

ผลของสมุนไพรต่อการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน

EFFECT OF HERBS TO LIPID PEROXIDATION

5

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อโนดาห์ รัชเวทย์*

บทคัดย่อ

การวิจัยในครั้งนี้เป็นการหาความสามารถรวมในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในสมุนไพรตัวอย่างในท้องถิ่น 9 ชนิด คือ ยอ บัวบก ขี้เหล็ก อินทนิลน้ำ ครอบฟันสี ชุมเห็ดเทศ ผักเชียงดา หญ้าหนวดแมว ชะพลู โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานแกลลิกแอซิด โดยใช้สเปกโตรโฟโตเมทรี โดยนำสารตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 704 นาโนเมตร หลังจากนั้นได้ทำการเลือกสมุนไพร 4 อันดับแรกที่ทำให้ความสามารถรวมในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด คือชุมเห็ดเทศ หญ้าหนวดแมว อินทนิลน้ำ ชะพลู โดยมีค่าความสามารถรวมในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 0.249 0.219 0.146 0.144 mg/mL ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกแอซิด มาทดสอบการป้องกันการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน โดยการนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตร โดยความเข้มข้นที่ใช้คือ 0.3125 0.625 1.25 2.50 5.0 10.00 mg/mL ให้ผลดังนี้ เมื่อมีการเติมสารสกัดสมุนไพรคือชุมเห็ดเทศ หญ้าหนวดแมว อินทนิลน้ำ ชะพลู มีรูปแบบการออกฤทธิ์ในการป้องกันการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) สังเกตได้จากระดับ MDA ลดลงเรื่อยๆ เมื่อสารสกัดสมุนไพรเพิ่มขึ้น แต่ในสมุนไพรชุมเห็ดเทศและหญ้าหนวดแมวที่ความเข้มข้น 0.3125 mg/mL ไม่สามารถลดระดับ MDA ได้เมื่อเทียบกับ positive control

ABSTRACT

The Total antioxidation activity of 9 local medicinal plants, Indian mulberry (*Morinda citrifolia* L.), Tiger's herb (*Centella asiatica* L.), Cassia Tree(*Cassia siamea* (Lamk.)), Queen's Crape Myrt (*Lagerstroemia speciosa* (L.) Pers.), : Ringworm Bush (*Cassia alata* (L.) Roxb.), Perrpioca of the woods (*Gumnema inodorum* (Lour.) Decne.), Cat's Whisker (*Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq.) and Wild Betel Leafbush (*Piper samentosum* Roxb.), were examined in this research. The extract solutions were compared with Gallic acid standard curve by using spectrophotometer to examine absorbance at wavelength 704 nm. The top 4 medicinal plants which gave a high value of the total antioxidation activity compared to the Gallic acid standard curve were chosen. Those were Ringworm Bush, Cat's Whisker, Queen's Crape Myrt and Wild Betel Leafbush which had 0.249, 0.219, 0.146 and 0.144 mg/mL respectively. All of them were chosen for testing in the action of Lipid peroxidation inhibition. The concentration 0.3125, 0.625, 1.25, 2.50, 5.0 and 10.00 mg/mL were used by absorbance measurement at 532 nm. The result shown that the mechanism of Lipid peroxidation inhibition of 4 medicinal plants were not significant different ($p < 0.05$) that could be observed by the gradually decreasing in MDA level when the concentration of extract medicinal plants increased. But in the concentration 0.3125 mg/mL of Ringworm Bush and Cat's Whisker medicinal plants couldn't decreased in level of MDA comparing to the positive control.

* คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่

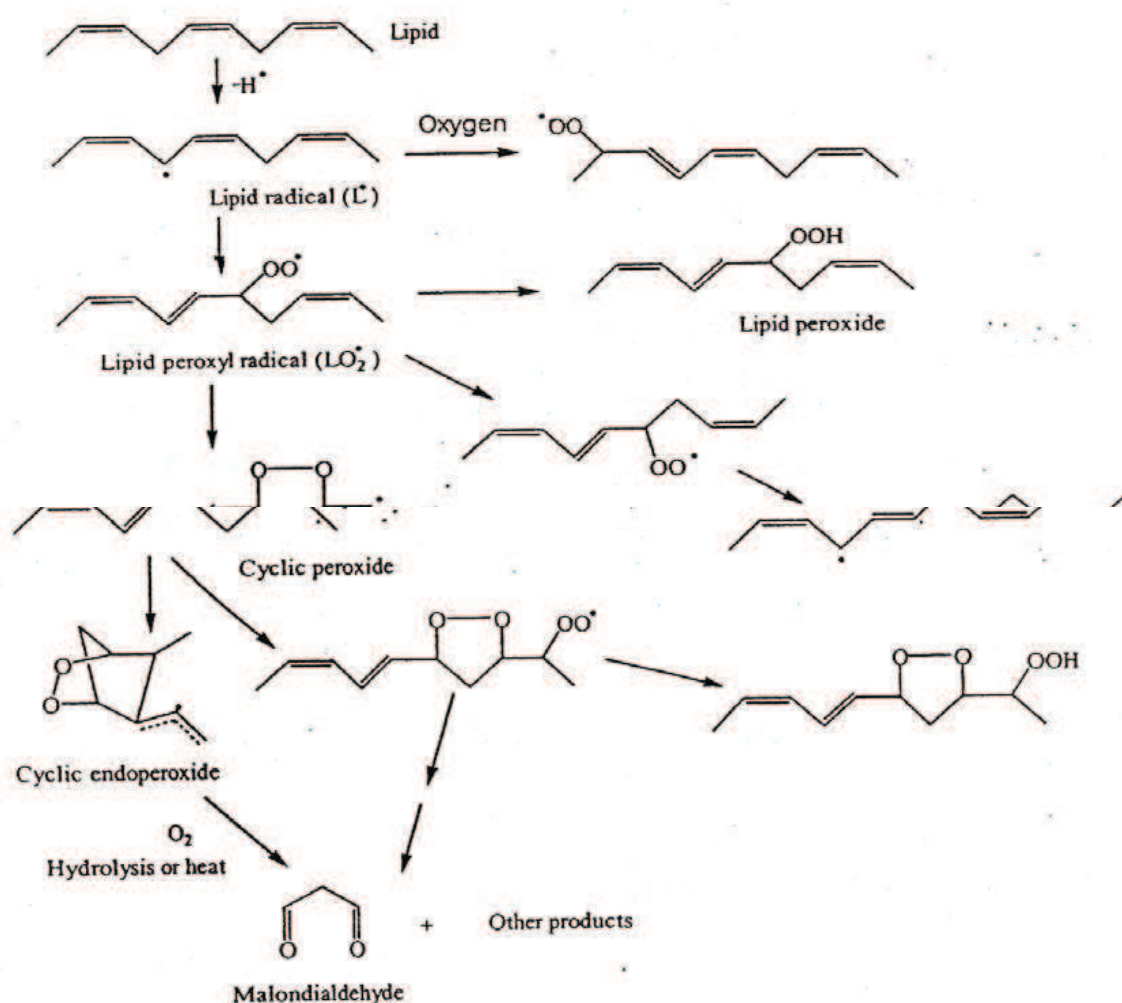
ภูมิหลัง

อนุมูลอิสระ คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนไม่เป็นคู่ อยู่ในวงอิเล็กตรอนวงนอกสุด(outer orbital) เนื่องจากการมีอิเล็กตรอนที่โดดเดี่ยว (unpaired electron) อยู่ในวงโคจรของโมเลกุลทำให้ไม่เสถียร ทำให้อนุมูลอิสระเป็นสารที่มีความไวในการเข้าทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นสูงมากโดยอนุมูลอิสระจะไปแย่งจับหรือดึงเอาอิเล็กตรอนจากโมเลกุลหรืออะตอมสารที่อยู่ข้างเคียงเพื่อให้ตัวมันเสถียร โมเลกุลที่อยู่ข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระชนิดใหม่ ซึ่งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นใหม่นี้จะไปทำปฏิกิริยากับสารโมเลกุลอื่นต่อไป เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) ต่อกันไปเรื่อยๆ (Halliwell, 1991) ดังที่ทราบว่าเป็นต้นเหตุสำคัญในการเกิดโรคและยังมีบทบาทสำคัญทำให้โรคมะเร็งและการพัฒนาการอย่างรวดเร็วและรุนแรงมากขึ้น ทั้งยังส่งผลให้เกิดการทำลายดีเอ็นเอ โปรตีน ไขมันได้ ในส่วนไขมันนั้น เมื่ออนุมูลอิสระเข้าไปทำปฏิกิริยาจะทำให้เกิดลิพิดเปอร์ออกซิชั่น (Lipid peroxidation) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเมื่ออนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับกรดไขมันไม่อิ่มตัวในผนังเซลล์เกิดเป็น lipid peroxide ซึ่งจะเคลื่อนย้ายตัวเองออกจากชั้นในของเยื่อหุ้มเซลล์ ขึ้นมาอยู่บนผิวของเยื่อหุ้มเซลล์และทำให้เกิดการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่สามารถทำให้เกิดโรคอื่นๆตามมา เช่นโรคหลอดเลือด โรคหัวใจ โรคมะเร็ง เป็นต้น

