บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ทฤษฎี เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ขลู่

1.1 ข้อมูลทั่วไป

ขลู่มีชื่อท้องถิ่น เช่น หนวดงั่ว หนวดงิ้ว หนาดงัว หนาดวัว (อุดรธานี) ขี้ป้าน (แม่ฮ่องสอน) คลู ขลู (ภาคใต้) ชื่อภาษาอังกฤษคือ Indian Marsh Fleabane ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Pluchea indica* (L.) Less. ชื่อพ้องคือ *Pluchea foliolosa* DC., *Corymbosa Roxb*., *Conyza indica* Mig., *Baccharis indica* Linn. จัดอยู่ในวงศ์ Compositae

1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ขลู่เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก สูง 1-2 เมตร ขึ้นเป็นกอ แตกกิ่งก้านสาขามาก ลำต้นกลมสีน้ำตาลแดง หรือเขียว ลำต้นและกิ่งก้านมีขนละเอียดปกคลุม ใบเดี่ยว ออกแบบสลับ รูปไข่กลับ กว้าง 1-5 เซนติเมตร ยาว 2.5-10 เซนติเมตร ปลายใบมน ปลายใบมีขนาดใหญ่กว่าโคนใบ โคนใบสอบ ขอบใบหยักแบบฟันเลื่อย โดยรอบมีขนขาวๆ ปกคลุม ก้านใบสั้นมาก เนื้อใบบาง แผ่นใบเรียบเป็นมัน ใบค่อนข้างแข็งและเปราะ ใบมีกลิ่นหอมฉุน ดอกออกเป็นช่อที่ปลายยอด หรือตามซอกใบ รูปกลม หลายๆ ช่อมารวมกัน ดอกเป็นฝอยสีขาวนวลหรือสีขาวอมม่วง กลีบดอกแบ่งออกเป็นวงนอกกับวงใน กลีบดอกวงนอกสั้นกว่าวงใน กลีบดอกวงในเป็นรูปท่อ ดอกวงนอกกลีบดอกยาวประมาณ 3-3.5 มิลลิเมตร ดอกวงใน กลีบดอกจะเป็นรูปท่อมีความยาวประมาณ 4-6 มิลลิเมตร ปลายจักเป็นซี่ฟันประมาณ 5-6 ซี่ ภายในมีทั้งดอกตัวผู้และดอกตัวเมียสีขาวอมม่วงขนาดเล็กอยู่เป็นจำนวนมาก ปลายกลีบดอกหยักเป็นซี่ฟัน 5-6 หยัก อับเรณูตรงโคนเป็นรูปหัวลูกศรสั้นๆ เกสรตัวเมียแยกเป็น 2 แฉกสั้นๆ ก้านช่อดอกยาวประมาณ 5-6 มิลลิเมตร ไม่มีก้านดอกย่อย ริ้วประดับมีลักษณะแข็ง สีเขียว และเรียงกันประมาณ 6-7 วง วงนอกเป็นรูปไข่ วงในคล้ายรูปหอกแคบ ปลายแหลม ผลเป็นผลแห้งไม่แตก รูปทรงกระบอก ขนาดเล็ก ยาวประมาณ 0.7 มิลลิเมตร ผลเป็นสัน มีขนาดเล็กมาก มีเหลี่ยม 10 สัน มีรยางค์ไม่มาก สีขาว ยาวประมาณ 4 มิลลิเมตร เมล็ดมีลักษณะเป็นฝอยเล็กๆ เมื่อแก่จะปลิวไปตามลม ยอดมีรสมันใช้รับประทานเป็นผักสด พบชอบขึ้นตามธารน้ำ ที่ชื้นแฉะ โดยเฉพาะที่ที่น้ำเค็มขึ้นถึง ใบอ่อนใช้รับประทานเป็นผักจิ้มได้ ใบเมื่อนำมาผึ่งให้แห้ง จะมีกลิ่นหอมคล้ายกลิ่นน้ำผึ้ง ใช้ชงดื่มแทนชา (นันทวัน บุณยะประภัศร และ อรนุช โชคชัยเจริญพร, 2539 และสุดารัตน์ หอมหวล และพลชาติ หอมหวล, 2553)

ภาพที่ 2.1 ลักษณะของต้น ใบ ดอก และ ผล ของขลู่

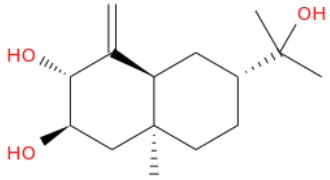
ที่มา: สุดารัตน์ หอมหวล และพลชาติ หอมหวล (2553)

1.3 สรรพคุณทางยา

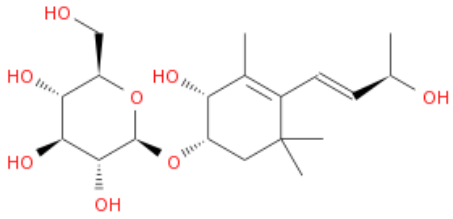
ขลู่เป็นพืชที่ชอบขึ้นตามธารน้ำโดยเฉพาะที่น้ำเค็มขึ้นถึง พบทั่วไปในเขตร้อน เช่น ประเทศอินเดีย จีน ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย ไทย เป็นต้น เป็นพืชที่ปลูกง่าย โดยใช้กิ่งแก่ปักชำ ขึ้นได้ในดินแทบทุกชนิด ในตำรายาไทยใช้ทั้งต้นต้มกินเป็นยาขับปัสสาวะ แก้เบาหวาน ต้มน้ำอาบแก้ผื่นคัน น้ำคั้นใบสดรักษาริดสีดวงทวาร ทั้งต้นสด หรือแห้ง เตรียมเป็นยาต้มรับประทานขับปัสสาวะ แก้โรคนิ่วในไต แก้ปัสสาวะพิการ เป็นยาช่วยย่อย แก้ริดสีดวงทวารหนัก ริดสีดวงจมูก แก้เบาหวาน แก้ประดง แก้เลือดลม และผื่นคันตามผิวหนัง เปลือกต้น เมล็ด แก้ริดสีดวงทวาร แก้กระษัย เป็นยาอายุวัฒนะ โดยนำมาต้มน้ำรับประทาน หรือต้มน้ำแล้วใช้ไอรมทวารหนัก แก้ริดสีดวงจมูก โดยตากแห้งแล้วเตรียมเป็นยาสูบ ใบ มีกลิ่นหอม ต้มน้ำดื่ม แทนเป็นน้ำชา ฝาดสมาน แก้ไข้ ขับปัสสาวะ ขับเหงื่อ แก้กระหายน้ำ แก้บิด แก้ประดง แก้เลือดลม แก้ริดสีดวงทวาร แก้แผลอักเสบอาจใช้ใบสดตำพอกบริเวณที่เป็น และต้มน้ำอาบบำรุงประสาท ราก รับประทานเป็นยาฝาดสมาน แก้บิด แก้ไข้ ขับเหงื่อ แก้แผลอักเสบ ใช้รากสดตำพอกบริเวณที่เป็น (นันทวัน บุณยะประภัศร และ อรนุช โชคชัยเจริญพร, 2539; น.391-394 และ สุดารัตน์ หอมหวล และพลชาติ หอมหวล, 2553)

