# บทที่ 2
# ทฤษฎีและ/หรือแนวความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย

## 2.1 อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง เนื่องจากมีผลกระทบ ต่อสุขภาพร่างกายมนุษย์โดยเหนี่ยวนำให้เกิดโรคร้ายแรง เช่น โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือด โรคหัวใจ และโรคที่เกิดจากภาวะเซลล์เสื่อม ความเสียหายที่เกิดขึ้นนี้เกิดจากความไม่สมดุล ระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระและอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายตามปกติและได้รับจากสิ่งแวดล้อม เมื่อวิทยาการทางด้านการแพทย์พัฒนาก้าวหน้าขึ้น ทำให้ทราบแน่ชัดถึงผลร้ายของอนุมูลอิสระ จึงมีความพยายามในการศึกษาถึงการป้องกันและค้นคว้าหาสาร ที่นำมาเพื่อต้านฤทธิ์อนุมูลอิสระมากขึ้น แหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ ส่วนใหญ่ได้มาจากสารที่อยู่ในพืชผักผลไม้ที่รับประทาน และสารจากส่วนต่างๆของพืช

อนุมูลอิสระ (Free Radicals) หรือ Reactive Oxygen Species (ROS) คือ โมเลกุลหรือไอออนที่มี อิเล็กตรอนโดดเดี่ยวอยู่รอบนอกและมีอายุสั้นมากประมาณ 1 หรือ $10^{-3}$ – $10^{-10}$วินาที จึงจัดว่าเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและว่องไวต่อการหรือเกิดปฏิกิริยาเคมี โดยสามารถตรวจวัด ด้วย Electron Spin Resonance (ESR) โมเลกุลหรือไอออนชนิดนี้เป็นตัวก่อให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่

โดยปกติจะมีการกล่าวถึงเฉพาะอนุมูลอิสระ (Free Radicals) ที่เป็นสาเหตุการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกายเรา แต่แท้จริงแล้ว ROS คือตัวการสำคัญอีกตัวหนึ่ง โดย ROS จะรวมถึง โมเลกุลที่ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาที่เป็นทั้งอนุมูลอิสระ (Radicals) หรือ ที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระ (Non-radicals) ก็ได้

### 2.1.1 ชนิดของอนุมูลอิสระ

ร่างกายของมนุษย์ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่สุด เรียกว่า เซลล์ เซลล์หลายๆเซลล์ทำงานร่วมกันเป็นเนื้อเยื่อ และกลุ่มของเนื้อเยื่อหลายชนิดทำงานด้วยกัน เรียกว่าอวัยวะ ตัวอย่างของอวัยวะได้แก่ หัวใจ ไต ปอด ฯลฯ นอกจากนี้ยังพบว่าความผิดปกติ หรือความบกพร่องใดๆ ของอวัยวะต่างๆ ในร่างกายของมนุษย์นั้นก็ล้วนแล้วแต่มีต้นกำเนิดมาจากการตาย หรือความเสียหายของส่วนเล็กที่สุดหรือส่วนที่เป็นเซลล์ของอวัยวะนั้นๆแทบทั้งสิ้น จากการศึกษาทางวิทยาศาสตร์

การแพทย์พบว่าสิ่งที่ทำให้เซลล์ เกิดความเสียหายหรือเกิดจากการตายได้มากที่สุดคือสารพิษตกค้างชนิดหนึ่ง ที่เราเรียกว่า อนุมูลอิสระ (Free Radicals) ที่มีอยู่อย่างมากมายในร่างกายของมนุษย์ อนุมูลอิสระหรือสารพิษ ดังกล่าวนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

กลุ่มแรก คือ อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกาย ซึ่งเป็นผลมาจากกระบวนการเมแทบอ-ลิซึมของร่างกาย ซึ่งได้แก่ สารเคมีที่หลงเหลือจากขบวนการทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นภายในร่างกายและในเซลล์สิ่งมีชีวิต

กลุ่มที่สอง คือ อนุมูลอิสระที่มาจากสิ่งแวดล้อมภายนอกร่างกาย ได้แก่ การติดเชื้อจากแบคทีเรียและไวรัส สิ่งแวดล้อมที่เป็นมลพิษ การออกกำลังกายอย่างหักโหม เป็นต้น

### 2.1.2 **กระบวนการทางเคมีสำหรับการเกิดอนุมูลอิสระ** ROS

ปฏิกิริยาการแยกอย่างสมมาตร (Symmetric separation)