ในปัจจุบันนี้มีกระแสนิยมในการบริโภคพืชสมุนไพรกันมากขึ้น ด้วยมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องรายงานว่ามีพืชสมุนไพรชนิดมากมายในการป้องกันโรคและการรักษาสุขภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) หมายถึง สารประกอบที่สามารถป้องกันหรือชะลอกระบวนการเกิดออกซิเดชัน กระบวนการออกซิเดชันคือ การให้โปรตอนแก้มโมเลกุลหรือไอออนอื่น เพื่อให้โมเลกุลหรือไอออนเกิดความเสถียรมากขึ้น นอกจากนี้ยังมีการคิดวิธีสังเคราะห์อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติในหลอดทดลอง และทดสอบความสามารถของสารในการยับยั้งอนุมูลอิสระเหล่านี้ จึงมีหลายวิธีที่นิยมใช้ในการทดสอบ ซึ่งหนึ่งในหลายวิธีของการทดสอบคือวิธี Lipid peroxidation (Halliwell *et al.*, 1987) เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันแบบลูกโซ่ของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว อนุมูลอิสระเพียง 1 อนุโมเลกุล สามารถทำให้เกิดลิพิดเปอร์ออกไซด์ เป็นจำนวนหลายร้อยโมเลกุลก่อนที่จะสิ้นสุดปฏิกิริยาเนื่องจากปฏิกิริยา Lipid peroxidation สามารถเกิดได้ง่ายกับเยื่อหุ้มเซลล์ ที่ประกอบด้วยลิพิด 2 ชั้น การเกิดลิพิดออกซิเดชันกับลิพิดในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ มีคุณสมบัติที่เปลี่ยนไป ยังส่งผลกระทบต่อเอนไซม์และรีเซพเตอร์ที่ฝังตัวอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เอนไซม์และรีเซพเตอร์มีการทำงานที่เสียไป เป็นสาเหตุในเกิดโรคต่างๆได้อีกด้วย ผลผลิตที่เกิดขึ้นมาจาก Lipid peroxidation ได้แก่ สารไฮโดรคาร์บอน เช่น อิเทน อีเทน และเพนเทน รวมถึง สารคีโตน และสารอัลดีไฮด์ เป็นต้น ซึ่งสารอัลดีไฮด์ที่มีความสำคัญ คือ มาลอนไดอัลดีไฮด์ (Malondialdehyde, MDA)

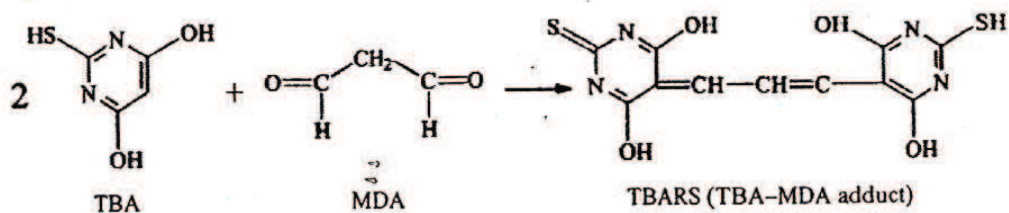
กระบวนการ Lipid peroxidation เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่ ปฏิกิริยาเริ่มต้นของการเกิดโซ่ปฏิกิริยาการทวีเพิ่มขึ้น และการสิ้นสุดปฏิกิริยา ปฏิกิริยาลูกโซ่เริ่มต้นด้วยการมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้น และอนุมูลอิสระนี้เข้าทำปฏิกิริยากับลิพิดและทำให้เกิดอนุมูลลิพิด ($L\cdot$ หรือ $R\cdot$) ดังภาพ 1 ที่แสดงถึงกลไกการเกิดปฏิกิริยา Lipid peroxidation (โอภา และคณะ. 2549)

