ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผักพื้นบ้าน

นางสาว บังอร วงศ์รักษ์
นางสาว ศศิลักษณ์ ปิยะสุวรรณ์

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
พ.ศ. 2549

FREE RADICAL SCAVENGER OF THAI VEGETABLES

MISS BUNGON WANGRUG
MISS SASILAK PIYASUWAN

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE BACHELOR DEGREE OF SCIENCE IN PHARMACY
FACULTY OF PHARMACY
MAHIDOL UNIVERSITY

โครงการพิเศษ
เรื่อง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผักพื้นบ้าน

.....

(นางสาวบังอร วงศ์รักษ์)

.....

(นางสาวศศิลักษณ์ ปิยะสุวรรณ์)

.....

(รองศาสตราจารย์ยุวดี วงษ์กระจ่าง)
อาจารย์ที่ปรึกษา

.....

(รองศาสตราจารย์รุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุล)
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

.....

(รองศาสตราจารย์สมใจ นครชัย)
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

.....

(รองศาสตราจารย์เพ็ญโฉม พึ่งวิชา)
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผักพื้นบ้าน

บังอร วงศ์รักษ์, ศศิลักษณ์ ปิยะสุวรรณ์

อาจารย์ที่ปรึกษา: ยุวดี วงษ์กระจ่าง*, รุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุล**, สมใจ นครชัย***, เพ็ญโฉม พึ่งวิชา*

* ภาควิชาสรีรวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

** ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

*** ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ผักพื้นบ้าน, ผักกูด, ผักติ้ว, ผักปลังขาว, ย่านาง, ผักเหมียง, ผักหวานบ้าน

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผักพื้นบ้าน จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ ผักกูด, ผักติ้ว, ผักปลังขาว, ย่านาง, ผักเหมียง และผักหวานบ้าน สกัดสารสำคัญจากผักแต่ละชนิดโดยการหมักด้วย methanol นาน 3 วัน แล้วนำไประเหยแห้งด้วยความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส นำสารสกัดที่ได้มาแยกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ละลายในน้ำ และส่วนที่ไม่ละลายในน้ำซึ่งนำมาละลายกลับด้วย methanol ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผักทั้ง 6 ชนิดด้วยวิธี DPPH assay โดยผสมตัวอย่างที่ทดสอบกับสารละลาย 2,2–diphenyl–1–picrylhydrazyl (DPPH) แล้ววัดการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm เปรียบเทียบกับ control, วิตามินซี และวิตามินอี (Trolox) ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดจากผักติ้วแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด โดยสารสกัดส่วนที่ละลายในน้ำและส่วนที่ไม่ละลายในน้ำให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 205.96 μg/ml และ 101.79 μg/ml ตามลำดับ รองลงมาคือ สารสกัดจากย่านาง ให้ค่า IC_{50} 499.24 μg/ml (ส่วนที่ละลายในน้ำ) และ 772.63 μg/ml (ส่วนที่ไม่ละลายในน้ำ) สำหรับวิตามินซีและวิตามินอี ให้ค่า IC_{50} 9.34 μg/ml และ 15.91 μg/ml ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากผักอีก 4 ชนิดมีค่า IC_{50} มากกว่า 1,000 μg/ml การตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นพบว่าสารสกัดผักติ้วมี hydrolysable tannin ส่วนสารสกัดย่านางมี phenolic compounds และได้จัดทำ TLC fingerprints เพื่อเปรียบเทียบสำหรับการศึกษาครั้งต่อไป

Abstract

Free radical scavenger of Thai vegetables

Bungon Wangrug, Sasilak Piyasuwan

Project advisor: Yuwadee Wongkrajang*, Rungravi Temsiririrkkul**, Somjai Nakornchai***, Penchom Peungvicha*

*Department of Physiology, Faculty of Pharmacy, Mahidol University

**Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy, Mahidol University

***Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mahidol University

Keyword: free radical scavenger, *Diplazium esculentum* (Retz.) Swartz, *Cratoxylum formosum* (Jack) Dyer ssp.pruniflorum (Kurz.) Gogelin, *Basella alba* L., *Tiliacora triandra* Diels., *Gnetum gnemon* L. , *Sauropus androgynus* Merr.

The radical scavenging activity of Thai vegetables were determined by DPPH assay. Six kinds of vegetables including *Diplazium esculentum* (Retz.) Swartz, *Cratoxylum formosum* (Jack) Dyer ssp.Pruniflorum (Kurz.)Gogelin, *Basella alba* L., *Tiliacora triandra* Diels., *Gnetum gnemon* L. and *Sauropus androgynus* Merr. were selected. These vegetables were extracted by maceration in methanol for 3 days and then filtered. The filtrates were evaporated on water bath at 60 degree Celsius until dry. The dry extracts were dissolved in water, the soluble part (water soluble fraction) was separated, and the residue was redissolved in methanol (methanol fraction).Various concentrations of the extracts were mixed with 2, 2–diphenyl–1– picrylhydrazyl (DPPH), absorbance at 515 nm were measured by Novaspec II. Vitamin C and Trolox were used as reference standard. The results showed that *Cratoxylum formosum* (Jack) Dyer ssp.Pruniflorum (Kurz.) Gogelin extract possess the most potent properties, IC_{50} of water soluble fraction and water insoluble fraction were 205.96 μg/ml and 101.79 μg/ml, respectively. While IC_{50} of *Tiliacora triandra* Diels. water soluble fraction and water insoluble fraction were 499.79 μg/ml and 772.63 μg/ml, respectively. IC_{50} of vitamin C were 9.34 μg/ml whereas IC_{50} of Trolox 15.91 μg/ml. The chemical identification and TLC fingerprints of *Cratoxylum formosum* (Jack) Dyer ssp.Pruniflorum (Kurz.) Gogelin and *Tiliacora triandra* Diels. extracts were also performed.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงตามความมุ่งหมายได้ด้วยความช่วยเหลือจาก รศ.ยุวดี วงษ์กระจ่าง ภาควิชาสรีรวิทยา รศ.รุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุล ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ รศ.สมใจ นครชัย ภาควิชาเภสัชวิทยา รศ.เพ็ญโฉม พึ่งวิชา ภาควิชาสรีรวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำในการค้นคว้าข้อมูล การทำการทดลอง และรวบรวมข้อมูลตลอดจนการเรียบเรียงข้อมูลในการทำรายงาน ผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณอาจารย์เป็นอย่างสูง

นอกจากนี้ทางผู้วิจัยยังได้รับความช่วยเหลือจาก คุณรัตนา นาคสง่า เจ้าหน้าที่ภาควิชาสรีรวิทยา คุณอุบลวรรณ บุญเปล่ง เจ้าหน้าที่ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ คุณดุษณี ธนฐิติพงศ์ เจ้าหน้าที่ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย และนักศึกษาปริญญาโทและปริญญาเอก ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่กรุณาให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือและอำนวยความสะดวกต่างๆ ในระหว่างการทำการทดลอง ทำให้การวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณทุกท่านมา ณ ที่นี้ด้วย

บังอร วงศ์รักษ์

ศศิลักษณ์ ปิยะสุวรรณ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
Abstract	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
สัญลักษณ์และคำย่อ	ช
บทนำ	1
ทบทวนวรรณกรรม	3
วิธีดำเนินการวิจัย	16
ผลการวิจัย	21
สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	33
ข้อเสนอแนะ	34
ประโยชน์ที่ได้รับ	34
เอกสารอ้างอิง	35
ภาคผนวก	37

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณสารสกัดและ% yield ของผักพื้นบ้านแต่ละชนิด	21
2	ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน Vitamin C	22
3	ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน Trolox	22
4	ค่า % Inhibition ของสารสกัดแยกที่ละลายในน้ำ และไม่ละลายในน้ำ ที่ความเข้มข้น 1000 μg/ml วัด absorbance 515 nm ที่ 30 นาที	24
5	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักกูดที่ละลายในน้ำ	24
6	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักกูดที่ไม่ละลายในน้ำ	25
7	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักติ้วที่ละลายในน้ำ	25
8	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักติ้วที่ไม่ละลายในน้ำ	26
9	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักปลังที่ละลายในน้ำ	26
10	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักปลังที่ไม่ละลายในน้ำ	26
11	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดย่านางที่ละลายในน้ำ	27
12	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดย่านางที่ไม่ละลายในน้ำ	27
13	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักเหมียงที่ละลายในน้ำ	27
14	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักเหมียงที่ไม่ละลายในน้ำ	28
15	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักหวานบ้านที่ละลายในน้ำ	28
16	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักหวานบ้านที่ไม่ละลายในน้ำ	28
17	ค่า % Inhibition ของสารสกัดแยกที่ละลายในน้ำและไม่ละลายในน้ำ ที่ความเข้มข้น 1000 μg /ml วัด absorbance 515 nmที่ 30 นาที	30
18	ผลการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของ Phenolic compounds	31

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	สมการการเกิดปฏิกิริยา หลังจากการเติมสารต้านอนมูลอิสระ	7
2	ผักกูด	8
3	ผักติ้ว	9
4	ผักปลังขาว	11
5	ย่านาง	12
6	ผักเหมียง	13
7	ผักหวานบ้าน	14
8	กราฟความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรงของสารมาตรฐาน Vitamin C และ Trolox กับ % Inhibition	23
9	กราฟความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรงของสารสกัดผักติ้วที่ละลายในน้ำ และไม่ละลายน้ำกับ % Inhibition	29
10	กราฟความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรงของสารสกัดย่านางที่ละลายในน้ำ และไม่ละลายน้ำกับ % Inhibition	30
11	fingerprints ของสารสกัดผักติ้วหลังสเปรย์ด้วย 1 % methanolic ferric chloride	32
12	fingerprints ของสารสกัดย่านางหลังสเปรย์ด้วย 1 % methanolic ferric chloride	32

สัญลักษณ์และคำย่อ

Conc.	=	ความเข้มข้น
g	=	กรัม
mg	=	มิลลิกรัม
ml	=	มิลลิลิตร
M	=	โมลาร์
µg, mcg	=	ไมโครกรัม
µl	=	ไมโครลิตร
M.W.	=	น้ำหนักโมเลกุล
TLC	=	Thin Layer Chromatography
mM	=	มิลลิโมลาร์
V	=	ปริมาตร
IC_{50}	=	ค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการดูดกลืนแสงของสาร DPPH radical ได้ 50 เปอร์เซ็นต์
UV	=	รังสีอัลตราไวโอเลต

บทนำ

อนุมูลอิสระ เป็นสารไม่เสถียร มีช่วงครึ่งชีวิตสั้น โดยทั่วไปอนุมูลอิสระจะทำปฏิกิริยากับสารอื่น ใน 2 รูปแบบ คือ โดยการดึงเอาอะตอมไฮโดรเจนมาจากสารโมเลกุลอื่นที่อยู่ข้างเคียง และโดยการเพิ่มโมเลกุลของออกซิเจนเข้าไป เพื่อให้เกิดเป็นอนุมูลเปอร์ออกซิล (Peroxyl radical) เนื่องจากอนุมูลมีอิเลคตรอนที่ไม่ได้จับคู่อยู่ในโมเลกุล จึงมีความไวสูงในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลในร่างกาย ทำลายสมดุลของระบบต่างๆในร่างกาย โดยการทำลายองค์ประกอบหลักของเซลล์ สามารถแตกพันธะเปปไทด์ของโปรตีน ทำให้โปรตีนไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ นอกจากนี้ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับทั่วไปในวงการแพทย์ว่า โรคหลายชนิด เช่น โรคในระบบหัวใจและหลอดเลือด หรือโรคมะเร็ง เป็นต้น มีความสัมพันธ์กับการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกาย ดังนั้น การทำลายหรือควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระดังกล่าว อาจช่วยในการป้องกันการเกิดโรคต่างๆได้

