



การสกัด และการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรฮว่านจื๊อ
Extraction and Biological Evaluation of *Pseuderatherum platiferum*

โดย

ดร. สมหมาย ปะติตังโง

และคณะ

คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

2551



การสกัด และการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรว่านจ็อก

Extraction and Biological Evaluation of *Pseuderatherum platiferum*

ดร. สมหมาย	ปะติตังโง
ผศ.สุเทพ	เทียนวรรณ
อ.จิตรี	ภูตระกูล
อ.สืบศักดิ์	ก้อนคำดี
อ.สุวรรณา	จันทนา

คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

2551

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้เป็นการศึกษาการสกัด และการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดสมุนไพร
ฮว่านจื๊อ โดยทำการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและความสามารถในการต้านการ
เจริญเติบโตของแบคทีเรียเพื่อเป็นแนวทางในการที่จะนำไปรักษาโรคต่างๆ หรือทำการต่อขยายผลผลิตยารักษา
โรค

การวิจัยครั้งนี้เล่มนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีเนื่องจากทางมหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ และคณะ
วิทยาศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ทั้งทางด้านเครื่องมือ อุปกรณ์การทดลอง สถานที่ทำการทดลอง สารเคมี
รวมทั้งเอกสารต่างๆ ที่ใช้ในงานวิจัย จนทำให้รายงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบคุณนางสาวเพ็ญ
พรหมวงศ์, นางสาวดุจเดือน ชีวจร และนางสาวพิศุลทอง สีนสุพรรณเพียง ที่ได้เสียสละเวลาอันมีค่ามาช่วย
ทำงานวิจัยตั้งแต่แรกจนจบ

ขอขอบพระคุณบิดา - มารดาที่ช่วยเป็นกำลังใจให้ต่อสู้งานวิจัยได้ประสบผลสำเร็จด้วย

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

การวิจัยในครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อทำการศึกษาศักดิ์ และวิธีการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากสมุนไพรสมุนไพรโดยการนำพืชสมุนไพรแห้งหนัก 588.39 g แช่ในตัวทำละลายอินทรีย์ได้แก่ Hexane, Dichloromethane, Ethyl acetate, Ethanol และ Methanol ปริมาตร 600 ml ต่อครั้งซึ่งแช่จำนวน 3 ครั้ง (ระยะเวลา 3, 2 และ 2 วัน) แล้วทำการลดปริมาตรด้วยเครื่อง Rotary evaporator จะได้สารสกัดที่มีน้ำหนัก 29.12, 60.01, 90.14, 100.03 และ 42.36 g ตามลำดับ นำสารสกัดแต่ละตัวมาทำการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH method, FRAP method และทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียชนิด *E.Coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.* และ *Citrobacter* พบว่าสารสกัดหยาบจากใบสมุนไพรโดยการนำพืชสมุนไพรแห้งหนัก 588.39 g แช่ในตัวทำละลาย Hexane, Dichloromethane, Ethyl acetate, Ethanol และ Methanol มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 12520.00, 1468.46, 768.66, 656.27 และ 917.07 ppm ตามลำดับ ในขณะที่เดียวกัน การทดสอบความสามารถการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP method พบว่าสารสกัดหยาบที่มีความสามารถในการรีดิวซ์มากที่สุดคือ Crude Dichloromethane สามารถรีดิวซ์ได้ Fe^{2+} ปริมาณ 0.228 ± 0.007 , 0.471 ± 0.005 , 0.947 ± 0.007 mM และรองลงมาเป็น Ethyl acetate ซึ่งมีปริมาณ Fe^{2+} เท่ากับ 0.158 ± 0.007 , 0.509 ± 0.005 , 0.936 ± 0.005 และ Methanol ซึ่งมีปริมาณ Fe^{2+} เท่ากับ 0.061 ± 0.012 , 0.419 ± 0.007 , 0.776 ± 0.007 รองลงมาอีกจะเป็นสารสกัดหยาบ Crude Ethanol ซึ่งมีปริมาณ Fe^{2+} เท่ากับ 0.064 ± 0.005 , 0.109 ± 0.002 , 0.250 ± 0.007 และสุดท้ายจะเป็น Crude Hexane มีปริมาณ Fe^{2+} เท่ากับ 0.130 ± 0.007 , 0.185 ± 0.005 , 0.248 ± 0.007 ที่ความเข้มข้น ที่ความเข้มข้น 250, 500, 1000 ppm ตามลำดับ ส่วนผลของการทดสอบความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียพบว่า *E.Coli* ไม่มีสารสกัดใดที่สามารถต้านได้ และสารสกัดหยาบ Dichloromethane และ Methanol สามารถต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.* และ *Citrobacter* ได้ดี แต่สารสกัดหยาบจาก Ethanol สามารถต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ดีเฉพาะ *Klebsiella spp.*, *Citrobacter* เท่านั้น ในขณะที่สารสกัดหยาบ Hexane, Ethyl acetate ไม่มีความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดใดเลย

Abstract

This project deals with extraction and biological evaluation of *Pseuderatherum platiferum*. The solvent that used for extraction were hexane, dichloromethane, ethyl acetate, ethanol and methanol by taking the dry *Pseuderatherum platiferum* 588.39 g ferment with the organic solvent three times for 3, 2 and 2 day respectively . Crude extracts of *Pseuderatherum Platiferum* were analyzed for antioxidant and antimicrobial activity. The DPPH and FRAP assays were used for determining all *Pseuderatherum Platiferum* extract's antioxidant activity. Total antioxidant activity of *Pseuderatherum Platiferum* extract by which DPPH assay has IC_{50} 656.270 ppm of ethanol extract. It was the best antioxidant. The other extracts like ethyl acetate, methanol, dichloromethane, hexane extract's IC_{50} 768.660, 917.070, 1468.460 and 12520.000 ppm, respectively. For total antioxidant activity of *Pseuderatherum Platiferum* extract by FRAP assays get the highest ferrous concentration were 0.228 ± 0.007 , 0.471 ± 0.005 , 0.947 ± 0.007 mM at 250, 500, 1000 ppm of ethyl acetate extract. The some of bacterias like *E.Coli*, *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp* and *Citrobacter* were uses for determining all *Pseuderatherum Platiferum* extract agains microbacterals. All *Pseuderatherum Platiferum* extract weren't inhibit of *E.coli* but dichloromethane extract and methanol extract could inhibit *Klebsiella spp*, *Etherobacter spp* and *Citrobacter* whereas hexane and ethyl acetate extract couldn't inhibit any bacteria in the ranges of concentration uses.

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ในการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 บทนำ	3
2.2 พืชสมุนไพร	4
2.3 เชื้อแบคทีเรีย	7
2.4 อนุมูลอิสระ (Free Radical)	11
2.5 ชนิดและการเรียกชื่ออนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง	12
2.6 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)	13
2.7 การศึกษาความสามารถการต้านอนุมูลอิสระรวม (Total Antioxidant Capacity)	16
2.8. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	23
บทที่ 3 สารเคมี อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์	25
3.2 สารเคมี	25
3.3 วิธีการทดลอง	26

สารบัญ (ต่อ)

3.3.1 การเตรียมพืชตัวอย่างสำหรับการสกัด	26
3.3.2 วิธีการสกัดพืชตัวอย่าง	26
3.3.3 การวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารสกัด	27
3.3.4 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH method	27
3.3.5 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Ferric reducing /antioxidant power assay (FRAP)	28
3.3.6 การทดสอบการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย	30
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปราย	
4.1 น้ำหนักของสารสกัดที่ได้จากการสกัดในแต่ละตัวทำละลาย	31
4.2 ผลของการศึกษาหาความยาวคลื่นที่สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุด	31
4.3 ผลการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแต่ละชนิด	32
4.4 ผลของการคำนวณหา IC_{50}	37
4.5 ผลการทดสอบความสามารถการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP	38
4.6 ผลการต้านแบคทีเรีย	40
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผล	
5.1 สรุปผลการทดลอง	42
5.2 ข้อเสนอแนะ	43
ภาพผนวก	44
เอกสารอ้างอิง	50

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
ตารางที่ 2.1 แสดงวิธีการทดสอบ Biochemical test ในการวินิจฉัยแยกเชื้อในกลุ่ม <i>Enterobacter</i>	11
ตารางที่ 2.2 แสดงชนิดของอนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง	13
ตารางที่ 2.3 แสดงวิธีวิเคราะห์หาความสามารถการต้านอนุมูลอิสระ	18
ตารางที่ 3.1 แสดงการเจือจางสารละลายในการทำกราฟมาตรฐาน	29
ตารางที่ 4.1 แสดงน้ำหนักสารสกัดที่ได้จากการสกัดโดยตัวทำละลายชนิดต่างๆ	31
ตารางที่ 4.2 แสดงผลของการศึกษาหาความยาวคลื่นที่สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุด	32
ตารางที่ 4.3 ผลการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแต่ละชนิด	33
ตารางที่ 4.4 แสดงค่า IC_{50} ของสารตัวอย่างในการต้านอนุมูลอิสระได้ 50%	37
ตารางที่ 4.5 แสดงผลของค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ของสารมาตรฐาน Fe^{2+} ที่ความยาวคลื่น 593 nm	38
ตารางที่ 4.6 แสดงปริมาณของ Fe^{2+} ที่ได้จากการรีดิวซ์ Fe^{3+} โดยสารตัวอย่างในการวิเคราะห์ หาความสามารถการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี FRAP	39
ตารางที่ 4.7 แสดงความสามารถของการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจากสาร สกัดขาน้ำจืด	40

สารบัญภาพประกอบ

รูปภาพ	หน้า
รูปที่ 2.1 แสดงกลไกการทำงานของอนุมูลอิสระ	14
รูปที่ 2.2 แสดงโครงสร้างของวิตามินอี	15
รูปที่ 2.3 แสดงโครงสร้างของวิตามินซี	15
รูปที่ 2.4 แสดงลักษณะโครงสร้างของวิตามินเอ	15
รูปที่ 2.5 แสดงโครงสร้างของอนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์	16
รูปที่ 2.6 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาในการรีดิวซ์ Fe (III) ให้เป็น Fe(II)	21
รูปที่ 2.7 แสดงกลไกการต้านอนุมูล DPPH	22
รูปที่ 4.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ของสารสกัดขมิ้นชันโดยตัวทำละลาย Hexane	34
รูปที่ 4.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถการต้านอนุมูลอิสระของขมิ้นชันโดยตัว ทำละลาย Dichloromethane กับความเข้มข้น	35
รูปที่ 4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของความสามารถการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด Ethyl acetate กับความเข้มข้น	35
รูปที่ 4.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถการต้านอนุมูลอิสระกับความเข้มข้นต่างๆ ของสารสกัดขมิ้นชัน Ethanol เพื่อนำไปคำนวณหาค่า IC ₅₀	36

ภาพที่ 4.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและ ความเข้มข้นต่างๆของสารสกัดสารสกัดหยาบของ Methanol เพื่อนำไปคำนวณหาค่า IC_{50} (Inhibition Concentrations 50%) ของสารสกัดแต่ละตัว	36
รูปที่ 4.6 แสดงการเปรียบเทียบค่า IC_{50} (Inhibition Concentrations 50%) ของสารตัวอย่างกับ อนุมูลอิสระมาตรฐาน	37
รูปที่ 4.7 กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ความสามารถการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP	38

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ในปัจจุบันประเทศทั่วโลกได้สร้างเทคโนโลยีที่ทันสมัยเพื่อเป็นเครื่องอำนวยความสะดวกของประชากรแต่ละประเทศทั้งด้านการติดต่อสื่อสาร การคมนาคม การเกษตร การศึกษา และการรักษาทางการแพทย์ แต่ในขณะเดียวกันโรคภัยไข้เจ็บก็เกิดขึ้นมาทำร้ายคน และสัตว์อยู่เรื่อยๆ เช่น โรคมะเร็งในปีที่ 2549 มีผู้ป่วยโรคมะเร็งจำนวน 2,219 ราย (Hospital-Based Cancer Registry, 2549) โรคไข้หวัดนก โรคเอดส์ โรคซาร์ นอกจากนี้แล้วยังมีโรคอีกมากมายที่เนื่องมาจากสารอนุมูลอิสระ เช่น โรคที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อม ความบกพร่องของเซลล์ประสาท ระบบสื่อประสาทในสมอง และสภาวะขาดเลือดของอวัยวะที่สำคัญต่อการดำรงชีวิต เช่น หัวใจและสมอง ที่สำคัญอนุมูลอิสระมาทำร้ายสารชีวโมเลกุลที่สำคัญในร่างกายที่ไวต่อการถูกออกซิไดซ์ ทำให้คุณสมบัติและการทำงานเปลี่ยนไป เกิดการบกพร่อง หรือถูกทำลาย อันเป็นต้นเหตุของการเกิดโรคชนิดต่างๆนี้ (โอภา วัชรกุลป์, 2549) ในขณะเดียวกันพวกแบคทีเรียก็ได้สร้างความเดือดร้อนให้เกิดโรคอีกมากมาย เช่น โรคอุจจาระร่วง (Diarrheal diseases) โรคติดเชื้อของระบบทางเดินปัสสาวะ ไข้ดิงอักเสบ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ แผลติดเชื้อ โลหิตติดเชื้อ ซึ่งเนื่องมาจากแบคทีเรียกลุ่ม *E.Coli* (ไวโรลิกซ์ ศรีสุระ) ทำให้สร้างความเสียหายอย่างมากทั้งด้านสังคม ด้านเศรษฐกิจและด้านสุขภาพอนามัย เป็นสาเหตุจูงใจให้นักวิทยาศาสตร์ทุกด้านพยายามศึกษาค้นคว้าหาความรู้หรือแก้ปัญหาอย่างเคร่งครัด เช่นในปี 2550 ได้มีการค้นพบสารสกัดที่มีความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH จากเปลือกต้นวงศ์อบเชยมีค่า EC_{50} สูงกว่า BHT ซึ่งเป็นสารแอนติออกซิแดนซ์ที่ยอมรับกันและเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน (Pannee Denrungruang, 2550)

ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงให้ความสนใจในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากสมุนไพรคือใบฮว่านจื๊อ (*Pseuderatherum Platiferum*) ที่ชาวบ้านได้นำมาใช้ในการรักษาโรคเบาหวาน โรคมะเร็งชนิดต่างๆ โรคตับอักเสบ โรคความดันโลหิต โรคเลือดออกในลำไส้ ไข้หวัด ลดอาการปวดประจำเดือน (ไอเดีย อุดุลยานุภาพ, 2550) โดยการนำใบฮว่านจื๊อมาทำการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ แล้วทำการทดสอบความสามารถการต้านอนุมูลอิสระและทำการทดสอบการฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคบางชนิด

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1 ทำการสกัดสารจากใบฮว่านง็อกโดยการหมักกับตัวทำละลายชนิดต่างๆ
- 1.2.2 ศึกษาความสามารถการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบฮว่านง็อกที่สกัดจากตัวทำละลายต่างๆ โดยวิธี DPPH method และ FRAP method
- 1.2.3 ศึกษาความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดต่างๆ
- 1.2.4 เพื่อเป็นแนวทางในการวิจัยครั้งต่อไป

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

- 1.3.1 ทำการสกัดใบฮว่านง็อกโดยใช้ตัวทำละลาย Hexane, Dichloromethane, Ethyl acetate, Ethanol และ Methanol
- 1.3.2 ทดสอบความสามารถการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) โดยวิธี DPPH method, FRAP method และ Superoxide dismutase assay
- 1.3.3 ทดสอบการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Klebsiella spp.*, *Etherobacter spp.*, *Citrobacter* และ *E.Coli*

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 ได้สารสกัดที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ
- 1.4.2 ได้สารสกัดที่มีความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคบางชนิด
- 1.4.3 ได้แนวทางในการศึกษาวิจัยครั้งต่อไป

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 บทนำ

สมุนไพรฮวันจ็อก (Hoan Ngoc) เป็นพืชพื้นเมืองของประเทศเวียดนามมีผู้นำเข้ามาใช้ใน ประเทศไทยเป็นกลุ่มทหารผ่านศึกสมัยสงครามเวียดนามเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า วานลิง หรือ พญาวานร

ชื่อทางวิทยาศาสตร์: *Pseuderatherum Platiferum*

Family: *Acanthaceae*

สรรพคุณของต้นสมุนไพร

- รักษาคนสูงอายุ ปวดเมื่อยตามร่างกาย ทำงานหนัก เกิดประสาทหลอน
- รักษาไข้หวัด ความดันโลหิตสูง ท้องไส้ไม่ปกติ
- รักษาบาดแผล เคล็ดขัดยอก กระดูกหัก
- รักษาอาการทางเดินอาหาร ไม่ปกติ
- รักษาอาการโรคกระเพาะอาหาร โรคเลือดออกในลำไส้ กระเพาะปัสสาวะอักเสบ
- รักษาอาการคอพอก ตับอักเสบ
- รักษาอาการไตอักเสบ ปัสสาวะเป็นเลือด ปัสสาวะขุ่นข้น
- รักษาโรคตาทุกชนิด เช่น ตาแดง ตาต้อ ตาหือเลือด
- รักษาอาการมดลูกหย่อนของหญิงคลอดบุตรใหม่ ให้ผลดี ช่วยให้มดลูกเข้าอู่
- รักษาโรคความดันโลหิตสูง ความดันโลหิตต่ำ โรคประสาทอ่อนๆ
- สามารถใช้กับสัตว์ได้ จากเอกสารระบุว่าใช้กับไก่ชนหลังจากชนไก่แล้วต้องการให้ไก่ฟื้นจากการบาดเจ็บ ให้ไก่กินใบของต้นสมุนไพร จะฟื้นตัวได้เร็ว (สรรพคุณและขนาดการใช้ใบวานลิง (พญาวานร, ฮวันจ็อก). Online. <http://blog.sanook.com/Default.aspx?alias=medplant>.)

รายละเอียดในการใช้รักษาแต่ละโรค

- โรคกระเพาะอาหารเป็นแผล รับประทานครั้งละไม่เกิน 7 ใบ วันละ 2 ครั้ง รับประทานติดต่อกันไปจนครบ 50 ใบ
- โรคเลือดออกในลำไส้ รับประทานใบสด 713 ใบ หรือคั้นเอาน้ำ วันละ 2 เวลา
- โรคเกี่ยวกับลำไส้ใหญ่ เป็นบิด รับประทานครั้งละไม่เกิน 7 ใบ วันละ 2 ครั้ง รับประทานติดต่อกันไปประมาณ 100 ใบ
- โรคตับอักเสบ คอพอก รับประทานครั้งละ 7 ใบ วันละ 3 ครั้ง รับประทานติดต่อกันไปจนครบ 150 ใบ
- โรคไตอักเสบ ปวดเป็นประจำ รับประทานครั้งละ 34 ใบ วันละ 3 ครั้ง รับประทานไปจนครบ 30 ใบ
- อาการท้องไส้ไม่ปกติ รับประทาน 714 ใบ 2 ครั้ง ถึงจะหาย
- ปวดเมื่อยตามร่างกาย รับประทาน 714 ใบ 2 ครั้ง ถึงจะหาย
- อาการปัสสาวะแสบ ปัสสาวะเป็นเลือด รับประทาน 1,421 ใบ โดยการคั้นเอาน้ำขึ้นๆ รับประทาน
- โรคตาแดง รับประทาน 7 ใบ และบด 3 ใบ ปิดที่ตาเวลานอน 1 คืน จะหาย
- โรคความดันโลหิตสูง จะลดทันทีเมื่อรับประทาน 5 – 9 ใบ
- แก้โรคเบาหวาน ผู้ชายรับประทาน วันละ 7 ใบ ผู้หญิงรับประทานวันละ 9 ใบ ภายใน 90 วัน จะหาย
- ใช้กับสัตว์ เช่น ไก่เหงา เป็นอหิวาต์ หรือ นิวคาสเซิล ให้ไก่กิน 23 ใบ ไก่ชนหลังจากการชนแล้วให้กิน 23 ใบ
- สตรีหลังคลอด รับประทานวันละ 1 ใบ ทุกวัน จะทำให้ฟื้นตัวได้เร็ว

2.2 พืชสมุนไพร

สมุนไพรเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่มีประวัติควบคู่กับชีวิตของมวลมนุษยมายาวนาน โดยใช้สมุนไพรในการบำบัดรักษาโรคมาแต่โบราณกาลด้วยการลองผิดลองถูก หากพืชสมุนไพรชนิดใดให้ประโยชน์ด้านการรักษาโรค ก็จะจดจำถ่ายทอดสืบต่อกันไปทำให้เกิดเป็นยากลางบ้าน (folklore medicine) ใช้กันในชุมชนเล็กๆ หรือเป็นยาแผนโบราณ (traditional medicine) ใช้กันในชุมชนใหญ่ๆ เมื่อพูดถึงสมุนไพรในความรู้สึกรักของคนทั่วไป มักจะนึกถึงเฉพาะยาที่ได้จากพืชเท่านั้น แต่จริงๆ แล้วสมุนไพรหมายถึงยาจากพืช สัตว์ แร่ธาตุ และจุลินทรีย์ แต่ปัจจุบันยาที่ได้จากสัตว์และแร่

ธาตุยังไม่เป็นที่แพร่หลายในประเทศไทย เช่น ยาจากคางคก ซึ่งพบในต่อมาได้ตามีสืชาวจะเปลี่ยนเป็นสิน้ำตาลดำเมื่อทำให้แห้ง มีบิวฟาโทลิน (bufatolin) และ บิวโฟลิน (bufolin) เป็นสารสำคัญใช้เป็นยารักษาหัวใจ แก้ปวด แก้ไอ แก้คัน ฯลฯ ส่วนอื่นๆ ของสัตว์หรือสัตว์ทั้งตัวที่นำมาใช้เป็นยา ได้แก่ เขากวางอ่อน ด้ง คีหมี ตั๊กแตน ไล่เดือน เป็นต้น สำหรับแร่ที่ใช้เป็นยาบ่อยๆ ได้แก่ เปลือกแกง น้ำปูนใส เป็นต้น ในปัจจุบันสารสกัดจากสมุนไพรได้จากพืชเป็นส่วนใหญ่และสารสกัดที่ยอมรับในเภสัชตำรับก็ล้วนแต่ได้มาจากพืช ส่วนสารที่ได้จากสัตว์และจุลินทรีย์ก็จะใช้เทคนิคจำเพาะที่แตกต่างออกไป

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

การพัฒนาพืชสมุนไพรเพื่อใช้เป็นยาจะเป็นกลวิธีหนึ่งที่ช่วยแก้ปัญหาเศรษฐกิจของประเทศได้ส่วนหนึ่ง กล่าวคือ เมื่อสมุนไพรบางชนิดได้รับการพัฒนาเป็นยาแล้ว ประชาชนนิยมใช้อย่างแพร่หลาย ก็จะทำให้สมุนไพรชนิดนั้นเป็นพืชเศรษฐกิจได้และสามารถลดการนำเข้าบางส่วน นอกจากนั้นการนำสมุนไพรมาใช้เป็นยายังสอดคล้องกับนโยบายของรัฐบาลในเรื่องการให้ประชาชนมีความสามารถในการพึ่งตนเองได้ในทางสาธารณสุขอีกด้วย

ความสำคัญของยาจากพืชสมุนไพร

ปัจจุบันทั่วโลกให้ความสนใจกับพืชสมุนไพรเป็นอย่างมากทั้งด้านอุตสาหกรรมยา อาหาร และ เครื่องสำอางเนื่องจากเริ่มประจักษ์ถึงอันตรายจากฤทธิ์ข้างเคียง และความเป็นพิษของสิ่งสังเคราะห์หรือยาแผนปัจจุบันกันมากขึ้น ประกอบกับการวิจัยค้นคว้ายาตัวใหม่ๆ จากพืชสมุนไพร

ต่างๆ เช่น อนุพันธ์อาร์เทมิซินิน (artemisinin derivatives) ได้แก่ อาร์ทาซูนเนต (artesunate) และอาร์เทมิเทอร์ (artemether) เป็นสารพวกแลกโตน (lactone) จากต้นชิงเฮา (*Artemisia annua* L.) ในวงศ์คอมโพสิเท (Compositae) ใช้เป็นยาด้านมาลาเรียที่ออกฤทธิ์รวดเร็วและมีความเป็นพิษต่ำ โดยออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อพลาสโมเดียม (*Plasmodium*) ในระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดได้มากกว่าร้อยละ 95 และจะหมดไปจากกระแสเลือดภายใน 24 ชั่วโมงหลังให้ยา หรือสารในกลุ่มไพเรทริน (pyrethrin) ที่สกัดได้จากดอกไพเรทรัม (*Pyrethrum cinerarifolium* Trev.) ในวงศ์คอมโพสิเท ใช้เป็นยาฆ่าแมลงทั้งประเภทเดี่ยวและคู่ รวมทั้งแมลงรบกวนภายในบ้าน เช่น มด ยุง แมลงวัน ไพเรทรินจะสลายตัวได้ง่าย ทำให้ไม่มีปัญหาพดก้างเหมือนยาฆ่าแมลงแบบสังเคราะห์และมีความเป็นพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ส่วน plautol เป็นสารจำพวกไดเทอร์พีนแอลกอฮอล์ (diterpene alcohol) แยกได้จากใบป้าน้อย (*Croton sublylatus* Kurz.) ในวงศ์ยูฟอร์เบียซีอี (Euphorbiaceae) ใช้รักษาแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้ มีฤทธิ์ข้างเคียงน้อยกว่ายาสังเคราะห์ที่มีอยู่ในปัจจุบัน เป็นต้น ทำให้สมุนไพรเป็นแหล่งสำคัญของสารประกอบเคมีจำนวนมากที่มีประโยชน์ทั้งทางการแพทย์และอุตสาหกรรม แม้ว่าปัจจุบันจะยังคงมีการสังเคราะห์สารเคมีขึ้นมาเพื่อใช้เป็นยาจำนวนมาก แต่ด้วยยาต่างๆ หลายชนิดยังคงได้จากการสกัดจากพืชสมุนไพร เช่น จิงโกไลด์ บี (Ginkgolide B.) เป็นสารจากใบแปะก๊วย (*Ginkgo biloba* L.) ในวงศ์จิงโกซีอี (Ginkgoaceae) ซึ่งนิยมใช้กันมากในวงการแพทย์ทั่วโลก ช่วยป้องกันและรักษาความสมบูรณ์ของผนังเส้นเลือดฝอย ปรับระดับหมุนเวียนของเลือดและต่อต้านการอักเสบ การบวม จึงใช้ในผู้ป่วยที่เลือดไปเลี้ยงสมองไม่พอ ผนังเส้นเลือดแดงทำงานไม่ปกติ ป้องกันการเกิดอัมพาต ใช้กับโรคที่เกี่ยวกับความชรา เช่น วิงเวียน ปวดศีรษะ หูอื้อ และใช้ปรับอารมณ์ผู้สูงอายุ วงการแพทย์ปัจจุบันต้องอาศัยผลิตภัณฑ์ยาจากธรรมชาติ เพื่อเป็นแหล่งผลิตยาในการบำบัดรักษาโรคประมาณร้อยละ 40 ของคำรับยา รวมทั้งยาสามัญประจำบ้านล้วนมาจากธรรมชาติ นอกจากนี้สมุนไพรในรูปอาหารเสริมสุขภาพ (health foods) หรือยาชง (teas) ประเภทต่างๆ ที่มาจากธรรมชาติก็เป็นที่นิยมกันมากในตลาดทางเอเชียตะวันออก อเมริกา และยุโรป ปัจจุบันประเทศไทยมีการตื่นตัวในเรื่องอาหารเสริมสุขภาพเป็นอันมาก เช่น โสม (*Panax ginseng* C.A. Meyer) เชื่อว่าจะทำให้สุขภาพแข็งแรง กระชุ่มกระชวย มีกำลังวังชา และช่วยให้ร่างกายแข็งแรง มีกำลังวังชา และช่วยให้ร่างกายปรับตัวเข้ากับสภาวะต่างๆ ได้ดี หรือ เลซิทีน (lecithin) ซึ่งพบมากในถั่วเหลือง (*Glycine max* Merr.) และไข่แดง มีคุณสมบัติช่วยบำรุงผิวพรรณให้นุ่มนวลสดใส ปราศจากริ้วรอย ช่วยละลาย

ไขมันในกระแสเลือด ป้องกันการรวมตัวของคอเลสเตอรอลเป็นก้อน ไม่เกิดเป็นตะกอนจับตัวแข็ง ป้องกันโรคหัวใจ นอกจากนี้สารสำคัญในเลซิทิน คือ ฟอสฟาติดีลโคลีน (phosphatidyl choline) เมื่อเข้าสู่สมองจะเปลี่ยนเป็นอะเซทิลโคลีน (acetylcholine) ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาท การรับประทานเลซิทินซึ่งมีฟอสฟาติดีลโคลีนสูง จะมีผลให้อะเซทิลโคลีนเพิ่มขึ้น เป็นการส่งเสริมบทบาทการทำงานของสมองในด้านการเรียนรู้และความจำ มีการใช้เลซิทินในการบำบัดและป้องกันโรคความจำเสื่อมในผู้สูงอายุด้วย

