

บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้อง

2.1 ป่าชุมชนบ้านหัวทุ่ง ตำบลเชียงดาว อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่

ป่าชุมชนบ้านหัวทุ่งอยู่ในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเชียงดาว ตำบลเชียงดาว อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่ มีพื้นที่มากกว่า 6,000 ไร่ มีความหลากหลายของพืชพรรณในป่าไม้ สัตว์ป่า และจุลินทรีย์ โดย อังคณา อินตาและคณะ (2555) ได้สำรวจพืชสมุนไพรในป่าชุมชนบ้านหัวทุ่ง ตั้งแต่เดือนมีนาคมถึงธันวาคม 2553 โดยการสอบถามชาวบ้านและหมอพื้นบ้านพบพืชสมุนไพรทั้งหมด 113 ชนิดใน 53 วงศ์ ส่วนของพืชที่มีการนำมาใช้มากที่สุดคือ รากและทั้งต้นและวิธีใช้ยาสมุนไพรที่นิยมคือการต้มกับน้ำ ตัวอย่างพืชสมุนไพรที่มีคุณค่าและเป็นเอกลักษณ์ของชุมชนบ้านหัวทุ่ง ได้แก่ อ้อสะพายควาย (*Euonymus* sp.) กวาวเครือขาว (*Pueraria* sp.) กวาวเครือแดง (*Butea superba*) มะเขือแจ้เครือ (*Securidaca inappendiculata*) และ เชื่องแข้งม้า (*Leea indica*) พืชสมุนไพรที่อยู่ในสภาวะขาดแคลน ได้แก่ กีบม้าลม (*Cycas micholitzii* var. *simplicipinna*) กาสสามปีก (*Flemingia sootepensis*) ว่านนกนางแอ่น (*Adenia* sp.) มะเขือแจ้เครือมั่งหยวด (*Stephania brevipes*) และอ้อสะพายควาย (*Euonymus* sp.) ส่วนพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ได้แก่ กวาวเครือขาว กวาวเครือแดง อ้อสะพายควาย หมอกมุงเมือง (*Dendrolobium thorelii*) มะเขือแจ้เครือ โตไม้รูลัม (*Elephantopus scaber*) เชื่องแข้งม้า เป็นต้น

2.2 หงอนไก่ (Barleria strigosa)

สมุนไพรหงอนไก่ (*Barleria strigosa*) หรือหญ้าหงอนไก่ หรือสังกรณี มีชื่อเรียกตามภูมิภาคอื่น ๆ เช่น กำแพงใหญ่ (เลย) ขี้ไฟนกคุ้ม (ปราจีนบุรี) สังกรณี (ภาคกลาง) หญ้าหงอนไก่ หญ้าหัวนา (ภาคเหนือ) กวางหีและ (สุโขทัย) เท่งดี (กระเหรี่ยง กาญจนบุรี) เป็นต้น อยู่ในวงศ์ Acanthaceae มีลักษณะทางอนุกรมวิธานคือ

Kingdom	Plantae
Division	Spermatophyta
Class	Magnoliopsida
Order	Scrophulariales
Family	Acanthaceae
Genus	Barleria
Scientific Name	<i>Barleria strigosa</i>

หงอนไก่เป็นพืชล้มลุกกิ่งไม้พุ่ม ดอกสีน้ำเงินเข้มและมีใบประดับ ลำต้นเดี่ยวตั้งตรง ไม่มีหนามแตกกิ่งก้านสาขารอบ ๆ ต้นมากมาย ตามกิ่งก้านจะมีขนสีน้ำตาลปกคลุมอยู่ ลำต้นสูงประมาณ 30-100 เซนติเมตร เป็นไม้พุ่มกลางแจ้ง พบบริเวณป่าดิบ ป่าเบญจพรรณ ลักษณะใบเป็นต้นไม้ใบเดี่ยว ออกเรียงกันเป็นคู่ ๆ ไปตามข้อของต้น ใบเป็นรูปรีค่อนยาว ปลายใบแหลม ใบด้านบนเกลี้ยงเป็นมัน ขอบใบเรียบ พื้นใบเป็นสีเขียว

ด้านล่างของใบมีขนยาว ตามเส้นใบ ขนาดของใบมีขนาดกว้างประมาณ 4-7 เซนติเมตร ยาว 10-15 เซนติเมตร ดอกออกเป็นช่ออยู่ตามง่ามของใบ ดอกย่อยมีจำนวนมากจะมีใบห่อหุ้มอยู่ 4 กลีบต่อหนึ่งดอก แต่ดอกจะบานครั้งละ 1-2 ดอก ไม่มีก้านดอก กลีบดอกสีม่วงแกมน้ำเงิน ผลออกเป็นช่ออยู่ตามง่ามใบ ซึ่งมีใบประดับห่อหุ้มอยู่ 4 กลีบ ผลแห้งแตกได้ รูปร่างแบน บางพื้นที่เรียกว่า สังกรณี หย้าหัวนาค ชาวบ้านนำรากมาต้มน้ำดื่มบำรุงกำลัง แก้อ่อนใน ดับพิษร้อน ถอนพิษไข้กาฬ พิษงู แก้อาการหอบหืด ไอ อาเจียนเป็นเลือด วัณโรค ใบสดตำผสมน้ำมันมะพร้าว ใช้นวดตามร่างกาย รักษาริดสีดวงทวาร (เพิ่มเติมสมิตินันท์, 2001 และ Kanchanapoom, T. et al, 2004) นอกจากนี้ ยังมีงานวิจัยรายงานผลของสารสกัดจากรากพืชในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Phosphodiesterase ซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำงานของกล้ามเนื้อ หัวใจ ระบบเลือดอีกด้วย (Temkitthawon, P., et al., 2008) ตำรับยาของอินเดียใช้ในการรักษาโรคผิวหนัง สิว ฝี โรคต่างขาและอาการปวดฟัน (Prapalert, W., et al., 2017) ญัษฐพร มานะประดิษฐ์และคณะ (2556) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากสังกรณีหรือหย้าหางอนไก่ โดยการนำสังกรณีสดมาล้าง และอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 °C จนน้ำหนักคงที่ สกัดสารด้วยวิธีการสกัดแบบการหมัก (maceration) ในตัวทำละลายเมทานอล จากนั้นนำไปทำการระเหยด้วยเครื่อง evaporator ผลการวิจัยพบว่าเมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ต่อแบคทีเรียจำนวน 3 สายพันธุ์ (*B. subtilis*, *S. aureus* และ *P. aeruginosa*) ที่ระดับความเข้มข้น 62.5, 125, 250, 500 และ 1000 มก./มล. และใช้เมทานอลเป็น negative control พบว่าสารสกัดหยาบมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ดีที่สุด



รูป 2.1 ต้นและดอกของหงอนไก่
ที่มา : วสันต์ ภูพิชิต, 2550

2.3 ฮ่อสะพายควาย (*Arnicratea grahamii*)

ฮ่อสะพายควาย (*Arnicratea grahamii*) อยู่ในวงศ์ Celastraceae ฮ่อสะพายควาย เป็นเถาวัลย์หรือไม้พุ่มเลื้อยใบมีลักษณะเป็นวงรีกว้าง 7-13 x 5-10 เซนติเมตร เส้นกึ่งกลางยื่นออกมา 5-6 คู่ปลายสุดสั้นเรียวแหลมบางเวลามีลักษณะป้านหรือกลม ฐานกลมหรือกลมก้านใบสั้นอ้วน ช่อดอกเป็นช่อแบบช่อแยกแขนง ยาว 4-12 เซนติเมตร มีดอกจำนวนมาก ก้านดอกยาว 3-5 เซนติเมตร ใบประดับคล้ายรูปสามเหลี่ยมก้านดอกยาว

0.5-1.75 มิลลิเมตร ดอกมีสีเขียวก่อนข้างเหลืองซีดฐานหยาบกลมโค้งเข้าไปข้างในเล็กน้อย เมื่อถึงระยะออกดอก กลมแบนเล็กน้อย 5 เหลี่ยม ในอวุลมี 4-7 ในแต่ละเซลล์ถุงไข่ แข็ง แบน เป็นวงรีรูปไข่ขนาด 4x10 เซนติเมตร ลำต้นหนา เมล็ดมีลักษณะเป็นรูปไข่ขนาด 6-10x1.5-2.5 เซนติเมตร ลักษณะทางอนุกรมวิธานคือ

Kingdom	Plantae
Division	Spermatophyta
Class	Magnoliopsida
Order	Celastrales
Family	Celastraceae
Genus	Arnicratea
Scientific Name	<i>Arnicratea grahamii</i>

