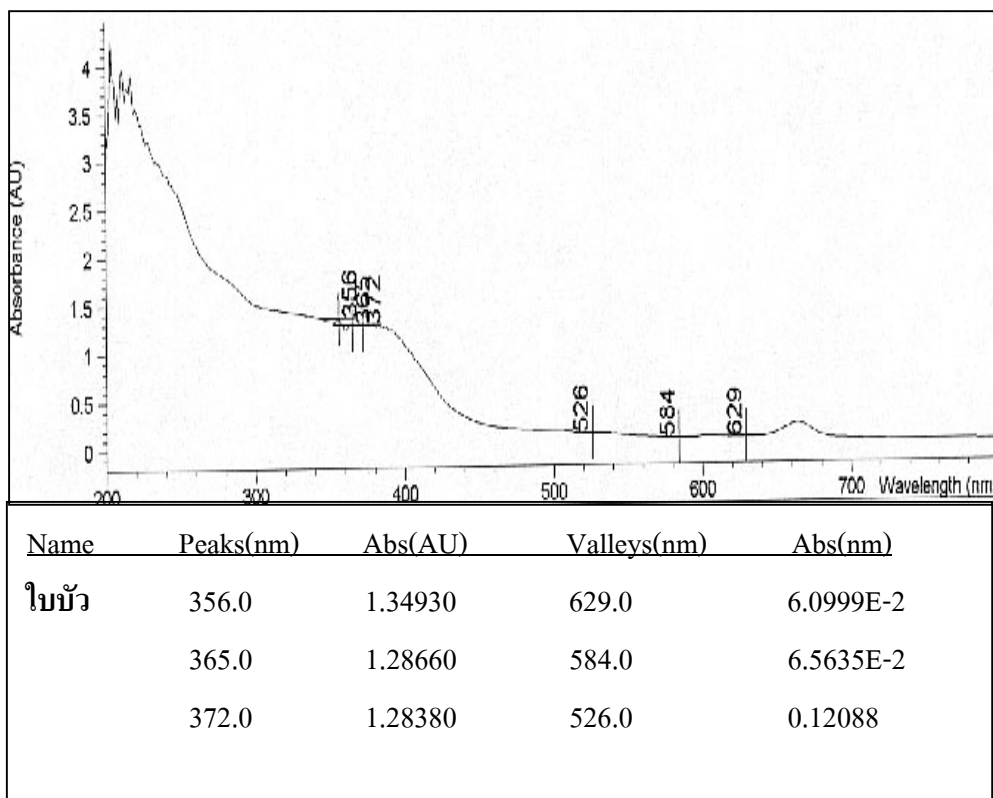
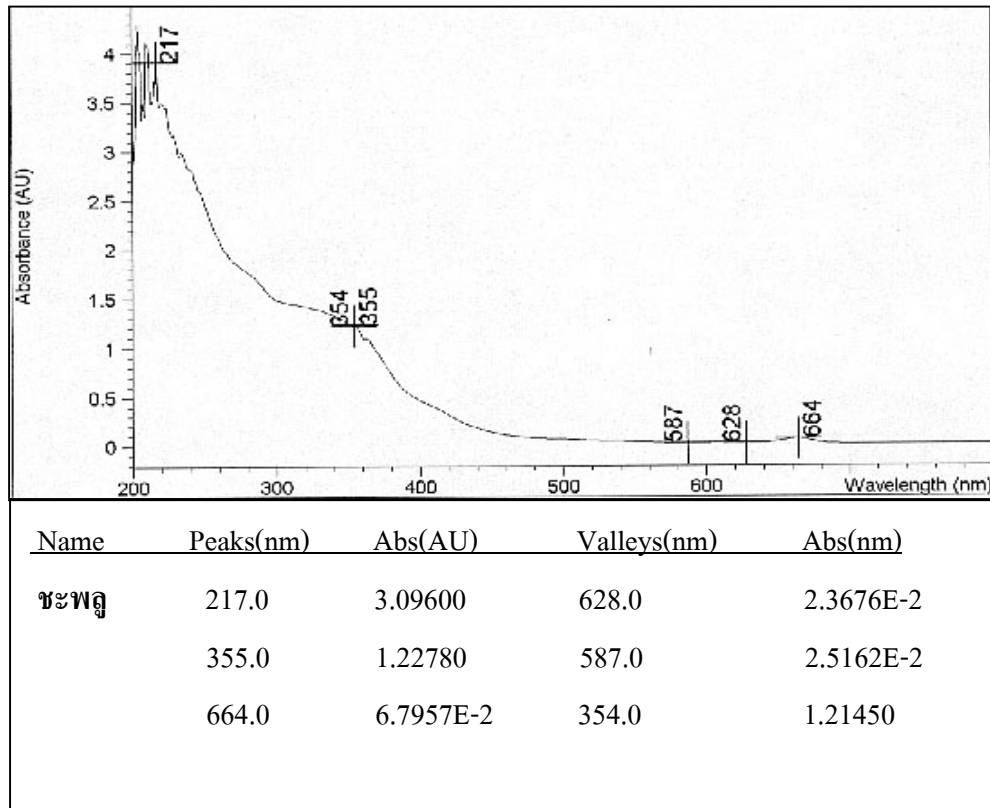


3. ผลการทดลองและวิจารณ์

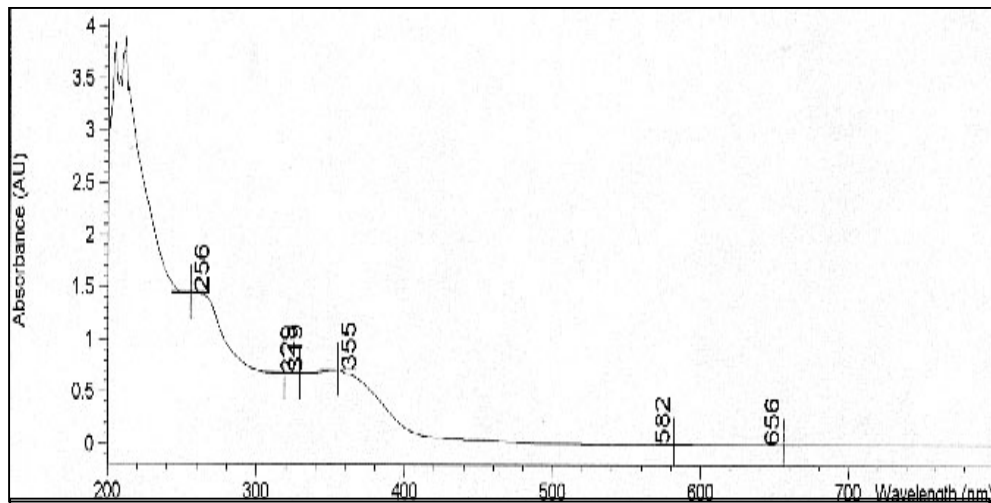
3.1 สมบัติการดูดกลืนแสงของสารสกัด

เมื่อนำสารสกัดแต่ละชนิดมาละลายในเมทานอลให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 mg/ml พบว่าสารละลายที่เตรียมได้มีลักษณะใสและไม่มีสีที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ยกเว้น สารสกัดจากชะพลู ใบบัว ใบมะกรูด และผิวมะกรูด ซึ่งมีสีน้ำตาล และเมื่อนำสารละลายเหล่านี้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 200 ถึง 800 นาโนเมตรโดยมีเมทานอลเป็น blank พบว่า มีสารสกัดอยู่ 7 ชนิดซึ่งดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วงความยาวคลื่นแสงเหนือม่วง (200-400 นาโนเมตร) [รูปที่ 5(ก)-(จ)] แสดงว่า สารสกัดเหล่านี้ประกอบด้วยสารที่มีสมบัติดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นดังกล่าวอยู่เป็นส่วนใหญ่ ส่วนสารสกัดจากवानกิบเรด ปิบฝรั่ง และหญ้าพันงูเขียวนั้น ถึงแม้ไม่มีการดูดกลืนแสงในช่วง 200-400 นาโนเมตร ปรากฏเป็นพีค (peak) ชัดเจน แต่เมื่อพิจารณาจากรูปแบบการดูดกลืนแสง (absorption spectrum) ของสารสกัดเหล่านี้แล้ว [รูปที่ 5(ค) และ 5(ง)] ดูเหมือนว่ามีการดูดกลืนแสงในช่วงดังกล่าวด้วย

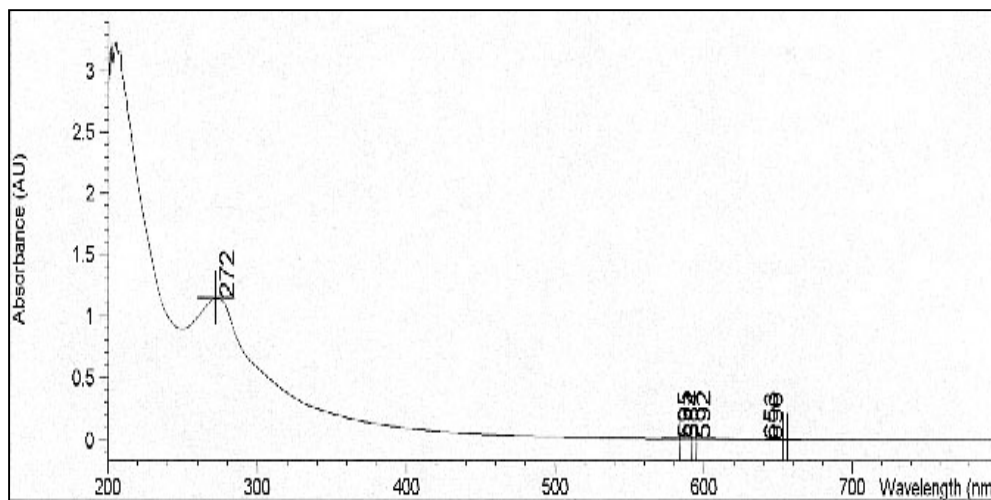
นอกจากคลื่นแสงเหนือม่วงแล้ว สารสกัดส่วนมากยังดูดกลืนแสงสีแดงโดยเฉพาะที่ความยาวคลื่นประมาณ 663-664 นาโนเมตร อีกด้วย ซึ่งน่าจะเป็นผลของคลอโรฟิลล์ (chlorophyll) ที่ยังคงปะปนอยู่ในสารสกัดเหล่านั้นนั่นเอง เนื่องจากรงควัตถุนี้สามารถดูดกลืนแสงได้ดีในช่วง 650-700 นาโนเมตร (Goodwin, 1988) อย่างไรก็ตาม การที่สารสกัดทั้งหมดไม่ดูดกลืนความยาวคลื่นแสงต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดสอบ ซึ่งได้แก่ การทดสอบความสามารถจับ Fe^{2+} ที่ 485 นาโนเมตร การดักจับอนุมูล DPPH \cdot ที่ 518 นาโนเมตร การดักจับอนุมูล $OH\cdot$ การยับยั้งกระบวนการออกซิเดชันของไขมัน การยับยั้งดีเอ็นเอ ถูกทำลายที่ 532 นาโนเมตร การยับยั้งเม็ดเลือดแดงแตกที่ 540 นาโนเมตร การดักจับอนุมูล $O_2\cdot^-$ ที่ 560 นาโนเมตร และการหาปริมาณ polyphenols ของสารสกัดที่ 760 นาโนเมตร ย่อมแสดงว่า สารสกัดทุกชนิดที่นำมาศึกษาจะไม่ส่งผลกระทบต่อผลของการทดสอบเหล่านี้