$$X — X \longrightarrow X^{\bullet} + X^{\bullet}$$

อนุมูลอิสระอื่นๆ

$$X^{\bullet} — HR \longrightarrow HX + R^{\bullet}$$

ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้นว่า อนุมูลอิสระถูกสร้างขึ้นมาทั้งจากกระบวนการเมแทบอ- ลิซึมของร่างกาย และในภาวะที่ผิดปกติ เช่น ภาวะของโรค หรือภาวะที่ร่างกายแวดล้อมด้วยมลพิษ โดยในภาวะที่ผิดปกติจะส่งผลให้ร่างกายเกิดการสะสมของอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจำเป็น ที่ร่างกายต้องหาทางป้องกันการโดนทำลายจากอนุมูลอิสระเหล่านั้น สิ่งที่ร่างกายสร้างขึ้นเพื่อปกป้องตัวเอง ก็คือระบบแอนติออกซิแดนท์ (Antioxidants) ซึ่งประกอบไปด้วยสารหรือเอนไซม์ต่างๆ ที่ความเข้มข้นต่ำๆ ก็สามารถจะชะลอหรือป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันของสาร (Substrate) ที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา โดยสารเหล่านี้รวมถึงสารเกือบทุกชนิดในร่างกาย เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต ดีเอ็นเอ แต่อย่างไรก็ตามมีบางภาวะที่ปริมาณอนุมูลอิสระมีมากเกินกว่าที่ระบบแอนติออกซิแดนท์จะจัดการได้ จะเกิดภาวะที่เรียกว่า Oxidative stress ขึ้นมาซึ่งจะส่งผลกระทบต่างๆ

ต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น การทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ของดีเอ็นเอ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และเกิดการทำลายของกลุ่มโมเลกุลที่มีพันธะ S-H และเยื่อหุ้มเซลล์ ก่อให้เกิด ผลเสียต่อเซลล์ และการทำลายเซลล์ ซึ่งเป็นสาเหตุ ของการแก่ (Aging) และรุนแรงไปถึงการเกิดเป็นโรคภัยไข้เจ็บต่างๆ เช่น เส้นเลือดตีบ โรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน (Autoimmune disease) โรคที่เกิดจากการที่เลือดกลับไปเลี้ยงอวัยวะที่เคยมีการตีบตันของเส้นเลือดในระยะสั้นๆมาก่อน (Reoxyge-nation injury, Reperfusion injury) รวมไปถึงโรคมะเร็งเป็นต้น การทำลายโมเลกุลที่เป็นต้นเหตุการเกิดของอนุมูลอิสระนับเป็นกลไกการทำงานของระบบแอนตี้ออกซิแดนท์ที่สำคัญกลไกหนึ่ง ซึ่งเป็นการทำงานที่อาศัยเอนไซม์หรือไม่ก็ได้

## 2.2 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

สารต้านอนุมูลอิสระหรือสารต้านออกซิเดชัน คือ สารเคมีที่ทำหน้าที่ต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา ได้แก่ สารออกซิแดนท์ (Oxidants, Oxidizable substances) แล้วให้ผลยับยั้งหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันอย่างมีนัยสำคัญ ร่างกายมนุษย์สามารถผลิตสารต้านอนุมูลอิสระได้ ปริมาณหนึ่ง สารเหล่านั้นได้แก่ เอนไซม์และโปรตีนที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น Superoide dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione peroxidase (GPx), Glutathione (GSH) พืชผักผลไม้เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ ได้แก่ วิตามินต่างๆ เช่น วิตามินอี วิตามินซี วิตามินเอ และเบต้าแคโรทีน รวมทั้งโคเอนไซม์ ซีลีเนียม ทองแดง แมงกานีส และเหล็ก การทำลายโมเลกุลที่เป็นต้นเหตุการเกิดของอนุมูลอิสระ นับเป็นกลไกการทำงานของระบบแอน- ตี้ออกซิแดนท์ที่สำคัญกลไกหนึ่ง ซึ่งเป็นการทำงานที่อาศัยเอนไซม์หรือไม่ก็ได้

### 2.2.1 กลไกการต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระทำลายอนุมูลอิสระโดยการให้หรือรับอิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระ ทำให้ปฏิกิริยาลูกโซ่สิ้นสุดลง สารต้านอนุมูลอิสระ โดยตัวเองจะไม่กลายเป็นอนุมูลอิสระ เมื่อทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระเนื่องจากตัวมันเองมีความคงตัว ทั้งในรูปอิเล็กตรอนครบ และอิเล็กตรอนขาดหรือเกินกลไกการต้านอนุมูลอิสระแบ่งได้เป็น 2 กลไก ตามลักษณะการออกฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ คือ ฤทธิ์ป้องกันอนุมูลอิสระ (Preventive antioxidant activity) และฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ (Free- radical scavenging antioxidant activity)

### 2.2.2 ฤทธิ์ป้องกันอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระประเภทนี้ ออกฤทธิ์ป้องกันไม่ให้เกิดอนุมูลอิสระตั้งแต่เริ่มต้น ได้แก่ การยับยั้งไม่ให้เกิดอนุมูลที่เหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระ เช่น ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์การ- คีเลตโลหะทรานสิชัน และการระงับไม่ให้เกิด Reactive oxygenspecies (ROS) สารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มนี้ ได้แก่ เอนไซม์ และโปรตีนในร่างกายที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น CAT, GPx, GSH รวมทั้งวิตามินอีและสารกลุ่มแคโรทีน ดังแสดงในปฏิกิริยานี้

$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$$

$$H_2O_2 + 2GSH \rightarrow 2\,H_2O + GSSG$$

$$LOOH + 2GSH \rightarrow LOH + H_2O + GSSG$$

**รูปที่ 2.1** การต้านอนุมูลอิสระด้วยโปรตีนและเอนไซม์ในร่างกาย

(LOOH = เพอร์ออกไซด์ของไขมัน)

