

## บทที่ 2

### แนวคิดทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 บุนนาค (6,7)

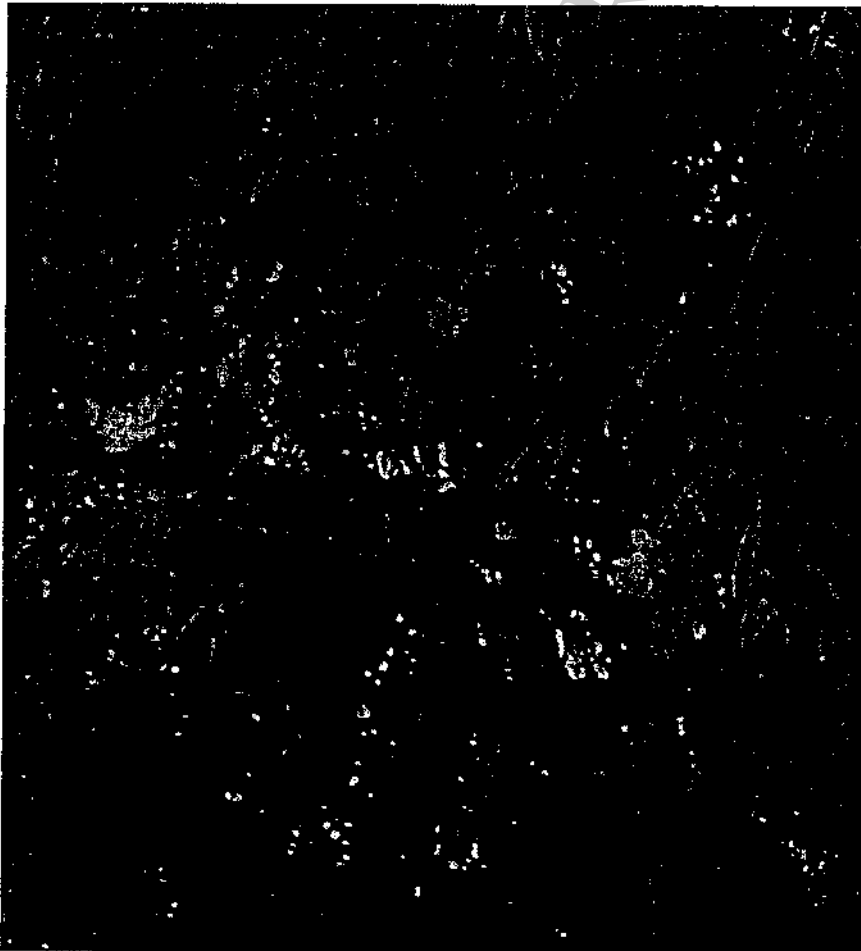
บุนนาค เป็นพันธุ์ไม้ท้องถิ่นของไทยและเอเชียเขตร้อน อยู่ในวงศ์เดียวกับสารภีและมะดัน พบตามป่าชื้น มีถิ่นกำเนิดที่ประเทศอินเดียและมาเลเซีย บุนนาคเป็นไม้เนื้อแข็งที่มีคุณค่ามาก ใช้ในงานก่อสร้างได้ทุกประเภท เมื่อดันเจริญเติบโตเต็มวัยจะออกดอก 2-3 ปีต่อครั้ง ดอกสีขาว กลิ่นหอม ต้นบุนนาคเป็นต้นไม้ที่สวยงาม นิยมปลูกเป็นไม้ประดับ ขยายพันธุ์โดยการตอนกิ่งหรือเพาะเมล็ด เป็นพืชที่ปลูกเพื่อเก็บดอกขาย เพราะเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของยาหอม ยาลม ยาบำรุงหัวใจ ยาสำหรับสตรีหลายขนาน และมีการนำส่วนต่างๆ ของต้นบุนนาค มาเป็นส่วนผสมในยาแผนโบราณ บุนนาคเป็นต้นไม้ประจำจังหวัดพิจิตร และมหาวิทยาลัยพายัพ จังหวัดเชียงใหม่

#### 2.1.1 ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ (6,7)

ชื่อวิทยาศาสตร์	<i>Mesua Ferrea</i> Linn.
วงศ์	Guttiferae
ชื่อสามัญ	Ironwood, Indian Rose Chestnut
ชื่ออื่นๆ	นาคบุตร (ภาคใต้) ปะนาคอ (ปัตตานี-มาเลเซีย) สารภีคอย (เชียงใหม่) ก้าก้อ (กะเหรี่ยง-เชียงใหม่) ก้าก้อ (ฉาน-แม่ฮ่องสอน)
ลักษณะทั่วไป	เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงใหญ่ สูงประมาณ 10-15 เมตร คิ่งรูป 2.1 ลำต้นตรง ยอดอ่อนมีสีแดง ใบคกหนาหีบ ใบเดี่ยวเรียวยาว ขอบเรียบ ท้องใบมีสีน้ำตาลอมเทาเป็นมัน ใบกว้าง 3-4 เซนติเมตร ยาว 7-12 เซนติเมตร ดอกเดี่ยวขนาดใหญ่สีขาวนวล กลีบดอกสีขาวนวลบาง มีกลิ่นหอม กลีบเลี้ยงแข็งรูปถ้วยวงกลม เกสรตัวผู้มีสีเหลือง มีจำนวนมาก ผลรูปไข่แข็ง ปลูกเป็นไม้ประดับ ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด และกิ่งตอน เป็นพืชที่นำปลูกเพื่อเก็บดอกขาย ความต้องการและราคาสูง เพราะเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของยาหอม ยาลม ยาบำรุงหัวใจ ยาสำหรับสตรี หลายขนาน

## 2.1.2 สรรพคุณทางยา (7)

ใบ	รสฝาด สมานบาดแผลสด แก้พิษงู
ดอก	รสหอมเย็น ขมเล็กน้อย แก้ร้อนในกระต๊อบกระต่าย แก้วิงเวียน หน้า มืดตาลาย ใจสั่นหวิว ชูกำลัง บำรุงโลหิต แก้กลิ่นสาปสาบในร่างกาย
เถา	รสหอมเย็น บำรุงครรภ์ ทำให้ชื่นใจ แก้ไข้ ใช้ผสมทำยาลมบำรุง หัวใจ
ผล	ขี้บแห้ง
เปลือกต้น	รสฝาดร้อนเล็กน้อย ใช้เป็นยารักษาโรคกระเพาะอาหารอักเสบ หลอดลมอักเสบ และเป็นยาบำรุงกำลัง
ราก	รสเผื่อน ขี้บดในลำไส้
กระพี้	รสเผื่อนเล็กน้อย แก้เสมหะในคอ

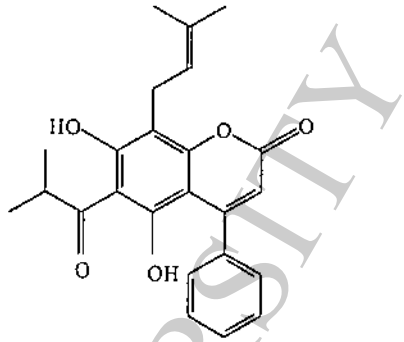
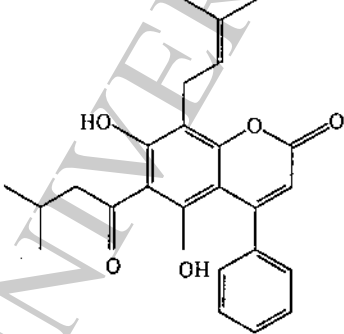
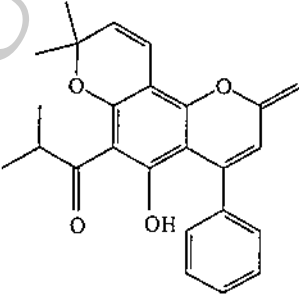
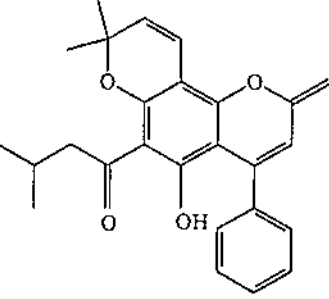


