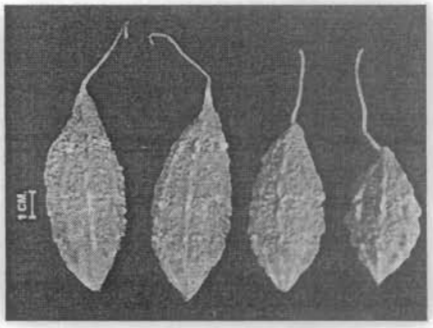
บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มะระ (*Momordica charantia* L)

มะระเป็นพืชล้มลุกอยู่ในวงศ์ Cucurbitaceae มีถิ่นกำเนิดในทวีปแอฟริกา (45 สายพันธุ์) และทวีปเอเชีย (4-7 สายพันธุ์) (Robinson & Decker-Walters, 1997) โดยในแต่ละประเทศมีชื่อเรียกมะระที่แตกต่างกัน เช่น Bitter Gourd, Bitter Cucumber และ Balsam Pear (ประเทศอังกฤษ) Paroka (ประเทศฝรั่งเศส) Pari และ Pare (ประเทศอินโดนีเซีย) และ Mreah (ประเทศกัมพูชา) เป็นต้น ในประเทศไทยนิยมปลูกมะระ 2 สายพันธุ์ คือ มะระจีน (Chinese Bitter Cucumber หรือ Bitter Melon) และมะระขี้นก (Thai Bitter Cucumber หรือ Bitter Ground) ลักษณะทั่วไปของต้นมะระ คือ เป็นพืชเถาเลื้อย อายุ 1 ปี มีมือเกาะยึดพยุงลำต้นให้พันขึ้นค้าง ใบเดี่ยวรูปฝ่ามือ ดอกสีเหลือง มีกลีบดอก 5 กลีบ ดอกเป็นดอกไม่สมบูรณ์เพศ ดอกตัวผู้ และตัวเมียอยู่คนละต้น (ธวัช ลวะเปารยะ, 2543; วีณา เชิดบุญชาติ และ วชิรพงศ์ หวลบุตตา, 2543; นิดดา หงษ์วิวัฒน์, ทวีทอง หงษ์วิวัฒน์ และสุภาพรรณ เผ่ามชัยภูมิ, 2548; สุธาทิพ ภมรประวัติ, 2550)

ผลมะระขี้นก มีลักษณะปรากฏเป็นสีเขียวเข้ม (Exocarp+Mesocarp) รูปร่างคล้ายกระสวย ผิวขรุขระ ผลความยาว 6-7.5 เซนติเมตร และมีรสชาติขม (ภาพที่ 2-1) (ปัทมา สุนทรศารทูล, 2541) มะระขี้นกมีผลอ่อนสีขาว ผลแก่สีเขียว และผลสุกสีแดง หรือ สีแดงอมส้ม ลักษณะปรากฏภายในผลอ่อนมีส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ด (Endocarp) และเมล็ดรูปไข่ มีสีขาวนวล เปลือกของเมล็ดมีลักษณะอ่อนสามารถตัดได้ง่าย ภายในเมล็ดมีน้ำใสๆลักษณะคล้ายวุ้น สำหรับผลสุกมีส่วนเปลือกสีแดงหุ้มภายนอกเมล็ด ส่วนของเมล็ดมีเปลือกแข็งสีน้ำตาลตัดได้ยาก



(ก)

(ข)

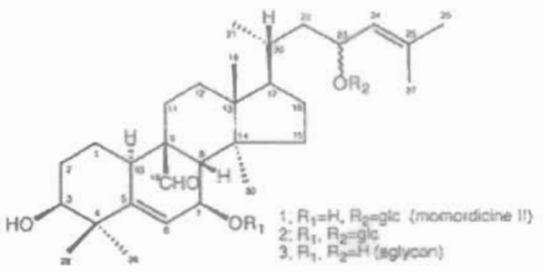
ภาพที่ 2-1 ลักษณะปรากฏของผลมะระขี้นก (ก) และผลมะระจีน (ข)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

มะระเป็นผักพื้นบ้านที่มีคุณสมบัติเป็นพืชสมุนไพร (Medicinal Plant) เป็นพืชที่ปลูกง่าย ให้ผลผลิตตลอดปี หรือเจริญได้เองตามธรรมชาติ และสามารถนำมาบริโภคได้ทั้ง ยอดอ่อน ผลอ่อน และใบ (ธวัช ลวะเปารยะ, 2543) นิยมนำมะระมาเป็นผักลวกจิ้มน้ำพริก และใช้เป็นส่วนผสมในอาหารหลายประเภท เช่น แกงลาว (ยอดอ่อน และใบ) และแกงจืด (ผลอ่อน) เป็นต้น เพราะมะระเป็นผักที่ให้รสชาติขมที่เป็นที่พึงพอใจ นอกจากนี้ ยอดอ่อน และผลมะระมีคุณค่าทางโภชนาการที่ รวมทั้งมีการนำผลมะระมาแปรรูปเป็นเครื่องดื่มสมุนไพร เนื่องจากมีรายงานการศึกษาที่เสนอว่า ผลมะระมีสารโพลีเปปไตด์พี (Polypeptide-P) และชาร์แรนติน (Charantine) ซึ่งมีสมบัติในการลดระดับน้ำตาลในเลือด เหมาะสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวาน (ภัทราพร ตั้งสุขฤทัย, 2547) และได้มีรายงานการศึกษาซึ่งแสดงให้เห็นว่า น้ำมะระมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถกำจัดอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์แอนอิออน ($O_2^{-\bullet}$) และอนุมูลไฮดรอกซิล ($^{\bullet}OH$) (Scartezzini & Speroni, 2000) แต่ในส่วนของผลมะระสุกพบว่ามีซาโปนิน (Saponin) เป็นส่วนประกอบ ดังนั้นในการนำผลมะระสุกมาบริโภค เพราะซาโปนิน ทำให้คลื่นไส้ อาเจียน สำหรับเมล็ดมะระเป็นที่สนใจของนักวิทยาศาสตร์มาก เพราะ มีโปรตีนชนิด Momordica anti-HIV protein, 30 KDa หรือ MAP 30 (30 KDa) ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ต้านการติดเชื้อเอชไอวี (HIV-1 Infection) (ปัทมา สุนทรศารทูล, 2541)

ประโยชน์ และสรรพคุณทางยาของมะระ (อรุณี ฉัตร์ธนะกุล, 2535; ปัทมา สุนทรศารทูล 2541; วีณา เชิดบุญชาติ และ วชิรพงศ์ หวลบุตตา, 2543; Scartezzini & Speroni, 2000)

1. ใบ นำมาต้มน้ำดื่ม ใช้รักษาอาการอักเสบ ฟกช้ำ โรคหวัด ดับพิษฝี โรคปากเปื่อย โรคตับ และม้ามพิการ เป็นต้น ซึ่งสารสำคัญที่พบในใบมะระ ได้แก่ สารกลุ่มไตรเทอพีน (Triterpenes) เช่น มอมอร์ดิซิน (Momordicine; I, II, III) (ภาพที่ 2-2) คูเคอร์บิแทน-ไตรเทอพีน (Cucurbitan- Triterpenes; III, IV, V)



ภาพที่ 2-2 โครงสร้างทางเคมีของ Momordicine II ที่ได้จากใบของมะระ (Yasui, Kato, & Yazawa, 1998)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. ผลอ่อน นำมาแปรรูปเป็นอาหารโดยการต้ม ลวก หรือตากแห้ง ส่วนของเนื้อมะระตากแห้งสามารถแปรรูปเป็นชามะระ หรือปั่นเนื้อมะระเพื่อนำส่วนของน้ำที่ได้มาดื่มเพื่อให้ง่ายต่อการบริโภค ใช้รักษาอาการตับม้ามพิการ บำรุงน้ำดี รักษาลมเข้าข้อ และรักษาอาการปวดบวมที่เข่า ลดน้ำตาลในเลือด เนื่องจากสารสำคัญที่พบในผลมะระ ได้แก่ สารโพลีเปปไตด์พี และสารชาร์แรนติน สามารถกระตุ้นการหลั่งของสารอินซูลิน รวมทั้งด้านเชื้อไวรัส และต้านมะเร็ง เป็นต้น

3. ราก นำมาต้มน้ำดื่ม ใช้ฝาดสมานในโรคริดสีดวงทวาร รักษาโรคบิด ปวดฟัน แผลอักเสบ เป็นต้น ซึ่งสารสำคัญที่พบในรากของมะระ ได้แก่ มอมอร์ดิซิน และซาโปนิน เป็นต้น

4. เมล็ด แปรรูปเป็นเมล็ดแห้ง เพื่อนำมาต้มน้ำดื่มมีรสชาติขม ใช้ขับพยาธิตัวกลม ซึ่งสารสำคัญที่พบในเมล็ดมะระ ได้แก่ โปรตีนหลายชนิด เช่น มอมอร์ดิน (Momordin; 24 KDa) แอลฟา และเบต้า-มอมอร์ชาริน (α,β -Momorcharin; 32, 29 KDa) (Leung, Yeung, & Leung, 1987) มอมอร์ดิโคไซด์ เอ และบี (momordicosides A และB) (Zhu, Zhong, Luo, & Xiao, 1990) พีอินซูลิน (p-Insulin; 11 KDa) และ MAP 30 (30 KDa) (กัญจน์ ศิลป์ประสิทธิ์, 2547; Lee-Huang, Huang, Chen, Huang, Bourinbaiar, Huang & Kung, 1995; Bourinbaiar & Lee-Huang, 1995)

แคลลัส (callus)

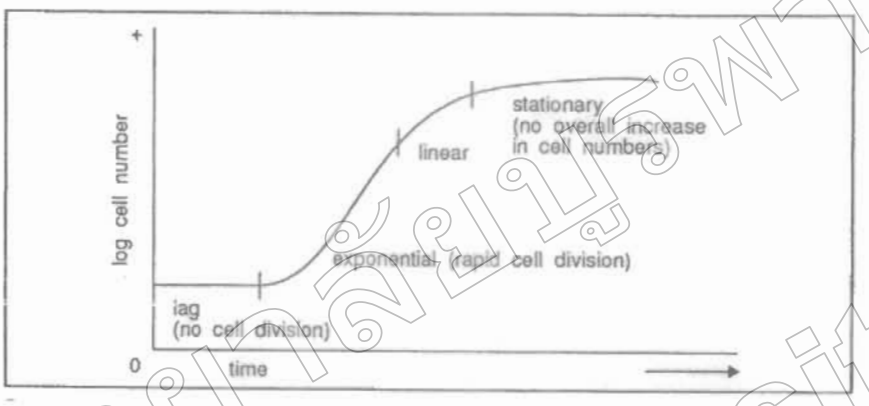
แคลลัส คือเนื้อเยื่อที่ได้จากการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วของเซลล์จากชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยง ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะหรือเนื้อเยื่อเฉพาะอย่าง แต่จะประกอบไปด้วยเซลล์พาเรงคิมา (parenchyma) เพียงอย่างเดียว มักมีการแบ่งตัวอย่างไม่หยุดยั้ง และมีรูปร่างไม่แน่นอน ภายในเซลล์มีแวคิวโอล(vacuole) สูง มีรงควัตถุ (pigment) น้อย มีส่วนน้อยเท่านั้นที่มีสีเขียว จากคลอโรฟิลล์ สีเหลืองจากแคโรทีนอยด์ และฟลาโวนอยด์ หรือมีสีม่วงของแอนโทไซยานิน ชิ้นส่วนพืชหลายอย่างที่สามารถนำมาชักนำให้เกิดแคลลัสได้ ได้แก่ ใบ ลำต้น ช่อดอก ผล เมล็ด เกสรเพศผู้ รากสะสมอาหารและเพอริไซเคิลของราก รวมทั้งชิ้นส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้าที่งอกในสภาพปลอดเชื้อ ได้แก่ ใบเลี้ยง ส่วนใต้ใบเลี้ยง เอนโดสเปิร์ม รวมทั้งโคลีออพไทล์

การเจริญของแคลลัสมีความคล้ายคลึงกับการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวโดยแบ่ง เป็น 5 ระยะ คือ

1. ระยะที่เซลล์เตรียมตัวเพื่อการแบ่งเซลล์ เรียกว่าระยะ lag phase
2. ระยะที่เซลล์มีการแบ่งตัวในอัตราสูงสุด เรียกว่าระยะ exponential growth
3. ระยะที่เซลล์ลดอัตราการแบ่งตัวลงตามลำดับ แต่ในขณะเดียวกันเซลล์จะมีการขยายตัวมากขึ้น เรียกว่าระยะ linear growth

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4. ระยะที่เซลล์มีการลดอัตราแบ่งตัวลงจนอยู่ในอัตราต่ำ พร้อมกับลดการขยายตัวลงด้วย เรียกว่าระยะ decelerating growth
5. ระยะที่เซลล์หยุดการแบ่งตัวแล้วและไม่มีการเจริญอีกต่อไป เซลล์มีจำนวนคงที่ เรียกว่าระยะ stationary phase



ภาพที่ 2-3 ลักษณะการเจริญเติบโตของแคลลัส (Hunter, 1993)

สารควบคุมการเจริญเติบโต (plant growth regulators; PGRs)

นอกจากความสำคัญของอาหารเพาะเลี้ยงแล้ว การตอบสนองของชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยงจะขึ้นอยู่กับสัดส่วนของออกซินและไซโตไคนิน โดยอาจใช้ออกซินเพียงอย่างเดียว หรือใช้ร่วมกับไซโตไคนิน ในสัดส่วนที่สมดุลย์ ระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นสิ่งสำคัญต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส การตอบสนองของเนื้อเยื่อจะขึ้นอยู่กับทั้ง endogenous hormone ภายในพืช และ exogenous PGRs ที่เติมลงไป ความเข้มข้นของ PGRs ที่มีผลต่อการเกิดแคลลัสจะผันแปรตามชนิดและชิ้นส่วนของพืช

ตัวอย่างการทดลองที่แสดงให้เห็นว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตที่ระดับความเข้มข้มต่างกันมีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสต่างกัน ได้แก่

การทดลองนำใบแตงกวา(*Cucumis sativas* L.) มาเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-D; 2,4-dicholoro- phenoxyacetic acid ความเข้มข้น 1.4, 4.5, 14 และ 45 μM ร่วมกับ BAP; benzylaminopurine ความเข้มข้น 4.4 μM ผลปรากฏว่า ในอาหารที่เติม 2,4-D 1.4 μM ทำให้ไม่มีการสร้าง embryogenic callus เลยขณะที่ความเข้มข้น 4.5 μM มีการสร้าง embryogenic callus น้อยกว่า 10 % และที่ความเข้มข้น 14 μM มีการสร้าง embryogenic callus ถึง 40% ดังนั้นระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ที่เหมาะสมคือ 14 μM (Kuijpers *et al.*,1996)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การทดลองนำชิ้นส่วนใบของต้นลูกผสม *Miscanthus* x *ogiformis* มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่าเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดแคลลัสลดลงเมื่อความเข้มข้นของ BA เพิ่มขึ้น โดยในอาหารที่ไม่เติม BA มีเปอร์เซ็นต์การสร้าง แคลลัสถึง 60.8% ขณะที่ในอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 3.6 μM มีการสร้าง แคลลัสเพียง 29.8 % เท่านั้น (Petersen, 1997)

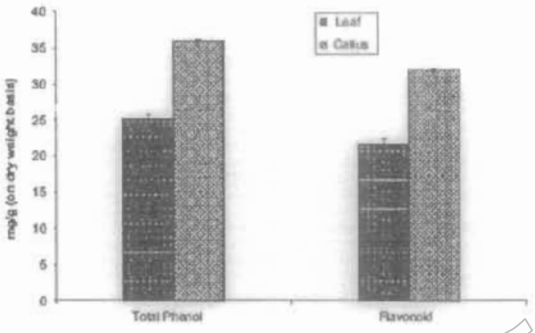
แหล่งของคาร์บอน (carbon sources) แหล่งคาร์บอนที่สำคัญ คือ น้ำตาล ความต้องการน้ำตาลของพืชแต่ละชนิด และในแต่ละชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงมีความแตกต่างกัน เช่น การชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบของต้นลูกผสม *Miscanthus* x *ogiformis* โดยเปรียบเทียบผลของน้ำตาล moltose, fructose, sorbital หรือ mannital และ glucose ปรากฏว่า glucose ให้ผลดีที่สุด ขณะที่อาหารที่เติม mannital หรือ sorbital สามารถชักนำให้เกิด แคลลัสได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น และไม่พบ embryogenic callus เลย และเมื่อใช้ชิ้นส่วนช่อดอกอ่อน และปลายยอดของพืชชนิดเดียวกันนี้ ปรากฏว่าแหล่งของคาร์บอนไม่มีอิทธิพลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสเลย (Peterson *et al.*,1999)