### 2.2.3 ฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มออกฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระโดยการยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่เริ่มต้น (Chain initiation) และทำลายปฏิกิริยาลูกโซ่ขั้นเพิ่มจำนวนอนุมูลอิสระ (Chain propagation) สารในกลุ่มนี้ ได้แก่ วิตามินอี วิตามินซี แอลบูมิน บิลิรูบิน ยูบิควินอล (CoQ10) แคโรทีนอยด์ และฟลาโวนอยด์ จะเห็นได้ว่า อนุมูลอิสระในปริมาณที่มากเกินสมดุลในร่างกายก่อโทษได้ร้ายแรงในร่างกายมนุษย์ มีสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำหน้าที่ควบคุมสมดุลปริมาณของอนุมูลอิสระหากสมดุลระหว่างอนุมูลอิสระ และสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายที่เสียไป ร่างกายจำเป็นต้องได้รับจากภายนอก แหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติส่วนหนึ่งได้จากอาหาร ผัก ผลไม้จากพืชที่มนุษย์บริโภคการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในส่วนต่างๆของพืชชนิดต่างๆ ทำให้ได้แหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระมากขึ้น

### 2.2.4 ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระ

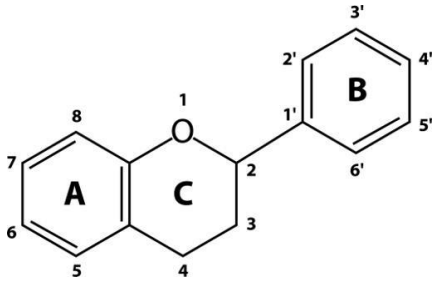
จากการศึกษาพบว่า อนุมูลอิสระบางชนิดนั้นไม่เป็นอันตราย และเซลล์เม็ดเลือดขาวใช้อนุมูลอิสระเหล่านี้ ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส และเซลล์มะเร็ง แต่ถ้ามีอนุมูลอิสระมากเกิน กว่าที่ร่างกายต้องการมาก ร่างกายของเราจะผลิตเอนไซม์บางชนิด ซึ่งเป็นแอนตี้ออกซิแดนท์เอนไซม์ เพื่อป้องกันอนุมูลอิสระ แต่อย่างไรก็ตามพบว่า ถึงแม้จะมีการสร้างแอนตี้ออกซิแดนท์เอนไซม์ขึ้นก็ไม่เพียงพอ ร่างกายยังต้องการสารแอนตี้ออกซิแดนท์ซึ่งได้แก่ วิตามินเอ เบต้าแคโรทีน วิตามินซี วิตามินอี ไบโอฟลาโวนอยด์ และเกลือแร่ เช่น ซีลีเนียม ทองแดง สังกะสี และโมลิบดินัมอีกด้วย

#### *2.2.4.1 แคโรทีนอยด์*

แคโรทีนอยด์เป็นสาระสำคัญที่พบในคลอโรพลาสต์ (Chloroplast) ของพืช มีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง โดยทำหน้าที่เป็นตัวช่วยคลอโรฟิลล์ซึ่งอยู่ในคลอโรพลาสต์ในการรับพลังงานแสง ดังนั้นในผักใบเขียวจึงพบว่ามีแคโรทีนอยด์ด้วย ในผักหรือผลไม้ที่ยังไม่สุกก็พบแคโรทีนอยด์แต่น้อยกว่าผักหรือผลไม้ที่สุก เพราะปกติแล้วในผักใบเขียวหรือในผักและผลไม้ที่ยังดิบอยู่ แคโรทีนอยด์จะอยู่ในส่วนของคลอโรพลาสต์ ในขณะที่ผักหรือผลไม้สุกแคโรทีนอยด์จะถูกสังเคราะห์ขึ้นในโครโมพลาสต์ (Chromoplast) เป็นปริมาณมาก เนื่องจากเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์มีมากขึ้น สารในกลุ่มแคโรทีนอยด์มีจำนวนหลายร้อยชนิดซึ่งให้ทั้งสีสัน ( สีแดง ส้ม และเหลือง ) และมีประโยชน์ต่อร่างกายมาก แคโรทีนอยด์แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ แคโรทีน (Carotene) และแซนโทฟิลล์ (Xanthophylls)

#### *2.2.4.2 ฟลาโวนอยด์ (Fravonoids)*

เป็นสารที่พบได้ทั่วไปในพืชที่มีใบสีเขียว และพบได้ในทุกส่วนของพืช จัดว่าเป็นสาระสำคัญของกลุ่ม polyphenolsมีสูตรโครงสร้างเป็น flavanหรือ 2-phenylbenzopyran โดยประกอบด้วยคาร์บอน 15 อะตอม เรียงกันเป็นระบบ $C_6C_3C_6$ ซึ่งวงอะโรมาติกทั้งสองวงจะถูกเชื่อมด้วยคาร์บอน 3 อะตอม (โอภา วัชระคุปต์, 2006) ฟลาโวนอยด์เป็นส่วนหนึ่งของสารฟีนอลที่มีอยู่ในธรรมชาติ และเป็นกลุ่มที่มีขนาดใหญ่ โดยมีประมาณ 2% ของคาร์บอนที่เกิดจากการสังเคราะห์ของพืชทั้งหมดที่เปลี่ยนเป็นฟลาโวนอยด์ การบริโภคฟลาโวนอยด์น่าจะเป็นประโยชน์ เพราะสามารถทำปฏิกิริยากับระบบต่างๆทางชีววิทยาและยังแสดงการเป็น anti-inflammatory, hypolipidemic, hypoglycemic และ antioxidant activities อีกด้วย