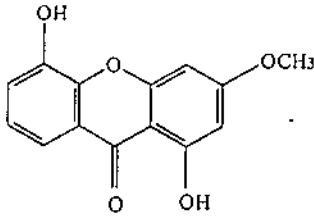
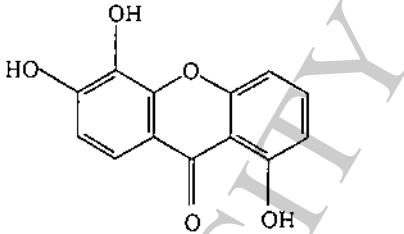
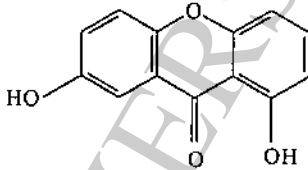
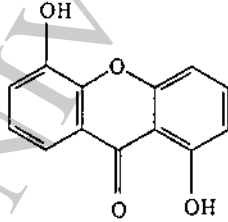
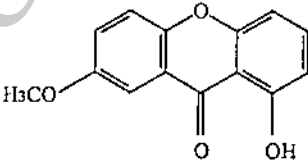
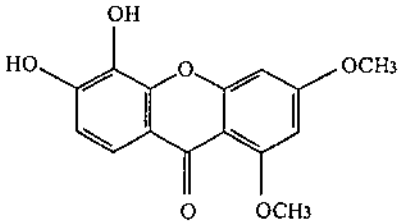
รูป 2.1 ต้นบุญนาค (7)

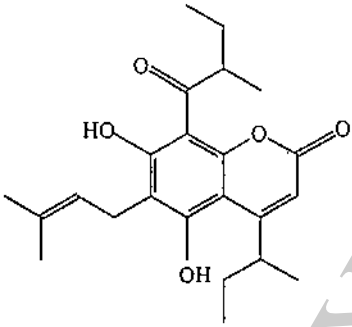
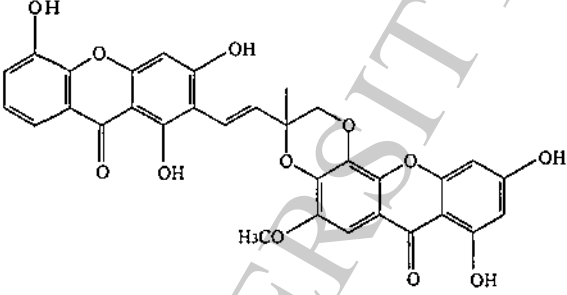
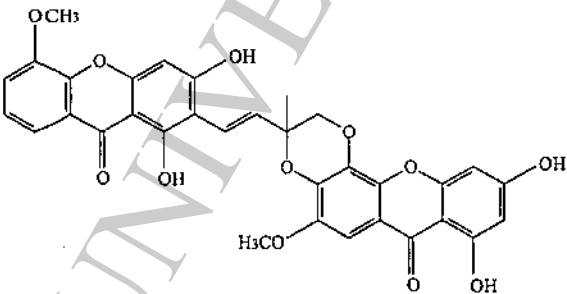
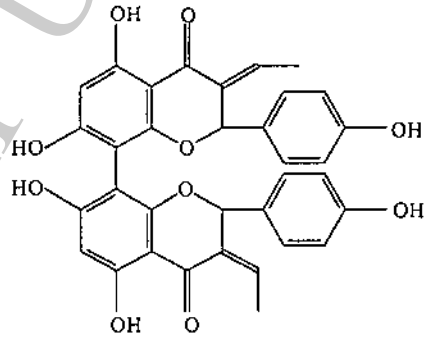
### 2.1.3 องค์ประกอบทางเคมีของบุนนาค

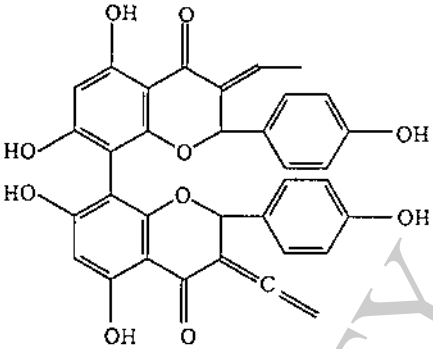
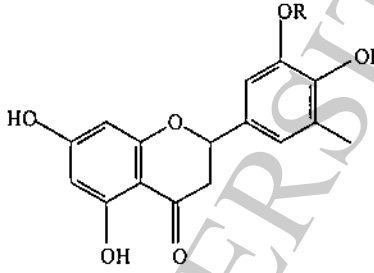
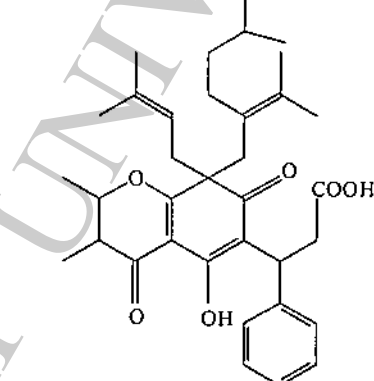
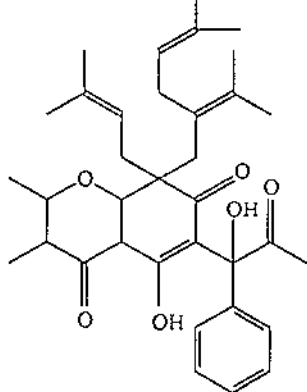
มีรายงานการพบองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนต่างๆ ของบุนนาค สูตรโครงสร้างทางเคมี แสดงในตาราง 2.1

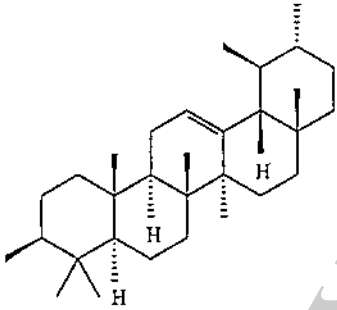
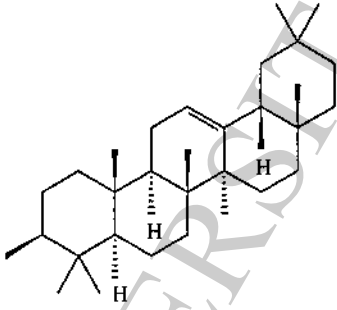
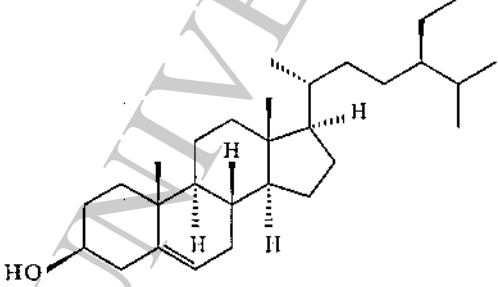
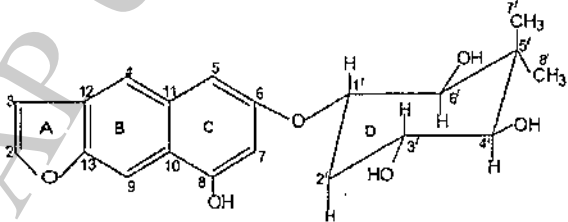
ตาราง 2.1 องค์ประกอบทางเคมีของบุนนาค

ส่วนที่พบ	ชื่อสาร	สูตรโครงสร้างทางเคมี	อ้างอิง
เมล็ด (seed)	Mesuol		8,9,10
เมล็ด (seed)	Mammeisin		11
เมล็ด (seed)	Mesuagin		12
เมล็ด (seed)	Mammeigin		9, 10

ส่วนที่พบ	ชื่อสาร	สูตรโครงสร้างทางเคมี	อ้างอิง
แก่นไม้ (heart-wood),	Mesuaxanthone-A		13,14
แก่นไม้ (heart-wood),	Mesuaxanthone-B		13,14
แก่นไม้ (heart-wood),	Euxanthone		13, 14
แก่นไม้ (heart-wood),	1,5-dihydroxyxanthone		15
แก่นไม้ (heart-wood),	Euxanthone 7-methylether		15
แก่นไม้ (heart-wood),	Ferrxanthone		16

ส่วนที่พบ	ชื่อสาร	สูตรโครงสร้างทางเคมี	อ้างอิง
เปลือกลำต้น (bark)	Ferruol-A		17
เปลือก (bark)	Mesuferrol-A		18
เปลือก (bark)	Mesuferrol-B		18
เกสรตัวผู้ (stamens)	Mesuaferrone-A		19