อุณหภูมิ (temperature) อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงแคลลัสประมาณ 25 องศาเซลเซียส ถ้าทำการชักนำแคลลัสในอุณหภูมิต่ำหรือสูงเกินไปจะไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ หรือได้ในปริมาณที่น้อย เช่น การทดลองนำช่อดอกของต้นข้าวสาลีมาชักนำให้เกิดแคลลัสที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4, 8 และ 12 วัน หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ปรากฏว่า เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ แต่แคลลัสจะเริ่มเกิดขึ้นหลังจากย้ายไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และอัตราการเกิดแคลลัสจะลดลงเมื่อเลี้ยงที่ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานขึ้น โดยเฉพาะที่เลี้ยงที่ 5 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 วัน อัตราการชักนำให้เกิดแคลลัสจากช่อดอกลดลงประมาณ 31% เมื่อเทียบจากชุดควบคุมที่เลี้ยงที่ 25 องศาเซลเซียส ตลอดเวลา (Hou *et al.*, 1997)

การผลิตสารทุติยภูมิจากการเพาะเลี้ยงแคลลัส

ในปัจจุบันมนุษย์สามารถผลิตสารทุติยภูมิได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งสามารถผลิตได้ในปริมาณที่มากกว่าธรรมชาติได้แล้ว Tadhani *et al.* (2006) ทำการทดลองเพาะเลี้ยงแคลลัสหญ้าหวาน (*Stevia rebaudiana*) ในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2.0 mg/l และ BA 0.3 mg/l เพื่อสกัดหาสารประกอบฟีโนลิกและฟลาโวนอยด์และทำการเปรียบเทียบกับปริมาณสารสกัดที่ได้จากใบหญ้าหวานในสภาพธรรมชาติ พบว่าแคลลัสสามารถผลิตสารประกอบฟีโนลิกและฟลาโวนอยด์สูงกว่าใบในสภาพธรรมชาติได้ (ภาพที่ 2 -4)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



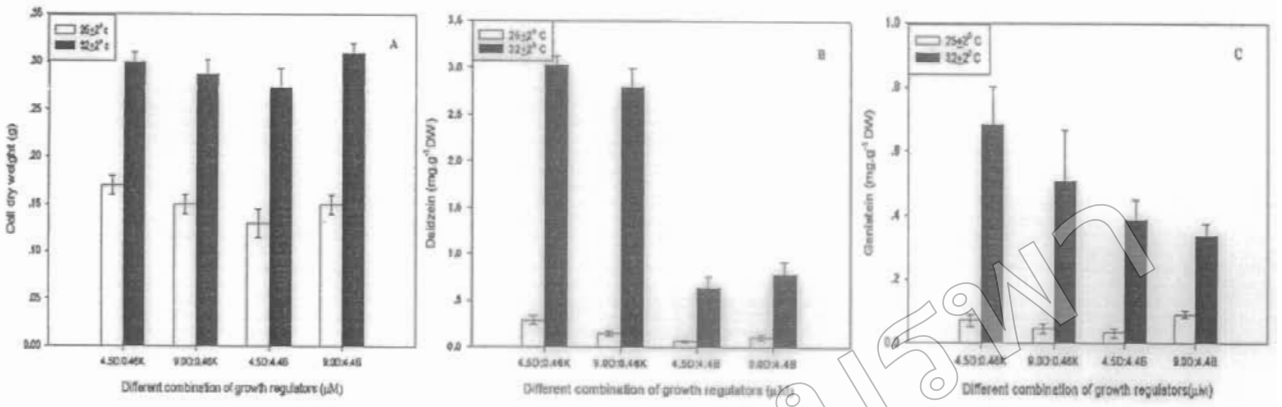
ภาพที่ 2-4 ปริมาณสารประกอบฟีโนลิกและฟลาโวนอยด์ของใบและแคลลัสของหญ้าหวาน (*Sativia reaudiana*) (Tadhani *et al.*, 2007)

อย่างไรก็ตามมีปัจจัยหลายประการที่มีผลต่อการผลิตสารทุติยภูมิจากการเพาะเลี้ยงแคลลัส ดังนี้

1. สารควบคุมการเจริญเติบโต (plant growth regulators) และคุณภูมิ

สารควบคุมการเจริญเติบโตมีความสำคัญเป็นอย่างมากในการแบ่งเซลล์และการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ (Angelova *et al.*, 2001) ไคเนตินในระดับความเข้มข้นเหมาะสำหรับการเจริญของแคลลัสยาสูบสามารถส่งผลให้เพิ่มการสังเคราะห์กรดคลอโรเจนิก (chlorogenic acid) ได้ (Angelova *et al.*, 2001) Thaonka และ Panichajakul (2006) ได้ศึกษาผลของการใช้ออกซิน (2,4-D) ร่วมกับไซโตไคนิน (kinetin, BAP) จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสของกวาวเครือขาว (*Pueraria candollei* var. *mixifica*) ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส และ 32±2 องศาเซลเซียส พบว่าอาหารที่ประกอบด้วย 2,4-D 4.5 µM และ kinetin 0.46 µM ส่งผลให้แคลลัสเจริญได้ดีและมีการผลิตสารไอโซฟลาโวน (isoflavone) สูงในอุณหภูมิทั้ง 2 ระดับ (ภาพที่ 2- 6) ส่วนในอาหารที่ประกอบด้วย 2,4-D และ BAP สามารถกระตุ้นการเจริญของแคลลัสได้ดีแต่มีการผลิตสารไอโซฟลาโวนต่ำ และที่อุณหภูมิ 32±2 องศาเซลเซียส มีการเจริญของแคลลัสและผลิตสาร daidzein และ genistein สูงกว่าที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 2- 6)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 2-5 การเจริญและการผลิตไอโซฟลาโวนจากแคลลัสของ *P. candollei* var. *mirifica* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมออกซิน (2,4-D) ร่วมกับไซโตไคนิน (kinetin, BAP) ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส และ 32±2องศาเซลเซียส (A) อัตราการเจริญของแคลลัส (B) ปริมาณสาร daidzein ที่ผลิตได้และ (C) ปริมาณสาร genistein ที่ผลิตได้ (D = 2,4-D, K = Kinetin, B = BAP) (Thaonka & Panichajakul, 2006)

2. ชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยง Matkowski. (2004) ศึกษาการผลิตสาร isoflavonoid จากการเพาะเลี้ยงแคลลัส พบว่าแคลลัสที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *P. lobata* สามารถผลิตสาร isoflavonoid กลุ่ม genistein, daidzein, glycosides, daidzin, puerarin และ 3′-methoxypuerarin ในปริมาณที่ต่างกัน เมื่อใช้ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงต่างกันโดย isoflavonoid มีปริมาณสูงใน แคลลัสที่ชักนำได้จาก ราก ใบ และลำต้นตามลำดับ

ตารางที่ 2 – 1 ปริมาณเฉลี่ย (mg / 100 g fw) ของสารไอโซฟลาโวนอยด์ (isoflavonoid) ที่สกัดได้จากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงได้จากชิ้นส่วนต่างๆ (Matkowski., 2004)

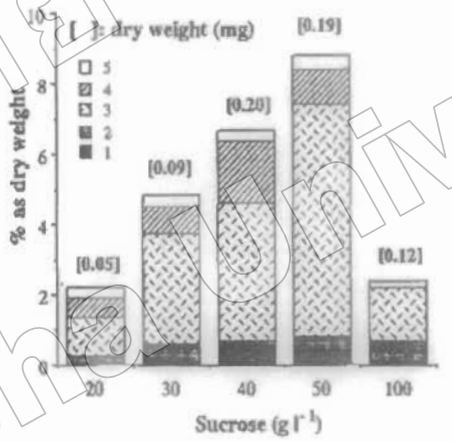
compound callus type	daidzin	genistein	3′-methoxy-puerarin	puerarin	total isoflavonoids
root callus	8.67±0.88	3.42±0.57	25.61±0.18	18.35±1.15	57.16±3.03
leaf callus	6.33±0.44	0.43±0.28	11.76±0.21	0.7 ±0.15	19.36±3.99
stem callus	2.09±0.5	1.03±0.39	4.81±0.17	1.85±0.27	9.93±0.98
stem callus (mature plant)	n/d	0.49±0.09	0.8 ±0.11	n/d	n/d

ND – not detected

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

และจากรายงานการทดลองของ Fedoreye *et al.* (2000) ซึ่งเพาะเลี้ยงแคลลัสของ *Maackia amurensis* และพบว่าปริมาณการผลิตสาร isoflavonoid มีในปริมาณสูงต่ำต่างกัน โดยให้ผลดีสุดและรองลงมาตามลำดับเมื่อชักนำแคลลัสจาก ก้านใบ ช่อดอก เนื้อเยื่อเจริญปลายรากและยอดตามลำดับ