นอกจากนี้การใช้องค์ประกอบทางเคมีที่มีอยู่ในพืชสมุนไพรเป็นต้นแบบ (model) ในการสังเคราะห์ยาด้วยกรรมวิธีทางเคมี เช่น ยาชาเฉพาะที่ (local anesthetic) มีสูตรพื้นฐานของโคเคน (cocaine) ซึ่งพบในใบโคคา (*Erythroxylum coca* Lamarck) วงศ์อีริโทซิลลาซีอี (Erythroxylaceae) เป็นต้น ยาแผนปัจจุบันส่วนหนึ่งได้จากการใช้เชื้อจุลินทรีย์เปลี่ยนแปลงโครงสร้างเคมีของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติให้กลายเป็นยา (partial synthesis) เช่น สเตียรอยด์ฮอร์โมน (steroid hormone) ที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในปัจจุบันจะใช้ไดออสจีนิน (diosgenin) จากพืชตระกูลไดออสโคเรีย (*Dioscorea* spp.) เป็นสารตั้งต้นผสมกับจุลินทรีย์ (microbial transformation) เพื่อทำการสังเคราะห์โปรเจสเตอโรน (progesterone) เพื่อใช้ในยาคุมกำเนิด

ปัจจุบันเครื่องสำอางส่วนใหญ่มีพืชสมุนไพรเป็นองค์ประกอบแทบทั้งสิ้น เช่น กรดแอลฟาไฮดรอกซี (α -Hydroxy acids, AHA) ซึ่งเป็นสารสกัดจากผลไม้มีนํานาชนิดจะช่วยเร่งการหลุดลอกของเซลล์ชั้นบนสุดที่เสื่อม รวมทั้งรอยเหี่ยวย่นต่างๆ พร้อมทั้งเสริมสร้างเซลล์ใหม่ให้เข้ามาแทนที่ จึงทำให้ผิวพรรณสดใสแลดูเนียน นิยมใช้มากในผลิตภัณฑ์ชะลอความแก่และ เครื่องสำอางบำรุงผิว นอกจากนั้นยังมีการใช้กรดบีตาไฮดรอกซี (β -Hydroxy acids) ซึ่งละลายในไขมัน ได้ดีกว่า กรดแอลฟาไฮดรอกซีในเครื่องสำอางด้วย หรือสารอโลอิน (aloin) จากใบว่านหางจระเข้ (*Aloe vera* L.) สามารถดูดซับรังสีอัลตราไวโอเลตได้ร้อยละ 20-30 จึงนำมาผสมในครีมป้องกันแดด

2.3 เชื้อแบคทีเรีย

2.3.1 *E. Coli*

ลักษณะการเจริญเติบโตและปฏิกิริยาทางชีวเคมี

E. Coli เจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดธรรมดา เมื่อเลี้ยงบนอาหารชนิดที่แสดงความแตกต่างของเชื้อ เช่น MacConkey agar โคโลนีมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร และมีสีชมพูแดง เนื่องจากหมักย้อยแลคโตสได้ (lactose fermenter) กรดที่เกิดจากการหมักย้อยน้ำตาลจะทำให้สีของอินดิเคเตอร์ในอาหารเปลี่ยนไปจากเดิม เชื้อบางสายพันธุ์ไม่สามารถย้อยน้ำตาลแลคโตสได้ (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 °C ได้ดี
2. แอนติเจน K มี 100 ชนิดซึ่งอาจเป็น L, A หรือ B แอนติเจนนี้เป็นส่วนหนึ่งของแคปซูลที่หุ้มตัวแบคทีเรียและคลุมแอนติเจน O ทำให้เชื้อไม่เกาะกลุ่มกันในแอนติซีรัม O ยกเว้นต่อเมื่อทำลายแอนติเจน K เสียก่อนโดยการต้มที่ 100 °C นาน 2.5 ชม. หรือที่ 121 °C นาน 2 ชั่วโมง
3. แอนติเจน H มี 52 ชนิด เป็นส่วนของแฟลกเจลลาของแบคทีเรีย จะถูกทำลายเมื่อนำไปต้มที่ 100°C

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 adenylyl cyclase ใน Epithelial cell ในลำไส้ทำให้เกิดมีอาการคลื่นของ cyclic adenosine monophosphate (cAMP) ยังส่งผลให้มีการหลั่ง

ของฟลูอิดเข้าไปในลูเมนของลำไส้ ส่วนกลไกการออกฤทธิ์ของสารพิษชนิดทนต่อความร้อนยังไม่ทราบ เชื้อที่สร้างสารพิษได้ ได้แก่ serotype 06 08025 027 078 0148 และ 0159 แต่การที่คนเกิดมีอุจจาระร่วงนั้นไม่ได้ขึ้นอยู่กับการมีเอนเทอโรทอกซินเท่านั้น ยังขึ้นอยู่กับการมีปัจจัยอื่นๆอีก รวมทั้งความสามารถของเชื้อโรคในการที่จะดำรงตัวเองอยู่ที่ Epithelial Cell ในลำไส้เล็ก การตรวจสอบ enterotoxigenic *E. Coli* ทำได้หลายวิธี ได้แก่ 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 ตรวจหาได้ทางวิธีซีโรโลยีดูการเกาะกลุ่มของเชื้อในแอนติเซรัมจำเพาะ serotype ที่ก่อให้เกิดโรคในคนอาจตรวจพบได้ในอุจจาระของคนปกติ ผู้ป่วยเป็นโรคอาจมีอาการไข้หรือไม่มีอาการไข้ อุจจาระเป็นน้ำ ต่อมาอาจมีมูกปน ร่างกายอ่อนเพลียเพราะเสียน้ำ และอิเล็กโทรไลต์มาก อาจถึงกับช็อคและตายได้

2. โรคติดเชื้อของระบบทางเดินปัสสาวะ มักมีสาเหตุมาจากเชื้อที่อาศัยอยู่ในลำไส้ผู้ป่วย
3. โรคติดเชื้ออื่นๆ เช่น ไล้ติ่งอักเสบ 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 เป็น ไนโตรได้
- Oxidase test ให้ผล Negative

ความสำคัญทางการแพทย์

แบคทีเรียใน family นี้ส่วนใหญ่อยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์โดยไม่ก่อให้เกิดโรค จึงเรียกว่า enteric bacteria เชื้อบางตัวเป็นเชื้อก่อโรคเช่น *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia pestis* บางตัวก็เป็น Normal flora ที่อาจเป็นเชื้อฉวยโอกาสได้ทำให้เกิดโรคได้ (opportunistic pathogen) เช่น *E. coli*, *Klebsiella pneumonia* และ *Proteus mirabilis*

การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. *Enrichment media* เช่น blood agar และ Chocolate agar เชื้อ *Enterobacteriaceae* สามารถเจริญได้ดีมักจะให้โคโลนีขนาดใหญ่ บางชนิด เช่น *Klebsiella* spp. ให้โคโลนีมันเยิ้มเพราะสามารถสร้าง Capsule ได้ บางชนิดสามารถสลายเม็ดเลือดแดงบน blood agar ได้ ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้ไม่สามารถจำแนกแบคทีเรียใน family *Enterobacteriaceae* นี้ได้

2. *Selective media* การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือของกรดน้ำดีและสีอะนิลีน ซึ่งทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแกรม positive เช่น MacConkey agar สามารถช่วยแยกแบคทีเรียกลุ่มนี้ออกเป็น 2 กลุ่มได้แก่

2.1 *Lactose fermenter* แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถ ferment lactose ได้ทำให้เกิดกรด lactic acid ซึ่งเปลี่ยนสีของ indicator ทำให้โคโลนีมีสีแดงหรือสีชมพู *Lactose fermenter* ได้แก่ *E. coli*, *Klebsiella* และ *Enterobacter* เป็นต้น

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

นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียอีกกลุ่มหนึ่งที่สามารถ ferment lactose ได้แต่ช้า (delayed fermenter) คือภายใน 3-7 วัน ได้แก่ *Citrobacter*, *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
Ornithine decarboxylase	Methyl red
Voges	Proskauer

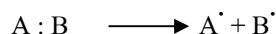
ในห้องปฏิบัติการบางแห่งอาจไม่จำเป็นต้องรายงานผล identification เชื้อบางตัวใน family นี้ถึงระดับ species อาจจะใช้ biochemical test ที่สำคัญๆ เช่น TSI, Oxidase test, Indole production, Citrate utilization, Motile, Urease test, Lysine deaminase และ Lysine- decarboxylase ก็สามารถวินิจฉัยแยกเชื้อได้

2.4 อนุมูลอิสระ (Free Radical)

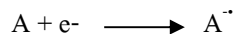
อนุมูลอิสระ เป็นอะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวอยู่ในออร์บิทัลวงนอกสุดที่มีระดับพลังงานสูง คำจำกัดความนี้หมายรวมถึงอะตอมของไฮโดรเจนและไอออนของโลหะทรานซิชันส่วนใหญ่ นอกจากนี้ยังรวมถึงโมเลกุลของออกซิเจนซึ่งนับว่าเป็นอนุมูลเพราะมีอิเล็กตรอนจำนวน 2 อิเล็กตรอนแต่ละอิเล็กตรอนแยกกันอยู่เป็นอิเล็กตรอนเดี่ยวในแต่ละออร์บิทัล ทั้งนี้การสปินหรือการหมุนรอบตัวของอิเล็กตรอนทั้งสองจะสปินแบบคู่ขนานในทิศทางเดียวกัน อนุมูลอิสระทั้งที่อยู่ในสถานะเป็นกลางทางไฟฟ้า และอนุมูลอยู่ในสถานะที่มีประจุไฟฟ้า โดยมีทั้งประจุบวกและประจุลบ สัญลักษณ์เคมีของอนุมูลอิสระ คืออิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระแสดงด้วยจุดในตำแหน่งข้างบน

ของสัญลักษณ์เคมี เช่น อนุมูล A[•] โดยเฉพาะอนุมูลอิสระที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ จะไวต่อการเกิดปฏิกิริยามากกว่าอนุมูลอิสระที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เนื่องจากอิเล็กตรอนเดี่ยวไม่เสถียรและพยายามจับคู่กับอิเล็กตรอนเดี่ยวอื่น ดังนั้นอนุมูลอิสระจึงมีสมบัติเฉพาะ คือมีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยาต่อโมเลกุลอื่นๆ อย่างไรก็ตามยังมีอนุมูลอิสระบางชนิดที่มีความเสถียร ไม่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา สามารถอยู่ในสภาพอนุมูลอิสระได้นาน อนุมูลอิสระที่มีความเสถียรมีน้อยชนิดมาก เช่น อนุมูลอิสระที่มีความสำคัญในทางชีวภาพ ได้แก่ อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O₂⁻) อนุมูลไฮดรอกซี (HO[•]) อนุมูลอัลคอกซี (RO[•]) และอนุมูลซูเปอร์ไฮดรอกซี (HO₂[•]) อนุมูลอิสระเหล่านี้จัดเป็นอนุมูลอิสระที่มีความไวในการเกิดปฏิกิริยาสูงมาก และขณะที่ไนตริกออกไซด์ (NO) หรือ อนุมูลไนตริกออกไซด์ (ON[•]) อนุมูลวิตามินอี และอนุมูลวิตามินซีมีความไวรองลงมา การเกิดอนุมูลอิสระมีหลายกลไกที่แตกต่างกันดังนี้

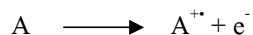
ก. การแตกพันธะโคเวเลนต์แบบโฮโมไลซิส



ข. การเพิ่มอิเล็กตรอนหนึ่งตัวให้แก่อะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า



ค. การสูญเสียอิเล็กตรอนหนึ่งตัวจากอะตอมที่เป็นกลาง



2.5 ชนิดและการเรียกชื่ออนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง

อนุมูลอิสระ หรืออนุมูล เป็นศัพท์ที่ใช้คู่กัน เหตุที่มีการตัดคำว่า อิสระ ออกเนื่องจากคุณสมบัติที่ไวต่อปฏิกิริยาทำให้อนุมูลไม่คงตัวอยู่ในสภาพอิสระได้ ส่วนการที่ยังใช้คำว่าอิสระเนื่องจากต้องการเน้นถึงเหตุของความไวต่อปฏิกิริยา ซึ่งผลมาจากสภาวะความเป็นอิเล็กตรอนเดี่ยวเป็นอิสระ ไม่มีคู่ นอกจากนี้การวิจัยพบว่ามีสารหลายชนิดที่ไม่อยู่ในสภาพอนุมูลแต่มีความเกี่ยวข้องกับอนุมูล และมีความไวต่อปฏิกิริยาสูงดังแสดงในตารางที่ 2.1 สารเหล่านี้มีทั้งสารที่ทำให้กำเนิดสารอนุมูลอิสระเนื่องจากมีความคงตัวต่ำและสลายตัวได้ง่าย เช่น โอโซน หรือเป็นสารที่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นเกิดเป็นอนุมูล เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ รวมถึงสารที่เป็นผลผลิตของอนุมูลที่อันตรายสูง ได้แก่ เปอร์ออกซีไนไตรท์ ซึ่งเรียกโดยรวมว่าสารไวต่อปฏิกิริยา (reactive species, RS)

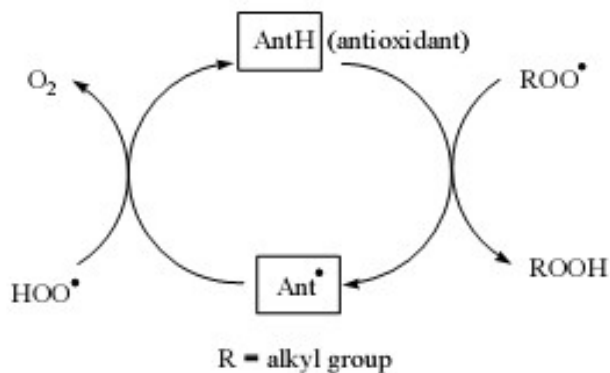
อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้องทางชีววิทยา สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (Reactive oxygen species, ROS) กลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (Reactive nitrogen species, RNS) และกลุ่มที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (Reactive chlorine species, RCS) สารบางชนิดสามารถจัดอยู่ได้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

ตารางที่ 2.2 : แสดงชนิดของอนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง

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

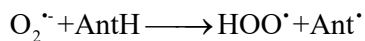
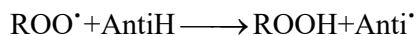
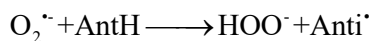
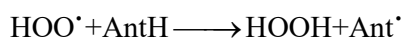
2.6. สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

การต้านอนุมูลอิสระที่เป็นอันตรายต่อร่างกายของคนเราเหล่านี้สามารถกำจัดไปได้ด้วยสารบางชนิดที่เรียกว่า สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) โดยสารต้านอนุมูลอิสระไปจับกับอนุมูลอิสระที่เป็นตัวปัญหา แล้วเกิดอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่เสถียรกว่า ส่งผลให้หยุดวงจรการเกิดอนุมูลอิสระตัวใหม่อีก เพราะมันจะรวมกันเองกลายเป็นโมเลกุลที่เสถียร แสดงวงจรการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระดังภาพที่ 2.1



รูปที่ 2.1 แสดงกลไกการทำงานของอนุมูลอิสระ

สามารถเขียนสมการแสดงการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระได้ดังนี้