ส่วนที่พบ	ชื่อสาร	สูตรโครงสร้างทางเคมี	อ้างอิง
เกสรตัวผู้ (stamens)	Mesuaferone-B		20
ใบ (leaves)	Mesuein	 <p>(R=rhamnose-galactose)</p>	21
เกสรตัวผู้ (stamens)	Mesuanic acid		22,23
เกสรตัวผู้ (stamens)	Mesuaferrol		24

ส่วนที่พบ	ชื่อสาร	สูตรโครงสร้างทางเคมี	อ้างอิง
เกสรตัวผู้ (stamens)	$\alpha$ -amyrin		24
เกสรตัวผู้ (stamens)	$\beta$ -amyrin		24
เกสรตัวผู้ (stamens), แก่นไม้ (heart- wood), ใบ (leaves)	??-sitosterol		15, 25, 26
ใบ (leaves)	12, 13-furano-8- hydroxy naphthyl-6- 0- $\beta$ -2',3',4',6' tetrahydroxy-5',5' dimethyl cyclohexyl ether		27

#### 2.1.4 ฤทธิ์ทางชีวภาพ

พืชเป็นแหล่งยารักษาโรคที่สำคัญของมนุษย์ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน จากข้อมูลขององค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) ได้ประมาณการว่าร้อยละ 80 ของประชากรโลก มีการใช้การแพทย์พื้นบ้าน (traditional medicine) ในการรักษาอาการเจ็บป่วยเบื้องต้น และในจำนวนร้อยละ 80 ของการใช้แพทย์พื้นบ้านมาจากการใช้สมุนไพร นอกจากนี้พบว่าสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบในยาส่วนใหญ่ได้มาจากพืช (28) มีรายงานสรุปว่า พืชชั้นสูงทั่วโลกมีประมาณห้าแสนสกุล แต่มีเพียงร้อยละ 6 ที่มีการตรวจสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activity) และมีเพียงร้อยละ 15 ที่มีการศึกษาองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ (29) ดังนั้นปัจจุบันจึงมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านเชื้อรา ฤทธิ์ต้านมาลาเรีย ฤทธิ์ต้านไวรัส ฤทธิ์ต้านวัณโรค เป็นต้น จากผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ (natural product) เช่น พืช สมุนไพร ผัก และผลไม้ เป็นต้น รวมทั้งน้ำมันหอมระเหยจากพืช เนื่องจากมีสมบัติในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีเช่นกัน (30)

มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของบุนนาคมากมาย บุนนาคเป็นพืชที่รู้จักดีในการใช้รักษาอาการไข้ อาหารไม่ย่อยและโรคไต ดอกใช้สมานแผล ปวดท้อง ขับเสมหะและใช้ในรักษาโรคบิด ส่วนใบและดอกใช้แก้พิษงูกัดและแมลงปองต่อย ส่วนกิ่งมีสมบัติเป็นการสมานแผลน้ำมันเมล็ดบุนนาคสามารถใช้ในการรักษาโรคไขข้อ (31)

น้ำมันหอมระเหยจากเถาสดตัวผู้ มีฤทธิ์เป็นยาถ่ายพยาธิตัวตืดและพยาธิปากขอ ส่วนน้ำมันจากเมล็ดมีฤทธิ์ต้านโรคหอบหืด (6)

น้ำมันหอมระเหยจากผลบุนนาคมีฤทธิ์ต้านเชื้อราหลายชนิด ได้แก่ *Trichophyton terrestre*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Histoplasma capsulatum* sp., *Cryptococcus neoformans*, *Microsporum mycetomi*, *Microsporum gypseum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus nidulans*, *Sporotrichum schenckii*, *Epidermophyton floccosum*, *Fusarium oxysporum* และ *Curvularia lunata* นอกจากนี้ น้ำมันหอมระเหยจากเถาสดตัวผู้มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Cryptococcus tropicalis* (32)

สารสกัดปิโตรเลียมอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม และเอทานอลของใบ กิ่ง และผลของบุนนาค มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย 14 ชนิด และมีฤทธิ์ต้านเชื้อรา 6 ชนิด (33)

สารสกัดเมทานอลจากดอกบุนนาค ยังมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* นอกจากนี้สารสกัดเมทานอลจากดอกบุนนาค ไม่มีฤทธิ์ต่อเชื้อ *Escherichia coli* และ *Shigella boydii* (4)

สาร mesuol และ mesuone ที่แยกได้จากบุนนาคมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียหลายชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Eberthella typhosa*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus friedlanderi*



และ *Mycobacterium phlei* โดยสารทั้งสองมีฤทธิ์ต่อเชื้อ *S. aureus* มากที่สุด และสาร mesuol มีฤทธิ์ต่อเชื้อ *M. phlei* มากกว่า mesrone (35)

สาร mesuol ที่แยกจากน้ำมันผลของปุนนาค มีฤทธิ์ป้องกันการเจ็บปวด และป้องกันการอักเสบได้ (36)

ในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในปุนนาคพบสาร xanthones ได้แก่ dehydrocycloguanandin, calophyllin-B, jacareubin, 6-deoxy jacareubin, mesuaxanthone-A, mesuaxanthone-B และ cuxanthone สามารถช่วยลดการหย่อนของกล้ามเนื้อ ลดความกังวล ลดความตึงของกล้ามเนื้อ นอกจากนี้สาร xanthones ไม่มีฤทธิ์บรรเทาอาการปวด ลดไข้ และระบบหลอดเลือดเลี้ยงหัวใจในกบและสุนัข สาร xanthones ทั้งหมดมีฤทธิ์ต้านการอักเสบของเนื้อเยื่อในช่องท้องและในปากของหนู โดยเฉพาะสาร jacareubin และ 6-deoxy jacareubin มีฤทธิ์ต้านแผลเปื่อยพุพองในหนู (37)

สาร 4-Alkyl และ 4-Phenyl-5,7-dihydroxycoumarins จากดอกปุนนาค มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และมีฤทธิ์ต้านโปรโตซัวเล็กน้อย (38)

สารสกัดเมทานอลจากดอกปุนนาค มีฤทธิ์ต้านมะเร็งเซลล์เม็ดเลือดขาว (T-lymphosit leukemia cell) และมีฤทธิ์เล็กน้อยในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* และ *Pseudomonas aeruginosa* (39)

สารสกัดเอทานอลจากปุนนาคมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของคน ได้แก่ เซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (human cholangiocarcinoma, CL-6), เซลล์มะเร็งกล่องเสียง (human laryngeal, Hep-2) และเซลล์มะเร็งตับ (human hepatocarcinoma, Hep-G2) (40)

## 2.2 อนุมูลอิสระ

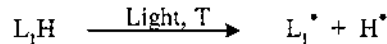
อนุมูลอิสระ (free radicals) คือ อะตอม โมเลกุล หรือสารประกอบที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวอยู่ในออร์บิทัลวงนอกสุดที่มีระดับพลังงานสูง เป็นสารที่ไม่เสถียรและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี โดยจะดึงอิเล็กตรอนหรือให้อิเล็กตรอนแก่สารอื่นเพื่อให้อิเล็กตรอนในออร์บิทัลวงนอกสุดอยู่เป็นคู่ โดยทั่วไปอนุมูลอิสระมีทั้งที่เป็นอนุมูลประจุลบ เรียกว่า อนุมูลแอนไอออน (anion radical) เช่น อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion,  $O_2^{\cdot-}$ ) อนุมูลอิสระที่เป็นกลางทางไฟฟ้า (neutral radical) เช่น อนุมูลไฮดรอกซิล (hydroxyl,  $OH^{\cdot}$ ) อนุมูลไนตริกออกไซด์ (nitric oxide,  $NO^{\cdot}$ ) และอนุมูลอิสระที่มีประจุเป็นบวก เรียกว่า อนุมูลแคทไอออน (cation radical) เช่น อนุมูลไพริดีนัล แคทไอออน (pyridinyl cation,  $NAD^{+\cdot}$ ) (41)

แหล่งกำเนิดของอนุมูลอิสระ มี 2 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยจากภายในร่างกาย และปัจจัยจากภายนอก ร่างกาย ซึ่งในร่างกายของคนเรามีการใช้ออกซิเจนในกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ หรือเรียกว่า