1.4 สารสำคัญที่พบในขลู่

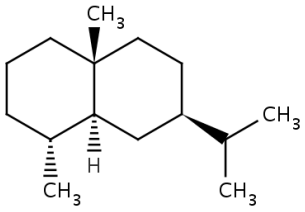
สารเคมีที่พบในต้นขลู่เป็นสารประกอบกลุ่ม terpene และ lignin glycosides เช่น citrucin C, hedyotisol A, hedyotisol B, plucheoside C, plucheoside E, plucheosides D1, D2, D3, plucheol A และ plucheol B (Uchiyama et al,. 1989, 1991) สารประกอบกลุ่ม polyphenol (quercetin) (Traithip, 2005) และ 3-(2',3'-diacetoxy-2'-methyl butyryl)-cuauhtemone ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ eudesmane (Mukhapadhyay et al., 1983)



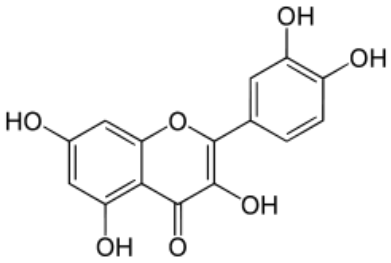
Plucheol A



Plucheoside



Eudesmane



Quercetin

ภาพที่ 2.2 แสดงโครงสร้างทางเคมีของตัวอย่างสารสำคัญที่พบในสารสกัดขลู่

1.5 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดจากขลู่

การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา พบว่าสารสกัดจากรากของต้นขลู่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) (Sen and Nag Chaudhuri, 1991), แก้แผลอักเสบ (antiulcer) (Sen et al., 1993), ฤทธิ์ต้านการออกซิเดชัน (antioxidant activity) (Sen et al., 2002) และต้านเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial) (Biswas et al., 2005) สารสกัดจากใบของต้นขลู่มีฤทธิ์ hypoglycemic (diuretic activities) (Pramanik et al., 2007) สารสกัดใบขลู่ในชั้นเอาทานอลมีฤทธิ์การต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) (Roslida et al., 2008) สารสกัดใบขลู่ในชั้นเมทานอลมีฤทธิ์การต้านการออกซิเดชัน (antioxidant activity) และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content) ที่สูงกว่าสารสกัดจากชั้นเฮกเซน (Noridayu et al., 2011) ในปัจจุบันพบว่าสารสกัดใบขลู่ที่สกัดด้วยน้ำร้อนมีฤทธิ์ต้านการออกซิเดชัน (antioxidant activity) (Srisook et al., 2012)

2. อนุมูลอิสระ (free radicals)

อนุมูลอิสระ (free radicals) คืออะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็คตรอนไมเปนคูอยูในวงอิเล็คตรอนวงนอกสุด (outer orbital) ที่มีระดับพลังงานสูง เนื่องจากการมีอิเล็กตรอนที่โดดเดี่ยว (unpaired electron) อยูในวงโคจรของโมเลกุลทำใหไมเสถียรทำใหอนุมูลอิสระเปนสารที่มีความไวในการเขาทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นสูงมากโดยอนุมูลอิสระจะไปแยงจับหรือดึงเอาอิเล็กตรอนจากโมเลกุลหรืออะตอมสารที่อยูขางเคียงเพื่อใหตัวมันเสถียรโมเลกุลที่อยูขางเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเปนอนุมูลอิสระชนิดใหมซึ่งอนุมูลอิสระที่เกิดมาใหมนี้จะไปทำปฏิกิริยากับสารโมเลกุลอื่นตอไป เกิดเปนปฏิกิริยาลูกโซ (chain reaction) ตอกันไปเรื่อยๆ (Halliwell, 1991) นอกจากนี้การศึกษาและวิจัยพบว่ามีสารหลายชนิดที่ไม่อยู่ในสภาวะอนุมูล แต่มีความเกี่ยวข้องหรือเป็นผลผลิตของอนุมูล และมีความไวต่อปฏิกิริยาสูง สารเหล่านี้มีทั้งที่เป็นสารที่ทำให้กำเนิดอนุมูลเนื่องจากมีความคงตัวต่ำ สลายตัวได้ง่าย เช่น โอโซน (O_3) หรือสารที่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นเกิดเป็นอนุมูล เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) รวมถึงสารที่เป็นผลผลิตของอนุมูลที่มีอันตรายสูง ได้แก่ เปอร์ออกซีไนไตรท ($ONOO^-$) ซึ่งเรียกโดยรวมว่าสารไวต่อปฏิกิริยา (reactive species, RS) อนุมูลอิสระ และสารที่เกี่ยวข้องกับอนุมูลที่มีบทบาทในทางชีววิทยา แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive oxygen species, ROS) ยกตัวอย่างเช่น ไฮดรอกซิล ($^{\bullet}OH$) และ ซุปเปอร์ออกไซด์แอนอิออน ($O_2^{-\bullet}$) เป็นต้น กลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive nitrogen species, RNS) ยกตัวอย่างเช่น ไนตริกออกไซด์ ($NO^{\bullet}$) เป็นต้น และกลุ่มที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive chloride species, RCS) ยกตัวอย่างเช่น อะตอมมิกคลอไรด์ (Cl) เป็นต้น (โอภา วัชระคุปต์, 2550)