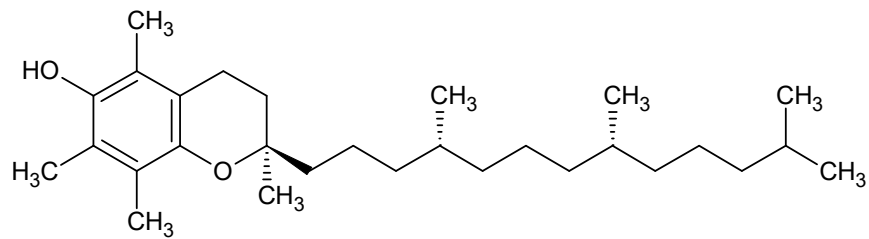


ร่างกายคนมีกลไกการกำจัดอนุมูลอิสระได้ 2 วิธี

1. เอนไซม์ (enzyme) ต่างๆในร่างกาย เช่น Superoxide dismutase (SOD), Superoxide reductase (SORs), Catalase (CatFe(II)H₂O₂ complex และ CatFe(III)H₂O₂ complex), Thioredoxin reductase (Trx), Glutathione peroxidase เป็นต้น โดยเอนไซม์เหล่านี้จะไปจับกับอนุมูลอิสระ เช่น Superoxide หรือ Nitric oxide เป็นการตัดวงจรการสร้างอนุมูลอิสระในร่างกายได้ อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ต่างๆที่มีอยู่ในร่างกายนั้นมีปริมาณจำกัด ฉะนั้นจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องอาศัยสารต้านอนุมูลอิสระจากแหล่งภายนอกในร่างกายเพื่อรักษาระบบสมดุลต่างๆในร่างกายให้ดำเนินต่อไปได้อย่างปกติ

2. อาหารหรือยาที่รับประทานเข้าไป เราสามารถที่จะเลือกรับประทานอาหารหรือยาที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น

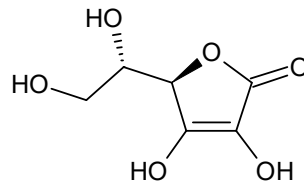
- a. วิตามินอี (Vitamin E) เป็นสารที่ละลายได้ดีในน้ำมันจึงพบมากในน้ำมันพืชต่างๆ



Vitamin E (α -Tocopherol)

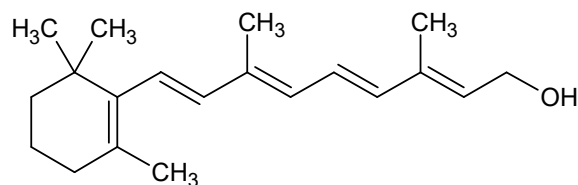
รูปที่ 2.2 แสดงโครงสร้างของวิตามินอี

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



รูปที่ 2.3 แสดงโครงสร้างของวิตามินซี

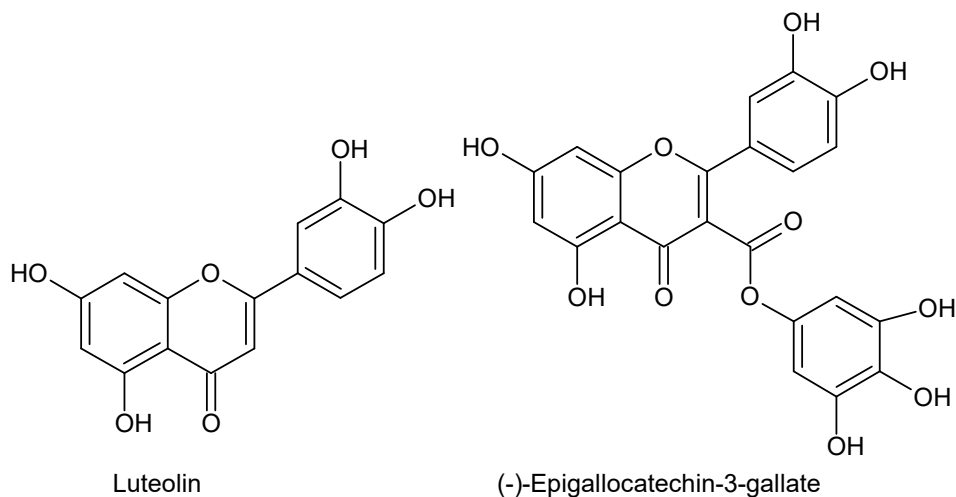
- c. เบตาแคโรทีน (β -Carotene) รวมทั้งวิตามินเอ (ระบบการทำงานของร่างกายสามารถเปลี่ยน β -Carotene เป็น Vitamin A) มีมากในผักผลไม้ที่มีสีเหลืองส้ม เช่น มะละกอสุก มะม่วงสุก มะเขือเทศ ฟักทอง แครอท และผักใบเขียว เช่น คำลิง ผักบุ้ง บรอกเคอรี



Vitamin A

รูปที่ 2.4 แสดงลักษณะโครงสร้างของวิตามินเอ

d. อนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์ (Flavonoid derivatives) พบมาในพืชจำพวกชา กาแฟ โดยเฉพาะในชาเขียว และเมล็ดกาแฟสด



รูปที่ 2.5 แสดงโครงสร้างของอนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์

2.7 การศึกษาความสามารถการต้านอนุมูลอิสระรวม (Total Antioxidant Capacity, TAC)

เนื่องจากร่างกายและเซลล์มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นได้หลายชนิด จึงมีระบบควบคุมป้องกันไม่ให้มีอนุมูลอิสระที่เกินสมดุลที่ทำให้เกิดอันตราย ระบบควบคุมป้องกันประกอบด้วย

ก). สารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งมีทั้งโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น อัลบูมิน เฟอร์ริติน และโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น วิตามินซี และยูริก เป็นต้น

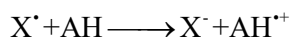
ข). เอนไซม์กำจัดอนุมูลอิสระมีหลายชนิดด้วยกัน

การใช้ดัชนีจากการหาความสามารถการต้านอนุมูลอิสระเดี่ยวๆ หรือวัดปริมาณการเกิดสารชีวโมเลกุลที่ถูกสารอนุมูลอิสระทำให้เสียหายเป็นดัชนีวัดสภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุลว่ามีมากน้อยเพียงใดนั้น อาจไม่เป็นค่าที่สะท้อนถึงภาพรวมของภาวะออกซิเดชันของร่างกายหรือสารตัวอย่าง ดังนั้นจึงมีการหาความสามารถรวมในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นการรวมองค์ประกอบทั้งหมดของสภาวะรีดอกซ์ และใช้เป็นดัชนีชี้วัดสภาวะออกซิเดชันของร่างกายโดยตรงด้วยการตรวจวัดจากเลือด พลาสมาและของเหลวที่ได้จากร่างกาย ในการวิเคราะห์มีหลักการสำคัญ 2 วิธีการคือ

1. การวิเคราะห์จากการส่งผ่านอะตอมไฮโดรเจน (hydrogen atom transfer, HAT) เช่น วิธี ORAC และวิธี TRAP

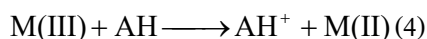
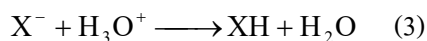
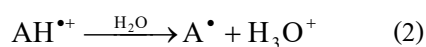
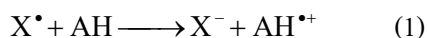
2. การวิเคราะห์จากการส่งผ่านอิเล็กตรอนเดี่ยว (electron transfer, ET หรือ SET) เช่นวิธี FRAP และวิธี TEAC เป็นต้น

วิธีวิเคราะห์โดยใช้หลักการ HAT จะวัดความสามารถการต้านอนุมูลอิสระในเลือดหรือพลาสมาในการขจัดอนุมูลอิสระโดยการให้อะตอมไฮโดรเจน



วิธีนี้จะหาพลังงานที่ทำให้พันธะของอะตอมไฮโดรเจนแตกออก (Bond dissociation energy, BSE) สารที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจะมีค่า ΔBDE ประมาณ -10 กิโลแคลอรี/โมล และมีค่าความต่างศักย์ของการแตกตัว (ionization potential, ΔIP) ต่ำกว่า -36 กิโลแคลอรี/โมล ในการหาดัชนี TAC เป็นการวัดความสามารถในการแข่งขันกันในการแข่งขันในเชิงจลนศาสตร์ 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



ในการวิเคราะห์จะเกิดกลไกทั้งสองคือ HAT และ ET ควบคู่กันไปเสมอ วิธี SET จะเปรียบเทียบความสามารถในการทำให้โปรตอนหลุดออกจากโมเลกุล และการแตกออกเป็นไอออน

ปฏิกิริยา SET จะลดลงเมื่อค่า pH เพิ่มขึ้น แสดงถึงความสามารถที่จะให้อิเล็กตรอนในการที่โปรตอนหลุดออก สารต้านออกซิเดชันที่เกิดกลไก SET จะมีค่า ΔIP มากกว่า -45 กิโลแคลอรี/โมล ปฏิกิริยา ET จะช้าและใช้เวลานานกว่าปฏิกิริยาจะสิ้นสุด ดังนั้นการคำนวณค่า TAC จะหาปริมาณของสารที่เกิดขึ้นเมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไปว่าจะมีปริมาณลดลงร้อยละเท่าใด หากมากกว่าจะคำนวณค่าทางจลนศาสตร์ วิธี SET ซึ่งจะวัดวิตามินซีและกรดยูริก 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 ^{•+} / metmyoglobin)	วิธีวัดโดยอ้อม SET
TEAC II (ABTS ^{•+} with manganese dioxide Mn ₂ O)	วิธีวัดโดยอ้อม SET
TEAC III (ABTS ^{•+} with potassium persulfate)	วิธีวัดโดยอ้อม SET
Diphenyl-1-picrylhydrazyl 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 ซึ่งหาปริมาณได้จากการที่อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นไปทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสาร ABTS เกิดอนุมูลที่มีสี ABTS^{•+} มีค่า λ_{max} ที่ 660, 734 และ 820 ซึ่งการวัดค่า TAC ทำโดยดูความสามารถของเลือด พลาสมา ในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อนำเลือดไปผสม

จะทำให้เกิดสีของ ABTS^{•+} ซ้ำลงหรือน้อยลง ทำให้มีสีจางลงซึ่งสามารถวัดปริมาณได้ การวิเคราะห์ทำได้ทั้งการวัดระยะเวลาที่ทำให้เกิดสีของ ABTS^{•+} หลังการเติมเลือดหรือพลาสมา หรือวัดปริมาณของ ABTS^{•+} ที่เกิดขึ้นจากค่าการดูดกลืนแสงในเวลาที่กำหนด วิธีการวัดโดยการกำหนดเวลาถึงแม้ว่าจะสะดวกและได้ค่าถูกต้องแม่นยำดีแต่เนื่องจากมีปัจจัยอื่นๆ เช่น ระยะเวลาที่ใช้ให้เกิดสีและอัตราการเกิดออกซิเดชัน เข้ามามีบทบาททำให้การแปลผลซับซ้อน ดังนั้นจึงมีการพัฒนาวิธีโดยการวัดพื้นที่ใต้เส้นกราฟ (AUC) ซึ่งจะให้ค่าที่ถูกต้องแต่ยุ่งยากไม่สะดวกและต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์ วิธี TRAP มีการพัฒนาต่อมาโดยการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทำปฏิกิริยากับอนุมูลไอโกลบินเกิดอนุมูลเฟอร์ริลไมโอโกลบิน ทำปฏิกิริยากับ ABTS เกิดเป็นอนุมูล ABTS^{•+} ที่มีสี ดังนั้นเมื่อเติมเลือดหรือสารที่ต้องการวิเคราะห์ลงในสารผสมที่ใช้ทดสอบ เลือดหรือสารที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจะยับยั้งปฏิกิริยาทำให้มีสีจางลง วิธีนี้อาจวัดค่าการดูดกลืนแสงของ ABTS^{•+} ที่ $\lambda_{\max} = 734 \text{ nm}$ วัดในเวลาที่กำหนดในจุดเดียว หรือวัดอัตราการเร็วในการเกิด ABTS^{•+} โดยบันทึกค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หรือระยะเวลาที่ใช้ก่อนเกิดปฏิกิริยา (lag time) หรือค่าระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโทรร็อก

วิธี ORAC เป็นการวิเคราะห์โดยอ้อมอีกวิธีหนึ่งที่วัดความสามารถของสารทดสอบหรือเลือดในการยับยั้งอนุมูลเปอร์ออกซีไม่ให้ทำปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยหยุดปฏิกิริยาถูกใช้ด้วยกลไก HAT การวิเคราะห์จะวัดแสงฟลูออเรสเซนส์ โดยอนุมูลเปอร์ออกซีจะทำปฏิกิริยาเปลี่ยนสารที่ให้แสงฟลูออเรสเซนส์เป็นสารที่ไม่ให้แสงฟลูออเรสเซนส์ ดังนั้นเมื่อเติมเลือดหรือสารต้านอนุมูลอิสระลงไปจะจับอนุมูลเปอร์ออกซีซึ่งทำให้มีแสงฟลูออเรสเซนส์เพิ่มขึ้นตามปริมาณและความแรงของสารที่ทดสอบที่เติมลงไป

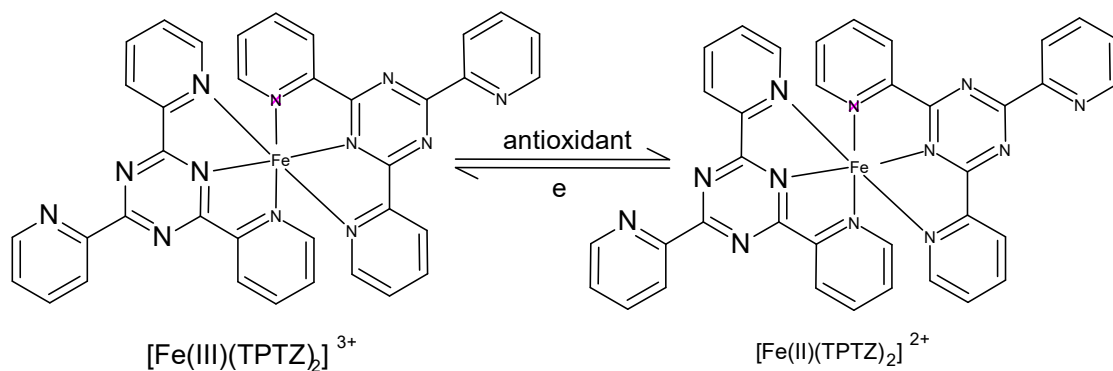
วิธีนี้จะใช้ b-phycoerythrin(b-PE) แทน ABTS^{•+} โดย β -PE มีคุณสมบัติให้แสงฟลูออเรสเซนส์ที่ 565 nm เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงหรือรังสีที่มีความยาวคลื่นเท่ากับ 540nm β -PE จะถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระทำให้คุณสมบัติในการให้แสงฟลูออเรสเซนส์เสียไป ดังนั้นเมื่อผสมสารแอโซ AAPH ซึ่งสลายตัวให้อนุมูลเปอร์ออกซี (ROO[•])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



