การสกัด ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพและการย้อมสีไหมของผักเม็ก

โดย

สมหมาย ปะติตังโข

และคณะ

คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

2552

การสกัด ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพและการย้อมสีไหมของผักเม็ก

โดย

ดร.สมหมาย ปะติตังโข

ผศ.สมศักดิ์ จีวัฒนา

อ. จิตรี ภู่ตระกูล

ผศ. สุเทพ เทียนวรรณ

อ. สุวรรณา จันคนา

คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

2552

บทคัดย่อ

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดสมุนไพรผักเม็ก โดยการสกัดสารจากใบแห้งหนัก 300 g ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ได้แก่ hexane, dichloromethane, ethyl acetate, ethanol และ methanol ได้สารสกัดหยาบที่มีน้ำหนัก 22.21,60.01, 80.14,90.03 และ 42.36 g ตามลำดับ พบว่าสารสกัดหยาบมีปริมาณของ polyphenolic เรียงลำดับจากมากไปน้อยคือ crude ethanol, crude methanol และ crude ethyl acetate ตามลำดับ เมื่อนำสารสกัดแต่ละส่วนมาทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค DPPH และ FRAP และความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียชนิด *E.coli, Klebsiella* spp.*, Enterobacter* spp. และ *Citrobacter* spp. พบว่าสารสกัดหยาบจากใบผักเม็กโดยตัวทำละลาย ethanol และ methanol มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ $DPPH^{\cdot}$ ด้วยค่า IC_{50} ที่ต่ำในระดับ 53.65 ppm เท่ากัน สำหรับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP พบว่าสารสกัดหยาบที่มีความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} ได้มากที่สุดคือ crude dichloromethane ส่วนความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย พบว่า crude dichloromethane, crude ethyl acetate, crude methanol และ crude ethanol สามารถต้านการเจิญเติบโตของ *E.coli, Klebsiella* spp., *Etherobacter* spp. และ *Citrobacter* spp. ได้ดี สำหรับผลการย้อมสีของผ้าไหม พบว่าสารสกัดจาก ethanol ทั้งที่ย้อมแบบโดยตรงและแบบมอร์แดนท์ให้โซนสีเหลือง น้ำตาลที่ติดทนสีไม่ตกด้วยสนิมเหล็ก

Abstract

Biological evaluation of crude extracts of *Kanchanaburi gratum* (Wight) S.W. Mitra, var, gratum. The dried leaves 300 g was extracted by hexane, dichloromethane, ethyl acetate, methanol and ethanol to give crude extract 22.21, 60.01, 80.14, 90.03 and 42.36 g respectively. Crude extracts of them were analyzed for antioxidant and antibacterial activities. The DPPH and FRAP assays were used for determining all of crude extracts as antioxidant activities and polyphenolic contents. For the polyphenolic contents were arranged from maximum to minimum: crude ethanol, crude methanol and crude ethyl acetate, respectively. Total antioxidant activity of crude extract by which DPPH assay has IC_{50} 53.65 ppm for ethanol and methanol extract, they were the best antioxidant capacity. For total antioxidant activity by FRAP assay gain the highest ferrous concentration were crude ethanol, crude ethyl acetate, crude methanol equal to crude dichloromethane, and crude hexane respectively. Some of bacteria as *E.coli, Klebsiella* spp*., Enterobacter* spp*.* and *Citrobacter* spp*.* were uses for determining all crude extracts against microbial growth. Crude of ethyl acetate, ethanol and methanol inhibited all bacterial use in the ranges of concentration. For dying properties of crude ethanol get shade of yellow and brown which such durable by effect of rust.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการสกัด การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ และการย้อมสีไหมของสมุนไพรผักเม็ก โดยทำการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเพื่อเป็นแนวทางในการที่จะนำไปรักษาโรคต่างๆ หรือทำการต่อยอดผลิตยารักษาโรคและเป็นแนวทางในการพัฒนาสีย้อมไหมจากธรรมชาติ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทางคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ทั้งทางด้านเครื่องมือ อุปกรณ์การทดลองบางส่วน สถานที่ทำการทดลอง และขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ที่สนับสนุนทุนวิจัย จนสามารถทำให้งานวิจัยนี้เสร็จสมบูรณ์

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 บทนำ	3
2.2 พืชสมุนไพร	3
2.3 เชื้อแบคทีเรีย	6
2.4 อนุมูลอิสระ (Free Radical)	10
2.5 ชนิดและการเรียกชื่ออนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง	11
2.6 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)	12
2.7 การศึกษาความสามารถการต้านอนุมูลอิสระรวม (Total Antioxidant Capacity)	14
2.8 ทฤษฎีสี	21
2.9 การย้อมด้วยสีธรรมชาติ	25
2.10 ทฤษฎีการย้อมสีทั่วไป	26

2.11 ระดับการย้อมสี 29

2.12 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 30

บทที่ 3 สารเคมี อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง 34

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี 34

3.2 วิธีการทดลอง 35

3.2.1 การเตรียมพืชตัวอย่างสำหรับทำการสกัด 35

3.2.2 วิธีการสกัดพืชตัวอย่าง 35

3.2.3 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH method 36

3.2.4 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี

Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP) 37

3.2.5 การวิเคราะห์หาปริมาณ Total polyphenol 38

3.2.6 การทดสอบการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย 39

3.2.7 การย้อมสีไหม 40

บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล 41

4.1 บทนำ 41

4.2 น้ำหนักของสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ 41

4.3 ผลของการศึกษาหาความยาวคลื่นที่สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุด 42

4.4 ผลการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแต่ละชนิด 42

4.5 ผลการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP 47

4.6 การวิเคราะห์ปริมาณของ Polyphenolic Content 50

4.7 Antibacterial Activities 51

4.8 ผลการย้อมผ้าไหมของผักเม็ก 53

บทที่ 5 สรุป วิจารณ์ผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 56

5.1 บทนำ 56

5.2 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 56

5.3 ข้อเสนอแนะ 57

เอกสารอ้างอิง 59

สารบัญตาราง

เรื่อง	หน้า
2.1 แสดงวิธีการทดสอบ Biochemical test ในการวินิจฉัยแยกเชื้อในกลุ่ม *Enterobacter*	9
2.2 แสดงชนิดของอนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง	11
2.3 แสดงวิธีวิเคราะห์การหาความสามารถการต้านอนุมูลอิสระ	16
3.1 แสดงการเจือจางสารละลายในการทำกราฟมาตรฐาน	38
4.1 แสดงน้ำหนักสารสกัดที่ได้จากการสกัดโดยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ	41
4.2 แสดงผลของการศึกษาหาความยาวคลื่นของสารสกัด	42
4.3 ผลการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผักเม็กแต่ละตัวทำละลายด้วยเทคนิค DPPH	43
4.4 แสดงค่า IC_{50} ของสารตัวอย่างในการต้านอนุมูลอิสระ	46
4.5 แสดงค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ของสารมาตรฐาน Fe^{2+} ที่ความยาวคลื่น 593 nm	48
4.6 แสดงปริมาณของ Fe^{2+} ที่ได้จากการรีดิวซ์ Fe^{3+} โดยสารตัวอย่างในการวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP	49
4.7 แสดงปริมาณ phenolic content	50
4.8 แสดงความสามารถของการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบผักเม็ก	51
4.9 ผลการย้อมแบบโดยตรง	53

4.10 ผลการย้อมแบบมอร์แดนท์ 53

สารบัญรูป

เรื่อง	หน้า
2.1 แสดงกลไกการทำงานของอนุมูลอิสระ	12
2.2 แสดงโครงสร้างของวิตามินอี	13
2.3 แสดงโครงสร้างของวิตามีนซี	13
2.4 แสดงลักษณะโครงสร้างของวิตามินเอ	14
2.5 แสดงโครงสร้างของอนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์	14
2.6 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาในการรีดิวซ์ Fe(III) ให้เป็น Fe(II)	18
2.7 แสดงกลไกการต้านอนุมูล DPPH	20
4.1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % Radical Scaving กับความเข้มข้นของ Crude Hexane ของผักเม็ก	44
4.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % Radical Scaving กับความเข้มข้นของ Crude Dichloromethane	44
4.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % Radical Scaving กับความเข้มข้นของ Crude Ethyl acetate	45
4.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % Radical Scaving กับความเข้มข้นของ Crude Ethanol	45
4.5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % Radical Scaving กับความเข้มข้นของ Crude Methanol	46
4.6 แสดงการเปรียบเทียบค่า IC_{50} (Inhibitory Concentration 50%) ของสารตัวอย่างกับอนุมูลอิสระมาตรฐาน	47

4.7 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP 48

4.8 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ ปริมาณของ phenolic content 50

4.9 การต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย 52

4.10 การย้อมแบบโดยตรง 53

4.11 การย้อมแบบมอร์แดนท์ 54

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ปัจจุบันหลายประเทศในโลกได้ค้นพบองค์ความรู้ใหม่และนำมาสร้างเทคโนโลยีใหม่ที่ทันสมัย เพื่ออำนวยความสะดวกของประชาชนแต่ละประเทศ ไม่ว่าเป็นด้านการติดต่อสื่อสาร การคมนาคม การเกษตร การศึกษา และการรักษาโรคทางการแพทย์ แต่ในขณะเดียวกันโรคภัยไข้เจ็บก็เกิดขึ้นมาทำร้ายคน และสัตว์อยู่เรื่อยๆ เช่นโรคมะเร็งในปีที่ 2549 มีผู้ป่วยโรคมะเร็งจำนวน 2,219 ราย (Hospital-Based Cancer Registry,2549) โรคไข้หวัดนก โรคเอดส์ โรคซาร์ นอกจากนี้แล้วก็ยังมีโรคอีกมากมายที่เนื่องมาจากสารอนุมูลอิสระ เช่นโรคที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อม ความบกพร่องของเซลล์ประสาท ระบบสื่อประสาทในสมอง และสภาวะขาดเลือดของอวัยวะที่สำคัญต่อการดำรงชีวิต เช่น หัวใจและสมอง ที่สำคัญอนุมูลอิสระมาทำร้ายสารชีวโมเลกุลที่สำคัญในร่างกายที่ไวต่อการถูกออกซิไดซ์ ทำให้คุณสมบัติและการทำงานเปลี่ยนไปเกิดการบกพร่อง หรือถูกทำลาย อันเป็นต้นเหตุของการเกิดโรคชนิดต่างๆนี้ (โอภา วัชระคุปต์, 2549) ในขณะเดียวกันพวกแบคทีเรียก็ได้สร้างความเดือดร้อนให้เกิดโรคอีกมากมาย เช่นโรคอุจจาระร่วง (Diarrheal diseases) โรคติดเชื้อของระบบทางเดินปัสสาวะ ไส้ติ่งอักเสบ เยื่อบุช่องท้องอักเสบ แผลติดเชื้อ โลหิตติดเชื้อ ซึ่งเนื่องมาจากแบคทีเรียกลุ่ม *E.coli* (วิไลลักษณ์ ศรีสุระ) ทำให้สร้างความเสียหายอย่างมากทั้งด้านสังคม ด้านเศรษฐกิจและด้านสุขภาพอนามัย เป็นสาเหตุจูงใจให้นักวิทยาศาสตร์ทุกด้านพยายามศึกษาค้นคว้าหาความรู้หรือแก้ปัญหานี้อย่างเคร่งครัด เช่นในปี 2550 ได้มีการค้นพบสารสกัดที่มีความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH จากเปลือกต้นวงศ์อบเชยมีค่า EC_{50} สูงกว่า BHT ซึ่งเป็นสารแอนติออกซิแดนต์ที่ยอมรับกันและเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน (Pannee Denrungruang, 2550)

ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงให้ความสนใจในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากผักเม็ก (*Kanchanaburi gratum* (Wight) S.W. Mitra, var, gratum) ที่ชาวบ้านได้นำยอดอ่อนมาใช้ในการรักษาอาการ ท้องอืด ท้องเฟ้อ แน่น จุกเสียดในท้อง (www.google.com, 2552) โดยการนำผักเม็กมาทำการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ แล้วทำการทดสอบความสามารถการต้านอนุมูลอิสระ ทดสอบการฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคบางชนิด ตลอดจนทดลองศึกษาสมบัติการติดสีที่สกัดได้จากผักเม็กของไหม

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 ทำการสกัดสารจากใบผักเม็กโดยการแช่กับตัวทำละลายชนิดต่างๆ

1.2.2 ศึกษาความสามารถการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบผักเม็กที่สกัดจากตัวทำละลายต่างๆโดยวิธี DPPH method และ FRAP method

1.2.3 ศึกษาความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดต่างๆ

1.2.4 เพื่อศึกษาการติดสีของผ้าไหม

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 ทำการสกัดใบผักเม็กโดยใช้ตัวทำละลาย Hexane, Dichloromethane, Ethyl acetate, Ethanol และ Methanol

1.3.2 ทดสอบความสามารถการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) โดยวิธี DPPH method, FRAP method

1.3.3 ทดสอบการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Klebsiella spp., Enterobacter spp., Citrobacter spp.* และ *E.coli*

1.3.4 ทดสอบการติดสีย้อมของผ้าไหม

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้สารสกัดที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

1.4.2 จะได้สารสกัดที่มีความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคบางชนิด

1.4.3 ได้ทราบสมบัติการย้อมติดสีของผ้าไหม

1.4.4 เป็นความรู้พื้นฐานให้กับการวิจัยทางผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ และวงการแพทย์แผนไทยต่อไป

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 บทนำ

ในบทนี้คณะผู้วิจัยได้ให้รายละเอียดในสิ่งต่างๆ ดังต่อไปนี้

2.1.1 พืชสมุนไพรและความสำคัญของยาจากพืชสมุนไพร

2.1.2 เชื้อแบคทีเรีย

2.1.3 อนุมูลอิสระ (Free Radical)

2.1.4 ชนิดและการเรียกชื่ออนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง

2.1.5 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

2.1.6 การศึกษาความสามารถการต้านอนุมูลอิสระรวม (Total Antioxidant Capacity, TAC)

2.1.8 ทฤษฎีสี

2.1.9 การย้อมด้วยสีธรรมชาติ

2.1.10 ทฤษฎีการย้อมสีทั่วไป

2.1.11 ระดับการย้อมสี

2.1.12 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.2 พืชสมุนไพร

สมุนไพรเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่มีประวัติควบคู่กับชีวิตของมวลมนุษย์มายาวนาน โดยใช้สมุนไพรในการบำบัดรักษาโรคมาแต่โบราณกาลด้วยการลองผิดลองถูก หากพืชสมุนไพรชนิดใดให้ประโยชน์ด้านการรักษาโรค ก็จะจดจำถ่ายทอดสืบต่อกันไปทำให้เกิดเป็นยากลางบ้าน (folklore medicine) ใช้กันในชุมชนเล็กๆ หรือเป็นยาแผนโบราณ (traditional medicine) ใช้กันในชุมชนใหญ่ๆ เมื่อพูดถึงสมุนไพรในความรู้สึกของคนทั่วๆ ไป มักจะนึกถึงเฉพาะยาที่ได้จากพืชเท่านั้น แต่จริงๆแล้วสมุนไพรหมายถึงยาจากพืช สัตว์ แร่ธาตุ และจุลินทรีย์ แต่ปัจจุบันยาที่ได้จากสัตว์และแร่ธาตุยังไม่เป็นที่

แพร่หลายในประเทศไทย เช่น ยาจากคางคก ซึ่งพบในต่อมใต้ตามีสีขาวจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำเมื่อทำให้แห้ง มีบิวฟาโทลิน (bufatolin) และ บิวโฟลิน (bufolin) เป็นสารสำคัญใช้เป็นยาบำรุงหัวใจ แก้ปวด แก้ไอ แก้คัน ฯลฯ ส่วนอื่นๆ ของสัตว์หรือสัตว์ทั้งตัวที่นำมาใช้เป็นยา ได้แก่ เขากวางอ่อน ดีงู ดีหมี ตุ๊กแก ไส้เดือน เป็นต้น สำหรับแร่ที่ใช้เป็นยาบ่อยๆ ได้แก่ เกลือแกง น้ำปูนใส เป็นต้น ในปัจจุบันสารสกัดจากสมุนไพรได้จากพืชเป็นส่วนใหญ่ และสารสกัดที่ยอมรับในเภสัชตำรับก็ล้วนแต่ได้มาจากพืช ส่วนสารที่ได้จากสัตว์และจุลินทรีย์ก็จะใช้เทคนิคจำเพาะที่แตกต่างออกไป

ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีป่าเขตร้อน (tropical forest) ที่มีความหลากหลายของทรัพยากรทางชีวภาพ (biological diversity resources) นั่นคือ มีความหลายหลายของพันธุ์พืชสมุนไพร พันธุ์สัตว์ และแร่ธาตุ จึงมีการใช้ยาสมุนไพรในการรักษาโรคภัยไข้เจ็บต่างๆ กันอย่างกว้างขวางในทุกครัวเรือนมาเป็นเวลาช้านาน เนื่องจากมีสมุนไพรเป็นจำนวนมากที่สามารถนำมาใช้รักษาโรคได้ และบางชนิดประชาชนก็มีความคุ้นเคยในการนำมารักษาโรคด้วยตัวเอง ความนิยมในการใช้สมุนไพรได้ลดน้อยลงอย่างมากในช่วงที่อุตสาหกรรมผลิตยาเคมีสังเคราะห์แผนปัจจุบันได้เจริญรุดหน้าอย่างรวดเร็ว จนกระทั่งประชาชนผู้บริโภคได้ตระหนักถึงอันตรายจากฤทธิ์ข้างเคียงและความเป็นพิษของยาเคมีสังเคราะห์กันมากขึ้น ทำให้สมุนไพรเป็นที่สนใจและมีความสำคัญยิ่งขึ้นอีกครั้งหนึ่ง

การพัฒนาพืชสมุนไพรเพื่อใช้เป็นยาจะเป็นกลวิธีหนึ่งที่ช่วยแก้ปัญหาเศรษฐกิจของประเทศได้ส่วนหนึ่ง กล่าวคือ เมื่อสมุนไพรบางชนิดได้รับการพัฒนาเป็นยาแล้ว ประชาชนนิยมใช้อย่างแพร่หลาย ก็จะทำให้สมุนไพรชนิดนั้นเป็นพืชเศรษฐกิจได้และสามารถลดการนำเข้าบางส่วน นอกจากนั้นการนำสมุนไพรมาใช้เป็นยายังสอดคล้องกับนโยบายของรัฐบาลในเรื่องการให้ประชาชนมีความสามารถในการพึ่งตนเองได้ในทางสาธารณสุขอีกด้วย

ความสำคัญของยาจากพืชสมุนไพร

ปัจจุบันทั่วโลกให้ความสนใจกับพืชสมุนไพรเป็นอย่างมากทั้งด้านอุตสาหกรรมยา อาหารและเครื่องสำอางเนื่องจากเริ่มประจักษ์ถึงอันตรายจากฤทธิ์ข้างเคียง และความเป็นพิษของสิ่งสังเคราะห์หรือยาแผนปัจจุบันกันมากขึ้น ประกอบกับการวิจัยค้นคว้ายาตัวใหม่ๆ จากพืชสมุนไพรต่างๆ เช่น อนุพันธ์อาเทมิซินิน (artemisinin derivatives) ได้แก่ อาทาซูเนต (artesunate) และอาเทมีเทอร์ (artemether) เป็นสารพวกแลกโทน (lactone) จากต้นซิงเฮา (*Arteisia annua L.*) ในวงศ์คอมโพสิเต (Compositae) ใช้เป็นยาต้านมาลาเรียที่ออกฤทธิ์รวดเร็วและมีความเป็นพิษต่ำ โดยออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อพลาสโมเดียม (*Plasmodium*) ในระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดได้มากกว่าร้อยละ 95 และจะหมดไปจากกระแสเลือดภายใน 24 ชั่วโมงหลังให้ยา หรือสารในกลุ่มไพรีทริน (pyrethrin) ที่สกัดได้จากดอกไพรีทรัม (*Pyrethrum*

cinerarifilium Trev.) ในวงศ์คอมโพซิเต ใช้เป็นยาฆ่าแมลงทั้งประเภทเคี้ยวและดูด รวมทั้งแมลงรบกวนภายในบ้าน เช่น มด ยุง แมลงวัน ไพรีทรินจะสลายตัวได้ง่าย ทำให้ไม่มีปัญหาการตกค้างเหมือนยาฆ่าแมลงแบบสังเคราะห์และมีความเป็นพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ส่วน plaunotol เป็นสารจำพวกไดเทอร์พีนแอลกอฮอล์ (diterpene alcohol) แยกได้จากใบเป้าน้อย (*Croton sublylatus* Kurz.) ในวงศ์ยูฟอร์เบียซีอี (Euphorbiaceae) ใช้รักษาแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้ มีฤทธิ์ข้างเคียงน้อยกว่ายาสังเคราะห์ที่มีอยู่ในปัจจุบัน เป็นต้น ทำให้สมุนไพรเป็นแหล่งสำคัญของสารประกอบเคมีจำนวนมหาศาลที่มีประโยชน์ทั้งทางการแพทย์และอุตสาหกรรม แม้ว่าปัจจุบันจะยังคงมีการสังเคราะห์สารเคมีขึ้นมาเพื่อใช้เป็นยาจำนวนมาก แต่ตัวยาสำคัญๆ หลายชนิดยังคงได้จากการสกัดจากพืชสมุนไพร เช่น จิงโกไลด์บี (Ginkgolide B.) เป็นสารจากใบแปะก๊วย (*Ginkgo biloba* L.) ในวงศ์จิงโกซีอี (Ginkgoceae) ซึ่งนิยมใช้กันมากในวงการแพทย์ทั่วโลก ช่วยป้องกันและรักษาความสมบูรณ์ของผนังเส้นเลือดฝอย ปรับระดับหมุนเวียนของเลือดและต่อต้านการอักเสบ การบวม จึงใช้ในผู้ป่วยที่เลือดไปเลี้ยงสมองไม่พอ ผนังเส้นเลือดแดงทำงานไม่ปกติ ป้องกันการเกิดอัมพาต ใช้กับโรคที่เกี่ยวกับความชรา เช่น วิงเวียน ปวดศีรษะ หูอื้อ และใช้ปรับอารมณ์ผู้สูงอายุ วงการแพทย์ปัจจุบันต้องอาศัยผลิตภัณฑ์ยาจากธรรมชาติ เพื่อเป็นแหล่งผลิตยาในการบำบัดรักษาโรคประมาณร้อยละ 40 ของตำรับยา รวมทั้งยาสามัญประจำบ้านล้วนมาจากธรรมชาติ นอกจากนี้สมุนไพรในรูปอาหารเสริมสุขภาพ (health foods) หรือยาชง (teas) ประเภทต่างๆ ที่มาจากธรรมชาติก็เป็นที่นิยมกันมากในตลาดทางเอเชียตะวันออก อเมริกา และยุโรป ปัจจุบันประเทศไทยมีการตื่นตัวในเรื่องอาหารเสริมสุขภาพเป็นอันมาก เช่น โสม (*Panax ginseng* C.A. Meyer) เชื่อว่าจะทำให้สุขภาพแข็งแรง กระชุ่มกระชวย มีกำลังวังชา และช่วยให้ร่างกายแข็งแรง มีกำลังวังชาและช่วยให้ร่างกายปรับตัวเขากับสภาวะต่างๆ ได้ดี หรือ เลซิทิน (lecithin) ซึ่งพบมากในถั่วเหลือง (*Glycine max* Merr.) และไข่แดง มีคุณสมบัติช่วยบำรุงผิวพรรณให้นุ่มนวลสดใส ปราศจากริ้วรอย ช่วยละลายไขมันในกระแสเลือด ป้องกันการรวมตัวของคอเลสเทอรอลเป็นก้อน ไม่เกิดเป็นตะกอนจับตัวแข็ง ป้องกันโรคหัวใจ นอกจากนี้สารสำคัญในเลซิทีน คือ ฟอสฟาติดิวโคลีน(phosphatidyl chloline) เมื่อเข้าสู่สมองจะเปลี่ยนเป็นอะเซทิลโคลีน (acetylcholine) ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาท การรับประทานเลซิทินซึ่งมีฟอสฟาติดิวโคลีนสูง จะมีผลให้อะเซทิลโคลีนเพิ่มขึ้น เป็นการส่งเสริมบทบาทการทำงานของสมองในด้านการเรียนรู้และความจำ มีการใช้เลซิทินในการบำบัดและป้องกันโรคความจำเสื่อมในผู้สูงอายุด้วย