ชาวบ้านใช้เป็นยาบำรุงกำลัง แก้ปวดเมื่อยตามร่างกาย เลือดน้อยเลือดจาง รักษาอาการท้องร่วง แก้นิ่ว รักษาโรคดีซ่าน (ฐานข้อมูลพรรณไม้ องค์การสวนพฤกษศาสตร์, 2556) เนื้อไม้ ใช้แก้ลมพิษ แก้กามโรค เปลือกต้น เป็นยาแก้โรคผิวหนังกลากเกลื้อน นอกจากนี้ ยังใช้เป็นยาบำรุงเหงือกทำให้ฟันทน ยาถ่าย และฆ่าพยาธิ รักษาโรคปวดไขข้อ ลำต้นใช้ดองเหล้าเป็นยาชูกำลัง น้ำที่เคี้ยวจากราก ใช้รักษาโรคปวดกระดูก และไขข้อ (พรพิมล ม่วงไทย , 2555) อย่างไรก็ตาม ยังมีงานวิจัยเกี่ยวกับพืชชนิดนี้จำนวนน้อยมาก มีเพียงรายงานวิจัยที่พบว่า พืชที่อยู่ในวงศ์นี้มีฤทธิ์ในการต้านทานการอักเสบและต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงสามารถต้านทานโรคมะเร็งได้ (Moussa, C., et al., 2016) เป็นต้น



รูป 2.2 ใบฮ่อสะพายควาย

2.4 สารพฤกษเคมีที่สำคัญ

สมุนไพร (Medicinal plant หรือ Herb) คือ พืชทุกชนิดที่สามารถนำมาเป็นยาเพื่อบำบัดรักษาโรคได้ มนุษย์ได้นำส่วนของพืชต่าง ๆ มาแปรรูป เช่นส่วนของราก ลำต้น ใบ ดอก ผล เพื่อนำมาเป็นยาบำรุงร่างกาย หรือนำมาใช้เป็นอาหาร เชื้อเพลิง เครื่องนุ่งห่ม ที่พอกอาศัย ปัจจุบันสมุนไพรนอกจากจะใช้เป็นยาแล้ว ยังใช้เป็นอาหารเสริม เป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอาง ใช้แต่งกลิ่น แต่งสีอาหาร ตลอดจนใช้เป็นยาฆ่าแมลงอีกด้วย สารสำคัญที่พบในพืชสมุนไพรชนิดนี้ (รัตน อินทรานุภรณ์, 2547 อ้างถึง

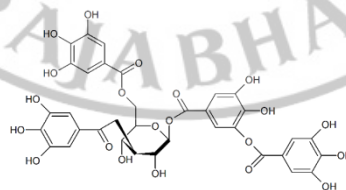
ใน เรณู คำหอม, 2559 ; อรุณรัตน์ สันธิติกวินสกุล, 2557 ; ปิยศิริ สุนทรนนท์ และคณะ, 2557 ; Doughari, J. H., 2012)

1) แอลคาลอยด์ (Alkaloids) เป็นสารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ มักพบในพืชชั้นสูง มีสูตรโครงสร้างซับซ้อนและแตกต่างกันมากมาย คุณสมบัติของแอลคาลอยด์คือ ส่วนใหญ่มีรสขม ไม่ละลายน้ำ ละลายได้ในสารละลายอินทรีย์ มีฤทธิ์เป็นด่าง แอลคาลอยด์มีประโยชน์ ในการรักษาโรคอย่างกว้างขวาง เช่น ใช้เป็นยาระงับปวด ยาแก้ไอ ยาแก้หอบหืด ยารักษาแผลในกระเพาะ และลำไส้ ยาลดความดัน ยาควบคุมการเต้นของหัวใจ เป็นต้น ตัวอย่างเช่น อะโทรปีน (Atropine) ซึ่งสกัดได้จากต้นและใบของลำโพง (*Datura metel* L.) มีฤทธิ์ลดการบีบตัวของลำไส้ รวมทั้งอีฟีดรีน (Ephedrine) ซึ่งสกัดได้จากต้นมั่วอึ้ง (*Ephedra equisetina* B.) มีฤทธิ์ขยายหลอดลมใช้เป็นยา รักษาโรคหอบหืด เป็นต้น

การทดสอบแอลคาลอยด์สามารถทดสอบด้วยปฏิกิริยาการเกิดตะกอน ซึ่งเป็นการทดสอบทั้งกลุ่มแอลคาลอยด์ทั่วไปและแอลคาลอยด์เฉพาะโดยแอลคาลอยด์เกือบทุกชนิดสามารถทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์ แล้วตกตะกอนหรือสารละลาย เช่น รีเอเจนต์เมเยอร์ (Mayer's reagent) จะเกิดตะกอนสีขาวหรือสีครีม หรือ รีเอเจนต์ดราเจนดรอฟฟ์ (Dragendroff's reagent) จะเกิดตะกอนสีส้ม สีแดงหรือสีน้ำตาล เป็นต้น

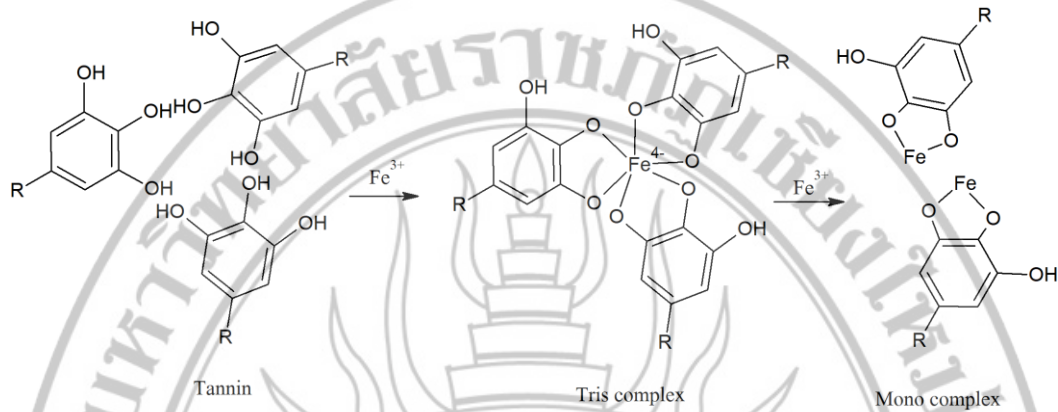
2) แอนทราควิโนน (Antraquinones) เป็นสารที่พบในธรรมชาติมีสีเหลืองส้ม แดงเข้มจนเกือบถึงดำ แต่ไม่ได้มีส่วนแต่งสีสันทให้กับธรรมชาติเหมือนสารสี (Pigments) อื่น ๆ เช่น ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) หรือ แอนโทไซยานิน (Anthocyanins) สารประกอบควินิน (Quinines) มีโครงสร้างเป็นอะโรมาติก ไดคีโตน (Aromatic diketone) ประกอบด้วย วงแหวนเบนซีน (Benzene ring) ตั้งแต่ 1 วงแหวนขึ้นไป และมีหมู่คีโตน 2 หมู่ อยู่ในตำแหน่งพารา (Para) ซึ่งกันและกัน แอนทราควิโนน พบในธรรมชาติทั้งรูปแบบอิสระและรูปแบบไกลโคไซด์ ซึ่งสามารถถูกไฮโดรไลส์ (Hydrolysed) ได้ด้วยกรด ด่าง หรือเอนไซม์ สีของควินิน จะเปลี่ยนได้ตาม pH ในกรดสีของควินินจะออกเหลืองหรือสีส้มและจะเปลี่ยนไปทางสีแดงเมื่ออยู่ในด่าง ควินินถูกใช้ประโยชน์ในทางยาจะมีฤทธิ์แก้โรคผิวหนัง กลาก เกลื้อน ใช้เป็นยาระบายและยาถ่าย พืชที่พบเช่น ใบมะขามแขก ใบขี้เหล็ก ใบชุมเห็ดเทศ ว่านหางจระเข้

3) แทนนิน (Tannins) เป็นสารจำพวกสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) เป็นสารที่มีโครงสร้างซับซ้อนพบได้เฉพาะในพืช (รูป 2.3) คำว่าแทนนิน หมายถึง สารจากพืชที่สามารถเข้ารวมตัวกับ โปรตีนของหนังสัตว์ (Animal hide) ทำให้ไม่เกิดการเน่าเปื่อยตามธรรมชาติ ดังนั้นทางด้านอุตสาหกรรมฟอก จึงมักใช้แทนนินในการฟอกหนังสัตว์โดยฟอกจากหนังดิบสดๆให้กลายเป็นหนังฟอกเพื่อนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องหนัง อีกทั้งสารในกลุ่มแทนนินยังใช้เป็นยาฝาดสมานและยาแก้ท้องเสีย ช่วยรักษาแผลไฟไหม้ สมุนไพรที่มีแทนนิน เช่น เปลือกทับทิม (*Punica granatum* L.) เปลือกอบเชย (*Cinnamomum* spp.) และใบฝรั่ง (*Psidium guajava* L.) เป็นต้น ตัวอย่างเช่น กรดแทนนิก (Tannic acid) และกรดแกลลิก (Gallic acid)