ในเริ่มแรกใช้โปรตีนเบต้าไพโคอีริทริน (β -PE) เป็นสารที่ให้แสงฟลูออเรสเซนส์ซึ่งต่อมาไม่เป็นที่นิยม เนื่องจาก β -PE มีความแปรปรวนสูงในการเกิดปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ และแสงฟลูออเรสเซนส์จะลดลงเมื่อถูกแสง นอกจากนี้สารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มฟีนอลโดยเฉพาะโปรแอนโทไซยานินจะจับกับโปรตีน β -PE ทำให้ค่า ORAC มีค่าต่ำกว่าความเป็นจริง ปัจจุบันนิยมใช้ฟลูออเรสซิน หรือ ไดคลอโรฟลูออเรสซิน ซึ่งมีความคงตัวและไม่ไวต่อปฏิกิริยาจนเกินไป ในการวิเคราะห์จะติดตามปฏิกิริยาเป็นเวลาประมาณ 30 นาที เพื่อให้ได้ค่า ORAC ที่ถูกต้องสมบูรณ์จะวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยทำการคำนวณพื้นที่ใต้เส้นกราฟ AUC ของการลดลงของแสง เมื่อเติมเลือดหรือสารต้านอนุมูลอิสระลงไปในสารละลายทดสอบ จะทำให้การลดลงของแสงเกิดช้ากว่าและน้อยกว่า

เพื่อกำจัดความแปรปรวนของสารเคมี เครื่องมือและผู้วิเคราะห์หาค่า ORAC จะคำนวณเป็นค่าที่สมมูลกับสารมาตรฐาน Trolox equivalent (TE) มีหน่วยเป็นไมโครโมลเทียบเท่ากับโทรล็อกต่อตัวอย่างทดสอบหนึ่งลิตรหรือหนึ่งกรัม (μM ของ TE/L หรือ μM ของ TE/g)

วิธี FRAP เป็นวิธีเป็นการวิเคราะห์หาค่า TAC โดยตรง มีหลักการว่าสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายทำหน้าที่โดยการให้อิเล็กตรอนจึงเป็นสารรีดิวซ์ ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า TAC เป็นความสามารถในการรีดิวซ์ วิธีนี้ใช้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก Fe^{3+} -TPTZ (Ferric tripyridyl triazine) เป็นสารทดสอบ อะตอมเหล็กนี้จะถูกรีดิวซ์โดยเลือดหรือสารต้านอนุมูลอิสระ ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอร์รัส Fe^{2+} -TPTZ ซึ่งมีสีน้ำเงินดุกกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm



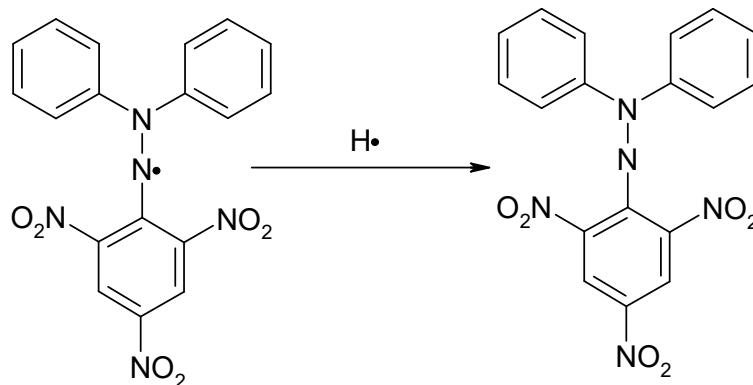
รูปที่ 2.6: แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาในการรีดิว Fe(III) ให้เป็น Fe(II)

วิธี FRAP จะวัดค่าต่างศักย์ของการรีดออกซ์ที่ต่ำกว่า 0.7 โวลต์ ซึ่งมีค่าความต่างศักย์ของสมการรีดออกซ์ของ Fe^{3+} -TPTZ ดังนั้นวิธี FRAP สามารถใช้วัดรีดออกซ์ของเซลล์และเนื้อเยื่อแต่วิธี FRAP ไม่สามารถวัดความสามารถการต้านอนุมูลอิสระ โดยการให้อะตอมไฮโดรเจน (HAT) เพราะจะให้ค่าต่ำกว่าความเป็นจริง

เนื่องจากความต่างศักย์รีดออกซ์ของ Fe^{3+} -TPTZ มีค่าใกล้เคียงกับค่าของ $\text{ABTS}^{+\cdot}$ ซึ่งใช้ในวิธีวิเคราะห์ TEAC ดังนั้นสารต้านออกซิเดชันจำพวกเดียวกันที่มีโครงสร้างที่คล้ายกันจะทำปฏิกิริยาได้ทั้งวิธีวิเคราะห์แบบ TEAC และวิธี FRAP แม้ว่าทั้งสองวิธีมีการแตกต่างกันในเรื่องค่า pH โดยวิธี TEAC จะวิเคราะห์โดยทำปฏิกิริยาในสภาวะเป็นกลางและวิธี FRAP จะทำปฏิกิริยาที่ pH 3.6 เพื่อให้เหล็กละลายได้ เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาที่สภาวะเป็นกรดจะลดค่าความต่างศักย์ในการแตกตัวเป็นไอออน ทำให้แรงส่งผ่านอิเล็กตรอนและเพิ่มค่าต่างศักย์รีดออกซ์ ดังนั้นแม้ว่าค่าที่ได้ทั้งสองวิธีจะมีค่าในทิศทางเดียวกัน แต่ค่าจากวิธี FRAP ต่ำกว่าวิธี TEAC เสมอ และค่าที่ได้จากวิธี FRAP ส่วนใหญ่จะไม่สัมพันธ์กับค่าที่ได้จากวิธีอื่น

ถึงแม้ว่าความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กมีความสัมพันธ์กับการขจัดอนุมูล โดยการให้อะตอมไฮโดรเจนไม่มาก แต่มีอนุมูลที่ถูกออกซิไดซ์หรือถูกรีดิวซ์ให้เป็นไอออนเป็นการหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ ดังนั้นการวัดความสามารถในการรีดิวซ์โดยวิธี FRAP ซึ่งแสดงถึงสภาวะรีดิวซ์ของพลาสมา เนื่องจากวิธี FRAP เป็นวิธีวิเคราะห์โดยหลักการ SET เท่านั้น ดังนั้นการนำผลการวิเคราะห์โดยวิธีอื่นๆมาประกอบ จะทำให้ได้ค่าการประเมินผลที่มีความถูกต้องดีขึ้น

วิธี DPPH[•] เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัว มีสีม่วงในรูปอนุมูลอยู่แล้วโดยไม่ต้องทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดอนุมูลเหมือนวิธีอื่นๆ การวิเคราะห์เป็นการวัดความสามารถในการรีดิวซ์ การวัดทำได้โดยใช้เครื่องมือ EPR หรือเครื่องสเปกโตรวัดการลดลงของสี 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 %

$T_{EC_{50}}$ = เวลาที่ใช้ในการลดปริมาณอนุมูลได้ EC_{50}

ข้อดีของวิธีนี้คือง่าย ใช้เครื่องมือสามัญที่มีทั่วไป นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ ยกเว้นสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่มีค่าการดูดกลืนแสงในขณะเดียวกัน ข้อด้อยของวิธีนี้คือ อนุมูลนี้มีความคงตัว ไม่ไวต่อปฏิกิริยาต่ออนุมูลที่เกิดขึ้นในร่างกาย ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่สามารถแยกแยะจัดอันดับอนุมูลที่มีความไวสูง นอกจากนี้โครงสร้างเคมีของ DPPH[•] ที่แสดงให้เห็นว่าอิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระถูกบดบังโดยอนุมูลของเบนซีน 3 วงค์ และหมู่ไนโตรเจน ทำให้สารต้านอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์แรงแต่มีขนาดใหญ่บางสารไม่สามารถเข้าทำปฏิกิริยาขจัดสารอนุมูลอิสระหรือเกิดปฏิกิริยาช้ากว่าความเป็นจริงทั้งๆที่สาร

ต้านอนุมูลอิสระมีฤทธิ์ดีในการขจัดอนุมูลเปอร์ออกไซด์ นอกจากนี้สารรีดิวซ์สามารถทำให้สี DPPH[•] จางลงได้อีกด้วย

2.8. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Lopez และคณะได้แสดงให้เห็นถึงสมบัติทางชีวภาพของ lipophilic *O*-naphthoquinone 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 แม้ว่าจะใช้เพียงลำพัง หรือในรูปแบบ 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 พบว่าผู้หญิงเอเชียที่มี isoflavone จากปัสสาวะปริมาณที่น้อยในสตรีที่เป็นมะเร็งเต้านม เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงว่าสตรีที่บริโภคถั่วปริมาณน้อยมีโอกาสดังกล่าวเกิดโรคมะเร็ง

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

Kostova *et al.* ทำการสังเคราะห์สารประกอบของ Lanthanum (III) กับ bis-coumarins ศึกษาสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ด้วยเทคนิค EA, IR, ^1H -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 โดยเฉพาะด้านการเจริญเติบโตของเซลล์ในระยะ malignant cell lines (*in vitro*) นอกจากนี้ยังได้ทดสอบทางคลินิก (clinical trials) พบว่าสามารถออกฤทธิ์ต้าน prostate cancer, malignant melanoma และ metastatic renal cell carcinoma ได้ด้วย

บทที่ 3

สารเคมี อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- Rotary evaporator, Buchi Rotovapor R-124
- UV spectrophotometer, Pharmacia Biotech
- Autoclave. Hirayama, Scientific promotion Co., LTD.
- Lamina air flow, Jafelab
- Hot air oven. Memmert, Scientific promotion Co., LTD.
- Incubator, Scientific promotion Co., LTD
- Dricycler, Boekel Philadelphia, PA

3.2 สารเคมี

- ตัวทำละลาย (Mobile phase) ชนิดต่าง ๆ
 - Hexane (C_6H_{14})
 - Dichloromethane (CH_2Cl_2)
 - Ethyl acetate
 - Ethanol (C_2H_5OH)
 - Methanol (CH_3OH)
 - น้ำกลั่น
- Ethanol (C_2H_5OH)
- conc. H_2SO_4
- Acetic acid (CH_3COOH), AR., Schalau
- DPPH (2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), SIMA
- BHA (3-tert-butyl-4-hydroxyanisole), AR, Fluka
- Ascorbic acid R.G., Reag.ACS, Reag.ISO, Reag.Ph.Eur
- Iron (III) chloride. $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, CARLO ERBA
- 2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine, Fluka
- Hydrochloric acid, Chemikit Limited partnership

- k. Iron (II) sulphate, AR, Ajax Finechem
- l. Dimethyl sulfoxide. Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH.
- m. Brain Heart Infusion agar. HiMedia Laboratories.Limited, Mumbai (Bombay) -400 086, India

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมพืชตัวอย่างสำหรับการสกัด

- 1.1 เก็บพืชตัวอย่าง โดยเก็บเอาส่วนใบ แล้วทำการหั่น (Cutting)
- 1.2 ทำการตากลม การตากลมพืชสมุนไพรนั้นเพื่อรักษาคุณภาพของสมุนไพรให้ดีที่สุดก่อนทำการสกัด ป้องกันการบูดเสียของจุลินทรีย์ และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่อยู่ในพืชสด หรืออบที่อุณหภูมิต่ำ
- 1.3 นำพืชสมุนไพรที่ได้มาทำการย่อย ด้วยเครื่องบด (Comminution or pulverization) เพื่อให้การสกัดสารที่สำคัญจากพืชได้ผลดีเพื่อให้พื้นที่สัมผัสระหว่างสมุนไพรและตัวทำละลายได้เหมาะสมและสกัดได้ออกประกอบที่สำคัญที่สุด

3.3.2 วิธีการสกัดพืชตัวอย่าง

1. ชั่งน้ำหนักพืชสมุนไพรสมุนไพร 588.39 g
2. นำสมุนไพรสมุนไพรใส่ในถุงผ้าที่สะอาด มัดปากถุงผ้าให้แน่น
3. ใส่ถุงผ้าที่มีสมุนไพรสมุนไพร ลงในโถแก้ว แล้วทำการสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ดังนี้
 - แห่ด้วย Hexane (C_6H_{14}) pure ปริมาตร 6000 ml ต่อครั้ง เป็นเวลาประมาณ 3, 2, 2 วัน/ครั้ง และ กรองสารละลายแล้วนำสารละลายที่กรองได้ ไปทำการระเหยตัวทำละลายออก ด้วยเครื่องRotary evaporator แล้วเก็บสารตัวอย่างไว้ทำการวิเคราะห์ต่อไป
 - แห่ด้วย Dichloromethane (CH_2Cl_2) pure ปริมาตร 6000 ml ต่อครั้ง เป็นเวลาประมาณ 3, 2 และ 2 วัน /ครั้ง กรองสารละลายแล้วนำสารละลายที่กรองได้ ไปทำการระเหยตัวทำละลายออก ด้วยเครื่อง Rotary evaporator แล้วเก็บสารตัวอย่างไว้ทำการวิเคราะห์ต่อไป
 - แห่ด้วย Ethyl acetate pure ปริมาตร 6,000 ml เป็นเวลาประมาณ 3, 2 และ 2 วัน/ครั้ง กรองสารละลายแล้วนำสารละลายที่กรองได้ ไปทำการระเหยตัวทำละลายออก ด้วยเครื่อง Rotary evaporator แล้วเก็บสารตัวอย่างไว้ทำการวิเคราะห์ต่อไป

- แห้ด้วย Ethanol (C_2H_5OH) pure ปริมาตร 6000 ml ต่อครั้ง เป็นเวลาประมาณ 3, 2 และ 2 วัน/ครั้ง กรองสารละลายแล้วนำสารละลายที่กรองได้ไปทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator แล้วเก็บสารตัวอย่างไว้ทำการวิเคราะห์ต่อไป

- แห้ด้วย Methanol (CH_3OH) pure ปริมาตร 6000 ml ต่อครั้ง เป็นเวลาประมาณ 3, 2, และ 2 วัน/ครั้ง กรองสารละลายแล้วนำสารละลายที่กรองได้ไปทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator แล้วเก็บสารตัวอย่างไว้ทำการวิเคราะห์ต่อไป

3.3.3 การวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารสกัด

เตรียมสารละลายของสารสกัดเข้มข้น 100 ppm โดยการชั่งสารสกัดมา 25 mg ละลายด้วยตัวทำละลายแล้วปรับปริมาตรเป็น 25 ml จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1,000 ppm แล้วทำการปิเปตมา 1 ml ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 ml แล้วปรับปริมาตรให้ถึงขีดจะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 100 ppm จากนั้นนำสารละลายแต่ละตัวไปทำการ Scan หาค่าความยาวคลื่น (λ_{max}) ของสารสกัดแต่ละตัว