สารที่นำมาใช้ต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ เรียกว่า สารต้านอนุมูลอิสระ เป็นสารที่ทำหน้าที่ต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น จึงช่วยยับยั้งอนุมูลอิสระไม่ให้ทำลายองค์ประกอบของเซลล์ โดยสารต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายต้องการและใช้เป็นประจำ ได้แก่ วิตามินซี วิตามินอี (1)

จากการศึกษาทางระบาดวิทยาจำนวนมาก ยืนยันถึงการลดอัตราเสี่ยง และเพิ่มอัตราการป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง โรคเกี่ยวกับหลอดเลือดและหัวใจ รวมถึงโรคอื่นๆที่มีความสัมพันธ์กับอนุมูลอิสระ จากการบริโภคผัก และผลไม้ ซึ่งจัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้รับจากภายนอก โดยผลดังกล่าวมาจาก ความเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารประเภทวิตามินซี เบต้าแคโรทีน แคโรทีนอยด์ รวมถึงสารกลุ่มโพลีฟีนอลิก โดยวิธีที่จะได้รับสารต้านอนุมูลอิสระ คือ การรับประทานเข้าไปเป็นอาหารประจำวัน (2)

แต่พบว่า การปลูกผักแบบเกษตรอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับผักที่ไม่ใช่ผักพื้นบ้าน มักมีโรคและแมลงรบกวน เกษตรกรจึงแก้ปัญหาโดยการใช้ยาฆ่าแมลง ส่งผลให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพผู้บริโภคได้ การรณรงค์ให้บริโภคผักพื้นบ้าน ซึ่งมีงานวิจัยหลายชิ้นที่สรุปว่า ผักพื้นบ้านเป็นผักที่มีความแข็งแรงทนทานต่อโรคและแมลง เหมาะสมกับภูมิอากาศและภูมิประเทศของประเทศไทย ทำให้ไม่มีความจำเป็นในการใช้สารเคมีเพื่อดูแลพืช จึงช่วยให้ผู้บริโภคลดโอกาสที่จะสัมผัสกับสารเคมีลงได้ นอกจากนี้ยังพบว่า ผักพื้นบ้านมีคุณค่าทางโภชนาการสูง มีสรรพคุณทางยาสมุนไพรอยู่มาก หากบริโภคเป็นประจำอาจสามารถป้องกัน บำรุง และรักษาความเจ็บป่วยได้ ประกอบกับสภาพเศรษฐกิจและสังคมในปัจจุบันที่ผู้บริโภคต้องการความปลอดภัยจากการ

บริโภคและความมั่นคงทางสุขภาพ ไม่ต้องการให้ตนเจ็บป่วย และกระแสสังคมที่ย้อนกลับมาสนใจยาสมุนไพรเพิ่มมากขึ้น (3)

ด้วยเหตุผลดังกล่าว จึงเล็งเห็นความสำคัญที่ต้องมีการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผักพื้นบ้าน เพื่อประโยชน์ในการสนับสนุนและส่งเสริมให้ผักพื้นบ้านได้เป็นที่รู้จัก รวมถึงเพื่อการวิจัยในขั้นสูงต่อไป

ทบทวนวรรณกรรม

อนุมูลอิสระ (Free Radical)

อนุมูลอิสระ คือ อะตอม โมเลกุล หรือสารประกอบที่มีอิเลคตรอนเดี่ยวอยู่ในออร์บิทัลวงนอกสุดที่มีระดับพลังงานสูง คำจำกัดความนี้หมายรวมถึงอะตอมของไฮโดรเจนและอิออนของโลหะทรานซิชันส่วนใหญ่ นอกจากนี้ยังรวมถึงโมเลกุลของออกซิเจนซึ่งนับว่าเป็นอนุมูลเพราะมีอิเลคตรอนจำนวน 2 อิเลคตรอน แต่ละอิเลคตรอนจะแยกกันอยู่เป็นอิเลคตรอนเดี่ยวในแต่ละออร์บิทัล อนุมูลอิสระมีทั้งที่อยู่ในสภาวะเป็นกลางทางไฟฟ้า และอนุมูลในสภาวะที่มีประจุไฟฟ้า โดยมีทั้งประจุบวกและประจุลบ สัญลักษณ์ทางเคมีของอนุมูล หรืออนุมูลอิสระ คืออิเลคตรอนเดี่ยวของอนุมูลซึ่งจะแสดงด้วยจุดในตำแหน่งข้างบนของสัญลักษณ์ทางเคมี เช่น อนุมูล $A^{\cdot}$ อนุมูล $A^{-\cdot}$ และอนุมูล $A^{+\cdot}$ โดยเฉพาะอนุมูลที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ จะไวต่อการเกิดปฏิกิริยามากกว่าที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เนื่องจากอิเลคตรอนเดี่ยวจะไม่เสถียรและพยายามจับคู่กับอิเลคตรอนเดี่ยวอื่น ดังนั้นอนุมูลอิสระจึงมีคุณสมบัติเฉพาะ คือ มีความไวสูงในการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นๆ อย่างไรก็ตามยังคงมีอนุมูลอิสระบางชนิดที่มีความเสถียร ไม่ไวในการเกิดปฏิกิริยา สามารถคงอยู่ในสภาพอนุมูลได้นาน อนุมูลอิสระที่มีความเสถียรมีจำนวนน้อยชนิดมาก ตัวอย่าง อนุมูลอิสระที่มีความสำคัญในทางชีวภาพ ได้แก่ อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์แอนอิออน ($O_2^{-\cdot}$) อนุมูลไฮดรอกซี($^{\cdot}OH$) อนุมูลอัลคอกซี($RO^{\cdot}$) และอนุมูลเปอร์ไฮดรอกซี ($HO_2^{\cdot}$) อนุมูลอิสระเหล่านี้จัดเป็นอนุมูลที่ไวในการเกิดปฏิกิริยาสูงมาก (4)

อนุมูลอิสระกับการเกิดโรค

เนื่องจากอนูมูลอิสระมีอิเลคตรอนที่ไม่ได้จับคู่อยู่ในโมเลกุล จึงมีความไวสูงในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลในร่างกาย ทำลายสมดุลของระบบต่างๆในร่างกาย โดยการทำลายองค์ประกอบหลักของเซลล์ เช่น ทำลายหน้าที่ของเซลล์เมมเบรนอันนำไปสู่การตายของเซลล์ ทำลายดีเอ็นเอโดยไปจับกับหมู่ฟอสเฟตและน้ำตาลดีออกซีไรโบส อนุมูลอิสระยังสามารถแตกพันธะเปปไทด์ของโปรตีน ทำให้โปรตีนไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ ซึ่งสิ่งเหล่านี้เป็นสาเหตุของการเกิดการกลายพันธุ์และการเกิดมะเร็ง นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดสภาวะทางพยาธิสภาพในโรคสำคัญบางโรค ได้แก่ โรคหัวใจ ไขมันอุดตันในเส้นเลือด ไขข้ออักเสบ ต้อกระจก เป็นต้น อนุมูลอิสระมีที่มาทั้งแหล่งภายนอกร่างกาย ได้แก่ มลพิษในอากาศ โอโซน ไนตรัสออกไซด์ ไนโตรเจนได

ออกไซด์ ฝุ่น ควันบุหรี่ อาหารที่มีกรดไขมันอิ่มตัวหรือธาตุเหล็กมากกว่าปกติ แสงแดด ความร้อน รังสีแกมม่า ยาบางชนิด เป็นต้น และแหล่งภายในร่างกาย ได้แก่ ออกซิเจน เป็นต้น (5)

ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระ

ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระจัดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (Free radical chain reaction) ซึ่งมีกลไกในการเกิดปฏิกิริยา 3 ขั้นตอน คือ

1. Initiation step

ปฏิกิริยากิริยาการเกิดอนุมูลอิสระในเซลล์ มักเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการสลายพันธะด้วยน้ำ (Hydrolysis) แสง (Photolysis) รังสี (Radiolysis) หรือปฏิกิริยารีดอกซ์ (Redox reaction) นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์อื่นๆ อีกหลายชนิดที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในเซลล์ รวมถึงโมเลกุลที่มีความไวสูงในการทำปฏิกิริยา เช่น nitric oxide (NO) และ singlet oxygen ($^1O_2$) ซึ่งหมายถึงออกซิเจนในสถานะที่ถูกกระตุ้น (Excited state) สิ่งเหล่านี้ล้วนทำให้เกิดขั้นตอนอินนิทิเอชันของปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระ ดังเช่นสมการที่ 1

$$RH \longrightarrow R^{\cdot} \qquad \text{สมการ 1}$$

2. Propagation step

อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในขั้นตอนอินนิทิเอชันจะดำเนินปฏิกิริยาต่อไปในขั้นตอนพรอพาเกชัน โดยเกิดปฏิกิริยาขึ้น 2 ทาง คือ โดยการดึงเอาอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลข้างเคียง หรือโดยการทำปฏิกิริยากับโมเลกุลออกซิเจนที่อยู่ในสถานะ ground state ทำให้ได้อนุมูลอิสระตัวใหม่ ดังสมการที่ 2 – 4

$$RH + R^{1\cdot} \rightleftharpoons R^{\cdot} + R^1H \qquad \text{สมการ 2}$$

$$R^{\cdot} + {}^3O_2 \rightleftharpoons ROO^{\cdot} \qquad \text{สมการ 3}$$

$$ROO^{\cdot} + RH \rightleftharpoons ROOH + R^{\cdot} \qquad \text{สมการ 4}$$

3. Termination step

ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น 2 อนุมูลมารวมกันได้เป็นสารที่มีความเสถียร จึงเป็นการหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระ ดังสมการที่ 5 และ 6

$$ROO^{\cdot} + ROO^{\cdot} \rightleftharpoons ROOR + O_2 \qquad \text{สมการ 5}$$

$$ROO^{\cdot} + R^{\cdot} \rightleftharpoons ROOR \qquad \text{สมการ 6}$$

(1,4)

การป้องกันอันตรายและความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ

โดยธรรมชาติแล้วจะมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในเซลล์และร่างกายหลายชนิด มีทั้งที่เป็นประโยชน์และให้โทษอันประกอบด้วย อนุมูลอิสระที่หลุดรอดออกมาจากการเผาผลาญออกซิเจนเป็นพลังงาน อนุมูลอิสระที่ทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณต่อเซลล์ และอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์ต่อการทำงานของเซลล์หรืออวัยวะ ในกรณีหลังจะมีประโยชน์แต่ออกฤทธิ์ในปริมาณที่ต่ำมากไม่เกิดอันตรายต่อเซลล์ เซลล์และร่างกายจะเป็นอันตรายและเสียหาย หากมีอนุมูลอิสระในปริมาณมากเกินสมดุล ดังนั้นเซลล์และร่างกายจึงมีกลไกเพื่อควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระไม่ให้สูงจนเกิดอันตราย กลไกสำคัญที่ทำหน้าที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระมีกลไกหลักอยู่สามกลไก ทำหน้าที่ลดผลกระทบที่เป็นอันตรายของอนุมูลต่อเซลล์ ในสภาวะปกติกลไกเหล่านี้ถือว่าเพียงพอ ต่อการรักษาปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุลได้ กล่าวคือสามารถควบคุมได้แม้ว่าจะมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้น อย่างไรก็ตามหากเกิดภาวะผิดปกติที่ทำให้กลไกการป้องกันเหล่านี้บกพร่องไม่สามารถที่จะควบคุมภาวะสมดุลได้ จะนำไปสู่การเกิดภาวะที่อนุมูลและสารออกซิแดนท์มีมากเกินสมดุล (Oxidative stress) และเกิดโรคต่างๆขึ้นในร่างกายได้ (5)

สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ คือสารที่มีหน้าที่ต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ในที่นี้รวมถึงสารที่สามารถยับยั้งและควบคุมอนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน จึงช่วยยับยั้งอนุมูลอิสระไม่ให้ทำลายองค์ประกอบของเซลล์ สารต้านอนุมูลอิสระมีทั้งที่เป็นสารจากธรรมชาติ เช่น Amino acid, Ascorbic acid, Carotenoids, Flavonoids, Tannins, Tocopherols เป็นต้น โดยทั่วไปสารต้านอนุมูลอิสระ แบ่งเป็น 5 ประเภทใหญ่ๆ ดังนี้

1. Primary antioxidant

สารในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิค(Phenolic compounds) ทำหน้าที่หยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระในปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน นอกจากนี้ยังรวมถึงสารโทโคฟีรอลธรรมชาติและสังเคราะห์ (Natural and synthetic tocopherol) alkyl gallate BHA BHT TBHQ และอื่นๆ ซึ่งสารในกลุ่มดังกล่าว ทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเลคตรอน

2. Oxygen scavenger

สารในกลุ่มนี้ได้แก่ กรดแอสคอร์บิค หรือวิตามินซี เป็นต้น สารในกลุ่มนี้จะเข้าทำปฏิกิริยากับออกซิเจน จึงเป็นการช่วยกำจัดออกซิเจนในระบบปิดได้

3. Secondary antioxidant

สารในกลุ่มนี้ได้แก่ dilauryl thiopropionate และ thiopropionic acid ทำหน้าที่สลายโมเลกุลของ lipid hydroperoxide ให้เป็นสารที่มีความเสถียร

4. Enzymic antioxidant

สารในกลุ่มนี้ได้แก่ เอนไซม์ต่างๆ ซึ่งแบ่งเป็น primary antioxidant enzyme และ auxiliary antioxidant enzyme สารในกลุ่มนี้ทำหน้าที่กำจัดออกซิเจนหรืออนุพันธ์ของออกซิเจน โดยเฉพาะไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

5. Chelating agent หรือ sequestrant

สารในกลุ่มนี้ เช่น กรดซิตริค กรดอะมิโน เป็นต้น สารในกลุ่มนี้ทำหน้าที่ไปจับกับไอออนของโลหะ เช่น เหล็ก และทองแดง ซึ่งไอออนเหล่านี้เป็นไอออนที่ส่งเสริมและเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน ทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่เสถียร (1)

การวิเคราะห์หาความสามารถรวมในการต้านออกซิเดชัน (Total Antioxidant Capacity, TAC)

การวิเคราะห์หาความสามารถรวมในการต้านออกซิเดชัน มีหลายวิธี ได้แก่

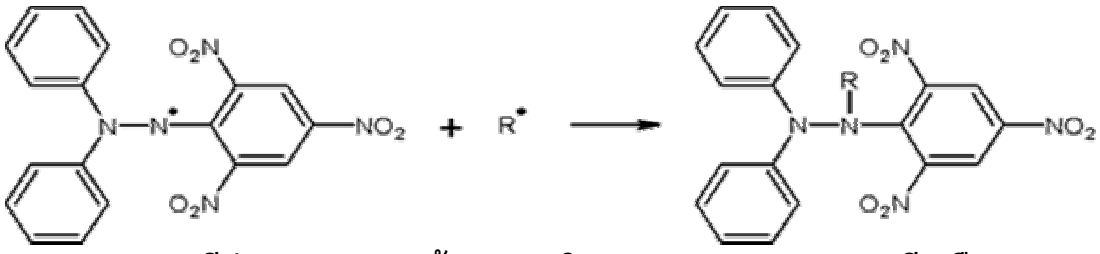
1. การวิเคราะห์จากการส่งผ่านอะตอมไฮโดรเจน (Hydrogen atom transfer, HAT) เช่น

- วิธี Oxygen radical absorbance capacity assay (ORAC) และ
- วิธี Total radical – trapping antioxidant parameter (TRAP)

2. การวิเคราะห์จากการส่งผ่านอิเลคตรอนเดี่ยว (Electron transfer, ET หรือ SET) เช่น

- วิธี Diphenyl – 1 – picrylhydrazyl assay (DPPH)
- วิธี The ferric reducing ability of plasma assay (FRAP)
- วิธี Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) (6)

ในการศึกษานี้จะใช้วิธี DPPH โดยอนุมูล $DPPH^{\cdot}$ เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัว มีสีม่วงอยู่ในรูปอนุมูลอยู่แล้ว โดยไม่ต้องทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดอนุมูล การวิเคราะห์เป็นการวัดความสามารถในการรีดิวซ์ การวัดทำโดยใช้เครื่องสเปคโตรวัดการลดลงของสี เมื่อเติมสารต้านอนุมูลลงไป โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร (7) ดังรูป



DPPH· **(สีม่วง)** **สารต้านอนุมูลอิสระ** DPPH· **(สีเหลือง)**

รูปที่ 1 สมการการเกิดปฏิกิริยา หลังจากการเติมสารต้านอนุมูล (8)

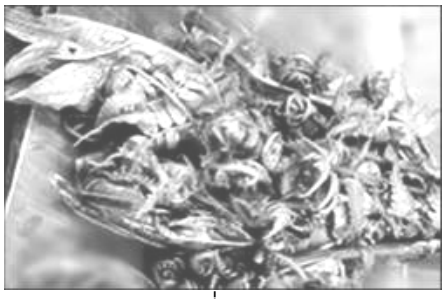
ข้อดี ของวิธีนี้มีข้อดี คือ ง่าย ใช้เครื่องมือสามัญที่มีทั่วไป นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลของสารต้านอนุมูลจากธรรมชาติ ยกเว้นสารกลุ่มแคโรตินอยด์ที่มีการดูดกลืนแสงในย่านเดียวกัน

ข้อด้อย ของวิธีนี้คือ อนุมูล DPPH· มีความคงตัวไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลที่เกิดในเซลล์หรือร่างกาย ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่สามารถแยกแยะจัดอันดับอนุมูลที่มีความไวสูงได้ นอกจากนี้ โครงสร้างทางเคมีของ DPPH· ที่แสดงจะเห็นว่าอิเลคตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระจะถูกบดบังด้วยวงเบนซีน 3 วง และหมู่ไนโตร ทำให้สารต้านอนุมูลที่มีฤทธิ์แรงแต่มีขนาดใหญ่บางสารไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยาขจัดอนุมูลหรือเกิดปฏิกิริยาช้ากว่าความเป็นจริง ทั้งๆที่ สารต้านอนุมูลนั้นมีฤทธิ์ดีในการขจัดอนุมูลเปอร์ออกซี นอกจากนี้สารรีดิวซ์สามารถทำให้สี DPPH· จางลงได้อีกด้วย (6)

ผักที่นำมาศึกษา

1.ผักกูด
2.ผักติ้ว
3.ผักปลังขาว
4.ย่านาง
5.ผักเหมียง
6.ผักหวานบ้าน

1.ผักกูด



รูปที่ 2 ผักกูด

วงศ์ : ATHYRIACEAE

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Diplazium esculentum* (Retz.) Swartz

ชื่อพื้นเมือง : ผักกูดขาว (เชียงใหม่) ผักกูด (กลาง)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ :

ผักกูดเป็นผักจำพวกเฟิร์น มีเหง้าตั้งตรง สูงมากกว่า 1 เมตร มีเกล็ดสีน้ำตาลเข้ม ขอบดำ ขอบเกล็ดหยักซี่ฟัน ลักษณะของใบเป็นใบประกอบแบบขนนกสองชั้น แผ่นใบมีขนาดต่างกัน มักยาวกว่า 1 เมตร ก้านใบยาว 70 เซนติเมตร กลุ่มใบย่อยคู่ล่าง มักลดขนาด ปลายเรียวแหลม โคนรูปกึ่งหัวใจหรือรูปติ่งหู ขอบหยักเว้าลึกเป็นแฉกเกือบถึงเส้นกลาง ใบย่อย แฉกปลายมน ขอบหยักซี่ฟัน แผ่นใบบาง กลุ่มอับสปอร์ อยู่ตามความยาวของเส้นใบย่อย มักเชื่อมกับกลุ่มอับสปอร์ที่อยู่ในแฉกติดกันซึ่งมีเส้นใบมาสานกัน

การขยายพันธุ์ : สปอร์และเหง้า

การใช้ประโยชน์ :

ทางอาหาร : ใบอ่อนและช่ออ่อน แกงผักกูด แกงกับปลาสด และนำมาลวกหรือสด รับประทานเป็นผักจิ้มร่วมกับน้ำพริกแดง น้ำพริกปลาร้า หรือนำมาแกงแคร่วมกับผักชนิดอื่นๆ

ทางยา : ใบ แก้ไข้ตัวร้อน แก้พิษอักเสบ บำรุงสายตา บำรุงโลหิต แก้โลหิตจาง ป้องกันเลือดออกตามไรฟัน ขับปัสสาวะ

ฤดูที่ใช้ประโยชน์ : ฤดูฝน (9)

2. ผักติ้ว

รูปที่ 3 ผักติ้ว

วงศ์ : GUTTIFERAE

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Cratoxylum formosum* (Jack) Dyer ssp. Pruniflorum(Kurz.) Gogelin

ชื่อพื้นเมือง : แต้ว (ไทย) , ติ้วขน (กลางและนครราชสีมา), ติ้วขาว (กรุงเทพฯ) , ติ้วส้ม (นครราชสีมา), เตา (เลย), ขี้ติ้ว ติ้วเหลือง (ไทย), ผักติ้ว(อุบลราชธานี มหาสารคาม-อีสาน), ติ้วแดง ติ้วยาง ติ้วเลือด (เหนือ), แต้วหิน(ลำปาง), กุยฉ่องเช้า (กระเหรี่ยง ลำปาง), กวยโซง (กระเหรี่ยง-กาญจนบุรี), ตาว(สตูล), มูโต๊ะ(มาเลเซีย-นราธิวาส),เน็คเคร่แย(ละว้า-เชียงใหม่), ราเง้ง(เขมร-สุรินทร์)

ผักติ้วหรือผักแต้ว เป็นไม้ป่าที่ขึ้นประปราย ในป่าเบญจพรรณแล้ง ในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและทางตอนเหนือของภาคใต้ ในที่สูงจากระดับน้ำทะเลตั้งแต่ 200 – 1,000 เมตร

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ :

ผักติ้วเป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็กถึงขนาดกลางสูง 8 – 15 เมตร เรือนยอดเป็นพุ่มกลม กิ่งอ่อนมีขนนุ่มทั่วไป เปลือกสีน้ำตาลไหม้ แตกเป็นสะเก็ด เปลือกในสีน้ำตาลแกมเหลือง และมีน้ำยางสีเหลืองปนแดงซึมออกมา ใบมนแกมรูปไข่กลับ และรูปขอบขนาน กว้าง 2 – 4 เซนติเมตร ยาว 3 – 13 เซนติเมตร ออกเป็นคู่ๆตรงข้ามกัน โคนสอบเรียวส่วนที่ค่อนไปทางปลายใบโตออก ปลายสุดสอบเข้า เนื้อบางหลังใบมีขนสากท้องใบมีขนนุ่มหนาแน่น ดอกสีชมพูอ่อนถึงสีแดง กลิ่นหอมอ่อนๆ ออกเป็นดอก ผลรูปร่างรีขนาดกว้าง 1 เซนติเมตร ยาว 2 เซนติเมตร หรือย่อมกว่าเล็กน้อย มีนวลขาวติดตามผิว เมื่อแก่จัดแตกออกเป็น 3 แฉก เมล็ดสีน้ำตาล

การขยายพันธุ์: เมล็ด ปักชำ

การใช้ประโยชน์ :

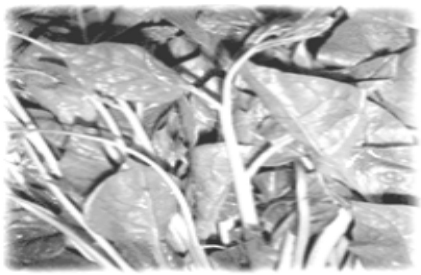
ทางอาหาร : ดอกอ่อน ใบอ่อนและช่อดอกอ่อนรับประทานเป็นผักได้ การปรุงอาหาร ชาวไทยภาคกลางและชาวอีสานรับประทานต้นติ้วเป็นผัก โดยที่ชาวไทยภาคกลางรับประทานยอดติ้ว

อ่อน เป็นผักจิ้มกับน้ำพริกและรับประทานดอกติ้วสดกับน้ำพริกปลาร้า ดอกติ้วมีรสเปรี้ยวนิดๆ จิ้มกับน้ำพริกปลาร้ามีรสอร่อยมาก ส่วนชาวอีสานรับประทานยอดอ่อน ใบอ่อนและช่อดอกเป็นผักสด แกล้มลาบ ก้อย น้ำพริก ซุป หมี่กะทิ หรือนำไปแกง เพื่อให้อาหารออกรสเปรี้ยว ส่วนดอกนำไปต้มแกง บางครั้งแกงรวมกันทั้งยอดอ่อนและดอกอ่อนเป็นผักที่อีสานนิยมรับประทานมากอีกชนิดหนึ่ง และมีจำหน่ายในท้องตลาดของท้องถิ่นอีสาน

ทางยา : -

ฤดูที่ใช้ประโยชน์ : ยอดอ่อนและใบอ่อนผลิในฤดูฝนและฤดูหนาว (2)

3. ผักปลังขาว



รูปที่ 4 ผักปลังขาว

วงศ์ : BASELLACEAE

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Basella Alba* L.*, Basella rubra* L.

ชื่อพื้นเมือง : ผักปลังขาว (ภาคกลาง), ผักปั๋ง (เหนือ)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ :

ลักษณะของลำต้นเป็นไม้เลื้อยพันต้นไม้อื่น ลำต้นอวบน้ำสีเขียวอ่อน ผิวเรียบเป็นมัน มีใบเดี่ยวเรียงสลับ รูปหัวใจขอบใบเรียบ แผ่นใบเป็นมันวาว สีเขียวอ่อน ความกว้างและความยาวประมาณ 5 – 8 เซนติเมตร อวบน้ำ มีดอกช่อออกตามซอกใบ ดอกติดที่ก้านออกสีขาวหรือสีชมพูอ่อน ลักษณะผลทรงกลมสีเขียวขนาด 0.3 – 0.5 เซนติเมตร เมื่อสุกจะมีสีน้ำตาลเข้มหรือดำ ภายในผลมีเมล็ดทรงกลม มีสีน้ำตาล เปลือกแข็ง

การขยายพันธุ์ : เมล็ด หรือ ปักชำเถา

การใช้ประโยชน์ :

ทางอาหาร : ยอดและดอกอ่อนนำไปต้ม ลวก หรือนึ่งให้สุก รับประทานเป็นผักจิ้มน้ำพริก แกงส้ม แกงแค ผัดกับแหนมหรือแกงใส่อ่อมหอย

ทางยา : ก้าน แก้พิษฝี แก้ขัดเบา แก้พรรดึก แก้ท้องผูก ลดไข้ ลดอาการแน่นท้อง *ใบ* ขับปัสสาวะ แก้อาการอักเสบ แก้กลาก บรรเทาอาการผื่นคัน น้ำคั้นจากใบเป็นเมือกใช้ทาช่องคลอดช่วยช่วยให้หญิงมีครรภ์คลอดง่ายขึ้น ดอก ทาแก้กลากเกลื้อน ราก แก้มือเท้าด่าง แก้รังแค แก้พรรดึก ใช้เป็นยาถูนวดให้ร้อน

ฤดูที่ใช้ประโยชน์ : ตลอดปี (10)

4. ย่านาง

รูปที่ 5 ย่านาง

วงศ์ : MENISPERMACEAE

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Tiliacora triandra* Diels.

ชื่อพื้นเมือง : เถาวัลย์เขียว เถาย่านาง ผักจอยนาง จอยนาง (เชียงใหม่) เครือย่านาง ปู่เจ้าเขาเขียว ขันยอ แฮนกึม

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ :

เป็นไม้เลื้อย กิ่งอ่อนมีขนอ่อนปกคลุม เมื่อแก่แล้วผิวค่อนข้างเรียบ รากมีขนาดใหญ่ ใบเดี่ยวออกติดกับลำต้นแบสลับ รูปร่างใบคล้ายรูปไข่หรือรูปไข่ขอบขนาน ปลายใบเรียว ฐานใบมน ขนาดใบยาว 5 – 10 เซนติเมตร กว้าง 2 – 4 เซนติเมตร ก้านใบยาว 1 เซนติเมตร ดอกออกตามซอกโคนเป็นช่อยาว 2 – 5 เซนติเมตร ช่อหนึ่งๆมีดอกขนาดเล็กสีเหลือง 3-5 ดอก ดอกแยกเพศอยู่คนละต้นไม่มีกลีบดอก ผลรูปร่างกลมรี ขนาดเล็ก สีเขียว เมื่อแก่กลายเป็นสีเหลืองอมแดง และกลายเป็นสีดำ

การขยายพันธุ์ : เมล็ด หัว

การใช้ประโยชน์ :

ทางอาหาร : เถาใบอ่อน และใบแก่ นำมาตำคั้นเอาน้ำสีเขียวไปทำแกงหน่อไม้ ใส่ในแกงขนุน แกงอีรอก อ่อม ห่อหมก ซุปหน่อไม้ แกงต้มเปรอะ แกงยอดหวาย

ทางยา : ทั้งต้น ปรุงเป็นยาแก้ไข้กลับ ใบ เป็นยาถอนพิษ ราก เป็นยากระทุ้งเป็นพิษไข้ แก้ไข้ แก้เมาสุรา ถอนพิษสำแดง แก้ไม่ผูกถ่าย

ฤดูกาลที่ใช้ประโยชน์ : ตลอดปี(10)

5. ผักเหมียง

รูปที่ 6 ผักเหมียง

วงศ์ : GNETACEAE

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Gnetum gnemon* L. Var. tenerum Markgr.

ชื่อพื้นเมือง: เหลียง (ชุมพร ระนอง ประจวบคีรีขันธ์-ใต้), เหมียง (พังงา ภูเก็ต กระบี่ –ใต้), เขลียง เรียนแก่ (นครศรีธรรมราช), เหรียง (สุราษฎร์ธานี), ผักกะเหรี่ยง (ชุมพร), ผักเมี่ยง (พังงา)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ :

ผักเหมียงเป็นไม่พุ่มสูงประมาณ 3 – 4 เมตร เป็นพืชที่เจริญทางใบมากกว่าลำต้นรากแก้วของเหมียงใหญ่ แข็งแรงหยั่งลึกลงในดิน สามารถทนแล้งได้ดีรากแขนงน้อยในรูปร่างกลมรี คล้ายหอกใบงอกมาจากปลายยอดของต้นและกิ่งเป็นคู่ๆใบยาว 10 – 20 เซนติเมตร กว้าง 10 เซนติเมตร ปลายใบเรียวแหลมและปลายใบมนแหลม ใบสีเขียวเป็นมันสดใสเมื่ออยู่ในร่มเงา แต่ถ้าอยู่ในที่โล่งใบจะสีจางหรือขาวทั้งใบ เหมียงจะออกดอกติดผลเมื่ออายุ 5 – 6 ปี ออกดอกในเดือนพฤศจิกายน – ธันวาคม ดอกขนาดเล็ก สีขาว ช่อยาว 3 – 4 เซนติเมตร ผลแก่จัดช่วงเดือนมีนาคม-เมษายน ผลกลมยาวคล้ายไข่ ผลแก่จะมีสีเหลืองเปลือกบาง ผลหนึ่งช่อมี 10 – 20 ผล

การขยายพันธุ์ : เมล็ด ตอนกิ่ง ปักชำหรือใช้ต้นจากรากแขนง

การใช้ประโยชน์ :

ผักเหมียงมีคุณค่าทางอาหารสูงทำให้ร่างกายแข็งแรง ใช้ยอดอ่อนใส่เข้าปากเคี้ยวไปเรื่อยๆลดความกระหายน้ำได้

ทางอาหาร : ยอดอ่อน ใบอ่อน ดอกของผักเหมียงใช้เป็นผักได้ยอดอ่อนและใบอ่อนจะเก็บรับประทานได้ตลอดปีส่วนดอกออกในฤดูหนาว

ฤดูกาลที่ใช้ประโยชน์ : ฤดูฝน(11)

6. **ผักหวานบ้าน**

รูปที่ 7 ผักหวานบ้าน

วงศ์ : EUPHORBIACEAE

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Sauropus androgynus* Merr.