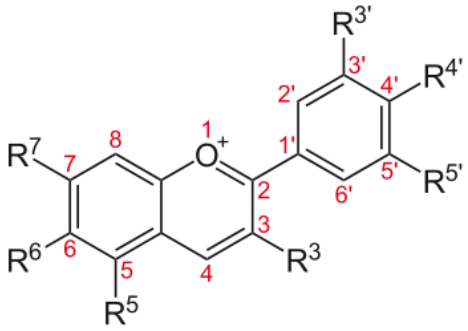

**รูปที่** 2.2 สูตรโครงสร้างพื้นฐานของ Flavonoid

ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เป็นกลุ่มของสารประกอบที่มีโครงสร้างพื้นฐานเป็นฟีนิลเบนโซไพโรน (phenylbenzopyrones) ซึ่งมีโมเลกุลขนาดเล็กและมีโครงสร้างประกอบด้วยการจัดเรียงตัวของคาร์บอน 15 ตัว (C6 - C3 – C6) เป็นวงแหวน 3 วง ได้แก่ วงแหวนเบนซีน (benzene ring) 2 วง (A and B) เชื่อมต่ออยู่กับวงแหวนไพแรน (heterocyclic pyran ring) ซึ่งอยู่ตรงกลางของโครงสร้าง C8 โดยสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยตามตำแหน่งของหมู่ฟังก์ชันซึ่งแทนที่ในโครงสร้างพื้นฐาน ได้เป็น 7 กลุ่ม ได้แก่

- ฟลาโวนอล (flavonols) เช่น เคอร์ซิติน (quercetin), แคมป์เฟอรอล (kaempferol) ไมริซิติน (myricetin)
- ฟลาโวน (flavones) เช่นลูติโอลิน (luteolin), อาพิจินิน (apigenin) ไครซิน (chrysin)
- ฟลาวาโนน (flavanones) เช่น เฮสเพอริติน (hesperetin) นารินจินิน (naringenin), อีริโอดิคทิออล (eriodictyol)
- ฟลาวานอล (flavanols) เช่น แคทิชิน (catechin) แกลโลแคทิชิน (gallocatechin), อีพิแคทิชิน (epicatechin) อีพิแกลโลแคทิชิน (epigallocatechin) อีพิแคทิชิน-3-แกลเลต (epicatechin-3-gallate) อิพิแกลโลแคทิชิน-3-แกลเลต (epigallocatechin-3-gallate)
- ฟลาวาโนนอล (flavanonols) เช่น แทกซิโฟลิน (taxifolin)
- ไอโซฟลาโวน (isoflavones) เช่น เดดซีน (daidzein), จีนิสตีน (genistein) ไกลซิตีน (glycitein) ฟอร์โมโนเนติน (formononetin)
- แอนโธไซยานิดิน (anthocyanidins) เช่น ไซยานิดิน (cyanidin) เดลฟินิดิน (delphinidin) มาลวิดิน (malvidin) พีลาร์โกนิดิน (pelargonidin) พีโอนิดิน (peonidin) พีทูนิดิน (petunidin)

### *2.2.4.3 แอนโทไซยานิน (Anthocyanins)*

แอนโทไซยานินพบว่าแพร่กระจายอย่างกว้างขวางในพืช ซึ่งให้สีน้ำเงิน สีม่วง สีน้ำเงินม่วง สีแดงม่วง สีแดง และสีส้ม ตามลำดับ (Jackman& Smith, 1996) แอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ (water-soluble pigments) จัดอยู่ในกลุ่มของฟลาโวนอยด์ (flavonoids) สีของแอนโทไซยานินจะเปลี่ยนแปลงไปตามสภาวะความเป็นกรด-ด่างโดยมีสีน้ำเงินเข้มในสภาวะที่เป็นด่าง (pH มากกว่า7) มีสีม่วงเมื่อเป็นกลาง (pH 7) และจะเปลี่ยนเป็นสีแดงสม ในสภาวะที่เป็นกรด (pH น้อยกว่า7) สามารถพบแอนโทไซยานินได้ทั่วไปในแวคิวโอลและเซลล์เนื้อเยื่อชั้นนอกของดอก ผล และใบของพืชดอก (angiosperms) ยกเว้นในพืชพวกตะบองเพชร ผักกาดหัว ผักโขมและพืชพวกสาหร่าย บางครั้งปรากฏในส่วนเนื้อเยื่อพืช (plant tissue) ได้แก่ ราก หัวใต้ดินของพืช (tuber)ลำต้น หน่อย่อยและพืชเมล็ดเปลือย ( gymnosperms) ต่างๆ แอนโทไซยานินประกอบด้วยส่วนของอะไกลโคน (aglycone)น้ำตาล (sugar) และหมู่เอซิล (acyl group) ปัจจุบันมีการค้นพบแอนโทไซยานิน มากกว่า300ชนิดจากสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่ได้พบกว่า 7,000 ชนิด แต่ละชนิดจะมีสีสันและคุณสมบัติ ที่แตกต่างกันไป แม้ว่าแอนโทไซยานินจะมีด้วยกันหลายชนิด แต่ทุกชนิดจะมีโครงสร้างหลักเป็นสารชนิดเดียวกันที่เรียกว่าแอนโทไซยานิดิน (anthocyanidins) ที่มีคาร์บอน 15 อะตอมอยู่ภายในโมเลกุล (สัมพันธ์คัมภิรานนท์, 2003) คือ โครงสร้างแบบ C6-C3-C6 ซึ่งเป็นไกลโคไซด์ (glycoside) ของ 2-phenylbenzopyrylium หรือ flavyliumcation (กรมวิทยาศาสตร์บริการ, 2010)