การเกิดอนุมูลอิสระในสิ่งมีชีวิต เกิดจากการเผาผลาญของเซลล์โดยการใช้ออกซิเจน อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์แอนอิออน ($O_2^{-\bullet}$) และอนุมูลไฮดรอกซิล ($^{\bullet}OH$) เป็นอนุมูลที่พบในเซลล์มากกว่าอนุมูลอื่นๆ ถ้าเกิดขึ้นอาจทำลายส่วนประกอบสำคัญของเซลล์รอบๆบริเวณนั้นไม่ว่าจะเป็นโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต หรือ ดีเอนเอ (DNA) ทำให้สารชีวโมเลกุลเหล่านั้นเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและเสียหน้าที่การทำงานไป (มลศิริ วิโรทัย, 2540) การเกิดอนุมูลอิสระมีไดหลายกลไกที่แตกตางกัน ดังนี้

ก. การแตกของพันธะโควาแลนทแบบโฮโมไลซิส

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

ข. การเพิ่มอิเล็กตรอน 1 ตัวใหแกอะตอมที่เปนกลางทางไฟฟา

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

ค. การสูญเสียอิเล็กตรอน 1 ตัวใหแกอะตอมที่เปนกลางทางไฟฟา

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

นอกจากนี้การศึกษาและวิจัยพบวามีสารหลายชนิดที่ไมไดอยูในสภาวะอนุมูล แตมีความเกี่ยวของ เป็น ผลผลิตของอนุมูล เนื่องจากมีความคงตัวต่ำ สลายตัวไดงาย เชน ไฮโดรเจนเปอรออกไซด (H_2O_2) เปอรออกซีไนไตรท ($ONOO^-$) อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวของกับอนุมูลมีบทบาทในทางชีวภาพ แบงออกเปน 3 กลุ่ม ใหญคือ กลุมที่มีออกซิเจนเปนองคประกอบสำคัญ (Reactive Oxygen Species, ROS) กลุ่มที่มีไนโตรเจนเปนองคประกอบสำคัญ (Reactive Nitrogen Species, RNS) กลุมที่มีคลอรีนเปนองคประกอบสำคัญ (Reactive Chlorine Species, RCS) สารบางชนิดจัดอยูได 2 กลุม เชน เปอรออกซีไนไตรท ($ONOO^-$) สามารถแสดงไดดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างอนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง (โอภา วัชระคุปต, 2550)

อนุมูลอิสระ	สารที่เกี่ยวข้อง
Reactive oxygen species (ROS, RS)	
Superoxide, Superoxide anions, $O_2^{-\bullet}$	H_2O_2, Ozone (O_3)
Hydroxyl, $^{\bullet}OH$	Hypobromous acid (HOBr)
Hydroperoxyl, $HO_2^{\bullet}$	Hypochlorous acid, HOCl
Reactive nitrogen species, RNS	
Nitric oxide, $NO^{\bullet}$	Nitrous acid, NO_2
Nitrogen dioxide, $NO_2^{\bullet}$ $NO_2^{-\bullet}$	
Reactive chlorine species, RCS	
Atomic chloride, Cl	Hypochlorous acid, HOCl Nitryl (nitronium) chloride, NO_2Cl Chloramines Chlorine gas (Cl_2)
Others	
Thionyl radical, $RS^{\bullet}$	

3. การปองกันอันตรายและความเสียหายที่ เกิดจากอนุมูลอิสระ (โอภา วัชระคุปต์, 2550)

กลไกกำจัดอนุมูลอิสระมี 2 วิธี คือ ประเภทแรกปองกันการเกิดสารอนุมูลอิสระไดแก เอนไซม์ Superoxide Dismutase (SOD), glutathione peroxidase, catalase, peroxidase, cytochrome C peroxidase ทองแดง สังกะสี ซีเลเนียม โปรตีนซึ่งมีทองแดงอยูในโมเลกุล (ceruloplasmin) มีกลไกดังนี้

3.1 เอนไซมที่ปองกันการออกซิเดชัน (antioxidant defense enzyme) ในระดบเซลลเอนไซมเปนกลไกสำคัญแรกที ทำหนาที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระใหอยูในสมดุล เอนไซมที่สำคัญไดแก่

3.1.1 เอนไซมซุปเปอรออกไซดดิสมิวเตส (Superoxide Dismutase; SOD) เอนไซม SOD จะทำหนาที่ขจัดอนุมูลอิสระเริ่มตนที่ เกิดขึ้นในรางกาย คือ อนุมูลอิสระซุปเปอรออกไซดแอนอิออน ($O_2^{-\bullet}$) โดยการเปลี่ยน $O_2^{-\bullet}$ ใหเปนไฮโดรเจนเปอรออกไซด

$$2O_2^{-\bullet} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

3.1.2 เอนไซมคาตาเลส (catalase ; CAT) เอนไซมคาตาเลสเปนเอนไซมซึ่งอยูในเปอรร็อกซิโซม มีฮีม คือ ferriprotoporphyrin เปนองคประกอบ เอนไซมคาตาเลสทำหนาที่เปลี่ยนไฮโดรเจนเปอรไซดไปเปนโมเลกุลของน้ำกับออกซิเจน