รูปที่ 5(ก) รูปแบบการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากชะพลู และใบบัว

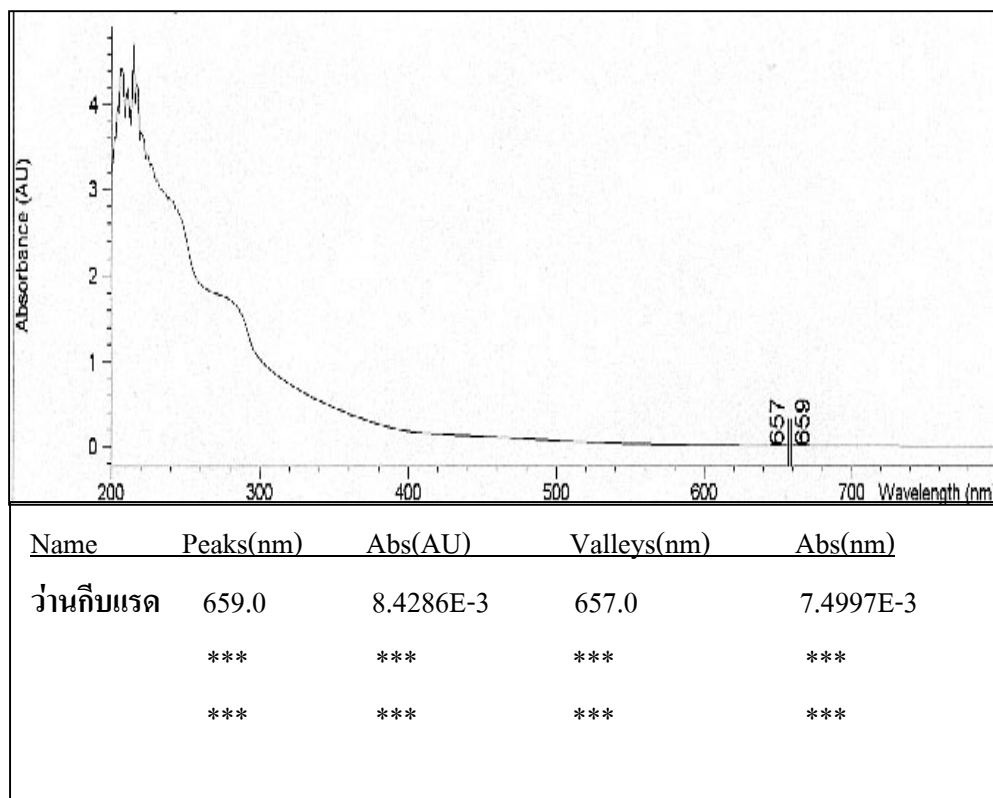
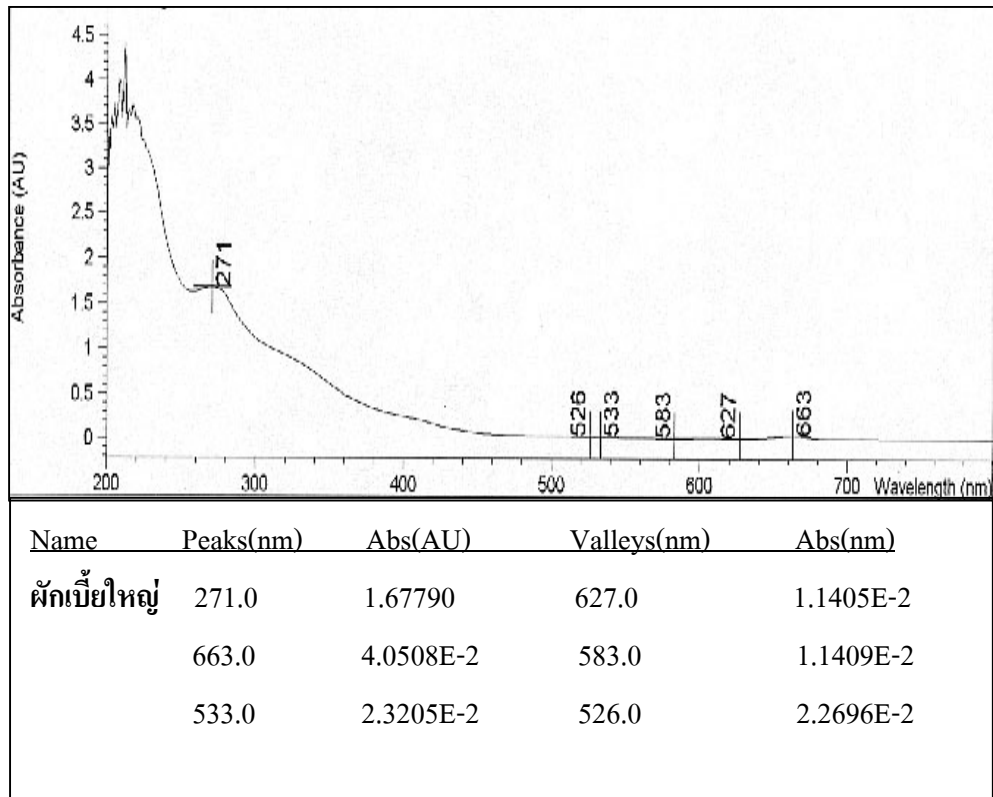


Name	Peaks(nm)	Abs(AU)	Valleys(nm)	Abs(nm)
เกสรบัว	256.0	1.44890	656.0	1.6766E-3
	355.0	0.70906	582.0	4.3812E-3
	319.0	0.68062	329.0	0.67691

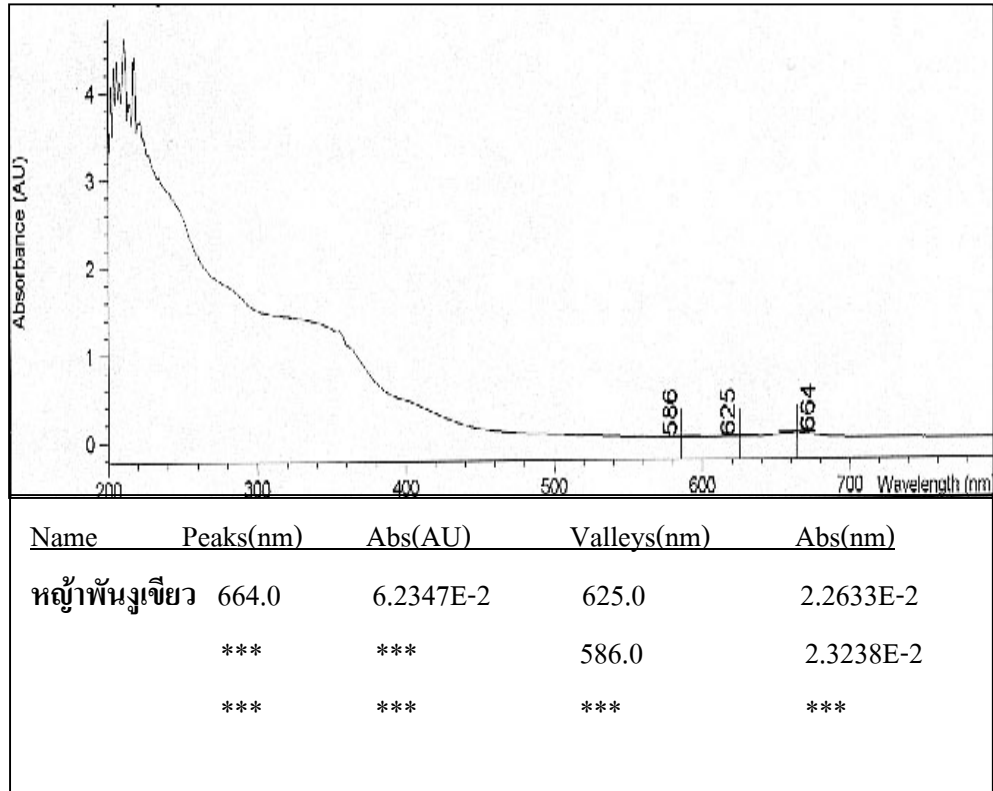
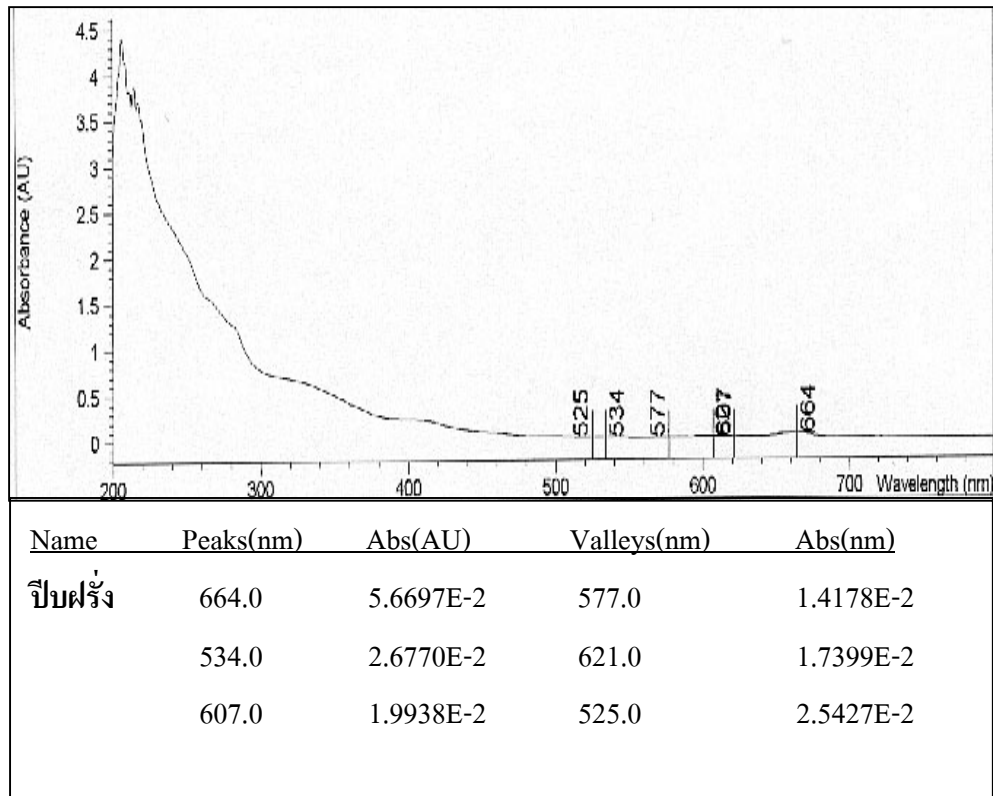