ชื่อพื้นเมือง : ผักหวาน ผักหวานบ้าน (กลาง อีสาน), จ๊าผักหวาน ก้านตง (เหนือ), มะยมป่า (ประจวบคีรีขันธ์), ผักหวานใต้ใบ (สตูล-ใต้), โกหลุ่ยกะนีเด๊าะ (เขมร-แม่ฮ่องสอน), นานาเชียม (มาเลย์-สตูล)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ :

ผักหวานบ้านเป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก สูงประมาณ 0.8 – 2 เมตร กิ่งก้านสีเขียวปนเทาค่อนข้างเล็ก ใบเป็นใบเดี่ยว ก้านใบสั้น ออกแบบสลับ ใบรูปร่างกลม หรือค่อนข้างเป็นสี่เหลี่ยมขนมเปียกปูนก็มี ใบกว้าง 2 – 3.2 เซนติเมตร ยาว 3.2 – 6 เซนติเมตรปลายใบแหลม โคนใบมน ขอบใบเรียบ มีลักษณะคล้ายใบมะยม มีสีนวลขาวๆบนหน้าใบ ดอกเป็นดอกเดี่ยวหรือออกเป็นกลุ่ม กลุ่มละ 2 – 4 ดอก สีม่วงแดงหรือสีแดงเข้ม ออกตามซอกใบ มีผล 3 พูสีขาวนวล และออกสีชมพูเล็กน้อย รูปคล้ายลูกมะยมเรียงตัวกันอยู่ใต้ใบ แต่มีขนาดเล็กกว่า คือมีเส้นผ่านศูนย์กลางผลประมาณ 1.0 – 1.5 เซนติเมตร เมล็ดเป็นรูปสามเหลี่ยมขนาดเล็ก

การขยายพันธุ์ :

ผักหวานบ้านเป็นพืชที่ชอบที่ลุ่มต่ำ มีความชื้นพอเหมาะ มักพบในป่า ทุ่งป่าผสมผลัดใบ ป่าแดง และตามบริเวณทุ่งนา ปลูกง่าย ขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ด มักพบว่าชาวบ้านภาคกลางและภาคอีสานนำมาปลูกไว้ในสวนหรือใกล้บ้าน เพื่อเก็บยอดมารับประทาน

การใช้ประโยชน์ :

ทางอาหาร : ยอดอ่อนใบอ่อน ลูกอ่อน รสเย็น ใช้รับประทานเป็นผัก โดยยอดอ่อนและใบอ่อนนำมาต้ม ลวก นึ่งหรือผัดน้ำมันให้สุก นำมารับประทานแกล้มกับน้ำพริกรสจัด หรืออาจนำผักหวานบ้านมาปรุงเป็นอาหาร เช่น แกงกับหมู แกงกับปลา แกงเลียง แกงอ่อม มีรสหวาน อร่อยน่ารับประทาน

ทางยา : ใช้รากฝนทาแก้คางทูม สรรพคุณระงับความร้อน ถอนพิษไข้ซ้ำ ไข้กลับ เนื่องจากรับประทานของแสลง

ฤดูที่ใช้ประโยชน์ : ฤดูฝน (9)

วิธีดำเนินการวิจัย

วัตถุประสงค์

1.เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของผักพื้นบ้าน

2.เพื่อตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีทางเคมีเบื้องต้นและThin Layer Chromatography (TLC)

วัสดุและอุปกรณ์

สารเคมี

1. Methanol
2. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
3. Ascorbic acid (vitamin C)
4. Trolox
5. n-butanol
6. Acetic acid
7. Ferric chloride
8. Tannic acid
9. Catechol

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. Water bath
2. TLC developing tank
3. TLC silica GF254
4. UV-spectrophotometer
5. Micropipette ขนาด 100 ไมโครลิตร
6. Beaker ขนาด 50 มิลลิลิตร
7. Beaker ขนาด 100 มิลลิลิตร
8. Beaker ขนาด 250 มิลลิลิตร
9. Beaker ขนาด 400 มิลลิลิตร

10. Beaker ขนาด 600 มิลลิลิตร

11. Cylinder ขนาด 5 มิลลิลิตร

12. Volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร

13. Volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร

14. Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร

15. Pipet ขนาด 1 มิลลิลิตร

16. Pipet ขนาด 2 มิลลิลิตร

17. Pipet ขนาด 5 มิลลิลิตร

18. Pipet ขนาด 10 มิลลิลิตร

19. Test tube ขนาด 5 มิลลิลิตร

20. เครื่องปั่นแยกกาก

21. มีด, เขียง

22. ผ้าขาวบาง

23. ผักพื้นบ้านทั้ง 6 ชนิด คือ ผักกูด ผักติ้ว ผักปลังขาว ย่านาง ผักเหมียง ผักหวานบ้าน

วิธีการวิจัย

1.การเตรียมสารสกัดจากผักพื้นบ้านและสารละลายของสารสกัดแยกที่ละลายในน้ำและไม่ละลายในน้ำ

1.1 การเตรียมสารสกัดจากผักพื้นบ้าน

- นำผักพื้นบ้านทั้ง 6 ชนิด คือ ผักกูด ผักติ้ว ผักปลัง ย่านาง ผักเหมียง ผักหวานบ้าน ล้างให้สะอาดและหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ

- ชั่งมาประมาณ 200 กรัม ใส่ในโหลแก้ว

- จากนั้นนำมาสกัดด้วยเมทานอล 99.8 % พอท่วม ปิดด้วย paraffin, foil และปิดฝาให้สนิท ตามลำดับ

- นำไปไว้ในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน โดยมีการเขย่าทุกวัน

- เมื่อครบกำหนดตามเวลา จึงนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง

- นำกากมาทำการสะบัดแยก ล้างด้วย methanol

- จากนั้นนำสารที่สกัดได้ ไประเหยแห้งบนเครื่องอังไอน้ำที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียล จนแห้ง จนได้สารสกัดแห้ง แล้วชั่งน้ำหนักสารสกัดแห้งที่ได้พร้อมจดบันทึก

1.2 การเตรียมสารละลายของสารสกัดแยกที่ละลายในน้ำและไม่ละลายในน้ำ

- นำสารสกัดแห้งจากข้อ1.1 ไปละลายน้ำแล้วนำมากรองจะได้สารสกัดแยกที่ละลายในน้ำ ส่วนสารสกัดที่ติดบนกระดาษกรองนำมาละลายกลับด้วย Methanol จะได้สารสกัดแยกที่ไม่ละลายในน้ำ (5, 7)

- เตรียมสารสกัดแยกที่ละลายในน้ำ โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลายในความเข้มข้นต่างๆกัน (50 – 1,000 µg/ml)

- เตรียมสารสกัดแยกที่ไม่ละลายในน้ำ โดยใช้ Methanol เป็นตัวทำละลายในความเข้มข้นต่างๆกัน (50 – 1,000 µg/ml)

2. Spectrophotometric assay

2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

- เตรียมสารละลายมาตรฐาน Vitamin C โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย เตรียม 4 ความเข้มข้น (5 – 20 µg/ml)

- เตรียมสารละลายมาตรฐาน Trolox โดยใช้ Methanol เป็นตัวทำละลาย เตรียม 4 ความเข้มข้น (5 – 25 µg/ml)

2.2 การเตรียมสารละลาย Methanolic DPPH radical ให้มีความเข้มข้น 2.0 mM

- วิธีเตรียมสารละลาย DPPH

คำนวณ : ความเข้มข้น ของ DPPH ที่ต้องการ คือ 2.0 mM

จากสูตร

$$\frac{M_1V_2}{1000} = \frac{g}{M.W.} \qquad (\text{DPPH มี M.W.} = 394.4)$$

$$g = \frac{M_1V_2 \times M.W.}{100}$$

$$= \frac{2.0 \times 10^{-3} \times 100 \times 394.4}{1000}$$

$$= 0.00789\ g$$

ชั่ง DPPH 7.9 mg ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml เติม methanol analytical grade ประมาณครึ่งหนึ่ง ของ volumetric flask เขย่าให้เข้ากัน และปรับปริมาตรจนถึงขีดที่กำหนด (8)

2.3 การตรวจวัดคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานและสารสกัดแยกผักพื้นบ้าน

- เติมสารละลาย Methanolic DPPH radical จากข้อ 2.2 ลงใน test tube จำนวน 200 µl
- เติมตัวทำละลายน้ำหรือ Methanol จนครบ 3 ml
- เติมสารละลายมาตรฐาน หรือสารสกัดแยกผักพื้นบ้านที่ละลายในน้ำหรือไม่ละลายในน้ำที่เตรียมไว้จากข้อ 1.2 ในแต่ละความเข้มข้น จำนวน 100 µl
- เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที
- วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 515 nm
-นำค่าที่วัดได้ในแต่ละความเข้มข้นหาค่าเฉลี่ย แล้วนำมาคำนวณ % inhibition จากสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = 1 - \left\{ \frac{A_{sample}}{A_{control}} \right\} \times 100$$

เมื่อ A_{sample} = absorbance ที่วัดได้ของสารสกัดตัวอย่างที่ผสมกับ Methanolic DPPH radical

$A_{control}$ = absorbance ที่วัดจาก Methanolic DPPH radical ผสม กับ ตัวทำละลายที่ใช้ (8)

3. Phytochemical screening

เป็นการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากผักพื้นบ้าน เพื่อต้องการทราบว่าผักพื้นบ้านที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนั้น มีองค์ประกอบทางเคมีเป็นกลุ่มใดโดยใช้ปฏิกิริยาเคมีง่ายๆ ซึ่งจะให้ผลเป็นสีหรือการเกิดตะกอน ในการวิจัยนี้จะตรวจสอบสารกลุ่ม Flavonoids และ Phenolic compounds and Tannins โดยองค์ประกอบเคมีเหล่านี้สามารถแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ (12) มีการใช้สารตรวจสอบดังนี้

- การตรวจสอบสารกลุ่ม Flavonoids ใช้ Shinoda test
- การตรวจสอบสารกลุ่ม Phenolic compounds and Tannins ใช้
  - 1% Ferric chloride solution ทดสอบ Phenolic compound
  - Gelatin solution ทดสอบ Tannin
  - Gelatin salt solution ทดสอบ Tannin
  - Bromine water ทดสอบ Condense tannins
  - Vanillin – HCL test ทดสอบ Condense tannins
  - Lime water ทดสอบ Hydrolysable tannins

4. Thin Layer Chromatography (TLC) Fingerprints

เป็นการจัดทำ TLC Fingerprints เพื่อใช้เปรียบเทียบในการศึกษาครั้งต่อไป ซึ่งตรวจสอบโดยอาศัยการแยกของสารด้วยวิธี Thin Layer Chromatography

- โดย Adsorbent ที่ใช้เป็นชนิด silica gel GF_{254}
- นำไป development ใน Solvent system ที่เหมาะสม ซึ่งทำในระบบปิด โดยระบบที่ใช้แยกสารสกัด คือ n – Butanol: Acetic acid: Water ในอัตราส่วน 4: 3: 1
- จากนั้นนำแผ่น TLC ออกจากTank ที่ใช้เป็นระบบปิด แล้วทำให้แห้ง
- พ่นด้วย 1 % Methanolic ferric chloride สารมาตรฐานที่ใช้ในการเปรียบเทียบคือ Tannic acid, Catechol (13)

ผลการวิจัย

1.การเตรียมสารสกัดจากผักพื้นบ้านและสารละลายของสารสกัดแยกที่ละลายในน้ำและไม่ละลายในน้ำ

จากการนำผักพื้นบ้านทั้ง 6 ชนิดมา 200 กรัม หมักด้วย methanol 99.8 % และนำไประเหยแห้งจะได้น้ำหนักสารสกัดและ % yield ดังตารางที่ 1 โดยผักติ้วได้น้ำหนักสารสกัด และมี % yield มากที่สุด คือ 23.81 กรัม และ 11.91 % ตามลำดับ ขณะที่ผักเหมียงได้น้ำหนักสารสกัดและมี % yield น้อยที่สุด คือ 9.38 กรัม และ 4.69 % ตามลำดับ เมื่อเทียบกับผักที่เหลืออีก 4 ชนิดที่ทำการทดลอง

ตารางที่ 1 ปริมาณสารสกัดและ% yield ของผักพื้นบ้านแต่ละชนิด

ตัวอย่างพืช	น้ำหนักผักสด (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด(กรัม)	% yield
ผักกูด	200	10.05	5.03
ผักติ้ว	200	23.81	11.91
ผักปลังขาว	200	14.85	7.43
ย่านาง	200	15.40	7.70
ผักเหมียง	200	9.38	4.69
ผักหวานบ้าน	200	11.47	5.74

2. Spectrophotometric assay

เมื่อวัดการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน Vitamin C และ Trolox ที่ความยาวคลื่น 515 nm โดยวัด absorbance 2 ครั้ง ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน จากนั้นนำมาหาค่าเฉลี่ย และนำไปคำนวณ % inhibition ได้ค่าดังตารางที่ 2 และ 3 ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน Vitamin C