$$2H_2O_2 + 2H^+ \xrightarrow{CAT} 2H_2O_2 + O_2$$

3.1.3 เอนไซมกลูตาไทโอนเปอรออกซิเดส (glutathione peroxidase ; GPx) เอนไซมเปอรออกซิเดสจะมีธาตุซิลิเนียมเปนองคประกอบสำคัญอยูในโครงสรางของเอนไซม GPx ทำหนาที่เรงปฏิกิริยารีดักชันของสารประกอบไฮโดรเปอรออกไซด ไดแก ลิพิดเปอรออกไซด (ROOH) และ ไฮโดรเจนเปอรไซด โดยมีการออกซิไดสกลูตาไทโอน รวมในปฏิกิริยาดวย เปนการสลายไฮโดรเจนเปอรออกไซดไมใหเกิดปฏิกิริยาเฟนตัน ซึ่งเปนปฏิกิริยาลูกโซ เอนไซมนี้ปกปองเซลลของสัตวเลี้ยงลูกดวยนมไมใหถูกทำลายหรือเสียหายจากภาวะที่รางกายถูกออกซิไดสหรือมีอนุมูลอิสระมากเกินไป

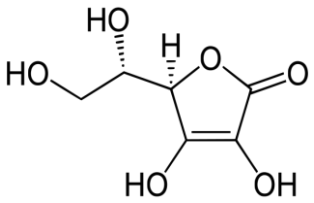
$$H_2O_2 + 2GSH \xrightarrow{GPX} GSSG + H_2O$$

$$ROOH + 2GSH \xrightarrow{GPX} ROH + GSSG + H_2O$$

3.2 สารตานอนุมูลอิสระ (antioxidants)

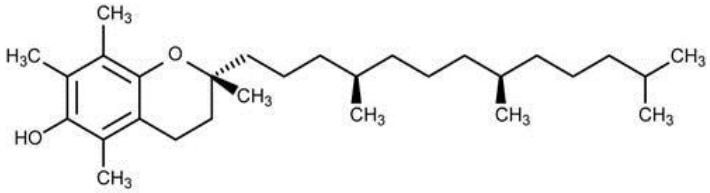
สารตานอนุมูลอิสระเปนสารที่สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยตรง เพื่อกำจัดอนุมูลใหหมดไป หรือหยุดปฏิกิริยาลูกโซไมใหดำเนินตอ สารอนุมูลอิสระที่มีอยูตามธรรมชาติ เชน

1. วิตามินซี (L-ascorbic acid) มีคุณสมบัติละลายน้ำไดดี จึงทำหนาที่ตานอนุมูลอิสระในเซลลและอวัยวะที่มีน้ำเปนองคประกอบหลัก วิตามินซีหรือกรดแอสคอรบิก ($AscH_2$) มีหมูไฮดรอกซี 2 หมูที่แตกตัวใหไฮโดรเจนได้ปฏิกิริยาโดยรวมคือ การใหอิเล็กตรอน 1 ตัว รวมกับอะตอมไฮโดรเจน แกอนุมูลอิสระ เปนการกำจัดหรือสลายอนุมูลอิสระคือ R ใหเปน RH จากการกำจัดนี้จะไดอนุมูลอิสระตัวใหมที่มีความไวต่ำคือ $Asc^{-\bullet}$ แสดงดังรูปที่ 2.3



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของวิตามินซี (L-ascorbic acid)
ที่มา: Yikrazuul (2009)

2. วิตามินอี หรือ tocopherol เปนวิตามินที่ละลายไดดีในไขมันจากโครงสรางมีไดหลายไอโซเมอรหรือรูปแบบ α-tocopherol เปนไอโซเมอรที่มีฤทธิ์สูงสุดจากบรรดาไอโซเมอรทั้งแปด วิตามินอี เปนสารตานอนุมูลอิสระที่สำคัญของเมมเบรนซึ่งมีลิพิดเปนองคประกอบ โดยปกปองไมใหเกิดลิพิดเปอรออกซิเดชัน แสดงดังภาพที่ 2.4



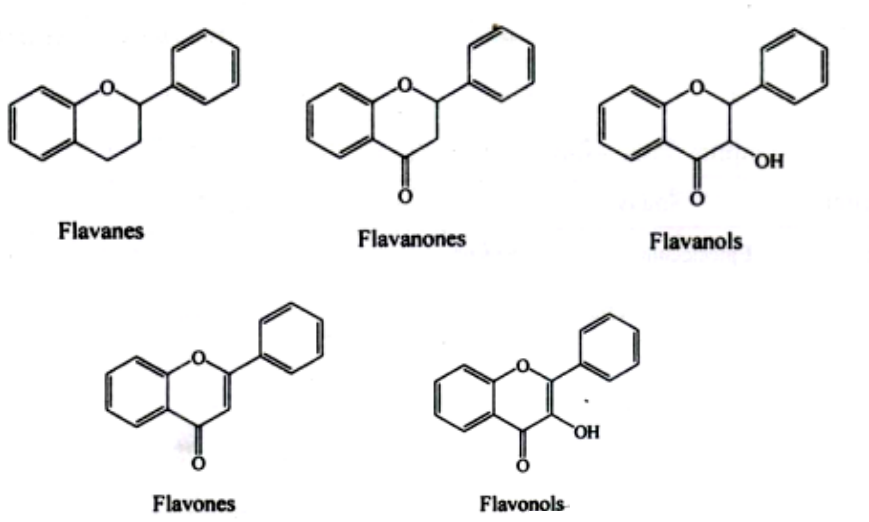
ภาพที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของวิตามินอี (α – tocopherol)
ที่มา: Helmenstine (2014)

3.3 สารประกอบฟนอลิก (phenolic compounds)