Name	Peaks(nm)	Abs(AU)	Valleys(nm)	Abs(nm)
กกบัว	272.0	1.14400	656.0	9.4700E-4
	584.0	9.7952E-3	653.0	5.6849E-3
	592.0	9.5129E-3	595.0	8.3408E-3

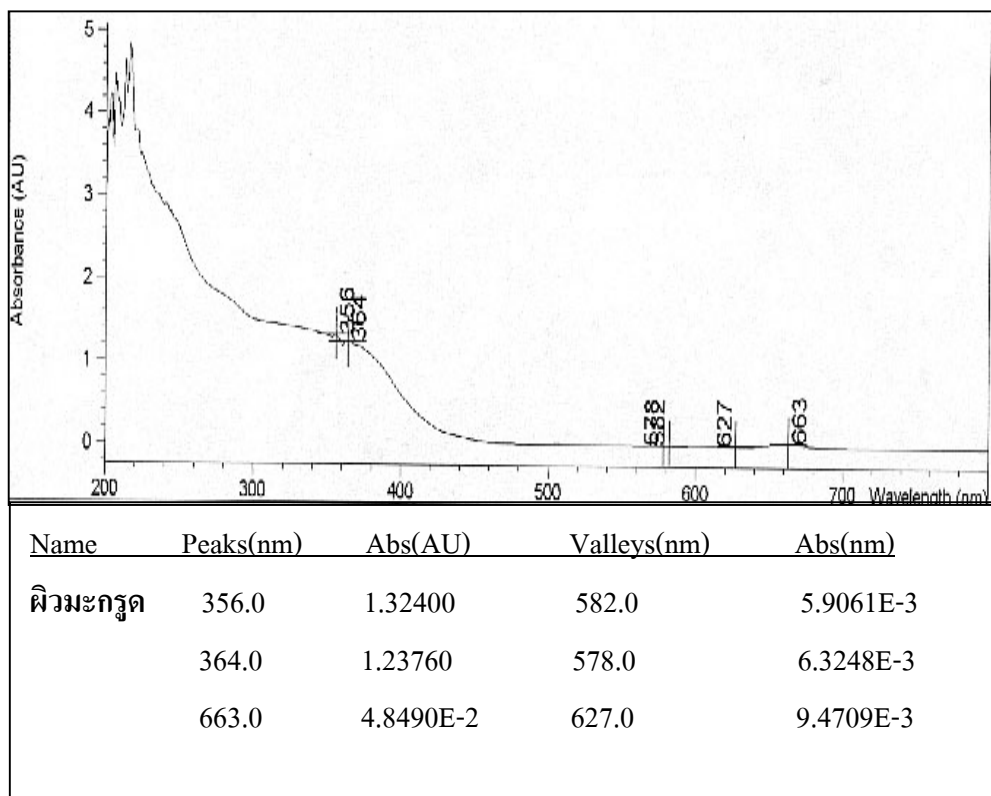
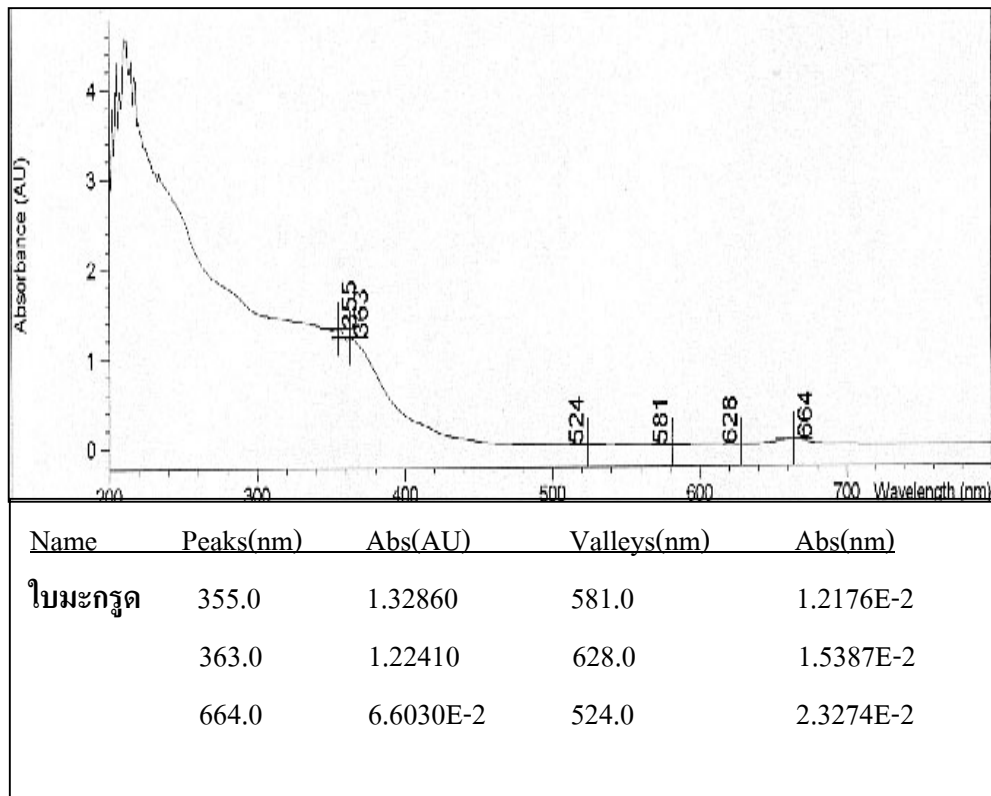
รูปที่ 5(ข) รูปแบบการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากเกสรบัว และกกบัว



รูปที่ 5(ค) รูปแบบการดูดกลืนแสงของสารสกัดฝักเบียร์ใหญ่ และว่านกีบเรด



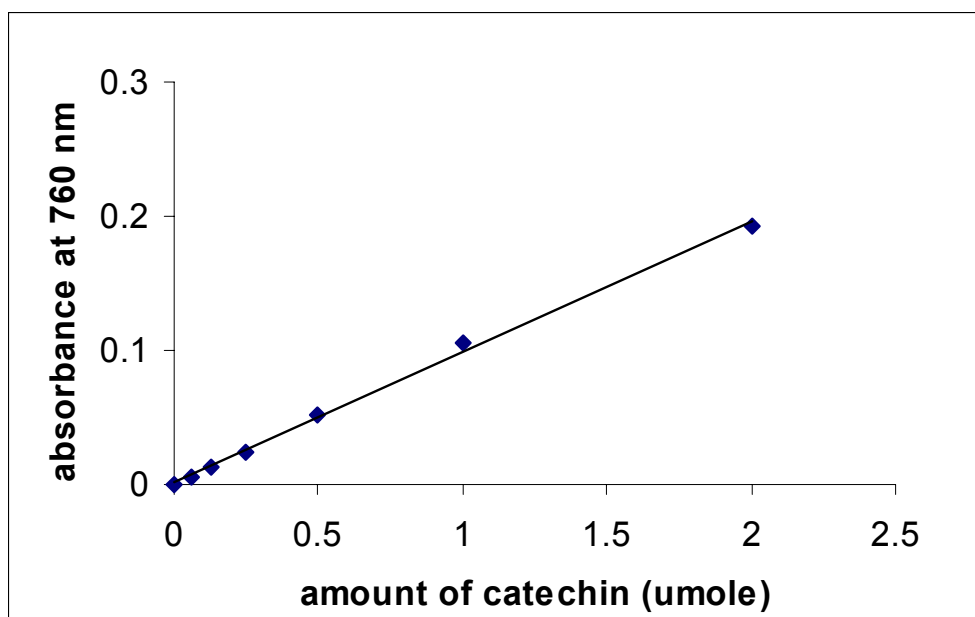
รูปที่ 5(ง) รูปแบบการดูดกลืนแสงของดาวสกัดจากปีปฝรั่ง และหญ้าพันธุ์เขียว



รูปที่ 5(จ) รูปแบบการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากใบมะกรูด และผิวมะกรูด