นอกจากนี้การใช้องค์ประกอบทางเคมีที่มีอยู่ในพืชสมุนไพรเป็นต้นแบบ (model) ในการสังเคราะห์ยาด้วยกรรมวิธีทางเคมี เช่น ยาชาเฉพาะที่ (local anesthetic) มีสูตรพื้นฐานของโคเคน (cocaine) ซึ่งพบในใบโคคา (*Erythroxylum coca* Lamarck) วงศ์อีริโทซิลลาซีอี (Erythroxylaceae) เป็นต้น ยาแผนปัจจุบันส่วนหนึ่งได้จากการใช้เชื้อจุลินทรีย์เปลี่ยนแปลงสูตรเคมีของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติให้

กลายเป็นยา (partial synthesis) เช่น สเตียรอยด์ฮอร์โมน (steroid hormone) ที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง ในปัจจุบันจะใช้ไดออสจีนิน (diosgenin) จากพืชตระกูลไดออสโคเรีย (*Dioscorea* spp.) เป็นสารตั้งต้นผสมกับจุลินทรีย์ (microbial transformation) เพื่อทำการสังเคราะห์โปรเจสเตอโรน (progesterone) เพื่อใช้ในยาคุมกำเนิด

ปัจจุบันเครื่องสำอางส่วนใหญ่มีพืชสมุนไพรเป็นองค์ประกอบแทบทั้งสิ้น เช่น กรดแอลฟาไฮดรอกซี (α-Hydroxy acids, AHA) เป็นสารสกัดจากผลไม้นานาชนิด ซึ่งจะช่วยเร่งการหลุดลอกของเซลล์ชั้นบนสุดที่เสื่อมรวมทั้งรอยเหี่ยวย่นตื้นๆ พร้อมทั้งเสริมสร้างเซลล์ใหม่ให้เข้ามาแทนที่ จึงทำให้ผิวพรรณสดใสแลดูเนียน จึงนิยมใช้กันมากในผลิตภัณฑ์ชะลอความแก่ และเครื่องสำอางบำรุงผิว นอกจากนั้นยังมีการใช้กรดบีตาไฮดรอกซี (β-Hydroxy acids) ซึ่งละลายได้ดีในไขมันมากกว่ากรดแอลฟาไฮดรอกซีในเครื่องสำอาง นอกจากนี้สารอโลอีน (aloin) จากใบว่านหางจระเข้ (*Aloe vera* L.) สามารถดูดรังสีอัลตราไวโอเลตได้ร้อยละ 20-30 จึงนำมาผสมในครีมป้องกันแดด

2.3 เชื้อแบคทีเรีย

2.3.1 *E. coli*

ลักษณะการเจริญเติบโตและปฏิกิริยาทางชีวเคมี

E. coli เจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดธรรมดา เมื่อเลี้ยงบนอาหารชนิดที่แสดงความแตกต่างของเชื้อ เช่น MacConkey agar โคโลนีมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร และมีสีชมพูแดง เนื่องจากหมักย่อยแลคโตสได้ (lactose fermenter) กรดที่เกิดจากการหมักย่อยน้ำตาลจะทำให้สีของอินดิเกเตอร์ในอาหารเปลี่ยนไปจากเดิม เชื้อบางสายพันธุ์ไม่สามารถย่อยน้ำตาลแลคโตสได้ (non-lactose fermenter) ซึ่งให้ลักษณะโคโลนีที่ไม่มีสี บางสายพันธุ์ให้ผลการหมักช้าซึ่งอาจนานถึง 7 วัน (late lactose fermenter)

คุณลักษณะที่สำคัญของการวินิจฉัย *E. coli* ได้แก่ การทดสอบ IMViC ให้ผล ++ - - คือ Indole และ Metyl Red ให้ผลบวก ส่วน Voges Proskauer และ Citrate ให้ผลลบ ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้

คุณสมบัติของแอนติเจน

แอนติเจนของ *E. coli* มีหลายชนิดคือ

1. แอนติเจน O มี 162 ชนิด อยู่ในชั้นผนังเซลล์ ทนต่อความร้อนที่ 121 ^{0}C ได้ดี

2. แอนติเจน K มี 100 ชนิดซึ่งอาจเป็น L, A หรือ B แอนติเจนนี้เป็นส่วนหนึ่งของแคปซูลที่หุ้มตัวแบคทีเรียและคลุมแอนติเจน O ทำให้เชื้อไม่เกาะกลุ่มกันในแอนติซีรัม O ยกเว้นต่อเมื่อทำลายแอนติเจน K เสียก่อนโดยการต้มที่ 100 ^{0}C นาน 2.5 ชั่วโมง หรือ ที่ 121 ºC นาน 2 ชั่วโมง

3. แอนติเจน H มี 52 ชนิด เป็นส่วนของแฟลกเจลลาของแบคทีเรีย จะถูกทำลายเมื่อนำไปต้มที่ 100ºC

แอนติเจน O, K และ H มีคุณสมบัติทางกายภาพและภูมิคุ้มกันวิทยาต่างกัน และการแยก serotype ของเชื้อขึ้นอยู่กับชนิดของแอนติเจนเหล่านี้

การทำให้เกิดโรคและพยาธิสภาพ

E. coli มีอยู่ทั่วไปในดิน น้ำ และลำไส้ของคนและสัตว์โดยไม่ทำให้เกิดโรค มีบาง serotype ทำให้เกิดโรคในคน คือ

1. โรคอุจจาระร่วง (Diarrheal diseases) *E. coli* บาง serotype ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงพบมากในเด็กอายุต่ำกว่า 2 ขวบ (Infantile Diarrhea) และพบในผู้ใหญ่ที่เดินทางไปต่างถิ่น แล้วเกิดเป็นโรคอุจจาระร่วงที่เรียกว่า traveler diarrhea เชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคอุจจาระร่วงมี 3 กลุ่มคือ

1.1 กลุ่ม *Enterotoxigenic* แบคทีเรียมีสารพิษพวกเอกโซทอกซินซึ่งอาจเป็นชนิดที่ไม่ทนต่อความร้อน หรือชนิดที่ทนต่อความร้อน สารพิษชนิดที่ไม่ทนต่อความร้อนมีคุณสมบัติคล้ายเอนเทอโรทอกซินของ Vibrio cholerae โดยจะกระตุ้นเอนไซม์ adenyl cyclase ใน Epithelial cell ในลำไส้ทำให้เกิดมีอาการคลั่งของ cyclic adenosine monophosbphate (cAMP) ยังส่งผลให้มีการหลั่งของฟลูอิดเข้าไปในลูเมนของลำไส้ ส่วนกลไกการออกฤทธิ์ของสารพิษชนิดทนต่อความร้อนยังไม่ทราบแน่ชัด เชื้อที่สร้างสารพิษได้ ได้แก่ serotype 06 08025 027 078 0148 และ 0159 แต่การที่คนเกิดมีอุจจาระร่วงนั้นไม่ได้ขึ้นอยู่กับการมีเอนเทอโรทอกซินเท่านั้น ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆอีก รวมทั้งความสามารถของเชื้อโรคในการที่จะดำรงตัวเองอยู่ที่ Epithelial Cell ในลำไส้เล็ก การตรวจสอบ enterotoxigenic *E. coli* ทำได้หลายวิธีได้แก่ Rabbit ileal loop test และวิธี tissue culture assay เป็นต้น

1.2 กลุ่ม *Enteroinvasive*

แบคทีเรียจะทำลาย Epithelial cell ของลำไส้ทำให้ลำไส้เกิดเป็นแผล ผู้ป่วยมีอาการคล้ายกับโรคบิดที่เกิดจากเชื้อ Shigella ได้แก่ serotypes 028 0112 0115 01240136 0143 0144 0147 และ 0152 พวกนี้ใช้วิธี Sereny test

1.3 กลุ่ม *Enteropathogenic*

กลไกในการก่อให้เกิดโรคในคนยังไม่ทราบแน่ชัด เชื้อกลุ่มนี้ได้แก่ serotypes 026, 055, 086, 0111, 0114, 0119, 0125, 0126, 0127, 0128 และ 0142 ตรวจหาได้ทางวิธีซีโรโลยีดูการ

เกาะกลุ่มของเชื้อในแอนติเซรัมจำเพาะ serotype ที่ก่อให้เกิดโรคในคนอาจตรวจพบได้ในอุจจาระของคนปกติ ผู้ที่ป่วยเป็นโรคอาจมีอาการไข้หรือไม่มีอาการไข้ อุจจาระเป็นน้ำ ต่อมาอาจมีมูกปน ร่างกายอ่อนเพลียเพราะเสียน้ำ และอิเล็คโตรไลท์มาก อาจถึงกับช็อคและตายได้

2. โรคติดเชื้อของระบบทางเดินปัสสาวะ มักมีสาเหตุมาจากเชื้อที่อาศัยอยู่ในลำไส้ผู้ป่วย

3. โรคติดเชื้ออื่นๆ เช่น ไส้ติ่งอักเสบ เยื่อบุช่องท้องอักเสบ แผลติดเชื้อ โลหิตติดเชื้อ เป็นต้น

2.3.2. *Enterobacter*

เป็น gram negative bacilli ที่พบได้บ่อยที่สุดในสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย และส่วนใหญ่เป็น Normal flora ของทางเดินอาหาร และเจริญเติบโตได้ง่าย ทั้งในสภาวะที่มี หรือไม่มีออกซิเจน

ลักษณะทั่วไป

- เป็น Gram negative bacilli ที่ไม่สร้างสปอร์
- มีทั้งพวกที่สามารถเคลื่อนที่ได้ และไม่ได้ พวกที่เคลื่อนที่ได้ส่วนใหญ่จะใช้ Peritrichous flagella (flagella ที่อยู่รอบๆเซลล์ในการเคลื่อนที่)
- Ferment กลูโคสให้กรดและแก๊ส หรือให้กรดเพียงอย่างเดียว
- Reduce ไนเตรต ให้เป็น ไนไตรต์ได้
- Oxidase test ให้ผล Negative

ความสำคัญทางการแพทย์

แบคทีเรียใน family นี้ส่วนใหญ่อยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์โดยไม่ก่อให้เกิดโรคจึงเรียกว่า *entericbacteria* เชื้อบางตัวเป็นเชื้อก่อโรค เช่น *Shigella, Salmonella* และ *Yersinia pestis* บางตัวก็เป็น *Normalflora* ที่อาจเป็นเชื้อฉวยโอกาสได้ทำให้เกิดโรคได้ (opportunistic pathogent) เช่น *E.coli*, *Klebsiella pneumonia* และ *Proteus mirabilis*

การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Enrichment media เช่น blood agar และ Chocolate agar เชื้อ Enterobacteriaceae สามารถเจริญได้ดีมักจะให้โคโลนีขนาดใหญ่ บางชนิด เช่น *Klebseilla spp*. ให้โคโลนีมันเยิ้มเพราะ

สามารถสร้าง Capsule ได้ บางชนิดสามารถสลายเม็ดเลือดแดงบน blood agar ได้ ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้ไม่สามารถจำแนกแบคทีเรียใน family Enterobacteriaceae นี้ได้

2. Selective media การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือของกรดน้ำดีและสีอะนีลีน ซึ่งทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแกรม positive เช่น MacConkey agar สามารถช่วยแยกแบคทีเรียกลุ่มนี้ออกเป็น 2 กลุ่มได้แก่

2.1 Lactose fermenter แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถ ferment lactose ได้ทำให้เกิด lactic acid ซึ่งเปลี่ยนสีของ indicater ทำให้โคโลนีมีสีแดงหรือสีชมพู Lactose fermenter ได้แก่ *E.coli*, *Klebseilla* และ *Enterobacter* เป็นต้น

2.2 Non lactose fermenter แบคทีเรียกลุ่มนี้ให้โคโลนีที่ไม่มีสี ได้แก่ *Shigella, Salmonella, Edwardsiella* และ *Proteus*

นอกจากนั้นยังมีแบคทีเรียอีกกลุ่มหนึ่งที่สามารถ ferment lactose ได้แต่ช้า (delayed fermenter) คือภายใน 3-7 วัน ได้แก่ *Citrobacter* และ *Arizona*

Biochemical test

การวินิจฉัยแยกเชื้อในกลุ่มนี้อาศัยการทดสอบ Biochemical test ที่สำคัญดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงวิธีการทดสอบ Biochemical test ในการวินิจฉัยแยกเชื้อในกลุ่ม *Enterobacter*

TSI	**Oxidase test**
Indole production	Citrate utilization
Motile	Urease test
Lysine deaminase	Lysine decarboxylase
Ornitine decarboxylase	Methyl red
Voges	Proskauer

ในห้องปฏิบัติการบางแห่งอาจไม่จำเป็นต้องรายงานผล identification เชื้อบางตัวใน family นี้ถึงระดับ species อาจจะใช้ biochemical test ที่สำคัญ ๆ เช่น TSI, Oxidase test, Indole production,

Citrate utilization, Motile, Urease test, Lysine deaminase และ Lysine- decarboxylase ก็สามารถวินิจฉัยแยกเชื้อได้

2.4 อนุมูลอิสระ (Free Radical)

อนุมูลอิสระ เป็นอะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวอยู่ในออร์บิทัลวงนอกสุดที่มีระดับพลังงานสูง คำจำกัดความนี้หมายรวมถึงอะตอมของไฮโดรเจนและอิออนของโลหะทรานซิชันส่วนใหญ่ นอกจากนี้ยังร่วมถึงโมเลกุลของออกซิเจนซึ่งนับว่าเป็นอนุมูลเพราะมีอิเล็กตรอนจำนวน 2 อิเล็กตรอน แต่ละอิเล็กตรอนแยกกันอยู่เป็นอิเล็กตรอนเดี่ยวในแต่ละออร์บิทัล ทั้งนี้การสปินหรือการหมุนรอบตัวของอิเล็กตรอนทั้งสองจะสปินแบบคู่ขนานในทิศทางเดียวกัน อนุมูลอิสระทั้งที่อยู่ในสภาวะเป็นกลางทางไฟฟ้า และอนุมูลอยู่ในสภาวะที่มีประจุไฟฟ้า โดยมีทั้งประจุบวกและประจุลบ สัญลักษณ์เคมีของอนุมูลอิสระ คืออิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระแสดงด้วยจุดในตำแหน่งข้างบนของสัญลักษณ์เคมี เช่น อนุมูล $A^{\cdot}$ โดยเฉพาะอนุมูลอิสระที่มีน้ำหนักโลเลกุลต่ำ จะไวต่อการเกิดปฏิกิริยามากกว่าอนุมูอิสระที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เนื่องจากอิเล็กตรอนเดี่ยวไม่เสถียรและพยายามจับคู่กับอิเล็กตรอนเดี่ยวอื่น ดั้งนั้นอนุมูลอิสระจึงมีสมบัติเฉพาะ คือมีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยาต่อโมเลกุลอื่นๆ อย่างไรก็ตามยังมีอนุมูลอิสระบางชนิดที่มีความเสถียร ไม่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา สามารถอยู่ในสภาพอนุมูลอิสระได้นาน อนุมูลอิสระที่มีความเสถียรมีน้อยชนิดมาก เช่น อนุมูลอิสระที่มีความสำคัญในทางชีวภาพ ได้แก่ อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ($O_2^{\cdot -}$) อนุมูลไฮโดรอกซี ($HO^{\cdot}$) อนุมูลอัลคอกซี ($RO^{\cdot}$) และอนุมูลซุปเปอร์ไฮดรอกซี ($HO^{\cdot}_2$) อนุมูลอิสระเหล่านี้จัดเป็นอนุมูลอิสระที่มีความไวในการเกิดปฏิกิริยาสูงมาก และขณะที่ไนตริกออกไซด์ (NO) หรือ อนุมูลไนตริกออกไซด์ ($ON^{\cdot}$) อนุมูลวิตามินอี และอนุมูลวิตามินซีมีความไวรองลงมา การเกิดอนุมูลอิสระมีหลายกลไกที่แตกต่างกันดังนี้

ก. การแตกพันธะโควาเลนท์แบบโฮโมไลซิส

$$A : B \longrightarrow A^{\cdot} + B^{\cdot}$$

ข. การเพิ่มอิเลคตรอนหนึ่งตัวให้แก่อะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า

$$A + e^- \longrightarrow A^{-\cdot}$$

ค. การสูญเสียอิเลคตรอนหนึ่งตัวจากอะตอมที่เป็นกลาง

$$A \longrightarrow A^{+\cdot} + e^-$$

2.5 ชนิดและการเรียกชื่ออนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง

อนุมูลอิสระ หรืออนุมูล เป็นศัพท์ที่ใช้คู่กัน เหตุที่มีการตัดคำว่า **อิสระ** ออกเนื่องจากคุณสมบัติที่ไวต่อปฏิกิริยาทำให้อนุมูลไม่คงตัวอยู่ในสภาพอิสระได้ ส่วนการที่ยังใช้คำว่าอิสระเนื่องจากต้องการเน้นถึงเหตุของความไวต่อปฏิกิริยา ซึ่งผลมาจากสภาวะความเป็นอิเล็กตรอนเดี่ยวเป็นอิสระไม่มีคู่ นอกจากนี้การวิจัยพบว่ามีสารหลายชนิดที่ไม่อยู่ในสภาพอนุมูลแต่มีความเกี่ยวข้องกับอนุมูล และมีความไวต่อปฏิกิริยาสูงดังแสดงในตารางที่ 2.1 สารเหล่านี้มีทั้งสารที่ให้กำเนิดสารอนุมูลอิสระ เนื่องจากมีความคงตัวต่ำและสลายตัวได้ง่าย เช่น โอโซน หรือเป็นสารที่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นเกิดเป็นอนุมูล เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ รวมถึงสารที่เป็นผลผลิตของอนุมูลที่อันตรายสูง ได้แก่ เปอร์ออกซีไนไตรท์ ซึ่งเรียกโดยรวมว่าสารไวต่อปฏิกิริยา (reactive species, RS)

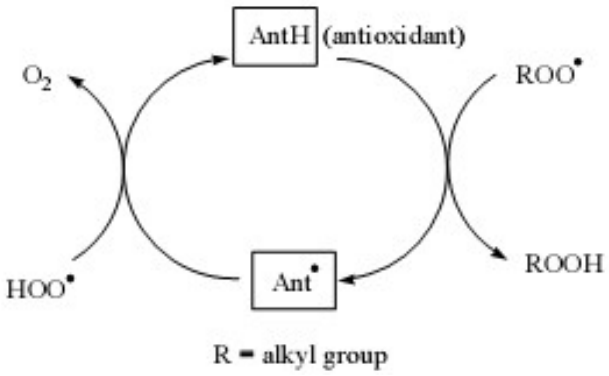
อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้องทางชีววิทยา สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (Reactive oxygen species, ROS) กลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (Reactive nitrogen species, RNS) และกลุ่มที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (Reactive chlorine species, RCS) สารบางชนิดสามารถจัดอยู่ได้ 2 กลุ่ม เช่น เปอร์ออกซีไนไตรท์

ตารางที่ 2.2 แสดงชนิดของอนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง

อนุมูลอิสระ	สารที่เกี่ยวข้อง
Reactive Oxygen Species (ROS)	
- Superoxide anion, $O_2^{\bullet-}$	H_2O_2, Ozone O_3
- Hydroxyl, $HO^{\bullet}$	Hydrobromous acid, HOBr
- Hydroperoxyl, $HO_2^{\bullet}$	Hypochlorous acid, HOCl
- Peroxyl, $RO_2^{\bullet}$	Signlet oxygen
- Alkoxyl, $RO^{\bullet}$	Organic peroxides
- Carbonate, $CO_3^{\bullet-}$	Peroxynitrite, $ONOO^-$
- Carbon dioxide	Peroxylnitrous acid, ONOOH
Reactive nitrogen species (RNS)	
- Nitric oxide, $NO^{\bullet}$	
- Nitrogen Dioxide, $NO_2^{\bullet}$, $NO_2^{\bullet-}$	
Reactive chlorine species (RCS)	
- Aromatic chlorine, Cl	

2.6 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

การต้านอนุมูลอิสระที่เป็นอันตรายต่อร่างกายของคนเราเหล่านี้สามารถกำจัดไปได้ด้วยสารบางชนิดที่เรียกว่า **สารต้านอนุมูลอิสระ** (Antioxidant) โดยสารต้านอนุมูลอิสระไปจับกับอนุมูลอิสระที่เป็นตัวปัญหา แล้วเกิดอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่เสถียรกว่า ส่งผลให้หยุดวงจรการเกิดอนุมูลอิสระตัวใหม่ๆขึ้นมาอีกเพราะมันจะรวมกันเองกลายเป็นโมเลกุลที่เสถียร แสดงวงจรการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระดังภาพที่ 2.1



รูปที่ 2.1 แสดงกลไกการทำงานของอนุมูลอิสระ

สามารถเขียนสมการแสดงการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระได้ดังนี้

$$HOO^{\bullet} + AntH \longrightarrow HOOH + Ant^{\bullet}$$

$$O_2^{\bullet -} + AntH \longrightarrow HOO^{-} + Anti^{\bullet}$$

$$ROO^{\bullet} + AntiH \longrightarrow ROOH + Anti^{\bullet}$$

$$O_2^{\bullet -} + AntH \longrightarrow HOO^{\bullet} + Ant^{\bullet}$$

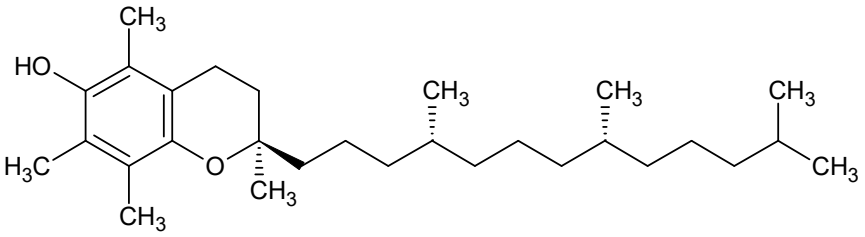
ร่างกายคนมีกลไกการกำจัดอนุมูลอิสระได้ 2 วิธี

1. เอนไซม์ (enzyme) ต่างๆในร่างกาย เช่น Superoxide dismultase (SOD), Superoxide reductase (SORs), Catalase (CatFe(II)H_2O_2 complex และ CatFe(III)H_2O_2 complex), Thioredoxin reductase (Trx), Glutathione peroxidase เป็นต้น โดยเอนไซม์เหล่านี้จะไปจับกับอนุมูลอิสระ เช่น Superoxide หรือ Nitric oxide เป็นการตัดวงจรการสร้างอนุมูลอิสระในร่างกายได้ อย่างไรก็ตามเอนไซม์

ต่างๆที่มีอยู่ในร่างกายนั้นมีปริมาณจำกัด ฉะนั้นจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องอาศัยสารต้านอนุมูลอิสระจากแหล่งภายนอกร่างกายเพื่อรักษาระบบสมดุลต่างๆในร่างกายให้ดำเนินต่อไปได้อย่างปกติ