สารประกอบฟนอลิก เปนสารที่พบไดในพืชทั่วไป มีสูตรโครงสรางทางเคมีเปนวงแหวนที่มีหมูไฮดรอกซิลอยางนอยหนึ่งหมูหรือมากกวานั้น สามารถละลายน้ำได กลุมใหญที่สุดที่พบจะเปนสารประกอบพวกฟลาโวนอยด (flavonoids) นอกจากนั้นยังมีสารประกอบตางๆ เชน simple monocyclic phenol, phenyl propanoid, phenolic quinine และ polyphenolic ซึ่งไดแก พวก lignin, tannin เปนตน รวมทั้งยังพบวามีสารประกอบที่มีกลุมฟนอล (phenolic unit) รวมอยูในโมเลกุลของโปรตีนอัลคาลอยด (alkaloid) และเทอรพีนอยด (terpenoid) เปนตน สารประกอบฟนอลิกทำหนาที่เปนตัวกำจัดอนุมูลอิสระที่สำคัญคือ อนุมูล peroxyl โครงสรางทั่วไปของสารประกอบฟนอลิก ประกอบดวยโครงสรางที่เปนวงอะโรมาติก และมีหมูแทนที่เปนหมูไฮดรอกซีอยางนอย 1 หมู สารกลุมที่สำคัญ ไดแก ฟลาโวนอยด

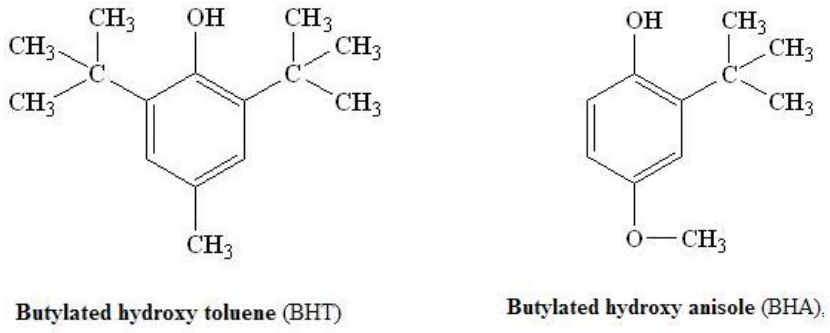
สารกลุมฟลาโวนอยด (flavonoids) แบงเปนกลุมยอยไดหลายกลุม ตามความแตกตางของสูตรโครงสรางโดยเฉพาะที่วงที่มีอะตอมออกซิเจนอยูในรูปแบบตางๆ เชน อีเทอร คีโตน รวมทั้งการมีหมูไฮดรอกซีแทนที่บนวงอะโรมาติกในโมเลกุล ตัวอยางของสารกลุมฟลาโวนอยด ไดแก ฟลาแวน (flanvanes), ฟลาวาโนน (flavanols), ฟลาวานอล (flavanols), ฟลาโวนอล (flavonols),

ฟลาโวน (flavonoes) และแอนโทไซยานิดิน (anthocyanidins) เปนตน โครงสรางของกลุมฟลาโวนอยดบางชนิดดังภาพที่ 2.5



ภาพที่ 2.5 ตัวอย่างของสารประกอบฟีนอลิก กลุ่มฟลาโวนอยด์
ที่มา: โอภา วัชระคุปต (2550)

สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (Synthesis antioxidants) เป็นสารประกอบฟีนอลิกที่สังเคราะห์ขึ้น โดยในโครงสร้างจะมีการเติมหมู่แอลคิล เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติให้เหมาะสมกับการละลายในไขมัน นำไปใช้เพื่อป้องกันการเกิดออกซิเดชันของไขมัน สารสังเคราะห์เหล่านี้ เช่น บิวทิเลเตต ไฮดรอกซี โทลูอีน (Butylated hydroxy toluene, BHT) โดยในปริมาณไม่เกิน 0.02% ยกตัวอย่างเช่น บีเอชเอ (butylated hydroxylanisole, BHA) เปนวัตถุกันหืนที่นิยมใชกันมากชนิดหนึ่ง โดยเฉพาะอยางยิ่งในผลิตภัณฑอาหารที่มีไขมันและน้ำมันเปนสวนประกอบ บีเอชเอเปนสารประกอบที่มีผลึกสีขาวหรือสีเหลืองออน มีกลิ่นฉุน ไมละลายน้ำ แตละลายในแอลกอฮอล สวนใหญจะอยูในรูปของสารผสม 2- และ 3- tert –butyl -4-hyfroxyanisole หรืออาจใชรวมกับแกลเลตหรือบีเอชที เพื่อใหมีประสิทธิภาพดีขึ้น และบีเอชที (butylated hydroxytoluene, BHT) เปนวัตถุกันหืนชนิดหนึ่งที่นิยมใชกัน เชนเดียวกับบีเอชเอ แตมีประสิทธิภาพดีกวาเล็กนอย บีเอชทีเปนสารประกอบที่เปนผลึกสีขาวหรือสีเหลืองออน ไมละลายน้ำ และ propane-1,2-diol แตละลายในแอลกอฮอล และใหกลิ่นฟนอล (phenol) เชนเดียวกัน มักนิยมใหผสมกับวัตถุกันหืนชนิดอื่น เพื่อเสริมใหมีประสิทธิภาพดีขึ้น นิยมใชในอาหารประเภท ไขมันสัตว น้ำมันพืช ผลิตภัณฑนม ผลิตภัณฑขนมอบ ผลิตภัณฑเนื้อ ผลิตภัณฑปลา และน้ำมันหอมระเหย ดังภาพที่ 2.6



ภาพที่ 2.6 โครงสร้างทางเคมีของ Butylated hydroxytoluene (BHT) และ Butylated hydroxylanisole (BHA)

ที่มา: พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์ (2558)

3.4 สารคีเลทโลหะ (metal chelator)