**รูปที่** 2.3 สูตรโครงสร้าง และลักษณะของ Anthocyanins

โครงสร้างของแอนโทไซยานิน ประกอบด้วยสารประกอบ 2 หรือ 3 ชนิด ได้แก่ชนิดที่ 1 คือ แอนโทไซยานิดินหรือ อะไกลโคน (Aglycone) ชนิดที่ 2 คือ น้ำตาล ซึ่งน้ำตาลจะเกิดพันธะกับคาร์บอน ตำแหน่งที่ 3 หรือตำแหน่งที่ 3 และ 5 โดยน้ำตาลที่เกิดพันธะได้ เช่น น้ำตาลกลูโคส (Glucose) น้ำตาลกาแลคโตส (Galactose) น้ำตาลรูติโนส (Rutinose) น้ำตาลแรมโนส

(Rhamnose) เป็นต้น และชนิดที่ 3 คือ กรด ซึ่งส่วนนี้อาจมีหรือไม่มีก็ได้ ถ้าแอนโทไซยานินมีกรดเป็นองค์ประกอบจะเรียกว่า นอนอะซิเลตเทต แอนโทไซยานิน (Non-acylated anthocyanin) แต่ถ้าไม่มีกรดเป็นองค์ประกอบจะเรียกว่า อะซิเลตเทต แอนโทไซยานิน (Acylated anthocyanin) โดยกรดจะเกิดการเอสเทอริฟิเคชั่น (Esterification) กับน้ำตาลที่จับกับ Carbon ตำแหน่งที่ 3 และหรือ ตำแหน่งที่ 5 กรดที่เกิดพันธะเอสเทอร์กับน้ำตาล เช่น กรดคูมาริก (Coumaric acid) กรดเฟอร์รูริก (Ferulic acid) กรดคาร์เฟอิก (Caffeic acid) เป็นต้น ซึ่งการเกิด เอซิเลชั่น (Acylation) ในโครงสร้างของแอนโทไซยานินจะทำให้ตัวแอนโทไซยานินชนิดนั้นมีความคงตัวดีขึ้น นอกจากโครงสร้างพื้นฐานจะมีผลต่อสีของแอนโทไซยานินแล้วพีเอชของสารละลายที่แอนโทไซยานินละลายอยู่ก็ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงสีได้เนื่องจากพีเอชมีผลทำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลของแอนโทไซยานินเป็น 4 รูปแบบ คือถ้า อยู่ในรูปquinonoidal base (A) จะมีสีม่วง ถ้าอยู่ในรูปแฟลวิเลียมแคทไอออน ($AH^+$) จะให้สีแดง แต่ถ้าเป็น carbinolpseudobase (B) และchalcone (C) จะไม่มีสี ซึ่งจะพบว่าส่วนใหญ่ที่พีเอช3 หรือต่ำกว่าจะให้สีแดง พีเอชเป็นกลางถึงด่างเล็กน้อย เช่น 8.5 จะให้สีม่วง แต่ถ้าเป็นด่างมาก ๆ เช่น ที่พีเอช11 จะให้สีน้ำเงิน

## 2.3 **การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ** (Antioxidant Capacity)

### 2.3.1 **วิธี** Folin-Ciocalteu's

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัด ทำโดยวิธี Folin-Ciocalteu ซึ่งอาศัยหลักการของปฏิกิริยารีดักชันและออกซิเดชันระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนโมลิบดินัม-ทังสเตนกับสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัด โดยที่จะเกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนปริมาณ 1 โมลอิเล็กตรอนจากสารประกอบฟีนอลิกไปยังสารประกอบเชิงซ้อนโมลิบดินัม-ทังสเตนปฏิกิริยาเคมี แสดงดังสมการ

$3H_2O.P_2O_5.13WO_3.5MoO_3.10H_2O$ หรือ $Mo^{+6}$complex และ

$3H_2O.P_2O_5.13W_2O_5.5Mo_2O_5.10H_2O$ หรือ $Mo^{+5}$complex

$Mo^{+6}$complex + $e^-$ ⟶ $Mo^{+5}$complex

สารละลายสีเหลือง — สารละลายสีน้ำเงิน ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร

**รูปที่** 2.4 ปฏิกิริยารีดักชันและออกซิเดชันระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนโมลิบดินัม-ทังสเตนกับสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัด

สารประกอบเชิงซ้อนโมลิบดินัม-ทังสเตน ที่มีเลขออกซิเดชัน $^{+}$6 จะมีสีเหลืองแกมเขียว เมื่อรับอิเล็กตรอนปริมาณ 1 โมลอิเล็กตรอนจากสารประกอบฟีนอลิก จะเปลี่ยนสถานะเลขออกซิเดชัน เป็น $^{+}$5 ซึ่งมีสีน้ำเงินแกมเขียว ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร และได้สารประกอบฟีนอลเลตเป็นผลิตภัณฑ์ ความเข้มของสีน้ำเงินแกมเขียว ขึ้นอยู่กับปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนโมลิบดินัม-ทังสเตน ที่มีเลขออกซิเดชัน $^{+}$5 กล่าวคือ ถ้ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมาก ปริมาณสารประกอบเชิงซ้อน โมลิบดินัม-ทังสเตน (เลขออกซิเดชัน $^{+}$5) ก็จะเพิ่มขึ้น สีของสารละลายก็จะเข้มขึ้นด้วย จึงสามารถนำมาใช้ในการหาปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกรวมในสารสกัดได้ ซึ่งวิธี Folin-Ciocalteu จะหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมโดยคิดเป็นปริมาณเทียบเท่ากับ Garlic acid

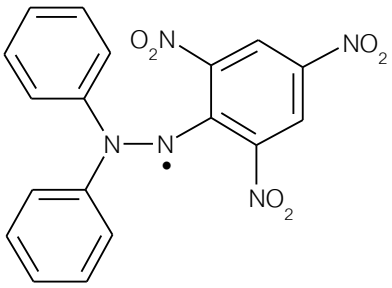
วิธี Folin-Ciocalteu's reagent เป็นการหาปริมาณสารฟีนอลิกรวม (Total phenolic compounds) มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant capacity) ซึ่งสามารถหาโดยวิธี Folin-Ciocalteu เป็นการศึกษาการเกิดสีโดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยสารประกอบฟีนอลิกเกิดปฏิกิริยาในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต และสาร Folin-Ciocalteu ถูกรีดิวซ์เกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน ดังสมการ และนำไปวิเคราะห์โดยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร

### 2.3.2 **วิธี** Aluminium Chloride Colorimetric Assays

การตรวจสอบหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจะใช้วิธี Aluminium chloride colorimetric assay ในการเกิดปฏิกิริยา $AlCl_3$ที่เติมในปฏิกิริยา จะเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับสารฟลาโวนอยด์ (Aluminium / Flavonoid) ที่เรียกว่า acid stable complexes ในตำแหน่ง C3 C5 และ/หรือ C5 ในสารสกัด เมื่อเติม NaOHลงไป สารผสมนั้นจะกลายเป็นสีชมพู ซึ่งติดตามการเกิดปฏิกิริยาโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer

### 2.3.3 **วิธี** DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical decolorization assays

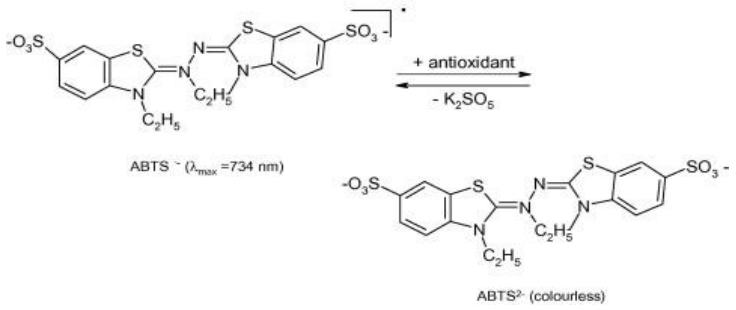
วิธี DPPH เป็นการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยศึกษาความสามารถในการขจัดอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH free radical) ของสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งอนุมูลอิสระดีพีพีเอช เป็นอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างเสถียร เมื่ออยู่ในรูปสารละลายจะมีม่วง ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร โครงสร้างทางเคมี ดังรูป 2.1 เมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ จะทำให้สีม่วงจางหายไป จึงสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคสเปกโทรสโคปีได้




**รูปที่** 2.5 โครงสร้างทางเคมีของ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical ($DPPH^{\bullet}$)

### 2.3.4 **วิธี** 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) free radical-scavenging activity (ABTS assays)

การทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระใช้การวิเคราะห์โดยวิธี ABTS assay ซึ่ง ABTS radical มีสีเขียว เมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไปทำให้สีเขียวนั้นจางลง เนื่องมาจากสารต้านอนุมูลอิสระไปให้อิเล็กตรอนกับอนุมูล ABTS ซึ่งจะติดตามการเกิดปฏิกิริยาที่ค่าความยาวคลื่น 734 nm




