# รายงานผลการวิจัย
# มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง

การศึกษาคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระในพรอพอลิส

FREE-RADICAL SCAVENGING ACTIVITY OF PROPOLIS

โดย

ภัทราพร ผูกคล้าย ธัญญรัตน์ เชื้อสะอาด

2553

# รายงานผลการวิจัย
# มหาวิทยาลัยแม่โจ้

**เรื่อง** การศึกษาคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระในพรอพอลิส

FREE-RADICAL SCAVENGING ACTIVITY OF PROPOLIS

**ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย** ประจำปี 2551

จำนวน 120,000 บาท

**หัวหน้าโครงการ** นางสาวภัทราพร ผูกคล้าย

**ผู้ร่วมโครงการ** นางสาวธัญญรัตน์ เชื้อสะอาด

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

31 พฤษภาคม 2553

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยแม่โจ้

B: 255967
I: 18444
วันที่ 8 มิ.ย. 2553

เลขเรียกหนังสือ
รว
547.23
ภ 375 ก

รว 547.23 ภ375ก
ภัทราพร ผูกคล้าย
การศึกษาคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระในพรอพอลิส
35001002268770

# การศึกษาคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระในพรอพอลิส

# FREE-RADICAL SCAVENGING ACTIVITY OF PROPOLIS

**ภัทราพร ผูกคล้าย และ ธัญญรัตน์ เชื้อสะอาด**

PATTRAPORN PUKKLAY AND THANYARAT CHUESAARD

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์พื้นฐาน มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ

ตำบลแม่ทราย อำเภอร้องกวาง จังหวัดแพร่ 54140

---

## บทคัดย่อ

พรอพอลิสเป็นสารที่ผลิตจากผึ้ง ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของพืชพรรณ พรอพอลิสของไทยยังไม่มีการศึกษามากนัก โดยเฉพาะพรอพอลิสจากจังหวัดแพร่ ดังนั้นจึงสนใจศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพรอพอลิสจากจังหวัดแพร่ พบว่าสารสกัดพรอพอลิสในตัวทำละลายเอทานอลมีสารกลุ่มโพลีฟีนอลและฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบ 1.295 และ 0.35 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัดพรอพอลิสตามลำดับ และสามารถแยกชนิดของสารโดยใช้เทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี ซึ่งเฟสเคลื่อนที่ ได้แก่ เฮกเซน : เอทิลอะซิเตท : กรดอะซิติก (60:40:1%v/v) พบว่าเกิดการแยก 10 จุดด้วยกัน จากนั้นนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ พบว่าสามารถยับยั้งอนุมูล DPPH และสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดไม่สามารถยับยั้งอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออนและไฮดรอกไซด์ได้

## ABSTRACT

Propolis is a resinous substance collected by honeybees from various plant sources. The composition of propolis depends upon the vegetation at the site of collection. In Thailand, propolis research is still limited. The objective of this study investigates the biological properties and chemical components of Thai propolis from Phrae Province. The result showed that ethanolic extract propolis consists of polyphenols and flavonoids which is 1.295 and 0.35 mg/g EEP, respectively. The components of EEP were separated into 10 spots by TLC technique in mobile phase hexane : ethyl acetate : acetic acid (60:40:1%v/v). Ethanolic extract of Thai propolis showed the ability to scavenge DPPH and hydrogen peroxide but cannot to scavenge superoxide anion and hydroxyl radicals.

# กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี โดยได้รับการสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร ประจำปี 2551 และขอขอบคุณมหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ ที่ให้การสนับสนุนในเรื่องอุปกรณ์และสถานที่ในการวิจัย

ขอขอบคุณอาจารย์วันทนีย์ แพงศรี อาจารย์ประจำสาขาวิชาศึกษาพื้นฐาน มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ ที่ให้คำปรึกษาเทคนิคทางด้านทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

ขอขอบคุณคุณวินัย พีระพันธุ์ นักวิชาการส่งเสริมการเกษตร 6 ต. ตำหนักธรรม อ. หนองม่วงไข่ จ. แพร่ ที่ช่วยในการเก็บพรอพอลิสเพื่อใช้ในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบคุณคุณสุพรรณี รักษาพล คุณพัทยา พรหมมิ คุณรุ่งนภา กาวิชัย คุณพรสวรรค์ ต๊ะเสี้ยว คุณภัทราพรรณ พรหมแก้วและคุณทัศนีย์ พรหมสุข นักศึกษาสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพที่มีส่วนช่วยศึกษาเทคนิคการสกัด การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และ เทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี ซึ่งทำให้งานวิจัยสำเร็จได้ดี

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ พนักงานผู้ช่วยปฏิบัติการ ประจำอาคารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ ที่มีส่วนช่วยในการเตรียมอุปกรณ์ เครื่องมือตลอดจนสารเคมีที่ใช้ในการทำวิจัย

สุดท้ายขอขอบคุณอาจารย์ศรีสุดา ทาหาร อาจารย์ประจำสาขาวิชาศึกษาพื้นฐาน มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ ที่ช่วยติดต่อสอบถามแหล่งพรอพอลิสในจังหวัดแพร่ พร้อมทั้งเป็นกำลังใจที่สำคัญทำให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงอย่างดียิ่ง

คณะผู้จัดทำ

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| บทคัดย่อ | i |
| Abstract | i |
| บทที่ 1 คำนำ (Introduction) | 1 |
| 1.1 ที่มาของปัญหา | 1 |
| 1.2 วัตถุประสงค์ | 2 |
| 1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 2 |
| 1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย | 2 |
| บทที่ 2 การตรวจเอกสาร (Literature Review) | 3 |
| 2.1 พรอพอลิส | 3 |
| 2.2 การสกัดสารและตัวทำละลายที่สำคัญ | 6 |
| 2.3 วิธีการสกัด | 7 |
| 2.4 การทำให้สารสกัดจากตัวอย่างให้เข้มข้น | 9 |
| 2.5 การกำจัดไข | 11 |
| 2.6 โครมาโทกราฟี | 11 |
| 2.7 คุณสมบัติและสรรพคุณของพรอพอลิส | 14 |
| 2.8 อนุมูลอิสระ | 15 |
| 2.9 สารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในพรอพอลิส | 27 |
| บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods) | 29 |
| 3.1 อุปกรณ์การทดลอง | 29 |
| 3.2 วิธีการทดลอง | 31 |
| 3.3 การศึกษาหาปริมาณสารที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ฟลาโวนอยด์(flavonoid) และโพลีฟีนอล (polyphenol) ในพรอพอลิส | 33 |
| 3.4 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพรอพอลิส โดยเทคนิค TLC | 33 |
| 3.5 การทดสอบทางสถิติ | 34 |
| 3.6 สถานที่ทำการทดลองหรือเก็บข้อมูล | 34 |
| 3.7 ระยะเวลาทำการวิจัย | 34 |

# สารบัญ (ต่อ)


| | หน้า |
|---|---|
| บทที่ 4 ผลการทดลอง (Results) | 35 |
| 4.1 ลักษณะของพรอพอลิสและสารสกัดพรอพอลิสในตัวทำละลายเอทานอล | 35 |
| 4.2 การศึกษาหาปริมาณสารโพลีฟีนอล (polyphenol) และฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ในสารสกัดพรอพอลิส | 35 |
| 4.3 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดพรอพอลิสด้วยวิธี TLC | 36 |
| 4.4 การศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดพรอพอลิส | 37 |
| 4.5 การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของสารสกัดพรอพอลิส | 38 |
| 4.6 การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งsuperoxide anion ของสารสกัดพรอพอลิส | 38 |
| 4.7 การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้ง hydroxyl radical ของสารสกัดพรอพอลิส | 39 |
| บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง (Discussion) | 40 |
| เอกสารอ้างอิง | 43 |