3.3.4 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH method

3.3.4.1 เตรียมสารละลายในแต่ละส่วนที่สกัดได้ คือ

- 1) สกัดได้จาก Hexane (C_6H_{14}) 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 1000, 500, 250, 125, 62.5 และ 31.25 ppm ตามลำดับ

3.3.4.2 เตรียมสารละลาย Methanolic DPPH radical 0.2 mM โดยการชั่งสาร DPPHหนัก 4 mg ด้วย Methanol แล้วปรับปริมาตรเป็น 50 ml

3.3.4.3 ปิเปต 0.5 ml ของสารละลายตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้น ใส่ลงในขวด 3 ใบเพื่อทำการทดสอบ 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย

3.3.4.4 ปิเปต 0.1 ml ของ methanolic DPPH radical ในขวดต่าง ๆ ในข้อ 3

3.3.4.5 เขย่าให้สารละลายเข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มีอุณหภูมิประมาณ 30 นาที

3.3.4.6 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น λ 517 nm ด้วยเครื่อง UV spectrophotometer

3.3.4.7 วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย standard DPPH radical (0.5 ml solvent ที่ใช้ในสารละลายส่วนสกัดรวมกับ 1 ml ของ 0.2 มิลลิโมล methanolic DPPH radical)

3.3.4.8 คำนวณค่า % Radical scavenging จากสมการ ดังนี้

$$\% \text{ Radical scavenging} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{Sample}}}{A_{\text{Control}}} \times 100$$

3.3.4.9 หาค่า IC_{50} จากความสัมพันธ์ของกราฟที่ได้

3.3.5 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP)

3.3.5.1 การเตรียมสารละลายเพื่อทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Ferric reducing /antioxidant power assay (FRAP)

1) **Acetate Buffer (300 mM, pH 3.6)** : โดยการชั่ง 3.1 g Sodium acetate.3H₂O, glacial acetate acid 16 ml ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 L ผสมให้เข้ากัน และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

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

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 °C (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

4) **Ferric chloride (20 mM)** : 0.054 g FeCl₂.6H₂O ละลายโดยน้ำกลั่น 10 mL (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

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

3.3.5.2 วิธีการวิเคราะห์ความสามารถการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Ferric reducing

/antioxidant power assay (FRAP)

1) ทำการปิเปตสารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่างๆปริมาตร 150 μL ใส่ในขวดสีชาขนาด 5 mL แล้วเติมสารละลาย FRAP ปริมาตร 3 mL เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 6 นาที

2) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm

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

3.3.5.3 การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลาย Ferrous sulphate

ทำการเตรียมสารละลาย Ferrous sulphate ที่มีความเข้มข้น 1 mM โดยการนำสาร $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 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

3.3.6 วิธีการทดสอบการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

3.3.6.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

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

หลังจากนั้นนำอาหารที่แข็งตัวมาละลายแล้วเทใส่จานเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (ต้องทำในเครื่อง Laminar air flow เพื่อป้องกันการปนเปื้อนเชื้อที่อยู่ในอากาศ)

3.3.6.2 การเตรียมสารสกัดเพื่อนำไปทดสอบความสามารถด้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

ในการทดสอบความสามารถด้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโดยนำสารสกัดแต่ละตัวมาเตรียมเป็นความเข้มข้น 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 mL ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 mL ปรับปริมาตรจะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 500 ppm

3.3.6.3 วิธีการทดสอบความสามารถด้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

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

2) นำเอา Paper disc ที่ใส่สารตัวอย่างแต่ละตัวมาวางบนจานเลี้ยงเชื้อ

3) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วัด Clear Zone

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปราย

4.1 น้ำหนักของสารสกัดที่ได้จากการสกัดในแต่ละตัวทำละลาย

หลังจากนำเอาสารตัวอย่างใบหวานร็อกที่มีน้ำหนัก 588.36 g แช่ในตัวทำละลายชนิดต่างๆ เป็นเวลา 3, 2 และ 2 วัน ต่อหนึ่งตัวทำละลายแล้วนำไปทำการลดปริมาตรโดยใช้เครื่อง Rotary evaporator แล้วเก็บไว้ในบีกเกอร์ที่ทราบน้ำหนัก ปลอ่ยให้สารสกัดแห้ง แล้วนำบีกเกอร์ที่มีสารสกัดบรรจุอยู่ไปชั่งน้ำหนักจะทำให้เราทราบน้ำหนักของสารสกัดที่ได้จากแต่ละตัวทำละลายซึ่งมีค่าดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงน้ำหนักสารสกัดที่ได้จากการสกัดโดยตัวทำละลายชนิดต่างๆ

ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด	น้ำหนักของสารสกัด (g)	สารสกัดหายาบ (%)
Hexane	29.12	4.95
Dichloromethane	60.01	10.20
Ethyl acetate	90.14	15.32
Ethanol	100.03	17.01
Methanol	42.36	9.20

4.2 ผลของการศึกษาหาความยาวคลื่นที่สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุด

จากการศึกษาหาความยาวคลื่นที่สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดของสารสกัดที่ได้จากการสกัดโดยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้ผลดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงผลของการศึกษาหาความยาวคลื่นของสารสกัด

ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด	$\lambda_{\max}$ (nm)
Hexane	410
Dichloromethane	373
Ethyl acetate	320
Ethanol	315
Methanol	335

จากตารางพบว่าสารสกัดแต่ละชนิดมี Wavelength ที่แตกต่างกันและแตกต่างจาก $\lambda_{\max}$ ของสารละลาย DPPH ซึ่งมีค่า Wavelength เท่ากับ 517 nm ดังนั้นสารที่สกัดจึงสามารถนำไปทำการวิเคราะห์หาค่าการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ได้

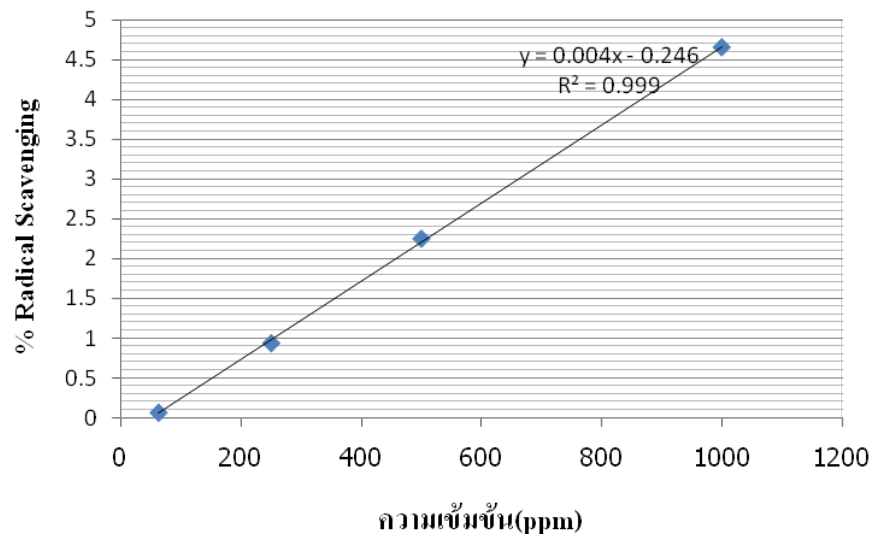
4.3 ผลการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแต่ละชนิด

ผลการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบฮว่านจ็อก โดยวิธี DPPH แสดงผลการทดลองเป็นเปอร์เซ็นต์การจับอนุมูลอิสระ (% Scavenging effect) เป็นผลมาจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย DPPH กับสารสกัดหยาบ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ $\lambda_{\max}$ 517 nm ซึ่งเป็นค่า Wavelength ที่สารละลาย DPPH สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุด ดังนั้นค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH เปลี่ยนไปแสดงว่า สารมีสมบัติเป็นสารแอนติออกซิเจนด์เข้าทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH โดยที่ DPPH free radical ได้รับอิเล็กตรอนหรืออนุมูลอิสระไฮโดรเจน จากสารสกัดใบฮว่านจ็อกทำให้เกิดการเสถียร แล้วเปลี่ยนไปไม่เป็นอะตอมอิสระต่อไป ซึ่งสามารถสังเกตได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ $\lambda_{\max}$ 517 nm จะลดลงแล้วนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปซึ่งมีค่าเท่ากับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจะได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.3

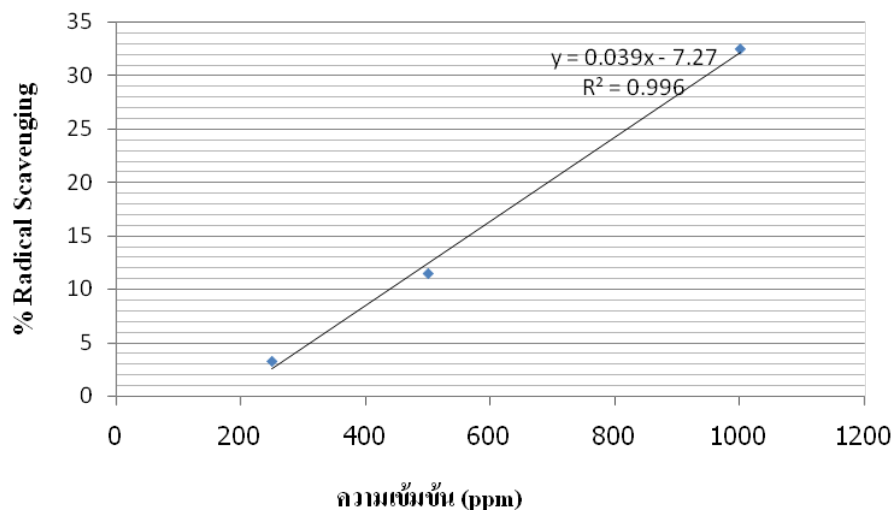
ตารางที่ 4.3 ผลการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแต่ละชนิด

ชนิดของสารสกัด	ความเข้มข้น (ppm)	Radical Scavenging activity (%)				
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\bar{X} \pm SD$	95% CL for μ
Crude Hexane	1000.00	4.650	4.630	4.670	4.650±0.020	4.650±0.050
	500.00	2.250	2.250	2.210	2.250±0.040	2.250±0.100
	250.00	0.940	0.930	0.950	0.940±0.010	0.940±0.020
	125.00	0.870	0.880	0.870	0.870±0.010	0.870±0.020
	62.50	0.080	0.050	0.090	0.070±0.020	0.070±0.050
	31.25	0.000	0.000	0.000	0.000±0.000	0.000±0.000
Crude Dichloromethane	1000.00	32.520	32.510	32.530	32.520±0.010	32.520±0.020
	500.00	11.480	11.500	11.480	11.480±0.020	11.480±0.124
	250.00	3.250	3.200	3.300	3.250±0.050	3.250±0.124
	125.00	0.000	0.000	0.000	0.000±0.000	0.000±0.000
	62.50	0.000	0.000	0.000	0.000±0.000	0.000±0.000
	31.25	0.000	0.000	0.000	0.000±0.000	0.000±0.000
Crude Ethyl acetate	1000.00	63.880	63.880	63.880	63.880±0.020	63.880±0.050
	500.00	34.880	34.900	34.880	34.880±0.020	34.880±0.050
	250.00	17.000	17.200	16.800	17.000±0.200	17.000±0.497
	125.00	8.430	8.430	8.450	8.430±0.020	8.430±0.050
	62.50	4.060	4.1000	4.060	4.060±0.040	4.060±0.099
	31.25	2.680	2.620	2.740	2.680±0.060	2.680±0.149
Crude Ethanol	1000.00	77.080	77.080	77.040	77.080±0.040	77.080±0.099
	500.00	36.770	36.770	36.800	36.770±0.030	36.770±0.075
	250.00	18.620	18.640	18.620	18.650±0.030	18.650±0.075
	125.00	9.600	10.200	9.600	9.600±0.060	9.600±0.149
	62.50	5.230	5.200	5.260	5.230±0.030	5.230±0.075
	31.25	2.620	2.580	2.660	2.620±0.040	2.620±0.099
Crude Methanol	1000.00	56.560	56.620	56.560	56.560±0.060	56.560±0.149
	500.00	23.800	23.770	23.810	23.800±0.00	23.800±0.075
	250.00	10.600	10.560	10.620	10.600±0.030	10.600±0.075
	125.00	5.190	5.140	5.200	5.190±0.050	5.190±0.124
	62.50	2.100	2.090	2.060	2.100±0.050	2.100±0.124
	31.25	0.940	0.910	0.970	0.940±0.030	0.940±0.075
BHT	1000.00	94.612	94.619	94.612	94.614±0.004	94.614±0.010
	500.00	82.211	82.218	82.211	82.213±0.004	82.213±0.010
	250.00	55.761	55.767	55.761	55.763±0.003	55.763±0.007
	125.00	27.810	27.809	27.801	27.816±0.005	27.816±0.012
	62.50	14.431	14.435	14.425	14.432±0.005	14.432±0.012
Ascorbic acid	1000.00	96.69	96.695	96.685	96.685±0.005	96.685±0.012
	500.00	85.679	85.683	85.678	85.678±0.003	85.678±0.007
	250.00	37.751	37.754	37.655	37.655±0.056	37.655±0.139
	125.00	8.818	8.825	8.817	8.817±0.004	8.817±0.010

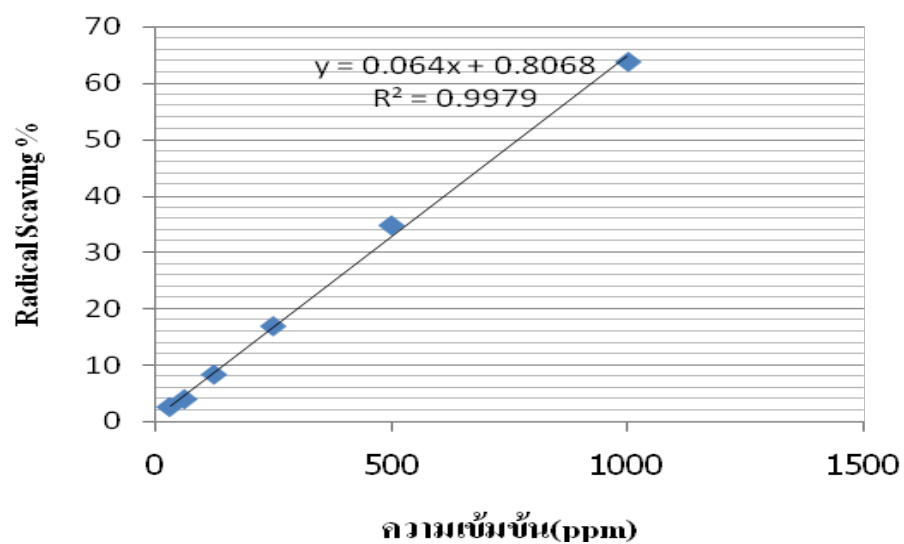
จากตารางที่ 4.3 พบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแต่ละตัวจะแปรผันตรง กับความเข้มข้นของสารตัวอย่างนั้นๆ และเมื่อเรานำค่าความสามารถการต้านอนุมูลอิสระสร้างกราฟเปรียบเทียบกับความเข้มข้นจะได้กราฟเป็นเส้นตรง ดังนี้