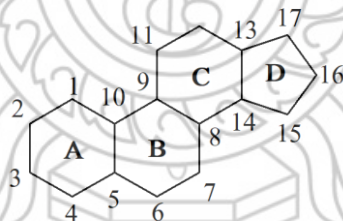
รูป 2.3 โครงสร้างของกรดแทนนิก (Tannic acid)

การทดสอบแทนนินด้วยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอนซึ่งการทดสอบนี้จะใช้รีเอเจนต์เฉพาะเช่น สารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์เจือจาง ดังรูปที่ 2.4 สามารถทดสอบแทนนินได้ทั้งสองชนิด กรณีปรากฏสีน้ำเงินเขียวหรือสีเขียวดำถึงสีเขียวอมน้ำตาล แสดงว่ามีแทนนินชนิดแทนนินไฮโดรไลซ์ เกิดสีน้ำเงินเข้มหรือสีเขียวเข้มถึงสีดำ แสดงว่ามีแทนนินชนิดแทนนินควบแน่น



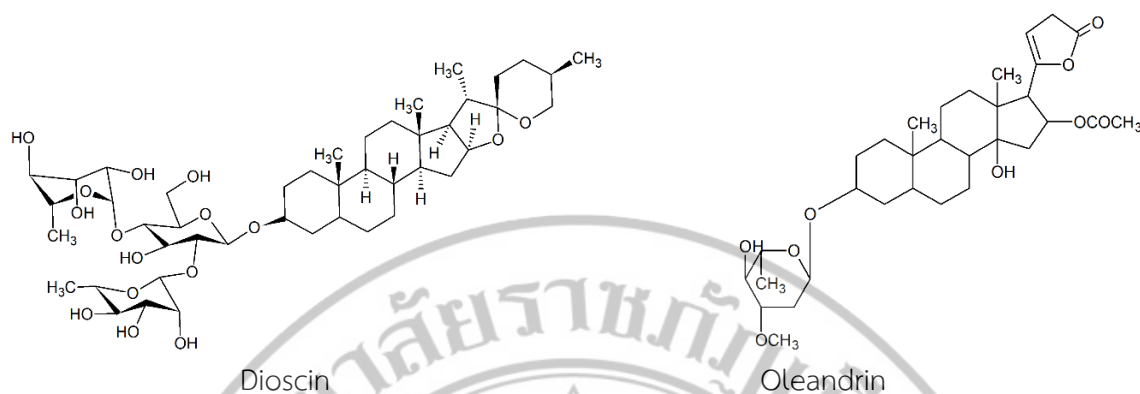
รูป 2.4 การเกิดปฏิกิริยาของสารกลุ่มแทนนินกับสารละลายเฟอร์ริก (Fe^{3+})

4) สเตอรอยด์ (Steroids) เป็นสารประกอบอินทรีย์จำพวกพอลิไอโซพรีน (Polyisoprene) ที่เกิดจาก ไอโซพรีน (Isoprene) 6 หน่วยมาเชื่อมต่อกันและมีโครงสร้างหลักเป็น ไโซโคลเพนทาโนเปอร์ไฮโดรฟีนแอนเทน (Cyclopentanoperhydrophenanthene) ดังรูปที่ 2.5 วงแหวน A, B และ C จะอยู่ในลักษณะ คอนฟอร์เมอร์แบบเก้าอี้ (Chair conformation) การเชื่อมต่อกันระหว่างวงแหวน A และ B จะมีไอโซเมอร์ได้ 2 แบบ คือ แบบทรานส์ (Trans) และแบบซิส (Cis) สเตอรอยด์ที่พบในธรรมชาติมีหลากหลายชนิดที่สามารถพบในพืชและสัตว์ บทบาทสำคัญของสเตอรอยด์ในสิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่คือ ฮอรโมน



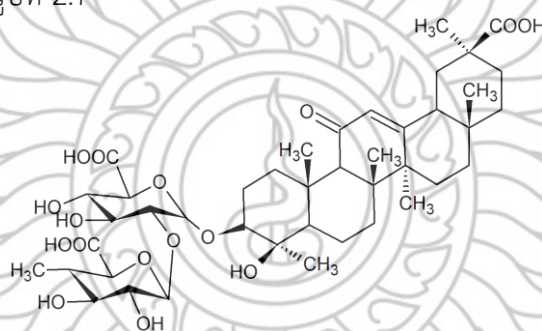
รูป 2.5 โครงสร้างหลักของ สเตอรอยด์ (Steroid)

5) ไกลโคไซด์ (Glycosides) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่เกิดจากส่วนที่ไม่ใช่น้ำตาลที่เรียกว่า อะไกลโคน (Aglycone) จับกับส่วนที่เป็นน้ำตาล (Glycoside) ซึ่งละลายน้ำได้ดี โครงสร้างของอะไกลโคน มีความแตกต่างกันหลายแบบทำให้ประเภทและสรรพคุณทางเภสัชวิทยาของไกลโคไซด์มีหลายชนิดที่ใช้เป็นยา ไกลโคไซด์จำแนกตามสูตรโครงสร้างของอะไกลโคนได้หลายประเภทคือ คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (Cardiac glycosides) ตัวอย่างเช่น โอลีแอน-ดริน (Oleandrin) สกัดได้จากใบ ของยี่โถ (Nerium indicum Mill.) ใช้บำบัดรักษาอาการโรคหัวใจ ใช้เป็นยาขับถ่าย ซาโปนินไกลโคไซด์ (Saponin glycosides) ตัวอย่างเช่น ไดออสซิน (Dioscin) เป็น สเตียรอยด์ดัลซาโปนิน (Steroidal saponins) สกัดได้จากเมล็ด ลูกชืด (Trigonella foenum-graecum L.) มีฤทธิ์ทำให้แผลแห้งเร็ว รักษาแผลไฟไหม้น้ำร้อนลวก



รูป 2.6 ตัวอย่างของสารในกลุ่ม ไกลโคไซด์

6) ซาโปนิน (Saponins) หรือซาโปนินไกลโคไซด์ มีส่วนอะไกลโคนเป็นสารพวก สเตอรอยด์ (Steroids) หรือ ไตรเทอร์พีนอยด์ (Triterpenoids) ส่วนนี้จะจับกับส่วนน้ำตาล หรืออนุพันธ์ของน้ำตาลที่ตำแหน่ง C₃ ได้เป็น ออกซิเจน-ไกลโคไซด์ (O-glycoside) ซาโปนินไกลโคไซด์ มีคุณสมบัติบางอย่างคล้ายสบู่ เช่น สามารถเกิดฟองเมื่อเขย่ากับน้ำ เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ดี ตัวอย่างเช่น กลีซีร์ริซิน (Glycyrrhizin) พบใน ชะเอมเทศ (*Glycyrrhiza glabra* Linn.) ซึ่งมีอะไกลโคนเป็นไตรเทอร์พีนอยด์และมีโมเลกุลของน้ำตาล 2 โมเลกุลเกาะตำแหน่งที่ 3 ดังรูปที่ 2.7

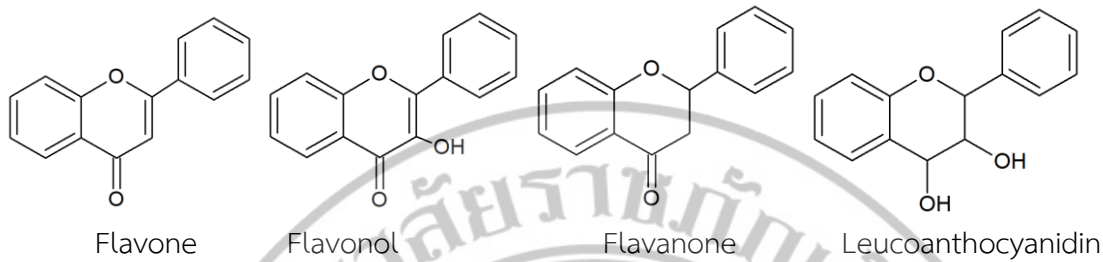


รูป 2.7 โครงสร้างของกลีซีร์ริซิน (Glycyrrhizin)

การทดสอบซาโปนินสามารถทำได้หลากหลายวิธีเช่น การทดสอบฟอง (Froth test) เมื่อเขย่าสารสกัดที่มีซาโปนินไกลโคไซด์ นานประมาณ 30 นาที จะเกิดฟองที่มีลักษณะเหมือนรังผึ้ง (Honey comb froth) เป็นวงแหวนขนาด 6 เหลี่ยม จัดเรียงตัวซ้อนกัน และคงทนอยู่ประมาณ 30 นาที ซึ่งฟองจะหายไปเมื่อเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ยืนยันโดยหยดสารละลายเบสลงในสารสกัด ซึ่งกรดจะทำปฏิกิริยากับเบส ได้เกลือ เมื่อเขย่าจะเกิดฟองในปริมาณมากและมีความคงทนนานกว่า 30 นาที แต่ถ้าไม่เกิดฟอง แสดงว่าเป็นอะไกลโคนของซาโปนินไกลโคไซด์ นอกจากนี้ ถ้าฟองเกิดจากโปรตีน จะหายไปหลังจากต้ม

7) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) มีโครงสร้างหลัก ได้แก่ ฟินิลเบนซิล-แกมมา-ไพโรน (C6-C3-C6) พบทั่วไปในพืชต่าง ๆ ยกเว้น สาหร่าย แบคทีเรีย รา รวมทั้งแมลงบางชนิด ฟลาโวนอยด์ประเภทแซลโคน ฟลาโวน (Flavone) ฟลาโวนอล (Flavonol) ฟลาวาโนน (Flavanone) ออโรน (Aurone) แอนโทไซยานิน (Anthocyanin) ลิวโคแอนโทไซยานิน (Leucoanthocyanin) และคาทีชิน (Catechin) โครงสร้างดังรูปที่ 2.8 สารฟลาโวนอยด์เป็นสารที่ไม่มีสีแต่สามารถดูดกลืนรังสีได้ในช่วง 315 – 380 นาโนเมตร ซึ่งเป็นช่วงคลื่นที่

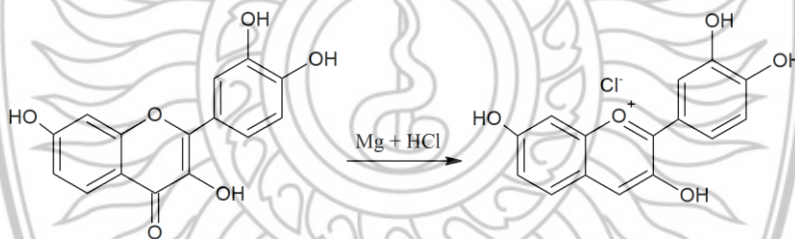
แมลงสามารถมองเห็นได้ ดังนั้นฟลาโวนอยด์จึงมีบทบาทสำคัญในการล่อแมลงเพื่อการผสมเกสร ฟลาโวนอยด์ที่พบมากในพืชชั้นสูง ได้แก่ Kaempferol และ Quercetin และที่พบได้บ้าง ได้แก่ Myricetin และ Gelangin



รูป 2.8 ตัวอย่างของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์

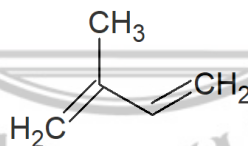
เนื่องจากฟลาโวนอยด์จะมีหมู่ไฮดรอกซิลเกาะอยู่กับโครงสร้างหลัก ส่งผลให้ฟลาโวนอยด์มีขี้วมมาก ดังนั้น จึงมักสกัดจำพวกนี้ด้วยตัวทำละลายที่มีขี้วมมาก

การทดสอบฟลาโวนอยด์ด้วยปฏิกิริยาการเกิดสีส่วนใหญ่จะทดสอบโดยใช้ปฏิกิริยาไซยานิดิน (Cyanidin reaction) ประกอบด้วยโลหะแมกนีเซียมและกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ดังรูปที่ 2.9 ให้ผลการทดสอบเฉพาะฟลาโวนอยด์ที่มีฟีนิลเบนซิล-แกมมา-ไพโรนซึ่งเป็นโครงสร้างหลัก กล่าวคือ สีส้มถึงสีแดง แสดงว่ามีฟลาโวน สีแดงถึงสีแดงเข้มหรือ สีแดงเลือดหมู (Crimson) แสดงว่ามีฟลาโวนอล สีแดงเข้มถึงสีแดงอมม่วง (Margenta) แสดงว่ามี ฟลาโวนโนไกลโคไซด์ ความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นจะขึ้นอยู่กับปริมาณของฟลาโวนอยด์ บางครั้งอาจเห็นสีไม่ชัดเจน เนื่องจากสีของสารสกัดบดบัง แก้ไขโดยเติมออกทิลแอลกอฮอล์ (Octyl alcohol) ลงไป เพื่อให้มองเห็นสีที่ชัดเจนขึ้น



รูป 2.9 การเกิดปฏิกิริยาไซยานิดินของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์

8) เทอร์พีนอยด์ (Terpenoids) เป็นกลุ่มของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่พบได้มากในธรรมชาติ เป็นไฮโดรคาร์บอนชนิดที่ไม่อิ่มตัว ถ้าอยู่ในรูปของเหลว สามารถติดไฟได้ที่พบได้ทั่วไปเช่น น้ำมันหอมระเหย เรซิน หรือโอโรเรซิน เป็นต้น เทอร์พีนอยด์จะประกอบด้วยหน่วยของไอโซพรีน (Isoprene) ที่มีคาร์บอน 5 อะตอม (C_5H_8) ดังรูปที่ 2.10



รูป 2.10 Isoprene (C_5H_8) ส่วนประกอบสำคัญของสารกลุ่มเทอร์พีนอยด์

ซึ่งมีการแบ่งประเภทของเทอร์พีนอยด์ ออกเป็นหลายประเภท เช่น เซสควิเทอร์พีน (Sesquiterpene ; C_{15}) เป็นส่วนประกอบสำคัญของน้ำมันหอมระเหยหลายชนิดไดเทอร์พีนส์ (Diterpenes ; C_{20}) เป็นองค์ประกอบพื้นฐานในเรซินและแทกซอลที่ใช้เป็นสารต้านมะเร็งไตรเทอร์พีนส์ (Triterpenes ; C_{30})

ที่เป็นองค์ประกอบในสารกลุ่มสเตอรอยด์ สเตอรอลและคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ที่ใช้เป็นยาออกฤทธิ์ด้านการอักเสบ ยาระงับความรู้สึก และยาฆ่าแมลง

การทดสอบเทอร์พีนอยด์ด้วยปฏิกิริยาการเกิดสีสามารถทดสอบเฉพาะเทอร์พีนบางชนิดเท่านั้นที่สามารถทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์แล้วเกิดสี เช่น การทดสอบแซลโควสกี (Salkowski test) โดยสกัดพืชด้วยอีเทอร์ แล้วเติมคลอโรฟอร์มและกรดซัลฟิวริกเข้มข้นเล็กน้อย จะปรากฏสีน้ำตาลแดงตรงรอยต่อของสารละลายใช้สำหรับการทดสอบเทอร์พีนทั่วไป และรีเอเจนต์ 2,6-ได-เทอร์ต-บิวทิล-พารา-ครีซอล (2,6-di-tert-butyl-p-cresol) ในเอทานอลจะปรากฏสารละลายสีม่วงใช้ทดสอบเพนทาไซคลิกไตรเทอร์พีน (Pentacyclic triterpenes)

2.5 การเตรียมตัวอย่างพืช

การเตรียมตัวอย่างพืชสมุนไพรต้องคำนึงถึงปัจจัยหลายอย่าง เช่น สารสำคัญในพืช พืชที่ใช้ในการสกัดจะต้องไม่มีพืชอื่นเจือปน ไม่มีโรคพืช อายุพืชที่ผลิตสารสำคัญ ความเสถียรขององค์ประกอบทางเคมี และการเก็บรักษา การเตรียมตัวอย่างโดยถูกวิธีจะเป็นการคงคุณภาพของพืชเอาไว้ โดยการเตรียมพืชก่อนการสกัดนั้น จึงต้องทำความสะอาด เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อน และการนำพืชตัวอย่างไปอบควรใช้อุณหภูมิที่ไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส หรือตากให้แห้งในที่อากาศสามารถถ่ายเทได้สะดวก เพื่อป้องกันไม่ให้สารสำคัญในพืชสลายตัว แล้วนำสารตัวอย่างไปลดขนาดเพื่อสามารถให้ตัวทำละลายเข้าไปแทรกกับผิวสัมผัสของพืชให้ได้มากที่สุด จึงจะทำให้สารสกัดที่ได้มามีปริมาณขององค์ประกอบทางเคมีที่มาก การทำให้พืชแห้งก่อนการสกัดนั้นมีข้อดีคือ จะเป็นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในพืชและทำให้ปราศจากน้ำในเซลล์พืช ซึ่งจะทำให้ตัวทำละลายอินทรีย์ละลายสารในพืชได้ดีกว่าตัวอย่างพืชสดโดยทั่วไปการสกัดสารเบื้องต้นไม่ว่าจะสกัดด้วยวิธีใดหรือตัวทำละลายใดก็จะต้องใช้ของเหลวผสมกึ่งของแข็งหรือเป็นผงที่ไม่อันตรายหรือสารสกัดอย่างหยาบ (Crude extract) ซึ่งเป็นสิ่งที่สกัดออกมาจากพืชโดยใช้ตัวทำละลาย ซึ่งอาจจะมียาองค์ประกอบทางเภสัชวิทยาประกอบด้วย (อรุณรัตน์ สันติจิตวินสกุล, 2557 ; Handa S.S. *et al.*, 2008)