การขจัดโลหะทรานซิชันโดยใชสารคีเลทโลหะ เปนอีกกลไกหนึ่งที่ใชควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระใหอยูในสมดุล ทั้งนี้เพราะโลหะทรานซิชัน เชน ธาตุเหล็ก และทองแดง มีสวนสำคัญในการเกิดอนุมูลอิสระ สารคีเลทโลหะในรางกายสวนใหญเปนโปรตีนทำหนาที่จับโลหะทรานซิชันที่กอใหเกิด OH เขามารวมไวในโครงสรางโดยอยูในรูปสารประกอบเชิงซอน โลหะจึงไมสามารถทำหนาที่เรงปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระได โปรตีนในรางกายที่จับโลหะเกิดเปนสารประกอบเชิงซอน มีดังนี้ คือ ทรานเฟอรริน (transferrin) เฟอรริติน (ferritin) แลกโตเฟอรริน (lactoferrin) เซรูโลพลามิน (ceruloplasmin) ฮีโมเพล็กซิน (hemoplexin) แฮบโทโกลบิน (haptoglobin) และอัลบูมิน นอกจากนี้ สารฟลาโวนอยดยังทำหนาที่เปนสารคีเลทโลหะดวย

4. การวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติมีมากมายหลายชนิด ซึ่งเปนสาเหตุสำคัญที่ทำลายสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ และทำใหเกิดโรคตางๆ ตามมา อนุมูลที่สำคัญ ไดแก Superoxide radical, Hydroxyl radical, สารอัลดีไฮดตางๆ ที่เกิดจากกระบวนการ Lipid peroxidation ฯลฯ จึงมีการคิดวิธีสังเคราะหอนุมูลอิสระ เหลานี้ในหลอดทดลอง และทดสอบความสามารถของสารในการยับยั้งอนุมูลอิสระเหลานี้ จึงมีหลายวิธีที่นิยมใชในการทดสอบดังนี้

4.1. วิธี Scavenging activity of ABTS radical

วิธีนี้เป็นวิธีวัดทางอ้อมโดยใช้สาร 2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) หรือ ABTS มีสูตรโมเลกุล $C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$ มาทำให้เป็นอนุมูลอิสระโดยการถูกออกซิไดซ์ด้วยโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ให้กลายเป็น $ABTS^{+\bullet}$ ซึ่งเป็นอนุมูลที่มีสีฟ้า-เขียว มี λmax ที่ 660, 734 และ 820 nm แต่จะนิยมวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm โดยปรับค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้น $ABTS^{+\bullet}$ ให้เป็น 0.700±0.02 เมื่อเติมสารทดสอบที่มีกิจกรรมต้านออกซิเดชัน จะทำให้ $ABTS^{+\bullet}$ ลดลง ซึ่งทำให้สีจางลงและสามารถนำไปคำนวณเป็น % inhibition ได้ตามสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{734 \text{ control}} - A_{734 \text{ test sample}}) / A_{734 \text{ control}}] \times 100$$

ผลการวิเคราะห์จะคำนวณเป็นค่าที่สัมพันธ์กับสารต้านออกซิเดชันมาตรฐาน Trolox จึงมีชื่อว่า Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) ข้อดีของวิธีนี้ คือ ทำได้ง่าย อนุมูล $ABTS^{+\bullet}$ จะทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับสารต้านออกซิเดชันอนุมูล $ABTS^{+\bullet}$ ละลายได้ทั้งในน้ำและสารทำละลายอินทรีย์ จึงทำให้ศึกษาได้ทั้งในสารที่ละลายในน้ำหรือละลายในไขมัน ส่วนข้อเสียของวิธีนี้ คือ ABTS ไม่เป็นสารตามธรรมชาติที่ก่อให้เกิดอนุมูลในเซลล์หรือร่างกาย

$$\underset{\lambda\text{max 734 nm}}{ABTS^{+\bullet}} \xrightarrow{+\text{antioxidant}} \underset{\text{colourless}}{ABTS}$$

4.2 วิธี Hydroxyl (OH) radical scavenging activity

Hydroxyl radical ($OH^{\bullet}$) เป็นอนุมูลอิสระที่ว่องไว สามารถจู่โจมชีวโมเลกุลที่สำคัญในร่างกาย โดยการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่อย่างต่อเนื่อง สิ่งมีชีวิตสามารถสร้าง $OH^{\bullet}$ radical โดย 2 กลไก ได้แก่

a. ปฏิกิริยาของไอออนโลหะทรานซิชันกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) แม้ว่าเกลือของโลหะทรานซิชันทั่วไปทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 ได้ $OH^{\bullet}$ แต่ในร่างกายนั้น เป็นไปได้ว่าเกิดจากเหล็ก Fe^{2+} ทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 ได้ $OH^{\bullet}$ โดยเรียกปฏิกิริยานี้ว่า Fenton reaction ดังสมการ

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{2+} + OH^{\bullet} + OH^{-} \qquad \text{(Fenton reaction)}$$

b. การแตกตัวของน้ำ เนื่องจากการถูกแสงหรือรังสี ดังสมการ

$$H_2O + h\nu \longrightarrow H_2O^{+\bullet} + e^{-}$$

$$H_2O+^{\bullet} + H_2O \longrightarrow OH^{\bullet} + H_3O^{+}$$

ในการศึกษาความสามารถในการยับยั้ง $OH^{\cdot}$ radical ของสารตัวอย่าง ต้องทำการสังเคราะห์ Hydroxyl radical ($OH^{\cdot}$) จากน้ำตาล deoxyribose โดยปฏิกิริยา Fenton reaction model system เมื่อเติมสาร Thiobarbituric acid (TBA) และ Trichloroacetic acid จะเกิดเป็นสีชมพู เมื่อเติมสารที่ต้องการทดสอบที่มีความสามารถในการยับยั้ง $OH^{\cdot}$ radical ลงไป จะทำให้สีชมพูของสารละลายจางลง โดยสามารถตรวจสอบได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 nm (Mathew and Abraham, 2006) จากนั้นนำไปคำนวณเป็น % inhibition ได้ตามสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{532 \text{ control}} - A_{532 \text{ test sample}}) / A_{532 \text{ control}}] \times 100$$