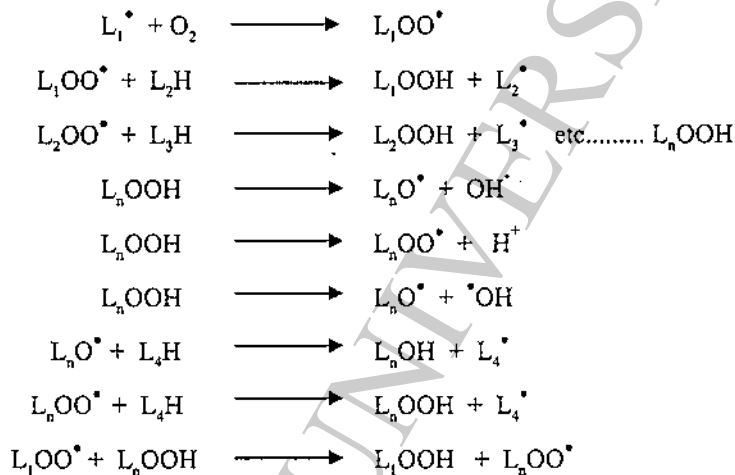
เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ตัวอย่างปฏิกิริยาที่ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระจากปัจจัยภายในร่างกาย เช่น

ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (42) แบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ

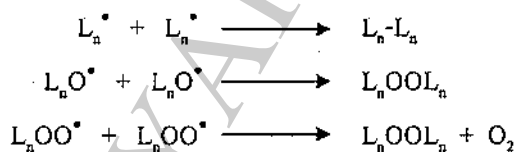
1) ระยะเหนี่ยวนำ (initiation) เป็นระยะที่ไขมันเกิดการแตกตัวเป็นอนุมูลอิสระ อาจมีแสงหรืออุณหภูมิสูง เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังสมการ



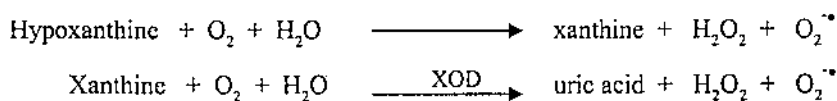
2) ระยะเพิ่มจำนวน (propagation) เป็นระยะที่อนุมูลอิสระเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน แล้วได้ผลิตภัณฑ์เป็นอนุมูลเปอร์ออกไซด์ (peroxyl radical,  $LOO^\bullet$ ) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่ไม่เสถียรสามารถทำปฏิกิริยากับไขมันต่อเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระของสารอื่น ปฏิกิริยาจะดำเนินต่อเนื่องกันไป เป็นปฏิกิริยาแบบลูกโซ่ และได้อนุมูลอิสระชนิดใหม่ออกมาตลอดเวลา เช่น



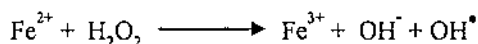
3) ระยะสิ้นสุด (termination) เป็นระยะหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ โดยอนุมูลอาจรวมตัวกันกลายเป็นโมเลกุลที่มีความเสถียร เช่น



ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (43) เช่นการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (xanthine oxidase, XOD) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันในกระบวนการสลายเบสพิวรีน (purine) โดยเปลี่ยนสารไฮโปแซนทีน (hypoxanthine) ไปเป็นสารแซนทีน (xanthine) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogenperoxide,  $H_2O_2$ ) ซึ่งสารแซนทีนจะเกิดปฏิกิริยาต่อเปลี่ยนเป็นกรดยูริก (uric acid) ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนี้ ทำให้เกิดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ( $O_2^{\bullet -}$ ) ดังปฏิกิริยา

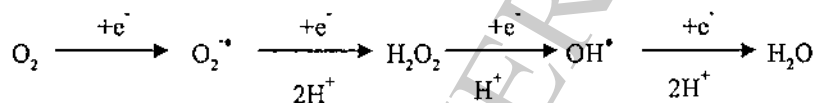


ปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับโลหะทรานสิชัน (44) ในร่างกายของคนเรามีสารประกอบโลหะทรานสิชัน เช่น เหล็ก ( $Fe^{2+}$ ) ทองแดง ( $Cu^{2+}$ ) ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นอนุมูลไฮดรอกซิล ( $OH^{\bullet}$ ) ซึ่งปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลไฮดรอกซิลนี้ เรียกว่า ปฏิกิริยาเฟนต์ัน (Fenton's reaction) ดังสมการ



อนุมูลไฮดรอกซิลเป็นสารออกซิไดส์ที่แรงและมีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาสูง สามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่นทันทีที่ถูกสร้างขึ้น ดังนั้นอนุมูลไฮดรอกซิลจึงเป็นอันตรายต่อชีวโมเลกุลของสิ่งมีชีวิตมากกว่าอนุมูลชนิดอื่นๆ

นอกจากนี้ในกระบวนการหายใจของสิ่งมีชีวิต ก๊าซออกซิเจนจะถูกรีดิวซ์ ไปเป็นสารตัวกลาง 3 ชนิด ได้แก่ อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และอนุมูลไฮดรอกซิล ก่อนที่จะเปลี่ยนเป็นน้ำซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายดังสมการ



ซึ่งสารทั้ง 3 ชนิดจะมีความว่องไวในการทำปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน ดังนั้นความเสียหายที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาก็จะแตกต่างกัน

ส่วนปัจจัยภายนอกในร่างกายที่เป็นแหล่งกำเนิดอนุมูลอิสระ เช่น ยาต้านโรคมบางชนิด โดยเฉพาะยาที่ใช้รักษาโรคมะเร็ง เช่น adriamycin, mitomycin C, bleomycin เมื่อรับประทานเข้าไปสามารถก่อให้เกิดอนุมูลอิสระและเกิดภาวะลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) (45) คิวโนฟรี เป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดอนุมูลอิสระ ซึ่งก่อให้เกิดโรคมะเร็ง ในคิวโนฟรีจะประกอบด้วยก๊าซไนตริกออกไซด์ (NO) ก๊าซไนโตรเจนไดออกไซด์ ( $NO_2$ ) แอลคิลเปอร์ออกซิไนไตรท์ (ROONO) และ เปอร์ออกซิไนไตรท์ เอสเทอร์ ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน อนุมูลไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และอนุมูลไฮดรอกซิล (46) โอโซน ไม่ได้เป็นอนุมูลอิสระ แต่เป็นตัวออกซิไดส์ที่แรงที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ เช่น อนุมูลโอโซนแอนไอออน สามารถทำปฏิกิริยากับโปรตอน ( $H^+$ ) แล้วเปลี่ยนเป็นอนุมูลไฮดรอกซิล (47) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอีกหลายอย่างที่ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระ เช่น แสงแดด มลพิษทางอากาศ ควีนจากท่อไอเสียรถยนต์ อาหารประเภทแป้ง ย่าง ตัวทำลายบางชนิดในโรงงานอุตสาหกรรม (48)

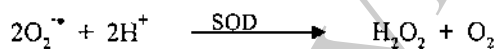
เมื่ออนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลในร่างกาย ได้แก่ ไขมัน (lipid) โปรตีน (protein) และดีเอ็นเอ (DNA) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมักเป็นปฏิกิริยาแบบลูกโซ่ ทำให้เกิดอนุมูลอิสระใหม่ขึ้นเรื่อยๆ ก่อให้เกิดความเสียหายอย่างต่อเนื่อง ทำให้การทำงานของสารชีวโมเลกุลเกิดความบกพร่อง การทำลายโครงสร้างดีเอ็นเอ การเปลี่ยนสภาพโปรตีนและไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ การสร้างพันธะโควาเลนต์

(covalent bond) กับโปรตีนจนทำให้โปรตีนทำงานผิดปกติ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคหลายชนิดหรือเหนี่ยวนำให้เกิดโรครุนแรงขึ้น เช่น โรคหัวใจ (49) โรคมะเร็ง โรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน โรครูมาตอยด์ (50) โรคความเสื่อมของเซลล์ประสาท ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคความจำเสื่อม (51) โรคภาวะชรา (52) เป็นต้น

### 2.3 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) (41) เป็นสารที่ทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระเพื่อกำจัดอนุมูลอิสระให้หมดไปหรือยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระหรือทำให้อนุมูลอิสระกลายเป็นสารที่เสถียรและไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับสารชีวโมเลกุล โดยปกติร่างกายมีกลไกในกำจัดอนุมูลอิสระได้เอง แต่ถ้ร่างกายมีการสร้างอนุมูลอิสระหรือได้รับอนุมูลอิสระในปริมาณที่มากเกินไปจะทำให้ร่างกายกำจัดอนุมูลอิสระไม่ทัน ทำให้เซลล์หรือเนื้อเยื่อเกิดความเสียหายหรือถูกทำลาย ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ ได้ ตัวอย่างเอนไซม์ในร่างกายที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