**รูปที่** 2.6 การเกิดปฏิกิริยาของ ABTS assay

## 2.4 มังคุด (Mangosteens)

### 2.4.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

มังคุด (*Garcinia mangostana* Linn.) เป็นพันธุ์ไม้ยืนต้นไม่ผลัดใบเขตร้อนชนิดหนึ่ง มีลำต้นสูงประมาณ 10 - 12 เมตร ทุกส่วนมียางสีเหลือง ใบเป็นใบเดี่ยวหนารูปทรงรี ขนาดกว้าง 6 - 11 เซนติเมตร ยาว 15 - 25 เซนติเมตร หลังใบมีสีเขียวเข้มและมัน ส่วนท้องใบมีสีอ่อนกว่า ดอกเป็นดอกสมบูรณ์เพศหรือแยกเพศ ออกเป็นดอกเดี่ยวหรือเป็นคู่ที่ซอกใบใกล้ปลายกิ่ง กลีบดอกเป็นสีแดง ส่วนกลีบเลี้ยงมีสีเขียวอมเหลืองซึ่งจะติดอยู่จนกระทั่งกลายเป็นผล ผลเป็นผลสดค่อนข้างกลมเมื่อแก่เต็มที่จะมีสีม่วงแดง มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 – 6 เซนติเมตร เปลือกนอกค่อนข้างแข็ง เนื้อในมีสีขาวฉ่ำน้ำ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 – 5 เซนติเมตร อาจมีหรือไม่มีเมล็ดอยู่ในเนื้อผลได้ ขึ้นอยู่กับขนาดและอายุของผล จำนวนกลีบของเนื้อจะเท่ากับจำนวนกลีบดอกที่อยู่ด้านล่างของเปลือก ผลมังคุดมีรสชาติหวานอมเปรี้ยวคล้ายสตอเบอรี่ที่ยังไม่สุกหรือส้มที่มีรสหวาน ส่วนเมล็ดไม่สามารถใช้รับประทานได้

**(ก)** **(ข)**

**รูปที่** 2.7 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมังคุด ได้แก่ ลำต้นมังคุด (ก) และผลมังคุด (ข)

### 2.4.2 สารสำคัญในผลมังคุด

มังคุดจัดว่าเป็นผลไม้ชนิดหนึ่งที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง จากรายงานการวิจัยของ US food testing lab ซึ่งได้คัดเลือกผลมังคุดจากต้นมังคุด จำนวน 2,006 ต้น มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารอาหารและแร่ธาตุในเนื้อมังคุด พบว่าเนื้อมังคุดประกอบด้วยสารอาหารและแร่ธาตุสูง ดังตาราง 1 โดยเฉพาะโปแตสเซียมซึ่งช่วยในเรื่องของการควบคุมความสมดุลของน้ำในร่างกายและความดันโลหิต นอกจากนี้เนื้อมังคุดยังมีค่า pH ค่อนข้างต่ำ ซึ่งทำให้เกิดรสเปรี้ยวและมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบที่ให้ความหวานค่อนข้างสูง ด้วยสาเหตุนี้ทำให้มังคุด มีรสชาติหวานอมเปรี้ยวและเป็นที่ชื่นชอบของผู้บริโภคเป็นอย่างมาก นอกจากเนื้อมังคุดที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงแล้ว เปลือกมังคุดซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากกระบวนการแปรรูปมังคุดยังประกอบด้วยสารสำคัญที่มีประโยชน์ทางการแพทย์และการรักษา ได้แก่ Xanthones กว่า 40 ชนิด นอกจากนั้นยังมี Tannin, Alpha&Gamma Mangostin, Catechins, Anthocyanin, Polysaccharides, Polyphenols, Stilbenes และ Quinones โดยจากรายงานการวิจัยพบว่าประเทศทางเอเชียตะวันออกเฉียงใต้นิยมนำสารสกัดจากเปลือกมังคุดมาใช้ในการรักษาบาดแผล อาการติดเชื้อที่ผิวหนัง โรคบิดมีตัว แผลอักเสบ ท้องร่วง และอหิวาตกโรค

### 2.4.3 การใช้ประโยชน์ทางการแพทย์และการรักษาของสารสกัดจากเปลือกมังคุด

- ***ฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย สาเหตุท้องเสีย*** สารสกัดน้ำต้มเปลือกผลมังคุดมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียอันเป็นสาเหตุอาการท้องเสีย ได้แก่ *Sh. dysenteriae*, *Sh. flexneri*, Sh. sonnei และ Sh. boydii, E.coli , Streptrococcus faecalis, Vibrio cholerae, *V. parahaemolyticus*, *S. agona*, *S. typhi*, *S.* typhimurium, *S.* stanley, *S. Virchow* และ *S.welterverdin* โดยสารสกัดน้ำต้มจากเปลือกผลความเข้มข้น 62.5 – 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *Sh. dysenteriae*, *Sh. typhi* และ *Sh. boydii* แต่มีการศึกษาบางเรื่องพบว่าสารสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95% และไดเอทิลอีเทอร์จากเปลือกผลความเข้มข้น $10^5$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Sh. dysenteriae, Sh. flexneri, Sh. boydii* และ *Sh. sonnei* สารสกัดปิโตรเลียมอีเทอร์จากเปลือกผลไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* และสารสกัดเอทานอลจากเปลือกผลความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อแผ่น ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli*