4.3 วิธี Superoxide radical scavenging

Superoxide anion radical ($O_2^{-\cdot}$) เป็นอนุมูลเริ่มแรกที่เกิดขึ้นในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตและเป็นตัวเริ่มต้นที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระตัวอื่นๆอีกมากมายจากการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ นอกจากจะทำให้อนุมูลอิสระมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นแล้ว ฤทธิ์และความแรงของอนุมูลอิสระที่เกิดจากปฏิกิริยาลูกโซ่เป็นอันตรายสูงขึ้นด้วย แต่ตัวของ $O_2^{-\cdot}$ จะมีความว่องไวน้อยกว่า $OH^{\bullet}$ ซึ่งการเกิด $O_2^{-\cdot}$ เป็นดังสมการ

$$O_2 + e^{-} \longrightarrow O_2^{-\cdot}$$
$$O_2^{-\cdot} + O_2^{-\cdot} + 2H^{+} \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

เมื่อ $O_2^{-\cdot}$ ทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 จะทำให้เกิด $OH^{\cdot}$ เรียกปฏิกิริยานี้ว่า Haber-Weiss reaction ดังสมการ

$$O_2^{-\cdot} + H_2O_2 + H^{+} \longrightarrow OH^{\cdot} + O_2 + H_2O$$

การศึกษาสมบัติการเป็นสารจับ $O_2^{-\cdot}$ ของสารตัวอย่าง ซึ่ง $O_2^{-\cdot}$ จะผลิตมาจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารในระบบ Phenazine methosulphate (PMS)-Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) อนุมูล $O_2^{-\cdot}$ ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับสาร Nitroblue tetrazolium (NBT) ซึ่งมีสีเหลือง ปฏิกิริยาระหว่าง $O_2^{-\cdot}$ กับสาร NBT ให้ผลิตภัณฑ์เป็นสาร diformazan (DF) ที่มีสีน้ำเงิน และ สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ 560 nm จากนั้นนำไปคำนวณเป็น % inhibition ได้ตามสมการ

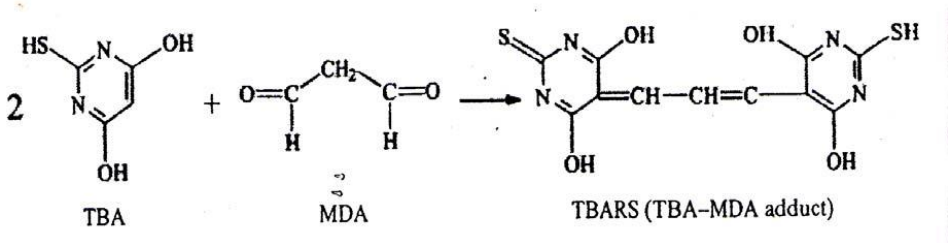
$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{560 \text{ control}} - A_{560 \text{ test sample}}) / A_{560 \text{ control}}] \times 100$$

4.4 วิธี Lipid peroxidation in liver homogenates

เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันแบบลูกโซ่ของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว อนุมูลอิสระเพียง 1 อนุมูลสามารถทำให้เกิดลิปิดเปอร์ออกไซด์ เป็นจำนวนหลายร้อยโมเลกุลก่อนที่จะสิ้นสุดปฏิกิริยา เนื่องจากปฏิกิริยา Lipid peroxidation สามารถเกิดได้ง่ายกับเยื่อหุ้มเซลล์ ที่ประกอบด้วยลิปิด 2 ชั้นการเกิดลิปิดออกซิเดชันกับลิปิดในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ มีคุณสมบัติที่เปลี่ยนไป ยังส่งผลกระทบต่อเอนไซม์และรีเซพเตอร์ที่ฝังตัวอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เอนไซม์และรีเซพเตอร์มีการทำงานที่เสียไปเป็นสาเหตุในเกิดโรคต่างๆได้อีกด้วย ผลผลิตที่เกิดขึ้นมาจาก Lipid peroxidation ได้แก่ สารไฮโดรคาร์บอน เช่น อีเทน อีทีน และเพนเทน รวมถึง สารคีโตน และสารอัลดีไฮด์ เป็นต้น ซึ่งสารอัลดีไฮด์ที่มีความสำคัญ คือ มาลอนไดอัลดีไฮด์ (Malondialdehyde: MDA)

Lipid peroxidation เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่ ปฏิกิริยาเริ่มต้นของการเกิดโซ่ ปฏิกิริยาการทวีเพิ่มขึ้น และการสิ้นสุดปฏิกิริยา ปฏิกิริยาลูกโซ่เริ่มต้นด้วยการมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้น และอนุมูลอิสระนี้เข้าทำปฏิกิริยากับลิปิดและทำให้เกิดอนุมูลลิปิด ($L^{\bullet}$ หรือ $R^{\bullet}$)

วิธีนี้เป็นการวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้ง Lipid peroxidation ของสารสกัดทดสอบ โดยใช้ตับหนูมาทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน แล้วทำให้เกิดผลผลิตจากปฏิกิริยา Lipid peroxidation ได้เป็นสารมาลอนไดอัลดีไฮด์ (Malondialdehyde: MDA) จากนั้นเติมกรดไทโอบาร์บิทูริกในสภาวะกรดสาร MDA จะทำปฏิกิริยากับกรดไทโอบาร์บิทูริก ได้เป็นสารมีสีเรียกว่า TBARS (thiobarbituric acidreactive substances) ดังภาพที่ 2.7 เมื่อเติมสารสกัดทดสอบที่มีความสามารถในการยับยั้ง Lipidperoxidation ลงไป จะทำให้สารสีจางลง จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 nm (โอภา วัชระคุปต, 2550)



ภาพที่ 2.7 แสดงปฏิกิริยาการเกิด TBARS
ที่มา: โอภา วัชระคุปต์ (2550)

ข้อดีของวิธีการนี้ คือ ทำการศึกษาง่าย สะดวก ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาสูง แต่มีข้อเสีย คือต้องใช้สิ่งมีชีวิตในการทำการทดลอง ทำให้ลดความนิยมลง เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงแล้วนำไปคำนวณหา % inhibition ตามสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{532 \text{ control}} - A_{532 \text{ test sample}}) / A_{532 \text{ control}}] \times 100$$