3.2 ปริมาณ polyphenols ในสารสกัด

Polyphenols จัดเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งพบได้ในพืชทั่วไป สำหรับในพืชสมุนไพรนั้น ปริมาณและตำแหน่งที่พบสารกลุ่มนี้มักแตกต่างกันไปตามชนิดของพืช (Duh and Yen, 1997) ในปัจจุบัน เป็นที่ทราบกันดีว่า polyphenols อย่างเช่น ฟลาโวนอยด์ และ แซนโทน ชนิดต่าง ๆ ที่มีต้นกำเนิดจากพืชพรรณธรรมชาติมีปริมาณที่น้อย สามารถดักจับอนุมูลอิสระได้เพราะมีโครงสร้างเคมีที่ประกอบด้วยหมู่ phenolic ซึ่งมีสมบัติเป็นนิวคลีโอไฟล์ (nucleophile) ที่ดี จำนวนหลายหมู่ (Lopes *et al.*, 1999) ดังนั้น สารสกัดจากพืชที่มีสารประกอบเหล่านี้มีอยู่มากจึงมักออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี (Cai *et al.*, 2004) จากผลการหาปริมาณ polyphenols ในสารสกัดทั้ง 10 ชนิด (ตารางที่ 2) โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน catechin (รูปที่ 6) ซึ่งเป็นสาร polyphenol จากพืชที่ประกอบด้วยหมู่ phenolic จำนวน 2 หมู่ (Rice-Evans *et al.*, 1996) พบว่าในแต่ละชนิดของสารสกัดเหล่านี้มีปริมาณ polyphenols ซึ่งเทียบเป็น catechin แล้ว แตกต่างกัน จากการที่หมู่ phenolic มีสมบัติดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วงเหนือม่วง (Morrison and Boyd, 1975) ดังนั้น ความสามารถดูดกลืนแสงเหนือม่วงของสารสกัดจึงย่อมมีความสัมพันธ์กับปริมาณของสารประกอบ polyphenols ชนิดต่าง ๆ ที่มีอยู่ในสารสกัด นั่นเอง ผลจากการทดลองนี้ ปรากฏว่า สารสกัดจากใบบัวซึ่งดูดกลืนแสงเหนือม่วงได้ดีทั้งที่ความยาวคลื่น 356, 365 และ 372 นาโนเมตร นั้น [รูปที่ 5(ก)] มีปริมาณ polyphenols มากที่สุด เมื่อเทียบกับสารสกัดทั้งหมด รองลงมาได้แก่ ว่านกีบแรด ใบมะกรูด ผิวมะกรูด ชะพลู หนุ่ยพันธุ์เขียว เกสรบัว ผักเบี้ยใหญ่ และปีบฝรั่ง ตามลำดับ ส่วนที่มีปริมาณ polyphenols น้อยที่สุดคือ กกบัว ซึ่งดูดกลืนแสงเหนือม่วงที่ 272 นาโนเมตร เท่านั้น สำหรับสารสกัด 3 ชนิดได้แก่ ว่านกีบแรด ปีบฝรั่ง และหนุ่ยพันธุ์เขียว ซึ่งไม่มีผลของการดูดกลืนแสงปรากฏในช่วงเหนือม่วงเลย [รูปที่ 5(ค) และ 5(ง)] แต่จากการที่พบว่าสารสกัดเหล่านี้มี polyphenols อยู่ด้วยนั้น ช่วยยืนยันความสามารถดูดกลืนแสงเหนือม่วงของสารสกัดทั้ง 3 ชนิดตามที่ได้เคยกล่าวไว้ในหัวข้อ 3.1 ได้เป็นอย่างดี



รูปที่ 6 กราฟมาตรฐานของ catechin ที่ใช้หาปริมาณ polyphenols ในสารสกัด

ตารางที่ 2 ปริมาณ polyphenols ในสารสกัดแต่ละชนิด

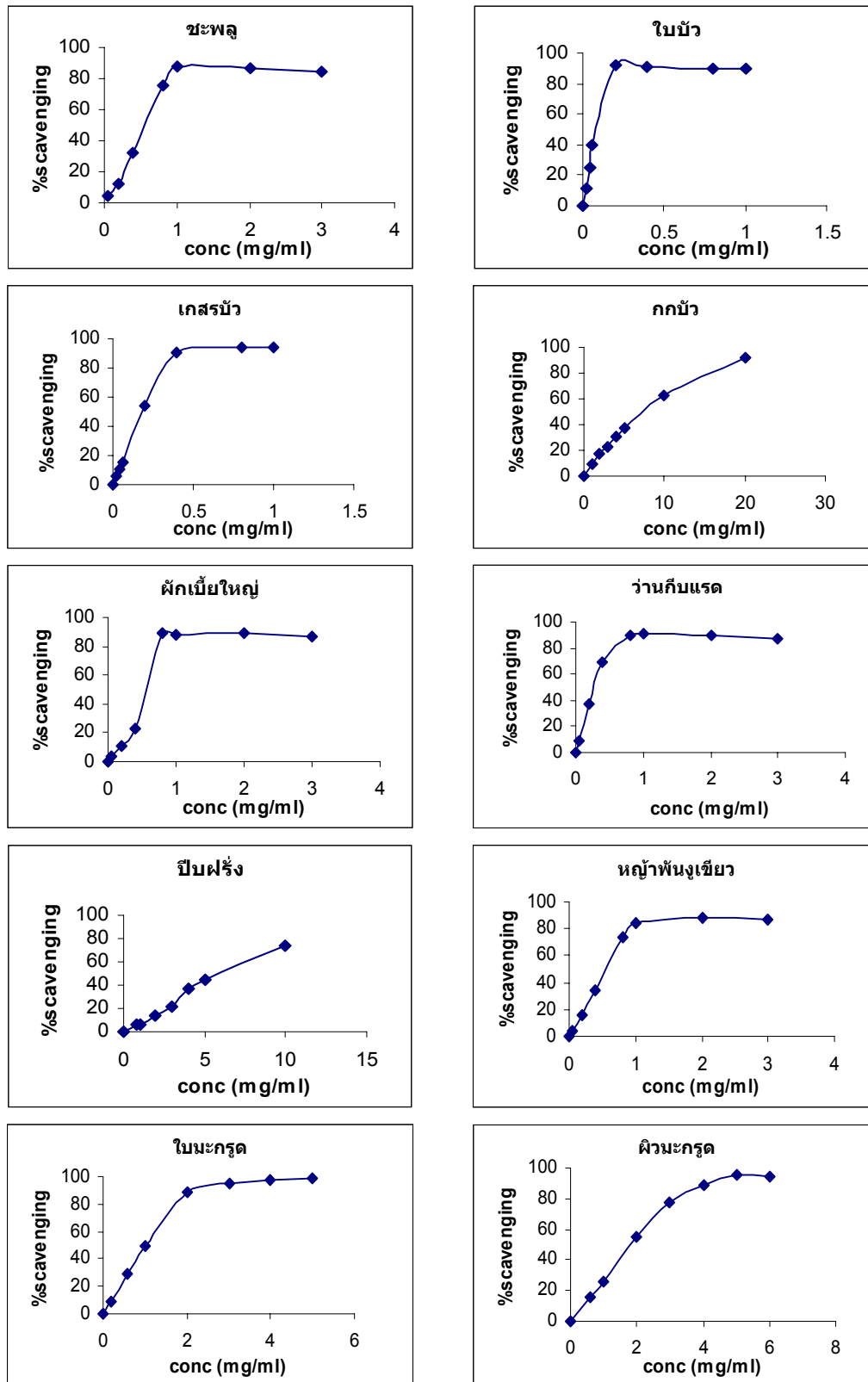
สารสกัด	ปริมาณ polyphenols ($\mu\text{mole catechin}$)/mg สารสกัด
ชะพลู	6.41 ± 0.14
ใบบัว	15.98 ± 0.16
เกสรบัว	5.28 ± 0.26
กกบัว	0.23 ± 0.14
ผักเบี้ยใหญ่	4.34 ± 0.16
ว่านกีบแรด	9.31 ± 0.40
ปีบฝรั่ง	1.01 ± 0.38
หญ้าพันงูเขียว	5.97 ± 0.14
ใบมะกรูด	8.19 ± 0.40
ผิวมะกรูด	6.58 ± 0.14

[หมายเหตุ ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ($\bar{x} \pm \text{S.D.}$) จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง]

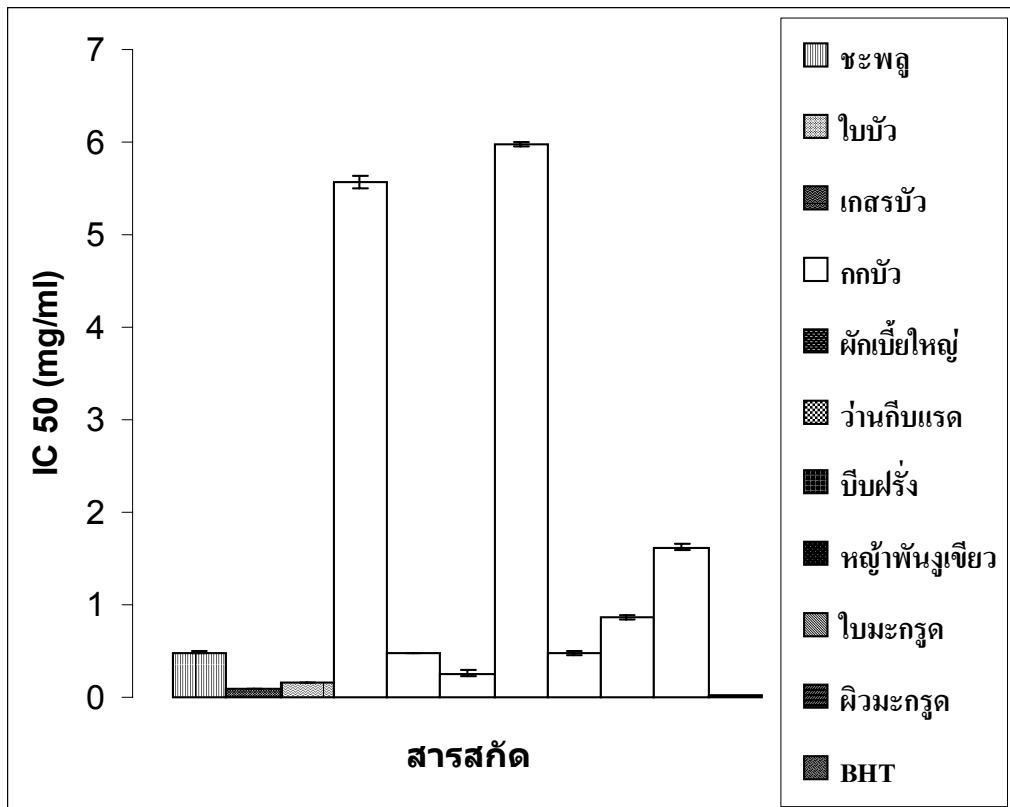
3.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด

3.3.1 ฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH

การทดสอบความสามารถดักจับอนุมูล DPPH[•] ในสารละลาย ตามที่ระบุในหัวข้อ 2.3.1 เป็นวิธีการที่นิยมใช้กันทั่วไปสำหรับตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดในเบื้องต้น (Zhu *et al.*, 2002) ซึ่งอาศัยหลักการคือ เมื่ออนุมูล DPPH[•] ในสารละลายสีม่วงเข้มได้รับอิเล็กตรอนหรือ H[•] จากสารทดสอบ จะกลายเป็นสารประกอบ DPPH ที่เสถียรขึ้นและไม่มีสีม่วงเข้มเหมือนกับ DPPH[•] ทำให้ตรวจวัดความสามารถของสารสกัดได้ จากค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH[•] ที่ลดลง ดังกล่าว (Bran-Williams *et al.*, 1995) ในการทดสอบสารสกัดทั้ง 10 ชนิด ผลปรากฏว่า สารสกัดส่วนใหญ่สามารถดักจับอนุมูล DPPH[•] ได้โดยมีค่ามีค่า IC₅₀ ไม่เกิน 1 mg/ml ในขณะที่สารสกัดจากผิวมะกรูด กกบัว และปืบฝรั่ง ที่มีค่า IC₅₀ สูงถึง 1.62, 5.56 และ 5.98 mg/ml ตามลำดับ (รูปที่ 7 และ 8) สำหรับสารสกัดที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH[•] ได้ดีที่สุดได้แก่สารสกัดจากใบบัว โดยมีความ IC₅₀ เท่ากับ 0.09 mg/ml ซึ่งจัดเป็นฤทธิ์ที่ดี เมื่อเทียบกับสารออกฤทธิ์มาตรฐานคือ BHT ที่มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.03 mg/ml และเมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองดังกล่าว (รูปที่ 8) กับผลการหาปริมาณ polyphenols ในตารางที่ 2 จะเห็นได้ว่า ลำดับความสามารถดักจับอนุมูล DPPH[•] กับลำดับของปริมาณ polyphenols ในสารสกัดมีความใกล้เคียงกันเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งแสดงว่า ระดับของการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน่าจะขึ้นกับปริมาณ polyphenols ในสารสกัดนั้น ๆ เป็นสำคัญ อย่างไรก็ตาม ความสามารถให้อิเล็กตรอน ของ polyphenols มิได้อยู่ภายใต้อิทธิพลของจำนวนหมู่ phenolic อย่างเดียวเท่านั้น แต่อาจขึ้นกับตำแหน่งของหมู่ hydroxyl ที่เป็นส่วนประกอบโครงสร้างดังกล่าวด้วย เนื่องจากมีหลักฐานว่า หมู่ *ortho*-dihydroxyl บนวงแหวนบี (B-ring) ของฟลาโวนอยด์ สามารถให้อิเล็กตรอนได้ดีกว่าหมู่ hydroxyl ที่ตำแหน่งอื่น ๆ บนโมเลกุลเดียวกัน (Morel *et al.*, 1998)



รูปที่ 7 ความสามารถดักจับอนุมูล DPPH[•] (%scavenging) ของสารสกัดแต่ละชนิด ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

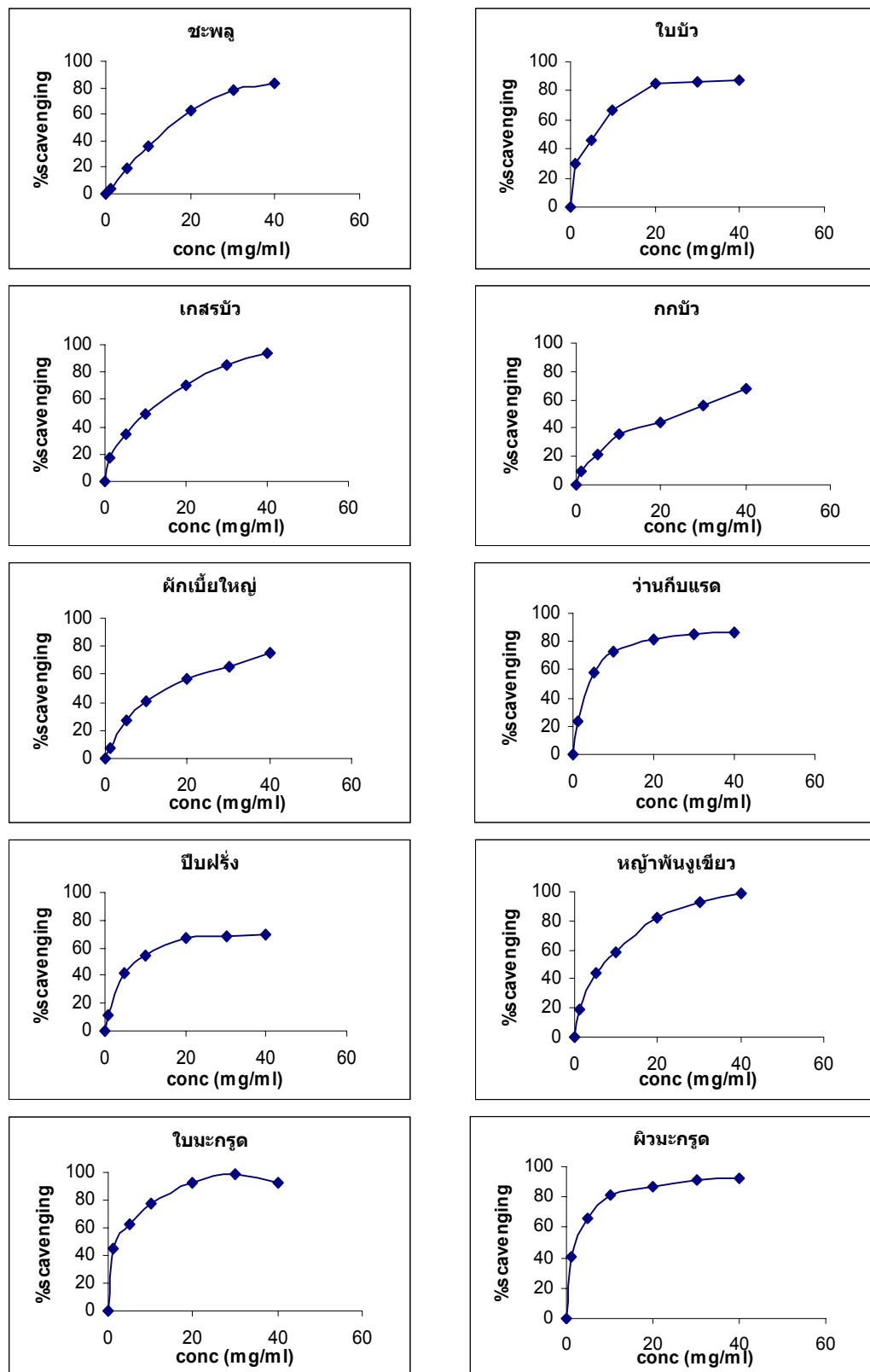


รูปที่ 8 เปรียบเทียบค่า IC₅₀ ในการดักจับอนุมูล DPPH[•] ของสารสกัดแต่ละชนิด
 [หมายเหตุ ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ($\bar{x} \pm S.D.$) จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง]

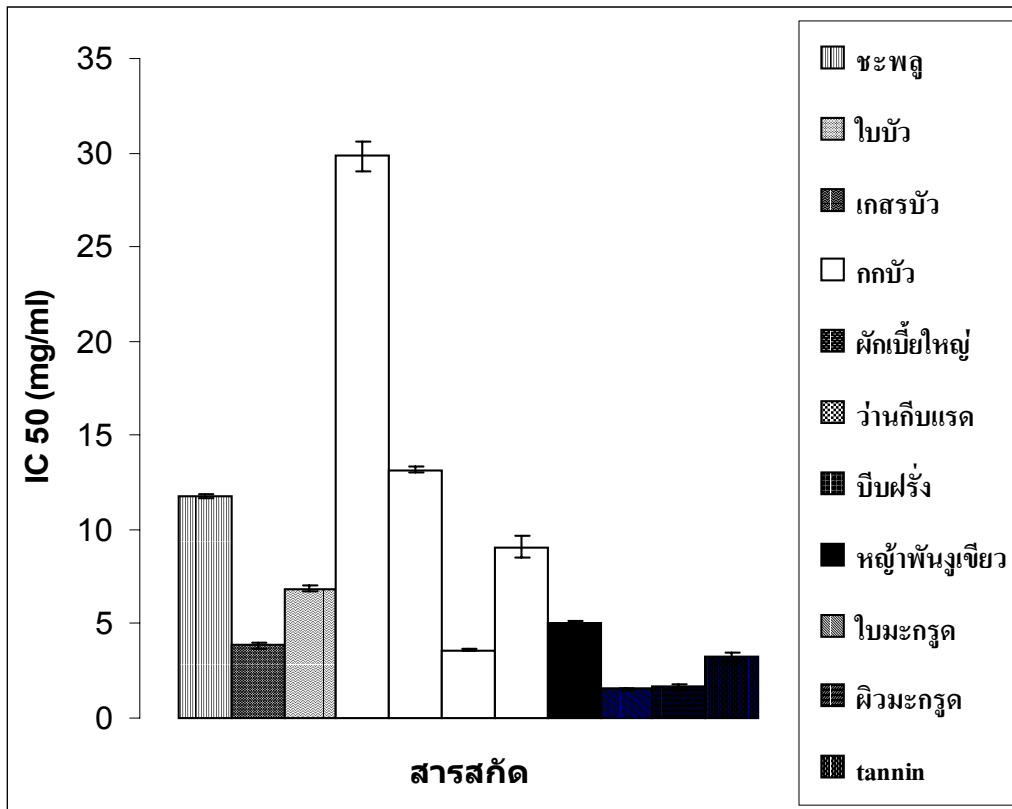
3.3.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลไฮดรอกซิล (OH[•])

เมื่อนำสารสกัดแต่ละชนิดมาทดสอบความสามารถดักจับอนุมูล OH[•] ตามที่ระบุในหัวข้อ 2.2 ซึ่งอาศัยหลักการคือ เมื่อน้ำตาล deoxyribose ถูกทำลายโดยปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูล OH[•] ที่เกิดจากปฏิกิริยา Fenton จะมีสารประกอบอัลดีไฮด์ (aldehydes) เกิดขึ้นซึ่งตรวจวัดได้ในรูปสารประกอบเชิงซ้อนสีชมพูของ TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) ดังนั้นจึงสามารถนำวิธีดังกล่าวมาใช้ตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดได้โดยดูจากค่าการดูดกลืนแสงสีชมพูที่ลดลงนั่นเอง (Lee *et al.*, 2002) พบว่าสารสกัดทั้งหมดที่นำมาทดสอบในครั้งนี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูล OH[•] เนื่องจากสามารถยับยั้งการแตกสลายของ deoxyribose ได้ (รูปที่ 9) และมีค่า IC₅₀ ต่าง ๆ ตามที่แสดงในรูปที่ 10 โดยสารสกัดจากใบมะกรูดมีฤทธิ์สูงสุด รองลงมาได้แก่ ผิวมะกรูด ซึ่งทั้งคู่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูล OH[•] แรงกว่าสารมาตรฐานคือ tannin ที่มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 3.25 mg/ml (สารสกัดใบมะกรูด และผิวมะกรูด มีค่า IC₅₀ เป็น 1.55 และ 1.64 mg/ml ตามลำดับ) ส่วนสารสกัดซึ่งแสดงฤทธิ์น้อยที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดทั้งหมดได้แก่ สารสกัดจากกกบัวซึ่งเป็นสารสกัดที่ดักจับอนุมูล DPPH[•] ได้ไม่ดี (รูปที่ 8)