2. อาหารหรือยาที่รับประทานเข้าไป เราสามารถที่จะเลือกรับประทานอาหารหรือยาที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น

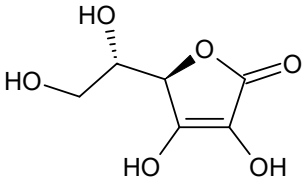
a. วิตามินอี (Vitamin E) เป็นสารที่ละลายได้ดีในน้ำมันจึงพบมากในน้ำมันพืชต่างๆ



Vitamin E (α-Tocopherol)

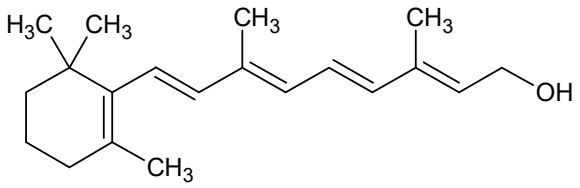
รูปที่ 2.2 แสดงโครงสร้างของวิตามินอี

b. วิตามินซี (Vitamin C) มีมากในพืช ผักสีเขียวและผลไม้รสเปรี้ยว เช่น ตำลึง ผักบุ้ง พริกหยวก ส้ม มะนาว สับปะรด



รูปที่ 2.3 แสดงโครงสร้างของวิตามีนซี

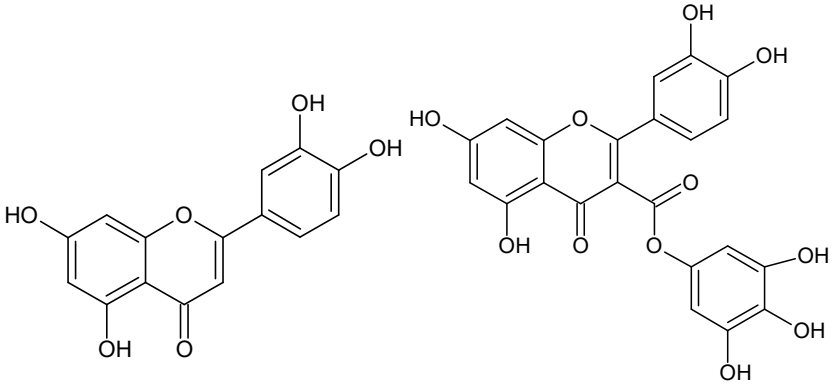
c. เบตาคาโรทีน (β-Carotene) รวมทั้งวิตามินเอ (ระบบการทำงานของร่างกายสามารถเปลี่ยน β-Carotene เป็น Vitamin A) มีมากในผักผลไม้ที่มีสีเหลืองส้ม เช่น มะละกอสุก มะม่วงสุก มะเขือเทศ ฟักทอง แครอท และผักใบเขียว เช่น ตำลึง ผักบุ้ง บรอคเคอรี



Vitamin A

รูปที่ 2.4 แสดงลักษณะโครงสร้างของวิตามินเอ

d. อนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์ (Flovonoid derivatives) พบมาในพืชจำพวกชา กาแฟ โดยเฉพาะในชาเขียว และเมล็ดกาแฟสด



Luteolin (-)-Epigallocatechin-3-gallate

รูปที่ 2.5 แสดงโครงสร้างของอนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์

2.7 การศึกษาความสามารถการต้านอนุมูลอิสระรวม

(**Total Antioxidant Capacity, TAC**)

เนื่องจากร่างกายและเซลล์มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นได้หลายชนิด จึงมีระบบควบคุมป้องกันไม่ให้มีอนุมูลอิสระที่เกินสมดุลที่ทำให้เกิดอันตราย ระบบควบคุมป้องกันประกอบด้วย

ก) สารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งมีทั้งโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น อัลบูมิน เฟอร์ริติน และโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น วิตามีนซี และยูริก เป็นต้น

ข) เอนไซม์ขจัดอนุมูลอิสระมีหลายชนิดด้วยกัน

การใช้ดัชนีจากการหาความสามารถการต้านอนุมูลอิสระเดี่ยวๆ หรือวัดปริมาณการเกิดสารชีวโมเลกุลที่ถูกสารอนุมูลอิสระทำให้เสียหายเป็นดัชนีวัดสภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุลว่ามีมากน้อยเพียงใดนั้น อาจไม่เป็นค่าที่สะท้อนถึงภาพรวมของภาวะออกซิเดชันของร่างกายหรือสารตัวอย่าง ดังนั้นจึงมีการหาความสามารถรวมในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นการรวมองค์ประกอบทั้งหมดของสภาวะรีดักอกซ์ และใช้เป็นดัชนีชี้วัดสภาวะออกซิเดชันของรางกายโดยตรงด้วยการตรวจวัดจากเลือด พลาสมาและของเหลวที่ได้จากร่างกาย ในการวิเคราะห์มีหลักการสำคัญ 2 วิธีการคือ

1. การวิเคราะห์จากการส่งผ่านอะตอมไฮโดรเจน (hydrogen atom transfer, HAT) เช่น วิธี ORAC และวิธี TRAP
2. การวิเคราะห์จากการส่งผ่านอิเล็กตรอนเดี่ยว (electron transfer, ET หรือ SET) เช่นวิธี FRAP และวิธี TEAC เป็นต้น

วิธีวิเคราะห์โดยใช้หลักการ HAT จะวัดความสามารถการต้านอนุมูลอิสระในเลือดหรือพลาสมาในการขจัดอนุมูลอิสระโดยการให้อะตอมไฮโดรเจน

$$X^{\bullet} + AH \longrightarrow X^{-} + AH^{\bullet +}$$

วิธีนี้จะหาพลังงานที่ทำให้พันธะของอะตอมไฮโดรเจนแตกออก (Bond dissociation energy, BSE) สารที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจะมีค่า △BDE ประมาตร -10 กิโลแคลอรี/โมล และมีค่าความต่างศักย์ของการแตกตัว (ionization potential, △IP) ต่ำกว่า – 36 กิโลแคลอรี/โมล ในการหาดัชนี TAC เป็นการวัดความสามารถในการแข่งขันกันในเชิงจลนศาสตร์ ปฏิกิริยา HAT จะไม่ขึ้นกับตัวทำละลายและค่า pH แต่หากมีสารรีดิวซ์หรือโลหะอยู่ด้วยจะทำให้การวิเคราะห์ด้วยวิธี HAT ซับซ้อนและส่งผลให้ค่าจากการวิเคราะห์สูงกว่าความเป็นจริง

ในการวิเคราะห์โดยใช้หลักการ SET หรือ ET เป็นการหาความสามารถในการส่งผ่านอิเล็กตรอนไปรีดิวซ์สารอื่น ได้แก่ โลหะและอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระจะขจัดอนุมูลโดยกลไก HAT และ SET ซึ่งให้ผลผลิตที่เหมือนกันในขั้นสุดท้าย แม้ว่าจะมีกลไกทางจลนศาสตร์และเกิดสารข้างเคียงที่แตกต่างกัน เมื่อรวมสมการที่ (1)-(3) ในกลไก SET จะให้ผลเช่นเดียวกันกับสมการของกลไก HAT ดังแสดง

$$X^{\bullet} + AH \longrightarrow X^{-} + AH^{\bullet +} \qquad (1)$$

$$AH^{\bullet +} \xrightarrow{H_2O} A^{\bullet} + H_3O^{+} \qquad (2)$$

$$X^{-} + H_3O^{+} \longrightarrow XH + H_2O \qquad (3)$$

$$M(III) + AH \longrightarrow AH^{+} + M(II) \quad (4)$$

ในการวิเคราะห์จะเกิดกลไกทั้งสองคือ HAT และ ET ควบคู่กันไปเสมอ วิธี SET จะเปรียบเทียบความสามารถในการทำให้โปรตอนหลุดออกจากโมเลกุล และการแตกออกเป็นไอออน ปฏิกิริยา SET จะลดลงเมื่อค่า pH เพิ่มขึ้น แสดงถึงความสามารถที่จะให้อิเล็กตรอนในการที่โปรตอนหลุดออก สารต้านออกซิเดชันที่เกิดกลไก SET จะมีค่า $\triangle$IP มากกว่า -45 กิโลแคลอรี/โมล ปฏิกิริยา ET จะช้าและใช้เวลานานกว่าปฏิกิริยาจะสิ้นสุด ดังนั้นการคำนวณค่า TAC จะหาปริมาณของสารที่เกิดขึ้นเมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไปว่าจะมีปริมาณลดลงร้อยละเท่าใด หากมากกว่าจะคำนวณหาค่าทางจลนศาสตร์ วิธี SET ซึ่งจะไวต่ออวิตามินซีและกรดยูริก สารปนเปื้อนและโลหะจะรบกวนวิธี SET ทำให้การวิเคราะห์มีความแปรปรวนสูง ตารางที่ 2.2 แสดงวิธีต่างๆที่ใช้ในการวิเคราะห์ความสามารถรวมของการต้านอนุมูลอิสระ วิธีวิเคราะห์แบบนี้แบ่งเป็นการวัดโดยตรงและวัดโดยอ้อม

ตารางที่ 2.3 แสดงวิธีวิเคราะห์การหาความสามารถการต้านอนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ	**วิธีการวิเคราะห์**
Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)	วิธีวัดโดยอ้อม HAT
Photochemiluminescence assay	วิธีวัดโดยอ้อม HAT
TEAC I ($ABTS^{\cdot+}$/ metmyoglobin)	วิธีวัดโดยอ้อม SET
TEAC II ($ABTS^{\cdot+}$ with manganese dioxide Mn_2O)	วิธีวัดโดยอ้อม SET
TEAC III ($ABTS^{\cdot+}$ with potassium persulfate)	วิธีวัดโดยอ้อม SET
Diphenyl-1-picrylhydrazly assay (DPPH)	วิธีวัดโดยอ้อม SET
Total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP)	วิธีวัดโดยอ้อม HAT
The ferric reducing ability of plasma assay (FRAP)	วิธีวัดโดยอ้อม SET

วิธีวิเคราะห์หาค่า TAC โดยอ้อม เป็นการวัดความสามารถในการยับยั้งหรือการขจัดอนุมูลอิสระที่ทำให้เกิดขึ้น ถือว่าเป็นวิธีวิเคราะห์โดยอ้อม ได้แก่วิธี TRAP, ORAC และวิธี TEAC เริ่มด้วยการทำให้อนุมูลอิสระเกิดขึ้น และน้ำเลือด หรือพลาสมาเติมลงไป จากนั้นจึงวัดความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ

วิธี TRAP วิธีนี้จะใช้สารประกอบเอโซ ABTS, ABTP หรือ AAPH, 2,2-azobis (2-amidopropane) ซึ่งสลายตัวให้อนุมูลเปอร์ออกซี ซึ่งหาปริมาณได้จากการที่อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นไปทำ

ปฏิกิริยาออซิเดชันกับสาร ABTS เกิดอนุมูลที่มีสี $ABTS^{\bullet+}$ มีค่า λ_{max} ที่ 660, 734 และ 820 ซึ่งการวัดค่า TAC ทำโดยดูความสามารถของเลือด หรือ พลาสมา ในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อนำเลือดไปผสมจะทำให้เกิดสีของ $ABTS^{\bullet+}$ ช้าลงหรือน้อยลง ทำให้มีสีจางลงซึ่งสามารถวัดปริมาณได้ การวิเคราะห์ทำได้ทั้งการวัดระยะเวลาที่ทำให้เกิดสีของ $ABTS^{\bullet+}$ หลังการเติมเลือดหรือพลาสมา หรือวัดปริมาณของ $ABTS^{\bullet+}$ ที่เกิดขึ้นจากค่าการดูดกลืนแสงในเวลาที่กำหนด วิธีการวัดโดยการกำหนดเวลา ถึงแม้ว่าจะสะดวกและได้ค่าถูกต้องแม่นยำดีแต่เนื่องจากมีปัจจัยอื่นๆ เช่น ระยะเวลาที่ใช้ให้เกิดสี และอัตราการเกิดออกซิเดชัน เข้ามามีบทบาททำให้การแปลผลซับซ้อน ดังนั้นจึงมีการพัฒนาวิธีโดยการวัดพื้นที่ใต้เส้นกราฟ (AUC) ซึ่งจะให้ค่าที่ถูกต้องแต่ยุ่งยากไม่สะดวกและต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์ วิธี TRAP มีการพัฒนาต่อมาโดยการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทำปฏิกิริยากระตุ้นเมทไมโอโกลบินเกิดอนุมูลเฟอร์ริลไมโอโกลบิน ทำปฏิกิริยากับ ABTS เกิดเป็นอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ ที่มีสี ดังนั้นเมื่อเติมเลือดหรือสารที่ต้องการวิเคราะห์ลงไปในสารผสมที่ใช้ทดสอบ เลือดหรือสารที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจะยับยั้งปฏิกิริยาทำให้มีสีจางลง วิธีนี้อาจวัดค่าการดูดกลืนแสงของ $ABTS^{\bullet+}$ ที่ λ_{max} = 734 nm วัดในเวลาที่กำหนดในจุดเดียว หรือวัดอัตราความเร็วในการเกิด $ABTS^{\bullet+}$ โดยบันทึกค่าการดูกลืนแสงหลังจากเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หรือระบุเวลาที่ใช้ก่อนเกิดปฏิกิริยา (lag time) หรือค่าระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโทรร็อก

วิธี ORAC เป็นการวิเคราะห์โดยอ้อมอีกวิธีหนึ่งที่วัดความสามารถของสารทดสอบหรือเลือดในการยับยั้งอนุมูลเปอร์ออกซีไม่ให้ทำปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ด้วยกลไก HAT การวิเคราะห์จะวัดแสงฟลูออเรสเซนส์ โดยอนุมูลเปอร์ออกซีจะทำปฏิกิริยาเปลี่ยนสารที่ให้แสงฟลูออเรสเซนส์เป็นสารที่ไม่ให้แสงฟลูออเรสเซนส์ ดังนั้นเมื่อเติมเลือดหรือสารต้านอนุมูลอิสระลงไปจะขจัดอนุมูลเปอร์ออกซีซึ่งทำให้มีแสงฟลูออเรสเซนส์เพิ่มขึ้นตามปริมาณและความแรงของสารที่ทดสอบที่เติมลงไป

วิธีนี้จะใช้ b-phycoerythrin(b-PE) แทน $ABTS^{\bullet+}$ โดย β-PE มีคุณสมบัติให้แสงฟลูออเรสเซนส์ที่ 565 nm เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงหรือรังสีที่มีความยาวคลื่นเท่ากับ 540 nm β-PE จะถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระทำให้คุณสมบัติในการให้แสงฟลูออเรสเซนส์เสียไป ดังนั้นเมื่อผสมสารแอโซ AAPH ซึ่งสลายตัวให้อนุมูลเปอร์ออกซี ($ROO^{\bullet}$) จะทำให้เกิดแสงฟลูออเรสเซนส์ของ β-PE ลดลงดังสมการ 2 ดังนั้นการเติมซีรั่มหรือสารต้านอนุมูลอิสระลงไปในสารละลายทดสอบจะยับยั้งการสูญเสียแสงฟลูออเรสเซนส์ของ β-PE ดังสมการที่ 3 และ 4

$$R\text{-}N{=}N\text{-}R \longrightarrow N_2 + 2ROO^{\bullet} \qquad (1)$$

$$ROO^{\bullet} + \beta\text{-}PE \longrightarrow ROOH + \text{oxidized-}\beta\text{-}PE \qquad (2)$$

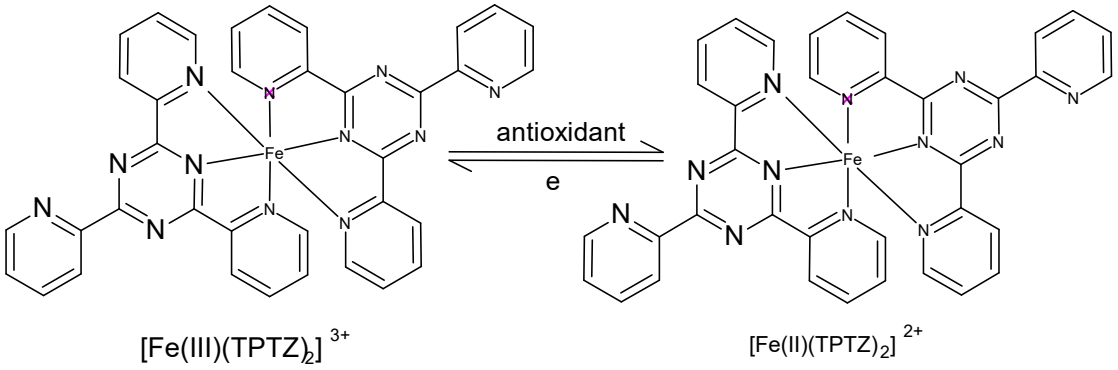
$$ROO^{\bullet} + antioxidant \longrightarrow ROOH + A^{\bullet} \quad (3)$$

$$ROO^{\bullet} + A^{\bullet} \longrightarrow AOOA \quad (4)$$

ในเริ่มแรกใช้โปรตีนเบต้าไฟโคอีริทติน **(**β-PE **)** เป็นสารที่ให้แสงฟลูออเรสเซนส์ซึ่งต่อมาไม่เป็นที่นิยม เนื่องจาก β-PE มีความแปรปรวนสูงในการเกิดปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ และแสงฟลูออเรสเซนส์จะลดลงเมื่อถูกแสง นอกจากนี้สารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มฟีนอลโดยเฉพาะโปรแอนโทไซยานิดินจะจับกับโปรตีน β-PE ทำให้ค่า ORAC มีค่าต่ำกว่าความเป็นจริง ปัจจุบันนิยมใช้ฟลูออเรสซีน หรือ ไดคลอโรฟลูออเรสซีน ซึ่งมีความคงตัวและไม่ว่องไวต่อปฏิกิยาจนเกินไป ในการวิเคราะห์จะติดตามปฏิกิริยาเป็นเวลาประมาณ 30 นาที เพื่อให้ได้ค่า ORAC ที่ถูกต้องสมบูรณ์จะวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยทำการคำนวณพื้นที่ใต้เส้นกราฟ AUC ของการลดลงของแสง เมื่อเติมเลือดหรือสารต้านอนุมูลอิสระลงไปในสารละลายทดสอบ จะทำให้การลดลงของแสงเกิดช้ากว่าและน้อยกว่า

เพื่อกำจัดความแปรปรวนของสารเคมีและเครื่องมือ ผู้วิเคราะห์หาค่า ORAC จะคำนวณเป็นค่าที่สมมูลกับสารมาตรฐาน Trolox equivalent (TE) มีหน่วยเป็นไมโครโมลเทียบเท่ากับโทรร็อกต่อตัวอย่างทดสอบหนึ่งลิตรหรือหนึ่งกรัม **(**μM ของ TE/L หรือ μM ของ TE/g**)**

วิธี FRAP เป็นวิธีเป็นการวิเคราะห์หาค่า TAC โดยตรง มีหลักการว่าสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายทำหน้าที่โดยการให้อิเล็กตรอนจึงเป็นสารรีดิวซ์ ดันนั้นจึงกล่าวได้ว่า TAC เป็นความสามารถในการรีดิวซ์ วิธีนี้ใช้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก Fe^{3+}-TPTZ (Ferric tripyridyl triazine) เป็นสารทดสอบ อะตอมเหล็กนี้จะถูกรีดิวซ์โดยเลือดหรือสารต้านอนุมูลอิสระ ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอร์รัส Fe^{3+}-TPTZ ซึ่งมีสีน้ำเงินดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm



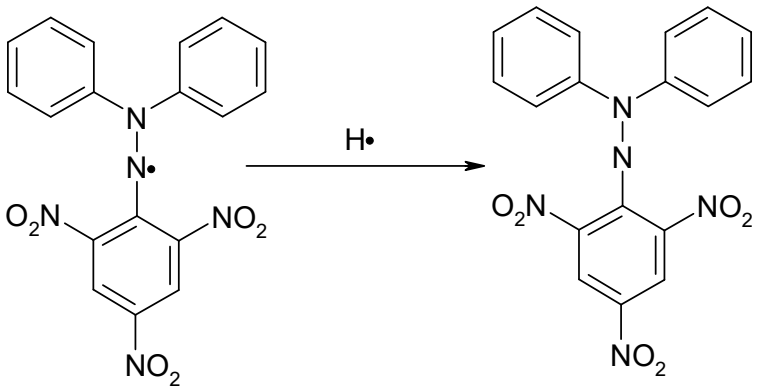
รูปที่ 2.6 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาในการรีดิวซ์ Fe(III) ให้เป็น Fe(II)

วิธี FRAP จะวัดค่าต่างศักย์ของการรีดอกซ์ที่ค่าต่ำกว่า 0.7 โวลต์ ซึ่งมีค่าความต่างศักย์ของสมการรีดอกซ์ของ Fe^{3+}-TPTZ ดังนั้นวิธี FRAP สามารถใช้วัดรีดอกซ์ของเซลล์และเนื้อเยื่อ แต่วิธี FRAP ไม่สามารถวัดความสามารถการต้านอนุมูลอิสระโดยการให้อะตอมไฮโดรเจน (HAT) เพราะจะให้ค่าต่ำกว่าความเป็นจริง

เนื่องจากความต่างศักย์รีดอกซ์ของ Fe^{3+}-TPTZ มีค่าใกล้เคียงกับค่าของ $ABTS^{\bullet+}$ ซึ่งใช้ในวิธีวิเคราะห์ TEAC ดังนั้นสารต้านออกซิเดชันจำพวกเดียวกันที่มีโครงสร้างที่คล้ายกันจะทำปฏิกิริยาได้ทั้งวิธีวิเคราะห์แบบ TEAC และวิธี FRAP แม้ว่าทั้งสองวิธีมีการแตกต่างกันในเรื่องค่า pH โดยวิธี TEAC จะวิเคราะห์โดยทำปฏิกิริยาในสภาวะเป็นกลางและวิธี FRAP จะทำปฏิกิริยาที่ pH 3.6 เพื่อให้เหล็กละลายได้ เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาที่สภาวะเป็นกรดจะลดค่าความต่างศักย์ในการแตกตัวเป็นไอออน ทำให้แรงส่งผ่านอิเล็กตรอนและเพิ่มค่าต่างศักย์รีดอกซ์ ดังนั้นแม้ว่าค่าที่ได้ทั้งสองวิธีจะมีค่าในทิศทางเดียวกัน แต่ค่าจากวิธี FRAP ต่ำกว่าวิธี TEAC เสมอ และค่าที่ได้จากวิธี FRAP ส่วนใหญ่จะไม่สัมพันธ์กับค่าที่หาได้จากวิธีอื่น

ถึงแม้ว่าความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กมีความสัมพันธ์กับการขจัดอนุมูลโดยการให้อะตอมไฮโดรเจนไม่มาก แต่มีอนุมูลที่ถูกออกซิไดซ์หรือถูกรีดิวซ์ให้เป็นไอออนเป็นการหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ ดังนั้นการวัดความสามารถในการรีดิวซ์โดยวิธี FRAP ซึ่งแสดงถึงสภาวะรีดิวซ์ของพลาสมา เนื่องจากวิธี FRAP เป็นวิธีวิเคราะห์โดยหลักการ SET เท่านั้น ดังนั้นการนำผลการวิเคราะห์โดยวิธีอื่นๆมาประกอบจะทำให้ได้ค่าการประเมินผลที่มีความถูกต้องดีขึ้น