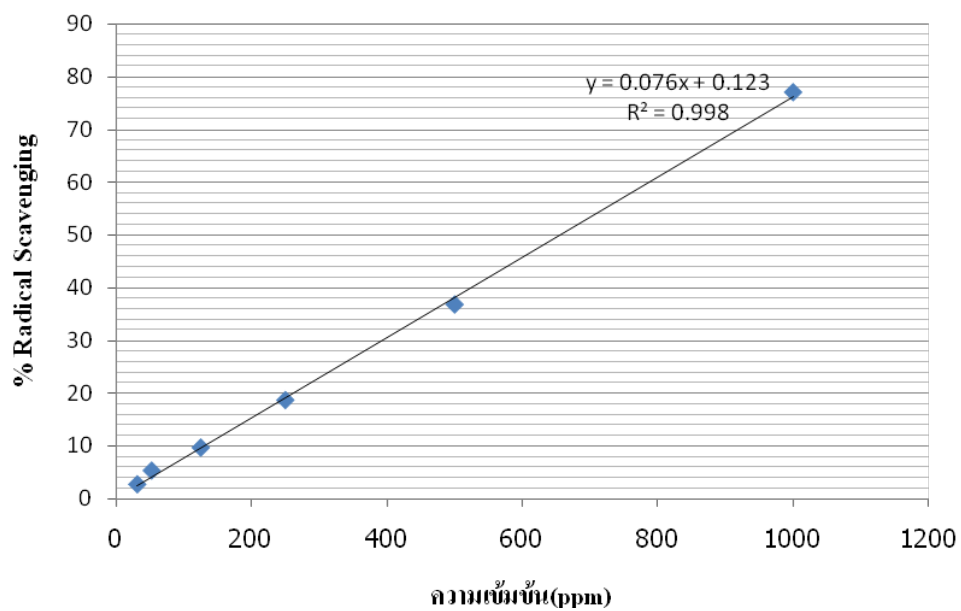
รูปที่ 4.1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % Radical Scaving กับความเข้มข้นของ Crude Hexane



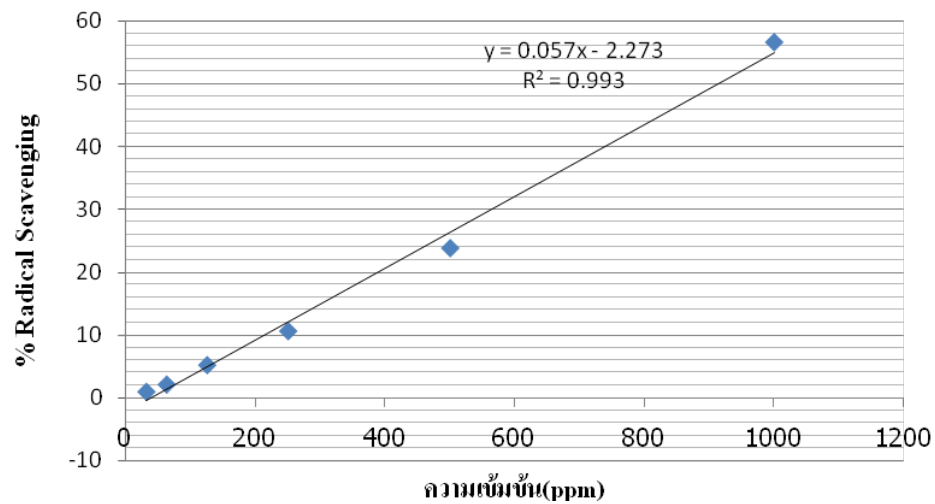
รูปที่ 4.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % Radical Scaving กับความเข้มข้นของ Crude chloromethane



รูปที่ 4.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % Radical Scavenging กับความเข้มข้นของ Crude Ethylacetate



รูปที่ 4.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % Radical Scavenging กับความเข้มข้นของ Crude Ethanol



ภาพที่ 4.5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % Radical Scavenging กับความเข้มข้นของ Crude Methanol

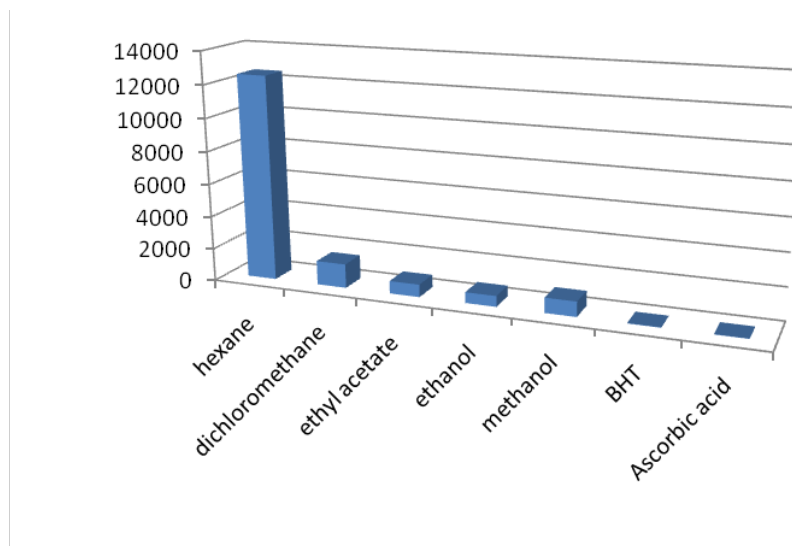
จากรูปที่ 4.1 นำมาคำนวณหาค่า IC_{50} ซึ่งเป็นความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH $\cdot$ ลดลงได้ 50% ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงค่า IC_{50} ของสารตัวอย่างในการต้านอนุมูลอิสระ

สารตัวอย่าง	IC_{50} (Inhibitory Concentration 50%) ppm
Crude Hexane	12520.000
Crude Dichloromethane	1468.460
Crude Ethyl acetate	768.660
Crude Ethanol	656.270
Crude Methanol	917.070
BHT	22.310
Ascorbic acid	16.012

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

4.4 ผลของการคำนวณหาค่า IC_{50}



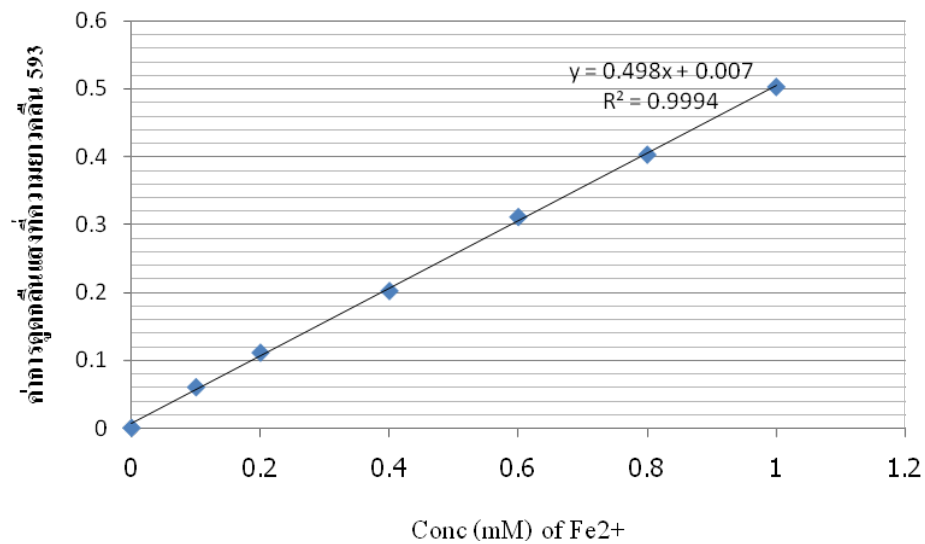
รูปที่ 4.6 แสดงการเปรียบเทียบค่า IC_{50} (Inhibitory Concentration 50%) ของสารตัวอย่างกับอนุมูลอิสระมาตรฐาน

4.5 ผลการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP

หลังจากนำสารละลาย Iron (II) sulphate ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm จะได้ค่าการดูดกลืนแสงดังตารางที่ 4.5

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



รูปที่ 4.7 กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP

จากการศึกษาค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง จะเห็นว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ อยู่ในช่วงของกราฟมาตรฐาน และคำนวณหาความเข้มข้นของ Fe²⁺ ที่เกิดขึ้นได้ผลดังแสดงตารางที่ 4.6

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

สารสกัด	ความเข้มข้น (mM)	ความเข้มข้นของ Fe^{2+} (mM)				
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	$\bar{x} \pm \text{SD}$	95% CL for μ
Crude Hexane	250	0.126	0.132	0.132	0.130 $\pm$ 0.003	0.130 $\pm$ 0.007
	500	0.183	0.185	0.186	0.185 $\pm$ 0.002	0.185 $\pm$ 0.005
	1000	0.245	0.251	0.247	0.248 $\pm$ 0.003	0.248 $\pm$ 0.007
Crude Dichloromethane	250	0.225	0.231	0.227	0.228 $\pm$ 0.003	0.228 $\pm$ 0.007
	500	0.469	0.473	0.470	0.471 $\pm$ 0.002	0.471 $\pm$ 0.005
	1000	0.944	0.949	0.948	0.947 $\pm$ 0.003	0.947 $\pm$ 0.007
Crude Ethyl acetate	250	0.161	0.155	0.157	0.158 $\pm$ 0.003	0.158 $\pm$ 0.007
	500	0.512	0.508	0.508	0.509 $\pm$ 0.002	0.509 $\pm$ 0.005
	1000	0.936	0.938	0.934	0.936 $\pm$ 0.002	0.936 $\pm$ 0.005
Crude Ethanol	250	0.062	0.066	0.064	0.064 $\pm$ 0.002	0.064 $\pm$ 0.005
	500	0.108	0.110	0.11	0.109 $\pm$ 0.001	0.109 $\pm$ 0.002
	1000	0.247	0.249	0.253	0.250 $\pm$ 0.003	0.250 $\pm$ 0.007
Crude Methanol	250	0.062	0.056	0.066	0.061 $\pm$ 0.005	0.061 $\pm$ 0.012
	500	0.422	0.416	0.418	0.419 $\pm$ 0.003	0.419 $\pm$ 0.007
	1000	0.777	0.773	0.779	0.776 $\pm$ 0.003	0.776 $\pm$ 0.007

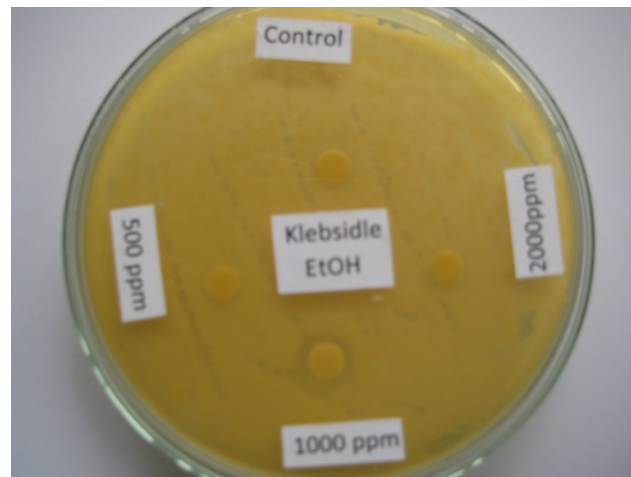
4.6 ผลการต้านแบคทีเรีย

หลังจากการนำสารสกัดมาเตรียมเป็นความเข้มข้นต่างๆ และทดสอบฆ่าแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด ซึ่งได้แก่ *E.coli*, *Klebsiella*, *spp Enterobacter spp* และ *Citrobacter* เป็นเวลา 48 ชั่วโมงจะได้ Clear Zone ดังตารางที่ 4.7

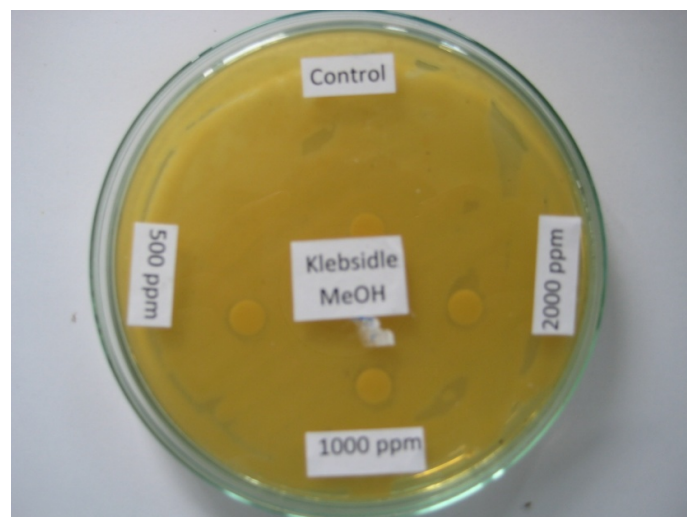
ตารางที่ 4.7 แสดงความสามารถของการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจากสารสกัดหยาดหวานนี้

สารสกัด	ความเข้มข้น	Clear zone (cm)			
		<i>E.coli</i>	<i>Klebsiella spp</i>	<i>Enterobacter spp</i>	<i>Citrobacter</i>
Crude Hexane	control	-	-	-	-
	2000	-	-	-	-
	1000	-	-	-	-
	500	-	-	-	-
Crude Dichloromethane	control	-	0.7	0.6	0.6
	2000	-	0.9	0.8	0.7
	1000	-	1.0	0.7	0.7
	500	-	0.7	0.7	1.0
Crude Ethyl acetate	control	-	-	-	-
	2000	-	-	-	-
	1000	-	-	-	-
	500	-	-	-	-
Crude Ethanol	control	-	0.6	-	0.7
	2000	-	1.0	-	0.9
	1000	-	0.7	-	0.8
	500	-	0.7	-	0.7
Crude Methanol	control	-	0.6	0.6	0.7
	2000	-	0.8	0.9	0.9
	1000	-	0.7	0.8	0.9
	500	-	0.7	0.8	0.9

4.7 ภาพการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย



ภาพที่ 6.3 แสดงความสามารถของ Crude ethanol ในการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิด *Klebsiella spp.* ที่ความเข้มข้นต่างๆ



ภาพที่ 6.4 แสดงความสามารถของ Crude Methanol ในการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิด *Klebsiella spp.* ที่ความเข้มข้นต่างๆ