ดังนั้นในการติดตามผลเสียของการเกิด lipid peroxidation ต่อเซลล์หรือส่วนประกอบของเซลล์จากการเกิดอนุมูลอิสระจึงประเมินได้จากการเกิด Malondialdehyde (MDA) นั่นเอง ในการวัดระดับ MDA นี้ได้จากการที่ MDA ทำปฏิกิริยากับ thiobarbituric acid (TBA) เกิดเป็นสารมีสีเรียกว่า TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) ซึ่งเป็น marker ของการเกิดอนุมูลอิสระที่ยอมรับกันโดยทั่วไป



ภาพประกอบ 1 กลไกการเกิดปฏิกิริยา Lipid peroxidation (โอภา และคณะ. 2549)

ดังนั้นวิธีนี้จึงเป็นการวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้ง Lipid peroxidation ของสารสกัด ทดสอบได้ โดยใช้ชุดทดสอบไข่แดงซึ่งเหนียวนาในการทำให้เกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน โดยใช้เฟอร์รัสซัลเฟต ซึ่งเรียกว่าnegative control(คือการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันเมื่อถูกเหนียวนาด้วยเฟอร์รัสซัลเฟต) แล้วทำให้เกิดผลผลิตจากปฏิกิริยา Lipid peroxidation ได้เป็นสารมาลอนไดอัลดีไฮด์ (Malondialdehyde, MDA) จากนั้นเติมกรดไทโอบาร์บิทริกในสภาวะกรด สาร MDA จะทำปฏิกิริยากับกรดไทโอบาร์บิทริก ได้เป็นสารมีสีชมพูอมส้มเรียกว่า TBARS ดังภาพ 2 เมื่อเติมสารสกัดทดสอบที่มีความสามารถในการยับยั้ง Lipid peroxidation ลงไป จะทำให้สารสีจางลง จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 nm (โอภาและคณะ. 2549) ส่วนpositive control คือการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันเองตามธรรมชาติ



ภาพประกอบ 2 ปฏิกิริยาการเกิด TBARS (โอภา และคณะ. 2549)

ข้อดีของวิธีการนี้ คือ ทำการศึกษาง่าย สะดวก ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาสูง เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงแล้วนำไปคำนวณหา % inhibition ตามสมการ

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

ดังนั้นจึงเชื่อว่าการบริโภคพืชสมุนไพรเป็นประจำจะช่วยป้องกันความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งเนื่องจากอนุมูลอิสระได้อีกด้วย ซึ่งในปีพ.ศ. 2546 วาสนา สิทธิกัน ได้ศึกษาถึงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพืชใน human monocytic cell line U937 ที่ถูกเหนี่ยวนำทำให้เกิดภาวะ oxidative stress โดย hyperoxide พบว่าเมื่อเติมสารสกัดจากพืช ได้แก่ กระเจี๊ยบแดง ขึ้นฉ่าย มะเฟืองและโหระพา ลงไปในเซลล์ human monocytic cell line U937 ที่ถูกชักนำให้เกิด lipid peroxidation โดย tert-butyl hydroperoxide โดยผลจากการทดสอบพบว่า สารสกัดจากพืชทุกตัวที่นำมาทดลองมีรูปแบบของการฤทธิ์ต้านการเกิด lipid peroxidation ที่คล้ายคลึงกัน ซึ่งระดับของ MDA จะลดลงเรื่อยๆ เมื่อสารสกัดมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 5 ถึง 200 µg/mL และในสารสกัดบางตัวระดับของ MDA ถูกยับยั้งได้น้อยลงในความเข้มข้นที่ 500 µg/mL นอกจากนี้กรรณิการ์ พุ่มทอง (ม.ป.ป) ได้ศึกษาฤทธิ์แอนติออกซิแดนซ์ของสารฟอสโฟโนลที่สกัดจากเปลือกหุ้มเม็ดมะขาม พบว่าสารสกัดมีความสามารถในการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ และมีสารฟอสโฟโนลชนิดเปอร์ออกไซด์ ไฮดรอกซิลและซูเปอร์ออกไซด์ ส่วนในปี ค.ศ.2006 ปรีชา ภูวไพริศร และคณะได้ทำการศึกษาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดไลโปเปอร์ออกซิเดชัน โดยใช้ชั้นไขมันจากสมองหนูเป็นแบบจำลอง จากการศึกษาพบว่าสารสกัดจากรากมะสังออกฤทธิ์ยับยั้งการเกิดไลโปเปอร์ออกซิเดชันได้ดี และการทำการแยกองค์ประกอบทางเคมีจากสารสกัดด้วยวิธีโครมาโตกราฟี และพิสูจน์โครงสร้างออกฤทธิ์ ซึ่งสามารถแยกสารคูมารินชนิดใหม่ซึ่งยังไม่เคยมีผู้รายงานมาก่อน คือ Furanocoumarin มีฤทธิ์ยับยั้งไลโปเปอร์ออกซิเดชันได้ดีใกล้เคียงกับวิตามินอี

