัยในการบริโภค (Yang, J.H., 2000 : Pokorny, J., 2001)

2) สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (Natural antioxidants) สารกลุ่มนี้ได้รับความสนใจและมีการค้นคว้าอย่างมากในปัจจุบันเนื่องจาก ความเชื่อมั่นว่ามีความปลอดภัยในการบริโภคมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ พบได้ทั้งในจุลชีพ สัตว์ และพืช ซึ่งมีทั้งที่เป็นวิตามิน เช่น วิตามินซี วิตามินอี เบต้าแคโรทีน และสารที่ไม่ให้คุณค่าทางโภชนาการ (nonnutrient) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นสารประกอบฟีนอลิก โดยเฉพาะกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenols) เช่น แซนโธน (xanthone) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ซึ่งประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิลที่เกาะบนวงเบนซีน (aromatic hydroxyl) ตั้งแต่ 2 หมู่ขึ้นไป หมู่ฟังก์ชั่น (functional group) เหล่านี้ มีบทบาทสำคัญในการดักจับอนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้น หรือก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้โดยการให้อนุมูล $H^{\bullet}$ แก่อนุมูลอิสระเหล่านั้น นอกจากนี้สารประกอบโพลีฟีนอลที่มี โครงสร้างของ ortho-dihydroxyl phenol อยู่ในโมเลกุลยังสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูล $OH^{\bullet}$ ในปฏิกิริยาที่มีอนุมูลโลหะทรานซิชัน คือ Fe^{2+} และ Cu^{2+} เป็นตัวเหนี่ยวนำได้โดยการเข้าจับกับโลหะดังกล่าวเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (complex) (Sanchez-Moreno, C., 2000) สารประกอบกลุ่มโพลีฟีนอลซึ่งพบในพืชพรรณธรรมชาตินานาชนิด สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีทั้งในห้องปฏิบัติการ (in vitro) และในสิ่งมีชีวิต

2.1) ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติ

กลไกการยับยั้งปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระโดยสารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ จะแตกต่างกันออกไป ตามคุณสมบัติของสารนั้นๆ เช่น คุณสมบัติการละลายในน้ำหรือไขมัน (Le Prell, C.G., 2007) ดังตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ ต่อไปนี้

1) เบต้าแคโรทีน (β-carotene) เมื่อเข้าสู่เซลล์ (in vivo) เบต้าแคโรทีนจะเปลี่ยนเป็นวิตามินเอโดยการแตกหักของพันธะคู่ที่ตำแหน่งกึ่งกลางโมเลกุล ดังภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2.2 การสังเคราะห์วิตามินเอจากเบต้าแคโรทีน (อัญชนา เจนวิถีสุข, 2545)

ปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระของเบต้าแคโรทีนคือการกำจัด singlet oxygen ($^1O_2$) เพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไขมัน ดังสมการ

$$^1O_2 + {}^1\beta\text{-carotene} \longrightarrow {}^3O_2 + {}^3\beta\text{-carotene}$$

จากสมการจะเห็นว่า เมื่อเบต้าแคโรทีนทำปฏิกิริยากับ singlet oxygen ($^1O_2$) แล้วจะได้เป็น triplet oxygen ($^3O_2$) หรือออกซิเจนที่อยู่ในสภาวะพื้น (ground state) และβ-carotenyl radical ซึ่งเป็นสารที่มีความเสถียรและอยู่ในรูปเรโซแนนซ์ (อัญชนา เจนวิถีสุข, 2545)

2) วิตามินอี (tocopherols) ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต วิตามินอีจะปรากฏเป็นสารประเภทไขมัน (Le Prell, C.G., 2007) แบ่งย่อยได้ทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ α-tocopherol, β-tocopherol, ρ-tocopherol และ δ-tocopherol ขึ้นอยู่กับจำนวนและตำแหน่งของหมู่เมทิลที่ติดอยู่กับ chromane ring (อัญชนา เจนวิถีสุข, 2545) วิตามินอีมีคุณสมบัติเป็นโมเลกุลที่ให้อิเล็กตรอน (electron donor) ซึ่งจะทำปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) กับอนุมูลเพอรอกซิล (peroxyl radical) เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระในขั้นตอนโพรพาเกชั่น (propagation step) (Le Prell, C.G., 2007) ดังสมการต่อไปนี้

$$\alpha\text{-tocopherol} + LOO^{\bullet} \longrightarrow \alpha\text{-tocopherol}^{\bullet} + LOOH$$

$$\alpha\text{-tocopherol}^{\bullet} + LOO^{\bullet} \longrightarrow LOO\text{-}\alpha\text{-tocopherol}$$

จากสมการจะเห็นว่า เมื่อ α-tocopherol ทำปฏิกิริยากับอนุมูลเพอรอกซิลแล้ว จากนั้นจะเกิดอนุมูล α-tocopherol ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลเพอรอกซิลโมเลกุลอื่นและได้เป็นสารที่มีความเสถียร และหยุดปฏิกิริยาออกซิเดชันลง (อัญชนา เจนวิถีสุข, 2545)

3) วิตามินซี (ascorbic acid) สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระโดยการทำปฏิกิริยารีดักชัน ซึ่งปฏิกิริยาของวิตามินซีจะเกิดขึ้นภายในบริเวณของเซลล์ที่ประกอบไปด้วยน้ำ (aqueous phase) ซึ่งต่างกับปฏิกิริยาที่เกิดจากวิตามินอี ซึ่งเกิดขึ้นในเยื่อหุ้มองค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์ (Le Prell, C.G., 2007) ปฏิกิริยาในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระของวิตามินซีจะเกิดขึ้นดังสมการดังต่อไปนี้

$$AH^- + OH^{\bullet} \longrightarrow H_2O + A^{-\bullet}$$

$$AH^- + O_2^{-\bullet} + H^+ \longrightarrow H_2O_2 + A^{-\bullet}$$

$$AH^- + ROO^{\bullet} \longrightarrow ROOH + A^{-\bullet}$$

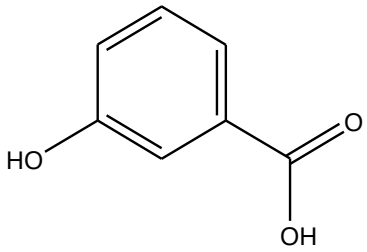
$$AH^- + H_2O_2 + H^+ \longrightarrow 2H_2O + A$$

จากสมการจะเห็นว่า วิตามินซีจะเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระและ ROS ได้สารที่เรียกว่า semidehydroascorbate ($A^{-\bullet}$) และ hydroascorbate (A) ซึ่งนอกจากวิตามินซีจะสามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระได้แล้ว ยังสามารถเสริมการทำงานของวิตามินอีได้ โดยการเข้าทำปฏิกิริยากับ α-tocopherol ทำให้อนุมูล α-tocopherol เปลี่ยนเป็น α-tocopherol เหมือนเดิม ดังสมการ (อัญชนา เจนวิถีสุข, 2545)

$$\alpha\text{-tocopherol}^{\bullet} + AH^- \longrightarrow \alpha\text{-tocopherol} + A^{-\bullet}$$

4) สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่พบได้ในพืชทั่วไป มีโครงสร้างหลักเป็นวงแหวนแอโรมาติก (aromatic ring) และมีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl

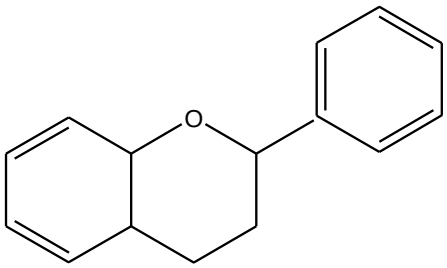
group) อยู่ในโมเลกุลอย่างน้อย 1 หมู่ มีคุณสมบัติละลายในน้ำได้ ส่วนมากพบรวมกับโมเลกุลของน้ำตาลในรูปสารประกอบไกลโคไซด์ (glycoside) สารประกอบฟีนอลิกในธรรมชาติมีหลายกลุ่ม และมีองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ลิกนิน (lignin) เมลานิน (melanin) และแทนนิน (tannin) เป็นต้น



ภาพที่ 2.3 สูตรโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิกทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระโดยเฉพาะอนุมูลเพอรอกซิล โดยทำให้อนุมูลอิสระกลายเป็นสารที่มีความเสถียร ช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาในขั้นตอนโพรพาเกชันและทำหน้าที่เป็น chelating agent ช่วยดักจับไอออนของโลหะซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) การเกิดอนุมูลอิสระไว้ในโมเลกุล อีกทั้งยังช่วยทำหน้าที่เป็นสารรีดิวซ์ ทำหน้าที่ให้ไฮโดรเจนและกำจัด ROS ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิก ขึ้นอยู่กับค่า redox potential ของหมู่ไฮดรอกซิลในโมเลกุล และคุณสมบัติเฉพาะตามโครงสร้างเคมีของสารดังกล่าว (อัญชนา เจนวิถีสุข , 2545)

5) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) สารฟลาโวนอยด์พบอยู่ทั่วไปในพืชที่มีสีเขียวและพบในทุกส่วนของพืชไม่ว่าจะเป็น ใบ ราก เนื้อไม้ เปลือกต้น ดอก ผล หรือเมล็ด ในสัตว์สามารถพบได้บ้าง โดยเชื่อว่ามาจากพืชที่บริโภคเข้าไปมากกว่าการเกิดชีวสังเคราะห์ในร่างกายของสัตว์เองฟลาโวนอยด์จัดเป็นสารสำคัญของกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenol) มีสูตรโครงสร้างหลักเป็นฟลาแวน (flavan) หรือ 2-ฟีนิลเบนโซไพแรน (2-phenylbenzopyran) ประกอบด้วยคาร์บอน 15 อะตอม ที่มีสูตรโครงสร้างพื้นฐานเป็น C_6-C_3-C_6 กล่าวคือ ประกอบด้วย substituted benzene rings จำนวน 2 หมู่ เชื่อมต่อกันด้วย aliphatic chain ของคาร์บอน 3 อะตอม และมีความแตกต่างกันตรง oxidation state ของ aliphatic chain ของอะตอมคาร์บอน 3 อะตอม



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างของฟลาโวนอยด์

2.4 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity determination)

วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสมารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ ในแต่ละประเภทจะมีหลายวิธีด้วยกัน ซึ่งแต่ละวิธีมีความจำเพาะแตกต่างกัน โดยปกติมักใช้หลายวิธีร่วมกันในการตรวจสอบและสรุปผล

2.4.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพ

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิง คุณภาพเป็นการทดสอบเพื่อหาชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในตัวอย่าง โดยอาศัยหลักการต่างๆ เช่น การทำให้เกิดสี การทำให้เกิดตะกอน ความสามารถของการละลายในตัวทำละลาย และการถูกดูดซับโดยตัวดูดซับ วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่นิยม ได้แก การตรวจวัดสารโพลีฟีนอลชนิดต่างๆ เช่น Shinoda test และ Pew test โครมาโทกราฟแบบชั้นบาง (thin layer chromatography, TLC) และการตรวจหาสารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ โดยใช้เครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC)

2.4.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ

1) การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (diphenylpicryhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay) เป็นการทดสอบด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระ ในที่นี้ก็คืออนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH$^{\bullet}$, Diphenyl-picryhydrazyl radical) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัว และมีสีม่วง สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดโดยใช้เครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เมื่อ DPPH$^{\bullet}$ ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายด้วยเอทานอล (สารที่ให้อิเล็กตรอน) จะทำให้สีม่วงจางลงๆ จนเป็นสีเหลือง ซึ่งก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงต้องตั้งทิ้งไว้ที่มืดเป็นเวลา 30 นาทีเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา ทำให้สามารถหาการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH$^{\bullet}$ สูตรคำนวณได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงจากการใส่ตัวอย่างเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น (ก่อนใส่สารตัวอย่าง) ดังนี้

$$DPPH^{\bullet} + AH \longrightarrow DPPH\text{-}H + A^{\bullet}$$

$$\text{DPPH radical scavenging (\%)} = [(A_0\text{-}A_s)/A_0] \times 100$$

โดย A_0 = คาการดูดกลืนแสงตั้งต้น

และ A_s = คาการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

2) การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS radical cation decolorization assay) เป็นวิธีการวัดความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS$^{\bullet+}$, 2,2′-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6sulfonic acid) radical) เป็นสารสังเคราะหที่มีสีเขียวปนน้ำเงิน สามารถดูดกลืนแสงไดสูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เนื่องจากสีของ ABTS$^{\bullet+}$ ปกติจะมีค่าการดูดกลืนแสงสูง จึงต้องทำการเจือจาง ABTS$^{\bullet+}$ ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นนำ ABTS$^{\bullet+}$ ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่ละลายด้วยเอทานอลเจือจางซึ่งจะทำให้สีจางลง และตั้งทิ้งไวเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา จึงสามารถหาความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างซึ่งได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS$^{\bullet+}$ โดยวิธีการคำนวณและการเทียบกับ

สารมาตรฐาน trolox กระทำเช่นเดียวกับวิธี DPPH$^{\bullet}$ ข้อดีของวิธีการนี้ คือ $ABTS^{\bullet+}$ ละลายไดดีในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ จึงทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว และทำปฏิกิริยาไดดีในช่วง pH กว้าง สวนข้อเสีย คือ $ABTS^{\bullet+}$ ไม่เป็นสารธรรมชาติที่พบในร่างกายหรือในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต และต้องมีการทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อนถึงจะเกิด เป็นอนุมูลอิสระ

$$ABTS^{\bullet+} + AH\ (antioxidant) \longrightarrow ABTS\ (สีจางลง) + A^{\bullet}$$

3) การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (ferricion reducing antioxidant power (FRAP) assay) วิธีการนี้อาศัยหลักการของสารต้านอนุมูลอิสระสามารถถ่ายเทอิเล็กตรอนให้กับสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe(III)\ (TPTZ)_2]^{3+}$ ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปเป็น $[Fe(II)\ (TPTZ)_2]^{2+}$ ซึ่ง $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ มีความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร วิธีการนี้เป็นวิธีที่ง่าย ใช้เวลาน้อย ไม่แพง และสามารถทำซ้ำแล้วให้ผลเหมือนเดิม แต่ข้อเสียคือ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นปฏิกิริยาเคมีที่ไมเกี่ยวข้องกับสภาวะร่างกาย และสารละลายที่ใช้อ้างอิง ต้องใช้น้ำปราศจากไอออน (deionized water)

$$[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+} \longrightarrow [Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$$

4) การวัดปริมาณฟีนอลรวม โดยวิธี Folin-Ciocalteu เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลรวมในพืชผัก ผลไม้ และเครื่องดื่มต่างๆ วิธีนี้จะอาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์ในการทำให้เกิดปฏิกิริยา เนื่องจาก molybdotung-state ion วิธี Folin-Ciocalteu ได้แก่ sodiumtungstate + sodiummolybdate + phosphoric acid และ sodium carbonate ติดตามการเปลี่ยนแปลงสีจากปฏิกิริยาไอออน Mo (VI) ซึ่งมีสีเหลือง เมื่อได้รับสารต้านออกซิเดชันแล้วจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ Mo (V) ซึ่งมีสีน้ำเงินเช่นเดียวกันกับปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น คือ

$$Na_2WO_4/Na_2MoO_4 \longrightarrow (phenol\text{-}MoW_{11}O_{40})^{-4}$$

$$Mo\ (VI) + e^{-} \longrightarrow Mo\ (V)$$

สีเหลือง สีน้ำเงิน

วิธี Folin-Ciocalteu สามารถติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยวัดค่า absorbance ที่ 725 นาโนเมตร การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลรวมในสารตัวอย่างจะใช้เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก ข้อดีของวิธีนี้ก็คือ สะดวก ง่าย รวดเร็ว และมีความแม่นยำ

5) การหาปริมาณฟลาโวนอยด์ เป็นการนำเอาสารละลายตัวอย่างมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเติม 10% อลูมิเนียมคลอไรด์ และ 5% โซเดียมไนไตรท์ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร และนำค่าการการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณฟลาโฟนอยด์จากสมการของกราฟสารละลายมาตรฐาน quercetin (calibration curve)

2.5 สมุนไพรพื้นบ้าน

พืชสมุนไพรพื้นบ้าน หมายถึง พืชที่ใช้ทำเป็นเครื่องยาซึ่งหาได้ตามพื้นบ้าน นิยมใช้ในการทำยา เป็นวัตถุดิบเบื้องต้นในการสกัดสารเคมีต่างๆ เพื่อใช้ในการผลิตยาแผนโบราณใช้ในการปรุงแต่ง กลิ่น รสและสีของอาหารใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ โดยส่วนมากเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่มีอยู่แล้วซึ่งประหยัดและมีราคาถูก