- ***ฤทธิ์แก้อาการท้องเสีย*** สารที่พบมากในเปลือกมังคุดคือ tannin ซึ่งให้รสฝาด สามารถแก้อาการท้องเสีย การใช้ทิงเจอร์จากเปลือกผลร่วมกับ emetine จะช่วยลดอาการบิดจากเชื้ออะมีบา และลดขนาดยา emetine ที่ต้องใช้ในการรักษาได้

- ***ฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย สาเหตุการเกิดหนอง*** สารสกัดเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียอันเป็นสาเหตุของการเกิดหนอง คือ Staphylococcus aureus และ S. aureus ที่ดื้อยา methicillin (MRSA) ส่วนสกัดที่ 1 จากสารสกัดปิโตรเลียมอีเทอร์จะให้ผลยับยั้งแบคทีเรียด้วยความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) และฆ่าแบคทีเรียด้วยความเข้มข้นต่ำสุด (MBC) ต่อ MRSA ได้ดีกว่า methicillin ถึง 20 เท่า และ 100 เท่า ตามลำดับ แต่ให้ผลยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MIC และ MBC) ต่อ S. aureus เท่ากับ methicillin โลชันที่ประกอบด้วยสารสกัดจากเปลือกผล 0.75% และสบู่เหลวที่ประกอบด้วยสารสกัดอัลกอฮอล์จากเปลือกผล 0.15% มีฤทธิ์ยับยั้ง S. aureus

- ***ฤทธิ์รักษาแผล*** Mangostin จากผลมังคุดมีผลรักษาแผลในหนูขาวได้ (26) ครีม GM1 ประกอบด้วยสารสกัดจากมังคุด มีคุณสมบัติใช้ในการรักษาแผล แผลติดเชื้ออักเสบ และแผลในผู้ป่วยเบาหวาน

- ***ป้องกันผิวจากแสงแดด*** ผลิตภัณฑ์ป้องกันผิวจากแสงแดด( Sun Screen), ที่ประกอบด้วยแมงโกสติน ร้อยละ 20 สามารถป้องกันผิวจากแสงแดด และมีค่าดัชนีในการป้องกันแสงแดด Sun Protective Factor (SPF) 10.4

- ***โรคมะเร็ง*** นับว่ามังคุดเป็นสมุนไพรชนิดหนึ่งที่น่าจะมีประโยชน์ต่อผู้ป่วยมะเร็ง จากสารแซนโทนที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) นอกจากนี้ยังมีสารพวกคาเทชิน โพลีฟีนอล เกลือแร่ และวิตามิน ซึ่งมีประโยชน์ต่อผู้ป่วยมะเร็งอีกด้วย เช่นมะเร็งเต้านม มะเร็งตับ มะเร็งเม็ดเลือดขาว ทั้งยังมีฤทธิ์ต้านเนื้องอกในหนูถีบจักร และต้านมะเร็งที่เกิดในเนื้อเยื่อ (Sarcoma - 180 ) สารกลุ่มแซนโทนจากเปลือกมังคุด ยับยั้งเอนไซม์โทโฟไอโซเมอเรส I และ II ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในกระบวนการถ่ายแบบดีเอ็นเอ ( DNA Replication) เพื่อการดำรงชีพต่อไปของสิ่งมีชีวิต โดยเอนไซม์นี้จะคลายเกลียวซุปเปอร์คอล์ยของดีเอ็นเอเพื่อให้เอนไซม์ชนิดต่างๆ เข้ามาทำการถ่ายแบบต่อไป คุณสมบัติดังกล่าวอาจยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้

## 2.5 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

**2.5.1** Waterhouse *et al.* (2001) หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-ciocalte โดยเทียบกับสาระลายมาตรฐาน Gallic Acid ต่อน้ำหนักของสารสกัดของตัวอย่าง ซึ่งสามารถวัดค่าดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

**2.5.2** Bushra *et al.* (2009) วิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดตัวอย่างจากผลมังคุดด้วยวิธี Aluminium Chloride Colorimetric Assays วิธีนี้เป็นวิธีวัดโดยการเกิดปฏิกิริยา $AlCl_3$ ที่เติมในปฏิกิริยา เกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับสารฟลาโวนอยด์ (Aluminium / Flavonoid) ซึ่งสามารถวัดค่าดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร

**2.5.3** Brand-Williams *et al.* (1995) วิเคราะห์คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดตัวอย่างจากผลมังคุดด้วยวิธี DPPH assays วิธีนี้เป็นวิธีวัดทางอ้อมโดยใช้สาร 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl หรือ DPPH radical ($DPPH^{\bullet}$) มีสูตรโมเลกุล $C_{18}H_{12}N_5O_6$ เป็น stable radical ในตัวทำละลาย Methanol ซึ่งสารละลายนี้มีสีม่วง และสามารถดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร

**2.5.4** Rice-Evans *et al.* (1996) วิธีวิเคราะห์คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดตัวอย่างจากผลมังคุดด้วยวิธี ABTS assays วิธีนี้เป็นวิธีวัดโดยใช้สาร 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) หรือ $ABTS^{\bullet+}$ มีสูตรโมเลกุล $C_{18}H_{24}N_6O_6S_4$ เป็น stable radical ในตัวทำละลาย Methanol ซึ่งสารละลายนี้มีฟ้า และสามารถดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร