บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

2.1 ข้อมูลทั่วไปของสังหยู

สังหยูใบเขียว **สังหยูใบแดง**

ภาพที่ 1 ลักษณะต้นและส่วนต่างๆ ของสังหยู

<u>สังหยูใบเขียว</u>

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Litsea martabanica* (Kurz) Hook.f.

วงศ์ : LAURACEAE

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ทั่วไป[4]

ไม้ยืนต้นขนาดเล็ก-กลาง สูง 3-12 เมตร ลำต้นตั้งตรง มีกิ่งแตกเป็นพุ่มบริเวณส่วนยอด เปลือกเรียบสีเทา-น้ำตาล มีช่องอากาศ **ใบ** เดี่ยวออกเรียงสลับ รูปไข่ปลายแหลมรี สีเขียวเข้มหนาเป็นมัน ใต้ใบมีขน ก้านใบยาว 0.8-2.5 เซนติเมตร มีขน เห็นเส้นกลางใบชัดเจน 1 เส้น **ดอก** เดี่ยว ขนาดเล็ก สีเหลืองอมเขียว ออกตามซอกใบ ใกล้ปลายกิ่ง ออกช่วงเดือนมิถุนายน-พฤศจิกายน **ผล** กลม ขนาดเล็ก ติดผลช่วงเดือน พฤศจิกายน-เมษายน

<u>สังหยูใบแดง</u>

วงศ์ : LAURACEAE

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ทั่วไป[4]

ไม้ยืนต้นขนาดเล็ก-กลาง สูงได้กว่า 5 เมตร ลำต้นตั้งตรง มีกิ่งแตกเป็นพุ่ม **ใบ** เดี่ยวสีเขียวหม่น มีผิวสัมผัสหยาบ รูปรี ขอบขนาน โคนใบสอบ ปลายใบแหลม ออกเรียงสลับ มีเส้นกลางใบชัดเจน 3 เส้น **ดอก** เดี่ยวขนาดเล็ก สีเหลืองอมเขียว ออกเป็นกระจุกตามซอกใบ

ประวัติการใช้ประโยชน์ตามภูมิปัญญาของชุมชนบนพื้นที่สูง

ใช้ราก โดยเฉพาะรากที่มีลักษณะเป็นปมของสังหยูทั้งชนิดใบเขียวและชนิดใบแดง นำไปต้มน้ำดื่ม รักษาโรคไต ช่วยล้างสารพิษ และแก้อาการแพ้สารพิษ โดยเฉพาะในชุมชนม้งบ้านป่ากล้วย พัฒนา โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงป่ากล้วย พื้นที่ดำเนินงานของสถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน)

การกระจายพันธุ์[4]

พบขึ้นกระจายทั่วไป ที่ระดับความสูง 500 เมตร ขึ้นไป

2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการสะสมของปริมาณสารออกฤทธิ์

ปัจจัยที่ส่งผลถึงความแตกต่างของปริมาณสารสำคัญในพืชสมุนไพร ได้แก่ สายพันธุ์ ภูมิประเทศ ภูมิอากาศ อายุในการเก็บเกี่ยว ส่วนที่นำมาใช้ ตลอดจนการจัดการหลังการเก็บเกี่ยว เช่น การทำความสะอาด ทำให้แห้ง เก็บรักษา

2.3 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพร

พฤกษเคมี (phytochemistry) เป็นวิชาที่เกี่ยวข้องกับสารเคมีในพืชโดยกล่าวถึงชนิด ปริมาณ คุณสมบัติ การตรวจวิเคราะห์ การกระจายตัวของสารเคมีชนิดต่าง ๆ รวมทั้งขั้นตอนการแยกสกัดสารสำคัญจากพืช การทำสารให้บริสุทธิ์ การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารโดยใช้เทคนิคต่าง ๆ รวมทั้งขบวนการชีวสังเคราะห์ของสารด้วย

ในสารสกัดหยาบ (crude extract) ประกอบด้วยสารองค์ประกอบหลายชนิด ซึ่งในการแยกสารให้บริสุทธิ์นั้น สามารถทำได้โดยอาศัยคุณสมบัติทางเคมี และทางกายภาพ เช่น การละลาย (solubility) การกลั่น (distillation) การสกัดด้วยของเหลวสองชนิด (liquid-liquid chromatography) การตกผลึกแยกส่วน (fractional crystallization) เป็นต้น ซึ่งวิธีที่มักใช้เพื่อทำให้สารบริสุทธิ์ขึ้น ได้แก่

การสกัดด้วยของเหลวสองชนิด (liquid-liquid extraction) เป็นการแยกสารโดยอาศัยการละลายที่แตกต่างกันในตัวทำละลายที่ไม่ผสมกัน (immiscible solvent)

การกลั่น (distillation) ใช้แยกสารที่ระเหยได้ออกจากสารที่ไม่ระเหย โดยอาศัยคุณสมบัติของความแตกต่างของอุณหภูมิจุดเดือดที่ต่างกัน

การตกผลึกแยกส่วน (fractional crystallization) ใช้แยกสารโดยอาศัยการละลายของสารเมื่ออยู่ในตัวทำละลายต่าง ๆ จะละลายได้ต่างกัน

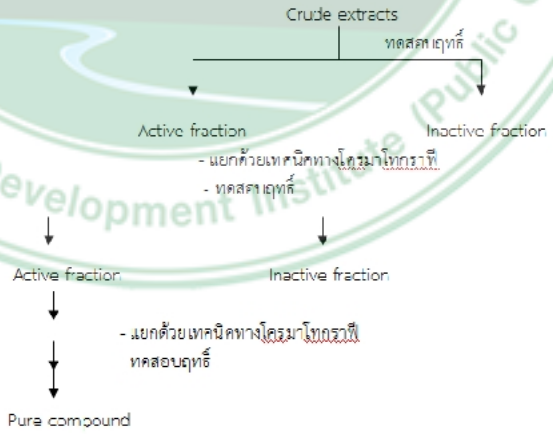
การเหวี่ยง (centrifugation) เป็นการแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน โดยสารเหล่านี้จะตกลงมานอนก้นด้วยอัตราเร็วที่ต่างกัน

อิเลคโทรโฟเลซิส (electrophoresis) เป็นการแยกสารที่มีประจุโดยการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า ใช้แยกสารที่แตกตัวให้ประจุ มักใช้แยกสารในกลุ่มของโปรตีน (protein) และพอลิแซคคาไรด์ (polysaccharide)

โครมาโทกราฟี (chromatography) เป็นวิธีการแยกสารประกอบออกจากกัน โดยอาศัยคุณสมบัติความแตกต่างของการกระจายตัว (distribution of partition) ของสารตัวอย่างระหว่าง 2 เฟส คือ เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) และ เฟสอยู่กับที่ (stationary phase) ซึ่งอัตราการเคลื่อนที่ของสารไม่เท่ากัน ขึ้นอยู่กับ interaction ของสารกับเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ สารที่มี interaction กับเฟสอยู่กับที่ได้ดี สารนั้นจะเคลื่อนที่ช้า

Thin Layer Chromatography (TLC)
Column Chromatography (CC)
Paper Chromatography (PC)
High Performance Liquid Chromatography (HPLC)
High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)
Overpressured Thin Layer Chromatography (OPLC)
Gas Chromatography (GC)
Droplet Counter Current Chromatography (DCCC)

ในกระบวนการศึกษาเพื่อติดตามสารออกฤทธิ์นั้น ภายหลังจากการสกัดสารจากพืชสมุนไพรแล้ว จึงต้องอาศัยกระบวนการในการแยกควบคู่ไปกับการตวจสอบฤทธิ์เพื่อติดตาม ดังแสดงใน ภาพ 2



ภาพที่ 2 แผนภูมิแสดงการแยกสารโดยอาศัย Bioassay guided isolation

2.4 การตรวจสอบฤทธิ์ (*in vitro*)

- ฤทธิ์ต่อการเกิดออกซิเดชัน[5,6]

การเกิดออกซิเดชั่น หรือปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) คือ ปฏิกิริยาที่โมเลกุลหรืออะตอมมีการสูญเสียอิเล็กตรอนจากวงโคจรให้กับโมเลกุลที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน โดย

ปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชัน (reduction) จะเกิดคู่กัน สารที่ทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนเรียกว่า ตัวรีดิวซ์ (reducing agent) และเรียกสารที่ทำหน้าที่รับอิเล็กตรอนนี้ว่า ตัวออกซิไดส์ (oxidizing agent) โดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน มักจะเกี่ยวข้องกับออกซิเจน นอกจากนี้การเกิดออกซิเดชันยังหมายถึง การเสียไฮโดรเจนอะตอมออกจากโมเลกุลอีกด้วย ดังนั้นปฏิกิริยาออกซิเดชันและอนุมูลอิสระจึงมีความเกี่ยวข้องกัน เนื่องจากปฏิกิริยาดังกล่าวทำให้เกิดอนุมูลอิสระ (Free readicals) ของสารต่างๆ ได้มากมายหลายชนิด และอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารอื่นๆ เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อไป

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณเป็นการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างประเภทต่างๆ วิธีที่นิยม ได้แก่ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH) โดยการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH assay นี้เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน ซึ่งใช้ reagent คือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ง่ายต่อการวิเคราะห์ ให้ความถูกต้องและแม่นยำสูง โดยมีหลักการคือ DPPH เป็น stable radical ในตัวทำละลายเมทานอล (methanol) สารละลายนี้มีสีม่วง ซึ่งดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 515-517 นาโนเมตร (nm) และเมื่อทำปฏิกิริยากับสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะทำให้สารละลาย DPPH สีจางลงจนเป็นสีเหลือง

โดย DPPH● จะเกิดปฏิกิริยากับ Antioxidant (AH) หรือกับ radical species (R●)

DPPH● + AH----------DPPH-H + A●

DPPH● + R●---------- DPPH-R

- ฤทธิ์ต่อเซลล์ตับเพาะเลี้ยง

การวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Cell Proliferation) เป็นวิธีการที่ใช้ศึกษาผลการตอบสนองของเซลล์ที่มีต่อสารทดสอบ มีหลายวิธีที่ใช้วัด Cell Proliferation เช่น การนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต วัดปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น รวมถึงการดูจาก metabolic activity ของเซลล์ โดยการวัด Metabolic activity ภายในเซลล์สามารถบ่งบอกว่าเซลล์นี้ยังมีพลังงานที่จะใช้ในการเพิ่มจำนวนอยู่หรือไม่ กลุ่มเซลล์ใดที่แสดงให้เห็นว่ามี metabolic activity มากก็หมายถึงว่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน ในการตรวจสอบการเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วยการวัด metabolism ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ MTT (colorimetric assay) ซึ่งหลักการและวิธีของการวัดคือ การวัดสภาวะ reduction environment (mitochondrial reductase) ของ mitochondria ในเซลล์ โดยเมื่อ MTT ถูก reduced ด้วย mitochondrial reductase จะทำให้สีของ MTT เปลี่ยนเป็นสีม่วงของสี formazan โดยสีจะถูกวัด absorption ที่ 570 nm ปริมาณของสีม่วงที่เพิ่มขึ้นจะหมายถึงปริมาณของเซลล์มีชีวิตเพิ่มขึ้นด้วย[7]

Apoptosis เป็นรูปแบบหนึ่งของการตายของเซลล์แบบที่มีการโปรแกรมไว้แล้ว (programmed cell death) ของสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ Annexin assay ซึ่งเป็นการทดสอบโดยอาศัยการลำเลียง phosphatidylserine (PS) จากด้านในไปยังด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ที่เริ่มจะเกิด apoptosis ในการทดสอบใช้ fluorescein conjugate annexin ซึ่งจะจับตัวกับ phosphatidylserine เป็นผลให้เซลล์ที่เริ่มจะเกิด apoptosis ถูกย้อมด้วยสีดังกล่าว ส่องดูได้ในกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์

(exitation/emission = 496/550 nm) หรือวัดได้ใน spectrofluorometer หรือใน flow cytometer ซึ่งมีโปรแกรมคอมพิวเตอร์ช่วยคำนวณทางสถิติให้ด้วย นอกจากนี้ในการทดสอบจะมีการเติม propidium iodide (PI) ลงไปด้วย เพื่อหา necrotic cells ซึ่ง membrane เสียความสามารถในการกั้นไม่ให้สารต่างๆ เข้าไปในเซลล์ PI จึงเข้าไป label DNA ของเซลล์ที่ตายแบบ necrosis ได้[8] การใช้ PI คู่กับ annexin จึงทำให้สามารถแยกเซลล์ออกได้เป็นสี่กลุ่ม คือ

Viable cells: annexin V - PI - ไม่ติดสีย้อม
Early apoptotic cells: annexin V + PI – ย้อมติดสีเขียวเท่านั้น
Late apoptotic cells: annexin V + PI + ย้อมติดทั้งสีเขียวและแดง
Necrotic cells: annexin V - PI + ย้อมติดสีแดงเท่านั้น

2.5 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านพิษยาฆ่าแมลง (*in vivo*)[9]

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านพิษยาฆ่าแมลง โดยใช้ยาฆ่าแมลงกลุ่ม organophosphate เนื่องจากสารเคมีกลุ่มนี้มีพิษรุนแรงมากกว่ายาฆ่าแมลงกลุ่มอื่นและมีการใช้อย่างกว้างขวาง ยิ่งไปกว่านั้นการลงพื้นที่ดูแลของเกษตรที่สูงก็พบว่ามีการใช้สารเคมีกลุ่มนี้มาก โดยสามารถยับยั้งการทำงานของ acetylcholine esterase ทำให้ระดับ acetylcholine ในร่างกายเพิ่มขึ้น ส่งผลต่อระบบไหลเวียนโลหิต เช่นทำให้ความดันโลหิตต่ำ หัวใจเต้นช้าลง ส่งผลต่อระบบหายใจ และทำให้เกิดอาการต่างๆ ได้แก่ ปวดท้อง ท้องเสีย อาเจียน ผู้ป่วยอาจเสียชีวิตจากการหายใจล้มเหลว นอกจากนี้ยาฆ่าแมลงกลุ่มดังกล่าวอาจเหนี่ยวนำให้มี oxidative stress ทำให้มีการสร้างอนุมูลอิสระ และสามารถทำลายโครงสร้างของ phospholipids bilayer ของเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้มี lipid peroxidation เพิ่มขึ้นอาจก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสมดุลระหว่าง antioxidants และ reactive oxygen species ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีการตรวจวัดระดับของ malondialdehyde (MDA) เพื่อบอกสภาวะ oxidative stress ในร่างกาย และการวิเคราะห์ระดับของ reduced glutathione (GSH) และ superoxide dismutase (SOD) ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ที่ใช้ในการจัดการกับอนุมูลอิสระ

2.6 การศึกษาความเป็นพิษระยะยาว (180 วัน) ในสัตว์ทดลอง[10,11]

การทดสอบการเกิดพิษแบบเรื้อรัง (Chronic toxicity) เป็นการทดสอบการเกิดพิษของสารพิษที่ใช้เวลานานออกไปกว่า 3 เดือน ซึ่งถือเป็นการทดสอบการเกิดพิษระยะยาว เช่น การเกิดโรคมะเร็งการได้รับสารพิษแบบเรื้อรังจะทำการทดลองเช่นเดียวกับการเกิดพิษแบบกึ่งเรื้อรัง แต่ระยะเวลาการได้รับสารควรจะมากกว่า 3 เดือนจนถึงเป็นปี การทดลองนิยมใช้สัตว์ทดลองจำนวนที่ค่อนข้างมาก เนื่องจากจะต้องใช้เวลานาน จะต้องมีสัตว์ทดลองเหลือจนถึงช่วงสุดทายของการทดลองเป็นจำนวนประมาณร้อยละ 50 จากจำนวนเริ่มต้น ขนาดของสารทดลองที่ใช้สูงสุดควรเป็นปริมาณของสารที่มากที่สุดที่สัตว์ทดลองทนอยู่ได้ (Maximum tolerable dose : MTD) ซึ่งจะได้จากการศึกษาแบบเรื้อรัง ขนาดอื่นๆ ที่จะใช้ทดสอบ คือ 1/2 หรือ 1/4 ของ MTD และควรมีกลุ่มเปรียบเทียบ (control group)