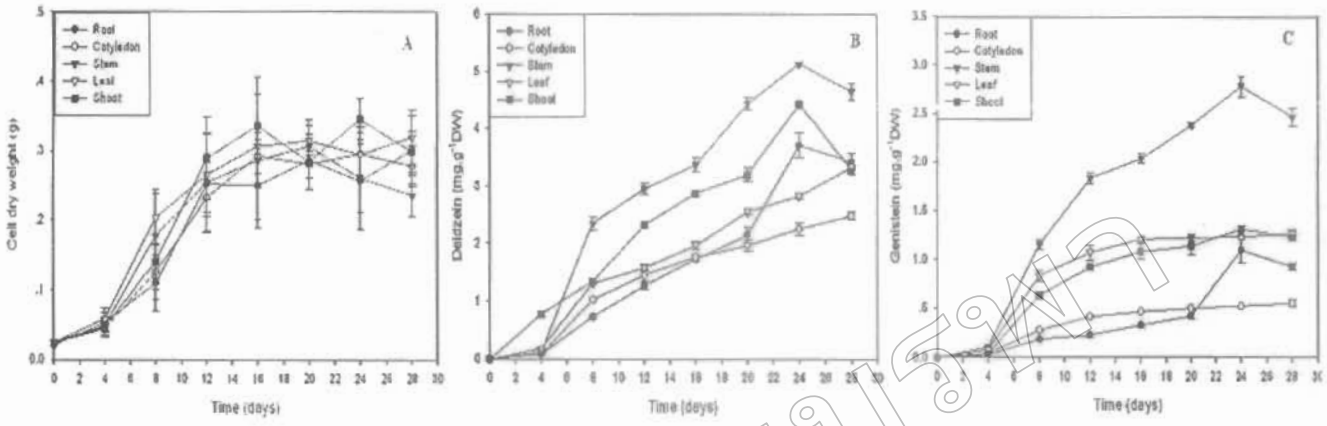
2. แหล่งของคาร์บอน ได้แก่น้ำตาลซูโครส ความเข้มข้นของซูโคสในอาหารมีผลต่อการผลิตสารทุติยภูมิ ดังเช่นจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสของ *Quercus acutissima* บนอาหารที่มีความเข้มข้นของซูโครสที่ระดับต่างๆ กัน (20 – 100 g/l) พบว่าอาหารที่ประกอบด้วยซูโครส 40 และ 50 mg/l ทำให้แคลลัสสามารถเจริญได้ดีและสามารถผลิตสารแทนนิน ได้แก่ 1 (+)-catechin, 2 ß-glucogallin, 3 penta-O-galloyl-fl-D-glucopyranoside, 4 pedunculagin และ 5 castalagin) ได้ปริมาณสูง (ภาพที่2-6) (Tanaka *et al.*, 1995)



ภาพที่ 2-6 การเจริญเติบโต (น้ำหนักแห้ง (mg)) และปริมาณสารแทนนินในการเพาะเลี้ยงแคลลัสของ *Q. acutissima* บนอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของซูโครสต่างกัน (Tanaka *et al.* ,1995)

3. ชิ้นส่วนต่างๆ ของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง (Thaonka & Panichajakul, 2006) พบว่า การเพาะเลี้ยงแคลลัสของกวาวเครือขาว (*Pueraria candollei* var. *mirifica)* จากชิ้นส่วนต่างๆ ของพืช ได้แก่ ราก ใบเลี้ยง ลำต้น ใบ และยอด มีผลต่อการผลิตสารทุติยภูมิ โดยแคลลัสที่กำเนิดมาจากลำต้นมีปริมาณ diadzein และ genistein สูงที่สุด (ภาพที่ 2- 7) และเมื่อแคลลัสมีการเจริญลดลงการผลิตสาร diadzein และ genistein ก็ลดลงด้วย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



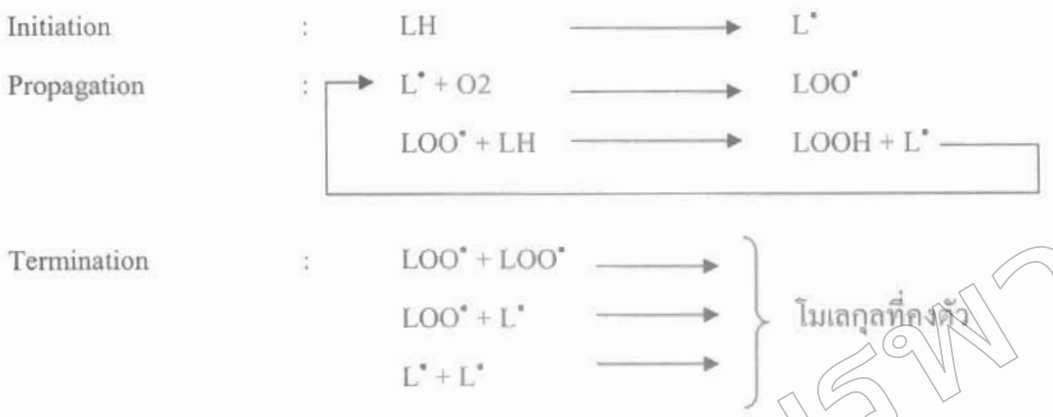
ภาพที่ 2-7 ระยะเวลาในการเจริญเติบโตและการผลิตสาร isoflavone ของแคลลัสจากชิ้นส่วนต่างๆ ของพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS เติม 2,4-D 4.5 μM และ kinetin 0.46 μM ที่อุณหภูมิ 32±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน (A) น้ำหนักแห้งของแคลลัส (B) ปริมาณ daidzein (C) ปริมาณ genistein

(Thaorica & Panichajakul, 2006)

อนุมูลอิสระ (Free Radical)

อนุมูลอิสระเป็นโมเลกุล หรืออะตอมที่มีอิเล็คตรอนเดี่ยวอยู่ในออร์บิทอล อย่างน้อย 1 ตัว โคจรอยู่รอบวงนอกสุดที่มีระดับพลังงานสูง โดยที่จำนวนอิเล็คตรอนเดี่ยวมีหนึ่งตัว หรือหลายตัวต่อหนึ่งออร์บิทอลก็ได้ ซึ่งอนุมูลอิสระจะเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อพันธะระหว่างอะตอมมีการแตกออกเหลือแต่อิเล็คตรอนเดี่ยวบนออร์บิทอล ซึ่งทำให้โมเลกุลอยู่ในสภาวะไม่เสถียร (อะตอม หรือโมเลกุลที่เสถียร จะต้องมีจำนวนอิเล็คตรอนอยู่เป็นคู่ ๆ เสมอหากอิเล็คตรอนขาด หรือเกินกว่าเดิมเพียงหนึ่งตัวอะตอม หรือโมเลกุลจะว่องไวมากไม่อยู่นิ่ง จึงหาทางจับคู่กับอิเล็คตรอนเดี่ยวอื่นๆ หรือทำปฏิกิริยากับอะตอมของธาตุอื่นเสมอ) ดังนั้นจึงทำปฏิกิริยากับโมเลกุลที่อยู่รอบๆ โดยการให้หรือรับอิเล็คตรอน กับโมเลกุลที่อยู่ข้างเคียง เพื่อให้เกิดความเสถียร โดยที่โมเลกุลที่สูญเสีย หรือรับอิเล็คตรอนไปนั้น จะกลายเป็นอนุมูลอิสระแทน และทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นต่อไปเกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (Chain Reaction) (วัลลภ วีชะรังสรรค์ และ ปราณีต โอปณะโสภิต, 2547) แต่ยกเว้นเฉพาะตัวที่ไม่เสถียรสองตัวมาเจอกันก็สามารถรวมกันเป็นโมเลกุลที่มีความเสถียรได้ดังสมการต่อไปนี้ (นวลศรี รักอริยะธรรม และ อัญชนาเจนวิถีสุข, 2545; Shahidi, 1997)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



อนุมูลอิสระมีทั้งอยู่ในสภาวะที่เป็นกลางทางไฟฟ้า และในสภาวะที่เป็นประจุไฟฟ้า ซึ่งมีลักษณะที่เป็นประจุบวก และประจุลบ โดยสัญลักษณ์ทางเคมีของอนุมูลอิสระ แสดงอิเล็คตรอนเดี่ยวของอนุมูลด้วยจุดในตำแหน่งข้างบนของสัญลักษณ์ทางเคมี เช่น อนุมูล $A^{\bullet}$ อนุมูล $A^{-\bullet}$ และอนุมูล $A^{+\bullet}$ (โอภา วัชระคุปต์, ปรีชา บุญจูง, จันทนา บุณยะรัตน์ และมาลีรักษ์ อัตต์สินทอง, 2549)