เมื่อพิจารณาลำดับความสามารถดักจับอนุมูล OH[•] เปรียบเทียบกับอนุมูล DPPH[•] ในรูปที่ 10 แล้วพบว่าถึงแม้สารสกัดส่วนใหญ่ดักจับอนุมูล OH[•] ได้ไม่ดีเท่าอนุมูล DPPH[•] แต่ก็มีสารสกัดอยู่ 3 ชนิดคือ สารสกัดใบมะกรูด ผิวมะกรูด และปืบฝรั่ง ซึ่งกลับดักจับอนุมูล OH[•] ได้ดีกว่า DPPH[•] ทั้งนี้ ในการต้านอนุมูล OH[•] ซึ่งจัดเป็นอนุมูลที่เข้าทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบของสิ่งมีชีวิตได้ว่องไวที่สุดนั้น (Racchi *et al.*, 2002) นอกจากการกำจัดโดยให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลโดยตรงแล้ว การเข้าจับกับ Fe²⁺ หรือ Cu²⁺ ก็นับเป็นอีกกลไกหนึ่งที่ใช้ยับยั้งการเกิดอนุมูล OH[•] จากปฏิกิริยาที่มีไอออนของโลหะทรานซิชันทั้งสองชนิดเป็นตัวเหนี่ยวนำ โดยเฉพาะสารประกอบ polyphenols ที่มีหมู่ *ortho*-dihydroxyl อยู่ในโมเลกุล สามารถจับกับไอออนเหล่านี้แล้วเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนได้ดี (Sanchez-Moreno *et al.*, 2000) ดังนั้นสมบัติต้านอนุมูล OH[•] ของสารสกัดจากพืชทั้ง 3 ชนิดดังกล่าวน่าจะเกิดจากความสามารถจับ Fe²⁺ ขององค์ประกอบในสารสกัดแล้วยังผลให้ปริมาณอนุมูล OH[•] ลดลงมากกว่าวิธีการดักจับโดยตรง



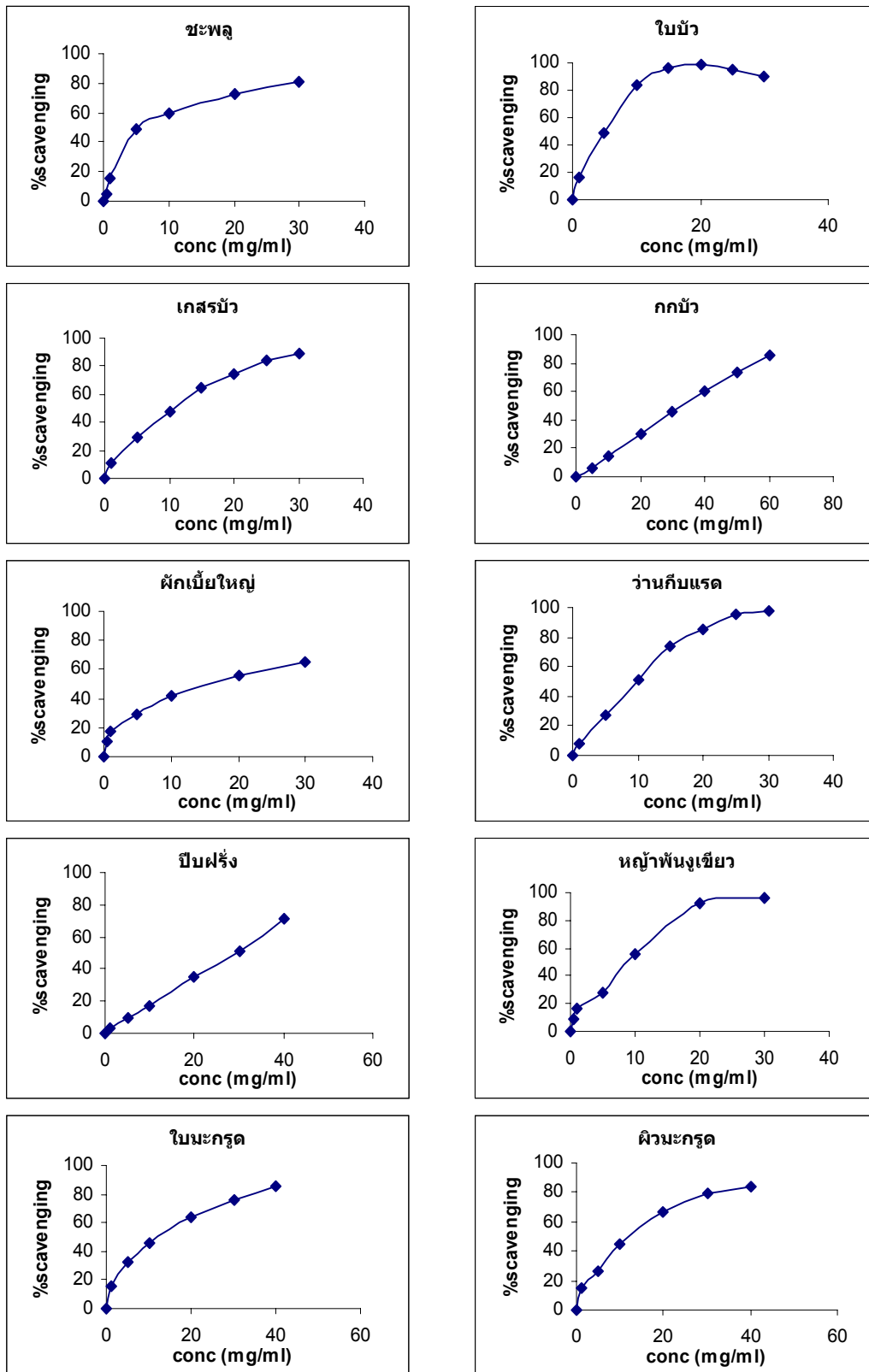
รูปที่ 9 ความสามารถดักจับอนุมูล OH^\bullet (%scavenging) ของสารสกัดแต่ละชนิด ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน



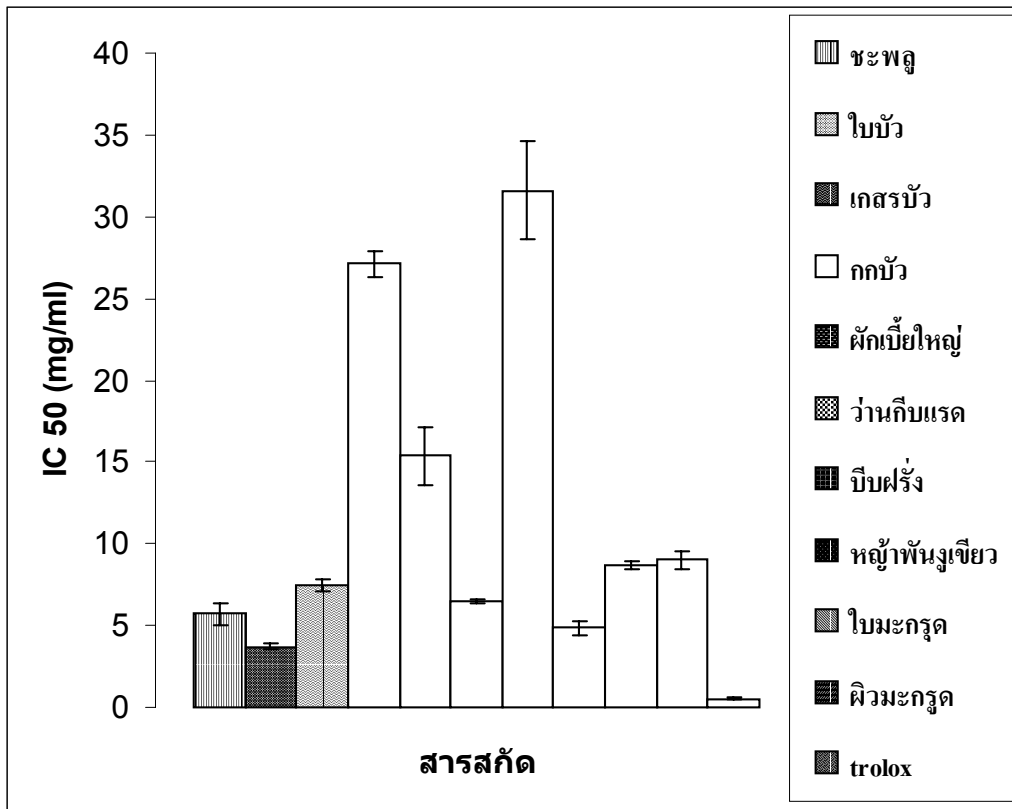
รูปที่ 10 เปรียบเทียบค่า IC₅₀ ในการดักจับอนุมูล OH[•] ของสารสกัดแต่ละชนิด
 [หมายเหตุ ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ($\bar{x} \pm S.D.$) จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง]

3.3.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (O₂⁻)