# สารบัญตาราง


ตารางที่ หน้า

2.1 ชนิดของพรอพอลิส ชนิดของพืชและสารสำคัญที่พบในพรอพอลิสแต่ละชนิด 5

3.1 แผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย 34

4.1 ผลผลิตร้อยละ ปริมาณโพลีฟีนอล และปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดพรอพอลิส ในตัวทำละลายเอทานอล 36

# สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า


2.1 พรอพอลิสถูกสร้างขึ้นเพื่อปิดช่องเปิดภายในกล่องเลี้ยงผึ้ง 3

2.2 พฤติกรรมของผึ้งในการเก็บส่วนของพืชเพื่อใช้ในการสร้างพรอพอลิส 4

2.3 การสกัดแบบมาเซเรชัน (maceration) 7

2.4 ซอกซ์เลตเอกแทรกเตอร์ (soxhlet extractor) 8

2.5 การสกัดแบบใช้เครื่องล้างความถี่สูง (ultrasound sonicator extraction, UE) 9

2.6 เครื่องโรตารีอีวาโพเรเตอร์ (rotary evaporator) 10

2.7 อนุมูลอิสระ (free radicals) 15

2.8 อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในไมโตคอนเดรีย 17

2.9 อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออนเป็นอนุมูลเริ่มต้นของอนุมูลอิสระอื่นๆ 20

2.10 โครงสร้างของวิตามินซี (vitamin C) 24

2.11 โครงสร้างของวิตามินอี (vitamin E) 25

2.12 โครงสร้างกลูทาไทโอน (glutathione) 26

4.1 ลักษณะของพรอพอลิสที่ได้จากอำเภอร้องกวาง จังหวัดแพร่ 35

4.2 โครมาโทแกรมของสารสกัดพรอพอลิสในตัวทำละลายเอทานอลบนแผ่น TLC 36

4.3 ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล DPPH ของสารสกัดพรอพอลิส 37

4.4 ความสามารถในการยับยั้งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของสารสกัดพรอพอลิส 38

# บทที่ 1
# คำนำ (Introduction)

## 1.1 ที่มาของปัญหา

ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งซึ่งมีทรัพยากรธรรมชาติที่หลากหลาย อาชีพหลักของคนไทยจึงเน้นในการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรที่มีอยู่ นั้นคือการทำเกษตรกรรม โดยเฉพาะทางภาคเหนือนอกจากการปลูกข้าว หรือทำสวนผลไม้แล้วนั้น อาชีพการเลี้ยงผึ้ง ยังเป็นอาชีพหนึ่งซึ่งสร้างรายได้ให้กับเกษตรกรได้เช่นกัน การเลี้ยงผึ้งในประเทศไทยเกิดขึ้นในปี พ.ศ. 2483 พบว่ามีการเลี้ยงผึ้งอย่างแพร่หลายในหลายจังหวัด ทั้งนี้เพราะเงินลงทุนในการเลี้ยงไม่สูงมากนัก ใช้พื้นที่ไม่มาก และประหยัดต้นทุน ผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากการเลี้ยงผึ้งมีหลายชนิด เช่น น้ำผึ้ง ไขผึ้ง รอแยลเจลลี่ เกสรผึ้ง เป็นต้น แต่การเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายนี้เองส่งผลให้ ผลิตภัณฑ์จากผึ้งมีการผลิตและมีวางจำหน่ายกันอย่างแพร่หลายเช่นกันและส่งผลให้ผลผลิตมีราคาต่ำ เมื่อเทียบกับต้นทุนที่จำเป็นต่อการผลิตนั้นมีราคาสูงขึ้นตามลำดับ นอกจากปัญหาดังกล่าว การขาดความรู้ความเข้าใจในผลผลิตจากการเลี้ยงผึ้งของเกษตรกรยังเป็นปัญหาที่สำคัญอีกปัญหาหนึ่งเช่นกัน พบว่าการเลี้ยงผึ้งยังให้ผลผลิตยางผึ้งหรือพรอพอลิส (propolis) ที่มีความสำคัญทางด้านการแพทย์ ซึ่งพบว่าเกษตรกรส่วนใหญ่ไม่ให้ความสำคัญกับการเก็บผลผลิตนี้ เพราะขาดความรู้ความเข้าใจว่าส่วนใดคือส่วนของพรอพอลิสและมีขั้นตอนในการเก็บที่ยุ่งยาก แต่เมื่อเปรียบเทียบทางด้านมูลค่าของพรอพอลิสนั้นมีราคาค่อนข้างสูง ซึ่งในต่างประเทศนั้นมีการนำพรอพอลิสมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเภสัชภัณฑ์อาทิเช่น ญี่ปุ่น นำมาผลิตเป็นเครื่องดื่ม อาหารบำรุงสุขภาพ ขณะที่ประเทศในแถบยุโรป นำมาเป็นส่วนประกอบของครีมป้องกันสิว ครีมทาหน้า ยาขี้ผึ้ง และโลชั่น เพราะพรอพอลิสสามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายอย่าง อาทิเช่น การต้านอนุมูลอิสระ การต้านอาการอักเสบ เป็นต้น