อนุมูลอิสระธรรมชาติที่สำคัญมาก คือ ออกซิเจนซึ่งมี 21 เปอร์เซ็นต์ในบรรยากาศ และ อนุมูลไฮดรอกซิล ($OH^{\bullet}$) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระมีความสำคัญทางชีวภาพ เช่น ในเม็ดเลือดขาวได้มีการทำลายสารแปลกปลอม และเชื้อโรค แต่ถ้าอนุมูลอิสระมีปริมาณที่มากเกินไป ก็อาจเป็นโทษต่อเซลล์ได้ เช่น ทำให้มีการอักเสบ และเซลล์ตาย หลังจากที่มีการติดเชื้อแล้ว เป็นต้น (ไมตรี สุทธจิตต์ อุดมภัณฑ์ ขาลสุวรรณ สิริวรรณ สุทธจิตต์ ปกฤษฎางค์ แก้วสุริยะ และ ภัคสิริ สินไชยกิจ, 2543)

สารกำจัดอนุมูลอิสระ (Free Radical Scavenging)

สารกำจัดอนุมูลอิสระเป็นกลุ่มของสารที่ให้ผลยับยั้ง เมื่อให้ในปริมาณที่ต่ำกับสารออกซิแดนท์(Oxidants Oxidizable Substances) หรือ ชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน อย่างมีนัยสำคัญ (วัลลภ วีชะรังสรรค์ และ ปราณีต โอปณะโสภิต, 2547) ซึ่งร่างกายมนุษย์สามารถผลิตสารต้านอนุมูลอิสระได้ปริมาณหนึ่ง โดยการทำลายโมเลกุลที่เป็นต้นเหตุการเกิดของ อนุมูลอิสระ เป็นการทำงานที่อาศัยเอนไซม์หรือไม่อาศัยเอนไซม์ก็ได้ ส่วนในทางเคมี สารกำจัดอนุมูลอิสระ คือ สารประกอบที่ป้องกัน หรือ ชะลอการเกิดกระบวนการออกซิเดชันได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1. กลไกการกำจัดอนุมูลอิสระ

สารกำจัดอนุมูลอิสระสามารถทำลายอนุมูลอิสระได้โดยกระบวนการให้หรือรับอิเล็คตรอนกับอนุมูลอิสระ ทำให้ปฏิกิริยาลูกโซ่สิ้นสุดลง โดยที่สารกำจัดอนุมูลอิสระไม่กลายเป็นอนุมูลอิสระเมื่อทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ เนื่องจากมีความคงตัวทั้งในรูปอิเล็คตรอน ครบ และอิเล็คตรอนขาด หรือเกิน ซึ่งกลไกการกำจัดอนุมูลอิสระแบ่งได้เป็นสองกลไกตามลักษณะการออกฤทธิ์ของสารกำจัดอนุมูลอิสระ คือ ฤทธิ์ป้องกันอนุมูลอิสระ (Preventive Antioxidant Activity) และฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ (Free-Radical Scavenging Antioxidant Activity)

2. สารกำจัดอนุมูลอิสระที่ได้จากธรรมชาติ (นวลศรี รังสรรย์ธรรม และ อัญชนา เจนวิถีสุข, 2545)

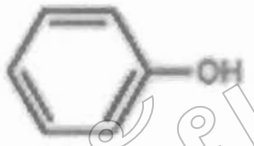
โดยปกติแล้วอนุมูลอิสระถูกสร้างขึ้นตลอดเวลาในกระบวนการทางชีวเคมีของเซลล์ ซึ่งในร่างกายของมนุษย์มีก๊าซออกซิเจนที่ได้จากกระบวนการหายใจ ดังนั้นผนังเซลล์จึงสัมผัสกับก๊าซออกซิเจนตลอด โดยกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่เป็นองค์ประกอบของไขมันที่อยู่บนผนังเซลล์ทำปฏิกิริยากับอนุพันธ์ของออกซิเจนจนเกิดอนุมูลอิสระขึ้นได้ ดังนั้นถ้าร่างกายมีอนุมูลอิสระมากขึ้น ก็เกินความสามารถของสารกำจัดอนุมูลอิสระในร่างกายที่สามารถกำจัดได้ จึงจำเป็นต้องพึ่ง สารกำจัดอนุมูลอิสระจากภายนอกเข้ามาช่วยในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยสารกำจัดอนุมูลอิสระสามารถพบได้จากอาหารที่บริโภคเข้าไป สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในอาหารมีหลายชนิดจนไม่สามารถระบุชี้ชัดลงไปได้ว่าสารต้านอนุมูลอิสระตัวไหนดีที่สุดในการเป็นสารกำจัดอนุมูลอิสระ เนื่องจากสารกำจัดอนุมูลอิสระต้องทำงานร่วมกัน

2.1 สารประกอบโพลีฟีนอล (Polyphenolic Compound)

สารประกอบฟีนอลเป็นสารกลุ่มใหญ่ สามารถพบทั่วไปในพืชทุกชนิด และมีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดสี และรสชาติในผัก และผลไม้ รวมถึงเป็นส่วนที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตจากพืช คล้ายกับเนื้อเยื่อของพืชที่มีกลไกการทำงานในการต้านภาวะที่เกิดจากการติดเชื้อจาก แมลง และจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค และภาวะเครียดที่เกิดจากสิ่งแวดล้อม เช่น รังสีอัลตร้าไวโอเล็ต อุณหภูมิ และมลพิษทางอากาศ (Friedman, 1997; Horax, Hettiarachchy & Islam, 2005) โดยโครงสร้างทั่วไปของสารประกอบฟีนอล ประกอบด้วย โครงสร้างที่เป็นวงอะโรมาติก หรือเรียกว่า วงเบนซีน (Benzene Ring, C6) และมีหมู่แทนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซิล (OH) อย่างน้อย 1 หมู่จับที่วงแหวน ถือเป็นสารทุติยภูมิ (Secondary Metabolites) ดังนั้นสารประกอบ ฟีนอลมีฤทธิ์เป็นกรด เนื่องจากมีความสามารถในการแตกตัวของหมู่ไฮดรอกซิลในธรรมชาติ (โอภา วัชระคุปต์ และคณะ, 2549; อรสา สุริยาพันธ์, ม.ป.ป.) แสดงดังภาพที่ 2-8 สารประกอบฟีนอลหลาย

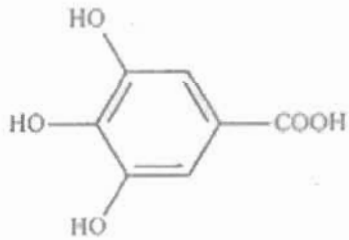
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ชนิดมีสมบัติเป็นสารกำจัดอนุมูลอิสระ สารในกลุ่มนี้ ส่วนใหญ่ละลายได้ในน้ำ หรือตัวทำละลายอินทรีย์ และในพืชแต่ละชนิดมีสารประกอบฟีนอลที่แตกต่างกัน ประกอบด้วย กรดฟีนอลิก (Phenolic Acid) กรดเบนโซอิก (Benzoic Acid) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) ฟีนิลโพรพานอยด์ (Phenylpropanoid) แทนนิน (Tannin) ลิกแนน (Lignan) และลิกนิน (Lignan) (ศิวาพร ศิวเวชช, 2529; Horax et al., 2005)



ภาพที่ 2- 8 โครงสร้างทั่วไปของสารประกอบฟีนอล (Fine, CPA, Candidate, 2000)

สารประกอบฟีนอลประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อย คือ กรดไฮดรอกซีเบนโซอิก (Hydroxybenzoic Acid) และกรดไฮดรอกซีซินนามิก (Hydroxycinnamic Acid หรือ Phenylpropanoids) (อรสา สุริยาพันธ์, ม.ป.ป.) โดยกรดไฮดรอกซีเบนโซอิกมีโครงสร้างหลักเป็น C_6-C_1 ที่พบได้ทั่วไปในผัก ผลไม้ คือ กรดเจนติสติก (Gentistic Acid) กรดแกลลิก (Gallic Acid) (Komutarin, 2003) แสดงดังภาพที่ 2-9



ภาพที่ 2-9 โครงสร้างของกรดแกลลิก (Wang & Mazza, 2002)