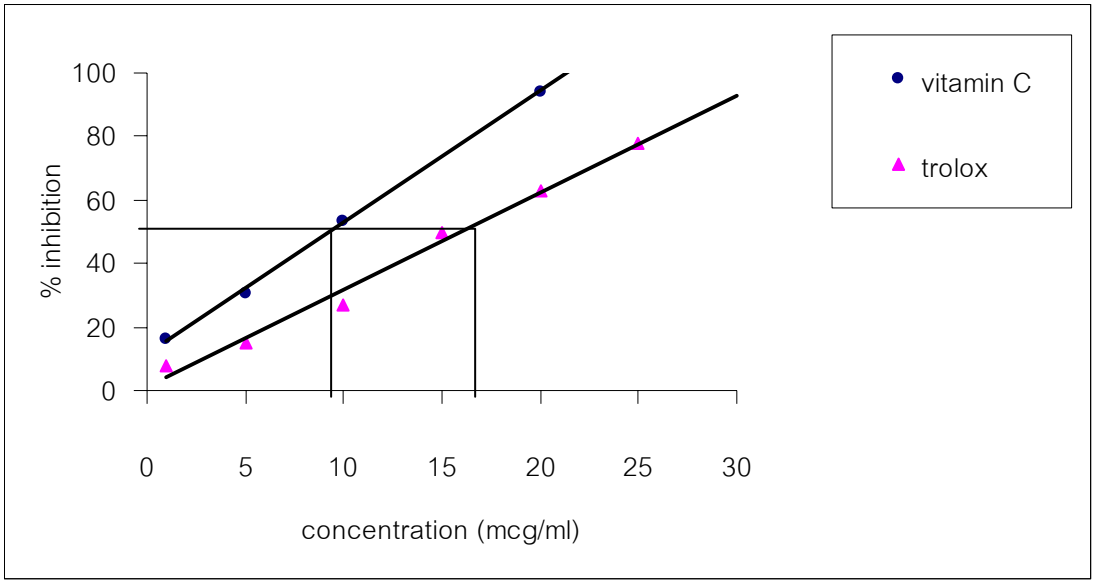
Conc. (µg/ml)	Methanol			
	Absorbance			%inhibition
	วัดครั้งที่ 1	วัดครั้งที่ 2	Average	
1	0.198	0.200	0.199	16.03
5	0.166	0.163	0.165	30.59
10	0.110	0.111	0.111	53.38
20	0.014	0.013	0.014	94.30

ตารางที่ 3 ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน Trolox

Conc. (µg/ml)	Methanol			
	Absorbance			%Inhibition
	วัดครั้งที่ 1	วัดครั้งที่ 2	Average	
1	0.236	0.245	0.241	7.50
5	0.218	0.223	0.221	15.19
10	0.190	0.189	0.190	27.12
15	0.140	0.123	0.132	49.42
20	0.090	0.102	0.096	63.08
25	0.056	0.058	0.057	78.08

เมื่อนำข้อมูลจากตารางที่ 2 และ 3 ของสารมาตรฐาน Vitamin C และ Trolox มาจัดทำกราฟเส้นตรง ระหว่าง % inhibition กับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหา IC_{50} พบว่า สารมาตรฐาน vitamin C และ Trolox มี IC_{50} เท่ากับ 9.34 µg/ml, 15.91 µg/ml ตามลำดับ ดังรูปที่ 8

รูปที่ 8 กราฟความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรงของสารมาตรฐาน Vitamin C และ Trolox กับ % inhibition



ตารางที่ 4 แสดงค่า % inhibition ของสารสกัดผักพื้นบ้าน 6 ชนิดที่นำมาทดลอง ทั้งสารสกัดแยกที่ละลายในน้ำและสารสกัดแยกที่ไม่ละลายในน้ำที่ความเข้มข้น 1,000 µg/ml ความยาวคลื่น 515 nm จากค่าที่แสดงดังตารางจะเห็นว่า สารสกัดผักติ้วทั้งส่วนที่ละลายในน้ำและไม่ละลายในน้ำมี % inhibition เท่ากับ 61.90 % และ 97.00% ตามลำดับ และสารสกัดย่านางทั้งส่วนที่ละลายในน้ำและไม่ละลายในน้ำมี % inhibition เท่ากับ 59.84% และ 66.30% ตามลำดับ มีค่ามากกว่า 50 % ซึ่งสามารถนำมาหา IC_{50} ได้ ส่วนสารสกัดผักกูด ผักปลังขาว ผักเหมียง ผักหวานบ้าน ทั้งส่วนที่ละลายในน้ำและไม่ละลายในน้ำมี % inhibition น้อยกว่า 50 %

ตารางที่ 4 ค่า % Inhibition ของสารสกัดแยกที่ละลายในน้ำและไม่ละลายในน้ำที่ความเข้มข้น 1000 µg/ml วัด absorbance 515 nmที่ 30 นาที

สารสกัดผัก	% Inhibition	
	สารสกัดแยกที่ละลายในน้ำ	สารสกัดแยกที่ไม่ละลายในน้ำ
ผักกูด	37.56	26.16
ผักติ้ว	61.90	97.00
ผักปลังขาว	25.41	11.73
ย่านาง	59.84	66.30
ผักเหมียง	23.99	7.04
ผักหวานบ้าน	36.78	17.67

จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผักพื้นบ้านทั้ง 6 ชนิด คือ ผักกูด ผักติ้ว ผักปลังขาว ย่านาง ผักเหมียง และผักหวานบ้าน ทั้งสารสกัดแยกที่ละลายในน้ำและไม่ละลายในน้ำโดยวัดที่ความเข้มข้นต่างๆกัน และนำมาหา % inhibition ได้ค่าดังตารางที่ 5-16 ตามลำดับ

ตารางที่ 5 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักกูดที่ละลายในน้ำ

Conc. (µg/ml)	Absorbance			% Inhibition
	วัดครั้งที่ 1	วัดครั้งที่ 2	Average	
50	0.170	0.179	0.175	16.51
150	0.157	0.155	0.156	25.36
250	0.147	0.143	0.145	30.62
500	0.133	0.130	0.132	37.08
1000	0.132	0.129	0.131	37.56

ตารางที่ 6 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักกูดที่ไม่ละลายในน้ำ

Conc. (µg/ml)	Absorbance			% Inhibition
	วัดครั้งที่ 1	วัดครั้งที่ 2	Average	
50	0.232	0.247	0.116	7.17
150	0.218	0.242	0.109	10.85
250	0.215	0.229	0.108	13.95
500	0.206	0.225	0.103	16.47
1000	0.179	0.202	0.090	26.16

ตารางที่ 7 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักติ้วที่ละลายในน้ำ

Conc. (µg/ml)	Absorbance			% Inhibition
	วัดครั้งที่ 1	วัดครั้งที่ 2	Average	
50	0.133	0.130	0.132	30.42
100	0.125	0.123	0.124	34.39
150	0.105	0.106	0.106	44.18
200	0.087	0.104	0.096	49.47
250	0.086	0.083	0.085	55.29
500	0.084	0.078	0.081	57.14
1000	0.075	0.069	0.072	61.90

ตารางที่ 8 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักติ้วที่ไม่ละลายในน้ำ

Conc. (µg/ml)	Absorbance			% Inhibition
	วัดครั้งที่ 1	วัดครั้งที่ 2	Average	
50	0.115	0.111	0.113	43.78
100	0.106	0.101	0.104	48.51
150	0.085	0.079	0.082	59.20
200	0.081	0.070	0.076	62.44
250	0.033	0.040	0.037	81.84
500	0.019	0.013	0.016	92.04
1000	0.007	0.005	0.006	97.01

ตารางที่ 9 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักปลังที่ละลายในน้ำ

Conc. (µg/ml)	Absorbance			% Inhibition
	วัดครั้งที่ 1	วัดครั้งที่ 2	Average	
250	0.169	0.168	0.169	6.91
500	0.161	0.164	0.163	10.22
750	0.139	0.136	0.138	24.03
1000	0.136	0.134	0.135	25.41

ตารางที่ 10 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักปลังที่ไม่ละลายในน้ำ

Conc. (µg/ml)	Absorbance			% Inhibition
	วัดครั้งที่ 1	วัดครั้งที่ 2	Average	
250	0.210	0.208	0.209	7.52
500	0.208	0.205	0.207	8.63
750	0.206	0.204	0.205	9.29
1000	0.201	0.198	0.200	11.73

ตารางที่ 11 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดย่านางที่ละลายในน้ำ

Conc. (µg/ml)	Absorbance			% Inhibition
	วัดครั้งที่ 1	วัดครั้งที่ 2	Average	
250	0.108	0.104	0.106	42.08
500	0.092	0.088	0.090	50.82
750	0.081	0.076	0.079	57.10
1000	0.073	0.074	0.074	59.84

ตารางที่ 12 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดย่านางที่ไม่ละลายในน้ำ

Conc. (µg/ml)	Absorbance			% Inhibition
	วัดครั้งที่ 1	วัดครั้งที่ 2	Average	
250	0.166	0.165	0.166	27.09
500	0.149	0.148	0.149	34.58
750	0.102	0.105	0.104	54.41
1000	0.078	0.075	0.077	66.30

ตารางที่ 13 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักเหมียงที่ละลายในน้ำ

Conc. (µg/ml)	Absorbance			% Inhibition
	วัดครั้งที่ 1	วัดครั้งที่ 2	Average	
250	0.166	0.174	0.170	1.73
500	0.154	0.152	0.153	11.56
750	0.153	0.149	0.151	12.72
1000	0.132	0.131	0.132	23.99

ตารางที่ 14 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักเหมียงที่ไม่ละลายในน้ำ

Conc. (µg/ml)	Absorbance			% Inhibition
	วัดครั้งที่ 1	วัดครั้งที่ 2	Average	
250	0.262	0.264	0.263	2.59
500	0.260	0.261	0.261	3.52
750	0.248	0.255	0.252	6.85
1000	0.250	0.252	0.251	7.04

ตารางที่ 15 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักหวานบ้านที่ละลายในน้ำ

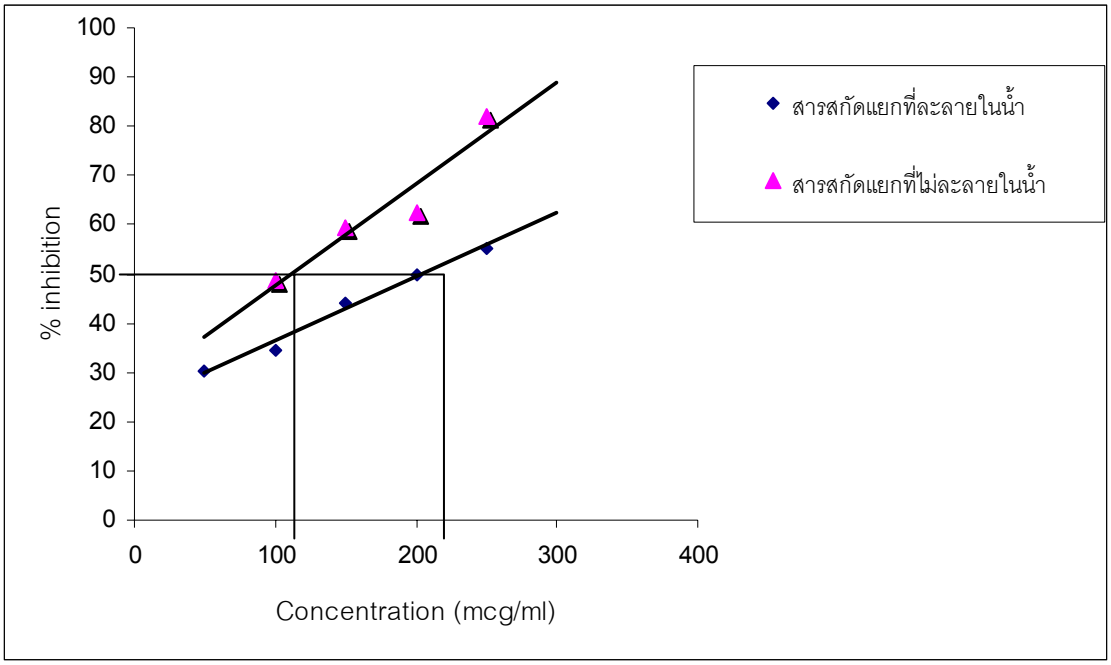
Conc. (µg/ml)	Absorbance			% Inhibition
	วัดครั้งที่ 1	วัดครั้งที่ 2	Average	
250	0.143	0.174	0.149	14.37
500	0.131	0.152	0.128	26.44
750	0.120	0.149	0.118	32.18
1000	0.111	0.131	0.110	36.78