สาเหตุของการขาดความรู้ความเข้าใจในผลิตภัณฑ์นี้ อาจเกิดจากข้อมูลพื้นฐานและงานวิจัยเกี่ยวกับพรอพอลิสในประเทศไทยนั้นยังมีน้อยมาก จำเป็นอย่างยิ่งในการศึกษาพรอพอลิสจากประเทศไทย นอกจากนี้พบว่า องค์ประกอบและความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของพรอพอลิสในแต่ละพื้นที่นั้นแตกต่างกันตามสภาพภูมิประเทศ ภูมิอากาศ และพืชพรรณ (Burdock *et al.*,1998) ปัจจัยสำคัญคือชนิดของพืชพรรณ ทั้งนี้เพราะว่าผึ้งสร้างพรอพอลิสโดยเก็บยางของต้นไม้ และนำมาผสมหรือเปลี่ยนแปลงยางไม้ให้เป็นพรอพอลิส (Marcucci *et al.*, 1995) เนื่องจากประเทศไทยมีความหลากหลายของพรรณไม้ อาจเป็นไปได้ว่าพรอพอลิสของไทย อาจมีองค์ประกอบและสรรพคุณแตกต่างจากพรอพอลิสในทวีปยุโรปหรือทวีปเอเชียก็เป็นได้

ดังนั้นการศึกษานี้สนใจศึกษาองค์ประกอบและสรรพคุณโดยเฉพาะฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพรอพอลิส จากประเทศไทย เพื่อเกิดเป็นองค์ความรู้ใหม่และฐานข้อมูลทางความรู้ ทำให้ทราบถึงองค์ประกอบและสรรพคุณ และส่งผลช่วยกระตุ้นความสนใจของเกษตรกร เพิ่มผลิตภัณฑ์จากการเลี้ยงผึ้ง นอกจากนี้ภาคอุตสาหกรรมโดยเฉพาะอุตสาหกรรมยา เครื่องสำอาง เคมีภัณฑ์ สามารถนำข้อมูลไปประยุกต์ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์จากผึ้งได้

## 1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพรอพอลิส
2. เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากพรอพอลิส
3. เพื่อศึกษาปริมาณของ flavonoid และ polyphenol ของสารสกัดจากพรอพอลิส

## 1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพรอพอลิส
2. ทราบถึงองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากพรอพอลิส
3. ทราบถึงปริมาณของฟลาโวนอยด์และโพลีฟีนอลของสารสกัดจากพรอพอลิส
4. เกิดองค์ความรู้พื้นฐานต่องานวิจัยทางด้านเกษตรกรรม เกษตรกรหรือหน่วยงานที่เกี่ยวข้องสามารถนำข้อมูลไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ได้

## 1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย

สารสกัดพรอพอลิสในตัวทำละลายเอทานอล นำมาศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ DPPH, superoxide anion, hydroxyl anion และ hydrogen peroxide นำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี โดยนำมาวัดปริมาณของ flavonoid และ polyphenol รวมทั้งนำมาแยกชนิดขององค์ประกอบของสารสกัดพรอพอลิสโดยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีหรือโครมาโทกราฟีผิวบาง (thin layer chromatography)

# บทที่ 2
# การตรวจเอกสาร (Literature Review)

## 2.1 พรอพอลิส (propolis)

### 2.1.1 ลักษณะทางกายภาพของพรอพอลิส

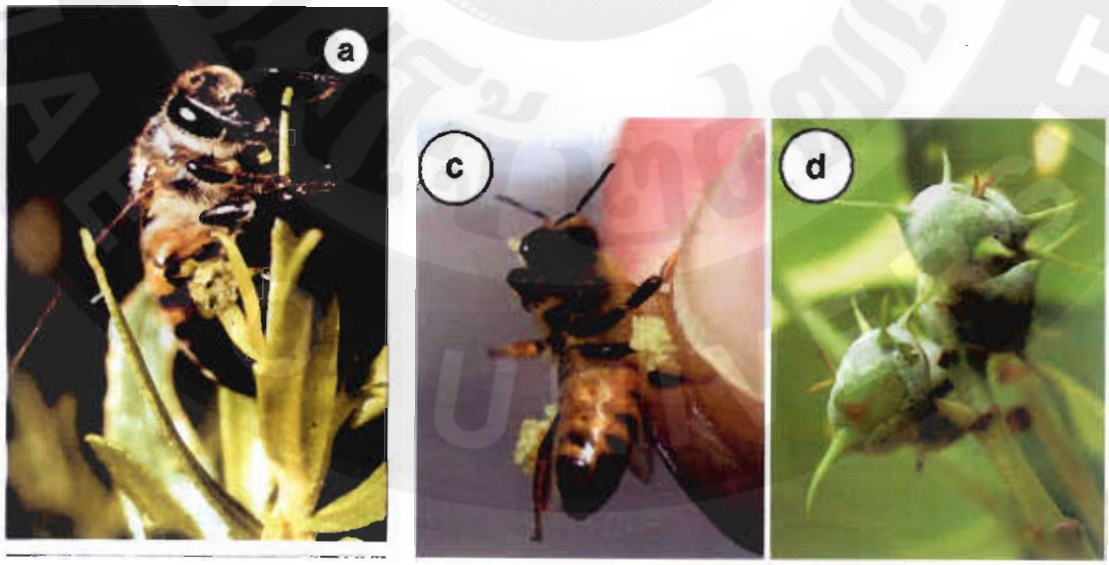
พรอพอลิสมีลักษณะเป็นยางข้นเหนียวและมีสีเหลืองจนถึงสีน้ำตาลเข้ม ไม่มีกลิ่น สีของพรอพอลิสขึ้นอยู่กับยางไม้ที่ผึ้งนำมาจากส่วนต่างๆ ของพืช เช่นส่วนของเปลือกไม้ หรือตาใบ (Burdock, 1998) โดยนำมาผสมกับไขผึ้งแล้วนำมาซ่อมแซมรัง อุดขันรอยรั่ว ดังแสดงในภาพที่ 2.1 Salatino *et al.* 2005 แสดงให้เห็นว่าเมื่อกล่องเลี้ยงผึ้งมีช่องเปิด ผึ้งจะสร้างพรอพอลิสขึ้นมาปิดช่องเปิดนั้น นอกจากนี้พรอพอลิสยังช่วยรักษาความสะอาด และป้องกันการระบาดของเชื้อโรคภายในรังได้ด้วย โดยเมื่อมีซากของศัตรูผึ้งตายอยู่ในรัง และมีขนาดใหญ่ที่ผึ้งไม่สามารถจะนำออกไปทิ้งนอกรังได้ ผึ้งจะนำสารพรอพอลิสมาหุ้มไว้ ทำให้ซากนั้นไม่เน่าเพื่อใช้ปิดรอยโหว่ของรังเลี้ยง และห่อหุ้มศัตรูที่ถูกผึ้งฆ่าตายในรังผึ้ง แต่ไม่สามารถนำออกไปทิ้งนอกรังผึ้งได้ เพื่อไม่ให้เกิดการเน่าเหม็นในรังผึ้ง