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมา กระแสในเรื่องความห่วงใยสุขภาพการป้องกันและรักษาอาการเจ็บป่วยกำลังเป็นสิ่งที่ผู้บริโภคให้ความสนใจเป็นอย่างมาก ผู้บริโภคในหลายๆ ประเทศทั่วโลกได้ให้ความสนใจในการนำสมุนไพรและผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรมารับประทานหรือเพื่อใช้บำรุงรักษาสุขภาพ ในหลายงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ได้พิสูจน์ว่า สารต้านอนุมูลอิสระมีบทบาทสำคัญในการลดความเสี่ยงจากการเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง และโรคหัวใจ สารต้านอนุมูลอิสระหรือสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) เป็นสารที่สามารถชะลอหรือป้องกันปฏิกิริยา ออกซิเดชันของสารที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาไม่ให้ทาลายสารชีวโมเลกุลในร่างกาย เช่น ดีเอ็นเอ ไขมัน โปรตีน เป็นต้น ซึ่งหากเกิดปฏิกิริยาจะนาไปสู่การเกิดโรคต่างๆ

สมุนไพร ซึ่งมีสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด เช่น สารประกอบฟีโนลิก (phenolic compounds) และวิตามินซี เป็นต้น สารที่อยู่ในกลุ่มสารประกอบฟีโนลิก ได้แก่ flavonoids, flavones, gallic acid, ellagic acid, anthocyanins, carotenoids และอนุพันธ์ของ cinnamic acid สารเหล่านี้พบมากน้อยต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของพืช สารต้านอนุมูลอิสระพวกนี้ทำให้พืชมีภูมิคุ้มกันจากการติดเชื้อต่างๆ และสามารถทนต่อปฏิกิริยา photooxidation ในการสร้างอาหารได้ (วาริน แสงกิตติโกมล, 2546) สารประกอบฟีโนลิกนอกจากจะมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระแล้ว ยังมีคุณสมบัติอื่นๆ เช่น ช่วยขยายหลอดเลือด ลดการอักเสบ กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ต้านมะเร็ง ต้านโรคภูมิแพ้ ทำลายเชื้อโรคที่เข้าสู่ร่างกาย

สารเคมีที่แยกสกัดได้จากสมุนไพรนั้นได้ถูกจำแนกออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ primary metabolite และ secondary metabolite ซึ่ง primary metabolite เป็นสารที่พบได้ในพืชทุกชนิด เป็นผลิตผลที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสง (photosynthesis) เช่น คาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโนและไขมัน ส่วน secondary metabolite นั้น ในพืชแต่ละชนิดจะพบไม่เหมือนกัน secondary metabolite จะมีสารเริ่มต้นเป็นกรดอะมิโน (amino acid) อะซีเตท (acetate) มีวาโลเนท (mevalonate) ฯลฯ โดยมีเอนไซม์เข้ามาเกี่ยวข้อง ซึ่งพืชต่างชนิดกันมักจะมีเอนไซม์ที่ไม่เหมือนกัน ทำให้วิถีทางในกระบวนการชีวสังเคราะห์ (biosynthesis) ต่างกันไป และได้สารประเภท secondary metabolite ต่างกันไปในต้นไม้ต่างชนิดกันหรือต่างฤดู

ย่านางแดง

ภาพที่ 2.5 ย่านางแดง (www.phargarden.com)

ชื่อสมุนไพร ย่านางแดง

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Bauhinia strychnifolia Craib.*

ชื่อวงศ์ Craib Fabaceae (Leguminosae-Caesalpinoideae)

ชื่อสามัญ/ชื่ออื่น เครือขยัน ขยัน สยาน ขยาน

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ต้น เป็นไม้เถาเลื้อยค่อนข้างแข็ง ขนาดใหญ่มีเหง้าหัวใต้ดิน เถายาวประมาณ 4-10 เมตร สีน้ำตาลเกลี้ยงพาดตามต้นไม้อื่น กิ่งแขนแขนงแยกออกจากง่ามใบสลับกันไปเป็นระเบียบ ตามปลายกิ่งแขนงมีมือม้วนเป็นคู่ๆ ตรงข้ามกับสำหรับเกาะยึด

ใบเดี่ยว เรียงสลับมีหูใบเล็กๆ 1 คู่ๆ ใบรูปขอบขนานหรือรูปไข่มนรี ขนากกว้าง 3-6 เซนติเมตร ยาว 6-12 เซนติเมตร โคนใบหยักเว้าเล็กน้อย ปลายใบสอบแคบหรือแหลม ผิวใบเกลี้ยงและเป็นมันสีเขียว เส้นแขนงใบสีแดงคล้ำ ใบยอดอ่อนสีออกแดง

ดอก ออกเป็นช่อยาวเรียวตามปลายกิ่ง ดอกเป็นหลอดกลวงโค้งเล็กน้อย ปลายบานห้อยลงคล้ายกับดอกประทัดจีนมีจำนวนมาก ช่อหนึ่งยาว 50-100 เซนติเมตร ดอกลู่มาทางโคนช่อแผ่ออก 2 ข้างของก้านช่อ กลีบรองดอกสีแดง โคนกลีบเชื่อมติดกันเป็นกรวยปลายแยกเป็นแฉกแหลมๆ 5 แฉก กลีบดอกสีแดงคล้ำ

ผล เป็นฝักแบนๆ มีขนสีน้ำตาลนุ่มคล้ายฝักฝาง สีเขียวอ่อน

สรรพคุณยาไทย

เหง้า ใช้ฝนกับน้ำหรือน้ำซาวข้าวหรือต้มดื่ม ใช้กระทุ้งพิษไข้ กินแก้พิษยาเบื่อเมา ยาสั่ง ยาสำแดง ถอนพิษ และแก้พิษไข้ทั้งปวง ขับพิษโลหิตและน้ำเหลือง แก้ท้องผูก

เถาย่างนางแดง ใช้ดับพิษร้อน ถอนพิษไข้ แก้พิษทั้งปวง พิษเบื่อเมา ถอนพิษผิดสำแดง แก้ไข้พิษ ไข้กาฬ ไข้หัว ไข้เซื่องซึม ไข้สุกใส ไข้ป่าเรื้อรัง ไข้ทับระดู บำรุงหัวใจ แก้โรคหัวใจบวม บำรุงธาตุ แก้ท้องผูกไม่ถ่าย (ฐานข้อมูลคณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 2557)

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

นิวัติ แก้วประดับ (2548) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ความเป็นพิษของสมุนไพรขมิ้นเครือในภาคใต้ 3 ชนิด คือ *Arcangelisia flava, Coscinium blumeanum* และ *Fibraurea tinctoria* โดยสกัดสมุนไพรด้วยตัวทำลาย 4 ชนิด คือ ปิโตรอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม เมทานอล และน้ำ (เรียงจากความเป็นขั้วจากน้อยไปมาก) ได้สารสกัด 12 ตัวอย่าง ซึ่งทดสอบด้วยวิธี DPPH$^{\bullet}$ (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) scavenging assay พบว่า สารสกัดด้วยเมทานอลของ A.flava สารสกัดด้วยเมทานอลและคลอโรฟอร์มของ C. blumeanum มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี โดยมีค่า EC_{50} ในช่วง 25-55 μg/mL ในขณะที่สารสกัดด้วยคลอโรฟอร์มของพืชทั้ง 3 ชนิด และสารที่สกัดด้วยเมทานอลของ A. flava และ C. blumeanum มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง MCF-7 ซึ่งมีค่า IC_{50} ในช่วง 8-12 μg/mL จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ สามารถแยกได้ 4 ชนิด คือ palmatine, jatrorrhizine, berberine และ triacontanyl caffeate จากผลการทดลองพบว่า palmatine, jatrorrhizine, berberine แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 ได้ดี ซึ่งมีค่า IC_{50} ในช่วง 37-206 μg/mL ส่วน triacontanyl caffeate มีฤทธิ์ที่ต่ำกว่า ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 15.5 μg/mL

โสภณ เริงสำราญ (2552) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการสกัดแยกองค์ประกอบทางเคมีจากเปลือกของต้นเปล้าใหญ่จากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ พบว่า สามารถแยกสารประกอบไดเทอร์พีนอยด์ได้ 2 ชนิด คือ Kaur-16-en-19-oic acid และ (-)-hardwickiic acid จากจังหวัดราชบุรีได้ 3 ชนิด คือ acanthoic acid (3), acanthol (4) และ (–)-hardwickiic acid (2) จากจังหวัด นครสวรรค์ได้ 3 ชนิด คือ kaur-16-en-19-oic acid (1), labda-7,12(E),14-triene-17-ol (9) และ labda-7,12(E),14-triene-17-oic acid (10) ซึ่งสาร 1-4 และ 9-10 ดังกล่าวข้างต้น เป็นสารที่เคยมีการรายงานไว้แล้ว ส่วนเปล้าใหญ่จากจังหวัดน่านแยกสารประกอบไดเทอร์พีนอยด์ชนิดใหม่ได้ 2 สาร คือ (5α, 8β, 9α, 10β, 14α)-cleistantha-13 (17), 15-dien-3β-ol (5) และ 3,4-*seco*-cleistantha-4(18),13(17),15-trien-3-oic acid (6) และได้สังเคราะห์อนุพันธ์ 2 ชนิด จากสาร 6 โดยปฏิกิริยาอีพอกซิเดชัน คือ 13,17-epoxy-3,4-*seco*-cleistantha-4 (18), 15-dien-3-oic acid (7) และ 14-epoxypimara-4 (18), 15-dien-3-oic acid (8) และได้นำสาร 5-8 มาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้ง เซลล์มะเร็ง 5 ชนิด คือ KATO-3 (กระเพาะอาหาร), SW620 (ลำไส้), BT474 (เต้านม), HEP-G2 (ตับ) และ CHAGO (ปอด) พบว่าสาร 5 มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง SW620, KATO-3, HEP-G2 และ CHAGO โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.5, 6.0, 6.1 และ 5.5 μg/mL ตามลำดับ สาร 6 มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด SW620 และ KATO-3 เพียงเล็กน้อย โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.6 และ 9.6 μg/mL ตามลำดับ ส่วนสาร 7 และ 8 ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้ง 6 ชนิด

ศิริกุญญา สยมภาค (2555) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และวิเคราะห์หาปริมาณสารในกลุ่มฟีนอลจากสารกัดของใบย่านางแดงที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ โดยการนำสมุนไพรย่านางแดงมาสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอล (ร้อยละ 50 และ 95) ซึ่งสกัดด้วยวิธีดังนี้ DPPH radical assay Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay และหาปริมาณสารในกลุ่มฟีนอลด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorometric method จากการศึกษาพบว่า ใบย่านางแดงที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 50 มีปริมาณสารในกลุ่มฟีนอลสูงที่สุด (199.58 mg GAE/g) ในขณะที่ใบย่านางแดงที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ซึ่งมีค่า EC_{50} เท่ากับ 6.50 µg/mL, FRAP value เท่ากับ 1,027.00 mg Fe(II)/g และ TEAC value เท่ากับ 295.26 mg Trolox/g ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่า สารสกัดจากใบย่านางแดงมีปริมารสารในกลุ่มฟีนอลสูงและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดี ซึ่งการศึกษาครั้งนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพ และเป็นข้อมูลพื้นฐานในการวิเคราะห์หาสารที่สำคัญในใบย่านางแดงต่อไป

Muraoka, O. (2010) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูซิเดสในลำไส้-เล็กของหนูทดลองทั้งสองชนิด พบว่า สารที่สกัดด้วยน้ำจากลำต้นและรากของกำแพงเจ็ดชั้น มีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูซิเดสในลำไส้เล็กของหนูทดลองทั้งสองชนิด โดยสามารถยับยั้งเอนไซม์ซู-เครส ซึ่งมีค่า IC_{50} ของลำต้นและรากเท่ากับ 36.5, 57.9 µg/mL ตามลำดับ และสามารถยับยั้งเอนไซม์มอลเตส ซึ่งมีค่า IC_{50} ของลำต้นและรากเท่ากับ 87.3, 157.7 µg/mL ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่า ลำต้นของกำแพงเจ็ดชั้นมีฤทธิ์การยับยั้งได้ดีกว่าราก โดยพบว่าสารที่มายับยั้งคือ salacinol และ kotalanol

Chavan, J..J. (2012) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลกำแพงเจ็ดชั้น โดยนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน (เมทานอล เอทานอล อะซิโตนและน้ำ) และนำมาวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลรวม (TPC) และฟลาโวนอยด์ (TFC) ตลอดจนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (AOA) โดยใช้วิธีดังนี้ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl ($DPPH^{\bullet}$), Ferric reducing antioxidant power (FRAP) และวิธีการจับโลหะ จากผลการทดลองพบว่า ผลของกำแพงเจ็ดชั้นที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล มีปริมาณฟีนอลรวมสูงที่สุด (3.20±0.12 mg GAE/g FW) ในขณะเดียวกันผลของกำแพงเจ็ดชั้นที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงที่สุด (0.31±0.68 mg RE/g FW) และยังพบว่า สารที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ดังนี้ การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี $DPPH^{\bullet}$ (92.44%), FRAP (1.939 O.D) และวิธีการจับโลหะ (74.16%) ซึ่งจะเห็นได้ว่า การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี $DPPH^{\bullet}$ และ FRAP มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญกับปริมาณฟีนอลรวม จึงสรุปได้ว่า ผลของกำแพงเจ็ดชั้นเป็นแหล่งของสารประกอบฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติที่ดี และสามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยาได้

Sellamuthu, P.S. (2012) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์การลดระดับน้ำตาลในเลือด พบว่า สารแมงจิเฟอริน (mangiferin) ที่สกัดได้จากลำต้นของกำแพงเจ็ดชั้น มีฤทธิ์การลดระดับน้ำตาลใน

เลือด โดยทดสอบในหนูที่ถูกระตุ้นให้เป็นเยาหวานด้วยสารเคมี Streptozotocin (STZ) พบว่าสามารถเพิ่มการหลั่งอินซูลินจาก β-cell ของตับอ่อน ทำให้ระดับอินซูลินในกระแสเลือดเพิ่มขึ้น และระดับน้ำตาลในเลือดลดลงใกล้เคียงกับยามาตรฐาน โดยศึกษาในไตของหนูทดลอง เมื่อป้อนหนูเพศผู้ที่เป็นเบาหวานด้วยสารแมงจิเฟอรินในขนาด 40 mg/kg b.wt เป็นเวลา 30 วัน พบว่าระดับน้ำตาลในเลือด 102.25 mg/dL (เทียบกับยามาตรฐาน glibenclamide วัดได้ 99.28 mg/dL) และปริมาณอินซูลินที่หลั่งออมาในพลาสมาวัดได้ 12.76 μg/mL (เทียบกับยามาตรฐาน glibenclamide วัดได้ 13.68 mg/dL)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สมุนไพรตัวอย่าง

3.1.1 ย่านางแดง (*Bauhinia strychnifolia Craib.*) (ลำต้น)

3.2 อุปกรณ์ สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

3.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

3.2.1.1 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

3.2.1.2 เครื่องบดสมุนไพร

3.2.1.3 ถุงซิปล็อก

3.2.1.4 ผ้าขาวบาง

3.2.1.5 ไม้พาย

3.2.1.6 หม้อ

3.2.1.7 Hot Plate

3.2.1.8 แท่งแก้ว (stirring rod)

3.2.1.9 ขวดสีชา

3.2.1.10 กรวยกรอง

3.2.1.11 กระบอกตวง

3.2.1.12 ขวดสีชา 45 mL

3.2.1.13 ตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ -4 °C

3.2.1.14 โถดูดความชื้น (desiccator)

3.2.1.15 บีกเกอร์ (Beakers) ขนาด 50, 150, 600 mL

3.2.1.16 ไมโครปิเปตขนาด 1000 µL

3.2.1.17 หลอดทดลอง (test tube)

3.2.1.18 ช้อนตักสาร (spatula)

3.2.1.19 อลูมิเนียมฟอยด์ (aluminium foil)

3.2.1.20 ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 25, 50, และ 100 mL

3.2.1.21 ปิเปต (pipette) ขนาด 5, 10 และ 25 mL

3.2.1.22 กระดาษชำระ

3.2.1.23 จุกยาง

3.2.1.24 หลอดหยด

3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย แสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมี	สูตรโมเลกุล	มวลโมเลกุล (g/mol)	บริษัท
เอทานอล	C_2H_6O	46.07	Carlo erba
2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH$^{\bullet}$)	$C_{18}H_{12}N_5O_6$	394.99	Fluka
กรดแกลลิก	$C_7H_6O_5$	170.12	J.T.Baker
โฟลิน – ซิโอแคลทู	-	270.30	Fluka
กรดแอสคอร์บิค	$C_6H_8O_6$	176.14	Carlo erba
โซเดียมคาร์บอเนต	Na_2CO_3	106.0	Carlo erba
เควอซิทิน	$C_{15}H_{10}O_7$	302	Carlo erba
โซเดียมไนไตรด์	$NaNO_2$	84.99	Carlo erba
อลูมิเนียมคลอไรด์	$AlCl_3 \cdot 6H_2O$	240	Carlo erba
Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethy lchlorman-2-carboxylic acid)	$C_{14}H_{18}O_4$	250	Carlo erba
2,2'-azino-bis(3-thylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS$^{\bullet+}$)	$C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$	514.62	Sigma