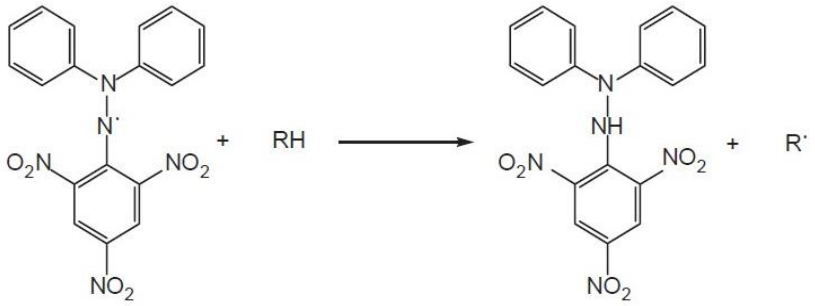
4.5 วิธี Reducing power

ความสามารถของการเป็นตัวให้อิเล็กตรอนในปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันของสารที่ต้องการทดสอบ สามารถใช้ในการหาความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้ วิธีนี้เป็นการศึกษาความสามารถในการรีดิวซ์ หรือให้อิเล็กตรอนของสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบแก่สารอนุมูลอิสระที่สังเคราะห์ขึ้นภายในระบบ โดยสารที่ต้องการทดสอบจะเป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระแล้วทำให้เปลี่ยนเป็นสารที่คงตัว อีกทั้งยังสามารถหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระอีกด้วย โดยอาศัยจากการวัดปฏิกิริยา reduction ของ $Fe^{3+}(CN^{-})_6$ ไปเป็น $Fe^{2+}(CN^{-})_6$ ซึ่งจะทำให้มีสีน้ำเงินที่เข้มขึ้น สามารถตรวจสอบความสามารถในการรรีดิวซ์ได้ จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 nm ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นแสดงถึง ความสามารถในการรีดิวซ์ที่มากขึ้น

4.6 วิธี DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical

อนุมูล DPPH• เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัว มีสีม่วง อยู่ในรูปอนุมูลอยู่แล้ว โดยไม่ต้องทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดอนุมูลเหมือนกับกรณีอนุมูล ABTS+• การวิเคราะห์เป็นการวัดความสามารถของสาร ทดสอบในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยวิธีให้ไฮโดรเจนอะตอม การวัดทำโดยใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) วัดการลดลงของสี เมื่อเติมสารต้านออกซิเดชันลงไป โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515-520 นาโนเมตร

DPPH radical ใช้ในการทดสอบความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระของสารตัวอย่าง (scavenging activity) สารละลายของ DPPH• มีสีม่วงในเอทานอล และเมื่อได้รับ H จะเปลี่ยนเป็น สารละลายสีเหลือง ดังภาพที่ 2.8



DPPH• สีม่วง | สารต้านอนุมูลอิสระ | DPPH-H สีเหลือง

ภาพที่ 2.8 แสดงปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารต้านอนุมูลอิสระ
ที่มา : Anamika and Kunal (2012)

ค่าที่วัดได้จะแสดงความสามารถในการสารต้านออกซิเดชันออกมาในค่า % inhibition ตามสมการดังนี้

$$\% \text{ inhibition} = [(A_{517 \text{ control}} - A_{517 \text{ test sample}})/ A_{517 \text{ control}})] \times 100$$

สำหรับในการวิจัยในครั้งนี้ ใช้วิธี DPPH assay ในการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบขลู่ ข้อดีของวิธีนี้คือ ทำได้ง่าย นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลของสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ ข้อเสียของวิธีนี้คือ อนุมูล $DPPH^{\bullet}$ มีความคงตัวไม่ไวต่อการทำปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลที่เกิดใน เซลล์หรือร่างกาย ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่สามารถแยกแยะจัดอันดับอนุมูลที่มีความไวสูงได้

5. วิธีการวัดปริมาณสารประกอบฟนอลิก

วิธีการวัดปริมาณสารประกอบฟนอลิกโดย spectrophotometric มี 3 วิธี (กัมปนาท สุขนิตย, 2548)

5.1 Folin-denis assay วิธีนี้นิยมใชวัดปริมาณของสารประกอบฟนอลิกในพืช และเครื่องดื่มผสมแอลกอฮอลโดยวัดคาดูดกลืนแสงของสารประกอบฟนอลิก ซึ่งจับกันเปนคอมเพลกซสีน้ำเงินใน alkaline solution มีวิธีการคือ นำสารสกัดตัวอยางผสมกับ Folin-Denis reagent จากนั้นเติมดวยโซเดียมคารบอเนต (Na_2CO_3) แลววัดคาดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร

5.2 Folin-ciocalteu assay ใชวัดปริมาณสารประกอบฟนอลิกในอาหารซึ่งจะวัดปริมาณสารประกอบฟนอลิกโดยรวมไมเฉพาะเจาะจงและวัดหมู่ funcion ของสารประกอบฟีนอลิกทุกหมู่ แตมีขอเสียคือ ซับสเตรทอาจถูกยอยไดดวย ascorbic acid ในการวัดปริมาณ

5.3 **Prussian blue assay** นิยมวัดปริมาณสารประกอบฟนอลิกในขาวฟาง โดยโพลีฟนอลิกจะเปลี่ยน ferric ไปเปน ferrous ion และสรางคอมเพลกซ ferricyanide-ferrous ion complex ทั้งนี้ขึ้นอยูกับความสามารถในการใหไฮโดรเจน หรืออิเลคตรอนของสารประกอบฟนอลิก มีวิธีการคือ นำสารสกัดตัวอยางผสมกับ $FeCl_3$ จากนั้นเติมดวย potassium ferricyanide แลววัดคาดูดกลืนแสงที่ 720 นาโนเมตร

กรอบแนวคิดในการวิจัย