วิธี $DPPH^{\bullet}$ เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัว มีสีม่วงในรูปอนุมูลอยู่แล้วโดยไม่ต้องทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดอนุมูลเหมือนวิธีอื่นๆ การวิเคราะห์เป็นการวัดความสามารถในการรีดิวซ์ การวัดทำได้โดยใช้เครื่องมือ EPR หรือเครื่องสเปคโตรวัดการลดลงของสี เมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไป โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm



รูปที่ 2.7 แสดงกลไกการต้านอนุมูล DPPH

ต่อมามีการพัฒนาใช้ DPPH ในการหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ เรียกว่า Antiradical Efficiency (AE) โดยคำนวณจากสมการ

$$AE = {}^{1}\!/\!_{EC_{50}T_{EC_{50}}}$$

EC_{50} = ความเข้มข้นของสารทดสอบที่สามารถลดปริมาณ DPPH• เริ่มต้นลงได้ 50 %

T_{EC50}= เวลาที่ใช้ในการลดปริมาณอนุมูลได้ EC_{50}

ข้อดีของวิธีนี้คือง่าย ใช้เครื่องมือสามัญที่มีทั่วไป นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ ยกเว้นสารกลุ่มแคโรตินอยด์ที่มีค่าการดูดกลืนแสงในขณะเดียวกัน ข้อด้อยของวิธีนี้คือ อนุมูลนี้มีความคงตัว ไม่ไวต่อปฏิกิริยาต่ออนุมูลที่เกิดขึ้นในร่างกาย ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่สามารถแยกแยะจัดอันดับอนุมูลที่มีความไวสูง นอกจากนี้โครงสร้างเคมีของ DPPH• ที่แสดงให้เห็นว่าอิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระถูกบดบังโดยอนุมูลของเบนซีน 3 วงค์ และหมู่ไนโตรเจนทำให้สารต้านอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์แรงแต่มีขนาดใหญ่บางสารไม่สามารถเข้าทำปฏิกิริยาขจัดสารอนุมูลอิสระหรือเกิดปฏิกิริยาช้ากว่าความเป็นจริงทั้งๆที่สารต้านอนุมูลอิสระมีฤทธิ์ดีในการขจัดอนุมูลเปอร์ออกซี นอกจากนี้สารรีดิวซ์สามารถทำให้สี DPPH• จางลงได้อีกด้วย

2.8 ทฤษฎีสี

ในศตวรรษที่ 17 นิวตันพบว่าลำแสงสีขาวของแสงแดดประกอบด้วยรังสีแสงสว่างที่มีสีต่างกันหลายสี เพราะเมื่อให้แสงแดด ส่องผ่านแท่งปริซึม แสงจะกระจายออกเป็นสีรุ้ง (เรียกว่าสเปกตรัม) แต่เมื่อนำเอาสเปกตรัมเหล่านั้นมาผ่านแท่งปริซึมอันที่ 2 แสงที่ได้จะกลายเป็นสีขาวเหมือนเดิม เขาจึงสรุปว่าสีรุ้งทั้ง 7 ในสเปกตรัมเป็นสีปฐมภูมิ ถ้าปล่อยแสงที่มีความยาวคลื่นเดียว เช่น 650 nm ที่มีปริมาณมากพอ กระทบเรตินาในลูกตาความรู้สึกถึงสีที่ต่างจากสีอื่นจะเกิดขึ้น และสิ่งเร้านั้นจะบอกว่าเรากำลังมองเห็นเป็นสี "แดง" ดังนั้นสีจึงแสดงออกมาในรูปของความรู้สึกหรือเรื่องราวของการมองเห็น ซึ่งเกิดจากการกระทำของพลังงานที่ความยาวคลื่นใดๆ ที่กระทำต่อเรตินาของตาคนปกติ ความแตกต่างของความยาวคลื่น จะทำให้เกิดความรู้สึกที่ต่างกันของการมองเห็นสี วัตถุจะมองดูแตกต่างกันเมื่ออยู่ภายใต้แสงสีที่ต่างกัน สีของวัตถุจะขึ้นอยู่กับธรรมชาติของแสงที่ตกกระทบวัตถุนั้น การสะท้อนแสงของวัตถุและสมบัติในการตอบสนองของตาผู้สังเกต สีของวัตถุจึงขึ้นอยู่กับปรากฏารณ์ที่เรียกว่า การดูดกลืนแบบเลือก (Selective absorption) การดูดกลืนแบบเลือกเป็นผลของสีวัตถุที่แยกอนุภาคของแสงที่ส่องสว่างวัตถุนั้น ส่วนหนึ่งของรังสีจะถูกดูดกลืนไว้ แล้วสะท้อน ส่วนที่เหลือออกไป เช่น วัตถุที่มีสีเขียวเมื่อถูกส่องด้วยแสงแดด วัตถุนั้นจะดูดกลืนพลังงานในช่วงอื่นไว้ยกเว้นสีเขียวและสะท้อน แสงสีเขียวเข้าตาเราจึงมองเห็นวัตถุนั้นเป็นสีเขียวเป็นต้น

ทฤษฎีสี หมายถึง ลักษณะกระทบต่อสายตาให้เห็นเป็นสีมีผลถึงจิตวิทยา คือมีอำนาจให้เกิดความเข้มของแสงที่อารมณ์และความรู้สึกได้ การที่ได้เห็นสีจากสายตา สายตาจะส่งความรู้สึกไปยังสมองทำให้เกิดความรู้สึกต่างๆ ตามอิทธิพลของสี เช่น สดชื่น ร้อน ตื่นเต้น เศร้า สีมีความหมายอย่างมากเพราะศิลปินต้องการใช้สีเป็นสื่อสร้างความประทับใจในผลงานของศิลปะ และสะท้อนความประทับใจนั้นให้บังเกิดแก่ผู้ดูมนุษย์เกี่ยวข้องกับสีต่างๆ อยู่ตลอดเวลาเพราะทุกสิ่งที่อยู่รอบตัวนั้นล้วนแต่มีสีสันแตกต่างกันมากมาย

สีในงานศิลปะที่เราใช้กันนั้น โดยมากมักเป็นสีประเภทสำเร็จรูป กล่าวคือเมื่อเปิดขวดขึ้นมาก็สามารถนำมาใช้ได้ทันที จนทำให้เราขาดทักษะความรู้ด้านการผสมสีให้ได้มาซึ่งสีในรูปแบบต่างๆ นับแต่อดีตกาล มนุษย์เรารู้จักการใช้สีในการสร้างสรรค์สิ่งต่างๆ รอบๆ ตัว เช่น การนำเอาสีของยางไม้ไปเขียนตามผนังถ้ำทั้งแบบตั้งใจและไม่ตั้งใจศิลปินสมัยก่อนๆ เห็นว่าเรื่องของสีเป็นเรื่องยุ่งยาก ทำให้การสร้างสรรค์งานศิลปะในยุคก่อนไม่ค่อยคำนึงถึงกฎเกณฑ์หรือหลักการเท่าไรนัก

ในยุคโบราณสีที่ใช้เป็นอุปกรณ์ในการเขียนภาพ ไม่ได้ได้มาจากกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ แต่ได้จากการนำเอาวัตถุดิบที่มีอยู่ ธรรมชาติมาทำให้เกิดสี เช่น สีแดง ได้จากยางไม้ ดินแดง หรือหิน

สีมาบดหรือแม้บางครั้งก็นำมาจากเลือดของสัตว์ สีขาวได้จากดินขาว สีดำได้จากการนำเอาเขม่าจากก้นภาชนะมาละลายน้ำ สีครามได้จากดอกไม้บางชนิด สีเหลืองได้จากดินเหลืองหรือยางซึ่งในยุคนั้นไม่ค่อยนิยมนำมาใช้ในการเขียนภาพ แต่มักนำสีที่ได้มาใช้ในการย้อมผ้าแต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเชื่อ วิถีทางวัฒนธรรมของแต่ละชนชาติว่า นิยมหรือมีวิธีในการสร้างสรรค์อย่างไร เช่น ชาวจีนไม่ค่อยนิยมที่จะเขียนภาพด้วยสีเท่าไรนัก แต่กลับนิยมเขียนภาพด้วยหมึกดำส่วนชนชาติไทยเรานิยมใช้หลายสี แต่ไม่มากนัก เพราะสีที่หาได้มีจำนวนจำกัดเท่าที่หาได้จากธรรมชาติ ได้แก่ สีดำ สีขาว สีแดง และเหลือง ต่อมาในยุคหลังๆ ที่มีการพัฒนาด้านเทคโนโลยี มีการคิดค้นและผลิตสีต่างๆ ออกมามากมาย หลายชนิด ทำให้การใช้สีนั้นกลายเป็นเรื่องที่ค่อนข้างยุ่งยากเพราะว่าคู่สีบางคู่มีความสดและเข้มพอๆ กัน ทำให้เข้ากันไม่ได้ เกิดความขัดแย้งและไม่เหมาะสม ขาดความนุ่มนวล ดังนั้นผู้เรียนจึงควรรู้จักหลักเกณฑ์ในการ รู้กฎเกณฑ์ในการใช้สีพอสมควร จึงจะทำให้การสร้างสรรค์ผลงานทางศิลปะดูสวยงามและมีคุณค่า

2.8.1 ประเภทของแม่สี

แม่สีในยุคปัจจุบัน อาจจำแนกออกได้เป็น 3 ประเภท คือ แม่สีจิตวิทยา แม่สีวิทยาศาสตร์ และแม่สีศิลปะ

2.8.1.1 แม่สีจิตวิทยา

แม่สีจิตวิทยา เป็นสีในกลุ่มที่มีอิทธิพลต่อความรู้สึก และมีผลต่อจิตใจของมนุษย์ กล่าวคือสีที่เราพบเห็นจะสามารถโน้มน้าวชวนให้รู้สึกตื่นเต้น โศกเศร้า โดยมากมักใช้ในการรักษาคนไข้ได้ เช่นโรคประสาท หรือโรคทางจิต แม่สีจิตวิทยาสี 4 สีประกอบด้วย สีแดง สีเหลือง สีเขียว และสีน้ำเงิน

2.8.1.2 แม่สีวิทยาศาสตร์

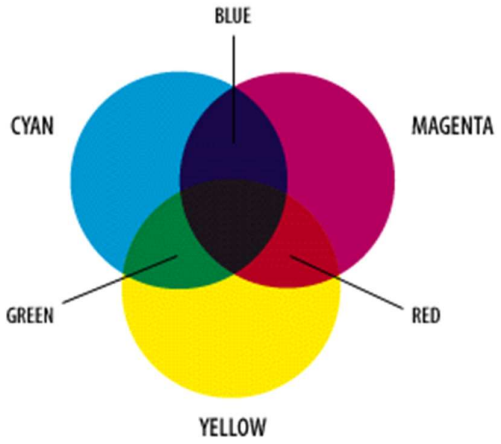
แม่สีวิทยาศาสตร์เป็นสีที่เกิดจากการสร้างหรือประดิษฐ์ขึ้นจากกระบวนการทางวิทยาศาสตร์เช่น สีของหลอดไฟ สีที่ผ่านแท่งแก้วปริซึม ที่เกิดจากการสะท้อนและการหักเหของแสง แม่สีในกลุ่มนี้ประกอบด้วย สีแสด สีเขียวมรกต และสีม่วง

2.8.1.3 แม่สีศิลปะ

แม่สีศิลปะหรือบางครั้งเรียกว่า แม่สีวัตถุธาตุ หมายถึงสีที่ใช้ในการวาดภาพ หรือสร้างสรรค์ผลงานทางศิลปะทั่วๆ ไปซึ่งเมื่อนำมาผสมกันในปริมาณต่างๆที่ต่างอัตราส่วนกันจะเกิดสีสรรต่างๆมากมายให้เราได้เลือกหรือนำมาใช้ในการสร้างสรรค์ ผลงานที่สวยงามได้ แม่สีในกลุ่มนี้ประกอบด้วย สีแดง สีเหลือง และสีน้ำเงิน

2.8.2 ทฤษฎีการผสมสีแบบลบ

บริวสเตอร์ได้ทดลองเกี่ยวกับสีต่างๆ และพบว่ามีสีหลักอยู่ 3 สี ที่สามารถนำมาผสมกันเพื่อทำให้เกิดสีรุ้งทั้ง 7 ที่นิวตันได้พบ ในสเปกตรัมของแสงแดด สีทั้ง 3 ที่บริวสเตอร์เรียกว่าสีปฐมภูมิหรือแม่สีของวัตถุคือ สีแดงเข้ม (Magenta) , สีเหลือง (Yellow) และสีน้ำเงินเขียว (Cyan) สีเหล่านี้เรียกว่า สีปฐมภูมิแบบลบ



(ที่มา http://irrigation.rid.go.th/rid8/royal_coin/electrical/illumination/color.html)

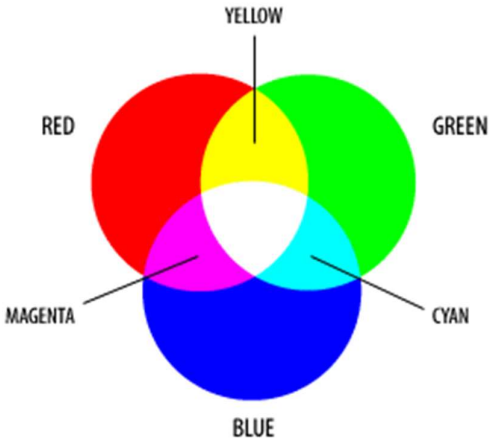
ถ้าเอาสีปฐมภูมิแบบลบคู่ใดคู่หนึ่งมาผสมกัน จะเกิดสีทุติยภูมิแบบลบขึ้นมาอีก 3 สี คือสีแดง (Red) , เขียว (Green) และน้ำเงิน (Blue) ดังรูป แต่เมื่อเอาสีปฐมภูมิทั้ง 3 มาผสมรวมกันในสัดส่วนที่เท่ากันจะได้สีดำ การผสมสีแบบนี้พบได้ในสีน้ำ-สีย้อมทั่วไป (ที่มา:NECTEC'S Web Based Learning:2552)

2.8.3 ทฤษฎีการผสมสีแบบบวก

ในศตวรรษที่ 19 โธมัส ยัง ได้บัญญัติทฤษฎีที่ว่าแสงสีขาวประกอบด้วยสีปฐมภูมิ 3 สีคือ สีแดง , เขียวและน้ำเงิน และกล่าวว่า สีปฐมภูมิเหล่านี้สามารถผสมกันเพื่อทำให้เกิดสีรุ้งทั้ง 7 ในสเปกตรัมได้

ทฤษฎีนี้ได้รับการยืนยันจากเฮลมโอซ์ และแมกซ์เวล

เฮลมโฮลซ์ได้ขยายงานทดลองของยัง โดยระบุว่า ภายในลูกตาคนเรามีใยประสาทเกี่ยวกับการมองเห็น 3 กลุ่ม แต่ละกลุ่มจะมีความรู้สึกไวต่อแสงปฐมภูมิในแต่ละช่วงต่างกันคือ กลุ่มที่ 1 ไวต่อแสงสีแดง , กลุ่มที่ 2 ไวต่อแสงสีเขียว และกลุ่มที่ 3 ไวต่อแสงสีน้ำเงิน โดยคิดว่าแสงที่มีสีอยู่ระหว่างสีปฐมภูมิเหล่านี้สมองจะตีความหมายออกมาว่าเป็นสีอะไร ตามทฤษฎีนี้แสงสีขาวจะเกิดจากการเร้าความรู้สึกของใยประสาททั้ง 3 กลุ่มเท่าๆ กันในเวลาเดียวกัน ซึ่งสามารถใช้อธิบาย การรวมกันของสีทางสเปกตรัมได้อีกด้วย การรวมกันของสีของแสงเรียกว่า ขบวนการผสมสีแบบบวก ซึ่งตรงข้ามกับทฤษฎีสีของบริวสเตอร์



(ที่มา http://irrigation.rid.go.th/rid8/royal_coin/electrical/illumination/color.html)

2.8.4 ระบบการเรียกชื่อสี แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

2.5.4.1 ระบบการจัดสีแบบ Monochromaticกลุ่มแรกเป็นระบบการจัดสีที่มีตัวแปรที่ใช้กำหนดสีอยู่ 3 ตัวคือ ความยาวคลื่นเด่น (Dominant wavelength) หรือชื่อสี (hue) , ความอิ่มตัวหรือความบริสุทธิ์ (Saturation) และความสว่าง (Brightness) ระบบนี้จะมีแผ่นตัวอย่างสีมาตรฐาน ที่มีการจัดระเบียบและตั้งชื่อเพื่อให้ง่ายต่อการระบุสี การเลือกสีก็ทำได้โดยการเทียบกับตัวอย่างสีมาตรฐานที่มีให้ ระบบที่มีชื่อเสียงมากคือ ระบบสีของมุนเซล (Munsell color system) ซึ่งใช้สำหรับเรียกชื่อสีของวัตถุจำพวกสีน้ำ , สีย้อม , สีหมึกต่างๆ ภายใต้เงื่อนไขการส่องสว่างมาตรฐาน

2.5.4.2 ระบบการจัดสีแบบ Trichromaticกลุ่มหลังเป็นระบบการจัดสีที่เกี่ยวกับงานวิจัย การผลิตและจำหน่าย มีข้อดีคือได้รวมเอาผลของคุณสมบัติการสะท้อนแสง หรือการส่งผ่านแสง (สีของวัตถุ) , คุณสมบัติทางสเปกตรัมของแหล่งกำเนิดแสง (สีของแสง) , คุณสมบัติการมองเห็น เพื่อใช้

สังเกตเห็นสีอันแท้จริงภายใต้เงื่อนไขที่กำหนด ระบบที่มีชื่อเสียงมากคือ ระบบสี CIE (CIE color system) โดย CIE ได้สร้างสามเหลี่ยมสีขึ้นมาเพื่อใช้กำหนดสีได้อย่างแม่นยำโดยอาศัยผลการคำนวณทางคณิตศาสตร์

2.9 การย้อมด้วยสีธรรมชาติ

การย้อมด้วยสีธรรมชาติแบ่งออกเป็น 3 แบบ ดังต่อไปนี้

2.9.1 แบบวัต (Vat dyes)

สารที่เป็นสีบางชนิดเมื่ออยู่ในรูปออกซิไดส์ (Oxidized form) จะไม่ละลายน้ำ แต่เมื่ออยู่ในรูปรีดิวซ์ (Reduced form) จะละลายน้ำได้ ดังนั้นในการย้อมสีประเภทนี้ในตอนแรกต้องรีดิวซ์สารที่มีสีนั้นให้เป็นสารที่ละลายได้ในน้ำเสียก่อน แล้วจึงนำมาย้อมในสารละลายนั้น ในขั้นต่อไปนำวัสดุที่ย้อมแล้วไปผึ่งให้แห้ง การผึ่งนั้นจะทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งจะเปลี่ยนสารละลายที่ใช้ย้อมนั้นให้เป็นสารที่มีสีซึ่งไม่ละลายน้ำและจับอยู่บนวัสดุ ตัวอย่างเช่น ในการย้อมสีอินดิโก (indigo) หรือสีครามจากต้นคราม อินดิโกนี้เมื่อไม่ละลายน้ำจะเป็นสีน้ำเงิน (Oxidized form) แต่เมื่อถูกรีดิวซ์โดยโซเดียมไดไทโอไนท์ (Sodium dithionite) จะได้เป็นลิวโคดิโก (Leucoindigo) ละลายน้ำได้และไม่มีสี คืออยู่ในรูปรีดิวซ์ (Reduced form) จากนั้นนำวัสดุที่จะย้อมไปแช่กับสารละลายลิวโคอินดิโก แล้วนำวัสดุที่ย้อมนั้นออกมาผึ่งไว้ ลิวโคอินดิโกจะถูกออกซิไดซ์ด้วยอากาศไปเป็นอินดิโกยึดจับทั้งภายในและผิวของวัสดุที่ย้อมอินดิโกที่ไม่ละลายน้ำนี้ จะทำให้สีมีความคงทน เช่น ใช้ย้อมผ้ายีน เป็นต้น

2.9.2 แบบโดยตรง (Direct dyes หรือ Substantive dyes)

เป็นการย้อมโดยสีที่ใช้ย้อมสามารถเกิดพันธะเคมีกับวัสดุที่นำมาย้อมโดยตรง คือถ้าวัสดุที่นำมาย้อมนั้นเป็นพวกเซลลูโลส (Cellulose) ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิล (OH) อยู่มาก จึงสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bonds) กับโมเลกุลของสีได้โดยตรง ส่วนวัสดุที่เป็นพวกโพลีเปปไทด์ (Polypeptide) จะประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็นโปรตีน จึงมีส่วนที่เป็นทั้งหมู่กรด และหมู่เบสอยู่ ทำให้หมู่ทั้งสองเกิดปฏิกิริยากับส่วนที่เป็นหมู่กรดหรือหมู่เบสของสีด้วยแรงดึงดูดไอออนิก (ionic interaction) แล้วเกิดเป็นเกลือ

2.9.3 แบบมอร์แดนท์ (Mordant dyes)

การย้อมสีด้วยวิธีนี้เป็นการย้อมโดยใช้สารมอร์แดนท์ด้วยเพื่อช่วยให้การติดยึดระหว่างตัวสีกับวัสดุที่ใช้ย้อมดีขึ้น ทำให้สีที่ย้อมโดยวิธีนี้มีความคงทน ไม่ตกสีหรือซีดง่าย สารมอร์แดนท์ที่นิยมใช้ก็คือสารละลายของเกลือโลหะ ได้แก่

Alum (Aluminium potassium sulfate), $AlK(SO_4)_2.2H_2O$

Blue Vitriol (Copper sulfate), $CuSO_4.5H_2O$

Chrom (Potassium dichromate), $K_2Cr_2O_7$

Tin (Stannous Chloride), $SnCl_2$

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการย้อมคือ พวกโลหะของสารละลายมอร์แดนจะเกิดเป็นสารเชิงซ้อนที่แข็งแรง (Strong complex) กับวัสดุ ดังนั้นจึงทำให้โมเลกุลของสีที่ใช้ย้อมยึดติดกับวัสดุที่นำมาย้อมได้ดี

การย้อมโดยวิธีนี้อาจทำได้ 3 ลักษณะ คือ

2.9.3.1 นำวัสดุที่ต้องการย้อมชุบสารละลายมอร์แดนท์ก่อนแล้วจึงทำการย้อม

2.9.3.2 ทำการย้อมและชุบสารละลายมอร์แดนท์พร้อมๆ กัน

2.9.3.3 ชุบสารละลายมอร์แดนท์ก่อนและหลังทำการย้อม

การย้อมโดยวิธีนี้ ถ้าใช้มอร์แดนท์ต่างชนิดกันแม้ว่าสีที่ใช้จะเป็นตัวเดียวกันก็ตาม จะทำให้วัสดุที่นำมาย้อมที่ได้มีสีต่างๆ กัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของมอร์แดนท์ เมื่อมีการเปลี่ยนชนิดของมอร์ดนท์ สีที่ได้จากการย้อมก็จะเปลี่ยนไป (เทียนศักดิ์,2533)

2.10 ทฤษฎีการย้อมสีทั่วไป

ในกระบวนการย้อมสีโดยทั่วไป การย้อมจะเกิดขึ้นในขณะที่วัสดุที่นำมาย้อมอยู่ในสารละลายของน้ำสี หรือในน้ำที่มีอนุภาคสีแขวนลอยอยู่ การที่อนุภาคของสีติดวัสดุที่นำมาย้อมได้ จะต้องมีแรงยึดเหนี่ยวทำหน้าที่ยึดโมเลกุลของสีที่ติดอยู่กับวัสดุที่นำมาย้อม ซึ่งแรงยึดเหนี่ยวนี้จะมีค่ามากกว่าแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลของสีกับน้ำ การติดของสีกับวัสดุที่นำมาย้อมนั้นจะมีมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับสมบัติ 2 ประการ คือ