3.2.3 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย แสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือ	รุ่น	บริษัท
เครื่อง UV-Vis spectrophotometer	Lambda 12	Perkin Elmer
เครื่อง Hot Plate Magnetic Stirrer	Jenway 1103	THERMO FISHER SCIENTIFIC INC, UK
เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง	OHAUS PA4102	OHAUS CORPORATION, USA
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	OHAUS MODEL PA214	PRECISA Co.,Ltd
ตู้อบความร้อน (hot air oven)	model UNE 500	Scilution Co.,Ltd

3.3 การเตรียมตัวอย่างและสารเคมี

3.3.1 การเตรียมอุปกรณ์และห้องสำหรับการทดลอง
ทำความสะอาดห้องและเตรียมอุปกรณ์สำหรับการทดลองให้เรียบร้อย

3.3.2 วิธีการเก็บตัวอย่าง
ย่านางแดง ที่เก็บได้จาก เขาภูสิงห์ อำเภอสหัสขันธ์ จังหวัดกาฬสินธุ์ ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียม ดังนี้

3.3.2.1 นำย่านางแดง มาล้างด้วยน้ำสะอาด นำไปตากให้แห้งจนน้ำหนักคงที่ จากนั้นนำไปบดหยาบด้วยเครื่องบดสมุนไพรแล้วเก็บย่านางแดงที่บดใส่ถุงซิปล็อก

3.3.2.2 นำไปชั่งน้ำหนักและจดบันทึกไว้

3.3.3 การเตรียมสารสกัดหยาบของย่านางแดง

3.3.3.1 การเตรียมย่านางแดงที่สกัดด้วยน้ำ

1) นำย่านางแดง ไปต้มด้วยน้ำสะอาด เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองสารโดยใช้ผ้าขาวบาง แล้วนำน้ำที่กรองได้ มาเคี่ยวเป็นเวลา 8 ชั่วโมง จนได้สารสกัดที่มีลักษณะข้นหนืด และเก็บสารสกัดย่านางแดงที่ได้ในขวดสีชาขนาด 45 mL

2) ปิดขวดสารสกัดย่านางแดงที่ได้ด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ที่เจาะรูรอบๆ จากนั้นนำไปอบในตู้อบความร้อน ที่อุณหภูมิ 60 ˚C เป็นเวลา 2 วัน เพื่อให้น้ำที่เหลือระเหยไปจนหมด จะได้สารสกัดหยาบของย่านางแดง นำไปเก็บไว้ในโถดูดความชื้น เพื่อให้สารตัวอย่างเย็นลง

3) นำไปชั่งน้ำหนักบันทึกค่าไว้ ทำเหมือนกันในทุกตัวอย่างและนำสารสกัดหยาบย่านางแดงมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -4 °C เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

3.3.3.2 การเตรียมตัวอย่างเพื่อทำการวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่างมา 0.1 กรัม ความเข้มข้น 1,000 mg/L ละลายด้วยน้ำ DI และปรับปริมาตรเป็น 100 mL เพื่อเป็น Stock ที่จะใช้นำไปวิเคราะห์

3.3.3.3 การเตรียมสารที่ใช้ในการทดลอง

1) เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่มีความเข้มข้น 100 mg/L โดยการ ชั่งกรดแกลลิกมา 0.0050 g ละลายในน้ำกลั่น 10 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI จนครบ 50 mL

2) การเตรียมสารละลายโฟลิน-ซิโอแคลทู (Folin-Ciocalteu) ความเข้มข้น 0.2 N โดยการปิเปตสารละลายโฟลิน-ซิโอแคลทู จากความเข้มข้น 2 N มา 10 mL และปรับปริมาตรเป็น 100 mL ด้วยน้ำ DI

3) การเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 10 %w/v โดยการชั่งโซเดียมคาร์บอเนตมา 10 g ละลายด้วยน้ำ DI และปรับปริมาตรเป็น 100 mL

4) การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 100 mg/L โดยการชั่งกรดแอสคอร์บิค มา 0.0100 g ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI เป็น 100 mL

5) การเตรียมสารละลาย DPPH$^{\bullet}$ ความเข้มข้น 0.1 mM โดยการชั่ง DPPH$^{\bullet}$ มา 0.039 g ละลายในเอทานอล และปรับปริมาตรเป็น 1000 mL ด้วยเอทานอล

6) การเตรียมสารลายมาตรฐานเควอซิทินความเข้มข้น 500 mg/L โดยการชั่งเควอเซติน มา 0.025 g ละลายด้วยเอทานอลและปรับปริมาตรเป็น 50 mL ด้วยเอทานอล

7) การเตรียมโซเดียมไนไตรด์ ($NaNO_2$) 5 %w/v โดยการชั่งโซเดียมไนไตรด์ มา 12.5 g ละลายด้วยน้ำ DI และปรับปริมาตรเป็น 250 mL

8) การเตรียมอะลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3 \cdot 6H_2O$) 10 %w/v โดยการชั่งอลูมิเนียมคลอไรด์ 10 g ละลายด้วยน้ำ DI และปรับปริมาตรเป็น 100 mL

9) การเตรียมสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) โดยผสม 7 mM $ABTS^{\bullet+}$ กับ 2.45 mM $K_2S_2O_8$ (Dipotassium peroxodisulphate) ให้เข้ากัน แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน $ABTS^{\bullet+}$: น้ำ เท่ากับ 1 : 4.2 วัดค่าการดูดกลืนแสงให้อยู่ในช่วง 0.7-0.9 ที่ความยาวคลื่น 734 nm

10) การเตรียมสารละลายมาตรฐานโทรลอก 100 mg/L โดยการชั่งโทรลอกมา 0.01 g ปรับปริมาตรด้วยเอทานอลให้เป็น 100 mL

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 วิธีการวัดฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจากย่านางแดงเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคและสารมาตรฐานโทรลอก ด้วยวิธี $DPPH^{\bullet}$ (Diphenyl picrylhydrazyl canvenging assay) (ดัดแปลงมาจากวิธีของ Zhang *et al*., 2007)

3.4.1.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างย่านางแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ มา 1.5 mL ใส่ลงในหลอดทดลองความเข้มข้นละ 3 หลอด

3.4.1.2 เติมสารละลาย $DPPH^{\bullet}$ 0.1 mM 1.5 mL ลงในหลอดทดลอง

3.4.1.3 เขย่าให้เข้ากันและเก็บไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที

3.4.1.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer บันทึกค่าที่ได้จากการทดลอง

3.4.1.5 สร้างกราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค และกราฟมาตรฐานโทรลอก

1) ปิเปตสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคที่ความเข้มข้น 100 mg/L (stock standard solution) มาเพื่อเตรียมสารละลายเข้มข้นดังนี้ 0, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5 และ 10 mg/L โดยแต่ละความเข้มข้นเตรียมที่ปริมาตร 100 mL จากนั้นปิเปตสารละลายที่ความเข้มข้นต่างๆ* มา 1.5 mL

2) ปิเปตสารมาตรฐานโทรลอกที่ความเข้มข้น 100 mg/L (stock standard solution) มาเพื่อเตรียมสารละลายเข้มข้นดังนี้ 0, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5 และ 10 mg/L โดยแต่ละความเข้มข้นเตรียมที่ปริมาตร 100 mL จากนั้นปิเปตสารละลายที่ความเข้มข้นต่างๆ มา 1.5 mL

3) เติมสารละลาย $DPPH^{\bullet}$ 0.1 mM 1.5 mL ลงในหลอดทดลอง

4) เขย่าให้เข้ากันและเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที

5) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer บันทึกค่าที่ได้จากการทดลอง จากนั้นนำค่าที่ได้ไปหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%inhibition) โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคและสารมาตรฐานโทรลอก คำนวณดังสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (\%inhibition)} = \left[\frac{(A_0-A_S)}{A_0}\right] \times 100$$

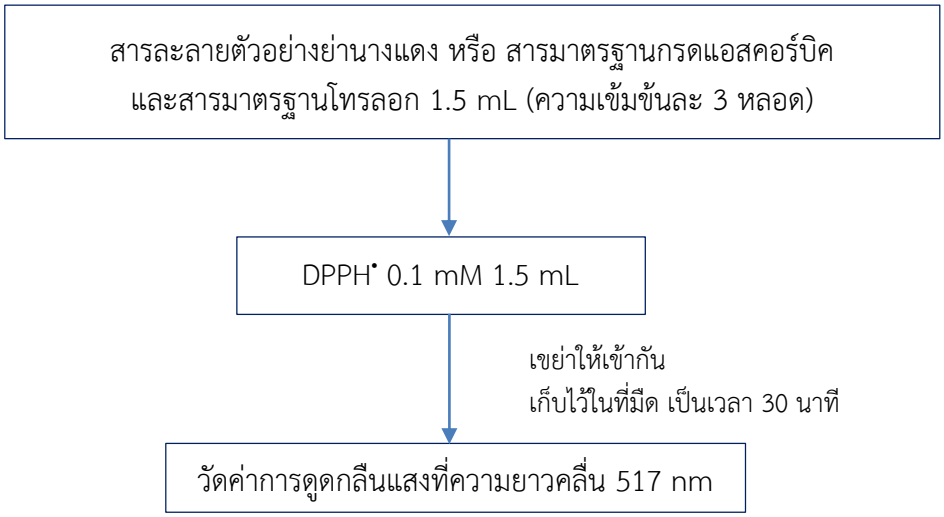
เมื่อ

A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงของแบลงค์ (เอทานอล + อนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$)

A_S = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง (สารตัวอย่าง + อนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$)

แล้วรายงานผลเป็นค่า IC_{50} เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคและสารมาตรฐานโทรลอก

สรุป วิธีการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดย่านางแดงเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคและสารมาตรฐานโทรลอก ด้วยวิธี $DPPH^{\bullet}$ (Diphenyl picrylhydrazyl scanvenging assay)



ตารางที่ 3.3 ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เตรียมของวิธี $DPPH^{\bullet}$

Sample	ความเข้มข้น (mg/L) ที่เตรียม
ย่านางแดง	0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 และ 15
กรดแอสคอร์บิค	0, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5 และ 10
โทรลอก	0, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5 และ 10

3.4.2 วิธีการทดสอบการฟอกสีอนุมูลอิสระจากสารสกัดย่านางแดงเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคและสารมาตรฐานโทรลอก ด้วยวิธี $ABTS^{\bullet+}$ (ABTS radical cation decolorization assay) (ดัดแปลงมาจากวิธีของ Roberta *et al.*, 1999)

3.4.2.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างย่ายางแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ มา 1.5 mL ใส่ลงในหลอดทดลอง ความเข้มข้นละ 3 หลอด

3.4.2.2 เติมสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ เจือจาง 1.5 mL ลงในหลอดทดลอง

3.4.2.3 เขย่าให้เข้ากันและเก็บไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที

3.4.2.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer บันทึกค่าที่ได้จากการทดลอง

3.4.2.5 สร้างกราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค และกราฟมาตรฐานโทรลอก

1) ปิเปตสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคที่มีความเข้มข้น 100 mg/L (stock standard solution) มาเพื่อเตรียมสารละลายเข้มข้นดังนี้ 0, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5 และ 10 mg/L โดยแต่ละความเข้มข้นเตรียมที่ปริมาตร 100 mL จากนั้นปิเปตสารละลายที่ความเข้มข้นต่างๆ มา 1.5 mL

2) ปิเปตสารมาตรฐานโทรลอกที่มีความเข้มข้น 100 mg/L (stock standard solution) มาเพื่อเตรียมสารละลายเข้มข้นดังนี้ 0, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5 และ 10 mg/L โดยแต่ละความเข้มข้นเตรียมที่ปริมาตร 100 mL จากนั้นปิเปตสารละลายที่ความเข้มข้นต่างๆ*มา 1.5 mL

3) เติมสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ 10 เจือจาง 1.5 mL ลงในหลอดทดลอง

4) เขย่าให้เข้ากันและเก็บไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที

5) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer บันทึกค่าที่ได้จากการทดลอง

นำค่าที่วัดได้ไปหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%inhibition) โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคและสารมาตรฐานโทรลอก คำนวณดังสมการ

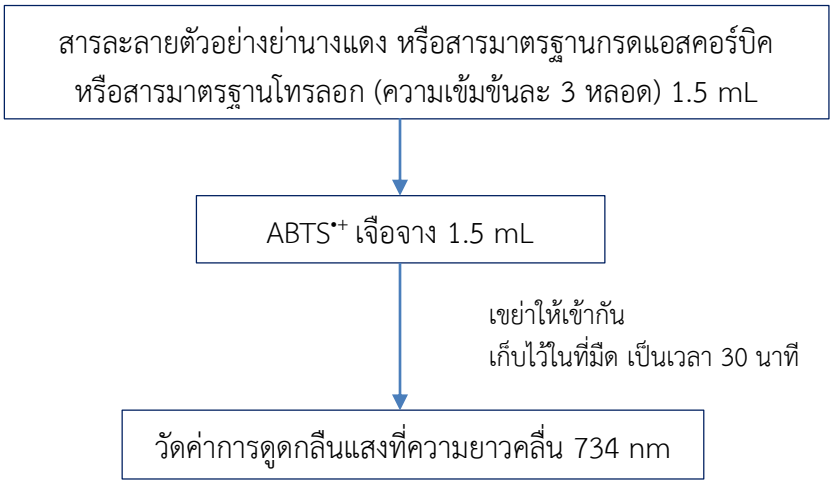
$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (\%inhibition)} = \left[\frac{(A_0-A_S)}{A_0}\right] \times 100$$

เมื่อ A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงของแบลงค์ (เอทานอล + อนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$)

A_S = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดย่านางแดง (สารตัวอย่าง + อนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$)

แล้วรายงานผลเป็นค่า IC_{50} เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคและสารมาตรฐานโทรลอก

สรุป วิธีการทดสอบการฟอกสีอนุมูลอิสระจากสารสกัดย่านางแดงเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคและสารมาตรฐานโทรลอก ด้วยวิธี $ABTS^{\bullet+}$ (ABTS radical cation decolorization assay)



ตารางที่ 3.4 ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เตรียมของวิธี $ABTS^{\bullet+}$

Sample	ความเข้มข้น (mg/L) ที่เตรียม
ย่านางแดง	0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 และ 15
กรดแอสคอร์บิค	0, 0.1, 0.5, 1, 2.5 ,5, 7.5 และ 10
โทรลอก	0, 0.1, 0.5, 1, 2.5 ,5, 7.5 และ 10

3.4.3 การหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดจากสารสกัดย่านางแดงเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu (ดัดแปลงมาจากวิธีของ Chidambara et al., 2002)

3.4.3.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างย่านางแดง ที่ความเข้มข้นต่างๆ* มา 0.1 mL ลงในหลอดทดลอง ความเข้มข้นละ 3 หลอด

3.4.3.2 เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ความเข้มข้น 0.2 N จำนวน 0.5 mL และเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 10 %w/v 0.4 mL ลงในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน เก็บไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30-60 นาที

3.4.3.3 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่นที่ 760 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer บันทึกค่าที่ได้จากการทดลอง

3.4.3.4 คำนวณหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดย่านางแดง โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายแกลลิก

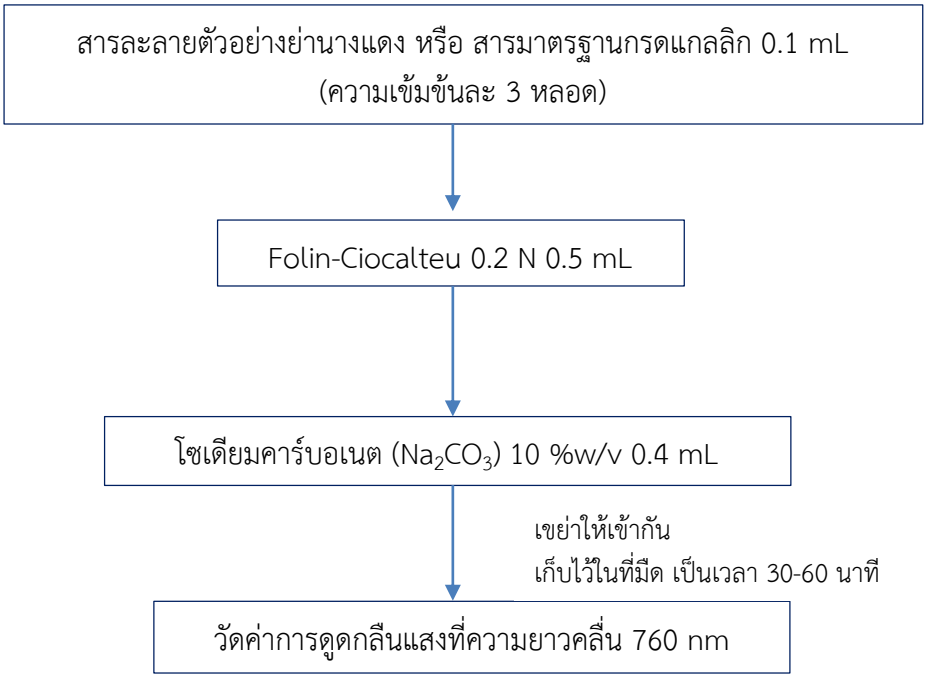
3.4.3.5 สร้างกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