2.6 การเลือกตัวทำละลายในการสกัดสารตัวอย่าง

การสกัดสารตัวอย่างที่มีองค์ประกอบทางเคมีที่ไม่ใช่น้ำมันหอมระเหย มักนิยมสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เช่น เฮกเซน อีเทอร์ ไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม แอซีโตน เอทิลแอซีเตตและแอลกอฮอล์ เป็นต้น โดยหลักการเลือกตัวทำละลายนั้นอาศัยหลักการต่างๆ เช่น การมีช่วงที่ใกล้เคียงกับสารที่ต้องการสกัด ไม่ทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบเคมีในพืช ไม่ระเหยง่ายและยากเกินไป ไม่เป็นพิษ หาง่ายและราคาไม่แพง โดยตัวทำละลายที่ผู้วิจัยเลือกใช้ในการวิจัยนี้คือ เมทานอลเนื่องจากเมทานอลเป็นสารที่มีขั้วสูง สามารถสกัดสารที่มีขั้วจากสารตัวอย่างได้ดีกว่า เช่นสารในกลุ่มฟีนอลิก จากงานวิจัยพบว่าเมทานอลสามารถสกัดสารประกอบฟีนอลได้ในปริมาณที่มากกว่าตัวทำละลายชนิดอื่น (Stankovic M., 2011) และสามารถสกัดสารพฤษเคมีได้ดีกว่าตัวทำละลายชนิดอื่น ๆ ดังตารางที่ 2.1

ตาราง 2.1 ตัวอย่างสารพฤษเคมีที่สกัดได้จากตัวทำละลายที่แตกต่างกัน (Jannatul A. *et al.*, 2013)

Water	Ethanol	Methanol	Choloroform	Dichoromethanol	Ether	Acetone
Anthocyanin	Tannins	Anthocyanin	Terpenoids	Terpenoids	Alkaloids	Flavonoids
Tannins	Polyphenol	Terpenoids	Flavonoids		Terpenoids	
Saponins	Flavonol	Tannins				
Terpenoids	Terpenoids	Saponins				

2.7 การสกัดสารตัวอย่าง

การสกัดสารสำคัญในพืช มีอยู่หลายวิธีเช่น วิธีการแช่หมัก (Maceration) วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายโดยเครื่องสกัดซอกซ์เลตและการสกัดด้วยตัวทำละลายโดยคลื่นไมโครเวฟ เป็นต้น

1) การสกัดแบบแช่หมัก (Maceration) เป็นวิธีการหมักพืชโดยใช้ตัวทำละลายในสภาวะปิดเพื่อป้องกันการระเหยจากตัวทำละลาย โดยแช่ไว้ในอุณหภูมิห้อง ทิ้งไว้ประมาณ 5-7 วัน โดยต้องหมั่นเขย่าหรือคนบ่อย ๆ เพื่อให้ตัวทำละลายเข้าไปละลายสารจากพืชตัวอย่าง เมื่อครบกำหนดแช่ ให้รินสารละลายและพยายามบีบคั้นสารละลายให้ออกจากพืชให้ได้มากที่สุด โดยมักจะหมักไว้ประมาณ 2-3 รอบ หรือจนกว่าสารตัวอย่างจะไม่สามารถละลายได้อีก โดยวิธีการนี้มักใช้กับการสกัดสารที่ไม่ทนความร้อนมากนัก (ปิยศิริ สุนทรนนท์ และคณะ, 2557 ; อรุณรัตน์ สันฐิติกวินสกุล, 2557 ; Banu K.S. and Cathrine L., 2015)

2) การทำให้สารสกัดเข้มข้น (Concentration) หลังจากได้สารละลายที่ผ่านกระบวนการสกัดมาแล้ว สารสกัดที่ได้มักจะเป็นสารละลายที่เจือจางจึงจำเป็นต้องทำให้ผ่านกระบวนการทำให้สารละลายนั้นมีความเข้มข้นมากขึ้นเพื่อความสะดวกในการแยกองค์ประกอบของสารที่สำคัญที่นิยมใช้คือ การกลั่นในระบบสุญญากาศ (Vacuum distillation system) เป็นการระเหยตัวทำละลายโดยใช้อุณหภูมิต่ำ โดยเครื่องจะต่อกับปั๊มสุญญากาศ (Vacuum pump) เพื่อลดความดันให้เกือบเป็นสุญญากาศ โดยหลักการทำงานของเครื่อง คือ นำขวดก้นกลมที่มีสารสกัดต่อเข้ากับเครื่องมือ จากนั้นเปิดปั๊มเพื่อให้เกิดระบบสุญญากาศ ปิดระบบสุญญากาศตรง ปลายเครื่องควบแน่น ให้ความร้อนขวดก้นกลมโดยสัมผัสกับน้ำในเครื่องอ่างน้ำพร้อมกับหมุนขวดก้นกลมตลอดเวลา เพื่อให้สารสกัดเกิดการกระจายความร้อนอย่างสม่ำเสมอ จนกระทั่งตัวทำละลายระเหยกลายเป็นไอผ่านไปยังเครื่องควบแน่น ซึ่งต่อกับระบบหล่อน้ำเย็น ทำให้ไอควบแน่นกลายเป็นของเหลวตกลงสู่ภาชนะรองรับ (อรุณรัตน์ สันฐิติกวินสกุล, 2557)

2.8 อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ (Free radical and Antioxidant)

อนุมูลอิสระ (Free radical) คือ อะตอมหรือโมเลกุลซึ่งไม่เสถียรเนื่องจากอิเล็กตรอนเดี่ยวของอะตอมในออร์บิทัลชั้นนอกสุดที่ระดับพลังงานสูง พบได้ทุกแห่งทั้งในสิ่งแวดล้อมและในสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะอย่างยิ่งกระบวนการผลิตพลังงานภายในเซลล์ หรือจากกระบวนการเมแทบอลิซึม (Metabolism) โดยปกติในร่างกายมนุษย์จะมีโมเลกุลหรืออะตอมที่มีจำนวนอิเล็กตรอนอยู่เป็นจำนวนคู่ การที่อะตอมหรือโมเลกุลเกิดการสูญเสียอิเล็กตรอนไปนั้นจะส่งผลให้อะตอมหรือโมเลกุลนั้น ๆ ไม่เสถียรและไวต่อการเกิดปฏิกิริยาโดยอนุมูลอิสระจะแย่งกันเข้าไปจับกับอิเล็กตรอนโมเลกุลอื่น ๆ ที่อยู่รอบข้างกลายเป็นอนุมูลอิสระแทนที่อิเล็กตรอนที่ขาดหายไปเพื่อให้ตัวเองเกิดความสมดุลหรือเสถียร ซึ่งจะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง จึงส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่อื่น ๆ ต่อเนื่องกันไป และเกิดขึ้นในเซลล์ตลอดเวลา ดังสมการ (2.1 และ 2.2)



อนุมูลอิสระในร่างกายส่วนมากเกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของร่างกายหรือในสภาวะที่ผิดปกติ เช่น ภาวะของโรคหรือภาวะที่ร่างกายแวดล้อมไปด้วยมลพิษ โดยในภาวะที่ผิดปกตินี้ จะส่งผลให้ร่างกายเกิดการสะสมของอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น อนุมูลอิสระจึงส่งผลให้เซลล์ของร่างกายเสียหาย ถ้ามีมาก