ดังนั้นในงานวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษา ผลของสมุนไพรพื้นบ้านในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งพืชสมุนไพรที่สนใจศึกษามีทั้งหมด 9 ชนิดคือ ยอ บัวบก ขี้เหล็ก อินทนิลน้ำ ครอบฟันสี ชุมเห็ดเทศ ผักเชียงดา ญ่าหวดแมว สะพลู โดยนำมาหาความสามารถโดยรวมในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก และเลือกมาทดสอบในการป้องกันการเกิดไลโปเปอร์ออกซิเดชันในชุดทดสอบไข่แดง รวมทั้งวิเคราะห์ผลความสามารถในการยับยั้ง Lipid peroxidation ของสารสกัดโดยใช้วิธี วิ-วิซิเบลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์และเพื่อเป็นแนวทางในการเลือกพืชสมุนไพรที่อุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ รวมทั้งเป็นข้อมูลพื้นฐานในการประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาความสามารถโดยรวมในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในพืชสมุนไพร
2. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการป้องกันการกระบวนกาเกิดไลโปเปอร์ออกซิเดชันในแบบทดสอบไข่แดง

วิธีการศึกษา

1. สมุนไพรตัวอย่าง

ยอ (*Morinda citrifolia* Linn.) ผักเชียงดา (*Gymnema indorum* Decne.) บัวบก (*Centella asiatica* (Linn.) Urban) ครอบฟันสี (*Abutilon indicum* Sweet) ขี้เหล็ก (*Cassia siamea* Lamk) อินทนิลน้ำ (*Lagerstroemia speciosa* Linn. Pers) หญาหนวดแมว (*Orthosiphon aristatus* Blume Mig) ชุมเห็ดเทศ (*Cassia alata* Linn.) ชะพลู (*Piper sarmentosum* Roxb.)

2. เครื่องมือ-อุปกรณ์

เครื่องบดละเอียด เครื่องให้ความร้อนโดยไอน้ำ (heating water bath) memmert, WB-22, Germany. เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge) Heffich, Unival 32, Germany. และ เครื่องเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-VIS Spectrophotometer), Shimadzu, UV1601, Japan.

3. สารเคมี

กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, HCl), MW 36.46 g/mol, Assay 35.5 %, d 1.18 g/cm³, APS, Australia. กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid, H₂SO₄), MW 98.08 g/mol, Assay 96.0 %, d 1.84 g/cm³, J.T Baker, USA. กรดแกลลิก (Gallic acid, C₇H₆O₅) assay 99.0%, MW 188.13 g/mol, Sigma, Germany. กรดไตรคลอโรอะซิติก (Trichloroacetic acid, CCl₃COOH), MW 163.39 g/mol, Assay 99.5 %, BDS, England. เฟอร์รัสซัลเฟต (Ferrous sulphate, FeSO₄), MW 278.02 g/mol, Assay 98.08-105 %, d 1.84 g/cm³, Ajax Finechem, Australia. 2-กรดไทโอบาร์บิวริก (2-thiobarbuturic acid, C₄H₄N₂O₂S), MW 144.1 g/mol, Assay 98 %, Sigma, Germany. 1,1,3,3-เตตระเมทอक्โซพรอเพน (1,1,3,3-tetramethoxypropane, C₇H₁₆O₄), Assay 98 %, MW 164.2 g/mol, Fluka, Switzerland. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (disodiumhydrogenphosphate, Na₂HPO₄), MW 141.96 g/mol, Assay 99%, Merck, Germany. โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (disodiumhydrogenphosphate, NaH₂PO₄), MW 137.99 g/mol, Assay 99%, Merck, Germany และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium Hydroxide, NaOH) assay 98%, MW 40g/mol, Finechem, Australia.