มีการรายงานว่า กรดแกลลิกเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ และการต้านการเกิดมะเร็งที่ดี (Kawada, Ohno, Ri, Ikoma, Yuugetu, Asai, Watanabe, Yasuda, Akao, Takemura, Minatoguchi, Gotoh, Fujiwara & Fukuda, 2001; Yilmaz & Toledo, 2004) โดยพบว่า เป็นการลดการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งจากตับหนูที่ทำในหลอดทดลองเมื่อใช้ในความเข้มข้นที่สามารถยับยั้ง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เซลล์มะเร็งได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC 50) มีค่าการยับยั้งที่ 200 ไมโครโมล และกรดแกลลิกมีฤทธิ์ทำงานร่วมกับยาต้านมะเร็ง เช่น คิสปาติน (Cisplatin) ที่มีอิทธิพลต่อมะเร็งตับ (Kawada et al., 2001) โดยกรดแกลลิกเป็นตัวกลางในการขัดขวางการเกิดออกซิเดทีฟของเซลล์ดีเอ็นเอที่ความเข้มข้นต่ำ (Fan & Lou, 2004) และสามารถต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง Caco-2 Human Colon (Caco-2 Cells) และเซลล์มะเร็งจากตับหนู WB-F344 (WB Cells) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Lee, Hur, Lee & Lee, 2005)

ฟีนิลโพรพานอยด์เป็นสารที่ได้จากกระบวนการทางชีวเคมีสังเคราะห์จากกรดอะมิโน เช่น แอล-ฟีนิลลาลานีน (L-Phenylalanine) หรือแอล-ไทโรซีน (L-Tyrosine) โดยผ่านวิถีเพนโทสฟอสเฟต (Pentose Phosphate Pathway) หรือวิถีชิกิมาต (Shikimate Pathway) หรือวิถีฟีนิลโพรพานอยด์ (Phenylpropanoid Pathway) เป็นสารตั้งต้น โดยสารที่พบได้ทั่วไปใน ผัก ผลไม้ คือ กรดคลอโรจีนิก (Chlorogenic Acid) มีการรายงานว่า กรดคลอโรจีนิกเป็นกรดที่มีความสำคัญต่อกระบวนการเผาผลาญอาหารของพืช และช่วยในการยับยั้งการเกิดเนื้องอกได้ (Huang, Smart, Wong & Conney, 1988; Jiang, Kusama, Satoh, Takayama, Watanabe, & Sakagami, 2000) พบว่ากรดคลอโรจีนิกสามารถยับยั้งการเกิดเนื้องอกในหนูเมื่อใช้กรดคลอโรจีนิกในปริมาณ 10 ไมโครโมล มีฤทธิ์ทำงานร่วมกับ 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) 5 นาโนโมล สามารถยับยั้งการเกิดเนื้องอกในหนูได้ 60 เปอร์เซ็นต์ (Huang et al., 1988) รวมทั้งช่วยยับยั้งการเกิดเนื้องอกภายในช่องปากของมนุษย์ได้ด้วยจากที่ทำการทดลองในหลอดทดลองในหลอดทดลอง (Jiang *et al.*, 2000)

2.2 สมบัติของสารประกอบฟีนอล (วิวัฒน์ หวังเจริญ, 2545)

สมบัติการเป็นสารกำจัดอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลที่ดีนั้น เนื่องจากสารประกอบฟีนอลเป็นตัวที่ให้อิเล็คตรอนที่ดี ดังนั้นเมื่อสารประกอบฟีนอลเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระจะเกิดเป็นอนุมูลฟีนอคซี (Phenoxy Radical) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีความเสถียร เพราะตำแหน่งของอิเล็คตรอนคู่โดดเดี่ยวเปลี่ยนไปเสมอ โดยคุณสมบัติที่ได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบันของสารประกอบฟีนอล คือ มีประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภคอาหาร โดยผลไม้ และผักเป็นแหล่งของสารประกอบฟีนอลที่ดี จากการศึกษาหลายงานวิจัยแสดงให้เห็นว่า สารประกอบฟีนอลมีอิทธิพลในการสนับสนุนทางด้านสุขภาพ เช่น การใช้สารประกอบฟีนอลในการป้องกันโรคต่างๆ โดยเฉพาะ การลดความดันโลหิต มะเร็ง และการป่วยที่มีผลต่อหัวใจ และหลอดเลือดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Shahidi, 1997; Beecher, 1999; Rice-Evans, 1999; Wang & Mazza, 2002; Pongnikorn, Fongmoon, Kasinrerk, & Limtrakul, 2003; Fu, 2004; Fouad, 2005; Hsu, Sheu, Liaw, Wang & Lin, 2005; Kim, Jun, Jeong & Chung, 2005; Hounsome, Hounsome, Tomos &

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Edwards-Jones, 2008) สารประกอบฟีนอลทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระ และไอออนของโลหะที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน และโมเลกุลอื่นๆ โดยการให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระอย่างรวดเร็ว ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้

$$ROO^{\bullet} + PPH \longrightarrow ROOH + PP^{\bullet}$$

$$RO^{\bullet} + PPH \longrightarrow ROH + PP^{\bullet}$$

เมื่อสารประกอบฟีนอลให้อะตอมไฮโดรเจนกับอนุมูลอิสระแล้ว อนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลจะมีความเสถียร ดังนั้นจึงไม่ทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นต่อไป ยิ่งไปกว่านั้นอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลบางชนิดสามารถรวมตัวกับอนุมูลอิสระอื่นได้อีกด้วย ทำให้สารประกอบฟีนอลเหล่านั้นสามารถลดจำนวนอนุมูลอิสระลงได้ถึง 2 เท่า ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้

$$ROO^{\bullet} + PP^{\bullet} \longrightarrow ROOPP$$

$$RO^{\bullet} + PP^{\bullet} \longrightarrow ROPP$$

แต่ความสามารถในการเป็นสารกำจัดอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลขึ้นอยู่กับระบบด้วย ดังนั้นการศึกษา หรือเปรียบเทียบคุณสมบัติดังกล่าวจึงจำเป็นต้องระบุรายละเอียดของระบบให้ชัดเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่งสับสเตรทที่เป็นเป้าหมายของระบบ นอกจากนี้ยังพบว่า ในภาวะที่มีสารประกอบฟีนอลความเข้มข้นสูง พีเอชสูง และมีเหล็กอยู่ด้วยนั้น เป็นตัวเริ่มต้นของกระบวนการออกซิเดชันได้

สารประกอบฟีนอลที่ถูกพบว่ามีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ที่นิยมใช้ในปัจจุบัน คือ วิตามินอี ส่วนสารประกอบฟีนอลอื่นๆ ที่กำลังได้รับความสนใจอย่างมาก คือ ฟลาโวนอยด์ (ได้แก่ ฟลาโวน ฟลาโวนอล ไอโซฟลาโวน คาเตชิน ฟลาโวโนน และชาลโคน) (Beecher, 1999) โดยสามารถพบฟลาโวนอยด์ ได้ในเกือบทุกส่วนของพืช และพืชที่มีสีเขียวทั่วไป

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (Folin-Ciocalteu's method)

(ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม และวันทนีย์ ช้างน้อย, 2545; อรสา สุริยาพันธ์, ม.ป.ป.)

สารประกอบฟีนอลิคเมื่อทำปฏิกิริยากับ Phosphomolybdic/Phosphotungstate Acid Complex ที่มีใน Folin-Ciocalteu's Reagent ในสภาวะที่เป็นด่าง ทำให้ได้สารประกอบสีน้ำเงิน โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายสารประกอบฟีนอลที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนทำให้สามารถวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในตัวอย่างได้

สารประกอบฟีนอลที่นิยมใช้เป็นสารอ้างอิง เช่น กรดแกลลิก กรดคลอโรจินิก และ กรดเฟอร์รูลิก เป็นต้น โดยการใช้กรดแกลลิกเป็นสารอ้างอิง หน่วยของปริมาณสารประกอบ ฟีนอลทั้งหมด ต้องแสดงในเทอมของ GAE หรือ Gallic Acid Equivalent หรือ mg of Gallic Acid/g of Extract (in GAE) หรือใช้กรดคลอโรจินิกเป็นสารอ้างอิง หน่วยของปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด ต้องแสดงในเทอมของ CAE หรือ Chlorogenic Acid Equivalent หรือ mg of Chlorogenic Acid/g of Extract (in CAE) (Horax, Hettiarachchy & Islam, 2005)

วิธีการวิเคราะห์สมบัติความสามารถรวมในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Total Antioxidant Capacity; TAC)

อนุมูลอิสระเกิดขึ้นได้หลายชนิดทั้งในร่างกาย หรือเซลล์ จึงมีระบบป้องกัน และควบคุมไม่ให้มีอนุมูลอิสระมากเกินสมดุลย์จนทำให้เกิดอันตรายได้ ดังนั้นจึงมีการหาความสามารถรวมในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยการวิเคราะห์จากการส่งผ่านอิเล็กตรอนเดี่ยว (Electron Transfer; ET หรือ SET) เช่น วิธี TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) (โอภา วัชระคุปต์ และคณะ, 2549)