เกินไปจะสามารถทำลายสารชีวโมเลกุลทุกประเภทและส่งผลกระทบต่อเยื่อหุ้มเซลล์ ดีเอ็นเอ (DNA) อาร์เอ็นเอ(RNA) โดยพบว่าในระยะสั้นอนุมูลอิสระจะส่งผลการอักเสบ การทำลายเนื้อเยื่อ ในระยะยาวจะส่งผลให้เซลล์เสื่อมหรือเกิดการแก่ของเซลล์ แต่หากมีปริมาณอนุมูลอิสระมากเกินไปร่างกายจะกำจัดได้จะทำให้เกิดสภาวะที่เรียกว่า “Oxidative stress” โดยภายใต้สภาวะนี้อนุมูลอิสระจะส่งผลการทำลายระบบต่าง ๆ ในร่างกายให้เสียสมดุลและส่งผลกระทบต่อเซลล์ ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต รวมทั้งเป็นสาเหตุของความชราและโรคต่าง ๆ เช่น โรคความจำเสื่อม (Alzheimer’s disease) ไขข้ออักเสบ (Arthritis) โรคหัวใจขาดเลือด (Coronary heart disease) ความผิดปกติของปอดและระบบประสาท โรคเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ หรือโรคมะเร็ง (Cancer) ซึ่งเป็นสาเหตุแห่งการเสียชีวิตอันดับต้น ๆ ของคนไทยและคนทั่วโลก ดังนั้น ในร่างกายของมนุษย์จึงมีกระบวนการต้านหรือกำจัดอนุมูลอิสระที่อยู่น้อยอยู่แล้วโดยอาศัยการสร้างเอนไซม์หรือสารต่าง ๆ ที่มีความเข้มข้นต่ำ ๆ หรือได้รับจากการรับประทานอาหาร เช่น เบต้า-แคโรทีน (β -carotene) วิตามินซี (Vitamin C) ซึ่งเป็นสารพฤษเคมีที่สามารถพบในพืชผักและผลไม้ โดยสามารถชะลอหรือป้องกันการสร้างอนุมูลอิสระพวกนี้ได้ โดยสารที่สามารถป้องกัน ยับยั้ง หรือทำลายอนุมูลอิสระพวกนี้ได้เรามักเรียกว่า สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) คือ สารที่มักพบในอาหารจำพวก พืชผัก และผลไม้ เป็นโมเลกุลของสารที่สามารถจับกับอนุมูลอิสระ เพื่อยับยั้งป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่นั้น โดยมักยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในเซลล์ที่ใช้ออกซิเจน ได้แก่ Superoxide radical ($O_2^{\cdot -}$), Peroxyl radicals ($O_2^{\cdot -2}$), Hydroxyl radicals ($OH^{\cdot}$) และ Peroxyl radical ($ROO^{\cdot}$) เพื่อไม่ให้อนุมูลอิสระเหล่านี้ก่อตัวขึ้นได้อีก โดยสารต้านอนุมูลอิสระมีมากมายหลายชนิดที่ทำหน้าที่แตกต่างกันไป สารต้านอนุมูลอิสระในธรรมชาติมักไม่ก่อให้เกิดผลข้างเคียง จึงมีบทบาทสำคัญในการบำรุงรักษาและป้องกันการเกิดโรคเช่น โรคเสื่อมของเนื้อเยื่อ (Degenerative diseases) หัวใจและสมองขาดเลือด (Cardiac and cerebral ischemia) การอักเสบของเนื้องอก (Tumour inflammation) เป็นต้น ฉะนั้นการจะต่อต้านหรือยับยั้งโรคเหล่านี้ได้จึงต้องอาศัยสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอกร่างกาย เช่น วิตามินซี (Vitamin C) วิตามินอี (Vitamin E) ฟลาโวนส์(flavones) เบต้า-แคโรทีน (β -carotene) และผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ได้จากพืช โดยสารต้านอนุมูลอิสระจะมีทั้งที่เป็นเอนไซม์และไม่เป็นเอนไซม์ หรือสารประกอบที่ละลายในน้ำและสารประกอบที่ละลายในไขมัน โดยสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มักมีกลไกในการทำงานต้านอนุมูลอิสระด้วยกันหลากหลายแบบ เช่น การดักจับอนุมูลอิสระ (Radical scavenging) การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (Singlet oxygen quenching) จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Metal chelation) หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (Chain-breaking) เสริมฤทธิ์ (Synergism) และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (Enzyme inhibition) ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ เป็นต้น (บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556 ; เรณู คำหอม, 2559 ; เนตรนภา เมยกลางและเฉลิม เรื่องวิริยะชัย, 2557 ; ปิยศิริ สุนทรนนท์ และคณะ, 2557 ; Ames B. N. *et al*, 1993 ; Stankovic M., 2011 ; Doughari J. H., 2012)

2.8.1 การหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (Determination of total antioxidant compounds)

1) การหาปริมาณฟีนอลิกรวม (Total phenolic content) มีหลักการคือ เป็นการวัดปริมาณความเข้มข้นของสารประกอบทั้งหมดที่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่อยู่ในโมเลกุล โดยไม่คำนึงถึงน้ำหนักโมเลกุลของสารประกอบฟีนอลิกนั้น ๆ ดังนั้น การวิเคราะห์ในรูปแบบนี้จึงไม่มี การระบุชนิดและโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ในสารตัวอย่าง

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกด้วยวิธีโฟลีน-ซีโอแคลเตอู (Folin-Ciocalteu method) โดยใช้หลักการแตกตัวของฟีนอลิก (Phenolic) เป็นโปรตอนและไอออนลบของ ฟีนอลเลท (Phenolate) ซึ่งไอออนลบจะปฏิกิริยา โฟลีน-ซีโอแคลเตอูรีเอเจนต์ (Folin-Ciocalteu reagent) ได้เป็นสารละลายสีน้ำเงิน การวิเคราะห์ปริมาณ ฟีนอลิกจึงเป็นการวัดความสามารถของการรีดิวซ์ในลักษณะเดียวกับการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การศึกษาส่วนใหญ่จึงพบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณ ฟีนอลิก อย่างไรก็ตาม ยังมีสารชนิดอื่นที่ไม่ใช่ฟีนอลิก เช่น น้ำตาลอะโรมาติกเอมีน กรดแอสคอบิก กรดอินทรีย์ และอื่น ๆ อีกมาก ที่สามารถรีดิวซ์ โฟลีน-ซีโอแคลเตอู รีเอเจนต์ ได้สีน้ำเงินเช่นเดียวกัน จึงทำให้การรายงานผลนั้นสูงเกินจริง การวิเคราะห์นี้จะใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) เป็นสารมาตรฐานแล้วรายงานอยู่ในรูปของ Gallic Acid Equivalent (GAE) ในหน่วยของมิลลิกรัมแกลลิก/กรัมตัวอย่างและคำนวณ ดังสมการ (2.3) (วรานนท์ ทองอินลา และคณะ, 2557)

$$\text{Gallic Acid Equivalent (GAE)} = \frac{\text{มิลลิกรัมกรดแกลลิก (mg gallic acid)}}{\text{กรัมของสารสกัดตัวอย่าง (g extract)}} \dots (2.3)$$

2) การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoid Content) เป็นการหาปริมาณฟลาโวนอยด์โดยวิธีการวิเคราะห์ด้วยการเปรียบเทียบความเข้มของสี (colorimetric method) โดยใช้อลูมิเนียมคลอไรด์ (AlCl_3) (เพชรรุ่ง เทพทอง และคณะ, 2555)

มีหลักการที่เกี่ยวข้องคือการใช้วิธีการตรวจวัดสี (Colorimetric) โดยอลูมิเนียมคลอไรด์ (AlCl_3) และโซเดียมไนเตรต (NaNO_2) ทำปฏิกิริยากับ สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 506.0 นาโนเมตร

จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปวัดหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์จากกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของเคอร์ซีติน และค่าการดูดกลืนแสงในหน่วย Quercetin equivalents (QE) มิลลิกรัม/กรัมตัวอย่าง และคำนวณดังสมการ (2.4)

$$\text{Quercetin equivalents (QE)} = \frac{\text{มิลลิกรัมเคอร์ซีติน (mg Quercetin)}}{\text{กรัมของสารสกัดตัวอย่าง (g extract)}} \dots (2.4)$$

สำหรับกลไกในการต้านอนุมูลอิสระของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์นั้น มีรายงานการศึกษาอย่างกว้างขวาง แต่ทั้งนี้ยังไม่มีรายงานยืนยันที่ชัดเจนถึงกลไกการออกฤทธิ์ อย่างไรก็ตามกลไกหลักในการออกฤทธิ์ของสารกลุ่มนี้เป็นสารต้านออกซิเดชันโดยหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ (Chain breaking antioxidant) ในการยับยั้งหรือขจัดอนุมูลอิสระ โดยทำหน้าที่เป็นตัวให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูลเหล่านั้น หลังจากที่ฟลาโวนอยด์ถูกออกซิไดซ์แล้วจะได้อนุมูลของฟลาโวนอยด์ฟีนอกซิลเป็นผลิตภัณฑ์ และอนุมูลที่ได้ี้มีความเสถียรมากกว่า เนื่องจากโครงสร้างของฟลาโวนอยด์มีการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนตลอดเวลา (Electron delocalize) ดังแสดงในปฏิกิริยา

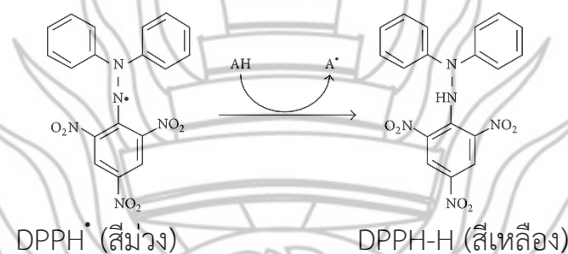


2.8.2 การหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Determination of antioxidant activity)

การหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นการทดสอบเชิงปริมาณโดยต้องทราบความเข้มข้นที่แน่นอนของอนุมูลอิสระ และวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งหรือกำจัดอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างที่สนใจโดยวัดปริมาณอนุมูลอิสระที่ลดลงหรือที่เหลือโดยอาศัยการดูดกลืนแสงที่วัดโดยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยมีอยู่หลายวิธีที่นิยมใช้ ได้แก่ (บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556)

1) การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีฟิเพอซ (Diphenyl-Picrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging Assay)

เป็นการเป็นการทดสอบด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระในที่นี้คืออนุมูลอิสระดีฟิเพอซ (DPPH[•], diphenyl-picrylhydrazyl radical) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัว และมีสีม่วงสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 515.0 นาโนเมตร เมื่อ DPPH[•] ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายด้วยเอทานอล (สารที่ให้อิเล็กตรอน) จะทำให้สีม่วงจางลง ๆ จนเป็นสีเหลือง ดังสมการ (2.5) ซึ่งก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงต้องตั้งทิ้งไว้ที่มีดเป็นเวลา 30 นาทีเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา ทำให้สามารถหาการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูตรคำนวณได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงจากการใส่ตัวอย่างเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น (ก่อนใส่สารตัวอย่าง) ดังสมการ (2.6)



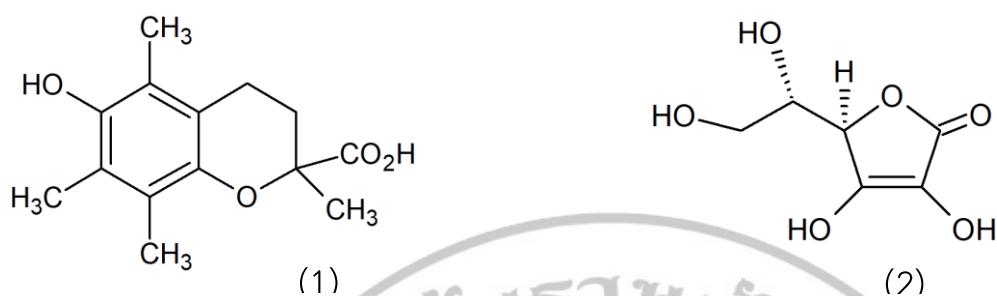
$$\text{สูตรการคำนวณ DPPH radical scavenging (\%)} = \left[\frac{(A_0 - (A_s - A_{s0}))}{A_0} \right] \times 100 \quad \dots (2.6)$$

โดย A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น

A_s = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

A_{s0} = ค่าการรบกวนการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

สารมาตรฐานที่ใช้ในการเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คือ โทร็อกซ์ (Trolox, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchlorman-2-carboxylic acid) และวิตามินซี (Ascorbic acid) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ มาคำนวณหาร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% ABTS free-radical inhibition) จากนั้นหาค่า (Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity : VCEAC) ทำการสร้างกราฟมาตรฐานจากสารละลายมาตรฐานวิตามินซี (Ascorbic acid) และหาค่า (Trolox equivalent antioxidant capacity : TEAC) โดยการสร้างกราฟมาตรฐานจากสารละลายมาตรฐานโทร็อกซ์ จากนั้นหาความเข้มข้นของสารสกัดตัวอย่าง ที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากกราฟมาตรฐาน นำไปคำนวณหาค่า (Vitamin C equivalent antioxidant capacity : VCEAC) ในรูปมิลลิกรัมของวิตามินซี ต่อกรัมของสารสกัดตัวอย่าง (mg Vitamin C/g extract) และนำไปคำนวณหาค่า (Trolox equivalent antioxidant capacity : TEAC) ในรูปมิลลิกรัมของโทร็อกซ์ ต่อกรัมของสารสกัดตัวอย่าง (mg Trolox /g extract)



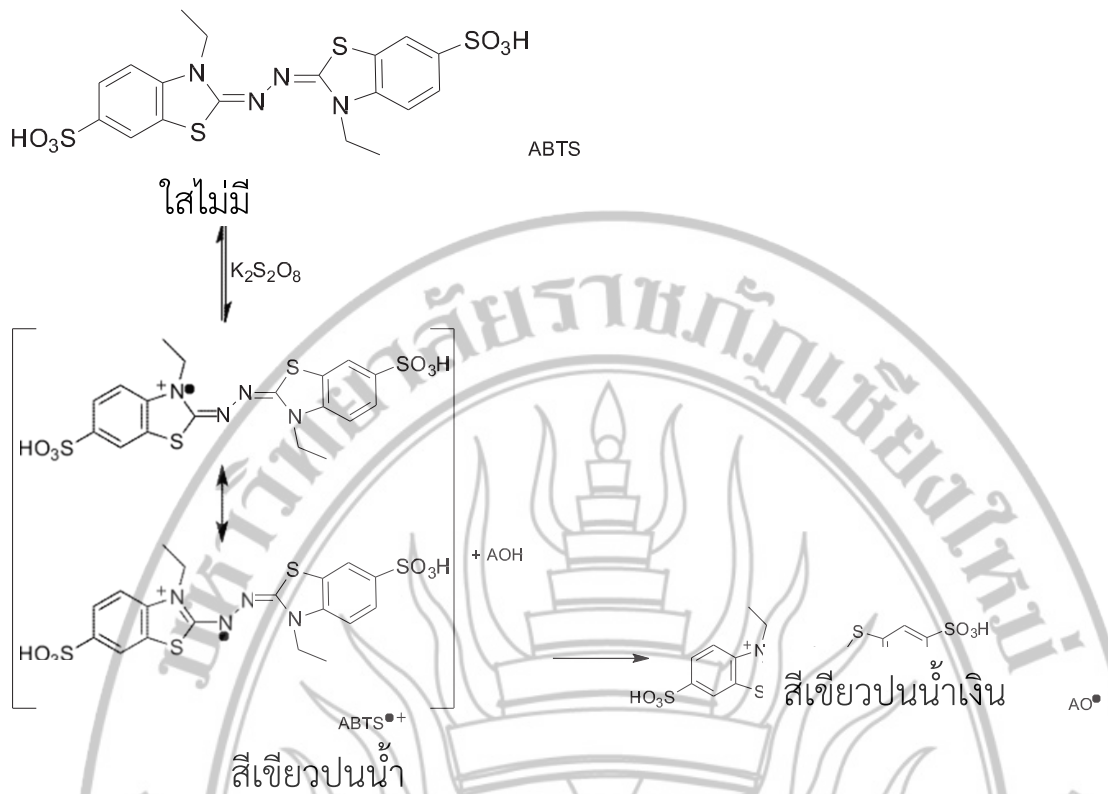
รูป 2.11 โครงสร้างของโทรลอกซ์ (1) และวิตามินซี (2)

ข้อดีของวิธีนี้ คือ ง่าย สะดวก และรวดเร็ว ส่วนข้อเสีย คือ DPPH[•] ค่อนข้างเสถียร ไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายจริง จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ช้า ทำให้ค่าการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วัดได้น้อยกว่าความเป็นจริง และต้องวัดในปฏิกิริยาที่เป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งจะทำให้โปรตีนตกตะกอนจึงไม่สามารถวิเคราะห์ได้ในตัวอย่างที่เป็นเลือดได้ อีกทั้งสารปนเปื้อนและโลหะจะรบกวน (Interfere) ซึ่งสามารถเป็นตัวรบกวนแล้วทำให้สีของอนุมูลอิสระ DPPH[•] จางลงได้เช่นกัน

2) การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS radical cation decolorization assay)

เป็นวิธีการวัดความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS^{•+}, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical) เป็นสารสังเคราะห์ที่มีสีเขียวปนน้ำเงินสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 734.0 นาโนเมตร เนื่องจากสีของ ABTS^{•+} ปกติจะมีค่าการดูดกลืนแสงสูง จึงต้องทำการเจือจาง ABTS^{•+} ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นนำ ABTS^{•+} ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่ละลายด้วยเอทานอลเจือจางซึ่งจะทำให้สีจางลง และตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา จึงสามารถหาความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ซึ่งวิธีการคำนวณและการเทียบกับสารมาตรฐานโทรลอกซ์ และวิตามินซี กระทำเช่นเดียวกับวิธี DPPH