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผล

5.1.สรุปผลการทดลอง

การวิจัยครั้งนี้เป็นการนำพืชสมุนไพรหวานจอก (*Pseuderatherum Platiferum*) มาทำการสกัดเอสารสำคัญ โดยตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้แก่ Hexane, Dichloromethane, Ethyl acetate, Ethanol และ Methanol เพื่อศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี Ferric reducing /antioxidant power assay (FRAP) และ DPPH method นอกจากนี้ยังทดสอบความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิด *E.coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.* และ *Citrobacter* โดยการนำเชื้อแบคทีเรียมาจากภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

การสกัดสารที่สำคัญจากสมุนไพรหวานจอกโดยตัวทำละลาย Hexane, Dichloromethane, Ethyl acetate, Ethanol และ Methanol จะได้สารสกัดหยาบที่มีน้ำหนัก 29.12, 60.01, 90.14, 100.03 และ 42.36 g ตามลำดับ จากสมุนไพรที่มีน้ำหนักแห้ง 588.36 g คิดเป็นเปอร์เซ็นต์จะได้ 4.95, 10.20, 15.32, 17.01 และ 9.20 g ตามลำดับ และนำสารสกัดที่แห้งไปศึกษาคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

การศึกษาศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบแต่ละตัวโดยวิธี DPPH method (2, 2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl) พบว่าสารสกัดที่ได้จาก Ethanol มีความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH[•] ได้ดีที่สุดซึ่งมีค่าเปอร์เซ็นต์ Radical Scavenging activities เท่ากับ 77.080 ± 0.040 , 36.770 ± 0.030 , 18.650 ± 0.030 , 9.600 ± 0.060 , 5.230 ± 0.030 และ 2.620 ± 0.040 ที่ความเข้มข้น 1000, 500, 250, 125, 62.5 และ 31.25 ppm เมื่อนำไปคำนวณหาค่า IC_{50} เท่ากับ 656.270 ppm และรองลงมาคือ Ethyl acetate, Methanol และ Hexane ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 768.660, 917.070, 1468.460 และ 12520.000 ppm และจากการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสาร Ascorbic acid และสาร BHT ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระมาตรฐานพบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 16.012, 22.310 ppm ตามลำดับ

การศึกษาศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Ferric reducing /antioxidant power assay (FRAP) พบว่าสารที่มีความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} ให้เป็น Fe^{2+} ได้ดีจากมากไปหาน้อยคือ 1) Crude Dichloromethane สามารถรีดิวซ์ได้ Fe^{2+} ปริมาณ 0.228 ± 0.007 , 0.471 ± 0.005 และ 0.947 ± 0.007 mM 2) Crude Ethyl acetate ซึ่งมีปริมาณ Fe^{2+} เท่ากับ 0.158 ± 0.007 , 0.509 ± 0.005 และ 0.936 ± 0.005 3) Crude Methanol ซึ่งมีปริมาณ Fe^{2+} เท่ากับ 0.061 ± 0.012 , 0.419 ± 0.007 และ 0.776 ± 0.007 4) Crude Ethanol ซึ่งมี

ปริมาณ Fe^{2+} เท่ากับ 0.064 ± 0.005 , 0.109 ± 0.002 และ 0.250 ± 0.007 และ 5) Crude Hexane มีปริมาณ Fe^{2+} เท่ากับ 0.130 ± 0.007 , 0.185 ± 0.005 และ 0.248 ± 0.007 ที่ความเข้มข้น 250, 500 และ 1,000 ppm ตามลำดับ

ส่วนผลของการทดสอบความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย พบว่าไม่มีสารสกัดหยาบใดที่มีความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของ *E. Coli*, สารสกัดหยาบ Dichloromethane และ Methanol สามารถต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Klebsiella spp.*, *Etherobacter spp.* และ *Citrobacter* ได้ดี แต่สารสกัดหยาบจาก Ethanol สามารถต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ดีเฉพาะ *Klebsiella spp.* และ *Citrobacter* ในขณะที่ สารสกัดหยาบ Hexane และ Ethyl acetate ไม่มีความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดได้เลย

ดังนั้นสารสกัดหยาบจากใบชว่นจ็อกโดยตัวทำละลายอินทรีย์ทุกชนิด ได้แสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH[•] และมีความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} ให้เป็น Fe^{2+} ได้ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารสกัดหยาบจากใบชว่นจ็อกโดยตัวทำละลาย Ethanol มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีมากกว่าสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายชนิดอื่นๆ และมีค่า IC_{50} ไม่แตกต่างกันมากเมื่อเทียบกับสาร BHT และ Ascorbic acid ที่เป็นยอมรับกันว่าเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Klebsiella spp.* และ *Citrobacter* อีกด้วย เพราะฉะนั้นสารสกัดจากใบชว่นจ็อกโดยตัวทำละลาย Ethanol สามารถนำไปใช้งานในด้านการแพทย์ หรือทำการวิเคราะห์โครงสร้างแล้วทำการพัฒนาโครงสร้างเพื่อเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพให้ดีกว่าเดิมอีกต่อไป

5.2 ข้อเสนอแนะ

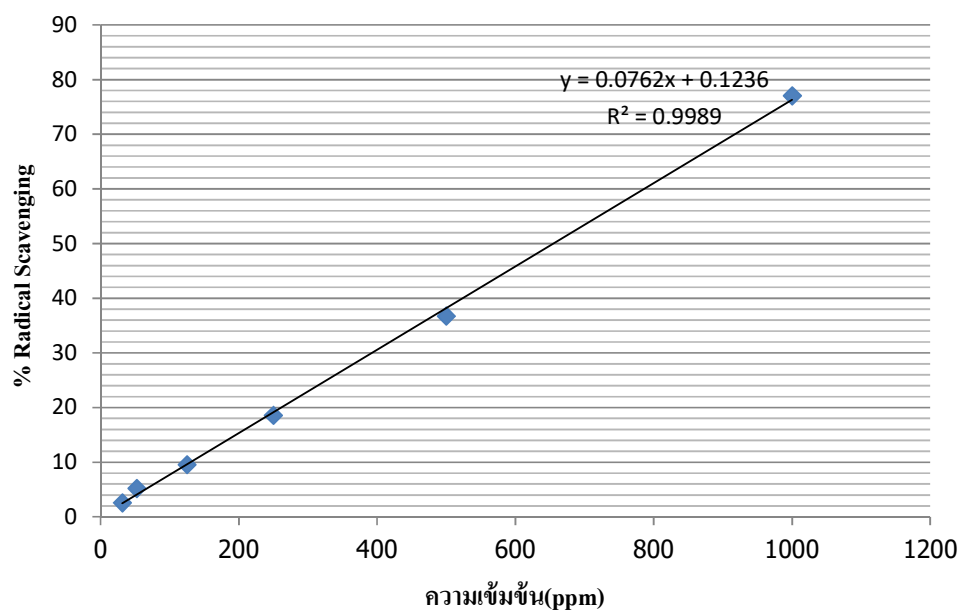
1. การวิเคราะห์ความสามารถการต้านอนุมูลอิสระควรใช้อุปกรณ์ที่สะอาดมาก ไม่ให้มีสิ่งปนเปื้อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารที่เป็นโลหะ เช่น Fe, Cu, Zn เป็นต้น เพราะว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีมีความสามารถในการรีดิวซ์สูง จะทำปฏิกิริยากับโลหะนี้จนหมดความสามารถในการรีดิวซ์ก่อนที่จะทำปฏิกิริยากับอนุมูลที่เราต้องการทดสอบ ทำให้ค่าที่ได้จากการทดสอบน้อยกว่าค่าจริง
2. ควรทำการทดสอบหลายวิธีเนื่องจากว่าสารต้านอนุมูลอิสระแต่ละตัวจะมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ไม่เท่ากัน

ภาคผนวก

ภาคผนวก

1. การคำนวณหา IC_{50} (Inhibitory Concentration 50%)

การคำนวณหา IC_{50} โดยนำค่าความชันของกราฟระหว่างความเข้มข้นกับสารตัวอย่าง
นั้นๆ เช่น สารสกัดจากใบฮวานเจือกโดยตัวทำละลาย Hexane



รูปที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับความสามารถในการต้านอนุมูล
อิสระ

จากรูปที่ 1 แสดงให้เห็นว่ากราฟมีความชัน $y = 0.076x + 0.1236$ สามารถนำไป
คำนวณหา IC_{50} ดังสมการต่อไปนี้

$$\begin{aligned}
 y &= 0.076x + 0.1236 \\
 50 &= 0.076x + 0.1236 \\
 x &= \frac{50 - 0.1236}{0.076} = 656.270
 \end{aligned}$$

ดังนั้นค่า IC_{50} ของสารสกัดฮวานเจือกมีค่าเท่ากับ 656.270

2. การคำนวณหาค่าเฉลี่ย

$$\bar{X} = \frac{\sum_i^N X_i}{N} = \frac{X_1 + X_2 + \dots + X_N}{N}$$

X_i = ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในการวัดครั้งที่ i ($i = 1, 2, 3, \dots$)

$$X_1 = 4.650$$

$$X_2 = 4.630$$

$$X_3 = 4.670$$

$$\bar{X} = \frac{4.650 + 4.630 + 4.670}{3} = 4.650$$

ดังนั้นค่าเฉลี่ยของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระคือ $\bar{X} = 4.650$

3. การคำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน(Standard Deviation, S)

ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S) ของการวัดแต่ละชุด

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{N-1}}$$

เมื่อ X_i = ค่าการต้านอนุมูลอิสระแต่ละครั้ง

S = ค่าการเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$$X_1 = 4.650$$

$$X_2 = 4.630$$

$$X_3 = 4.670$$

$$\bar{X} = 4.650$$

$$\text{ดังนั้น } S = \sqrt{\frac{(4.650 - 4.650)^2 + (4.630 - 4.650)^2 + (4.670 - 4.650)^2}{N-1}} = 0.020$$

4. การหาช่วงความเชื่อมั่น

$$\mu = \bar{X} \pm \frac{tS}{\sqrt{N}}$$

เมื่อ t = ระดับชั้นเสรี

$$\mu = 4.650 + \frac{0.020 \times 4.30}{\sqrt{3}} = 4.650 \pm 0.050$$

ดังนั้นค่าระดับความเชื่อมั่น 95% เท่ากับ 4.650 ± 0.050

ตารางที่ 6.1 ค่า t ที่มีขีดความเชื่อมั่นต่างๆ

ระดับชั้น ความเสรี (N-1)	ค่า t สำหรับขีดความเชื่อมั่น (%)					
	50	80	90	95	99	99.8
1	1.00	3.08	6.31	12.70	63.70	318.00
2	0.82	1.89	2.92	4.30	9.92	22.30
3	0.76	1.64	2.35	3.18	5.84	10.20
4	0.74	1.53	2.13	2.78	4.60	7.17
5	0.73	1.48	2.02	2.57	4.03	5.89
6	0.72	1.44	1.94	2.45	3.71	5.21
7	0.71	1.42	1.90	2.36	3.50	4.78
8	0.71	1.40	1.86	2.31	3.36	4.50
9	0.70	1.38	1.83	2.26	3.25	4.30
10	0.70	1.37	1.81	2.23	3.17	4.14
12	0.70	1.36	1.78	2.18	3.06	3.93
15	0.69	1.34	1.75	2.13	2.95	3.73
20	0.69	1.32	1.72	2.09	2.84	3.55
30	0.68	1.31	1.70	2.04	2.75	3.38
60	0.68	1.30	1.67	2.00	2.66	3.23
∞	0.67	1.29	1.64	1.96	2.58	3.09

ต้นฮว่านง็อก

สมุนไพรฮว่านง็อก (Hoan Ngoc) เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า ว่านลิง, พญาพานร เป็นพืชพื้นเมืองของประเทศเวียดนาม ผู้ที่นำเข้ามาปลูกในประเทศไทยเป็นกลุ่มทหารผ่านศึกสมัยสงครามเวียดนาม

ชื่อทางวิทยาศาสตร์: *Pseuderatherum Platiferum*

Family: *Acanthaceae*

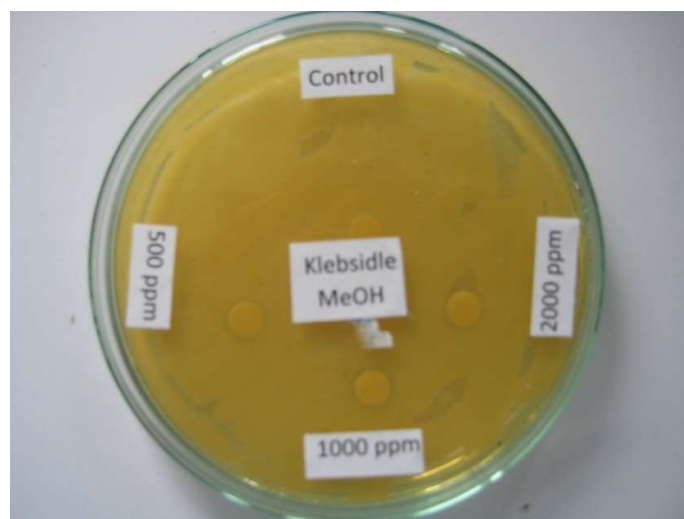


ภาพที่ 2 แสดงลักษณะของต้นฮว่านง็อก

ภาพการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย



ภาพที่ 6.3 แสดงความสามารถของ Crude ethanol ในการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิด *Klebsiella spp.* ที่ความเข้มข้นต่างๆ



ภาพที่ 6.4 แสดงความสามารถของ Crude Methanol ในการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิด *Klebsiella spp.* ที่ความเข้มข้นต่างๆ

เอกสารอ้างอิง

- ปิยนุช ทองผาสุก. ผลของรังสีแกมมาต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารเคอร์คูมินอยด์ในขมิ้นชัน.
ในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีนิเวศลิยร์ครั้งที่ 10: 16-17 สิงหาคม 2550.
กรุงเทพฯ
- นาถธิดา วีระปรียากร. 2550. การทดสอบความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ (DPPH).
มหาวิทยาลัยขอนแก่น: คณะเภสัชศาสตร์.
- พรรณี เค้นรุ่งเรือง. 2550. กรุงเทพฯ: ฤทธิ์การการต้านอนุมูลอิสระของเปลือกคันทงศ์อบเชย. ใน
รายงานผลงานวิจัย ประจำปี 2550. สำนักงานวิจัยการจัดการป่าไม้และผลิตผลป่าไม้
- รัตน อินทรานุปกรณ์. 2547. การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร. กรุงเทพฯ:
สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วิไลลักษณ์ ศรีสุระ.(2551): Online. จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับอาหาร. ค้นจาก
<http://www.halalthailand.com/healthy/subindex.php?page=content&category=&subcategory=&id=60>
- สรรพคุณและขนาดการใช้ใบว่านลิง (พญาวานร, ฮว่านจ๊อก). (2551) Online. ค้นจาก
<http://blog.sanook.com/Default.aspx?alias=medplant>.
- โอภา วัชรคุปต์. 2549. สารต้านอนุมูลอิสระ. กรุงเทพฯ : พี.เอส.พรินท์, 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 Horticultural Science**. 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 *Vitex 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.