1) ปิเปตสารมาตรฐานกรดแกลลิกที่มีความเข้มข้น 100 mg/L (stock standard solution) มาเพื่อเตรียมสารละลายเข้มข้นดังนี้ 0, 5, 10, 20, 40, 80 และ 100 mg/L โดยแต่ละความเข้มข้นเตรียมที่ปริมาตร 50 mL จากนั้นปิเปตสารละลาย ที่ความเข้มข้นต่างๆ* มา 0.1 mL แล้วเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ความเข้มข้น 0.2 N จำนวน 0.5 mL และเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 10 %w/v จำนวน 0.4 mL

2) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer บันทึกค่าที่ได้จากการทดลอง

3) นำมาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายกรดแกลลิก

สรุป วิธีการหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดจากสารสกัดย่านางแดงเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu



ตารางที่ 3.5 ความเข้มข้นของตัวอย่างย่านางแดง ที่เตรียมของวิธี Folin-Ciocalteu

Sample	ความเข้มข้น (mg/L) ที่เตรียม
ย่านางแดง	0, 100, 200, 300, 400 และ 500

3.4.4 การหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจากสารสกัดย่านางแดงเทียบกับสารมาตรฐานเควอซิทิน ด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric (ดัดแปลงมาวิธีของ Pourmorad, Hosseinimehr and Shahabimajd, 2006)

3.4.4.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างย่านางแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ* มา 0.15 mL ลงในหลอดทดลอง ความเข้มข้นละ 3 หลอด

3.4.4.2 เติมโซเดียมไนไตรต์ ($NaNO_2$) 5 %w/v 1 mL แล้วเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที

3.4.4.3 เติมอลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3 \cdot 6H_2O$) 10 %w/v 1.5 mL แล้วเขย่าให้เข้ากัน

3.4.4.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer บันทึกค่าที่ได้จากการทดลอง

3.4.4.5 สร้างกราฟมาตรฐานเควอซิทิน

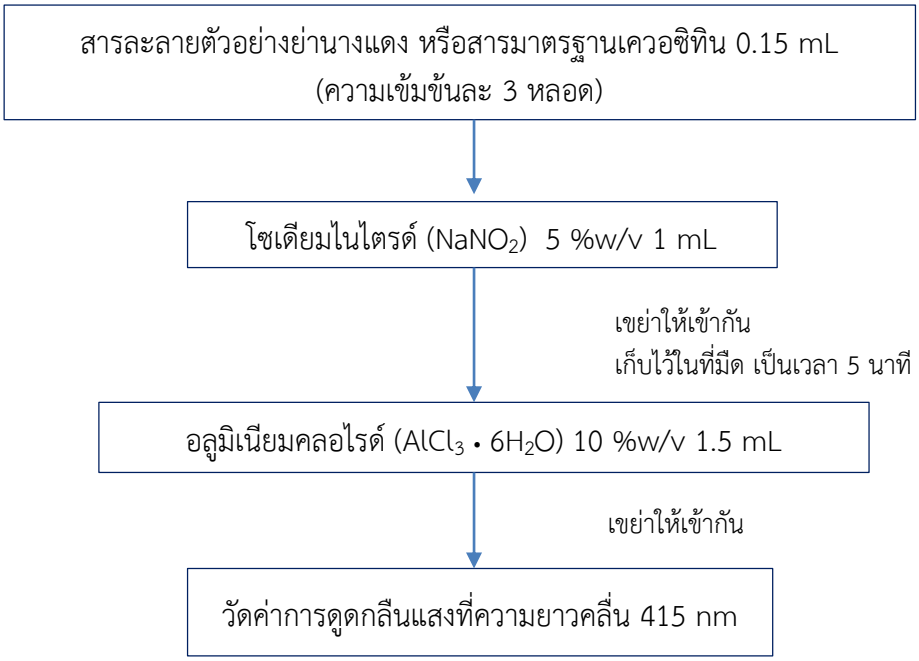
1) ปิเปตสารมาตรฐานเควอซิทินที่มีความเข้มข้น 500 mg/L (stock standard solution) มาเพื่อเตรียมสารละลายเข้มข้นดังนี้ 0, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 200, 300, 400 และ 500 mg/L โดยแต่ละความเข้มข้นเตรียมที่ปริมาตร 50 mL จากนั้นปิเปตสารละลายที่ความ

เข้มข้นต่างๆ มา 0.15 mL แล้วเติมโซเดียมไนไตรต์ ($NaNO_2$) 5 %w/v 1 mL เขย่าให้เข้ากัน เก็บไว้ในที่มืด 5 นาที เติมอลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3 \cdot 6H_2O$) 10 %w/v 1.5 mL จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน

2) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer บันทึกค่าที่ได้จากการทดลอง

3) นำมาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายเควอซิทิน

สรุป การหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจากสารสกัดย่านางแดงเทียบกับสารมาตรฐานเควอซิทิน ด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric



ตารางที่ 3.6 ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เตรียมของวิธี Aluminium chloride colorimetric

Sample	ความเข้มข้น (mg/L) ที่เตรียม
ย่านางแดง	0, 25, 50, 150, 250, 500 และ 700
เควอซิทิน	0, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 200, 300, 400 และ 500

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

ในการทดลองจะทำการสกัดย่านางแดงตัวอย่างละ 3 ซ้ำ และนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH$^{\bullet}$และการฟอกสีอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ จากนั้นนำมาหาปริมาณสารฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยและคำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการเตรียมสารสกัดจากย่านางแดง

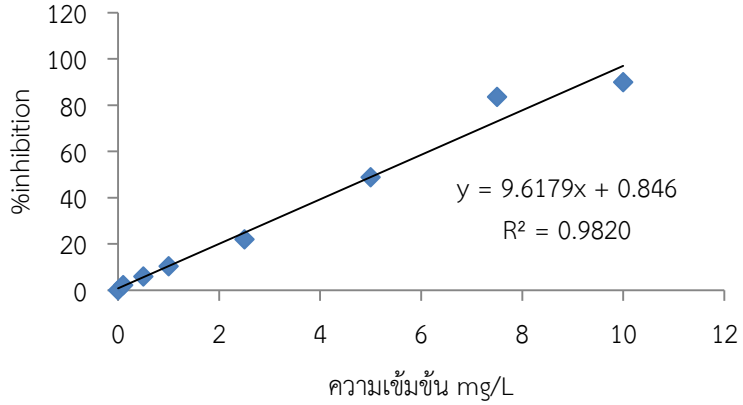
จากการวิจัย นำย่านางแดง มาทำการสกัดด้วยน้ำ แล้วนำสารสกัดไประเหยแห้ง ผลของการสกัดย่านางแดงที่ได้ แสดงดังข้อมูลในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงน้ำหนักของสารสกัดย่านางแดง

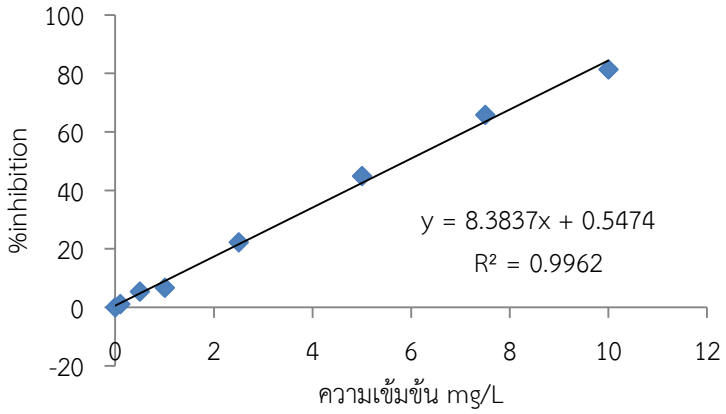
ตัวอย่าง	น้ำหนักแห้งก่อนนำไปสกัด (กรัม)	น้ำหนักสารสกัดหยาบ (กรัม)	% yield
ย่านางแดง *(Bauhinia strychnifolia Craib.)*	182.92	34.20	18.70

4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH•

เมื่อวัดการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค และสารมาตรฐานโทรลอก ที่ความยาวคลื่น 517 nm โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย ในความเข้มข้นต่างกัน จากนั้นนำไปหา %Inhibition แล้วนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่าง %Inhibition กับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาค่า IC_{50} พบว่า สารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค มีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.35 mg/L และสารมาตรฐานโทรลอก มีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.41 mg/L

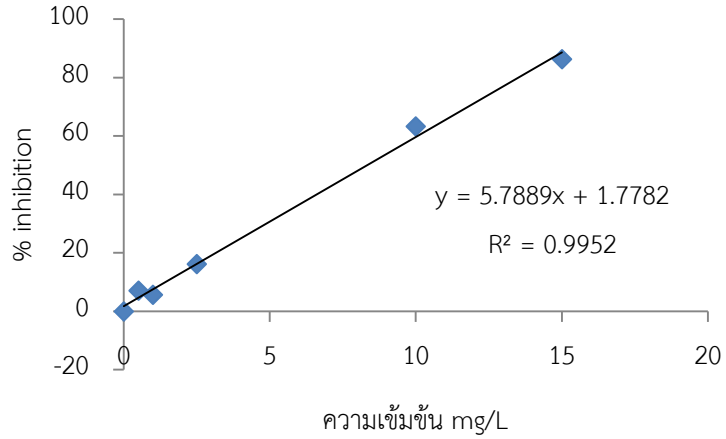


ภาพที่ 4.1 กราฟความสัมพันธ์ของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคที่ความเข้มข้นต่างๆ กับ %inhibition ด้วยวิธี DPPH•



ภาพที่ 4.2 กราฟความสัมพันธ์ของสารมาตรฐานโทรลอกที่ความเข้มข้นต่างๆ กับ %inhibition ด้วยวิธี DPPH•

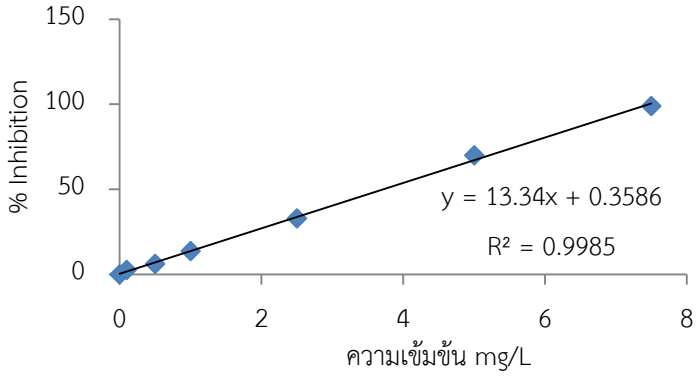
การทดสอบนี้เป็นการทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH• ของสารสกัดจากย่านางแดง พบว่า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยทำการศึกษาที่ความเข้มข้น ที่อยู่ในช่วง 0 ถึง 500 mg/L ซึ่งพบว่า ค่า IC_{50} เท่ากับ 6.86 mg/L



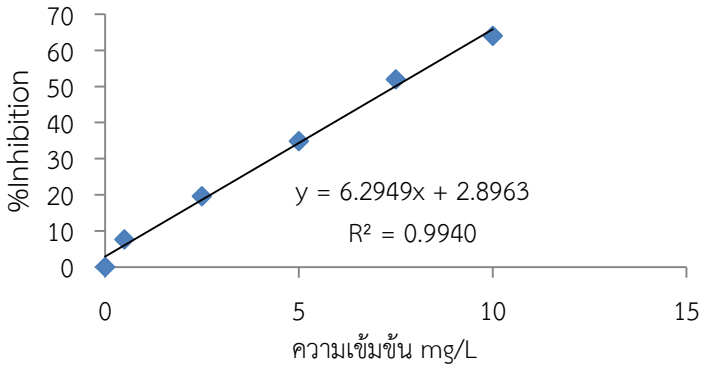
ภาพที่ 4.3 กราฟความสัมพันธ์ของสารสกัดจากย่านางแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ กับ %inhibition ด้วยวิธี DPPH•

4.3 ผลการทดสอบการฟอกสีอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS$^{\bullet+}$

เมื่อวัดการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค และสารมาตรฐานโทรลอก ที่ความยาวคลื่น 734 nm โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย ในความเข้มข้นต่างกัน จากนั้นนำไปหา %Inhibition แล้วนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่าง %Inhibition กับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาค่า IC_{50} พบว่า สารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค มีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.39 mg/L และสารมาตรฐานโทรลอก มีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.05 mg/L

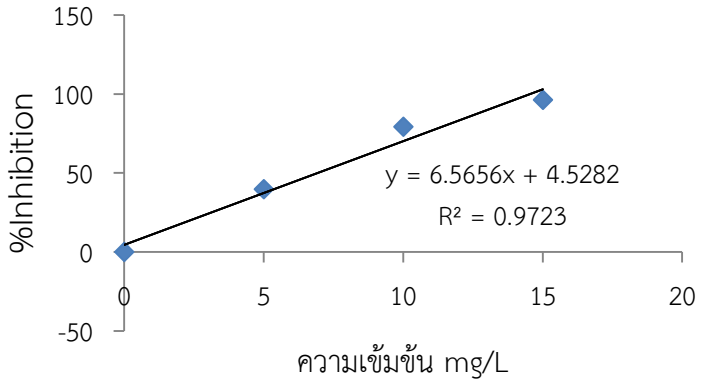


ภาพที่ 4.4 กราฟความสัมพันธ์ของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค ที่ความเข้มข้นต่างๆ กับ %inhibition ด้วยวิธี ABTS$^{\bullet+}$

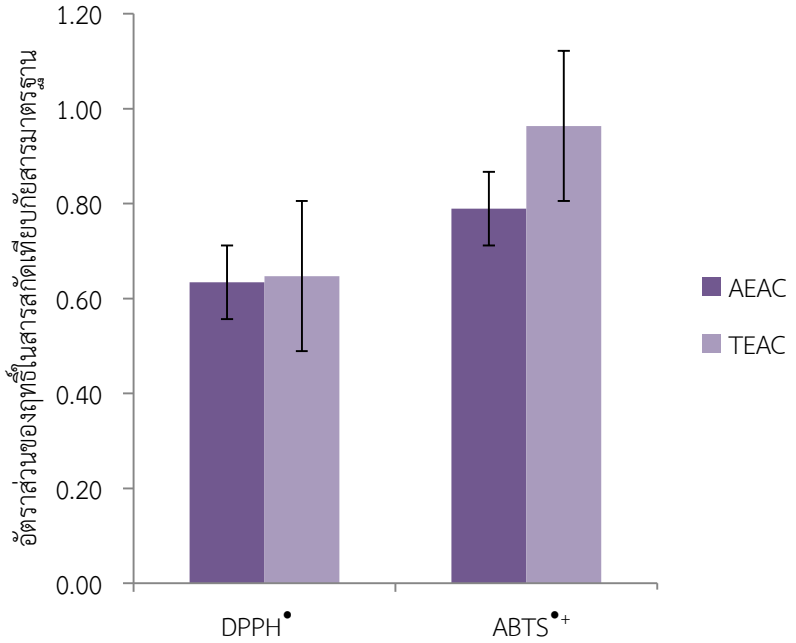


ภาพที่ 4.5 กราฟความสัมพันธ์ของสารมาตรฐานโทรลอกที่ความเข้มข้นต่างๆ กับ %inhibition ด้วยวิธี ABTS$^{\bullet+}$

การทดสอบนี้เป็นการทดสอบฤทธิ์ในการฟอกสีอนุมูล ABTS$^{\bullet+}$ ของสารสกัดจากย่านางแดง พบว่า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เมื่อทำการศึกษาที่ความเข้มข้นในช่วง 0 ถึง 700 mg/L พบว่า ค่า IC_{50} ของสารสกัดย่านางแดง เท่ากับ 5.24 mg/L



ภาพที่ 4.6 กราฟความสัมพันธ์ของสารสกัดจากย่านางแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ กับ %inhibition ด้วยวิธี $ABTS^{\bullet+}$