1) ความสามารถที่โมเลกุลของสีจะแทรกเข้าไปในเนื้อของวัสดุที่นำมาย้อม
2) การเกิดปฏิกิริยาเคมีระหว่างหมู่ฟังก์ชันของวัสดุที่นำมาย้อมกับโมเลกุลของสี

สีที่ละลายอยู่ในน้ำ มิได้อยู่นิ่งแต่จะเคลื่อนที่ตลอดเวลา ที่เป็นเช่นนี้เพราะทั้งตัวสีและในน้ำมีแรงอย่างใดอย่างหนึ่งแฝงอยู่ เมื่อนำวัสดุที่จะย้อมใส่ลงในน้ำย้อม แรงต่างๆ จะทำให้ตัวสีเคลื่อนไหวตามลำดับขั้น 3 ขั้น จึงเห็นวัสดุเป็นสีตามต้องการ ได้แก่

1) สีค่อยๆ เคลื่อนตัวในน้ำย้อมเกาะที่ผิววัสดุที่นำมาย้อม

2) สีจะยึดติดที่ผิวของวัสดุที่นำมาย้อม

3) สีจะค่อยๆ เคลื่อนที่จากผิวภายนอกของวัสดุที่นำมาย้อมเข้าไปจนถึงกึ่งกลางของวัสดุที่นำมาย้อม

การที่สีติดวัสดุที่นำมาย้อมได้เพราะสารประกอบทั้งสองชนิดรวมกันเกิดเป็นสารประกอบตัวใหม่ การรวมตัวของสีและวัสดุที่นำมาย้อมนั้นไม่ทำให้สมบัติทางเคมีเปลี่ยนไปเพียงเปลี่ยนสมบัติกายภาพ เห็นเป็นสีต่างๆ เท่านั้น โดยอัตราส่วนจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความต้องการ สีอาจจะเข้มมากจนเกือบดำ หรืออ่อนจางจนอาจจะเป็นสีขาว การรวมตัวของวัสดุที่นำมาย้อมและสีก็ยังคงเป็นสารประกอบอยู่ สารประกอบนี้อาจสลายตัวออกโดยกระบวนการอย่างใดอย่างหนึ่ง การเปลี่ยนตัวสีให้เป็นสารประกอบเคมีที่มีโครงสร้างแตกต่างไปจากเดิม จึงมักจะไม่ละลายน้ำ ถ้าไม่มีการตกแต่งภายหลังย้อมใดๆแล้ว ตามทฤษฎีกระบวนการย้อมสีนี้สามารถเปลี่ยนกลับไปกลับมาได้ นั่นคือเมื่อย้อมสีติดบนวัสดุที่นำมาย้อมแล้วสามารถทำให้สีหลุดออกได้ โดยแยกออกเป็นตัวสีและวัสดุที่นำมาย้อมในสภาพเดิมได้ แต่สีบางตัวทำได้ง่าย บางตัวก็ทำได้ยาก

การย้อมสีที่ถูกต้อง สีจะต้องซึมเข้าไปติดถึงภายในวัสดุที่นำมาย้อม จะติดเฉพาะรอบนอกเท่านั้นไม่ได้ ในทางปฏิบัติการย้อมให้ติดสีเข้าไปถึงภายในวัสดุที่นำมาย้อมนี้ทำได้ไม่เสมอไป กระบวนการย้อมมักจะสิ้นสุดลงก่อน สีติดเฉพาะบริเวณรอบนอกวัสดุที่นำมาย้อม ภายในยังคงมีสีขาว เรียกว่า ริงได (ring dye) ลักษณะเช่นนี้เกิดได้กับวัสดุที่นำมาย้อมทุกชนิดเมื่อย้อมใน 2-3 นาทีแรก หรือเมื่อย้อมที่อุณหภูมิต่ำกว่าที่ควรซึ่งทำให้ระดับการเคลื่อนตัวของสีภายในวัสดุที่นำมาย้อมน้อยลง

วัสดุที่นำมาย้อมนั้นมีลักษณะอย่างหนึ่งที่เหมือนกันคือ ประกอบด้วยโมเลกุลเล็กๆ ต่อกันเหมือนโซ่ ถ้าใช้รังสีเอกซ์จะตรวจพบว่าการเรียงตัวไม่เหมือน เมื่อนำวัสดุที่นำมาย้อมไปดึงยืดจะทำให้โมเลกุลเรียงตัวได้ดีขึ้น ลักษณะที่โมเลกุลเรียงตัวกันภายในวัสดุที่นำมาย้อมจึงเห็นได้ชัดเจนว่ามีอยู่ 2 แบบแรกเรียงตัวกันเป็นระเบียบเรียกว่า crystallites ในใยเซลลูโลสเรียกว่า micelles ก็ได้ อยู่เป็นช่วงๆ ภายในวัสดุที่นำมาย้อม อีกส่วนหนึ่งเรียงตัวกันหลวมๆ ไม่เป็นระเบียบ

โมเลกุลของสีย้อมค่อนข้างใหญ่ ไม่สามารถซึมผ่านเข้าไประหว่างโมเลกุลของวัสดุที่นำมาย้อมที่มีสายโมเลกุลเรียงตัวกันหนาแน่นมีระเบียบได้ ขนาดโมเลกุลที่จะสามารถซึมผ่านเข้าไปภายในส่วนที่เรียงตัวไม่เป็นระเบียบของวัสดุที่นำมาย้อมได้จะเท่ากับขนาดของสี monoazo ช่องว่างระหว่างส่วนที่ไม่เป็นระเบียบเรียกว่า pore โดยช่องว่างนี้กับขนาดโมเลกุลของสีจะมีความสัมพันธ์กัน ถ้าสามารถทราบขนาดของช่องว่างและขนาดโมเลกุลของสีจะทำให้การย้อมสีทำได้ง่ายขึ้น การย้อมสีส่วนใหญ่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย และใยผ้าเมื่ออยู่ในน้ำจะพองตัวออกได้ตามปริมาณของหมู่ไฮดรอกซิล (OH) ที่มีอยู่ การ

พองตัวของวัสดุที่นำมาย้อมจะเกิดเฉพาะบริเวณช่องว่างเท่านั้น ทำให้ช่องว่างมีขนาดใหญ่ขึ้น โมเลกุลของสีซึมผ่านเข้าไปได้ง่าย สีแต่ละชนิดมีขนาดโมเลกุลไม่เท่ากัน จึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้สีย้อมบางตัวติดวัสดุที่นำมาย้อมได้ดี แต่บางตัวติดได้ไม่ดี

เมื่อโมเลกุลของสีซึมผ่านเข้าไปภายในวัสดุที่นำมาย้อมแล้ว จะต้องมีแรงยึดเหนี่ยงบางอย่างมาแยกตัวสีออกจากน้ำและเกาะติดวัสดุที่นำมาย้อม สีโมเลกุลใหม่ที่อยู่ในน้ำย้อมภายนอกวัสดุที่นำมาย้อมจะซึมเข้าไปแทนที่ วัสดุที่นำมาย้อมจึงค่อยๆ มีโมเลกุลของสีรวมตัวกันอยู่มากขึ้นสีจะเข้มมากขึ้น ตามลำดับวัสดุที่นำมาย้อมจะดูดติดไว้ได้เป็นปริมาณมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับกลุ่มเคมีที่ทำปฏิกิริยาของตัวสีและวัสดุที่นำมาย้อมนั้น

ลักษณะการย้อมสีที่สำคัญ คือ ได้สีสม่ำเสมอและเหมือนกันตลอด (ไม่ด่าง) ทั้งนี้จะย้อมได้ดีขึ้นอยู่กับสมบัติทางเคมีของสีและวัสดุที่นำมาย้อม วิธียอ้มและลักษณะของเครื่องย้อม สีบางตัวมีลักษณะพิเศษแม้เมื่อแรกย้อมจะด่างแต่พอย้อมให้นานขึ้นสีจะค่อยๆ กระจายตัวออกไปทำให้สีมีความสม่ำเสมอ สมบัตินี้เรียกว่า migration หรือการซึมกระจาย การเลือกสีมาใช้จึงจำเป็นต้องพิจารณาสมบัตินี้ด้วย จะทำให้ย้อมได้ผลดีและง่าย วัสดุที่นำมาย้อมบางชนิดต้องย้อมด้วยสีที่ซึมกระจายตัวดี แต่บางชนิดไม่มีความจำเป็น เพราะปฏิกิริยาย้อนกลับของสีหรือการดูดติดวัสดุที่นำมาย้อมและการลอกออกของตัวสีเกิดขึ้นได้เกือบทุกขบวนการ บางครั้งต้องการให้เกิดขึ้นแต่บางครั้งก็ไม่ต้องการ เพราะส่วนมากต้องย้อมให้สีมีความคงทนสูง สีประเภทนี้บางครั้งมีโมเลกุลใหญ่ทำให้ซึมกระจายตัวยาก ย้อมให้สม่ำเสมอยากแต่ตัวสีคงทนต่อการใช้น้ำสูง สมบัติกระจายตัวของสีจึงสำคัญ ของแข็งหลายชนิดสามารถดูดซึมสีได้เมื่อใส่ลงในสารละลายสี วัสดุที่นำมาย้อมมีสมบัติเฉพาะที่ดูดซึมได้มาก เพราะช่องว่างหรือความหลวมของโมเลกุลและปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุลของสีและวัสดุที่นำมาย้อม ช่องว่างนี้เมื่อถูกน้ำจะพองตัวออกสีซึมผ่านเข้าไปได้ วัสดุที่นำมาย้อมแต่ละชนิดมีช่องว่างอยู่นับไม่ถ้วน ซึ่งตามแนวขวางของวัสดุที่นำมาย้อมจะมีประมาณ 10 ล้านช่อง วัสดุที่นำมาย้อมที่เห็นเป็นสีต่างๆ จะต้องใช้โมเลกุลของสีเรียงซ้อนกันตั้งแต่ 10-100 ชั้น ถ้าเป็นสีเข้มจะมีประมาณ 1000 -10000 ชั้น จึงจะมองให้เห็นว่ามีสีได้ชัดเจนเมื่อมีแสงพอเหมาะ มีโมเลกุลของสีย้อมรวมกันอยู่อย่างน้อย 10000 โมเลกุล บางครั้งสามารถเกิดเป็นสีเข้มได้แม้ว่าจะมีสีอยู่เพียงชั้นเดียว ถ้ามีแรงอะไรสักอย่างหนึ่งหรือสองอย่างมาบังคับให้สีตัวนั้นแผ่กระจายไปทั่วทั้งผิววัสดุที่นำมาย้อม

แรงยึดเหนี่ยวที่ทำให้เกิดการรวมตัวของสีกับวัสดุที่นำมาย้อมต้องมีมากกว่าแรงยึดเหนี่ยวของการรวมตัวของน้ำและสีจึงจะย้อมได้ผลดี สมบัติเช่นนี้ทำให้เกิดขึ้นได้เมื่อโมเลกุลของสีมีหมู่อะตอมที่เรียงตัวกันในลักษณะที่ทำให้เกิดภาวะดูดติด (substantivity) กับวัสดุที่นำมาย้อมแล้วเกิดพันธะทางเคมียึดกันแน่น อิทธิพลเชิงเคมีที่ทำให้สียึดติดกับวัสดุที่นำมาย้อมสามารถแบ่งกว้างๆ ได้ 4 ชนิด ได้แก่

1) พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond)
2) แรงแวนเดอวาลส์ (Van de Waals force)
3) แรงไอออนิก (ionic forces)
4) พันธะโควาเลนท์ (covalent bond)

แรงยึดเหนี่ยวเหล่านี้จะไม่ทำหน้าที่เพียงลำพัง แต่จะต้องมีอย่างน้อย 2 ชนิดขึ้นไป บางครั้งต้องมีทั้ง 4 ชนิด จึงจะทำให้สีกับวัสดุที่นำมาย้อมรวมตัวกันได้ (อัจฉราพร,2527)

2.11 ระดับการย้อมสี

ระดับการย้อมสี หมายถึง อัตราการดูดซึมของสีเข้าไปภายในวัสดุที่นำมาย้อม ในช่วงระยะเวลาที่กำหนดให้โดยสีจะค่อย ๆ ซึมอย่างช้า ๆ เข้าไปตามช่องว่างของวัสดุที่นำมาย้อมเข้าสู่ภายใน ถ้าวัสดุที่นำมาย้อมมีโมเลกุลที่เป็นระเบียบมาก จะดูดสีได้ช้าลง ต้องการเวลาย้อมนานขึ้นจึงจะย้อมให้สีติดได้สม่ำเสมอและเข้าถึงกึ่งกลางของวัสดุที่นำมาย้อม บางครั้งถ้าภาวะการย้อมถูกต้องสมบูรณ์จะเสียเวลาเพียงวินาทีหรือ 2-3 นาที แต่บางครั้งจะนานนับชั่วโมง ใยสังเคราะห์ซึ่งมีโครงสร้างโมเลกุลแน่นมากอาจเสียเวลาเป็นวันถ้าไม่ปรับปรุงการย้อมใหม่

ระดับการย้อมที่ถูกต้องคือ สีจะต้องซึมเข้าไปภายในวัสดุที่นำมาย้อมและติดจนกระทั่งเมื่อตัดวัสดุที่นำมาย้อมตามขวางแล้วดูดด้วยกล้องจุลทัศน์เห็นเป็นสีเดียวและเท่ากันตลอด ความเข้มของสีภายในวัสดุที่นำมาย้อมจะต้องเท่ากับความเข้มของสีที่คงอยู่ในน้ำย้อม เรียกการย้อมถึงระดับนี้ว่าการย้อมสมดุล (equilibrium) ถ้าสีเกาะติดแต่เพียงรอบนอกของวัสดุที่นำมาย้อมหรือซึมเข้าไปภายในเพียงภายใต้รอบนอกของผิววัสดุที่นำมาย้อมเท่านั้น ภายในกึ่งกลางยังเป็นสีขาวอยู่เรียกว่า การย้อมแบบวงแหวน (ring dyeing) การย้อมได้สมดุลหรือไม่จะสังเกตได้หลายทางด้วยกัน ที่ง่ายที่สุดคือ เมื่อย้อมไปนานๆ น้ำย้อมไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างใด ความเข้มของสีที่วัสดุที่นำมาย้อมเป็นปกติ อาจยุติได้ว่าย้อมสีได้สมดุลแล้ว ระดับการย้อมสีอาจระบุเป็นเวลาที่ย้อมให้สีซึมผ่านเข้าไปภายในวัสดุที่นำมาย้อมได้ร้อยละ 50 ของการย้อมสมดุล (time of half dyeing = t1/2) ความเร็วที่สีสามารถซึมกระจายตัวเข้าไปภายในวัสดุที่นำมาย้อมระบุเป็นค่าของปริมาณตัวสีที่ผละออกมาจากน้ำย้อมที่ทราบความเข้มของสีเข้าภายในวัสดุที่นำมาย้อมตามช่วงระยะเวลาที่กำหนดให้ ไม่ว่าจะย้อมได้เร็วหรือช้าล้วนเป็นสิ่งที่ไม่ต้องการในวงการย้อมทั้งสิ้น เพราะถ้าย้อมได้เร็วเกินไปก็ย้อมให้สีสม่ำเสมอได้ยาก ถ้าช้าเกินไปก็เปลืองเวลาและเชื้อเพลิง ค่าแรงงานก็เพิ่มขึ้น บางครั้งวัสดุที่นำมาย้อมที่แช่สีย้อมอยู่นานๆก็เสื่อมสภาพได้ ดังนั้นเพื่อควบคุมระดับการย้อมผู้ย้อมต้องควบคุมเวลาให้พอเหมาะหรือเติมสารช่วยย้อมบางชนิดเพื่อให้สีติดวัสดุที่นำมาย้อมในระดับที่ต้องการและในช่วงเวลาที่กำหนด (อัจฉราพร,2527)

2.12 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Lopez *et al.* ได้แสดงให้เห็นถึงสมบัติทางชีวภาพของ lipophilic *O*-napthoquinone ซึ่งเป็น quinine ที่ได้จากผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติมีฤทธิ์เป็นยารักษาโรคต่างๆ เช่น antibacterial, antifungal, trypanocidal และ cytotoxic effects โดยสมาชิกที่สำคัญของสารในกลุ่มนี้คือ β-lapachone (3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphtho [1,2b] pyran-5,6-dione) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น Yoshida and walker sarcoma, epidermoid laryngeal carcinoma, melanoma, promyelocytic-leukemia, prostate, breast, ovary, colon, hepatoma และ lung cancer cells

Azmi *et al.* ได้แสดงให้เห็นว่า resveratrol (3,4',5-trihydroxy stilbene) ซึ่งเป็นสารพวก polyphenol ที่ได้จากพืชต่างๆ เช่น mulberries, grapes และ red wine มีสมบัติทาง chemopreventive properties, anti-inflammatory, anti-platelet, anti-mutagenic effects และยังมีสมบัติเป็น agonist สำหรับ estrogen receptor นอกจากนี้ยังป้องกันโรคหัวใจ (cardiovascular protective properties) และป้องกันพืชไม่ให้เกิดโรคจากเชื้อรา ขัดขวาง DNA polymerase และ ribonucleotide reductase, ยับยั้ง LDL oxidation ต่อต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ระยะคือ tumor initiator, promotion และ progression ดังนั้น resveratrol สามารถชักนำให้เกิด apoptosis ในผู้ป่วยโรคมะเร็งได้ นักวิจัยกลุ่มเดียวกันนี้ยังได้ศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารกลุ่ม polyphenol ที่ได้จากพืช เช่น flavonoids, tannins และ curcumins พบว่ามันสามารถชักนำให้เกิด oxidative DNA damage แม้ว่าจะใช้เพียงลำพังหรือในรูป metal compounds เช่น Cu(II) สมบัติหลายประการของสารเหล่านี้ เช่น เกาะกับ DNA และการทำลาย (degradation) คล้ายคลึงกับสารต้านมะเร็งอื่นๆ เช่น bleomycin, adriamycin และ 4'-(9-acridinylamino) methanesulphone-m-anisidine (mAMSA) โดย polyphenolic resveratrol สามารถทำให้สาย DNA แตกเมื่อมี Cu ไอออนอยู่ด้วย

DiSilvestra *et al*. ศึกษาผลการต้านอนุมูลอิสระของ soy isoflavone อาจจะช่วยป้องกันการเกิดซ้ำของมะเร็งเต้านมได้ แต่ isoflavone ที่ออกฤทธิ์คล้าย estrogen อาจจะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งเต้านม การออกฤทธิ์เช่นนี้ของ isoflavone เป็นผลมาจากเอนไซม์ 2 ชนิดที่มี copper อยู่คือ superoxide dismutase 1 (SOD 1; ทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระจึงป้องกันโรคมะเร็งเต้านมได้) และ ceruloplasmin (เพิ่มการผลิต estrogen เมื่อมีมากจึงเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งเต้านม) จากการศึกษาทางระบาดวิทยาของสตรีเอเชียถึงความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดมะเร็งเต้านมและอาหารที่มีถั่ว พบว่าผู้หญิงเซี่ยงไฮ้ที่มี isoflavone จากปัสสาวะปริมาณที่น้อยในสตรีที่เป็นมะเร็งเต้านม เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงว่าสตรีที่บริโภคถั่วปริมาณน้อยมีโอกาสเกิดโรคมะเร็ง

Al-Haiza *et al*. ใช้ coumarins เป็นกลุ่มของสารอินทรีย์ที่สำคัญในการใช้ประโยชน์ เช่น ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (bactericides), ฆ่าเชื้อรา (fungicides), ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory), anticoagulant และ anticancer agents สมบัติทางเภสัชวิทยาเหล่านี้ทำให้นักวิจัยสนใจที่จะสังเคราะห์อนุพันธ์ใหม่ๆ ที่มีมากยิ่งขึ้นไปอีก โดยมีลักษณะที่แตกต่างกันที่วง heterocyclic ที่เชื่อมต่ออยู่กับ coumarin (coumarin moiety)

Kostova *et al.* ทำการสังเคราะห์สารประกอบของ Lanthanum (III) กับ bis-coumarins ศึกษาสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ด้วยเทคนิค EA, IR, ^{1}H-และ ^{13}C-NMR และ mass-spectral data ตามลำดับ โดยสเปกตรัมของสารประกอบเหล่านี้เทียบกับลิแกนด์อิสระ พบว่า La(III) ทำปฏิกิริยากับลิแกนด์ที่ตำแหน่ง deprotonated hydroxyl ทั้ง 2 หมู่ สำหรับ cytotoxicity ใช้เทคนิค MTT assay กับ HL-60, BV-173 และ SKW-3 cell lines ผลที่ได้คาดว่าสารประกอบเหล่านี้เป็นตัวทำให้เกิดการตายของเซลล์ (trigger programmed cell death หรือ apoptosis)

Lewis *et al.* ได้ศึกษาอนุพันธ์ของคูมาริน (coumarin) dicumarol (3,3'-Methylene bis[4-hydroxycoumarin] เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก sweet clover (*Melilotus alba*) ใช้เป็นยา anticoagulant นอกจากนี้สารคูมาริน และอนุพันธ์ยังใช้เป็นยาต้านมะเร็ง โดยเฉพาะต้านการเจริญเติบโตของเซลล์ในระยะ malignant cell lines (*in vitro)* นอกจากนี้ยังได้ทดสอบทางคลินิก (clinical trials) พบว่า สามารถออกฤทธิ์ต้าน prostate cancer, malignant melanoma และ metastatic renal cell carcinoma ได้ด้วย

ศุภชัย พจน์เลิศอรุณ (2543:บทคัดย่อ) ได้ศึกษาการพัฒนาระบบสนับสนุนการผสมสีในการฟอกย้อม โดยการพัฒนาโปรแกรม Supporting CCM ซึ่งเป็นระบบสนับสนุนการผสมสีในการฟอกย้อม ที่พัฒนาขึ้นจากโปรแกรมไมโครซอฟ แอกเซส โดยวัตถุประสงค์ในงานวิจัยครั้งนี้ คือ 1) ต้องการในการปรับเปอร์เซ็นต์สีที่เครื่องคอมพิวเตอร์วัดสีทำนายให้ในครั้งแรกให้ผลการทดลองย้อมสีตัวอย่างนั้นมีความใกล้เคียงตัวอย่างสีที่ต้องการมากขึ้น 2) ลดอิทธิพลของความเข้มสีในแต่ละรุ่นการผลิตที่ใช้ซึ่งมีผลต่อการย้อมสีตัวอย่างโดยตรง 3) ต้องการข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับการผสมสี โปรแกรม Supporting CCM ที่พัฒนาขึ้นนี้ อาศัยเทคนิคการวิเคราะห์การถดถอยซึ่งใช้โปรแกรม SPSSช่วยในการคำนวณหาสมการในการปรับสูตรครั้งแรกให้ใกล้เคียงสูตรจริงมากขึ้น โดยที่การวัดผลงานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบโปรแกรมSupporting CCM โดยการทดลองย้อมสีตัวอย่าง 3 สี เพื่อให้ได้สีตามชิ้นตัวอย่างมาตรฐาน คือ เฉดสีแดงเข้ม เฉดสีแดง และเฉดสีส้ม เปรียบเทียบระหว่างการทดลองย้อมสีตัวอย่างโดยใช้เครื่องคอมพิวเตอร์วัดสี แล้วปรับสูตรสีครั้งแรกโดยใช้โปรแกรม Supporting ก่อนปรับสูตรตามปกติ ซึ่งผลที่ได้ในการวิจัยครั้งนี้คือจำนวนครั้งในการทดลองย้อมสีตัวอย่างเพื่อให้ได้สีเหมือนชิ้นตัวอย่างมาตรฐานของเฉดสีแดงเข้ม มีจำนวน 2 ครั้งเท่ากัน ในขณะที่เฉดสีแดง และเฉดสีส้ม มีจำนวนครั้งลดลงจาก 3 ครั้ง