ตารางที่ 16 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผักหวานบ้านที่ไม่ละลายในน้ำ

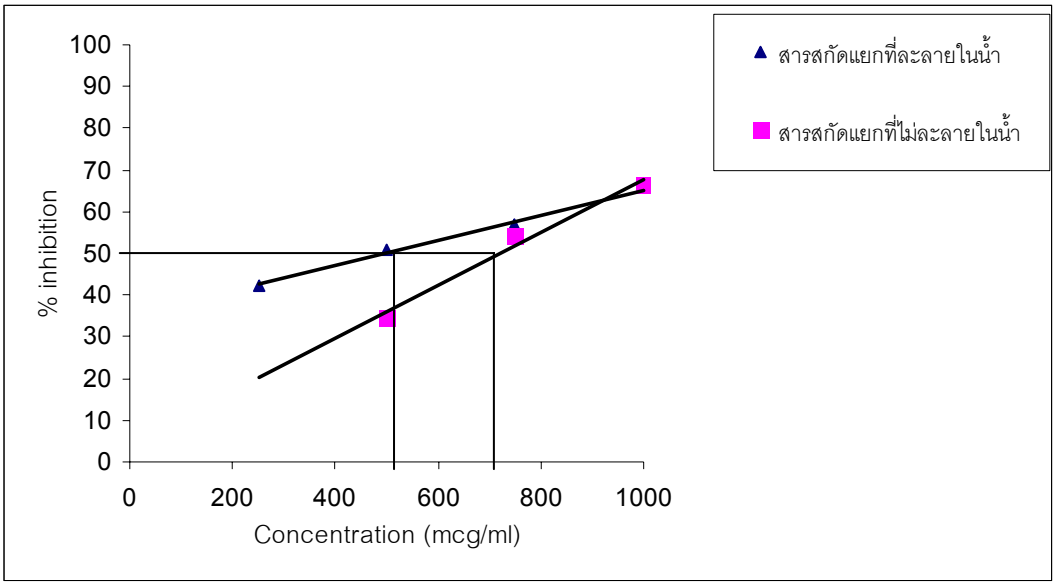
Conc. (µg/ml)	Absorbance			%inhibition
	วัดครั้งที่ 1	วัดครั้งที่ 1	Average	
250	0.193	0.192	0.193	10.47
500	0.181	0.194	0.188	12.79
750	0.180	0.181	0.181	16.05
1000	0.177	0.177	0.177	17.67

จากสารสกัดผักติ้วและย่านางที่ละลายในน้ำและไม่ละลายในน้ำ มี % inhibition มากกว่า 50% จึงนำมาจัดทำกราฟเส้นตรงระหว่าง % inhibition กับความเข้มข้นต่างๆ สามารถหา IC_{50} ได้จากกราฟ พบว่า สารสกัดผักติ้วแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด โดยสารสกัดส่วนที่ละลายได้ในน้ำและส่วนที่ไม่ละลายในน้ำให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 205.96 µg/ml และ 101.79 µg/ml ตามลำดับ ดังรูปที่ 9 รองลงมาคือ สารสกัดย่านาง ให้ค่า IC_{50} 499.24 µg/ml (ส่วนที่ละลายได้ในน้ำ) และ 772.63 µg/ml (ส่วนที่ไม่ละลายในน้ำ) ดังรูปที่ 10 ส่วนสารสกัดจากผักอีก 4 ชนิดมีค่า IC_{50} มากกว่า 1,000 µg/ml

รูปที่ 9 กราฟความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรงของสารสกัดผักติ้วที่ละลายในน้ำและไม่ละลายในน้ำกับ % inhibition



รูปที่ 10 กราฟความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรงของสารสกัดย่านางที่ละลายในน้ำและไม่ละลายในน้ำกับ % inhibition



ตารางที่ 17 การหาค่า % inhibition ของสารมาตรฐาน vitamin C , Trolox และสารสกัดผักพื้นบ้านทั้ง 6 ชนิดที่ละลายในน้ำและไม่ละลายในน้ำ โดยนำ vitamin C มาเปรียบเทียบกับสารสกัดแยกที่ละลายในน้ำ ขณะที่ Trolox เปรียบเทียบกับสารสกัดแยกที่ไม่ละลายในน้ำและ มี IC_{50} เท่ากับ 9.34 µg/ml, 15.91 µg/ml ตามลำดับ สารสกัดผักติ้วที่ละลายในน้ำและไม่ละลายในน้ำมี IC_{50} เท่ากับ 205.96 µg/ml, 101.79 µg/ml ตามลำดับ ส่วนสารสกัดย่านางที่ละลายในน้ำและไม่ละลายในน้ำ มี IC_{50} เท่ากับ 499.24 µg/ml, 772.63 µg/ml ตามลำดับ ส่วนสารสกัดผักกูด ผักปลังขาว ผักเหมียง ผักหวานบ้าน มี IC_{50} มากกว่า 1,000 µg/ml

ตารางที่ 17 ค่า % Inhibition ของสารสกัดแยกที่ละลายในน้ำและไม่ละลายในน้ำที่ความเข้มข้น 1000 µg/ml วัด absorbance 515 nmที่ 30 นาที

สารมาตรฐาน / สารสกัดตัวอย่าง	ละลายในน้ำ (µg/ml)	ไม่ละลายในน้ำ (µg/ml)
Vitamin C	9.34	-
Trolox	-	15.91
ผักติ้ว	205.96	101.79
ย่านาง	499.24	772.63

ผักกูด	>1000	>1000
ผักปลังขาว	>1000	>1000
ผักเหมียง	>1000	>1000
ผักหวานบ้าน	>1000	>1000

3. Phytochemical screening

จากการหาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของ Flavonoids และ Phenolic compounds and Tannins ของสารสกัดผักติ้วและย่านาง พบว่า ย่านางไม่มี Flavonoids เป็นองค์ประกอบเนื่องจากให้ผลลบกับ Shinoda test แต่มี Phenolic compounds จากการที่ให้ผลบวกกับ1% ferric chloride solution ส่วนสารสกัดผักติ้วไม่มี Flavonoids เป็นองค์ประกอบเช่นกัน แต่ผักติ้วมี tannin เป็นองค์ประกอบทางเคมีที่ให้ผลบวกกับ Gelatin solution และ Gelatin salt solution และเป็น tannin ชนิด Hydrolysable tannin จากการให้ผลบวกกับ Lime water ดังตารางที่ 18

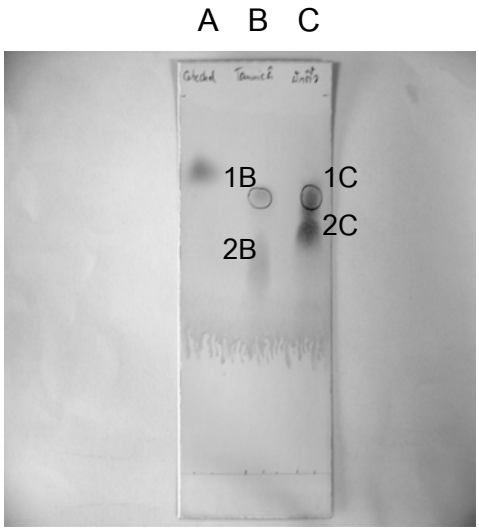
ตารางที่ 18 ผลการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของ Phenolic compounds

สารทดสอบ	Result	
	ผักติ้ว	ย่านาง
1. Shinoda test	-	-
2. 1%Ferric Chloride solution	+ (น้ำเงินเขียว)	+
3. Gelatin solution	+ (ตะกอนขุ่นขาว)	-
4. Gelatin salt solution	+ (ตะกอนขุ่นขาว)	-
5. Bromine water	-	-
6. Vanillin- HCl test	-	-
7. Lime water	+ (ตะกอนเหลือบน้ำเงินเทา)	-

4. Thin Layer Chromatography (TLC) Fingerprints

จากการทำ Thin Layer Chromatography เป็นการตรวจสอบโดยอาศัยการแยกของสาร โดยระบบที่ใช้ คือ n- butanol : acetic acid : water ในอัตราส่วน 4 : 3 : 1 โดย fingerprints ที่ได้เป็นผลจากการตรวจสอบของสารสกัดผักติ้วและย่านาง หลังจากพ่นด้วย 1 % methanolic ferric chloride และสารมาตรฐานที่ใช้คือ Tannic acid , Catechol แสดงดังรูปที่ 11 และ 12 ตามลำดับ

รูปที่ 11 Fingerprints ของสารสกัดผักติ้วหลังสเปรย์ด้วย 1 % methanolic ferric chloride



A = catechol

B = tannic acid

C = ผักติ้ว

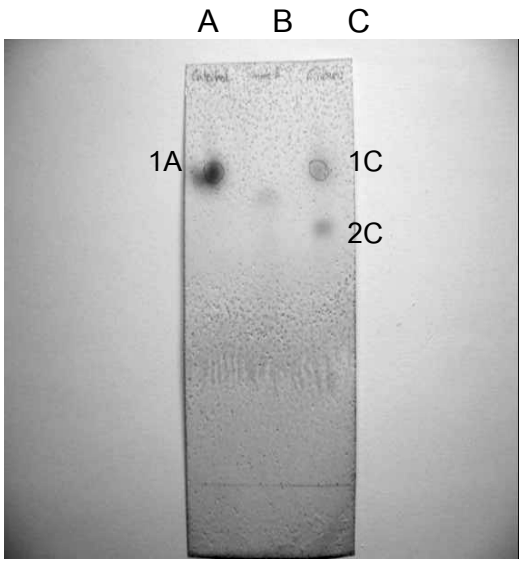
Rf_{1B} tannic acid = 0.73

Rf_{2B} tannic acid = 0.57

Rf_{1C} ผักติ้ว = 0.73

Rf_{2C} ผักติ้ว = 0.63

รูปที่ 12 Fingerprints ของสารสกัดย่านางหลังสเปรย์ด้วย 1 % methanolic ferric chloride