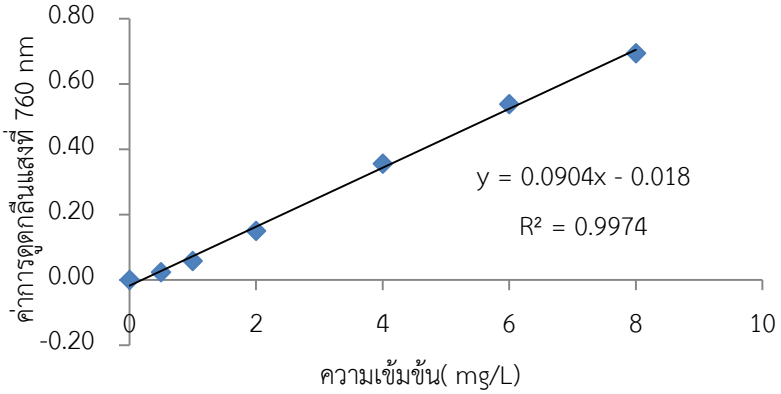
ภาพที่ 4.7 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบกับสารมาตรฐาน กรดแอสคอร์บิค (AEAC) และสารมาตรฐานโทรลอก (TEAC) ด้วยวิธี $DPPH^{\bullet}$ และ $ABTS^{\bullet+}$

จากภาพที่ 4.7 แสดงค่าการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคและสารมาตรฐานโทรลอกด้วยวิธี $DPPH^{\bullet}$ และ $ABTS^{\bullet+}$ เมื่อนำค่า IC_{50} ของทั้ง 2 ชนิดมาเปรียบเทียบ สามารถนำเสนอผลในรูปของ AEAC (Ascorbic acid equivalent antioxidant capacity) และ TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของย่านางแดง ด้วยวิธี $DPPH^{\bullet}$ มีค่า AEAC เท่ากับ 0.63 หมายถึง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของย่านางแดง 1 g เทียบเท่ากับกรดแอสคอร์บิค 0.63 g และ มีค่า TEAC เท่ากับ 0.79 หมายถึง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของย่านางแดง 1 g เทียบเท่ากับโทรลอก 0.79 g ส่วน วิธี $ABTS^{\bullet+}$ พบว่า มีค่า AEAC เท่ากับ 0.65

หมายถึง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของย่านางแดง 1 g เทียบเท่ากับกรดแอสคอร์บิค 0.65 g และ มีค่า TEAC เท่ากับ 0.96 หมายถึง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของย่านางแดง 1 g เทียบเท่ากับโทรลอก 0.96 g

4.4 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu

จากการศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu โดยคำนวณปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก ซึ่งได้ผลการทดลองดังนี้

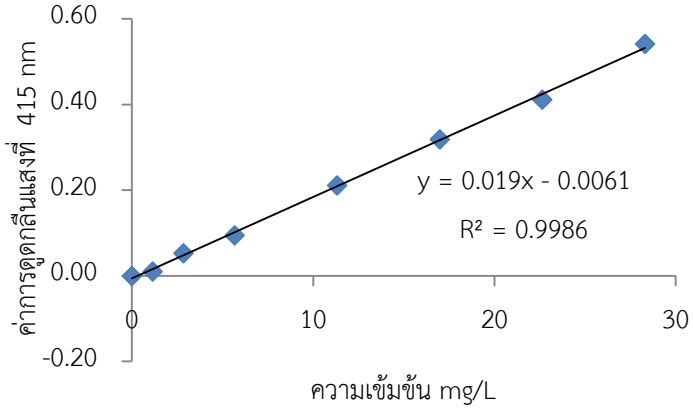


ภาพที่ 4.8 กราฟความสัมพันธ์ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (mg/L) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu

จากภาพที่ 4.8 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดได้จากการคำนวณจากสมการ y = 0.0904x - 0.018 ของกราฟความสัมพันธ์ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (mg/L) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

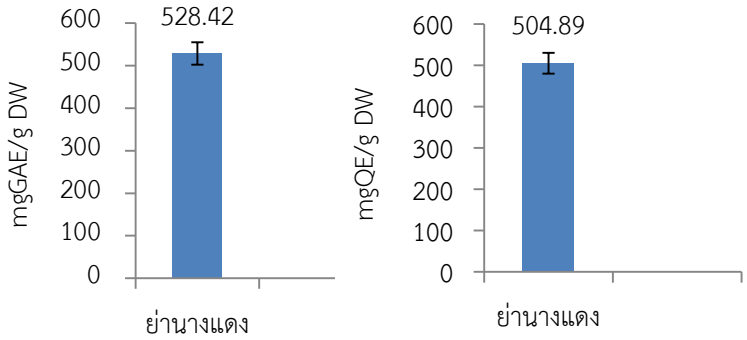
4.5 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoids content) ด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric

จากการศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric โดยคำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจากกราฟมาตรฐานเควอซิทิน ซึ่งได้ผลการทดลองดังนี้



ภาพที่ 4.9 กราฟความสัมพันธ์ของสารมาตรฐานเควอซิทิน (mg/L) ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric

จากภาพที่ 4.9 ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่ได้จากการคำนวณจากสมการ y = 0.019x - 0.0061 ของกราฟความสัมพันธ์ของสารมาตรฐานเควอซิทิน (mg/L) ที่ความเข้มข้นต่างๆ



ภาพที่ 4.10 ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของย่านางแดง ตามลำดับ

จากภาพที่ 4.10 พบว่า ย่านางแดงมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเมื่อคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก เท่ากับ 528.42 mgGAE/g DW และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด เมื่อคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานเควอซิทิน เท่ากับ 504.89 mgQE/g DW

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

ในการทดลองศึกษาและเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของย่านางแดง โดยใช้วิธีการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH$^{\bullet}$ (Diphenyl picrylhydrazyl scanvenging assay) และวิธี ABTS$^{\bullet+}$ (ABTS radical cation decolorization assay) การหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu และการหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเทียบกับสารมาตรฐานเควอซิทินด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH$^{\bullet}$ (Diphenyl picrylhydrazyl scanvenging assay) ของย่านางแดง พบว่า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.86 mg/L และการทดสอบฤทธิ์การฟอกสีอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS$^{\bullet+}$ (ABTS radical cation decolorization assay) พบว่า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.24 mg/L

จากผลการทดสอบการหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu พบว่า มีปริมาณของสารฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 528.42 mgGAE/g DW และการทดสอบการหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเทียบกับสารมาตรฐานเควอซิทินด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric พบว่า มีปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด เท่ากับ 504.89 mgQE/g DW

จากผลการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค (AEAC) และสารมาตรฐานโทรลอก (TEAC) ด้วยวิธี DPPH$^{\bullet}$ และ ABTS$^{\bullet+}$ พบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของย่านางแดง ด้วยวิธี DPPH$^{\bullet}$ มีค่า AEAC และ TEAC เท่ากับ 0.63 และ 0.79 ตามลำดับ ส่วนวิธี ABTS$^{\bullet+}$ พบว่า มีค่า AEAC และ TEAC เท่ากับ 0.65 และ 0.96 ตามลำดับ

ในการศึกษาสมุนไพรย่านางแดงครั้งนี้ นับเป็นข้อมูลเบื้องต้น เพื่อนำไปศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับสูง และสามารถต่อยอดในทางเภสัชกรรมต่อไป

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับวิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบด้วยวิธีอื่นเพื่อนำมาเปรียบเทียบกับวิธีการเดิม

2. ควรมีการศึกษาว่าสมุนไพรย่านางแดงที่นำมาศึกษานั้น มีสารชนิดใดอยู่บ้างและเปรียบเทียบว่ามีปริมาณมากน้อยเพียงใด

3. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อต่อยอดการทำเป็นสูตรตำรับยาจากสมุนไพรที่หาได้ตามท้องถิ่นเพื่อใช้รักษาโรคต่างๆ

บรรณานุกรม

นัยนา บุญทวียุวัฒน์. (2546). *ชีวเคมีทางโภชนาการ.* ซิกม่า ดีไซน์กราฟฟิก จำกัด, กรุงเทพ-มหานคร

นิวัติ แก้วประดับ, สุกัญญา เดชอดิศัย และ สุปรียา ยืนยงสวัสดิ์. (2548). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสมุนไพรไทยชื่อขมิ้นเครือ. *วารสารสงขลานครินทร์.* หน้า 455-467

วาริน แสงกิตติโกมล. (2546). การเปรียบเทียบปริมาณสารโพลีฟีโนลิกและปริมาณรวมการต้านสารอนุมูลอิสระในผักและสมุนไพร. *วารสารสหเวชศาสตร์* 3: 91-99.

สุดารัตน์ หอมหวน. (2012). ย่านางแดง. *ฐานข้อมูลคณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.* สืบค้น 4 สิงหาคม 2558, จาก http://www.phargarden.com

โสภณ เริงสำราญ, ธนพงษ์ กรีธาดำรงเดช และ จำเรียง ธรรมธร. (2552). *สารที่มีฤทธิ์ในการรักษาโรคมะเร็งจากเปล้าใหญ่.* กรุงเทพฯ: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

อนันต์ สกุลกิม. (2551). อนุมูลอิสระ สารอันตรายต่อสุขภาพและร่างกาย. *ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์.* 8 (1): 28-33.

อัญชนา เจนวิถีสุข. (2545***).*** *การตรวจหาและบ่งชี้ชนิด สารต้านอนุมูลอิสระจากผักพื้นบ้านและสมุนไพรไทย.* วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต มหาวิหาวิทยาลัยเชียงใหม่

โอภา วัชระคุปต์, ปรีชา บุญจูง, จันทนา บุณยะรัตน์ และ มาลีรักษ์ อัตต์สินทอง. (2549). *สารต้านอนุมูลอิสระ.* กรุงเทพฯ: พี.เอส.พริ้นท์.

Halliwell, B. et al. (1995). *The characterization of antioxidant.* Food and Chemical Toxicology. 33: 601-617.

Bast, A., Haeren, G. and Doelmen, C. (1991). Oxidants and antioxidants: state of art. *American Journal of Medicine.* 91: 2-13.

Chavan, J.J., Nimbalkar. M.S., Gaikwad, N., Dixit, G.B., Yadav, S.R. (2012)**.** In vitro propagation of Ceropegia spiralis Wight an endemic and rare potential ornamental plant of peninsular India. *U.S.A. Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America. India Section B,* 81:120-126.

บรรณานุกรม (ต่อ)

Gressier, B., Lebegue, S. and Brunnet, C. (1994) . Proxidant porperties of methotrexate evatuation and prevention by an antioxidant drug. *Archivder Pharmazie Chemistry in Life Science.* 49: 679-681.

Konstan, M.W., and Berger, M. (1993). *Infection and inflammation of the lung in cystic fibrosis.* In P.B. Davis (Ed.), Cystic Fibrosis, (New York: Marcel Dekker, Inc.), pp. 219–276.

Le Prell, C.G., Hughes L. F., Miler, J. M. (2007). Free radical scavengers vitamins A, C and E plus magnesium reduce noise trauma. *Free Radical Biology and Medicine.* 42: 1454–1463.

Muraoka, O, Morikawa T, Miyake S, Akaki J, Ninomiya K, Yoshikawa, M. (2010). Quantitative determination of potent α-glucosidase inhibitors, salacinol and kotalanol, in Salacia species using liquidchromatography mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 52: 770-773.

Nawar, W.W. (1996). Lipid in O.R. Fennema (eds.), *Food Chemistry.* New York. 210-243.

Pokorny, J., Yanishlieva, N. and Gordon, M. (2001). *Antioxidants in food: practical applications.* New York: CRC Press. 380 pp.

Sanchez-Moreno, C., Jimenez-Escria, A. and Saura-Calixto. J. (2000). Study of low-density lipoprotein oxidizability indexes to measure the antioxidant activity of dietary polyphenols. *Nutrition Research.* 20: 941-953.

Sellamuthu. P.S., Arulselvan, P., Muniappan, B.P., Fakurazi Sand Kandasamy, M. (2012) . Mangiferin from Salacia chinensis prevents oxidative stress and protects pancreatic beta-cells in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Medicinal Food.* 16: 719-727.

บรรณานุกรม (ต่อ)

Sies, H., Stahl, W. and Sundquist, A. (1992). Antioxidant functions of vitamins, vitamin E and C, beta-carotene and other carotenoids. *Annals of the New York Academy of sciences.* 368: 7-19.

Sikarwar, M.S., Patli MB. (2012) Antihyperlipidemic activity of Salacia chinensis root extracts in triton-induced and atherogenic dietinduce hyperlipidemic rats. *Indian Journal of Pharmacology.* 44(1): 88-92.

Sirikunya Sayompark, Arunporn Itharat, Pintusorn Hansakul. (2012*). Comparative Study of Antioxidant Activities and Total Phenolic Content of Bauhinia strychnifolia Leaves Extracts.* Sci-Health, 011:50.

Valacchi, G. et al. (2004). In vivo ozone exposure induces antioxidant stress-related responses in murine lung and skin. *Free Radical Biology & Medicine.* 36: 673-681.

Voest, E.E., Vreugdenhil, G. and Marx, J. (1994). Iron-chelating agents in non-iron overload conditions. *Annals of Internal Medicine.* 120: 490-499

Yang, J.H. et al. (2000). Antioxidant and related compounds. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* 61: 1646-1649.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารสกัดตัวอย่างและการเตรียมสารเคมี

การคำนวณ

1. การคำนวณความเข้มข้นของย่านางแดง

ตัวอย่างการคำนวณตัวอย่างสมุนไพรความเข้มข้น 1000 mg/L ปริมาตร 100 mL

$$\text{จากสูตร} \quad ppm = \frac{\text{มวลของตัวถูกละลาย}}{\text{ปริมาตรของสารละลาย}} \times 10^6$$

$$\text{จะได้ว่า} \quad 1000 = \frac{g}{100} \times 10^6$$

$$g = 0.1\ g$$

ดังนั้น ในการทดลองต้องชั่งสารตัวอย่างมา 0.1 g แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100 mL

2. การคำนวณความเข้มข้นของสารละลาย DPPH$^{\bullet}$

ตัวอย่างการคำนวณความเข้มข้นสารละลาย DPPH$^{\bullet}$ 0.1 mM

$$\text{จากสูตร} \quad \text{โมล} = \frac{\text{มวลของตัวถูกละลาย}}{\text{มวลโมเลกุล}}$$

$$\text{เนื่องจาก} \quad n = 0.1\times10^{-3}\ \text{mol, MW} = 394.4$$

$$\text{จะได้ว่า} \quad 0.1\times10^{-3} = \frac{g}{394.4}$$

$$g = 0.039\ g$$

ดังนั้น ในการทดลองจึงต้องชั่งสาร DPPH$^{\bullet}$ มา 0.039 g ปรับปริมาตรด้วยเอทานอล 1000 mL

3. การคำนวณความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค

ตัวอย่างการคำนวณสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 100 mg/L ปริมาตร 100 mL

$$\text{จากสูตร} \quad ppm = \frac{\text{มวลของตัวถูกละลาย}}{\text{ปริมาตรของสารละลาย}} \times 10^6$$

$$\text{จะได้ว่า} \quad 100 = \frac{g}{100} \times 10^6$$

$$g = 0.01\ g$$

ดังนั้น ในการทดลองจึงต้องชั่งสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคมา 0.01 g แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100 mL

4. การคำนวณความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก

ตัวอย่างการคำนวณสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้น 100 mg/L ปริมาตร 50 mL

$$\text{จากสูตร} \quad \text{ppm} = \frac{\text{มวลของตัวถูกละลาย}}{\text{ปริมาตรของสารละลาย}} \times 10^6$$

$$\text{จะได้ว่า} \quad 100 = \frac{g}{50} \times 10^6$$

$$g = 0.005\ g$$

ดังนั้น ในการทดลองจึงต้องชั่งสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคมา 0.005 g แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 50 ml

5. การคำนวณความเข้มข้นของสารละลาย Na_2CO_3

ตัวอย่างการคำนวณความเข้มข้นของสารละลาย Na_2CO_3 10% w/v ปริมาตร 100 mL

$$\text{จากสูตร} \quad \%\ w/v = \frac{\text{มวลของตัวถูกละลาย}}{\text{ปริมาตรของสารละลาย}} \times 100$$

$$\text{จะได้ว่า} \quad 10 = \frac{g}{100} \times 100$$

$$g = 10.0\ g$$

ดังนั้น ในการทดลองจึงต้องชั่งสาร Na_2CO_3 มา 10.0 g แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100 mL

6. การคำนวณความเข้มข้นของสารละลายโฟลิน–ซิโอแคลทู (Folin-Ciocalteu)

ตัวอย่างการคำนวณความเข้มข้นของสารละลายโฟลิน–ซิโอแคลทู 0.2 N จากสารละลาย โฟลิน–ซิโอแคลทู ความเข้มข้น 2 N (เจือจางอัตราส่วน 1:10 ระหว่างสารละลายกับน้ำกลั่น) ปริมาตร 100 mL