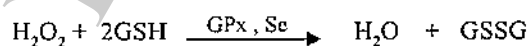
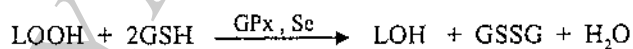
เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเตส (Superoxidase Dismutase, SOD) สามารถกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนที่เกิดขึ้นในร่างกาย โดยเปลี่ยนให้เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์



เอนไซม์คาตาเลส (Catalase, CAT) สามารถเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ให้เป็นน้ำและก๊าซออกซิเจน ซึ่งไม่เป็นอันตรายแต่เซลล์



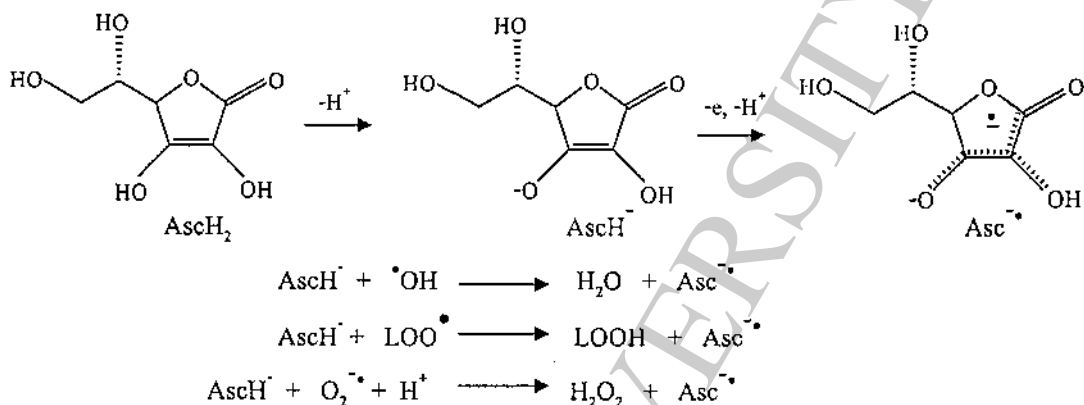
เอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส (Glutathione peroxidase, GPx) จะทำงานร่วมกับธาตุซีลีเนียม โดยทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยารีดักชันของสารประกอบไฮโดรเปอร์ออกไซด์ ได้แก่ ลิปิดเปอร์ออกไซด์ (LOOH) อาจมีกลูตาไทโอน (GSH) ร่วมในปฏิกิริยา โดยเปลี่ยนเป็นโมเลกุลน้ำและกลูตาไทโอนไดซัลไฟด์ (GSSG) นอกจากนี้เอนไซม์นี้สามารถสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไม่ให้เกิดปฏิกิริยาเฟนตันดังสมการ



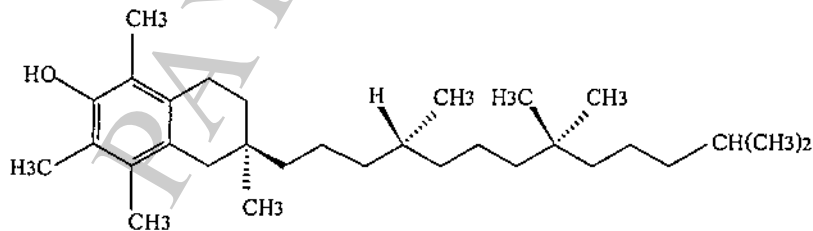
สารต้านอนุมูลอิสระในธรรมชาติ ส่วนมากพบใน ผัก ผลไม้ และพืชสมุนไพร เนื่องจากมีสารหลายชนิดที่เป็นองค์ประกอบและมีสมบัติต้านอนุมูลอิสระ เช่น วิตามินซี วิตามินอี แคโรทีนอยด์ และสารประกอบฟีนอลิก

วิตามินซี หรือกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว ละลายในน้ำได้ดีจึงสามารถต้านอนุมูลอิสระในเซลล์และอวัยวะที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ วิตามินซีพบมากในผักและผลไม้สด เช่น ดอกขี้เหล็ก ผักหวาน มะรุม ฝรั่ง ส้ม มะขามป้อม มะนาว วิตามินซีถูกทำลายได้ง่ายด้วยความ

ร้อนและแสง ในแต่ละวันผู้หญิงควรได้รับวิตามินซี 60-75 มิลลิกรัม ส่วนผู้ชายควรได้รับวิตามินซี 90 มิลลิกรัม (53) วิตามินซีมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมตาบอลิซึมของกรดอะมิโนและทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ของปฏิกิริยาทางชีวเคมีต่างๆ ในร่างกาย วิตามินซียังเป็นส่วนหนึ่งของสารชีวเคมีที่สร้างคอลลาเจนซึ่งเป็นโปรตีนส่วนหนึ่งของโครงสร้างกระดูกของมนุษย์ (54) เมื่อวิตามินซี ( $\text{AscH}_2$ ) อยู่ในร่างกายจะแตกตัวให้ไฮโดรเจนแล้วเปลี่ยนให้อยู่ในรูป ascorbate anion ( $\text{AscH}^-$ ) ซึ่งเมื่อให้อิเล็กตรอนและไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ เช่น อนุมูลไฮดรอกซิล อนุมูลเปอร์ออกซิล และอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน จะได้อนุมูล semidehydroascorbate ( $\text{Asc}^{\cdot-}$ ) ที่มีความเสถียร ดังสมการ

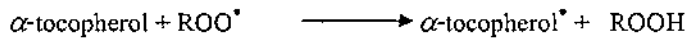


วิตามินอี (54) เป็นสารที่ละลายในไขมัน ปัจจุบันแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ โทโคฟีรอล (tocopherol) และโทโคไตรเอนอล (tocotrienol) แต่ละกลุ่มยังแยกย่อยได้อีก 4 ชนิด คือ แอลฟา ( $\alpha$ -) เบต้า ( $\beta$ -) แกมมา ( $\gamma$ -) เดลต้า ( $\delta$ -) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับจำนวนและตำแหน่งของหมู่เอทิลที่ติดกับวงแหวนโครเมน วิตามินอีมีหลายไอโซเมอร์แต่โครงสร้างทางเคมีที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด คือ  $\alpha$ -tocopherol เป็นดังรูป 2.2 วิตามินอีพบมากในพวกรั้วพืชที่ไม่ขัดขาว ในเมล็ดธัญพืช ข้าวกล้อง และถั่วทุกชนิด นอกจากนี้ยังมีการพบวิตามินอีในผัก เช่น ผักกาดหอม ผักโขม วิตามินอีจะทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ เช่น อนุมูลเปอร์ออกซิล ทำให้ได้สารที่มีความเสถียร เป็นผลให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันหยุดลง

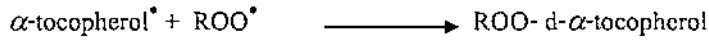


รูป 2.2 โครงสร้างวิตามินอี ( $\alpha$ -tocopherol)