เมื่อนำสารสกัดแต่ละชนิดมาทดสอบความสามารถดักจับอนุมูล O_2^- โดยเลียนแบบวิธีการตรวจวัดแอกติวิตีของ superoxide dismutase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถสูงในการกำจัดอนุมูล O_2^- โดยทำหน้าที่เร่งการเปลี่ยน O_2^- เป็น H_2O_2 ในปฏิกิริยา dismutation (Fridovich, 1997) วิธีการทดสอบที่ใช้มีหลักการคือ เมื่อ riboflavin ถูกกระตุ้นด้วยแสงจะสามารถรับอิเล็กตรอนจาก methionine แล้วเปลี่ยนโครงสร้างเป็น semiquinone ซึ่งจะให้อิเล็กตรอนต่อไปยังออกซิเจน (O_2) เปลี่ยนเป็น O_2^- แล้วไปรีดิวซ์ (reduce) NBT ที่มีสีเหลืองเปลี่ยนเป็นสาร formazan ที่มีสีม่วงในที่สุด วัดความสามารถของสารสกัดในการดักจับอนุมูล O_2^- ได้จากการยับยั้งการเปลี่ยนสีของ NBT ดังกล่าว (Beyer and Fridovich, 1987) จากการทดลองพบว่าสารสกัดทั้งหมดมีฤทธิ์ต้านอนุมูล O_2^- เนื่องจากสามารถยับยั้งการเปลี่ยนสีของ NBT ได้ (รูปที่ 11) แต่มีค่า IC_{50} ก่อนข้างสูง ดังแสดงในรูปที่ 12 โดยสารสกัดที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูล O_2^- ได้ดีที่สุดคือ สารสกัดใบบัวนั้น มีค่า IC_{50} สูงถึง 3.70 mg/ml ค่อนข้างกว่าสารออกฤทธิ์มาตรฐานคือ trolox ประมาณ 7 เท่า (มีค่า IC_{50} เพียง 0.55 mg/ml เท่านั้น) ในขณะที่ กกบัว กับปืบฝรั่ง มีฤทธิ์ในระดับที่ต่ำสุด เมื่อนำผลการทดลองดังกล่าวมาเปรียบเทียบกับความสามารถดักจับ DPPH \cdot ของสารสกัด (รูปที่ 7) พบว่ามีความสอดคล้องกัน ซึ่งสะท้อนถึงความสามารถให้อิเล็กตรอนของสารประกอบ polyphenols ต่าง ๆ ในสารสกัดเหล่านี้ได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตาม ชีคความสามารถดักจับอนุมูล O_2^- ของ polyphenols ยังอาจขึ้นกับโครงสร้างสารนั้น ๆ อีกด้วย เนื่องจากเคยมีผู้รายงานว่า catechin และอนุพันธ์ต่าง ๆ ของ catechin ซึ่งประกอบด้วยวงแหวนบีตา (β -ring) ที่มีหมู่ไฮดรอกซิล จำนวน 3 หมู่ (3,4,5-trihydroxyl groups) เกาะติดอยู่ สามารถให้อิเล็กตรอนกับ อนุมูลชนิดนี้ได้ดีกว่าวงแหวนที่มีเพียง 2 หมู่ (3,4-dihydroxyl groups) (Unno *et al.*, 2000)



รูปที่ 11 ความสามารถดักจับอนุมูล $O_2^{\cdot-}$ (%scavenging) ของสารสกัดแต่ละชนิด ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน



รูปที่ 12 เปรียบเทียบค่า IC₅₀ ในการดักจับอนุมูล O₂⁻ ของสารสกัดแต่ละชนิด
 [หมายเหตุ ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ($\bar{x} \pm S.D.$) จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง]

3.4 ความสามารถจับ Fe^{2+} ของสารสกัด

เมื่อนำสารสกัดแต่ละชนิดมาทดสอบความสามารถในการจับ Fe^{2+} ตามวิธีที่ระบุไว้ในหัวข้อ 2.4 โดยการใช้ TMM ซึ่งเมื่อเข้าทำปฏิกิริยากับเหล็กอิสระ (Fe^{2+}) ในสารละลาย จะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีชมพู ดังนั้นเมื่อเหล็กเหล่านี้ถูกจับหมดไม่เหลือไปทำปฏิกิริยากับ TMM สีชมพูของสารละลายดังกล่าวย่อมจางหายไป ทำให้ตรวจสอบความสามารถจับเหล็กในรูป Fe^{2+} ของสารสกัดได้จากค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายสีชมพูที่ลดลงนั่นเอง (Yang *et al.*, 2000) จากการทดลองพบว่าสารสกัดทั้งหมดสามารถจับ Fe^{2+} ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3 สารสกัดใบบัวสามารถจับ Fe^{2+} อิสระที่มีอยู่ในสารละลายผสมได้มากที่สุด โดยที่ความเข้มข้น 2 mg/ml สามารถจับเหล็กได้เกือบหมด ซึ่งดีกว่า EDTA และ citric acid ที่ความเข้มข้น 0.2 M ซึ่งสามารถจับ Fe^{2+} ได้ประมาณ 31 และ 97 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับใกล้เคียงกับที่ Ratanamahasukul (2000) เคยรายงานไว้ รองลงมาคือ สารสกัดจากवानกิบแรด ในขณะที่สารสกัดอื่น ๆ แสดงความสามารถพอ ๆ กัน ยกเว้น สารสกัดผักเบี้ยใหญ่ซึ่งจับเหล็กได้น้อยมาก จึงเป็นเหตุผลสำคัญอย่างหนึ่งที่ทำให้สารสกัดชนิดนี้กำจัดอนุมูล OH^{\cdot} ได้ไม่ดีนัก และเมื่อเปรียบเทียบความสามารถให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระคือ DPPH $^{\cdot}$ (รูปที่ 8) กับผลการทดลองนี้แล้ว จะเห็นได้ว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูล OH^{\cdot} ของสารสกัดเหล่านี้ ส่วนหนึ่งมาจากการกำจัด Fe^{2+} ที่เป็นตัวเริ่มต้นของปฏิกิริยา Fenton นั่นเอง แต่ทั้งนี้สารสกัดแต่ละชนิดอาจอาศัยกลไกดังกล่าวมากน้อยไม่เท่ากันขึ้นกับปริมาณและโครงสร้างของ polyphenols ในสารสกัดนั้น ๆ นั่นเอง (Rice-Evans *et al.*, 1996)

ตารางที่ 3 ความสามารถจับ Fe^{2+} (% chelation) ของสารสกัดแต่ละชนิด

สารสกัด ความเข้มข้น	% chelation		
	0.5 mg/ml	1 mg/ml	2 mg/ml
ชะพลู	9.30 ± 0.59	12.0 ± 0.26	20.0 ± 1.69
ใบบัว	10.8 ± 0.25	61.1 ± 1.01	99.6 ± 0.19
เกสรบัว	3.25 ± 0.10	7.06 ± 0.51	18.0 ± 1.56
กกบัว	3.86 ± 0.44	10.9 ± 0.61	20.1 ± 0.70
ผักเบี้ยใหญ่	5.21 ± 0.44	8.63 ± 0.10	11.2 ± 0.35
ว่านกีบแรด	4.31 ± 1.70	29.6 ± 1.78	71.2 ± 0.51
ปีบฝรั่ง	9.30 ± 2.04	15.6 ± 0.79	18.5 ± 1.95
หญ้าพันธุ์เขียว	16.8 ± 0.68	28.8 ± 0.79	38.0 ± 3.75
ใบมะกรูด	6.89 ± 1.05	10.9 ± 0.68	23.7 ± 1.35
ผิวมะกรูด	10.1 ± 1.02	16.8 ± 0.34	33.1 ± 1.21
EDTA (0.2 M)		31.4 ± 0.19	
citric acid (0.2 M)		96.9 ± 0.26	

[หมายเหตุ ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ($\bar{x} \pm S.D.$) จากการทดลอง 3 ครั้ง]

3.5 ความสามารถปกป้องชีวโมเลกุลจากอนุมูลอิสระ

3.5.1 ความสามารถยับยั้งเม็ดเลือดแดงแตก

เมื่อนำตัวอย่างเม็ดเลือดแดงมาทำปฏิกิริยากับ AAPH ในสารละลายที่อุณหภูมิ 37°C AAPH จะแตกตัวเพราะความร้อน (thermolysis) ให้อนุมูล peroxy ซึ่งจะเข้าทำลายเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงโดยเหนี่ยวนำให้เกิดลูกโซ่ของปฏิกิริยาออกซิเดชัน (autooxidation chain) ของไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ดังกล่าว (Yen and Wu, 1999) ตรวจวัดความสามารถของสารสกัดแต่ละชนิดในการยับยั้งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้จากค่าดูดกลืนแสงของฮีโมโกลบินที่ลดลงเมื่อเทียบกับสารละลายเม็ดเลือดแดงในสถานะที่ไม่มีสารยับยั้งปฏิกิริยาใด ๆ อยู่เลย จากการทดลองพบว่าสารสกัดทั้งหมดสามารถยับยั้งเม็ดเลือดแดงแตกได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4 โดยที่ความเข้มข้น 250 µg/ml สารสกัดจากใบบัวบกได้สูงสุด แต่ก็ยังน้อยกว่าสารต้านออกซิเดชันมาตรฐานคือ ascorbic acid ณ ความเข้มข้นเดียวกัน รองลงมาได้แก่ ใบมะกรูด ผิวมะกรูด หนุ่ยพันธุ์เขียว ชะพลู ปืบฝรั่ง ผักเบี้ยใหญ่ เกสรบัว ว่านกีบแรด กกบัว เรียงลำดับตามความสามารถต้าน DPPH[•] นั้นเอง (รูปที่ 8) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 500 µg/ml สารสกัดส่วนใหญ่ยังคงมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งใกล้เคียงกับของเดิม ซึ่งนั่นแสดงถึงความสามารถสูงสุดของสารสกัดเหล่านี้ ยกเว้น สารสกัดจากผักเบี้ยใหญ่ ใบมะกรูด ผิวมะกรูด และชะพลู ซึ่งสามารถยับยั้งเม็ดเลือดแดงแตกเพิ่มขึ้นจนเกือบสมบูรณ์ (98.87, 98.14, 97.94 และ 97.41 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) และดีกว่า ascorbic acid ที่ความเข้มข้นเดียวกัน (96.47 เปอร์เซ็นต์) ทั้งนี้ผลการทดลองข้างต้นย่อมแสดงว่า การปกป้องเม็ดเลือดแดงจากอนุมูลอิสระมาจากความสามารถดักจับอนุมูลอิสระโดยตรงของสารสกัดเหล่านี้ เป็นสำคัญ

ตารางที่ 4 ความสามารถยับยั้งเม็ดเลือดแดงแตก
(% inhibition of hemolysis) ของสารสกัดแต่ละชนิด

สารสกัด ความเข้มข้น	% inhibition of hemolysis	
	250 µg/ml	500 µg/ml
ชะพลู	80.08 ± 0.30	97.41 ± 0.07
ใบบัว	93.82 ± 0.13	98.87 ± 0.07
เกสรบัว	64.60 ± 1.02	67.14 ± 0.43
กกบัว	52.50 ± 0.27	57.17 ± 0.65
ผักเบี้ยใหญ่	67.35 ± 0.49	81.21 ± 0.25
ว่านกีบแรด	56.08 ± 0.55	63.80 ± 0.69
ปีบฝรั่ง	69.77 ± 2.03	78.84 ± 0.25
หญ้าพันงูเขียว	85.57 ± 0.12	93.77 ± 0.26
ใบมะกรูด	90.02 ± 0.85	98.14 ± 0.19
ผิวมะกรูด	87.47 ± 0.73	98.06 ± 0.13
ascorbic acid	94.03 ± 0.30	96.47 ± 0.61

[หมายเหตุ ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ($\bar{x} \pm S.D.$) จากการทดลอง 3 ครั้ง]