เป็น 2 ครั้ง รวมถึง ค่าความแตกต่างของสีเปรียบเทียบชิ้นตัวอย่างมาตรฐาน หรือค่า dECMC21 ครั้งแรกนั้นถึงแม้เฉดสีส้มจะเพิ่มขึ้นจาก 3.22 เป็น 4.21 แต่เฉดสีแดงเข้ม ลดลง จาก 2.05เป็น 1.34 และเฉดสีแดงลดลงจาก 2.28 เป็น 1.24 ซึ่งผลจากการทดสอบโปรแกรมนั้นที่ได้นั้นกล่าวโดยสรุปคือ อยู่ในเกณฑ์ที่น่าพอใจ

โสภา สิมะรักษ์อำไพ และคณะ (2551) ได้ทำการวิจัยเรื่อง การปฏิรูปการเรียนรู้ด้วยการศึกษาและพัฒนาภูมิปัญญาท้องถิ่น การย้อมสีไหมด้วยครั่ง บ้านนาตังจังหวัดสุรินทร์ ใช้วิธีการศึกษาโดยลงพื้นที่เพื่อสัมภาษณ์เชิงลึกเพื่อทราบบริบททท้องถิ่น และวิธีการย้อมสีเส้นไหมด้วยครั่ง แล้วนำมาทดลององปฏิบัติการ พบว่า การย้อมสีเส้นไหมด้วยครั่ง โดยใช้อัตราส่วนของครั่ง 3 กรัม และ 4 กรัม ต่อเส้นไหม 1 กรัม เปรียบเทียบระหว่างใบพลองเหมือดและใบเหมือดด้วยวิธีการย้อมตามภูมิปัญญาท้องถิ่น ได้เส้นไหมที่มีสีแดงเข้มใกล้เคียงกัน ดังนั้นอัตราส่วนที่เหมาะสมจึงเป็น ครั่ง 3 กรัมต่อเส้นไหม 1 กรัม โดยสารช่วยติดจากใบพลองเหมือดจะได้สีแดงเข้มและติดทน

สุขใจ สมพงษ์พันธุ์ และคณะ (2551) ทำการพัฒนารูปแบบการย้อมสีธรรมชาติด้วยใบหูกวางและใบขี้เหล็ก โดยเลือกรูปแบบของสารช่วยติดและอัตราส่วนที่เหมาะสม เปรียบเทียบสีที่ได้จากการผสมของใบหูกวางหรือใบขี้เหล็กและกระเจี๊ยบ และคราม เปรียบเทียบประสิทธิภาพการติดสีของไหมหลังจากซักด้วยผงซักฟอกและน้ำแชมพู โดยมีขั้นตอนในการศึกษา 4 ขั้นตอนคือ 1) เมื่อย้อมไหมตามกรรมวิธีภูมิปัญญาชาวบ้าน พบว่าวิธีย้อมแบบร้อนมีความเหมาะสม โดยสีย้อมจากใบหูกวางและใบขี้เหล็กจะได้สี เหลืองทองและสีเขียวทอง ตามลำดับ ถ้าชอบสีเข้มสว่างให้แช่พืชที่ใช้ย้อมในน้ำ 1 คืน ถ้าชอบสีเข้มทึบไม่ต้องแช่พืชที่ใช้ย้อม 2) ทดลองใช้สารช่วยติด 10 ชนิด แล้วคัดเอาที่ดีที่สุด 3 ชนิด(จากแบบสอบถาม) คือ ถ้าใช้ใบหูกวางแบบไม่แช่น้ำ ได้แก่ น้ำสารส้ม น้ำใบมะขาม และน้ำ ส่วนวิธีย้อมแบบแช่น้ำ ได้แก่ น้ำโคลน น้ำใบมะขาม และน้ำมะนาว 3) หาอัตราส่วนที่เหมาะสม พบว่า สีย้อมจากใบหูกวางทุกอัตราส่วนใช้สารช่วยติดคือ น้ำสารส้ม ได้สีเหลืองทอง แต่เมื่อใช้น้ำใบมะขาม น้ำเกลือ น้ำมะเฟือง ได้สีเขียวเหลือง สีเขียวทอง ส่วนสีย้อมจากใบขี้เหล็ก ทุกอัตราส่วนใช้ใช้สารช่วยติด คือ น้ำใบมะขาม น้ำโคลน ได้สีเขียวเทา สีกากี เป็นส่วนใหญ่ แต่เมื่อใช้น้ำมะนาวได้สีเปลือกไข่ สำหรับความคงทนพบว่า พบว่าสีย้อมมีความคงทนดีและไม่แตกต่างกัน 4) ได้พัฒนาการย้อมด้วยสีผสม พบว่าใบหูกวางผสมกระเจี๊ยบได้สีน้ำตาล ใบขี้เหล็กผสมกระเจี๊ยบได้สีน้ำตาลแดง ใบหูกวางผสมครามได้สีเทา ใบขี้เหล็กผสมครามได้สีเขียวอมเหลือง นอกจากนี้ยังพบว่าสีผสมที่ซักด้วยแชมพูจะมีความคงทนกว่าสีที่ซักด้วยผงซักฟอก คณะผู้วิจัยกลุ่มนี้ยังได้สรุปไว้ว่า การย้อมไหมจากสีธรรมชาติ รูปแบบที่ดีคือย้อมร้อนทั้งแบบแช่น้ำ 1 คืน และไม่แช่น้ำ และส่วนมากใช้สารช่วยติดที่เป็นกรดจะได้สีธรรมชาติที่คงทนและสวยงาม

เทียนศักดิ์ เมฆพรรณโอภาสและคณะ (2533) ได้ทดลองย้อมเส้นใยไหมและเส้นใยฝ้ายด้วยเปลือกลิ้นฟ้า เปลือกสะเดา เปลือกประดู่ เปลือกกระโดน เปลือกอะราง เปลือกทองกวาว เปลือกสมอ เปลือกมะหาด เปลือกประโหด เปลือกสนทะเล เปลือกหอมใหญ่ กาบมะพร้าว ใบหูกวาง ใบยูคาลิปตัส แก่นแกแล และครั่ง โดยย้อมแบบมอร์แดนท์ และแบบโดยตรง พบว่า เส้นใยไหมจะติดได้ดีกว่า แสดงว่าสีย้อมจากธรรมชาตินำจะเหมาะสำหรับใช้ย้อมเส้นไหมมากกว่าเส้นใยฝ้าย และในการย้อมแบบมอร์แดนท์กับสีจากพืชชนิดเดียวกันเมื่อเปลี่ยนชนิดมอร์แดนท์สีที่ได้ก็จะต่างกันไปตามชนิดของมอร์แดนท์

อุไรลักษณ์ คุณสิงห์(มปป:บทคัดย่อ) ได้การศึกษาการศึกษาการย้อมกระดาษรีไซเคิลด้วยสีธรรมชาติ โดยนำสีธรรมชาติจากพืช 5 ชนิด ซึ่งได้แก่ ขมิ้นชัน ลิ้นฟ้า ฝาง อัญชัน และประดู่ มาสกัดด้วยน้ำ แล้วนำไปย้อมกระดาษรีไซเคิล 3 ประเภท คือ กระดาษรีไซเคิลที่ทำมาจากกระดาษถ่ายเอกสาร กระดาษรีไซเคิลที่ได้จากการนำกระดาษถ่ายเอกสารผสมกับกระดาษหนังสือพิมพ์อัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก และกระดาษรีไซเคิลที่ทำมาจากกระดาษหนังสือพิมพ์ ย้อมโดยวิธีย้อมโดยตรง จากการศึกษาพบว่าสีที่เกาะติดกระดาษรีไซเคิลได้ดีมากคือฝางและประดู่ เกาะติดได้ปานกลางคืออัญชัน และเกาะติดได้น้อยคือขมิ้นชันและลิ้นฟ้า การย้อมด้วยสีจากพืชชนิดเดียวกันที่ความเข้มข้นเดียวกันในกระดาษรีไซเคิลแต่ละประเภทจะให้สีแตกต่างกันเกือบทั้งหมด ยกเว้นที่ความเข้มข้นเริ่มต้นกระดาษรีไซเคิลทั้งสามประเภทที่ย้อมด้วยอัญชันจะให้สีเหมือนกัน กระดาษรีไซเคิลที่ทำมาจากกระดาษถ่ายเอกสารผสมกับกระดาษหนังสือพิมพ์กับกระดาษรีไซเคิลที่ทำมาจากกระดาษหนังสือพิมพ์ที่ย้อมด้วยฝางจะให้สีเหมือนกัน และกระดาษรีไซเคิลที่ทำมาจากกระดาษถ่ายเอกสารกับกระดาษรีไซเคิลที่ทำมาจากกระดาษหนังสือพิมพ์ที่ย้อมด้วยประดู่จะให้สีเหมือนกัน ส่วนการย้อมที่ความเข้มข้นต่างๆกันของสีจากพืชแต่ละชนิดกระดาษรีไซเคิลแต่ละประเภทจะได้สีแตกต่างกัน นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาความเป็นไปได้ของการหาค่าการติดสีด้วยวิธี UV visible พบว่าได้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λmax) หลายค่า และมีการกระจายของข้อมูลของค่าการดูดกลืนแสงค่อนข้างมาก ทำให้ ณ ขณะนี้ไม่สามารถใช้วิธีนี้ในการศึกษาการหาค่าการติดสีของสีธรรมชาติบนกระดาษรีไซเคิลได้ แต่ถ้ามีการควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ของสีที่สกัดได้ อาจจะสามารถใช้เทคนิคนี้ในการศึกษาการหาค่าการติดสีของสีธรรมชาติบนกระดาษรีไซเคิลได้

บทที่ 3
สารเคมี อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

a. Rotary evaporator, Buchi Rotovapor R-124

b. UV spectrophotometer, Parmacia Biotech

c. Autoclave. Hirayama, Scientific promotion Co.,LTD.

d. Lamina air flow, Jafelab

e. Hot air oven. Memmert, Scientific promotion Co., LTD.

f. Incubater, Scientific promotion Co., LTD

g. Dricycler, Boekel Philadelphia, PA

3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

a. ตัวทำละลาย (Mobile phase) ชนิดต่าง ๆ

- Hexane (C_6H_{14})
- Dichloromethane (CH_2Cl_2)
- Ethyl acetate
- Ethanol (C_2H_3OH)
- Methanol (CH_3OH)
- น้ำกลั่น

b. Ethanol (C_2H_5OH)

c. conc. H_2SO_4

d. Acetic acid (CH_3COOH), AR., Schalau

e. DPPH (2, 2-Diphenyl-1-picry-hydrazyl), SIMA

f. Ascorbic acid R.G., Reag.ACS, Reag.ISO, Reag.Ph.Eur

g. Iron (III) chloride. FeCl3.6H2O, CARLO ERBA

h. 2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine , Fluka

i. Hydrochloric acid, Chemikit Limited Partnership

j. Iron (II) sulphate,AR, Ajax Finechem

k. Dimethyl sulfoxide. Sigma-Aldrich Laborchemikakien GmbH.

l. Brain Heart Infusion agar. HiMedia Laboratories.Limited, Mumbai (Bombay) - 400086, India

m. Gallic acid

n. Folin Ciocalteu's reagent

o. Sodium Carbonate

p. BHT (2, 6-Ditert-butyl-p cresol)

q. Alum (Aluminium potassium sulfate), $AlK(SO_4)_2.2H_2O$

r. Blue Vitriol (Copper sulfate), $CuSO_4.5H_2O$

s. Chrom (Potassium dichromate), $K_2Cr_2O_7$

t. Tin (Stannous chloride), $SnCl_2.2H_2O$

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมพืชตัวอย่างสำหรับทำการสกัด

1. เก็บพืชตัวอย่าง โดยเก็บเอาส่วนใบ

2. ทำการตากลม การตากลมพืชสมุนไพรเพื่อรักษาคุณภาพของสมุนไพรให้ดีที่สุดก่อนทำการสกัด ป้องกันการเน่าเสียจากจุลินทรีย์ และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่อยู่ในพืชสด หรืออบที่อุณหภูมิต่ำ

3. นำพืชสมุนไพรที่ได้มาทำการย่อย ด้วยเครื่องบด (Comminution or pulverization) เพื่อทำให้การสกัดสารที่สำคัญจากพืชได้ผลดี ทั้งนี้เพื่อให้พื้นที่สัมผัสระหว่างสมุนไพรและตัวทำละลายมีมากขึ้นและสกัดได้องค์ประกอบที่สำคัญออกมามากที่สุด

3.2.2 วิธีการสกัดพืชตัวอย่าง

1. ชั่งน้ำหนักพืชสมุนไพรใบเสม็จหนัก 300.00 g

2. นำสมุนไพรใบเสม็จใส่ในถุงผ้าที่สะอาด มัดปากถุงผ้าให้แน่น

3. ใส่ถุงผ้าที่มีสมุนไพรว่านใบเสม็จ ลงในโถแก้ว แล้วทำการสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ดังนี้

- แช่ด้วย Hexane (C_6H_{10}) pure ปริมาตร 3,000 ml ต่อครั้ง เป็นเวลาประมาณ 3, 2และ 2 วัน/ครั้ง และ กรองสารละลายแล้วนำสารละลายที่กรองได้ ไปทำการระเหยตัวทำละลายออก ด้วยเครื่อง Rotary evaporator แล้วเก็บสารตัวอย่างไว้ทำการวิเคราะห์ต่อไป

- แช่ด้วย Dichloromethane (CH_2Cl_2) pure ปริมาตร 3,000 ml ต่อครั้ง เป็นเวลาประมาณ 3, 2 และ 2 วัน /ครั้ง กรองสารละลายแล้วนำสารละลายที่กรองได้ ไปทำการระเหยตัวทำละลายออก ด้วยเครื่อง Rotary evaporator แล้วเก็บสารตัวอย่างไว้ทำการวิเคราะห์ต่อไป

- แช่ด้วย Ethyl acetate pure ปริมาตร 3,000 ml เป็นเวลาประมาณ 3, 2 และ 2 วัน/ครั้ง กรองสารละลายแล้วนำสารละลายที่กรองได้ ไปทำการระเหยตัวทำละลายออก ด้วยเครื่อง Rotary evaporator แล้วเก็บสารตัวอย่างไว้ทำการวิเคราะห์ต่อไป

- แช่ด้วย Ethanol (C_2H_5OH) pure ปริมาตร 3,000 ml ต่อครั้ง เป็นเวลาประมาณ 3, 2 และ2 วัน/ครั้ง กรองสารละลายแล้วนำสารละลายที่กรองได้ไปทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator แล้วเก็บสารตัวอย่างไว้ทำการวิเคราะห์ต่อไป

- แช่ด้วย Methanol (CH_3OH) pure ปริมาตร 3,000 ml ต่อครั้ง เป็นเวลาประมาณ 3, 2, และ 2 วัน/ครั้ง กรองสารละลายแล้วนำสารละลายที่กรองได้ ไปทำการระเหยตัวทำละลายออก ด้วยเครื่อง Rotary evaporator แล้วเก็บสารตัวอย่างไว้ทำการวิเคราะห์ต่อไป

3.2.3 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH method

3.2.3.1 เตรียมสารละลายในแต่ละส่วนที่สกัดได้ คือ

1) สกัดได้จาก Hexane (C_6H_{10}) pure
2) สกัดได้จาก Dichloromethane (CH_2Cl_2) pure
3) สกัดได้จาก Ethyl acetate pure
4) สกัดได้จาก Ethanol (C_2H_5OH) pure
5) สกัดได้จาก Methanol (CH_3OH) pure
6) BHT (2, 6-Ditert-butyl-p cresol)
7) Ascorbic acid

แล้วนำสารสกัดที่ต้องการทดสอบ มาเตรียมเป็นความเข้มข้น 100, 50, 25 แล 12.5 ตามลำดับ

3.2.3.2 เตรียมสารละลาย Mathanolic DPPH radical 0.2 mM โดยการชั่งสาร DPPH หนัก 4 mg ละลายด้วย Methanol แล้วปรับปริมาตรเป็น 50 ml

3.2.3.3 ปิเปต 0.5 ml ของสารละลายตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้น ใส่ลงในขวด 3 ใบ เพื่อทำการทดสอบ 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย

3.2.3.4 ปิเปต 0.1 ml ของ methanolic DPPH radical ในขวดต่าง ๆในข้อ 3

3.2.3.5 เขย่าให้สารละลายเข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดประมาณ 30 นาที

3.2.3.6 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น λ 517 nm ด้วยเครื่อง UV spectrophotometer

3.2.3.7 วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย standard DPPH radical (0.5 ml solvent ที่ใช้ในสารละลายส่วนสกัดรวมกับ 1 ml ของ 0.2 มิลลิโมล mathanolic DPPH radical)

3.2.3.8 คำนวณค่า % Radical scavenging จากสมการ ดังนี้

$$\% \text{ Radical scavenging} = \frac{A_{control} - A_{Sample}}{A_{Control}} x100$$

3.2.3.9 หาค่า IC_{50} จากความสัมพันธ์ของกราฟที่ได้

3.2.4 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP)

3.2.4.1 การเตรียมสารละลายเพื่อทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Ferric reducing /antioxidant power assay (FRAP)

1) Acetate Buffer (300 mM, pH 3.6): โดยการชั่ง 3.1 g Sodium acetate.$3H_2O$, glacial acetate acid 16 ml ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 L ผสมให้เข้ากันและนำเอาไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C

2) Dilute HCl 40 mM **:** 3.33 mL conc. HCl (12 M), น้ำกลั่น 1 L ผสมให้เข้ากันแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3) TPTZ (2,4,6-tri[2-pyridyl]-s-triazine) 10 ml **:** 0.031 g TPTZ ละลายใน 40 mM ของ HCl ละลายใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 ^{o}C (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

4) Ferric chloride (20 mM) **:** 0.054 g $FeCl_3$.$6H_2O$ ละลายโดยน้ำกลั่น 10 mL (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

5) การเตรียมสารละลาย FRAP reagent : โดยการนำเอาสารละลาย acetate buffer, TPTZ และ ferric chloride ในปริมาตร 100, 10 และ 10 mL ตามลำดับแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนนำมาใช้

3.2.4.2 วิธีการวิเคราะห์ความสามารถการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Ferric reducing /antioxidant power assay (FRAP)

1) ทำการปิเปตสารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่างๆ และสารละลายมาตราฐานปริมาตร 150 µL ใส่ในขวดสีชาขนาด 5 mL แล้วเติมสารละลาย FRAP ปริมาตร 3 mL เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 6 นาที

2) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm

3) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานที่สร้างจากความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Iron (II) sulfate solution กับค่าการดูดกลืนแสง

3.2.4.3 การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลาย Ferrous sulphate

ทำการเตรียมสารละลาย Ferrous sulphate ที่มีความเข้มข้น 1 mM โดยการนำสาร $FeSO_4.7H_2O$ จำนวน 0.278 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 10 mL แล้วทำการเจือจางสารละลาย (dilution) เพื่อสร้างกราฟ Standard ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงการเจือจางสารละลายในการทำกราฟมาตรฐาน

Standard concentration (µM)	Ferrous sulphate (mL)	Distilled water
100	1	9
200	2	8
400	4	6
600	6	4
800	8	2
1000	10	0

นำสารละลาย Ferrous sulphate แต่ละความเข้มข้นไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานเทียบกับความเข้มข้น

3.2.5 การวิเคราะห์หาปริมาณ Total polyphenol

1. ทำการเตรียมสารละลาย Folin ciocaltue reagent เข้มข้น 0.2 M โดยปิเปต Folin ciocaltue reagent เข้มข้น 0.2 M 10 ml ละลายด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml

2. ทำการเตรียมสารละลาย Sodium carbornate เข้มข้น 7.5 g/l โดยชั่ง Sodium carbornate จำนวน 0.75 g ละลายด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml

3. ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกเข้มข้น 100 µg/ml โดยชั่งกรดแกลลิก จำนวน 0.0100 g ละลายด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml นำมาเจือจางให้มีความเข้มข้นในช่วง 10-100 µg/ml

4. เตรียมสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml โดยชั่งสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม 0.0050 g ละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml

5. ปิเปตสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามที่ความเข้มข้นต่างๆ 1 ml

6. เติมสารละลาย Folin ciocaltue reagent 2.5 ml ทุกหลอด

7. เติมสารละลาย Sodium carbornate 2 ml ทุกหลอด

8. หลังจากนั้นทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที ในที่มืด

9. จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,300 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที

10. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

11. จากนั้นนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโดยใช้กรดแกลลิกที่ทราบความเข้มข้นเป็นสารละลายมาตรฐาน

3.2.6 วิธีการทดสอบการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

3.2.6.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

การเตรียมอาหารที่จะทำการทดสอบความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยใช้อาหารสำเร็จรูป Brain Heart Infusion agar สามารถเตรียมได้โดยการชั่งอาหารสำเร็จรูป 50 g ละลายในน้ำกลั่น 1,000 mL แล้วนำไปต้มจนเดือด จากนั้นเทในลงขวดรูปชมพู่แล้วทำการฆ่าเชื้อโดยใช้เครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121º C เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ข้ามคืน

หลังจากนั้นนำอาหารที่แข็งตัวมาละลายแล้วเทใส่จานเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (ต้องทำในเครื่อง Lamina air flow เพื่อป้องกันการปนเปื้อนเชื้อที่อยู่ในอากาศ)

3.2.6.2 การเตรียมสารสกัดเพื่อนำไปทดสอบความสามารถต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

ในการทดสอบความสามารถต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโดยนำสารสกัดแต่ละตัวมาเตรียมเป็นความเข้มข้น 2,000, 1,000 และ 500 ppm โดยชั่งสารตัวอย่างมา 20 mg แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 mL จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 2,000 ppm ปิเปตออกมา 5 mL ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 mL แล้วปรับปริมาตร จะได้สารที่มีความเข้มข้น 1,000 ppm จากนั้นปิเปตออกมา 5 mLใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 mLปรับปริมาตรจะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 500 ppm

3.2.6.3 วิธีการทดสอบความสามารถต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

1) นำอาหาร Brain Heart Infusion agar ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3.6.1 ที่อยู่ในจานเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ปิเปตน้ำที่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 0.1 mL วางบนอาหาร นำเอาเชื้อแบคทีเรีย 1 loop ใส่ในน้ำแล้วเขี่ยเชื้อให้เต็มจาน

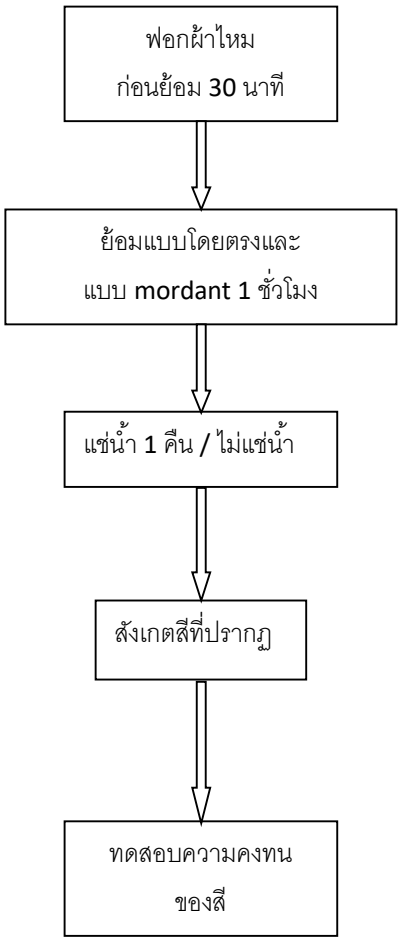
2) นำเอา Paper disc ที่ใส่สารตัวอย่างแต่ละตัวมาวางบนจานเลี้ยงเชื้อ

3) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วัด Clear Zone

3.2.7 การย้อมสีไหม

สำหรับการย้อมสีของไหม คณะผู้วิจัยเลือกใช้ทั้งเทคนิคการย้อมแบบโดยตรง (Direct dyes หรือ Substantive dyes) และแบบมอร์แดนท์ (Mordant dyes) โดยสารที่ใช้เป็นมอร์แนท์ได้แก่ Alum (Aluminium potassium sulfate; $AlK(SO_4)_2.2H_2O$), Blue Vitriol (Copper sulfate; $CuSO_4.5H_2O$),และ Chrom (Potassium dichromate; $K_2Cr_2O_7$) และ stannous chloride ($SnCl_2$) โดยใช้เทคนิคการย้อมแบบร้อนที่แช่น้ำ 1 คืนและไม่แช่น้ำ ตลอดจนเพิ่มความคงทนและป้องกันสีตกด้วยสนิมเหล็ก ได้ผลดังข้อ 4.8 (บทที่ 4)

แสดงขั้นตอนการย้อมได้ดังนี้



บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 บทนำ

ในบทนี้คณะผู้วิจัยได้เก็บรวบรวมข้อมูลที่สำคัญในด้านต่าง ๆ จากการทดลองดังนี้

4.1.1 น้ำหนักของสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ

4.1.2 ผลของการศึกษาหาความยาวคลื่นที่สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุด

4.1.3 ผลการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแต่ละชนิด

4.1.4 ผลการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP

4.1.5 การวิเคราะห์ปริมาณของ phenolic Content

4.1.6 Antibacterial Activities

4.1.7 ผลการย้อมผ้าไหมของผักเม็ก

4.2 น้ำหนักของสารสกัดที่ได้จากการสกัดตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

หลังจากนำเอาสารตัวอย่างใบเสม็ด (ผักเม็ก) ที่มีน้ำหนัก 300 g แช่ในตัวทำละลายชนิดต่างๆเป็นเวลา 3, 2 และ2 วัน ต่อหนึ่งตัวทำละลายแล้วนำไปทำการลดปริมาตรโดยใช้เครื่อง Rotary evaporator แล้วเก็บไว้ในบีกเกอร์ที่ทราบน้ำหนัก ปล่อยให้สารสกัดแห้ง แล้วนำบีกเกอร์ที่มีสารสกัดบรรจุอยู่ไปชั่งน้ำหนักจะทำให้เราทราบน้ำหนักของสารสกัดที่ได้จากแต่ละตัวทำละลายซึ่งมีค่าดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงน้ำหนักสารสกัดที่ได้จากการสกัดโดยตัวทำละลายชนิดต่างๆ

ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด	น้ำหนักของสารสกัด (g)	สารสกัดหยาบ (%)
Hexane	22.21	5.00
Dichloromethane	60.01	10.20
Ethyl acetate	80.14	15.32
Ethanol	90.03	17.01
Methanol	42.36	9.20

4.3 ผลของการศึกษาหาความยาวคลื่นที่สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุด

จากการศึกษาหาความยาวคลื่นที่สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดของสารสกัดที่ได้จากการสกัดโดยตัวทำละลายชนิดต่างๆได้ผลดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงผลของการศึกษาหาความยาวคลื่นของสารสกัด

ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด	λ_{max} (nm)
Hexane	400
Dichloromethane	350
Ethyl acetate	375
Ethanol	330
Methanol	345

จากตารางพบว่าสารสกัดแต่ละชนิดมี Wavelength ที่แตกต่างกันและแตกต่างจาก λ_{max} ของสารละลาย DPPH ซึ่งมีคา Wavelength เท่ากับ 517 nm ดังนั้นสารที่สกัดจึงสามารถนำไปทำการวิเคราะห์หาค่าการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ได้

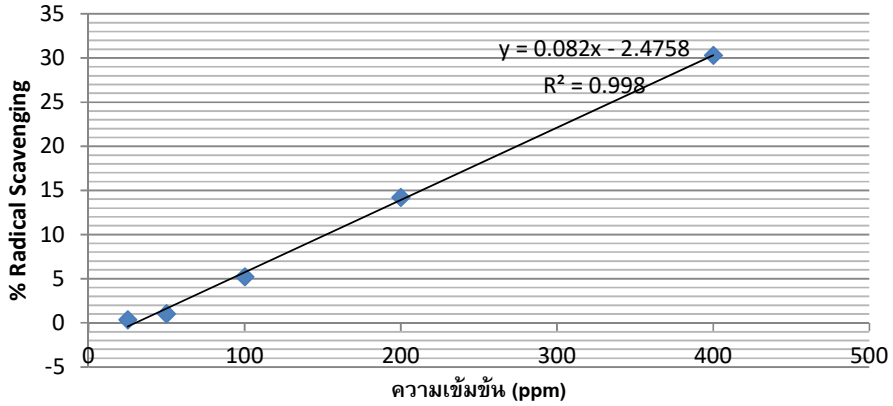
4.4 ผลการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแต่ละชนิด

ผลการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบผักเม็ก โดยวิธี DPPH แสดงผลการทดลองเป็นเปอร์เซ็นต์การจับอนุมูลอิสระ (% Scavenging effect) เป็นผลมาจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย DPPH กับสารสกัดหยาบ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ λ_{max} 517 nm ซึ่งเป็นค่า Wavelength ที่สารละลาย DPPH สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุด ดังนั้นค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH เปลี่ยนไปแสดงว่า สารมีสมบัติเป็นแอนติออกซิแดนต์โดยการเข้าทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH ซึ่ง DPPH free radical ได้รับอิเล็กตรอนหรืออนุมูลอิสระไฮโดรเจน จากสารสกัดใบเสม็ด (ผักเม็ก) ทำให้เกิดการเสถียร แล้วเปลี่ยนไปเป็นอะตอมอิสระต่อไป ซึ่งสามารถสังเกตได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ λ_{max} 517 nm จะลดลงแล้วนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปซึ่งมีค่าเท่ากับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจะได้ผลการทดลองดัง**ตารางที่ 4.3**

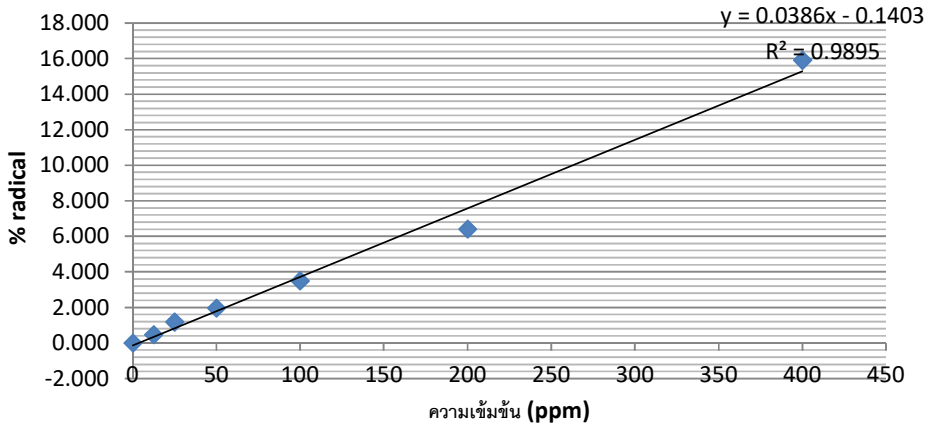
ตารางที่ 4.3 ผลการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผักเม็กแต่ละตัวทำละลายด้วยเทคนิค DPPH

ชนิดของสารสกัด	ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดคลื่นแสงที่ความยาวคลื่นที่ 517 nm			$\bar{x}$ ± SD	Radical Scavenging activity (%)
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
Crude Hexane	400.00	1.737	1.735	1.726	1.733±0.006	30.305
	200.00	1.685	1.773	1.705	1.721±0.046	14.204
	100.00	1.647	1.644	1.653	1.648±0.005	5.233
	50.00	1.491	1.494	1.491	1.492±0.002	1.046
	25.00	1.212	1.212	1.212	1.212±0.00	0.345
	12.50	0.870	0.894	0.869		
Crude Dichloromethane	400.00	1.678	1.673	1.683	1.678±0.005	15.896
	200.00	1.668	1.667	1.662	1.666±0.003	6.407
	100.00	1.650	1.657	1.652	1.653±0.004	3.499
	50.00	1.626	1.634	1.620	1.627±0.007	1.957
	25.00	1.581	1.571	1.583	1.578±0.006	1.186
	12.50	1.395	1.420	1.440	1.418±0.023	0.474
	0					0.000
Crude Ethyl acetate	100.00	1.276	1.287	1.288	1.284±0.007	81.469
	50.00	1.121	1.132	1.128	1.127±0.006	44.895
	25.00	0.785	0.786	0.794	0.788±0.005	21.189
	12.50	0.262	0.255	0.279	0.265±0.012	9.930
	0					0.000
Crude Ethanol	200.00	1.696	1.693	1.693	1.694±0.002	95.549
	100.00	1.681	1.685	1.688	1.685±0.004	23.858
	50.00	1.612	1.611	1.621	1.615±0.006	4.154
	25.00	1.274	1.285	1.291	1.283±0.009	2.143
	12.50	0.085	0.071	0.069	0.075±0.009	0.546
Crude Methanol	100.00	1.257	1.259	1.250	1.255±0.005	88.223
	50.00	1.062	1.067	1.074	1.068±0.006	50.964
	25.00	0.720	0.709	0.708	0.712±0.007	26.446
	12.50	0.171	0.175	0.168	0.171±0.004	13.567
	0					

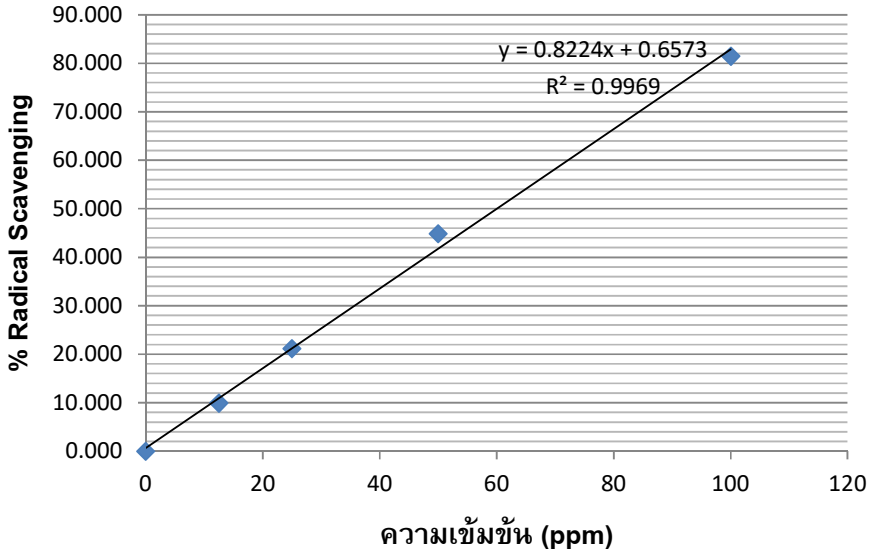
จากตารางที่ 4.3 พบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแต่ละตัวจะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารตัวอย่างนั้นๆ และเมื่อเรานำค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมาสร้างกราฟเปรียบเทียบกับความเข้มข้นจะได้กราฟเป็นเส้นตรง ดังนี้



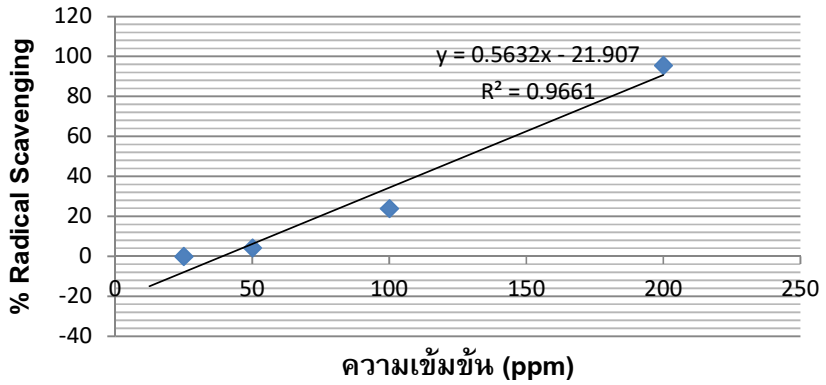
รูปที่ 4.1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % Radical Scaving กับความเข้มข้นของ Crude Hexane ของผักเม็ก



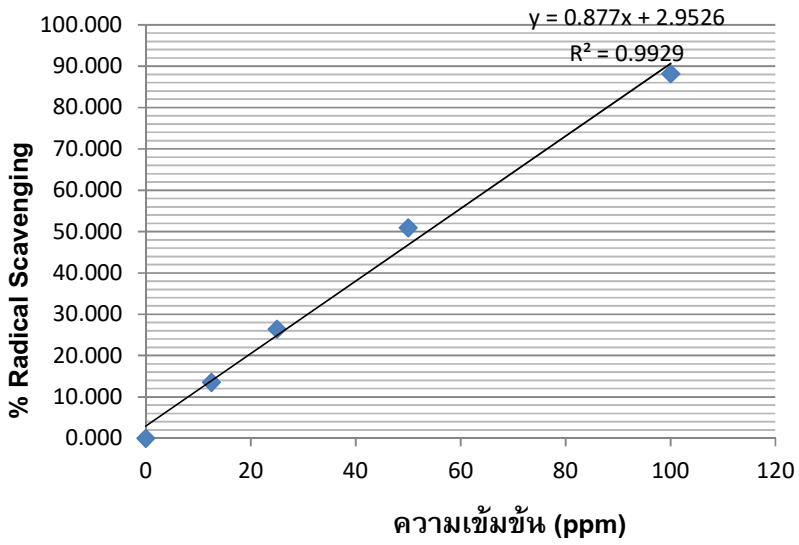
รูปที่ 4.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % Radical Scaving กับความเข้มข้นของ Crude Dichloromethane



รูปที่ 4.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % Radical Scaving กับความเข้มข้นของ Crude Ethyl acetate



รูปที่ 4.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % Radical Scaving กับความเข้มข้นของ Crude Ethanol



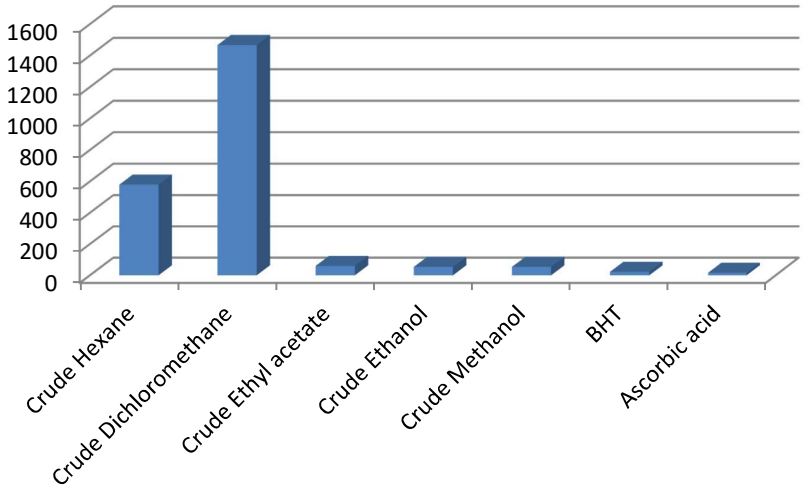
ภาพที่ 4.5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % Radical Scaving กับความเข้มข้นของ Crude Methanol

จากรูปที่ 4.1-4.5 นำมาคำนวณหาค่า IC_{50} ซึ่งเป็นความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ $DPPH^{\cdot}$ ลดลงได้ 50% ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงค่า IC_{50} ของสารตัวอย่างในการต้านอนุมูลอิสระ

สารตัวอย่าง	IC_{50} (Inhibitory Concentration 50%)
Crude Hexane	579.573
Crude Dichloromethane	1466.941
Crude Ethyl acetate	60.078
Crude Ethanol	53.650
Crude Methanol	53.647
BHT	22.310
Ascorbic acid	16.012

เมื่อนำค่า IC_{50} (Inhibitory Concentration 50%) ของสารตัวอย่างมาสร้างกราฟเปรียบเทียบกับสารอนุมูลอิสระมาตรฐานคือ Ascorbic acid และ BHT จะได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 แสดงการเปรียบเทียบค่า IC_{50} (Inhibitory Concentration 50%) ของสารตัวอย่างกับอนุมูลอิสระมาตรฐาน

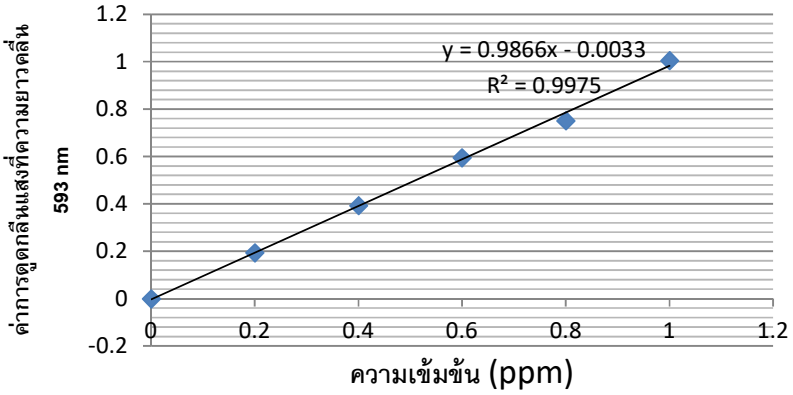
4.5 ผลการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP

หลังจากนำสารละลาย Iron(II)sulphate ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm จะได้ค่าการดูดกลืนแสงดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.5 แสดงค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ของสารมาตรฐาน Fe^{2+} ที่ความยาวคลื่น 593 nm

Standard concentration (mM)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 nm
0.0	0.000
0.1	0.060
0.2	0.111
0.4	0.202
0.6	0.311
0.8	0.403
1.0	0.503

Standard curve ของ FRAP technique สำหรับผักเม็ก



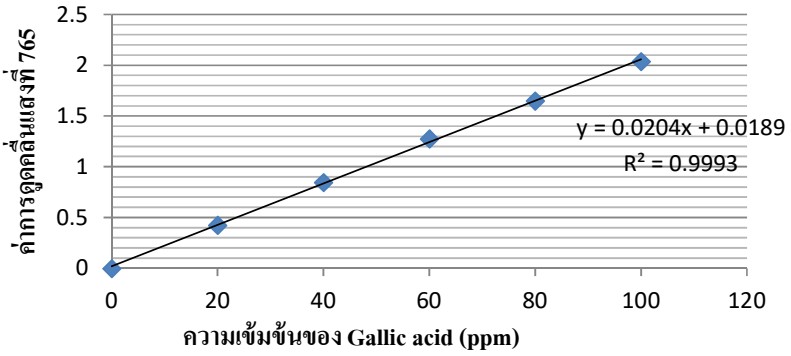
รูปที่ 4.7 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP

จากการศึกษาค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง พบว่าค่าการดูดอยู่กลืนแสงที่ได้อยู่ในช่วงของกราฟมาตรฐานและคำนวณหาค่าความเข้มข้นของ Fe^{2+} ที่เกิดขึ้นได้ผลดังตาราง **ที่ 4.6**

ตารางที่ 4.6 แสดงปริมาณของ Fe^{2+} ที่ได้จากการรีดิวซ์ Fe^{3+} โดยสารตัวอย่างในการวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP

สารสกัด	ความเข้มข้น (mM)	ความเข้มข้นของ Fe^{2+} (mM)			
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\bar{x}$ ± SD
Crude Hexane	150	1.293	1.264	1.302	1.286±0.020
	75	1.004	0.928	1.012	0.981±0.046
	37.5	0.786	0.771	0.768	0.775±0.010
	18.75	0.689	0.684	0.698	0.690±0.007
	9.38	0.639	0.658	0.644	0.647±0.010
Crude Dichloromethane	150	1.965	1.975	1.985	1.975±0.010
	75	1.939	1.946	1.952	1.946±0.007
	37.5	1.927	1.937	1.935	1.933±0.005
	18.75	1.925	1.925	1.931	1.927±0.003
	9.38	1.915	1.928	1.944	1.929±0.015
Crude Ethyl acetate	150	2.168	2.171	2.175	2.171±0.004
	75	2.079	2.074	2.086	2.080±0.006
	37.5	1.967	1.933	1.917	1.939±0.026
	18.75	1.621	1.709	1.763	1.698±0.072
	9.38	1.493	1.484	1.477	1.485±0.008
Crude Ethanol	150	2.228	2.208	2.231	2.222±0.013
	75	2.140	2.127	2.139	2.135±0.007
	37.5	2.088	2.091	2.088	2.089±0.002
	18.75	2.047	2.048	2.003	2.033±0.026
	9.38	2.007	2.006	2.056	2.023±0.029
Crude Methanol	150	1.935	1.971	1.941	1.949±0.019
	75	1.816	1.838	1.853	1.836±0.019
	37.5	1.661	1.652	1.656	1.656±0.005
	18.75	1.231	1.162	1.178	1.190±0.036
	9.38	0.849	0.801	0.840	0.830±0.026

4.6 การวิเคราะห์ปริมาณของ Polyphenolic Content



รูปที่ 4.8 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ ปริมาณของ phenolic content

ตารางที่ 4.7 แสดงปริมาณ phenolic content

สาร สกัด	ความ เข้มข้น (mM)	ค่า Absorbance			Phenolic content (ppm)			
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\bar{x}$ ± SD
1#	100	0.430	0.432	0.432	20.600	20.700	20.700	20.667±0.058
	60	0.272	0.275	0.273	12.700	12.850	12.750	12.767±0.076
	20	0.005	0.065	0.065	3.850	3.850	3.850	3.850±0.000
2	100	0.620	0.621	0.621	29.966	29.515	29.515	29.665±0.260
	60	0.441	0.441	0.442	20.691	20.691	20.740	20.707±0.028
	20	0.218	0.217	0.218	9.760	9.711	9.760	9.744±0.028
3	100	0.507	0.509	0.508	23.926	24.026	23.975	23.976±0.050
	60	0.322	0.314	0.323	14.858	14.466	14.907	14.744±0.242
	20	0.106	0.105	0.110	4.270	4.350	4.600	4.450±0.172