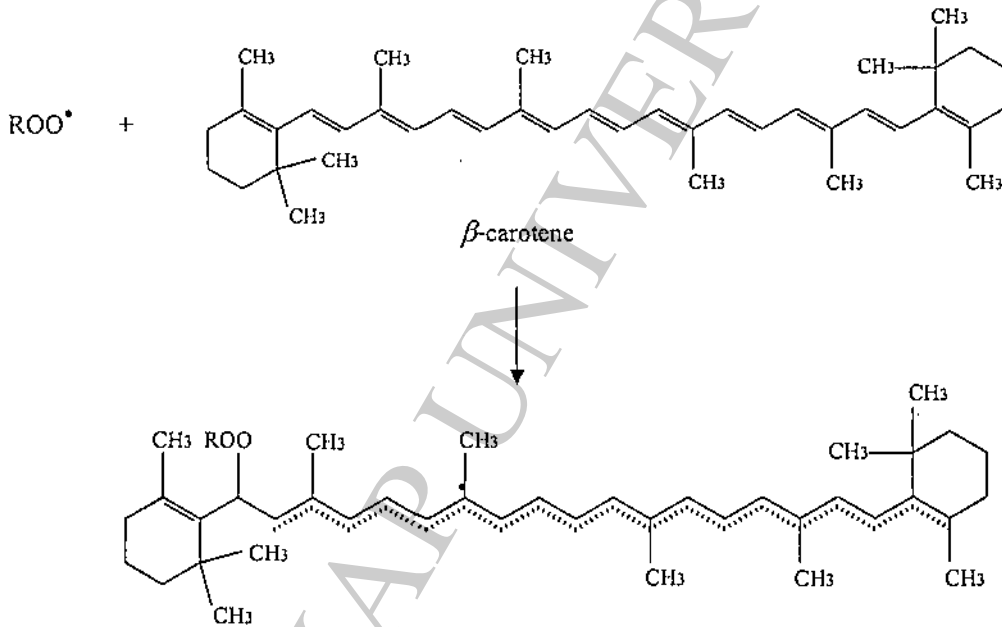
วิตามินอีทำหน้าที่เป็นตัวให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ peroxy (ROO<sup>•</sup>)



อนุมูล d- $\alpha$ -tocopherol<sup>•</sup> ที่เกิดขึ้นสามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ peroxy อื่น ทำให้ได้สาร ROO-d- $\alpha$ -tocopherol ที่มีความเสถียร

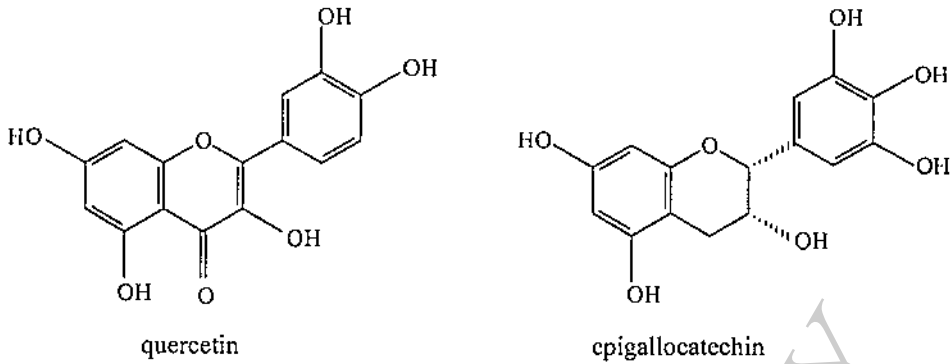


เบต้าแคโรทีน ( $\beta$ -carotene) (54) เป็นสารที่ละลายได้ทั้งในน้ำและน้ำมัน พบมากในผักหรือผลไม้ที่มีสีเขียวกและสีเหลือง เช่น ตำลึง และผักบุ้ง ฟักทอง แครอท มะละกอสุก มะม่วงสุก มะเขือเทศ ยอดแค ใบกะเพรา ใบขี้เหล็ก ผักเชียงดา เบต้าแคโรทีนมีสูตรโครงสร้างทางเคมี เบต้าแคโรทีน มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและมีประสิทธิภาพมากกว่า  $\alpha$ -tocopherol เมื่อเบต้าแคโรทีนดักจับอนุมูลอิสระไว้ในโมเลกุลแล้ว จะทำให้โมเลกุลอยู่ในลักษณะเรโซแนนซ์ที่มีความเสถียร ดังสมการ



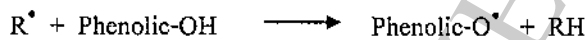
สารประกอบฟีนอลิก (41,54) พบได้ในพืชทั่วไป เป็นสารอินทรีย์ที่มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนอะโรมาติกที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) อย่างน้อยหนึ่งหมู่ในโมเลกุล สามารถละลายน้ำได้ สารประกอบฟีนอลิกที่พบในธรรมชาติมีหลายกลุ่มและมีโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกันไป กลุ่มใหญ่ที่พบเป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์

ตัวอย่างสารประกอบฟีนอลิกหลายชนิดมีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระสูง เช่น quercetin ในองุ่น และ epigallocatechin ในชาเขียว ดังรูป 2.3

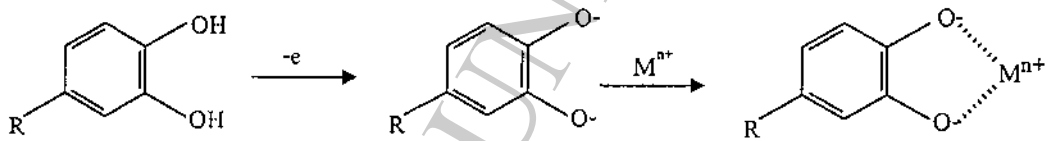


รูป 2.3 โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกบางชนิด

ในปัจจุบันพบว่าสารประกอบฟีนอลิกส่วนใหญ่มีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ โดยทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระเกิดเป็นอนุมูลอิสระใหม่ที่มีความเสถียรมากขึ้นเนื่องจาก โครงสร้างสามารถเกิดการเรโซแนนซ์ของอิเล็กตรอนได้ดี ดังสมการ



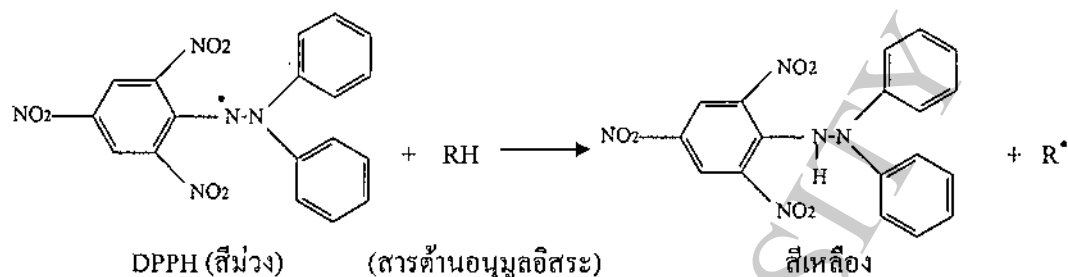
นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิกบางชนิดทำหน้าที่เป็นสารคีเลต (chelating agent) ทำหน้าที่จับกับโลหะทรานซิชัน เช่น  $\text{Fe}^{2+}$  และ  $\text{Cu}^{2+}$  ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเกิดอนุมูล ดังสมการ



#### 2.4 การวัดฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

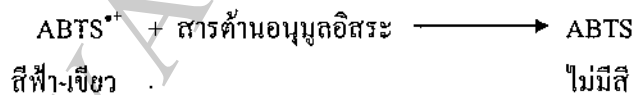
เนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระจำแนกออกได้เป็นหลายประเภท และมีกลไกในการทำปฏิกิริยาแตกต่างกันออกไป ดังนั้นวิธีการวัดฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ใช้ในปัจจุบันมีหลายวิธี เช่น วิธี DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) วิธี ABTS (2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid) วิธี FRAP (Ferric reducing ability of plasma) วิธี TBARs (Thiobarbituric acid reactive substance) วิธี ORAC (Oxygen radical absorbance capacity) และวิธี reducing power ในการวิจัยครั้งนี้ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด โดยใช้ 3 วิธี ได้แก่ วิธี DPPH วิธี ABTS และวิธี reducing power

วิธี DPPH ซึ่งเป็นวิธีการออกซิไดส์สารที่ทำให้เกิดสี คือ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่เสถียร อยู่ในรูปอนุมูลอิสระอยู่แล้วโดยไม่ต้องทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดอนุมูลอิสระ สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่นสูงสุด 517 นาโนเมตร ทำให้มองเห็นเป็นสีม่วง เมื่อสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไปออกซิไดส์ DPPH ทำให้โครงสร้างเปลี่ยนไปอยู่ในรูปที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นสารที่มีสีเหลืองและไม่ดูดกลืนแสงในช่วงเดียวกับ DPPH ดังสมการ (55)



จากปฏิกิริยาดังกล่าว สามารถหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (percent inhibition) ได้ จากปริมาณอนุมูล DPPH ที่เหลืออยู่หลังจากเกิดปฏิกิริยา เทียบกับปริมาณอนุมูล DPPH ที่เหลืออยู่ในชุดควบคุมซึ่งไม่มีสารต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณอนุมูล DPPH สามารถตรวจสอบได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