3.5.2 ความสามารถยับยั้งการทำลาย DNA

จากการนำสารสกัดมาทดสอบความสามารถยับยั้งการทำลาย DNA ตามวิธีที่ระบุในข้อ 5.2 โดย bleomycin ซึ่งมีสรรพคุณเป็นทั้งยาต้านจุลชีพและยาต้านมะเร็ง (Umezawa *et al.*, 1996) สามารถจับกับ Fe^{2+} เกิดเป็นสารเชิงซ้อนแล้วเข้าทำลาย DNA ได้ในสถานะที่มีออกซิเจน ทำให้มี base propanals เกิดขึ้นซึ่งสามารถวัดปริมาณได้ในรูปของ TBARS (Guttridge *et al.*, 1981) พบว่าสารสกัดทั้งหมดที่ความเข้มข้น 100 และ 200 µg/ml มีผลต่อ DNA น้อยมากเมื่อเทียบกับ ascorbic acid ซึ่งที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ อย่างเช่นในกรณีนี้ ทำหน้าที่ส่งเสริมการทำลาย DNA เนื่องจากสมบัติเสริมฤทธิ์

ออกซิเดชัน (Lee *et al.*, 1999; Yen *et al.*, 1999) อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองในตารางที่ 5 มีข้อน่าสังเกตคือทุกชุดการทดลองมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตร สูงกว่าชุดควบคุม ซึ่งแสดงว่ามี DNA บางส่วนถูกทำลายในสถานะที่มีสารสกัดและเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัด ดังเช่นที่เคยมีรายงานในสารสกัดจากขิง (ginger extract) (Arouma *et al.*, 1997) ยกเว้น สารสกัดจากผักเป็ดใหญ่ กลับมีแนวโน้มลดลง เช่นเดียวกับ BHT นอกจากนี้ในชุดทดสอบที่ใช้สารสกัดจากใบบัวซึ่งจับ Fe^{2+} ได้ดีที่สุด (ตารางที่ 3) กลับมี DNA ถูกทำลายมากกว่าสารสกัดอื่น ๆ อย่างชัดเจน

ตารางที่ 5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ของสารสกัดแต่ละชนิดในการทดสอบความสามารถยับยั้งการทำลาย DNA

สารสกัด ความเข้มข้น	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตร	
	100 $\mu\text{g/ml}$	200 $\mu\text{g/ml}$
ชุดควบคุม	0.006 \pm 0.001	0.006 \pm 0.001
ชะพลู	0.039 \pm 0.001	0.079 \pm 0.003
ใบบัว	0.064 \pm 0.002	0.123 \pm 0.003
เกสรบัว	0.018 \pm 0.001	0.023 \pm 0.001
กกบัว	0.016 \pm 0.001	0.021 \pm 0.001
ผักเป็ดใหญ่	0.087 \pm 0.002	0.031 \pm 0.001
ว่านทิวเรด	0.031 \pm 0.001	0.059 \pm 0.001
บีบฝรั่ง	0.019 \pm 0.001	0.029 \pm 0.001
หญ้าพันธุ์เขียว	0.033 \pm 0.001	0.061 \pm 0.001
ใบมะกรูด	0.037 \pm 0.001	0.066 \pm 0.001
ผิวมะกรูด	0.022 \pm 0.001	0.030 \pm 0.002
BHT	0.066 \pm 0.002	0.013 \pm 0.001
ascorbic acid	0.631 \pm 0.002	1.231 \pm 0.002

[หมายเหตุ ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ($\bar{x} \pm S.D.$) จากการทดลอง 3 ครั้ง]

3.5.3 ความสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน

จากการทดลองวัดความสามารถยับยั้งออกซิเดชันของไขมันที่ระบุในหัวข้อ 5.3 โดยนำสารสกัดแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 250 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ มาทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของไขมันจากสมองหนู ซึ่งเกิดจากอนุมูลอิสระเข้าทำปฏิกิริยาตั้งอิลีคตรอนจากไฮโดรเจนในพันธะคู่ของกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) เปลี่ยนให้เป็นอนุพันธ์ไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (hydroperoxide) และจะสลายตัวต่อไปได้จากการเร่งของ Fe^{2+} เกิดเป็นสารประกอบอัลดีไฮด์ ที่สำคัญคือ malondialdehyde (MDA) ซึ่งตรวจวัดได้ในรูปสารประกอบเชิงซ้อนสีชมพูเมื่อทำปฏิกิริยากับ TBA จากการทดลองพบว่า สารสกัดส่วนใหญ่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันได้ใกล้เคียงกันในทั้งสองความเข้มข้นที่เลือกมาทดสอบ ยกเว้น สารสกัดจากผักเป็ดใหญ่ ใบมะกรูด และ ผิวมะกรูดซึ่งออกฤทธิ์เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น ดังแสดงในตารางที่ 6 และสารสกัดว่าน กีบแระที่ความเข้มข้น 500 $\mu\text{g/ml}$ ยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีที่สุดคือ 77.58 เปอร์เซ็นต์ ใกล้เคียงกับ BHT ที่ความเข้มข้นเดียวกัน (79.36 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่สารสกัดจากปืบฝรั่งกับผิวมะกรูดยับยั้งได้น้อยที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดอื่น ๆ ผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ของสารสกัดจากพืชเหล่านี้ขึ้นกับปริมาณสารประกอบ phenolic ที่มีอยู่ในสารสกัดเป็นหลัก สำหรับกลไกออกฤทธิ์ของสารกลุ่มนี้ที่มาจากพืช พบว่า ส่วนใหญ่เป็นแบบ chain breaking คือ กำจัดอนุมูล peroxy ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันได้ โดยการให้ไฮโดรเจนอะตอมแล้วทำให้อนุมูลเสถียรขึ้น (Shi *et al.*, 2001)

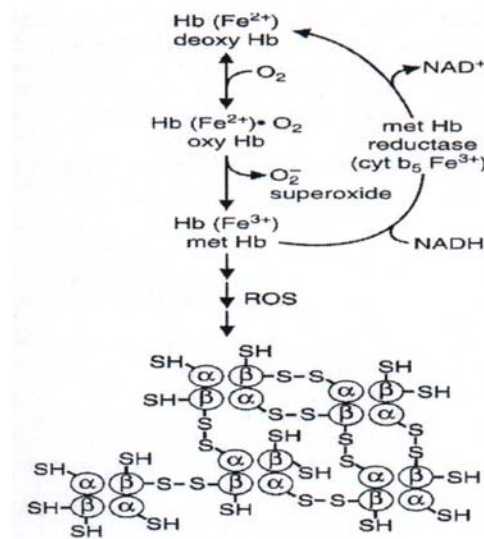
ตารางที่ 6 ความสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน
(% inhibition of lipid peroxidation) ของสารสกัดแต่ละชนิด

สารสกัด ความเข้มข้น	% inhibition of peroxidation	
	250 µg/ml	500 µg/ml
ชะพลู	69.29 ± 0.33	72.80 ± 0.32
ใบบัว	74.32 ± 0.39	75.46 ± 0.14
เกสรบัว	70.73 ± 0.41	76.16 ± 0.38
กกบัว	64.76 ± 0.45	75.08 ± 0.51
ผักเบี้ยใหญ่	49.19 ± 0.60	70.64 ± 0.19
ว่านกีบแรด	74.58 ± 0.26	77.58 ± 0.14
บีบฝรั่ง	27.20 ± 0.14	32.36 ± 0.13
หญ้าพันงูเขียว	69.08 ± 0.27	70.30 ± 0.26
ใบมะกรูด	45.26 ± 0.41	70.18 ± 0.46
ผิวมะกรูด	26.06 ± 0.15	45.30 ± 0.27
BHT	77.96 ± 0.08	79.36 ± 0.19

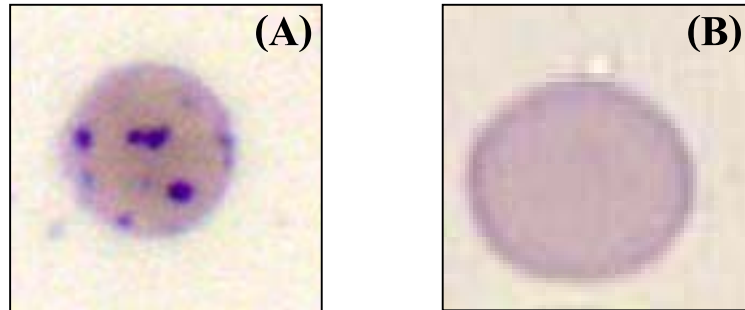
[หมายเหตุ ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ($\bar{x} \pm S.D.$) จากการทดลอง 3 ครั้ง]

3.5.4 การป้องกันการเกิดออกซิเดชันของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง

การเกิด Heinz bodies ในเม็ดเลือดแดงเป็นผลจากโมเลกุลฮีโมโกลบินที่ถูกออกซิไดส์ (oxidized hemoglobin) จับตัวกันเป็นร่างแห (cross-link) (รูปที่ 13) แล้วตกตะกอนเป็นก้อนติดอยู่ที่ผนังด้านใน (inner membrane surface) เม็ดเลือดแดง (Reinhart *et al.*, 1986) ซึ่งสามารถตรวจพบได้โดยการย้อมเม็ดเลือดแดงด้วยสี crystal violet เมื่อทดลองนำสารสกัดมาทดสอบประสิทธิภาพยับยั้งออกซิเดชันของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง โดยการใช้ APH เป็นสารแตกตัวให้อนุมูลอิสระแล้วสังเกต Heinz bodies ในเม็ดเลือดแดงเหล่านี้ พบว่า สารสกัดทั้งหมดที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 5 และ 10 mg/ml ไม่สามารถป้องกันการเกิดออกซิเดชันของโปรตีนดังกล่าวได้ เนื่องจากเมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบ Heinz bodies (ดังแสดงในรูปที่ 14) ในเม็ดเลือดแดงทั้งหมด ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดเหล่านี้ไม่สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงซึ่งมีสมบัติยอมให้สารบางชนิดเท่านั้นผ่านเข้าออกสะดวก (semi-permeable) (May, 1999) จึงไม่อาจเข้าไปยับยั้งการทำงานของอนุมูล APH ภายใต้ออกซิไดส์ได้คั้งนั้นเอง



รูปที่ 13 ลักษณะการจับตัวกันของฮีโมโกลบินที่ถูกออกซิไดส์



รูปที่ 14 เปรียบเทียบลักษณะเม็ดเลือดแดงที่มี Heinz bodies อยู่ภายใน (A) กับเม็ดเลือดแดงปกติ (B) เมื่อย้อมด้วยสี crystal violet