ปิเปตโฟลิน–ซิโอแคลทู 10 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100 mL

7. การคำนวณความเข้มข้นของสารละลาย $NaNO_2$

ตัวอย่างการคำนวณความเข้มข้นของสารละลาย $NaNO_2$ 5% w/v ปริมาตร 250 mL

$$\text{จากสูตร} \quad \%\ w/v = \frac{\text{มวลของตัวถูกละลาย}}{\text{ปริมาตรของสารละลาย}} \times 100$$

$$\text{จะได้ว่า} \quad 5 = \frac{g}{100} \times 100$$

$$g = 12.5\ g$$

ดังนั้น ในการทดลองจึงต้องชั่งสาร $NaNO_2$ มา 12.5 g แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 250 mL

8. การคำนวณความเข้มข้นของสารละลาย $AlCl_3$

ตัวอย่างการคำนวณความเข้มข้นของสารละลาย $AlCl_3$ 10% w/v ปริมาตร 100 mL

$$\text{จากสูตร} \quad \%\ w/v = \frac{\text{มวลของตัวถูกละลาย}}{\text{ปริมาตรของสารละลาย}} \times 100$$

$$\text{จะได้ว่า} \quad 10 = \frac{g}{100} \times 100$$

$$G = 10.0\ g$$

ดังนั้น ในการทดลองจึงต้องชั่งสาร $AlCl_3$ มา 10.0 g แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100 mL

9. การคำนวณความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเควอซิทิน

ตัวอย่างการคำนวณสารละลายมาตรฐานเควอซิทินความเข้มข้น 500 mg/L ปริมาตร 50 mL

$$\text{จากสูตร} \quad ppm = \frac{\text{มวลของตัวถูกละลาย}}{\text{ปริมาตรของสารละลาย}} \times 10^6$$

$$\text{จะได้ว่า} \quad 500 = \frac{g}{50} \times 10^6$$

$$g = 0.025\ g$$

ดังนั้น ในการทดลองจึงต้องชั่งสารมาตรฐานเควอซิทินมา 0.025 g แล้วปรับปริมาตรด้วยเอทานอล 50 mL

10. การคำนวณความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน $ABTS^{\bullet+}$

ตัวอย่างการคำนวณความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน $ABTS^{\bullet+}$ 10% v/v ปริมาตร 100 mL

$$\text{จากสูตร} \quad \%\ v/v = \frac{\text{มวลของตัวถูกละลาย}}{\text{ปริมาตรของสารละลาย}} \times 100$$

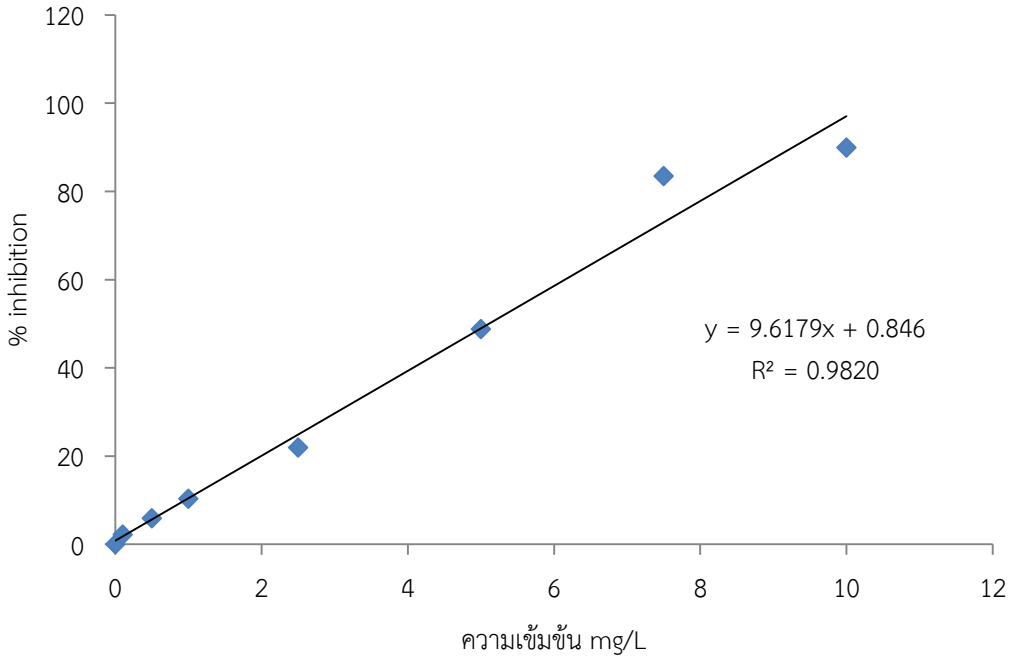
$$\text{จะได้ว่า} \quad 10 = \frac{g}{100} \times 100$$

$$g = 10.0\ g$$

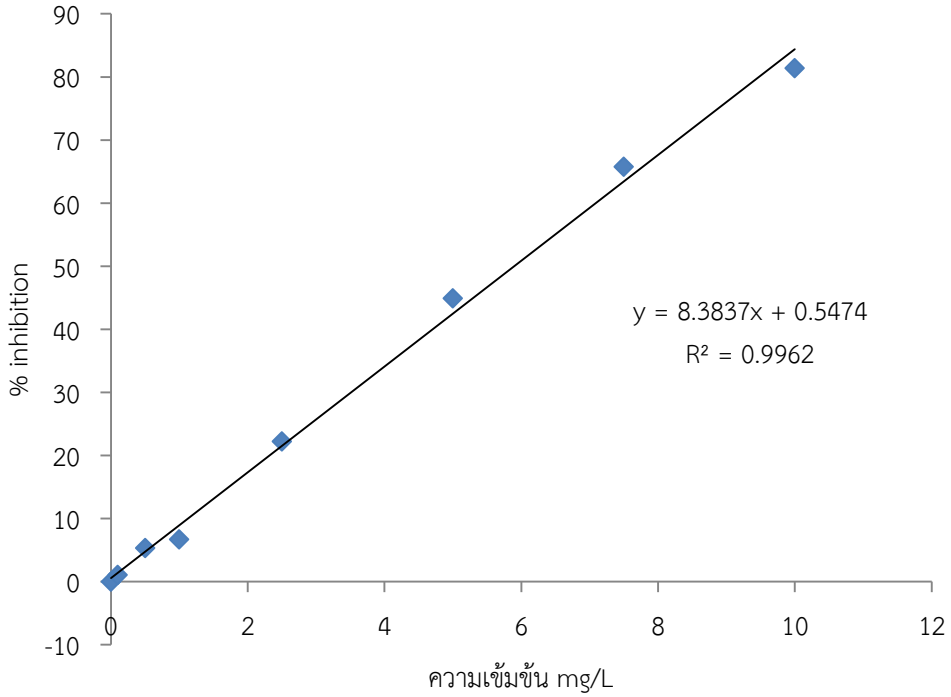
ดังนั้น ในการทดลองจึงต้องชั่งสาร $AlCl_3$ มา 10.0 g แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100 mL

ภาคผนวก ข

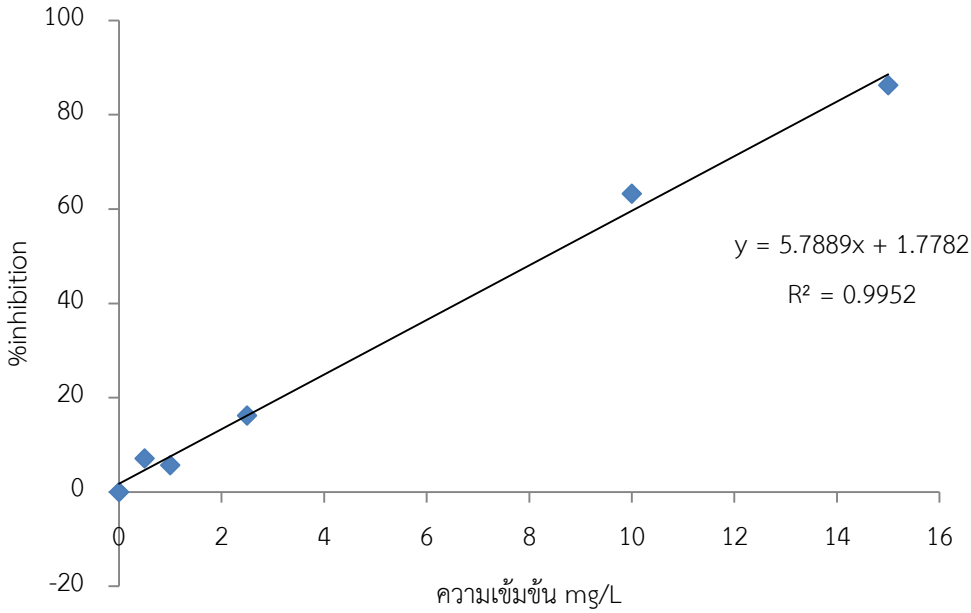
ผลการวิจัย



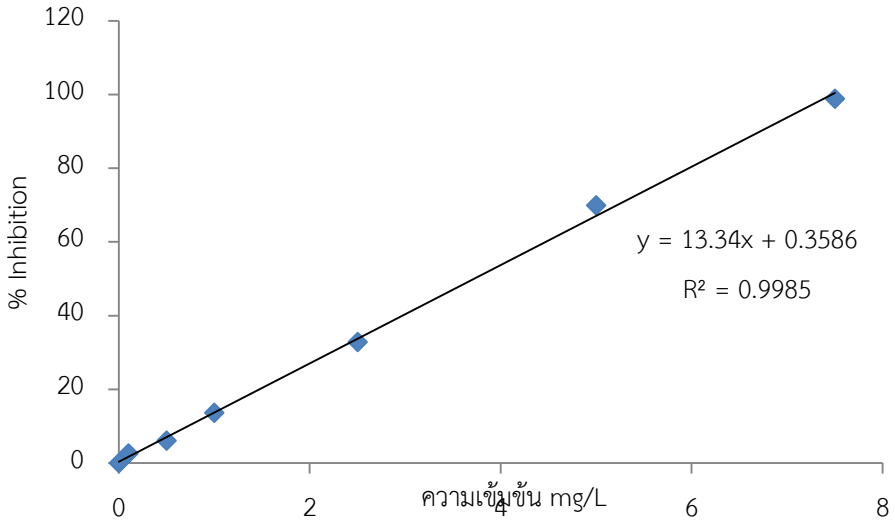
ภาพที่ ข-1 กราฟความสัมพันธ์ของสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคที่ความเข้มข้นต่างๆ กับ %inhibition ด้วยวิธี DPPH•



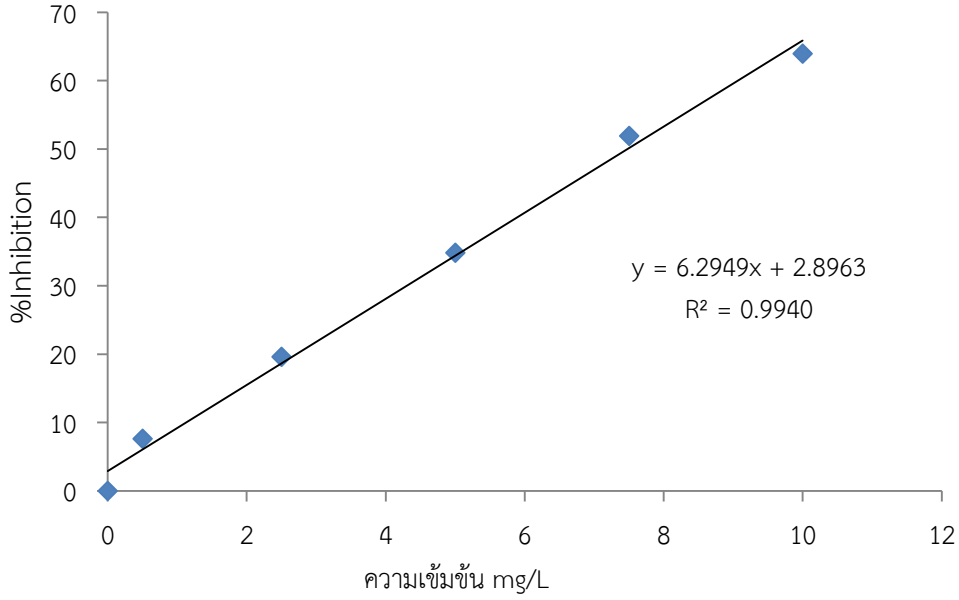
ภาพที่ ข-2 กราฟความสัมพันธ์ของสารมาตรฐานโทรลอกที่ความเข้มข้นต่างๆ กับ %inhibition ด้วยวิธี DPPH•



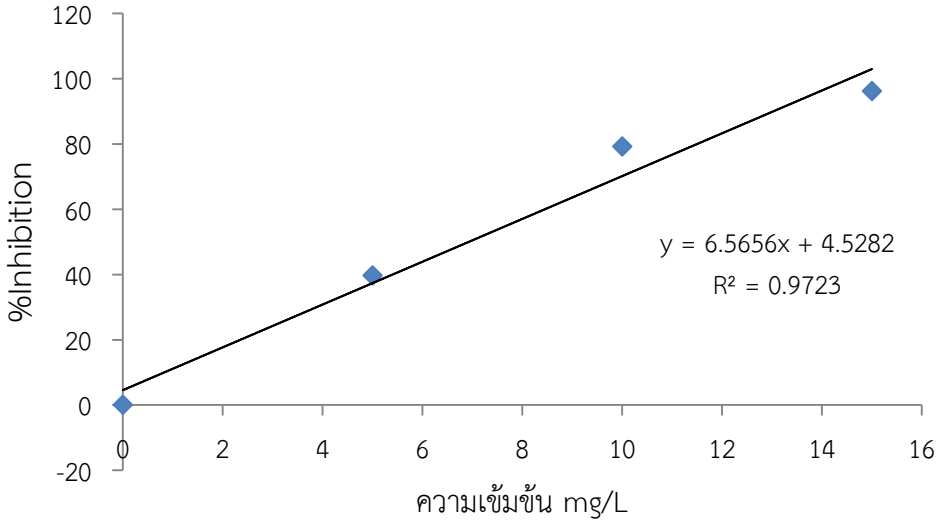
ภาพที่ ข-3 กราฟความสัมพันธ์ของสารสกัดจากย่านางแดงที่ความเข้มข้นต่างๆกับ %inhibition ด้วยวิธี DPPH$^{\bullet}$



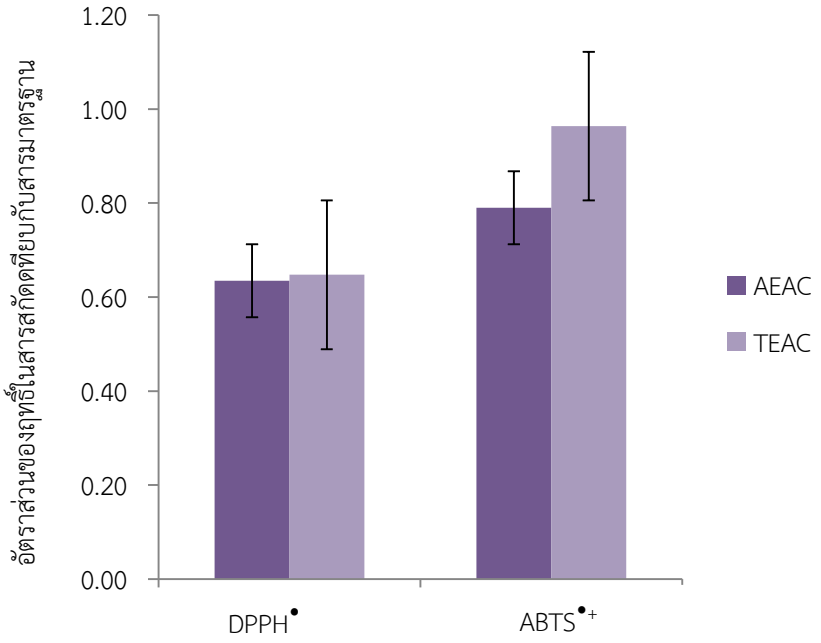
ภาพที่ ข-4 กราฟความสัมพันธ์ของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค ที่ความเข้มข้นต่างๆ กับ %inhibition ด้วยวิธี ABTS$^{\bullet+}$