ส่วนวิธี ABTS เป็นวิธีการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่คล้ายกับวิธี DPPH โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารที่ทำให้เกิดสี คือ ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) โดย potassium persulfate ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) จะไปออกซิไดส์ ABTS ให้เป็น  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  เกิดสารละลายสีฟ้า-เขียว จากนั้นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะรีดิวซ์  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  ให้กลับมาเป็น ABTS ทำให้เกิดสีน้อยลงหรือไม่เกิดสีเลย สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงของ  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  ที่ 734 นาโนเมตร ดังสมการ (56)



สำหรับวิธี reducing power ใช้ในการหาความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้ วิธีนี้เป็นการศึกษาความสามารถในการรีดิวซ์หรือให้อิเล็กตรอนของสารตัวอย่างแก่สารอนุมูลอิสระที่สังเคราะห์ขึ้นภายในระบบโดยสารที่ต้องการทดสอบจะเป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระแล้วทำให้เปลี่ยนเป็นสารที่คงตัวอีกทั้งยังสามารถหยุดปฏิกิริยาถูกโซ่ของอนุมูลอิสระอีกด้วย โดยอาศัยจากการวัดปฏิกิริยารีดักชันของ  $\text{Fe}^3+(\text{CN})_6$  ไปเป็น  $\text{Fe}^{2+}(\text{CN})_6$  ซึ่งจะทำให้มีสีน้ำเงินที่เข้มขึ้น สามารถตรวจสอบความสามารถในการรีดิวซ์ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นแสดงถึงความสามารถในการรีดิวซ์ที่มากขึ้น (57)



## 2.5 เทคนิคที่ใช้ในการทดลอง

### 2.5.1 โครมาโทกราฟีคอลัมน์ (Column chromatography, CC)

เป็นเทคนิคการแยกสารโดยอาศัยการกระจายตัวของสารที่ต่างกันในสองวัฏภาค คือ วัฏภาคคงที่ (stationary phase) และวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) วัฏภาคคงที่อาจเรียกว่า ตัวดูดซับ เช่น ซิลิกาเจล ( $\text{SiO}_2$ ) และอะลูมินา ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) จะบรรจุอยู่ในคอลัมน์ซึ่งเป็นหลอดแก้วยาว เมื่อสารตัวอย่างถูกทำให้อยู่ในรูปของเหลว แล้วนำเข้าสู่คอลัมน์ทางด้านบน และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ อาจเรียกว่า ตัวทำละลายไหลลงมาแล้ว เก็บสารละลายทางด้านล่างของคอลัมน์ ในกรณีที่ใช้ซิลิกาเป็นตัวดูดซับ จะใช้ตัวชะที่มีสภาพขั้วต่ำไปสูง สารตัวอย่างจะถูกแยกภายในคอลัมน์ โดยสารที่มีสภาพขั้วต่ำจะถูกดูดซับโดยตัวดูดซับได้น้อยและเคลื่อนที่ลงมาได้เร็ว ส่วนสารที่มีสภาพขั้วสูงจะถูกดูดซับโดยตัวดูดซับในคอลัมน์ได้ดี และเคลื่อนที่ลงมาช้า อาจต้องเพิ่มสภาพขั้วของตัวชะมากขึ้น เพื่อชะสารออกมาจากคอลัมน์ (6)

### 2.5.2 โครมาโทกราฟีผิวบาง (Thin layer chromatography, TLC)

หลักการของโครมาโทกราฟีผิวบางมีความคล้ายคลึงกับโครมาโทกราฟีคอลัมน์ คือ อาศัยความสามารถในการดูดซับในตัวดูดซับที่แตกต่างกันของสารระหว่างสองวัฏภาค แต่แตกต่างกันที่ตัวดูดซับในโครมาโทกราฟีผิวบางจะมีลักษณะเป็นแผ่นบางเคลือบอยู่บนของแข็งรองรับ เช่น แก้ว หรือแผ่นอลูมิเนียม สารตัวอย่างจะถูกทำให้เป็นจุดเล็กๆ บนแผ่นโครมาโทกราฟีผิวบาง แล้วนำไปจุ่มในแทงค์ที่บรรจุตัวทำละลาย ซึ่งตัวทำละลายจะพาสารให้เคลื่อนที่จากด้านล่างขึ้นด้านบน สารตัวอย่างจะเกิดการแยกบนแผ่นโครมาโทกราฟีผิวบาง ถ้าสารมีสีอาจเห็นด้วยตาเปล่า แต่ถ้าสารไม่มีสีสามารถทำให้เห็นได้โดยการส่องภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต (ultra violet, UV) หรือนำไปทำปฏิกิริยากับสารที่ทำให้เกิดสี เช่น ฟันด้วยกรดฟอสโฟโมลิบดิก แล้วเป่าด้วยลมร้อน เป็นต้น ส่วน Preparative thin layer chromatography (PTLC) เป็นแผ่น TLC ขนาดใหญ่ขนาด  $20 \times 20 \text{ cm}^2$  ถึง  $20 \times 40 \text{ cm}^2$  ความหนาของตัวดูดซับอาจเคลือบหนาถึง 1.5 มิลลิเมตร PTLC สามารถใช้แยกสารได้ถึง 2 กรัม โดยทั่วไปสารจะถูกแยกเป็นแถบถ้าเป็นสารไม่มีสีให้ตรวจสอบภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตหรือนำไปทำปฏิกิริยากับสารที่ทำให้เกิดสี ชุดตัวดูดซับของแต่ละแถบออก แล้วนำไปละลายในตัวทำละลาย (6)

### 2.5.3 เทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตเมทรี (UV/VIS spectrophotometry, UV/VIS)

เทคนิคการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ เป็นการดูดกลืนแสงของสารที่อยู่ในช่วงอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิล ซึ่งอยู่ในช่วงความยาวคลื่น 190-800 นาโนเมตร วิเคราะห์ได้ทั้งสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ สารประกอบเชิงซ้อน ทั้งที่มีสีหรือไม่มีสีก็ได้ เมื่อให้ลำแสงที่เคลื่อนที่อย่างต่อเนื่องผ่านไปยังวัตถุสพบว่าแสงบางส่วนถูกดูดกลืน บางส่วนเกิดการสะท้อน บางส่วนเกิดการกระเจิง และบางส่วนผ่านทะลุออกไป ถ้าแสงที่ทะลุออกไปนั้นผ่านเข้าเครื่องกระจายแสง เช่น ปริซึม หรือเกรตติง จะเห็นสเปกตรัม

หายไปส่วนหนึ่ง ส่วนที่หายไปนี้เรียกว่า absorption spectrum พลังงานที่ถูกดูดกลืนไปนั้นจะทำให้โมเลกุลหรืออะตอมเปลี่ยนระดับพลังงานจากสถานะพื้นไปยังสถานะกระตุ้น ในการวัดปริมาณของแสงที่ถูกดูดกลืนด้วยสารนั้น สามารถทำได้โดยให้ลำแสงผ่านเข้าไปในสารตัวอย่าง แล้ววัดปริมาณของแสงที่ผ่านทะลุออกมา โดยเปรียบเทียบกับแสงที่ทะลุออกมาเมื่อไม่มีสารตัวอย่าง และใช้กฎของเบียร์และแลมเบิร์ต (Beer and Lambert's law) มาใช้ในการวิเคราะห์สาร (58)

### 2.5.3 อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Infrared spectroscopy, IR)

เป็นเทคนิคที่ง่ายและรวดเร็วเทคนิคหนึ่งที่น่าิยมใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับโมเลกุลของสาร สำหรับการหาหมู่ฟังก์ชันของสารอาศัยการเกิดอันตรกิริยาของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความยาวคลื่นในช่วงรังสีอินฟราเรด (2-50  $\mu\text{m}$ ) โดยรังสีอินฟราเรดจะทำให้พันธะในอะตอมหรือกลุ่มอะตอมของสารเกิดการสั่น (vibration) และการหมุน (rotation) ในลักษณะต่างๆ ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงความยาวพันธะหรือมุมพันธะ ซึ่งแต่ละชนิดพันธะจะมีช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับการสั่นเป็นค่าแน่นอน เทคนิคนี้มีประโยชน์มากในการตรวจหาหมู่ฟังก์ชันของสารอินทรีย์ (6) การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารด้วยเครื่อง FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) ทำให้ทราบหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญในโมเลกุลสาร ทำโดยการนำตัวอย่างมาบดกับ KBr แล้วอัดเป็นแผ่นบางๆ เพื่อให้แสงผ่านได้ จากนั้นนำไปใส่ในช่องใส่สารตัวอย่าง นำไปวัดด้วยเครื่อง FTIR ในช่วงความยาวคลื่น  $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$  (58)