1. วิธีที่ใช้ ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)

โดยการใช้ ABTS เป็นวิธีการวัดความสามารถในการกำจัดอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ ที่มีความคงตัว โดยที่ ABTS ถูกออกซิไดซ์โดยอนุมูลเปอร์ออกซีเกิดเป็นอนุมูลที่เป็นประจุบวก $ABTS^{\bullet+}$ และมีสี ดังนั้นเมื่อเติมสารกำจัดอนุมูลอิสระลงไปทำให้สารละลายมีสีที่ซีดลง โดยผลการวิเคราะห์นำมาคำนวณเป็นค่าที่สัมพันธ์กับสารกำจัดอนุมูลมาตรฐานโทรล็อก ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของวิตามินอีที่ละลายน้ำ (Sánchez-Moreno, 2002)

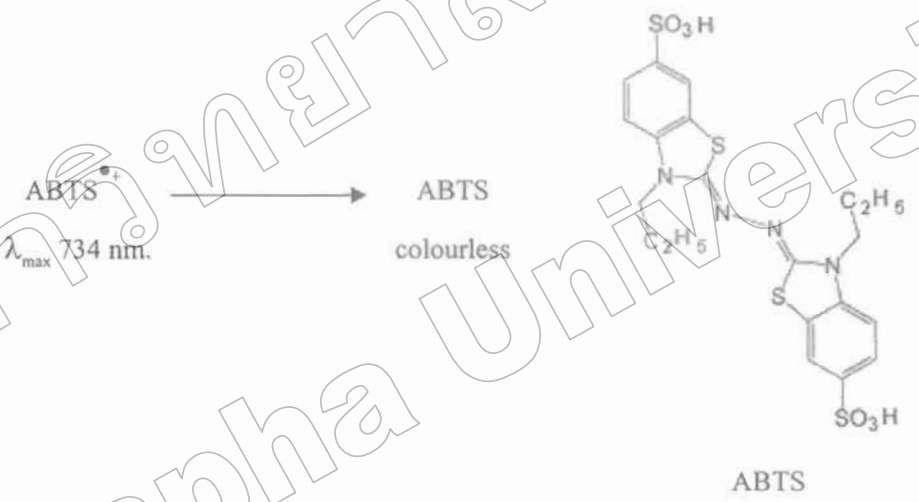
วิธี TEAC เป็นวิธีที่พัฒนามาจากการใช้เมทไมโอโกลบินกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทำปฏิกิริยากันจนเกิดเป็นอนุมูลเฟอร์ริลไมโอโกลบิน ทำปฏิกิริยากับ ABTS ให้เป็นอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ ที่มีสี โดยวัดที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 นาโนเมตร และ 734 นาโนเมตร ซึ่งเป็นค่าที่นิยมใช้ในการวัดค่าการดูดกลืนแสงของ $ABTS^{\bullet+}$ จากการวิเคราะห์ เป็นการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงของ $ABTS^{\bullet+}$ จากค่าควบคุมที่ไม่ได้เติมสารที่ใช้ในการทดสอบ แสดงดังภาพที่ 2-10

ปัจจุบันมีการนำสารอื่นมาใช้ในการทำให้เกิดอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ เช่น แมงกานีสไดออกไซด์ หรือ โปตัสเซียมเปอร์ซัลเฟต โดยสามารถวิเคราะห์สารกำจัดอนุมูลอิสระที่ละลายได้ดีในลิปิด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาวิธีการทำให้เกิด $ABTS^{\bullet+}$ โดยการใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากฮอสเรดิช ซึ่งมีข้อดี คือ ใช้เวลาน้อยกว่า และเป็นปฏิกิริยาที่ไม่ต้องใช้สภาวะในการสกัดที่รุนแรง นอกจากนี้ยังศึกษาถึงความสามารถในการต้านอนุมูลได้ในค่าพีเอชในช่วงกว้าง

ข้อดีของการใช้ ABTS คือ ทำได้ง่าย อนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ สามารถทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับสารต้านอนุมูลอิสระภายในเวลา 30 นาที โดยปกติแล้วใช้เวลาประมาณ 5 นาที การวิเคราะห์ทำได้ในช่วงพีเอชที่กว้างทำให้สามารถศึกษากลไกได้โดยละเอียด รวมถึงใช้วิเคราะห์หาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นสารที่ละลายได้ในน้ำ หรือสารที่ละลายได้ในลิปิด เนื่องจากอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ ละลายได้ทั้งในน้ำ และในสารทำละลายอินทรีย์ แต่มีข้อเสีย คือ ABTS ไม่เป็นสารธรรมชาติที่ก่อให้เกิดอนุมูลในเซลล์ หรือร่างกาย



ABTS

ภาพที่ 2-10 การวัดค่าการดูดกลืนแสงของ $ABTS^{\bullet+}$ ที่ลดลงเมื่อวัดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร และโครงสร้างของสาร ABTS (โอภา วัชระคุปต์ และคณะ, 2549)

2. วิธีที่ใช้ DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

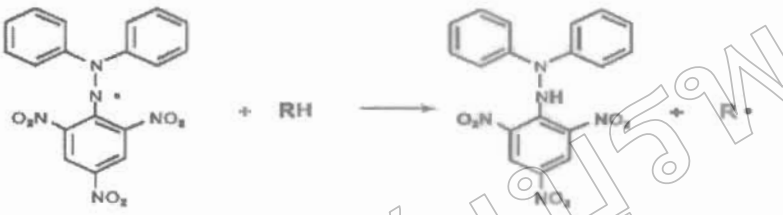
นิยมนำมาใช้ในการประเมินกิจกรรมเป็นสารกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพืช และจุลินทรีย์ โดยอนุมูล $DPPH^{\bullet}$ เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัว มีสีม่วงอยู่ในรูปอนุมูลอยู่แล้ว โดยไม่ต้องทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดอนุมูลเหมือนกับอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ การวิเคราะห์ เป็นการวัดความสามารถในการรีดิวซ์ โดยแสดงสมบัติการเป็นสารกำจัดอนุมูลอิสระ และวัดค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH ที่เปลี่ยนแปลงไป ปกติดูดกลืนแสงได้ดีที่สุด 517 นาโนเมตร เมื่อทำปฏิกิริยากับสารที่มีสมบัติเป็นสารกำจัดอนุมูลอิสระ ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH จะลดลง เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุลของสารกำจัดอนุมูลอิสระและอนุมูลอิสระ โดยที่อนุมูลอิสระได้รับไฮโดรเจนอะตอม (hydrogen donation) สังเกตุได้จากการเปลี่ยนแปลงสีม่วงเป็นสีเหลือง แสดงดังภาพที่ 2-11

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

$$DPPH^{\bullet} + (AH)_n \longrightarrow DPPH - H + (A^{\bullet})_n$$

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

$$A^{\bullet} + A^{\bullet} \longrightarrow AA$$



ภาพที่ 2-11 การเกิดปฏิกิริยาระหว่างอนุมูล DPPH$^{\bullet}$ กับสารกำจัดอนุมูลอิสระ (Prakash, 2001)

ปัจจุบันมีการพัฒนาโดยใช้ DPPH$^{\bullet}$ ในการหาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ เรียกว่า Antiradical Efficiency (AE) โดยคำนวณจากสมการ ดังนี้

$$AE = 1/EC_{50}T_{EC\,50}$$

โดยที่ : EC_{50} = ความเข้มข้นของสารทดสอบที่สามารถลดปริมาณ DPPH$^{\bullet}$ เริ่มต้นลงได้ 50 %