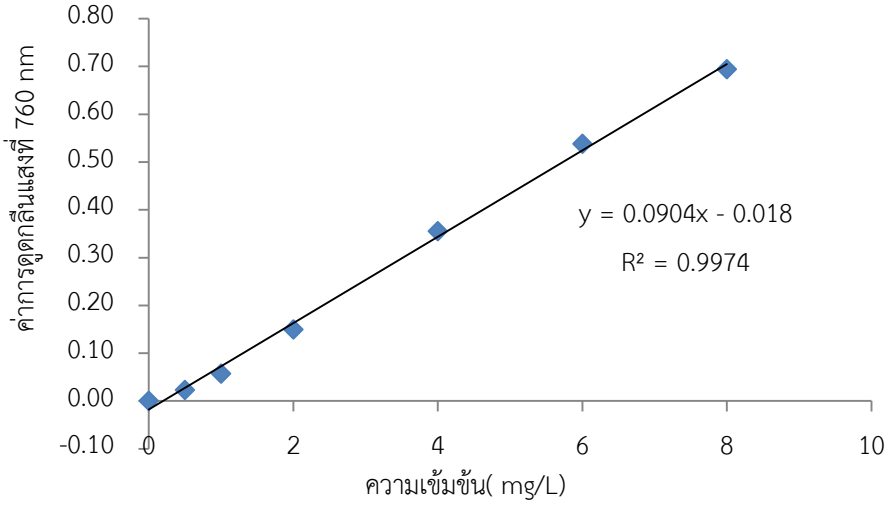
ภาพที่ ข-5 กราฟความสัมพันธ์ของสารมาตรฐานโทรลอกที่ความเข้มข้นต่างๆ กับ %inhibition ด้วยวิธี $ABTS^{\bullet+}$



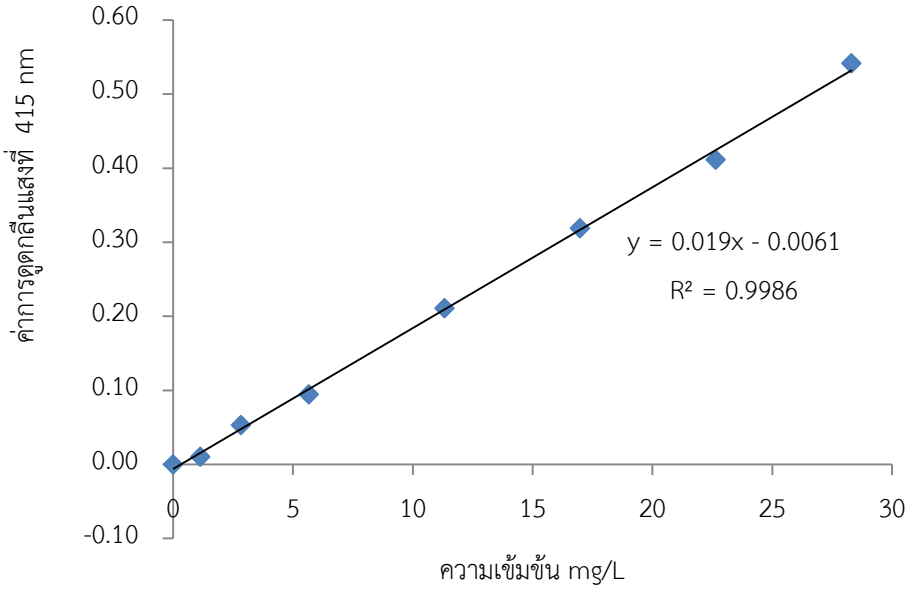
ภาพที่ ข-6 กราฟความสัมพันธ์ของสารสกัดจากย่านางแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ กับ %inhibition ด้วยวิธี $ABTS^{\bullet+}$



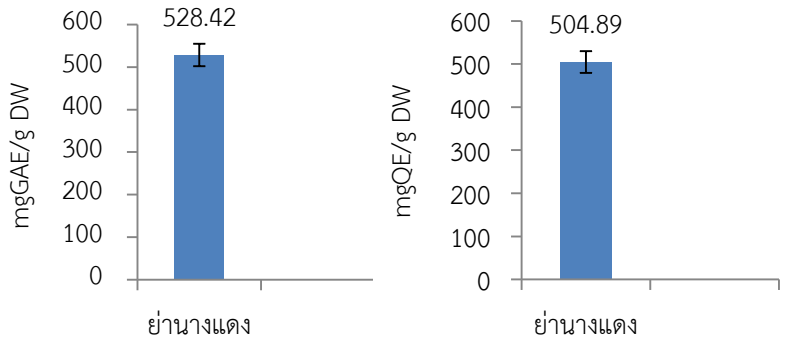
ภาพที่ ข-7 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบกับสารมาตรฐาน กรดแอสคอร์บิค (AEAC) และสารมาตรฐานโทรลอก (TEAC) ด้วยวิธี DPPH• และ ABTS•+



ภาพที่ ข-8 กราฟความสัมพันธ์ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (mg/L) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu



ภาพที่ ข-9 กราฟความสัมพันธ์ของสารมาตรฐานเควอซิทิน (mg/L) ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric



ภาพที่ ข-10 ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของย่านางแดง ตามลำดับ

ภาคผนวก ค
ข้อมูลจากการทดลอง

ตารางที่ ค-1 แสดงน้ำหนักของสารสกัดย่านางแดง

ตัวอย่าง	น้ำหนักแห้งก่อนนำไปสกัด (g)	น้ำหนักสารสกัดหยาบ (g)	% yield
ย่านางแดง *(Bauhinia strychnifolia Craib.)*	182.92	34.21	18.70

ตารางที่ ค-2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานโทรลอก เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH• และค่า IC_{50}

Concentration (ppm)	Absorbance at wavelength 517 nm.				% Radical scavenging	IC_{50}
Trolox	1	2	3	Average±SD	Average	
0	0.4755	0.4768	0.4785	0.4769±0.0015	0.0070	5.4166
0.1	0.4910	0.4596	0.4652	0.4719±0.0167	1.0414	
0.5	0.4541	0.4507	0.4498	0.4515±0.0023	5.3191	
1.0	0.4325	0.4479	0.4544	0.4449±0.0110	6.7030	
2.5	0.3589	0.3704	0.3673	0.3655±0.0060	22.2339	
5.0	0.2222	0.2789	0.3833	0.2948±0.0820	44.8941	
7.5	0.1580	0.1657	0.1658	0.1632±0.0045	65.7860	
10.0	0.1042	0.0759	0.0858	0.0886±0.0143	81.4147	

ตารางที่ ค-3 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH• และค่า IC_{50}

Concentration (ppm)	Absorbance at wavelength 517 nm.				% Radical scavenging	IC_{50}
Ascobic acid	1	2	3	Average±SD	Average	
0	0.4670	0.4956	0.4950	0.4859±0.0163	0.0069	4.3526
0.1	0.4342	0.4878	0.5038	0.4753±0.0365	2.1884	
0.5	0.4449	0.4564	0.4704	0.4572±0.0128	5.8997	
1.0	0.4328	0.4400	0.4340	0.4356±0.0040	10.3519	
2.5	0.3394	0.4566	0.3423	0.3794±0.0668	21.9112	
5.0	0.2830	0.2379	0.2253	0.2487±0.0303	48.8098	
7.5	0.0817	0.0927	0.0662	0.0802±0.0133	83.4945	
10.0	0.0339	0.0308	0.0819	0.0489±0.0286	89.9431	

ตารางที่ ค-4 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างจากย่านางแดง เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH$^{\bullet}$ และค่า IC_{50}

Concentration of crude extract (ppm)	Absorbance at wavelength 517 nm.				% Radical scavenging	IC_{50}
ย่านางแดง	1	2	3	Average±SD	Average	
0	0.4164	0.4164	0.4164	0.4164±0.0000	0.0000	6.8590
0.5	0.3906	0.3766	0.3929	0.3867±0.0088	7.1326	
1.0	0.3861	0.3987	0.3937	0.3928±0.0063	5.6596	
2.5	0.3121	0.3658	0.3685	0.3488±0.0318	16.2344	
10.0	0.1537	0.1537	0.1517	0.1530±0.0012	63.2485	
15.0	0.0541	0.0585	0.0589	0.0572±0.0027	86.2712	

ตารางที่ ค-5 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค เปอร์เซ็นการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS$^{\bullet+}$ และค่า IC_{50}

Concentration (ppm)	Absorbance at wavelength 734 nm.				% Radical scavenging	IC_{50}
Ascorbic acid	1	2	3	Average±SD	Average	
0	0.6126	0.611	0.6124	0.6120±0.0009	0.0000	3.3895
0.1	0.5952	0.5949	0.5980	0.5960±0.0017	2.6089	
0.5	0.5847	0.5710	0.5686	0.5748±0.0087	6.0839	
1.0	0.5230	0.5339	0.5281	0.5283±0.0055	13.6710	
2.5	0.3931	0.4306	0.4098	0.4112±0.0188	32.8159	
5.0	0.1685	0.1898	0.1938	0.1840±0.0136	69.9292	
7.5	0.0073	0.0090	0.0048	0.0070±0.0021	98.8508	

ตารางที่ ค-6 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานโทรลอก เปอร์เซ็นการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี $ABTS^{\bullet+}$ และค่า IC_{50}

Concentration (ppm)	Absorbance at wavelength 734 nm.				% Radical scavenging	IC_{50}
Trolox	1	2	3	Average±SD	Average	
0	0.9699	1.0319	1.0416	1.0145±0.0390	0.0033	5.0466
0.1	0.928	0.9564	0.9134	0.9326±0.0220	6.4301	
0.5	0.9215	0.9434	0.9465	0.9371±0.0136	7.6261	
1.0	0.8443	0.858	0.8514	0.8512±0.0070	16.0933	
2.5	0.8267	0.8732	0.7878	0.8292±0.0428	19.5959	
5.0	0.6689	0.6590	0.6565	0.6615±0.0066	34.7988	
7.5	0.4889	0.4910	0.4833	0.4877±0.0039	51.9238	
10.0	0.3724	0.3461	0.3787	0.3657±0.0173	63.9494	

ตารางที่ ค-7 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างจากย่านางแดง เปอร์เซ็นการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี $ABTS^{\bullet+}$ และค่า IC_{50}

Concentration of crude extract (ppm)	Absorbance at wavelength 734 nm.				% Radical scavenging	IC_{50}
ย่านางแดง	1	2	3	Average±SD	Average	
0	0.9714	0.9481	0.9785	0.9660±0.0159	0.0000	5.2368
2.5	0.7948	0.8194	0.7844	0.7995±0.0180	17.2360	
5.0	0.6364	0.6590	0.6540	0.6498±0.0119	32.7329	
7.5	0.5347	0.5224	0.5224	0.5265±0.0071	45.4969	
10.0	0.5001	0.4358	0.4059	0.4473±0.0481	53.6991	
12.5	0.3840	0.2036	0.2538	0.2805±0.0667	70.9662	
15.0	0.1989	0.1923	0.1779	0.1897±0.0107	80.3623	
17.5	0.1339	0.1186	0.1237	0.1254±0.0078	87.0186	
20.0	0.0582	0.0604	0.0745	0.0644±0.0088	93.3368	

ตารางที่ ค-8 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค (AEAC) และสารมาตรฐานโทรลอก (TEAC) ด้วยวิธี $DPPH^{\bullet}$ และ $ABTS^{\bullet+}$

สมุนไพร	$DPPH^{\bullet}$		$ABTS^{\bullet+}$	
	AEAC	TEAC	AEAC	TEAC
ย่านางแดง	0.6346	0.7897	0.6472	0.9637

ตารางที่ ค-9 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก ด้วยวิธี Folin – ciocalteu

Concentration (ppm)	Absorbance at wavelength 760 nm.			
Gallic acid	1	2	3	Average±SD
0	0.0011	0.002	0.0017	0.0016±0.0005
5.0	0.0257	0.0242	0.0229	0.0243±0.0014
10.0	0.0582	0.0571	0.0611	0.0588±0.0021
20.0	0.1503	0.1511	0.1531	0.1515±0.0014
40.0	0.3575	0.3500	0.3626	0.3567±0.0063
60.0	0.5033	0.5866	0.5300	0.5400±0.0425
80.0	0.7091	0.6838	0.6947	0.6959±0.0127
100.0	0.8614	1.0976	1.1759	1.0450±0.1637

ตารางที่ ค-10 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างจากย่านางแดง ด้วยวิธี Folin – ciocalteu

Concentration of crude extract (ppm)	Absorbance at wavelength 760 nm.			
ย่านางแดง	1	2	3	Average±SD
0	0.0004	0.0003	0.0005	0.0004±0.0001
100.0	0.4740	0.4768	0.4822	0.4777±0.0042
200.0	0.8929	0.9032	0.8696	0.8886±0.0172
300.0	1.2853	1.3009	1.2679	1.2847±0.0165
400.0	1.6482	1.6360	1.6515	1.6452±0.0082
500.0	1.9954	1.9635	1.9632	1.9740±0.0185

ตารางที่ ค-11 เปรียบเทียบข้อมูลการคำนวณปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ด้วยวิธี Folin – ciocalteu จากสมุนไพรย่านางแดง

Sample	Absorbance at wavelength 760 nm.				x*	Total phenolic content (mgGAE/g Dw)
	1	2	3	Average		
ย่านางแดง	0.4740	0.4768	0.4822	0.4777	5.2842	528.4224

***หมายเหตุ** x คือ ค่าความเข้มข้นที่คำนวณได้จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

ตารางที่ ค-12 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานเควอซิทิน ด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric

Concentration (ppm)	Absorbance at wavelength 415 nm.			
Quercetin	1	2	3	Average±SD
0	0.0302	0.0306	0.0332	0.0313±0.0016
5.0	0.0402	0.0395	0.0300	0.0366±0.0057
10.0	0.0429	0.0309	0.0335	0.0358±0.0063
15.0	0.0346	0.0401	0.0387	0.0378±0.0030
20.0	0.0399	0.0410	0.0442	0.0417±0.0022
25.0	0.0470	0.0523	0.0464	0.0486±0.0032
50.0	0.0884	0.0845	0.0800	0.0843±0.0042
100.0	0.1169	0.1311	0.1300	0.1260±0.0079
200.0	0.2237	0.242	0.2613	0.2423±0.0188
300.0	0.3371	0.3552	0.3581	0.3501±0.0114
400.0	0.4016	0.462	0.4653	0.4430±0.0360
500.0	0.5906	0.5707	0.5571	0.5728±0.0168

ตารางที่ ค-13 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างจากย่านางแดง ด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric

Concentration of crude extract (ppm)	Absorbance at wavelength 415 nm.			
ย่านางแดง	1	2	3	Average SD
0	0.0313	0.0313	0.0313	0.0313±0.0000
25.0	0.0287	0.0273	0.0272	0.0277±0.0008
50.0	0.0417	0.0413	0.0411	0.0414±0.0003
150.0	0.0958	0.0984	0.1003	0.0982±0.0023
250.0	0.1636	0.1737	0.1635	0.1669±0.0060
500.0	0.3002	0.3121	0.3026	0.3049±0.0063
700.0	0.4344	0.4503	0.4616	0.4488±0.0137

ตารางที่ ค-14 เปรียบเทียบข้อมูลการคำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์ ด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric จากย่านางแดง

Sample	Absorbance at wavelength 415 nm.				x*	Total flavonoid content (mgQE /100 g Dw)
	1	2	3	Average		
ย่านางแดง	0.1636	0.1737	0.1635	0.1669	7.1447	504.8919

***หมายเหตุ** x คือ ค่าความเข้มข้นที่คำนวณได้จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

ภาคผนวก ง

ภาพเครื่องมือที่ใช้ในการทำวิจัย

ภาพที่ ง-1 เครื่อง UV-Vis spectrophotometer

ภาพที่ ง-2 เครื่อง Hot Plate Magnetic Stirrer

ภาพที่ ง-3 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง

ภาพที่ ง-4 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

ภาพที่ ง-5 ตู้อบความร้อน (hot air oven memmert)

ภาคผนวก จ

วัตถุดิบและขั้นตอนในการเก็บตัวอย่าง

ภาพที่ จ-1 ย่านางแดง

ภาพที่ จ-2 ย่านางแดงที่บดหยาบ

ภาพที่ จ-3 การสกัดย่านางแดง

ภาพที่ จ-4 การกรองสารสกัดย่านางแดง

ภาพที่ จ-5 การเคี่ยวย่านางแดง

ภาพที่ จ-6 นำใส่ขวดและปิดด้วยกระดาษฟอยด์

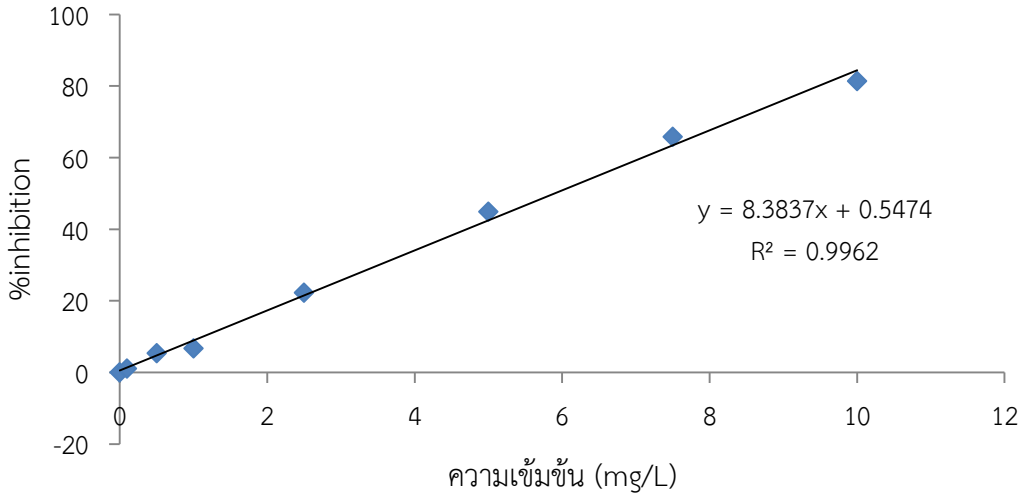
ภาพที่ จ-7 นำไปอบ

ภาพที่ จ-8 เก็บในโถดูดความชื้น

ภาคผนวก ฉ

การคำนวณผลการวิจัย

1. ตัวอย่างการคำนวณหาค่าร้อยละของการยับยั้งของสารมาตรฐานโทรลอก ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH• (IC_{50})