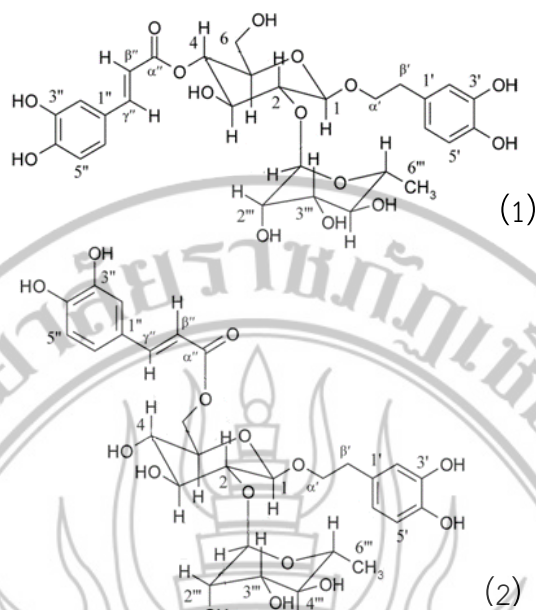
ข้อดีของวิธีการนี้ คือ ABTS^{•+} ละลายได้ดีในน้ำ และตัวทำละลายอินทรีย์จึงทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว และทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH กว้าง ส่วนข้อเสีย คือ ABTS^{•+} ไม่เป็นสารธรรมชาติที่พบในร่างกายหรือในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต และต้องมีการทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อนถึงจะเกิดเป็นอนุมูลอิสระ



รูป 2.12 ปฏิกิริยาออกซิเดชันของ ABTS โดยใช้โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟตเพื่อทำให้เกิด $ABTS^{\bullet+}$ และการทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ
ที่มา : Oliveira S.D. *et al.* (2014)

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

วาสนา ประภาเลิศ และคณะ (Prapalert W. *et al.*, 2017) ศึกษาสารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดหยาบเมทานอลของใบสังกรณี (*Barteria strigosa* Willd.) โดยพบว่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่ทำให้อนุมูลอิสระลดลง 50 % (IC_{50}) มีค่าเท่ากับ 73 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของสังกรณีพบว่ามีสารที่สำคัญคือ แทนนิน ซาโปนิน และ สเตอรอยด์ โดยพบสารประเภทฟีนอลเอทานอยด์ ไกลโคไซด์ (Phenylethanoid glycoside) 2 ชนิดคือ พาร์วีฟลอโรไซด์ เอ (Parvifloroside A) และ พาร์วีฟลอโรไซด์ บี (Parvifloroside B) โครงสร้างดังรูปที่ 2.13 โดยใบสังกรณียังมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถใช้ลดไข้ ถอนพิษ และลดการอักเสบ

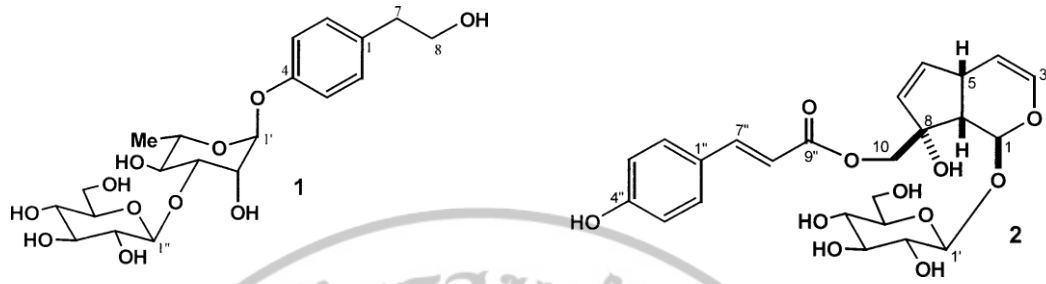


รูป 2.13 พาร์วีฟลอโรไซด์ เอ (Parvifloroside A) (1) และพาร์วีฟลอโรไซด์ บี (Parvifloroside B) (2)

แกงกุลลี และคณะ และแดเนียล (Ganguly A.N. *et al.*, 1969 ; Daniel M., 2006 quoted in Prapalert W. *et al.*, 2017) พบว่าในสังกรณีมีส่วนประกอบของ เบต้า และ แกมมา ซีโตสเตอรอล (β -, γ -sitosterol) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มของสเตอรอล และพบว่าในส่วนใบของสังกรณีมีสารประกอบฟีนอล (Phenolic compounds) เช่น อะพิจินิน (Apiginin), กรดวานิลลิก (Vanillic acid), กรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก (Para-hydroxybenzoic acid) และกรดพาราคูมาริก (Para-coumaric acid) ซึ่งมีฤทธิ์ป้องกันการอักเสบ ป้องกันมะเร็งและต้านอนุมูลอิสระ

ณัฐพร มานะประดิษฐ์ และคณะ (2556) ศึกษาสารสกัดหยาบจากใบสังกรณีที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 5 ชนิด พบว่าแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ P388 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวหนูมากที่สุด โดยมีค่า CC_{50} เท่ากับ 413.89 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลทำให้อัตราการแบ่งเซลล์ ในระยะเมทาเฟสของเซลล์ไลน์ P388 ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดที่ความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดหยาบ 1000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าใบสังกรณีมีสารที่สำคัญและมีฤทธิ์ทางชีวภาพ

ตรีเพชร กาญจนภูมิ (Kanchanapoom T. *et al.*, 2004) ศึกษาการแยกสารที่สำคัญจากสารสกัดหยาบจากเมทานอลจากใบสังกรณี พบว่าสามารถแยกสาร 2 ชนิด คือ Phenylethanoid glycoside (4-hydroxyphenylethyl 4-O- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-O- α -L-rhamnopyranoside) และ Iridoid glucoside (10-O-*trans*-coumaroyl-eranthemoside) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มไกลโคไซด์ (Glycoside)



Phenylethanoid glycoside

Iridoid glucoside

รูป 2.14 โครงสร้างของ Phenylethanoid glycoside และ Iridoid glucoside

Navendu V. *et.al* (2017) ค้นพบสปีชีส์อ้อยสะพายควาย *Reissantia* (Celastraceae) ในอินเดียซึ่งเป็นพืชที่มีขนาดเล็ก กระจายอยู่ทั่วไปในเขตร้อนของทวีปแอฟริกาและอินโด - มาลายา อ้อยสะพายควายเป็นไม้พุ่มเลื้อยที่มีขนาดเล็กเป็นไม้พุ่ม ใบและดอกมีขนาดเล็ก ใบหยักตรง ดอกเป็นช่อ กิ่งก้านมี ขนาดเล็กกลีบเลี้ยงและกลีบดอกเรียงสลับกัน

อานัส มรรคาเขต และ ธัญญพัทธ์ จิรวัดนานนท์ (2557) ศึกษาลักษณะทางเภสัชเวทและพฤกษเคมีของสมุนไพรที่มีชื่อพ้องว่า “อ้อยสะพายควาย” จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *Suregada multiflorum* (วงศ์ Euphorbiaceae), *Hiptage benghalensis* (วงศ์ Malpighiaceae) และอ้อยสะพายควายที่ยังไม่ระบุชนิดในวงศ์ Celastraceae ซึ่งตัวอย่างสมุนไพรทั้งสามชนิดนี้ เก็บจากสวนสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยนำมาจัดทำตัวอย่างพรรณไม้แห้งและเก็บไว้ที่พิพิธภัณฑ์สมุนไพร ศึกษาลักษณะทางมหภาคและลักษณะทางจุลภาคในส่วนใบและลำต้น เตรียมสารสกัดโดยหมักในเอทานอล 80% แล้วนำมาตรวจสอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้นและศึกษาองค์ประกอบทางเคมีโดยผลการศึกษาลักษณะทางมหภาคของใบ *S. multiflorum* มีลักษณะเป็นใบเดี่ยว เรียงสลับใบขอบขนาน ส่วนใบ *H. benghalensis* มีลักษณะใบเดี่ยว เรียงตรงข้าม ใบรูปไข่-รูปหอก และใบของตัวอย่างสมุนไพรในวงศ์ Celastraceae มีลักษณะเป็นใบเดี่ยว เรียงตรงข้ามสลับตั้งฉาก รูปรี-รูปไข่กลับ ลักษณะทางจุลทรรศน์ลักษณะของพืชทั้งสามชนิดที่มีความแตกต่างกัน ได้แก่ พบ Spiral vessel ใน *S. multiflorum* ส่วนในลำต้น *H. benghalensis* พบผลิกรูปกุหลาบของแคลเซียมออกซาลेट และ Reticulate vessel ในขณะที่ตัวอย่างสมุนไพรในวงศ์ Celastraceae พบผลิกรูปกุหลาบของแคลเซียมออกซาลेटรูปออกตะฮีดัล จากการศึกษาลักษณะทางพฤกษเคมีในสารสกัดของใบและลำต้น *S. multiflorum* พบสารฟลาโวนอยด์และสารเทอร์ปีนอยด์ ส่วนในสารสกัดของใบและลำต้น *H. benghalensis* พบน้ำตาลรีดิวซ์และสารฟลาโวนอยด์ และในสารสกัดตัวของอย่างสมุนไพรในวงศ์ Celastraceae พบน้ำตาลรีดิวซ์ สารแทนนินชนิดสลายตัวได้กับชนิดรวมตัวแน่น สารฟลาโวนอยด์ สารแอนทราควิโนน และสารเทอร์ปีนอยด์