$T_{EC\,50}$ = เวลาที่ใช้ในการลดปริมาณอนุมูลอิสระให้ได้ EC_{50}

ข้อดีของการใช้ DPPH$^{\bullet}$ คือ ใช้ได้ง่าย มีการใช้เครื่องมือโดยสามัญที่มีทั่วไป นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระของสารกำจัดอนุมูลอิสระตามธรรมชาติ ยกเว้นเฉพาะสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่มีการดูดกลืนแสงในขอบเขตเดียวกัน แต่มีข้อเสีย คือ อนุมูล DPPH$^{\bullet}$ มีความคงตัว ไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลที่เกิดในเซลล์ หรือร่างกาย ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่สามารถแยกแยะ หรือจัดอันดับอนุมูลอิสระที่ความไวสูงได้ รวมถึงโครงสร้างทางเคมีของ DPPH$^{\bullet}$ เป็นลักษณะที่อิเล็คตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระถูกบดบังด้วยวงเบนซีน 3 วง และหมู่ไนโตรเจน ทำให้สารกำจัดอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์แรงแต่มีขนาดใหญ่บางสารไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยากำจัดอนุมูลอิสระ หรือเกิดปฏิกิริยาช้ากว่าความเป็นจริง ทั้งๆที่สารกำจัดอนุมูลอิสระนั้นมีฤทธิ์ที่ดีในการกำจัดอนุมูลเปอร์ออกซี (โอภา วัชระคุปต์ และคณะ, 2549)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Horax และคณะ (2005) ได้สรุปความสำคัญ และประโยชน์ของสารประกอบฟีนอลทั้งหมด และส่วนประกอบของกรดฟีนอลในมะระ (*Momordica charantia*) และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดไว้ว่า จากการศึกษามะระ 4 สายพันธุ์ ดังนี้ India green (IG), India

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

white (IW), China green (CG) และChina white (CW) พบว่าChina white มีปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดสูงที่สุด คือ 6.07-8.90 mg chlorogenic acid equivalent (CAE)/g น้ำหนักแห้ง เมื่อเปรียบเทียบกับ India green ที่มีต่ำที่สุด คือ 4.64-6.84 mg CAE/g และการอบแห้งโดยวิธีการใช้เตาอบ และการอบแห้งโดยการระเหิด พบว่าการอบแห้งโดยวิธีการใช้ เตาอบมีปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดสูงกว่าการอบแห้งโดยการระเหิด คือ 5.39-8.94 และ4.64-8.90 mg CAE/g ตามลำดับ การทดสอบฟีนอลของเมล็ด เนื้อเยื่อภายใน และเปลือกนอก พบว่าเปลือกนอกมีปริมาณฟีนอลสูงที่สุด คือ 5.36-8.90 mg CAE/g ส่วนการทดสอบกรดฟีนอล พบว่าเปลือกนอกมีจำนวน และปริมาณของกรดฟีนอลิคสูงที่สุด คือ Gallic acid, Gentisic acid, Catechin, Chlorogenic acid และEpicatechin มีอัตราจาก 8.04-39.76, 16.99-32.29, 23.06-82.45, 4.55-15.83 และ 16.14-44.28 mg/100g ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และการทดสอบกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ พบว่าเปลือกนอกมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงที่สุด คือ 81.7-86.5 เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ดังนั้นมะระจึงเป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยสารประกอบฟีนอล โดยเป็นแหล่งที่ดีของสารต้านอนุมูลอิสระจากการประยุกต์ใช้ในระบบอาหาร

Wu and Ng. (2008) ได้สรุปความสำคัญ และประโยชน์ของสารต้านอนุมูลอิสระ และกิจกรรมการจับกับอนุมูลอิสระของมะระในไต้หวันไว้ว่า การเปรียบเทียบการสกัดมะระโดยการใช้น้ำกลั่น และเอทานอล นำมาประเมินค่าโดยวัดการจับกับอนุมูล DPPH พบว่าการสกัดโดยใช้น้ำกลั่นสามารถยับยั้งอนุมูล DPPH ได้ดีที่สุด คือ IC_{50} = 129.94 μg/ml. เมื่อเปรียบเทียบกับวิตามินอีที่ยับยั้งได้ IC_{50} = 172.78 μg/ml. เช่นเดียวกันกับกิจกรรมการจับกับเหล็ก พบว่าการสกัดโดยใช้น้ำกลั่นสามารถจับกับเหล็กได้ดีที่สุด คือ IC_{50} = 340.18 μg/ml. อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้ง Xanthine oxidase (XOI) และกิจกรรมการต้านการเกิด ลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน พบว่าวิตามินอีสามารถยับยั้งได้ดีที่สุด ดังนี้ วิตามินอีสามารถยับยั้ง Xanthine oxidase (XOI) ได้ IC_{50} = 0.79 μg/ml. เมื่อเปรียบเทียบกับการสกัดด้วยน้ำกลั่น คือ IC_{50} = 7.90 μg/ml. และการสกัดด้วนเอทธานอล คือ IC_{50} = 7.69 μg/ml. ส่วนการจับกับอนุมูลอิสระ cytochrome c การสกัดด้วยน้ำกลั่น คือ IC_{50} = 6.15 μg/ml. และการสกัดด้วนเอทธานอล คือ IC_{50} = 7.08 μg/ml. และการต้านการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันจากตับ และสมองหนู พบว่าการสกัดด้วยน้ำกลั่นสามารถต้านได้ดีกว่าการสกัดด้วยเอทธานอล แต่สามารถต้านการเกิด ลิปิดเปอร์ออกซิเดชันได้น้อยในพลาสมาของหนู อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งความเข้มข้นของ ฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่สกัดด้วยน้ำกลั่น คือ 62.0 mg/g โดยมีค่าสูงกว่าการสกัดด้วยเอทธานอล คือ 44.0 mg/g แต่ต่ำกว่าในการทดสอบฟีนอลทั้งหมด คือ การสกัดด้วยน้ำกลั่นมีปริมาณ 51.6 mg/g และการสกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณ 68.8 mg/g

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

Semiz and Sen. (2005) ได้สรุปความสำคัญ และประโยชน์ของสารต้านอนุมูลอิสระ และคุณสมบัติการปกป้องทางเคมีของสารสกัดจากผล *Momordica charantia* L. (มะระ)ไว้ว่า จากการทดสอบ Glutathione S-transferases (GSTs), Cytochrome P450s (CYPs) และเอนไซม์ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในหนู โดยใช้หนูเพศผู้ที่มีอายุ 12 สัปดาห์ และมีน้ำหนัก 200-250 กรัม โดยการให้สารสกัดผลมะระ 200 mg/kg ของน้ำหนักตัว ต่อเนื่องกันเป็นเวลา 4 วัน ใช้ทดสอบในส่วนของตับ ไต และปอด พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เกี่ยวกับตับ เช่น กิจกรรมของ Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT) และGlutathione peroxidase (GPx) โดยมีการเพิ่มขึ้นในกิจกรรมของ GPx ทั้งหมด 9 เท่า ขณะที่มีการเพิ่มขึ้นของ SOD และCAT 2-5 เท่า อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนสารสกัดผลมะระแสดงอิทธิพลของการปกป้องทางเคมีใน CCl_4-intoxicated ของหนู พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ GSTs ที่เกี่ยวกับตับ จากการควบคุมอื่นๆ คือ จากหนูที่มีการให้ สารสกัดผลมะระมีปฏิกิริยาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกิจกรรมของ Ethoxyresorufin *O*-deethylase (EROD) และMethoxyresorufin *O*-deethylase (MROD) ในไมโครโซมของตับหนู ซึ่งการคาตาไลซ์โดย CYP1A isoforms พบว่าสารสกัดจากผลของมะระให้ผลเป็นอิทธิพลของ สารต้านอนุมูลอิสระเทียบกับกิจกรรมการปกป้องทางเคมีในหนู

Kubola and Siriamornpun (2008) ได้สรุปความสำคัญ และประโยชน์ของสารประกอบ ฟีนอลิก และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระในส่วนของสารสกัดจากใบ ลำต้น และผลของมะระขี้นก (*Momordica charantia* L.) ที่ทำในหลอดทดลองไว้ว่า การสกัดใบ ลำต้น และผลของมะระด้วยน้ำเพื่อวิเคราะห์ปริมาณ DPPH และกิจกรรมการจับกับอนุมูลไฮดรอกซิล การวิเคราะห์เบต้า-แคโรทีน-ลิโนเลเอท (β-Carotene-Linoleate Bleaching assay) การจับกับเหล็กต่อกำลังของสารต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด รวมถึงสารประกอบฟีนอลิกโดยใช้ HPLC เพื่อสกัดสารต้านอนุมูลอิสระที่มีความแตกต่างกัน พบว่าสารสกัดจากใบมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และการจับกับเหล็กสูงที่สุด ในขณะที่สารสกัดจากผลสีเขียวมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่จับกับอนุมูลไฮดรอกซิล เบต้า-แคโรทีน- ลิโนเลเอท และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดสูงที่สุด กรดแกลลิกมีความสามารถเป็นสารประกอบฟีนอลเหนือกว่ากรดคาเฟอิก และคาเตชิน จากการศึกษาการสกัดมะระด้วยน้ำที่วิธีการต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน พบว่าสารประกอบฟีนอลมีปริมาณที่สูงที่สุดเมื่อเทียบกับการจับกับเหล็ก (R^2=0.948)

264558

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University