### 2.5.4 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR)

โดยปกตินิวเคลียสของอะตอมจะมีการหมุน ทำให้เกิดสนามไฟฟ้าและสนามแม่เหล็กที่เรียกว่า magnetic dipole ซึ่งเป็นค่าเฉพาะของแต่ละธาตุ สำหรับนิวเคลียสของไอโซโทปที่มี nuclear spin quantum number (I) เท่ากับ  $\frac{1}{2}$  เช่น  $^1\text{H}$  และ  $^{13}\text{C}$  เมื่อนำไปวางในสนามแม่เหล็กจะทำให้เกิดการวางตัวในสนามแม่เหล็กภายในมีทิศทาง 2 แนวคือ ในแนวขนานกับทิศทางของสนามแม่เหล็กภายนอกทำให้มีพลังงานต่ำลง และในแนวตรงข้ามกับทิศทางสนามแม่เหล็กภายนอกทำให้มีพลังงานเพิ่มขึ้น แต่เมื่อใดที่มีการให้คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความถี่เหมาะสม นิวเคลียสที่อยู่ในระดับพลังงานต่ำจะดูดกลืนพลังงานและเปลี่ยนการหมุนไปอยู่ในระดับพลังงานสูง ปรากฏการณ์เช่นนี้ เรียกว่า resonance โดยทั่วไป ความถี่ของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วงคลื่นวิทยุ ดังนั้นจึงเรียกเทคนิคนี้ว่า Nuclear magnetic resonance พลังงานของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าทำให้เกิด resonance นั้น ขึ้นอยู่กับความแรงของสนามแม่เหล็กภายนอก คุณลักษณะของนิวเคลียส เช่น โปรตอนที่มีสิ่งแวดล้อมต่างกัน จะมีความถี่ของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่ทำให้เกิด resonance แตกต่างกัน และมีลักษณะสัญญาณแตกต่างกัน ซึ่งเป็นค่า

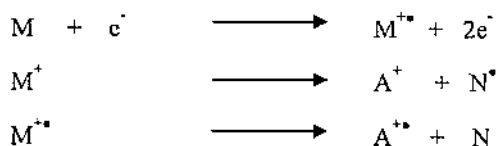
เฉพาะตัวสำหรับเทคนิค NMR ประกอบด้วย 1D NMR ( $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  และ DEPT ) และ 2D NMR (COSY, HMQC และ HMBC) ในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะ  $^1\text{H-NMR}$  และ  $^{13}\text{C-NMR}$

-  $^1\text{H-NMR}$  ในการวิเคราะห์  $^1\text{H NMR Spectrum}$  สิ่งสำคัญที่ต้องพิจารณา คือค่า Chemical shift ( $\delta$ , ppm) เพื่อคว่าโปรตอนเกาะอยู่กับคาร์บอนหมู่ใดบ้างเนื่องจากโปรตอนแต่ละชนิดจะเกิดเรโซแนนซ์ที่ตำแหน่งต่างกัน ค่า integration เพื่อหาจำนวนโปรตอนของพีคแต่ละกลุ่ม ลักษณะของพีค เพื่อตรวจสอบคว่ามีโปรตอนชนิดใดบ้าง เช่น ในกรณีของ H ที่อยู่บน C พีคส่วนใหญ่จะคมชัด แต่ถ้าอยู่บนเฮเทอโรอะตอม (N หรือ O) พีคที่ได้ค่อนข้างจะกว้าง การแยกของพีค (peak splitting) เนื่องจากสปินของนิวคลีไอข้างเคียงเกิดอันตรกิริยากัน หรือเกิดการ coupling ไม่ว่านิวคลีไอข้างเคียงจะเป็นชนิดเดียวกันหรือต่างกัน จำนวนการแยกของพีคขึ้นกับจำนวนของนิวคลีไอข้างเคียง ค่า coupling constant ( $J$ , Hz) เพื่อตรวจสอบคว่าโปรตอนใดบ้างที่เกิดอันตรกิริยาซึ่งกันและกัน โดยดูจากค่า  $J$  ซึ่งต้องเท่ากัน

-  $^{13}\text{C-NMR}$  พารามิเตอร์ที่มีประโยชน์ คือ ค่า chemical shift ( $\delta$ , ppm) ส่วนค่าอินทิกรัลนั้นไม่ได้แสดงจำนวนของคาร์บอน แต่สามารถนับจำนวนของคาร์บอนได้จากจำนวนของพีค ค่า Chemical shift ที่สำคัญ จะสามารถบอกลักษณะของคาร์บอนในโมเลกุลได้ ดังนี้ alkane ( $\delta$  0-50) alkyne ( $\delta$  70-90) alkene ( $\delta$  100-150) aromatic ( $\delta$  110-150) nitrile ( $\delta$  115-125) carbonyls ( $\delta$  150-200) เป็นต้น (6)

### 2.5.5 เทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโตรเมตรี (gas chromatography/mass spectrometry, GC/MS)

เทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโตรเมตรี เป็นเครื่องมือที่ทันสมัย สะดวกต่อการวิเคราะห์สารในปริมาณน้อย ผลการวิเคราะห์มีความถูกต้อง แม่นยำและแม่นยำสูง เทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโตรเมตรี เป็นการเชื่อมต่อเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟีเข้ากับเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี เทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี (gas chromatography, GC) มีหลักการคือ ก๊าซที่บรรจุก๊าซตัวพา (carrier gas) จะมีส่วนที่ควบคุมการไหลของก๊าซที่ปล่อยก๊าซออกมา (flow controller) เมื่อฉีดสารตัวอย่างเข้าไปในตำแหน่งฉีดสาร (injection port) สารจะถูกทำให้กลายเป็นก๊าซ แล้วมีก๊าซตัวพานำไอของสารผ่านไปยังคอลัมน์ (column) ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดการแยกของสาร เมื่อสารออกจากคอลัมน์ จะเข้าสู่ส่วนของดีเทคเตอร์ (detector) ซึ่งใช้ตรวจวัดสารแต่ละชนิดที่ถูกแยกออกจากคอลัมน์ ซึ่งจะทำให้เกิดสัญญาณขึ้น และถูกส่งไปยังเครื่องประมวลผลและข้อมูลต่างๆ (recorder) หลักการของเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี คือ เมื่อทำให้โมเลกุลเกิดการสูญเสียอิเล็กตรอน โมเลกุลสารจะกลายเป็นไอออนและมีประจุบวก ซึ่งถ้าโมเลกุลที่มีประจุบวกนี้มีพลังงานสูงพอ จะเกิดการแตกตัวออกเป็น ส่วนย่อยๆ ซึ่งอาจเป็นอนุภาคที่เป็นกลาง (N) อนุภาคที่เป็นอนุมูลแคทไอออน ( $\text{A}^+$ ) หรือแคทไอออน ( $\text{A}^+$ ) เช่น



ในทำนองเดียวกัน ถ้าไอออนย่อย ( $A^+$  หรือ  $A^+$ ) มีพลังงานมากพอจะเกิดการแตกตัวต่อไปอีก เป็นไอออนย่อยต่อไปเรื่อยๆ จนเหลือพลังงานน้อยสุดที่ไม่สามารถแตกตัวต่อไปได้อีก แมสสเปกตรัมจะบ่งบอกถึงลักษณะการแตกตัวของโมเลกุลไอออน หรือรวมรูปแบบการแตกตัวของแต่ละไอออนทั้งหมดเข้าด้วยกัน จะได้รูปแบบการแตกตัวของโมเลกุลที่เป็นลักษณะเฉพาะของสารแต่ละชนิด ส่วนเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์เป็นเครื่องมือที่ใช้แยก และวัดมวลของไอออนด้วยการใช้อัตราส่วนมวลต่อประจุ ( $m/z$ ) ดังนั้นค่า  $m/z$  จึงมีค่าเท่ากับมวลของไอออน เทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟีสามารถแยกองค์ประกอบของสารผสมได้ ส่วนเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี สามารถบอกข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างขององค์ประกอบที่แยกโดยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี (59)