4. วิธีการวิจัย

4.1 การเตรียมสารละลายสกัดสมุนไพร

นำสมุนไพรทั้ง 9 ชนิดที่เป็นผงชั่ง 100 กรัม เติมน้ำกลั่นที่ต้มจนเดือดลงไป 1000 ml ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปกรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วนำไปกรองซ้ำด้วยกระดาษกรอง นำส่วนที่เป็นกากไปสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง นำส่วนสารละลายที่กรองได้ทั้ง 3 ครั้งมารวมกัน นำไปทำให้เป็นผง นำผงสารสกัดสมุนไพรที่ได้ชั่งน้ำหนักและเก็บไว้ในโถสุญญากาศ

4.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมตรี

นำ stock มาตรฐานของกรดแกลลิกที่เข้มข้น 10 mg/mL มาเจือจางลงให้มีความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/mL ตามลำดับ จากนั้นปิเตสารละลายมาตรฐาน กรดแกลลิกที่มีความเข้มข้นต่างๆมา 0.1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นรีเอเจนต์ 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 90 นาที (หมายเหตุ : รีเอเจนต์ ได้แก่ H₂SO₄+Na₂HPO₄+(NH₄)₆Mo₇O₂₄) พอครบเวลานำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 704.0 นาโนเมตร แล้วนำมาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้น

4.3 การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมตรี

สารละลายสกัดสมุนไพรตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร นำไปปรับปริมาตรด้วยสารละลาย reagent 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 90 นาที พอครบเวลานำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 704.0 นาโนเมตร โดยนำไปคำนวณหาความสามารถโดยรวมในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก แล้วเลือกสารละลายตัวอย่างสมุนไพรมา 4 อันดับในการมีความสามารถโดยรวมในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อนำมาทดลองต่อไป

4.4 การเตรียมกราฟมาตรฐาน Malonaldehyde (MDA)

นำ stock มาตรฐาน MDA ที่เข้มข้น 100 μ M มาเจือจางให้มีความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40, 50, 80, 100 μ mol/L จากนั้นปิเปตน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร แล้วเติมสารมาตรฐาน MDA แต่ละความเข้มข้นมา 0.1 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นอีก 0.45 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นทิ้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมสารละลาย TBA 0.2 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย TCA 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 60 นาที พอครบเวลา ยกออกตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมน้ำ 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532.0 นาโนเมตร แล้วนำมาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้น

4.5 การป้องกันการเกิด ลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (Lipid peroxidation)

4.5.1) การเตรียมไข่แดง

นำไข่แดงมาบดให้ละเอียด จากนั้นปิเปตไข่แดงมา 1 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.4 ให้ครบ 100 มิลลิลิตร จะไข่แดงที่มีความเข้มข้น 10%(v/v)

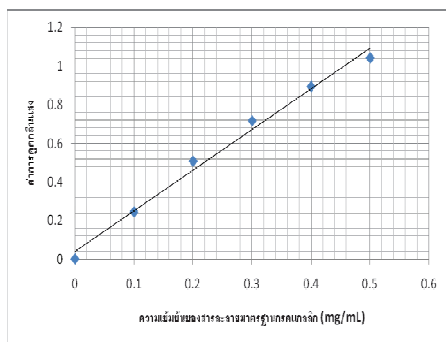
4.5.2) การทดลองการป้องกันการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน

นำไข่แดงที่บดละเอียดมา จากนั้นปิเปตมา 0.5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเติมสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิด 0.1 มิลลิลิตร (โดยความเข้มข้นของสมุนไพรแต่ละชนิดคือ 0.3125 0.625 1.250 2.50 5.00 และ 10.00 mg/mL) จากนั้นเติมน้ำ 0.4 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายเฟอร์รัสซัลเฟต 0.05 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 60 นาที พอครบเวลา ยกออกตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมน้ำ 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปเซนติฟิวส์ประมาณ 10 นาทีเพื่อแยกตะกอนออก จากนั้นดูดสารละลายส่วนบน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532.0 นาโนเมตร แล้วนำไปคำนวณหาการป้องกันการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน MDA

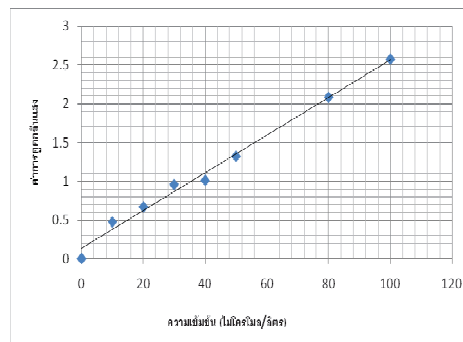
ผลการวิจัย

1. ผลการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานแกลลิก และการสร้างกราฟมาตรฐานแกลลิก

จากการนำสารละลายมาตรฐานแกลลิกที่มีความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 mg/L ปิเปตมา 0.1 mL เติมสารละลายรีเอเจนต์ 3 mL จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 704.0 นาโนเมตร แล้วนำมาสร้างกราฟมาตรฐานได้ผลดังภาพ 3