ภาพที่ ค-1 กราฟสมการในการคำนวณหาร้อยละการยับยั้งของสารมาตรฐานโทรลอก วิธี DPPH•

แทนค่า $y = 50$

จากสมการ $y = 8.3837x + 0.5474$

$$50 = 8.3837x + 0.5474$$

$$x = \frac{50 - 0.5474}{8.3837}$$

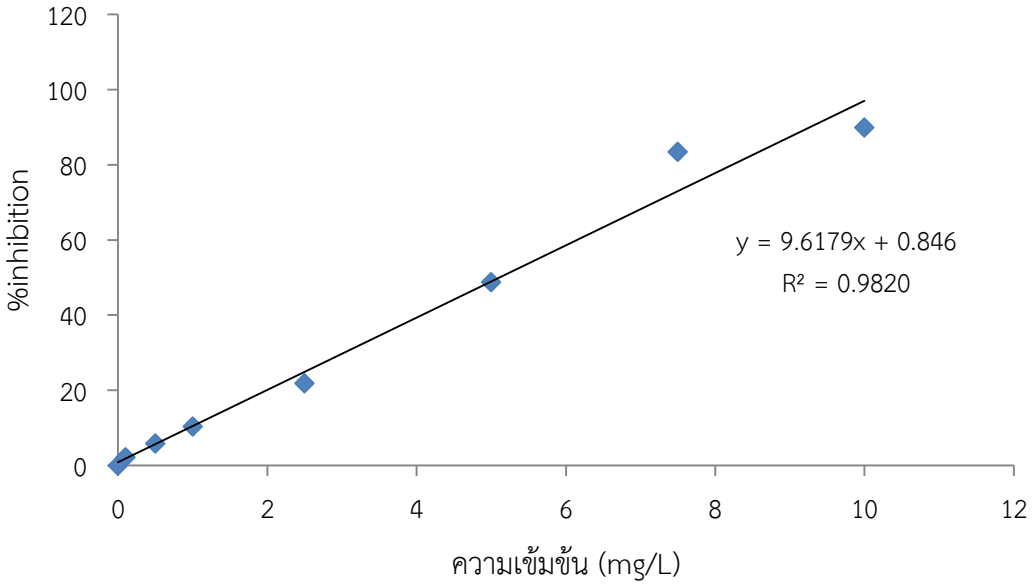
$$x = 5.8986$$

ดังนั้น สารมาตรฐานโทรลอกมีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.8986 mg/L

* สูตรการหา %inhibition

$$\%\text{inhibition} = \frac{A_{control} - A_{average}}{A_{control}} \times 100$$

2. ตัวอย่างการคำนวณหาค่าร้อยละของการยับยั้งของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH• (IC_{50})



ภาพที่ ค-2 กราฟสมการในการคำนวณหาร้อยละการยับยั้งของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค วิธี DPPH•

แทนค่า $y = 50$

จากสมการ $y = 9.6179x + 0.846$

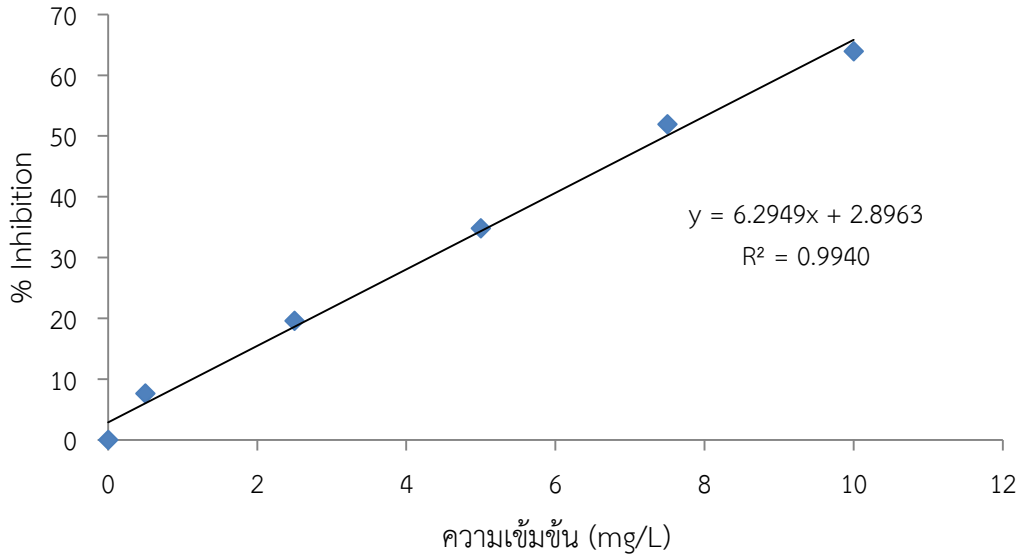
$50 = 9.6179x + 0.846$

$$x = \frac{50 - 0.856}{9.6179}$$

$x = 5.1096$

ดังนั้น สารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคมีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.1096 mg/L

3. ตัวอย่างการคำนวณหาค่าร้อยละของการยับยั้งของสารมาตรฐานโทรลอก ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS$^{\bullet+}$ (IC_{50})



ภาพที่ ค-3 กราฟสมการในการคำนวณหาร้อยละการยับยั้งของสารมาตรฐานโทรลอก วิธี ABTS$^{\bullet+}$

แทนค่า $y = 50$

จากสมการ $y = 6.2949x + 2.8963$

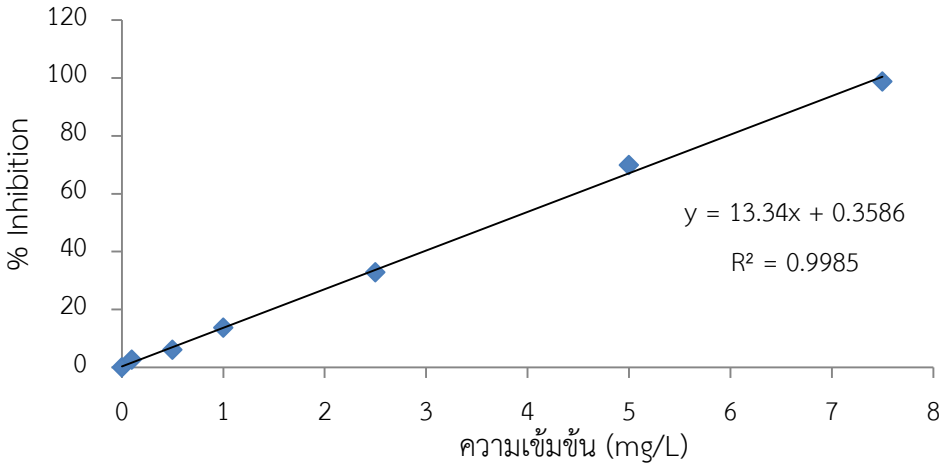
$$50 = 6.2949x + 2.8963$$

$$x = \frac{50 - 2.8963}{6.2949}$$

$$x = 7.4828$$

ดังนั้น สารมาตรฐานโทรลอกมีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.4828 mg/L

3. ตัวอย่างการคำนวณหาค่าร้อยละของการยับยั้งของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS$^{\bullet+}$ (IC_{50})



ภาพที่ ค-2 กราฟสมการในการคำนวณหาร้อยละการยับยั้งของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค วิธี ABTS$^{\bullet+}$

แทนค่า $y = 50$

จากสมการ $y = 13.34x + 0.3586$

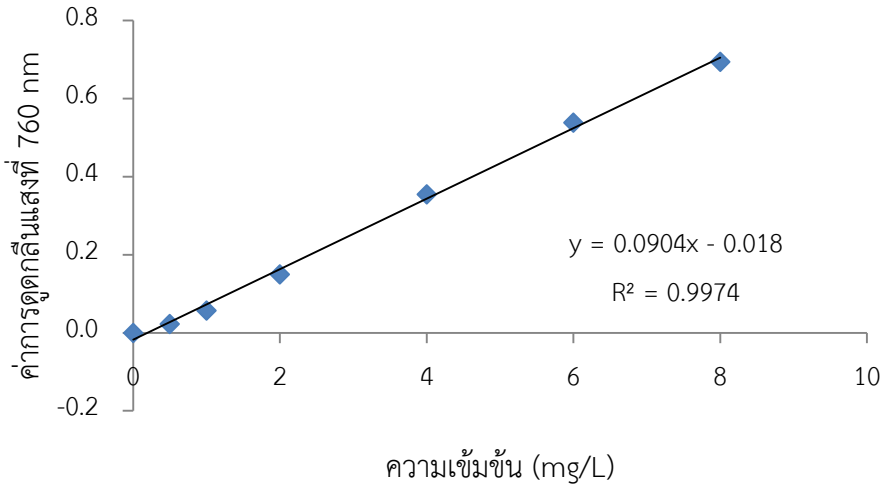
$$50 = 13.34x + 0.3586$$

$$x = \frac{50 - 0.3586}{13.34}$$

$$x = 3.7212$$

ดังนั้น สารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคมีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.7212 mg/L

5. ตัวอย่างการคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของย่านางแดงที่ความเข้มข้น 100 ppm เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก



ภาพที่ ค-3 กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก (mg/L)

แทนค่า $y = 0.4777$

จากสมการ $y = 0.0904x - 0.018$

$$0.4777 = 0.0904x - 0.018$$

$$x = \frac{0.4777 + 0.018}{0.0904}$$

$$x = 5.4834$$

สารละลาย 1000 mL มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด = 5.4834 mg

ถ้าสารละลาย 1 mL จะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด $= \frac{5.4834 \text{ mg} \times 1 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}}$

$= 0.0055$ mg

สารละลายตัวอย่างเจือจาง 0.1 mL มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก = 0.0055 mg

ถ้าสารละลายตัวอย่างเจือจาง 1 mL จะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก $= \frac{0.0055 \text{ mg} \times 1 \text{ mL}}{0.1 \text{ mL}}$

$= 0.055$ mg

สารสกัด 1 mg มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด = 0.055 mg

ถ้าสารสกัด 34,209.4 mg มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด $= \frac{0.055 \text{ mg} \times 34,209.4 \text{ mg}}{1 \text{ mg}}$

$= 1,881.5$ mg

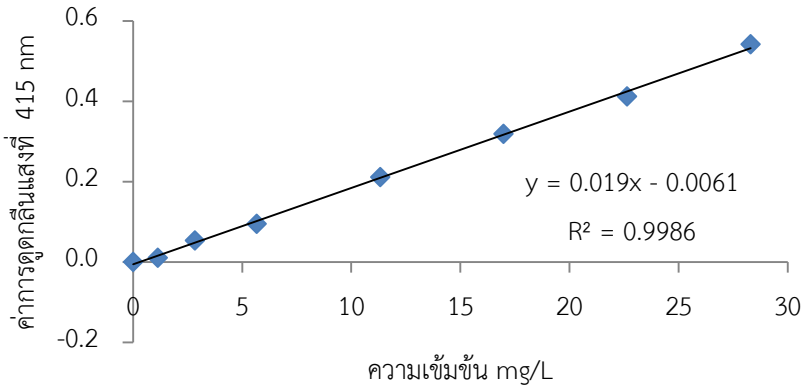
สารสกัดย่านางแดง 182.92 g มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด = 1881.5 mg

ถ้าสารสกัดย่านางแดง 1 g มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด $= \frac{1881.5 \text{ mg} \times 1 \text{ g}}{182.92 \text{ g}}$

$= 9.8825$ mg GE/ g DW

ดังนั้น สารสกัดย่านางแดงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 9.8825 mg GE/ g DW

5. ตัวอย่างการคำนวณหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของย่านางแดงที่ความเข้มข้น 250 ppm เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานเควอซิทิน



ภาพที่ ค-3 กราฟมาตรฐานของสารละลายเควอซิทิน (mg/L)

แทนค่า $y = 0.1356$

จากสมการ $y = 0.019x - 0.0061$

$0.1356 = 0.019x - 0.0061$

$x = \frac{0.1356 + 0.0061}{0.019}$

$x = 7.1447$

สารละลาย 1000 mL มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด = 7.1447 mg

ถ้าสารละลาย 2.65 mL จะมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด $= \frac{7.1447 \text{ mg} \times 2.65 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}}$

$= 0.019$ mg

สารละลายตัวอย่างเจือจาง 0.15 mL มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด = 0.019 mg

ถ้าสารละลายตัวอย่างเจือจาง 1 mL จะมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ $= \frac{0.019 \text{ mg} \times 1 \text{ mL}}{0.15 \text{ mL}}$

$= 0.127$ mg

สารสกัด 1 mg มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด = 0.127 mg

ถ้าสารสกัด 34,209.4 mg มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด $= \frac{0.127 \text{ mg} \times 34,209.4 \text{ mg}}{1 \text{ mg}}$

$= 4,344.6$ mg

สารสกัดย่านางแดง 182.92 g มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด = 4,344.6 mg

ถ้าสารสกัดย่านางแดง 1 g มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด $= \frac{4,344.6 \text{ mg} \times 1 \text{ g}}{182.92 \text{ g}}$

$= 23.4818$ mg QE/ g DW

ดังนั้น สารสกัดย่านางแดง มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 23.4818 mg QE/ g DW

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ นางสาวนภาลัย กุลบุตร

วันเกิด 7 กันยายน พ.ศ. 2536

ที่อยู่ปัจจุบัน 65 หมู่ที่ 3 ตำบลตระการ อำเภอตระการพืชผล จังหวัดอุบลราชธานี

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2551 **มัธยมศึกษาตอนต้น** โรงเรียนบ้านโพนเมือง อำเภอตระการพืชผล จังหวัดอุบลราชธานี

พ.ศ. 2554 **มัธยมศึกษาตอนปลาย** โรงเรียนนารีนุกูล อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี

2. ชื่อ นางสาวนุชจรี ชินภักดี

วันเกิด 27 กันยายน พ.ศ. 2536

ที่อยู่ปัจจุบัน 162 หมู่ที่ 8 บ้านหนองแวง ตำบลกุดธาตุ อำเภอหนองนาคำ จังหวัดขอนแก่น

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2551 **มัธยมศึกษาตอนต้น** โรงเรียนหนองนาคำวิทยาคม อำเภอหนองนาคำ จังหวัดขอนแก่น

พ.ศ. 2554 **มัธยมศึกษาตอนปลาย** โรงเรียนหนองนาคำวิทยาคม อำเภอหนองคำ จังหวัดขอนแก่น

3. ชื่อ นางสาวปิยธิดา ปาปะเพ

วันเกิด 30 กันยายน พ.ศ. 2536

ที่อยู่ปัจจุบัน 40 หมู่ที่ 10 บ้านโพธิ์ ตำบลหนองแสง อำเภอวาปีปทุม จังหวัดมหาสารคาม

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2551 **มัธยมศึกษาตอนต้น** โรงเรียนวาปีปทุม อำเภอวาปีปทุม จังหวัดมหาสารคาม

พ.ศ. 2554 **มัธยมศึกษาตอนปลาย** โรงเรียนวาปีปทุม อำเภอวาปีปทุม จังหวัดมหาสารคาม

4. ชื่อ นางสาวสมฤทัย ไชยขันธ์

วันเกิด 4 กันยายน พ.ศ. 2536

ที่อยู่ปัจจุบัน 50 หมู่ที่ 7 บ้านหนองห้าง ตำบลหนองห้าง อำเภอกุฉินารายณ์ จังหวัดกาฬสินธุ์

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2551 **มัธยมศึกษาตอนต้น** โรงเรียนบัวขาว อำเภอกุฉินารายณ์ จังหวัดกาฬสินธุ์

พ.ศ. 2554 **มัธยมศึกษาตอนปลาย** โรงเรียนบัวขาว อำเภอกุฉินารายณ์ จังหวัดกาฬสินธุ์