A = catechol

B = tannic acid

C = ย่านาง

Rf_{1A} catechol = 0.79

Rf_{1C} ย่านาง = 0.80

Rf_{2C} ย่านาง = 0.62

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

จากการศึกษาสามารถสรุปและวิจารณ์ผลการทดลองได้ดังนี้

1. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ของผักพื้นบ้านทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ ผักกูด, ผักติ้ว, ผักปลังขาว, ย่านาง, ผักเหมียง และผักหวานบ้าน พบว่า สารสกัดจากผักติ้วแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด โดยสารสกัดส่วนที่ละลายในน้ำและส่วนที่ไม่ละลายในน้ำให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 205.96 μg/ml และ 101.79 μg/ml ตามลำดับ รองลงมาคือ สารสกัดจากย่านาง ให้ค่า IC_{50} 499.24 μg/ml (ส่วนที่ละลายในน้ำ) และ 772.63 μg/ml (ส่วนที่ไม่ละลายในน้ำ) สำหรับวิตามินซีและวิตามินอี ให้ค่า IC_{50} 9.34 μg/ml และ 15.91 μg/ml ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากผักอีก 4 ชนิด ได้แก่ ผักกูด, ผักปลังขาว, ผักเหมียง และผักหวานบ้าน มีค่า IC_{50} มากกว่า 1,000 μg/ml จากการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นพบว่า ผักติ้วมี Hydrolysable tannin ส่วนย่านางมี Phenolic compounds และมีรายงานการวิจัยอื่นๆซึ่งสนับสนุนการทดลองรายงานว่าสารกลุ่ม Phenolic compounds และ Hydrolysable tannin มักแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้มีการศึกษาผักพื้นบ้านและสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบสาร Phenolic compounds และ / หรือ Hydrolysable tannin ด้วย (1,5)

2. เมื่อเปรียบเทียบความแรงของการแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสารสกัดแยกส่วนที่ละลายในน้ำ กับสารมาตรฐานวิตามินซี พบว่าสารสกัดผักติ้วและย่านาง มีความแรงน้อยกว่าวิตามินซี 20 เท่า และ 50 เท่า ตามลำดับ และการเปรียบเทียบความแรงของการแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสารสกัดแยกส่วนที่ไม่ละลายในน้ำ กับสารมาตรฐาน Trolox พบว่า สารสกัดผักติ้วและย่านาง มีความแรงน้อยกว่า Trolox 6 เท่า และ 50 เท่า ตามลำดับ ส่วนสารสกัดผักอีก 4 ชนิด ได้แก่ ผักกูด , ผักปลังขาว, ผักเหมียง และผักหวานบ้าน มีค่า IC_{50} มากกว่า 1000 μg/ml

3. การทำ Thin Layer Chromatography ระบบที่ใช้แยกสารสกัดคือ n – butanol : acetic acid : water ในอัตราส่วน 4 : 3 : 1 จาก fingerprints ของสารสกัดผักติ้ว จะเห็นว่ามี 2 จุด โดยมี 1 จุด ที่ตรงกับ tannic acid จึงอาจสรุปได้ว่าสารสกัดผักติ้วมี tannic acid เป็นองค์ประกอบ ส่วน tannic acid ที่เกิดขึ้น 2 จุด นั้นอาจมาจากการเกิด degradation ของสารที่มีการใช้งานมานานแล้ว ส่วน fingerprints ของสารสกัดย่านาง พบว่ามี 2 จุด และมี 1 จุด ที่ตรงกับ catechol จึงสรุปว่า ย่านางมี catechol เป็นองค์ประกอบ

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ของผักพื้นบ้านแต่ละชนิดจากหลายๆแหล่ง

2. ตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระควรใช้วิธีอื่นร่วมด้วย เช่น FRAP, ORAC, TRAP, Lipid peroxidation เป็นต้น

3. ควรทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ของผักพื้นบ้านชนิดอื่นๆเพิ่มขึ้น

4. วิธีการสกัดอาจเปลี่ยนไปใช้วิธีอื่นได้

ประโยชน์ที่ได้รับ

1. เรียนรู้เทคนิคและเพิ่มทักษะในการดำเนินการวิจัย

2. มีข้อมูลสนับสนุนการเลือกบริโภคผักพื้นบ้านและส่งเสริมให้เป็นที่รู้จักมากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. อัญชนา เจนวิถี. การตรวจหาและบ่งชี้ชนิดสารต้านอนุมูลอิสระจากผักพื้นบ้านและสมุนไพรไทย. [วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ]. เชียงใหม่: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2544.
2. เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ, บรรณาธิการ. ผักพื้นบ้านและอาหารพื้นบ้าน 4 ภาค. กรุงเทพฯ: องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก, 2542.
3. มาโนช วามานนท์, บรรณาธิการ. ผักพื้นบ้าน: ความหมายและภูมิปัญญาของสามัญชนไทย. ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก, 2540.
4. โอภา วัชระคุปต์, บรรณาธิการ. สารต้านอนุมูลอิสระในธรรมชาติ. ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: พี. เอส.พริ้นท์, 2549.
5. Surveswan S., Cai Y. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. Food Chemistry[Online]2006. Available from: http://www.sciencedirect.com/locate/ foodchem.html[Accessed 2006 August 15]
6. Dejian H., Boxin O. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2005 ; 53 : 1841-1856.
7. Dasgupta N., De B. Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: A Comparative study.Food Chemistry[Online]2005 .Available from: http:// www.sciencedirect.com/locate/ foodchem.html [Accessed 2006 July 3]
8. Brand-Williams N., Cuvelier M.E. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. Academic Press Limited 1995; 28: 25-30
9. เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ, บรรณาธิการ. ผักพื้นบ้านภาคกลาง. กรุงเทพฯ: องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก, 2542.
10. เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ, บรรณาธิการ. ผักพื้นบ้านภาคเหนือ. กรุงเทพฯ: องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก, 2542.
11. ลั่นทม จอนจวบทรง, บรรณาธิการ. ผักพื้นบ้าน(ภาคใต้)ทางเลือกในการผลิตและการบริโภค. ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก, 2537.

12. นันทวัน บุณยะประภัศร. การสกัดแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสำคัญจากสมุนไพร. ใน: นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, บรรณาธิการ. ยาและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เล่มที่ 1. ครั้งที่ 3: กรุงเทพฯ; หจก. แสงเทียนการพิมพ์, 2544: 129 – 68.
13. นพมาศ สุนทรเจริญนนท์. การตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานของสมุนไพรโดยใช้วิธี Thin-layer chromatography. เอกสารประกอบการสอนวิชาการผลิตภัณฑ์ธรรมชาติระดับนำร่อง ภาคการศึกษา 2548; คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

ภาคผนวก

การเตรียมสารละลายทดสอบ

1. Bromine water

Potassium Bromate	3	g
Potassium Bromide	15	g
Distilled Water q.s.	1,000	ml

เวลาที่จะทดสอบใช้สารละลายที่เตรียมไว้ 5 ส่วน ผสมกับ Conc. HCl 1 ส่วนเตรียมแล้วใช้ทันที

2. 1%Ferric chloride solution

ละลาย 1 กรัม Ferric chloride ในเมทานอลเติมให้เป็น 100 ml กรองถ้ามีตะกอน

3. Gelatin solution

Gelatin	1	g
Distilled Water q.s.	100	ml

4. Gelatin salt solution

Gelatin solution 1%	50	ml
Sodium chloride solution	50	ml

5. Lime water (Calcium Hydroxide solution)

Calcium Hydroxide	3	g
Potassium iodide	5	g
Distilled Water q.s.	1,000	ml

6. Vanillin reagent

Vanillin	10	g
Ethyl Alcohol q.s.	100	ml

การตรวจสอบ Flavonoids

วิธีที่ 1 การตรวจสอบ Flavonoids (Shinoda test)

1. บดผงยา 3 กรัม ในโกร่งกับ petroleum 15 ml บดซ้ำจนไม่มีสีออกมาในชั้นของ petroleum ether
2. บดกากที่ได้กับ 80 % Ethanol 30 ml กรองเก็บ filtrate ที่ได้ไปทดสอบ

ถ่ายสารสกัด 1 ml ลงในหลอดทดลอง

↓

ใส่ Mg ribbon 3-4 อัน

↓

เติม Conc. HCL 10 หยด

↓

สังเกต สีส้มถึงสีแดง

วิธีที่ 2 (Pew test)

ถ่ายสารสกัด 1 ml ลงหลอดทดลอง

↓

เติม Zn-dust 0.5 g + 2N HCL 2หยด

↓

เขย่า 1 นาที

↓

เติม Conc. HCl 10 หยด

↓

สังเกตสีแดงเข้ม ภายใน 2-5 นาที

แสดงว่ามี flavonoid หรือ flavonol-3-glycoside

ส่วน flavanone และ flavonol จะให้สีจางๆ

การตรวจสอบ Phenolic compounds and Tannins

การเตรียมสารสกัด

ละลายสารสกัด ด้วยน้ำให้เจือจางพอเพื่อให้สังเกตสีได้

(125 mg + น้ำ 50 ml)

↓

กรอง

↓

เติม 10% NaCl 1 ml

↓

กรอง (เก็บ filtrate)

วิธีการตรวจสอบ

แบ่งสารสกัดใส่หลอดทดลอง หลอดละ 2 ml จำนวน 9 หลอด

หลอดที่ 1 Control

หลอดที่ 2 เติม gelatin solution 2-3 หยด

Positive: ตะกอนขุ่นขาว

หลอดที่ 3 เติม gelatin salt solution 2-3 หยด

Positive: ตะกอนขุ่นขาว

หลอดที่ 4 เติม 1% ferric chloride 2-3 หยด

Positive: สีน้ำเงินเขียว

หลอดที่ 5 เติม bromine water 5-6 หยด

Positive: ตะกอนเบาสีอ่อน (buff- coloured)

หลอดที่ 6 Formalin –HCl test

เติม 40% formalin 3 หยด ตามด้วย10 % HCl 6 หยด จากนั้น ต้มในอ่าง อังไอน้ำ 1-2 นาที

Positive: ตะกอนสีแดง (phlobaphene) ไม่ละลายในน้ำร้อน ethanol หรือ 5 % KOH

หลอดที่ 7 Vanillin – HCl test

ถ่ายสารสกัดลงใน evaporating dish ระเหยจนแห้งบนอ่างอังไอน้ำ เติม vanillin reagent 1 ml + conc. HCl 1 หยด

Positive: สีแดง (crimson colour)

หลอดที่ 8 เติม Lime – Water 5 ml

Positive: ตะกอนสีเหลือบน้ำเงินเทา

(blue-gray colour)

การสรุปผลการทดลอง

1.ให้ผลลบ (-) กับ gelatin และ gelatin salt solution ไม่ให้สีกับ ferric chloride

สรุป : ไม่มี tannins ไม่มี polyphenol

2.ให้ผลบวก (+) กับ gelatin และ gelatin salt solution ให้สีออกเขียวกับ ferric Chloride, ให้ผลบวก (+) กับ bromine water, Formalin – HCl test และ Vanillin – HCl test, lignin test, ให้ผลลบกับ Lime – Water

สรุป : มี condensed tannin

3.ให้ผลบวก (+) กับ gelatin และ gelatin salt solution ให้สีออกน้ำเงินดำ

น้ำเงินดำ กับ ferric chloride, ให้ผลลบ (-) กับ bromine water, Formalin – HCl test และ Vanillin – HCl test , lignin test ให้ผลบวกกับ Lime – Water

สรุป : มี hydrolysable tannin

4.ให้ผลบวกกับทุก test ให้สีน้ำเงินอมเขียวกับ ferric chloride

สรุป : มี tannins ทั้ง สองประเภท

5.ให้ผลลบ (-) กับ gelatin และ gelatin salt solution ให้สีน้ำเงิน หรือสีเขียว หรือสีผสมของทั้ง สองสีกับ Ferric chloride, ให้ผลบวกกับ lignin test

สรุป: ไม่มี tannins มี phenolic compounds