ภาพประกอบ 3 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก



ภาพประกอบ 4 กราฟมาตรฐาน MDA

2. การหาค่าความสามารถรวมของสารต้านอนุมูลอิสระของสารสมุนไพร

การหาค่าความสามารถรวมของสารต้านอนุมูลอิสระ โดยการนำพืชสมุนไพรแต่ละชนิดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 704 นาโนเมตร ที่ความเข้มข้น 1 mg/mL จากการเทียบกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก แอซิดให้ผลดังตารางที่ 1

ตาราง 1 ค่าความสามารถรวมของสารต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพร

สมุนไพร	ค่าเฉลี่ย ปริมาณกรดแกลลิก(mg/mL)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)
ขี้เหล็ก	0.0730	0.0015
ใบยอ	0.1402	0.0027
ผักเชียงดา	0.070	0.0013
อินทนิลน้ำ	0.146	0.0036
ครอบฟันสี	0.06	0.0019
ชุมเห็ดเทศ	0.249	0.0056
ใบบัวบก	0.113	0.0024
ชะพลู	0.144	0.0032
หญ้าหนวดแมว	0.219	0.0046

จากตารางและผลการทดลองที่ได้ ได้ทำการเลือกสมุนไพร 4 อันดับแรกที่มีความสามารถโดยรวมในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระคือหญ้าหนวดแมว ชุมเห็ดเทศ อินทนิลน้ำ ชะพลูเพื่อนำไปทำการทดสอบต่อไป

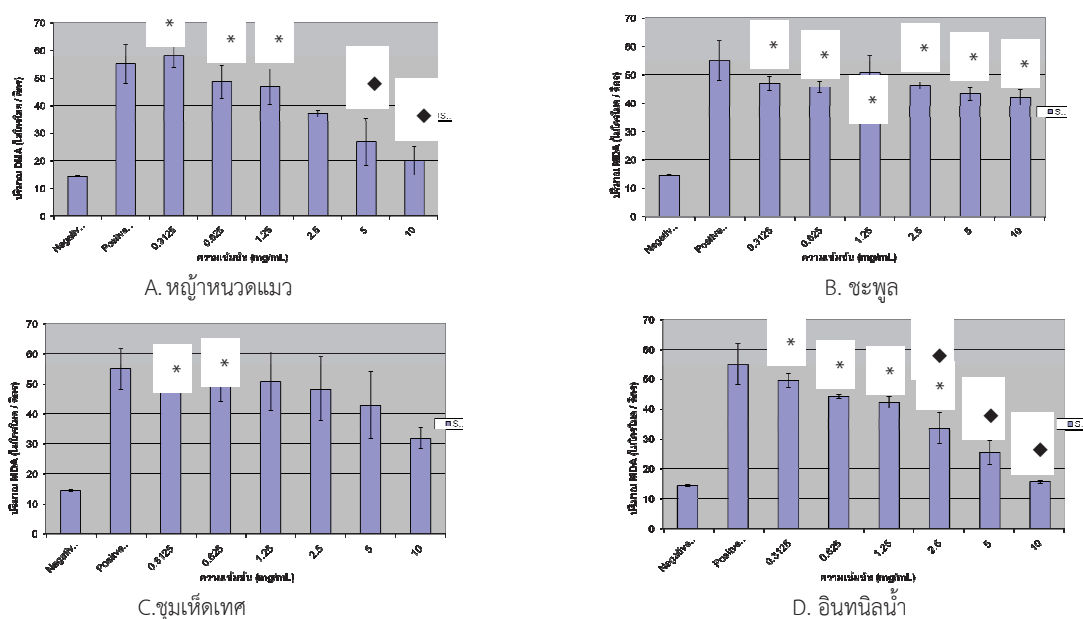
3. การเตรียมกราฟมาตรฐาน MDA

นำ stock มาตรฐาน MDA ที่เข้มข้น 100 μM มาเจือจางให้มีความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40, 50, 80, 100 $\mu\text{mol/L}$ จากนั้นเติมน้ำกลั่น 0.5 mL แล้วเติมสารมาตรฐาน MDA แต่ละความเข้มข้น 0.1 mL แล้วเติมน้ำกลั่นอีก 0.45 มิลลิลิตร จากนั้นทิ้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมสารละลาย TBA 0.2 mL และเติมสารละลาย TCA 1 mL เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มที่

อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 60 นาที พอลบเวลา ยกออกตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมน้ำ 2 mL เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532.0 นาโนเมตร แล้วนำมาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้น ได้ผลดังภาพที่ 4

4. การป้องกันการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน

เมื่อนำสมุนไพรทั้ง 4 ชนิด ที่มีค่าความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ 4 อันดับแรกมาทดสอบการป้องกันการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน โดยเลือกความเข้มข้นที่ 0.3125 0.625 1.25 2.50 5.00 10.00 mg/mL โดยใช้สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532.0 นาโนเมตรแล้วนำไปคำนวณหาค่าการป้องกันการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน MDA และวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมทางสถิติได้ผลดังภาพที่ 5



ภาพประกอบ 5 ภาพกราฟแสดงค่า SD และค่าความแตกต่างของสมุนไพร 4 ชนิด

หมายเหตุ * คือเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ negative control (คือการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันเมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยเพอร์ร็อกไซด์เฟต)

◆ คือลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ positive control (คือการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันเองตามธรรมชาติ)

สรุปและอภิปรายผล

ในการทดสอบลิพิดเปอร์ออกซิเดชันคือกระบวนการที่อนุมูลอิสระเข้าไปทำปฏิกิริยากับไขมันให้ผลผลิตคือ MDA ดังนี้ $X^\circ + \text{ไขมัน} \longrightarrow \text{MDA}$ จากการศึกษาหาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในสมุนไพรตัวอย่างในท้องถิ่น 9 ชนิดคือยอ บัวบก ขี้เหล็ก อินทนิลน้ำ ครอบฟันสี ชุมเห็ดเทศ ผักเชียงดา หอย้าหวดแมว ชะพลู โดยใช้สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 704 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแกลลิก แอซิดหลังจากนั้นได้ทำการเลือกพบว่าพืชสมุนไพร 4 อันดับ

แรกที่ทำให้ความสามารถรวมในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด คือชุมเห็ดเทศ หย้าหนดแมว อินทนิลน้ำ ชะพลู โดยมีค่าความสามารถรวมในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 0.249 0.219 0.146 0.144 mg/mL ตามลำดับ หลังจากนั้นได้นำไปทดสอบการป้องกันการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน โดยการนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตรโดยความเข้มข้นที่ใช้คือ 0.3125 0.625 1.25 2.50 5.0 10.00 mg/mL พบว่า เมื่อเติมสารสกัดสมุนไพรทั้ง 4 ชนิด แต่ละชนิดมีรูปแบบการออกฤทธิ์ในการป้องกันการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) สังเกตได้จากระดับ MDA ลดลงเรื่อยๆ เมื่อสารสกัดสมุนไพรมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นแต่ในสมุนไพร 2 ชนิดคือ สมุนไพรชุมเห็ดเทศและหย้าหนดแมวที่ความเข้มข้น 0.3125 mg/mL ไม่สามารถลดระดับ MDA ได้เมื่อเทียบกับ positive control และจากการวิจัยนี้คาดว่าสารสกัดสมุนไพรจะเข้าไปออกฤทธิ์โดยตรงกับอนุมูลอิสระซึ่งเป็นตัวการที่ทำให้เกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันทำให้ระดับ MDA ลดลง

เอกสารอ้างอิง

- กรรริการ พุ่มทอง. ฤทธิ์แอนติออกซิแดนท์ของสารฟอลิฟินอลที่สกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. (ม.ป.ป.).
- ชัยวัฒน์ นำชัยสีวัฒนา. การพัฒนาการตรวจวัดการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Thin layer Chromatography ในสมุนไพรไทย. ภาคนิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต. คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2542.
- ปรีชา ภูไพรศิริกาล. A Novel Furanocoumarin from Feroniella lucida Exerts Protective Effect against Lipid peroxidation. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2549.
- วาสนา สิทธิกัน. ฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระในเซลล์ Human monocytic cell line, U937 ที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะ oxidative stress โดย hydroperoxide. ภาคนิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต. คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2546.
- โอภา วัชรคุปต์และคณะ. สารต้านอนุมูลอิสระ. กรุงเทพฯ : พี.เอส. พรินท์, 2549.
- Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. Am J Med 91: 14S-22S, 1991.
- Halliwell B, Gutteridge JM, Aruoma OI. The deoxyribose method: a simple 'rest tube' assay for determination of rate constants for reaction of hydroxyl radicals. Anal. Biochem. 165 : 215-219, 1987.