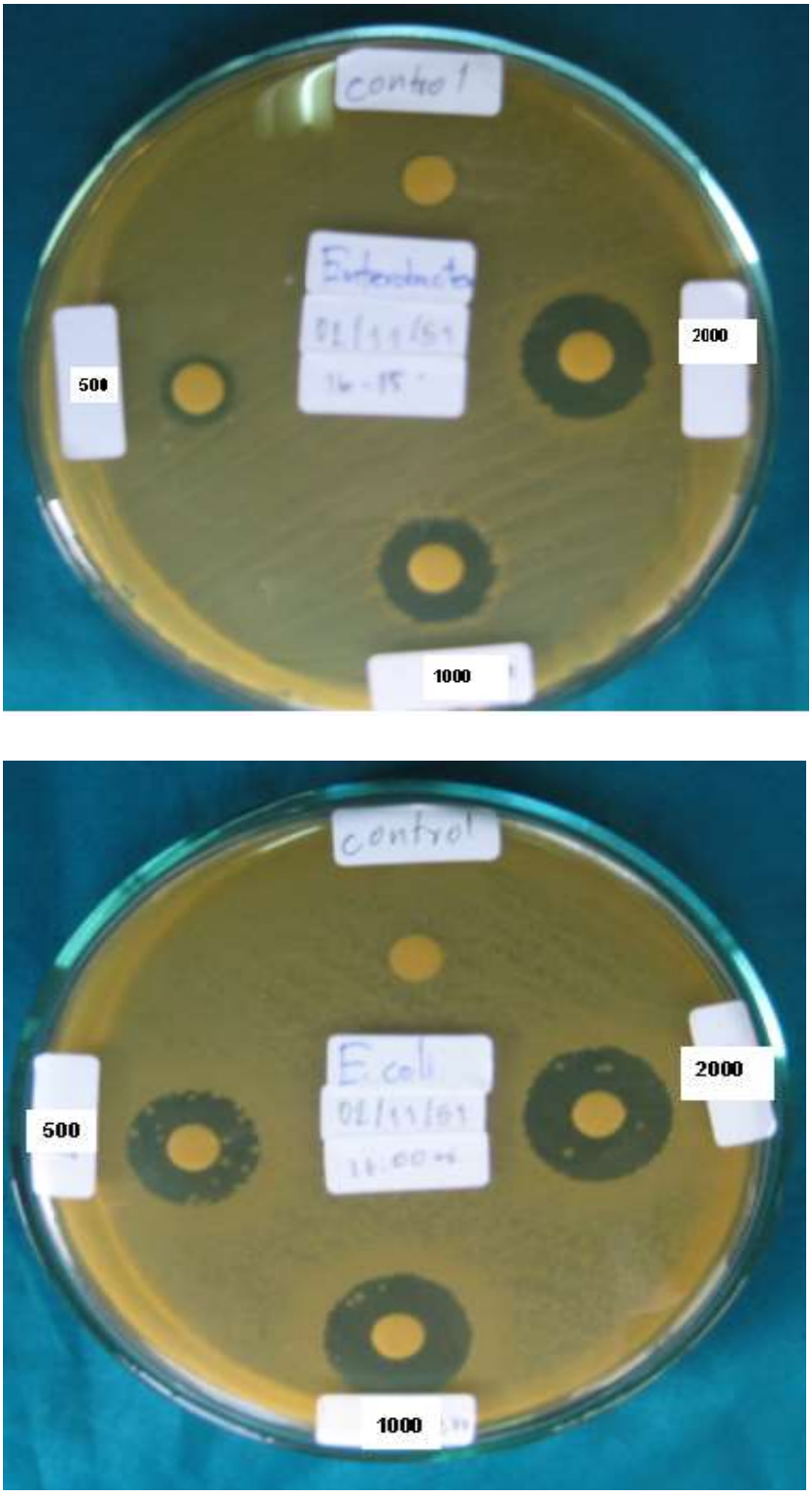
#1. Crude Ethyl acetate 2. Crude Ethanol 3. Crude Methanol

4.7 Antibacterial Activities

เมื่อนำสารสกัดมาเตรียมเป็นความเข้มข้นต่างๆ เพื่อทดสอบการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด ซึ่งได้แก่ *E.coli, Klebsiella spp., Enterobacter spp.* และ *Citrobacter spp.* หลังจากเวลา 48 ชั่วโมงวัด Clear Zone จะได้ผลดัง**ตารางที่ 4.7**

ตารางที่ 4.8 แสดงความสามารถของการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบผักเม็ก

สารสกัด	ความเข้มข้น (ppm)	Clear zone (cm)			
		E.coli	*Klebsiella spp.*	*Enterobacter spp.*	*Citrobacter spp.*
Crude Hexane	control	-	-	-	-
	2000	-	-	-	-
	1000	-	-	-	-
	500	-	-	-	-
Crude Dichloromethane	control	0.0	0.0	0.0	0.0
	2000	0.5	0.7	0.8	0.7
	1000	0.3	0.4	0.6	0.5
	500	0.1	0.2	0.3	0.3
Crude Ethyl acetate	control	0.0	0.0	0.0	0.0
	2000	0.8	0.7	0.6	0.8
	1000	0.5	0.5	0.4	0.6
	500	0.2	0.3	0.2	0.3
Crude Ethanol	control	0.0	0.0	0.0	0.0
	2000	0.9	1.0	0.7	0.9
	1000	0.5	0.7	0.4	0.5
	500	0.2	0.3	0.2	0.3
Crude Methanol	control	0.0	0.0	0.0	0.0
	2000	1.0	0.8	0.9	0.9
	1000	0.6	0.7	0.8	0.7
	500	0.3	0.2	0.4	0.3



รูปที่ 4.9 การต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

4.8 ผลการย้อมผ้าไหมของผักเม็ก

นำสารสกัดผักเม็กจาก Crude Ethanol มาทดสอบการย้อมด้วยเทคนิคการย้อมโดยตรงและการย้อม Mordant ได้ผลดังข้อ 4.8.1 และ 4.8.2

4.8.1 การย้อมโดยตรง **(Direct dyes หรือ Substantive dyes)**

ตารางที่ 4.9 ผลการย้อมแบบโดยตรง

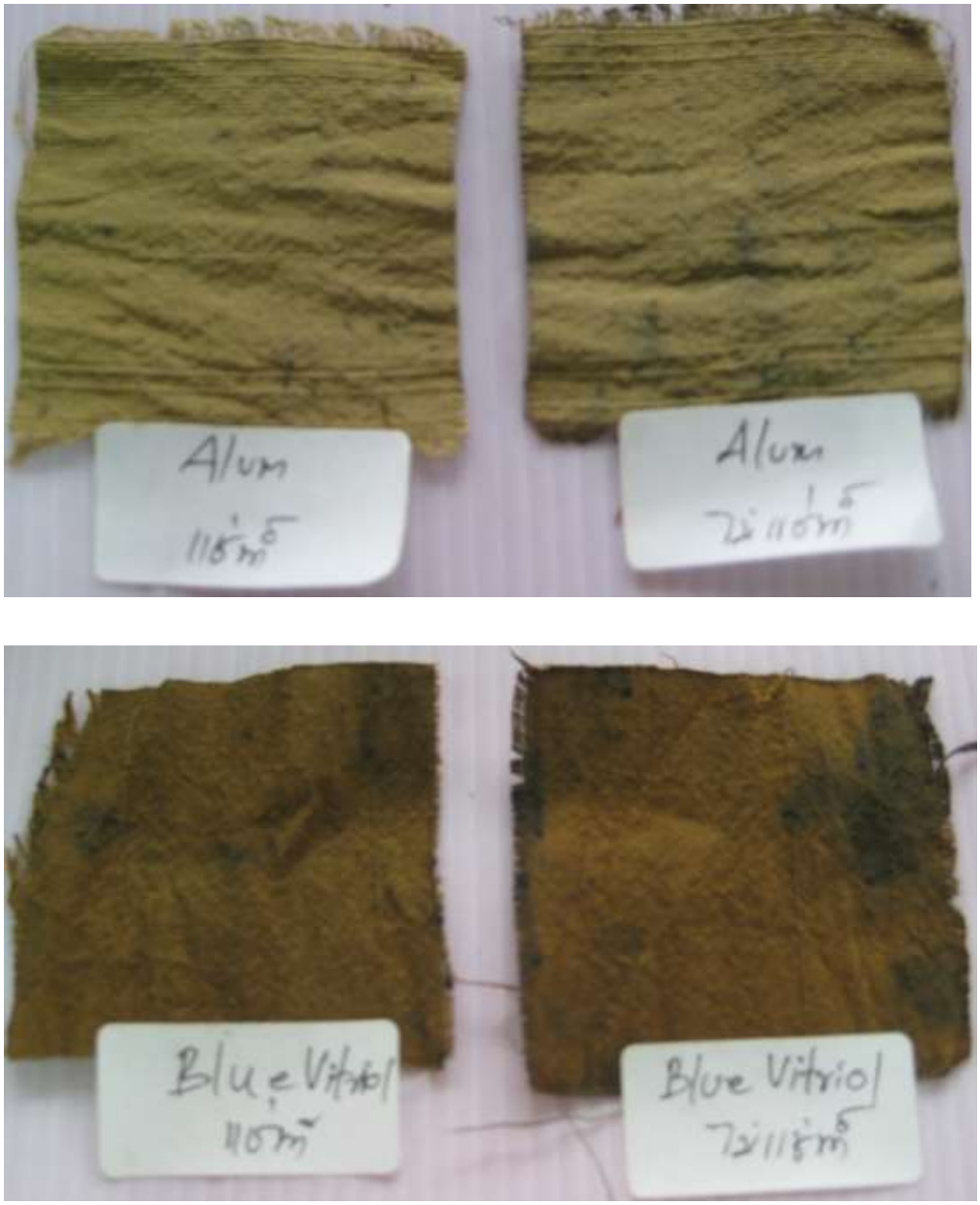
การย้อมแบบโดยตรง	แช่น้ำ 1 คืน	ไม่แช่น้ำ
สีที่ปรากฏ	เขียวเหลือง	เขียวเหลือง
ความคงทน	คงทน	คงทน

รูปที่ 4.10 การย้อมแบบโดยตรง

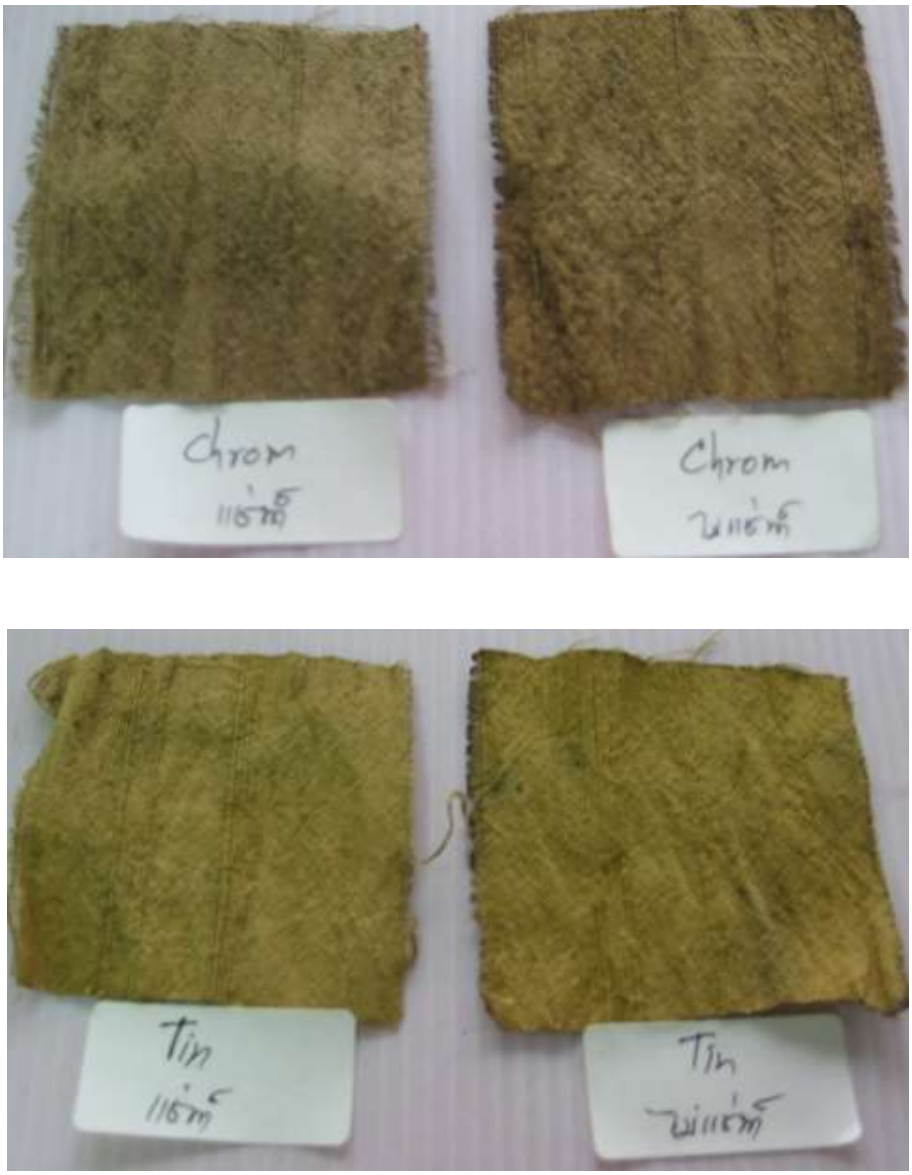
4.8.2 การย้อมแบบมอร์แดนท์ **(Mordant dyes)**

ตารางที่ 4.10 ผลการย้อมแบบมอร์แดนท์

Mordant	Alum		Blue vitriol		Chrom		Tin	
	แช่น้ำ 1 คืน	ไม่แช่น้ำ	แช่น้ำ 1 คืน	ไม่แช่น้ำ	แช่น้ำ 1 คืน	ไม่แช่น้ำ	แช่น้ำ 1 คืน	ไม่แช่น้ำ
สีที่ปรากฏ	เหลือง	เหลือง	น้ำตาลเข้ม	น้ำตาลเข้ม	น้ำตาล	น้ำตาล	เหลืองทอง	เหลืองทอง
ความคงทน	คงทน	คงทน	คงทน	คงทน	คงทน	คงทน	คงทน	คงทน



รูปที่ 4.11 การย้อมแบบมอร์แดนท์



รูปที่ 4.11 การย้อมแบบมอร์แดนท์ (ต่อ)

สรุป ในบทนี้คณะผู้วิจัยได้แสดงให้เห็นถึงผลการทดสอบฤทธิ์ในด้านต่างๆ ของสารสกัดผักเม็ก ได้แก่ ปริมาณ phenolic content การต้านอนุมูลอิสระทั้งเทคนิค DPPH และ FRAP ผลการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและผลการย้อมสีผ้าไหม สามารถสรุปได้ดังบทที่ 5

บทที่ 5

สรุป

วิจารณ์ผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 บทนำ

ในบทนี้คณะผู้วิจัยได้สรุปประเด็นต่างๆ ที่ได้จากการทำวิจัย ได้แก่ phenolic content ที่มีในสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายต่างๆ ทั้งชนิด polar solvents และ non-polar solvents สมบัติทางชีวภาพ (biological activities) ในด้านการต้านอนุมูลอิสระเทคนิค DPPH และ FRAP การต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียซึ่งได้แก่ *E.coli, Klebsiella spp., Enterobacter spp. และ Citrobacter spp.* ตลอดจนผลการย้อมไหมของสีที่สกัดได้

5.2 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การวิจัยครั้งนี้เป็นการเลือกใช้สมุนไพรผักเม็ก (*Kanchanaburi gratum* (Wight) S.W. Mitra, var, gratum) ซึ่งชาวบ้านใช้ยอดอ่อนแก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ แน่น จุกเสียดในท้อง โดยนำใบผักเม็กมาสกัดสารสำคัญด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ ได้แก่ Haxane, Dichloromethane, Ethyl acetate,Ethanol และ Methanol จะได้สารออกฤทธิ์ที่มีปริมาณต่างๆ กัน แล้วนำสารสกัดเหล่านั้นไปศึกษาสมบัติทางชีวภาพต่อไป

การศึกษาปริมาณ phenolic content ในแต่ละส่วนของสารสกัดพบว่ามีปริมาณ phenolic content ที่แตกต่างกัน โดยสารสกัดที่มีปริมาณเรียงตามลำดับจากมากไปหาน้อยคือ สารสกัดจาก Ethanol, สารสกัดจาก Methanolและสารสกัดจาก Ethyl acetate ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับสภาพขั้วนั้นเอง เนื่องจากองค์ประกอบ phenolic เป็นกลุ่มของสารที่มีหมู่ไฮดรอกซิลในโมเลกุลที่มีขั้วจึงละลายออกมาเมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายเหล่านี้

การศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแต่ละส่วนพบว่า สารสกัดหยาบจากตัวทำละลาย Ethyl acetate, Ethanol และ Methanol มีค่า IC_{50} เรียงตามลำดับดังนี้ 60, 53 และ 53 ppm ตามลำดับ ซึ่งมีค่าน้อยและใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน BHT และ Ascorbic acid นั่นแสดงว่าสารสำคัญที่

สกัดออกมาด้วยตัวทำละลายเหล่านี้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูง ส่วนสารสกัดของ Hexane และ Dichloromethane มีค่า IC_{50} สูงเป็น 579 และ 1,466 แสดงว่าประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระมีน้อย โดยเฉพาะของDichloromethane มีค่าน้อยที่สุด ดังนั้นถ้าต้องการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น ใช้เป็นยา เป็นสารต้านการเหม็นหืนเพื่อถนอมอาหาร และเป็นส่วนประกอบของเครื่องสำอางควรสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วพวก Ethyl acetate, Ethanol และ Methanol ซึ่งสอดคล้องกับภูมิปัญญาชาวบ้านที่นิยมสกัดหรือแช่สารที่ต้องการนำปรักษาโรคในตัวทำละลายแอลกอฮอล์ (Ethanol) เพราะหาได้ง่ายและมีพิษน้อยกว่าตัวทำละลายอื่นๆ

ส่วนผลการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค FRAP ก็สอดคล้องกับผลที่ได้จากวิธี DPPH คือสารสกัดของ Ethyl acetate, Ethanol และ Methanol มีประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+} ได้มาก นั่นแสดงว่าสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในใบผักเม็กส่วนหนึ่งเป็นสารในกลุ่ม polyphenolic อย่างแน่นอน ซึ่งเป็นพวก electron rich ที่พร้อมจะ donate ให้กับอะตอมของเหล็ก

สำหรับผลการต้านการเจริญเติบโตของแบคที่เรียก็สอดคล้องกับสมบัติต่างๆ ที่กล่าวข้างต้น คือสารออกฤทธิ์ที่สกัดด้วย Ethyl acetate, Ethanol และ Methanol มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญเติบโตของแบคที่เรียทั้ง 4 ชนิด

ในส่วนของการย้อมสีของผ้าไหมพบว่า เมื่อนำส่วนสกัดของ Ethanol มาทำการย้อมแบบโดยตรงและแบบมอร์แดนท์ที่ให้ความร้อน ทั้งที่แช่น้ำ 1 คืนและไม่แช่น้ำจะได้เฉดสีโซนเหลืองทองที่สวยงามติดทนโดยมีสนิมเหล็กเป็นตัวช่วยให้เกิดคุณสมบัตินี้ซึ่งสอดคล้องกับภูมิปัญญาชาวบ้าน (โสภา สิมะรักษ์อำไพ และคณะ, 2551)

5.3 ข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองที่ได้จากการงานวิจัยในครั้งนี้มีสิ่งที่น่าสนใจคือ

- เมื่อต้องการสกัดสารออกฤทธิ์ทางงชีวภาพควรใช้ตัวทำละลายพวก Ethyl acetate, Ethanol และ Methanol

- ควรทำการศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติม เช่น สมบัติในการต้านเชื้อรา สมบัติในการถนอมอาหาร

การนำไปช้รักษาโรคอื่นๆ ตลอดจนการนำไปเป็นส่วนประกอบของเครื่องสำอาง และการย้อมผ้าที่มีสมบัติพิเศษคือนอกจากจะทำให้เกิดสีตามที่ต้องการแล้วยังทำให้ได้ผ้าที่ไม่เกิดราหรือแบคทีเรียได้ง่าย เป็นต้น

- ในการวิจัยครั้งต่อไปควรนำส่วนสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สูงๆ เหล่านั้นมาทำให้บริสุทธิ์ หาสูตรโครงสร้าง ตลอดจนหาแนวทางเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพของ lead compounds เหล่านั้น

- เมื่อต้องการให้ได้ผ้าไหมมีสีเหลืองทองควรย้อมด้วยสารสกัดจากใบผักเม็ก ที่สกัดด้วย Ethanol และควรขยายสเกลในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

เทียนศักดิ์ เมฆพรรณโอกาส และคณะ. 2543. **การศึกษาการเป็นสีย้อมของพืชบางชนิดในท้องถิ่น**. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

นาถธิดา วีระปรียากูร. 2550. การทดสอบความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ (DPPH). มหาวิทยาลัยขอนแก่น: คณะเภสัชศาสตร์.

ปิยนุช ทองผาสุก. ผลของรังสีแกรมมาต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารเคอร์คูมินอยด์ในขมิ้นชัน. **ในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีนิวเคลียร์ครั้งที่ 10: 16-17 สิงหาคม 2550**. กรุงเทพฯ

พรรณี เด่นรุ่งเรื่อง. 2550.กรุงเทพฯ: ฤทธิ์การการต้านอนุมูลอิสระของเปลือกต้นวงศ์อบเชย. ใน**รายงานผลงานวิจัย ประจำปี 2550**. สำนักงานวิจัยการจัดการป่าไม้และผลิตผลป่าไม้

รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2547. **การตรวดสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร.** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิไลลักษณ์ ศรีสุระ.(2551): Online. จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับอาหาร. ค้นจาก http://www.halalthailand.com/healthy/subindex.php?page=content&category=&subcategory=&id=60

สรรพคุณและขนาดการใช้ใบว่านลิง (พญาวานร,ฮว่านง็อก). (2551) Online. ค้นจาก http://blog.sanook.com/Default.aspx?alias=medplant.

อัจฉราพร ไศละสูต. 2527. **คู่มือการย้อมสี**. พิมพ์ครั้งที่ 2. เทคนิค 19 การพิมพ์ : กรุงเทพฯ.

อุไรลักษณ์ คุณสิงห์ **การศึกษาการย้อมกระดาษรีไซเคิลด้วยสีธรรมชาติ.** มหาวิทยาลัยขอนแก่น: ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์
ค้นจาก www.google.co.th.2552.

โอภา วัชระคุปต์.2549. **สารต้านอนุมูลอิสระ.** กรุงเทพฯ : พี.เอส.พริ้นท์, 2549.

Alexander V. Maksimenko. 2005. Experimental Antioxidant Biotherapy for Protection of the Vascular Wall by Modified Forms of Superoxide Dismutase and Catalase. **Current Pharmaceutical Design,** 11: 2007-2016.

Connor, A.M., Luby, J.J., Tong, C.B.S., 2002. Variability in antioxidant activity in blueberry and correlations among different antioxidant activity assays. **Journal of the American Society for HorticulturalScience.** 127: 238–244.

Kriengsak Thaipong, Unaroj Boonprakob.2006. Comparison of ABTS, DPPH, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food composition and analysis**, 19: 669-675.

Luximon-Ramma, A., Bahorun, T., Crozier, A., 2003. Antioxidant actions and phenolic and vitamin C contents of common Mauritian exotic fruits. **Journal of the Science of Food and Agriculture,** 83: 496–502.

Miean, K.H., Mohamed, S., 2001. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 49: 3106–3112.

Nilesh Kumar Sharma, Sreela Dey, Ramasare Prasad(2007).In vitro antioxidant potential evaluation of *Euphorbia hirta* L**. Pharmacology online**, 1:91-98.

Om Prakash Tiwari, Yamine B. Tripathi .2007.Antioxidant properties of different fraction of *Viten negundo* Linn. **Food Chemistry**, 100: 1170-1176.

Talcott, S.T., Howard, L.R., 1999. Phenolic autoxidation is responsible for color degradation in processed carrot puree**. Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 47: 2109–2115.

Temple, N.J., 2000. Antioxidants and disease: more questions than answers. **Nutrition Research**, 20:449–459.

http://www.tkc.go.th/thesis/abstract.asp?item_id=9870

http://irrigation.rid.go.th/rid8/royal_coin/electrical/illumination/color.html

http://www.panyathai.or.th/wiki/index.php/%E0%B8%97%E0%B8%A4%E0%B8%A9%E0%B8%8E%E0%B8%B5%E0%B8%AA%E0%B8%B5