<u>ภาพที่ 2.1</u> พรอพอลิสถูกสร้างขึ้นเพื่อปิดช่องเปิดภายในกล่องเลี้ยงผึ้ง
ที่มา : Salatino *et al.* 2005

### 2.1.2 องค์ประกอบสำคัญของพรอพอลิสและแหล่งที่มาของสารสำคัญ

พรอพอลิส ประกอบด้วย ส่วนผสมของยางไม้และขี้ผึ้ง ประมาณร้อยละ 55 ขี้ผึ้งร้อยละ 30 น้ำมันหอมร้อยละ 10 และละอองเกสรร้อยละ 5 (Cunha *et al.*, 2004) จากการศึกษาพบว่าสารสำคัญในพรอพอลิสประกอบด้วยสารหลายชนิดอาทิเช่น polyphenol, terpenoid, steroid และ amino acid

จากการสังเกตพฤติกรรมของผึ้งในบราซิล Kumazawa *et al.* 2003 รายงานว่าผึ้งจะเก็บส่วนยอดของ *Baccharis dracunculiforia* ผลิตเป็นบราซิลพรอพอลิส เมื่อนำมาสกัดพบว่าสารสกัดนั้นมีความคล้ายคลึงกับสารที่สกัดจาก *Baccharis dracunculiforia* (ภาพที่ 2.2a) ซึ่งสารสำคัญที่สามารถพบได้ในบราซิลพรอพอลิสได้แก่ prenylated derivatives of *p*-coumaric acid, prenylated derivatives of acetophenone, dipertenes, lignans และ flavonoid (ตารางที่ 1) ซึ่งแตกต่างจากพรอพอลิสจากโอกินาวา ประเทศญี่ปุ่น ที่มีสาร Prenylated flavonoid เป็นองค์ประกอบสำคัญและ พบว่าผึ้งผลิตพรอพอลิสจากผลของ *Macaranga tanarius* (Kumazawa *et al.*, 2008) (ภาพ 2.2b และ 2.2c) แสดงให้เห็นว่าพรอพอลิสในแต่ละพื้นที่มีองค์ประกอบสำคัญแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของพืชในแต่พื้นที่นั้นๆ (Burdock *et al.*, 1998) จากปัจจัยนี้ ทำให้พรอพอลิส จากทวีปยุโรป อเมริกาเหนือและใต้ เอเชีย และแอฟริกามีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน (Marcucci, 1995) (ตารางที่ 2.1)




**ภาพที่ 2.2** พฤติกรรมของผึ้งในการเก็บส่วนของพืชเพื่อใช้ในการสร้างพรอพอลิส

**a** *Baccharis dracunculiforia* , บราซิล (Kumazawa et al. 2003)

**b และ c** *Macaranga tanarius* , โอกินาวา ญี่ปุ่น(Kumazawa et al. 2008)

**ตารางที่** 2.1 ชนิดของพรอพอลิส ชนิดของพืชและสารสำคัญที่พบในพรอพอลิสแต่ละชนิด

| พรอพอลิส | ชนิดของพืช | สารสำคัญ | อ้างอิง |
|---|---|---|---|
| European propolis (Poplar type) | *Populus Nigra* | Flavonoid aglycone, Phenolic acid, Phenolic ester | Bankova *et al.* 2002 |
| Brazillian propolis | *Baccharis dracunculiforia* | Prenylated derivatives of p-coumaric acid, Prenylated derivatives of acetophenone, Dipertenes, Lignans , Flavonoid | Marcucci *et al.* 1999, Kumazawa *et al.* 2003 |
| Cuban propolis | *Clusia rosea* | Polyisoprenyted benzophenone | Cuesta *et al.* 2002 |
| Taiwan propolis | Not identified | Prenylated flavonoid | Chen *et al.* 2003 |
| Japan propolis (Okinawa) | *Macaranga tanarius* | Prenylated flavonoid | Kumazawa *et al.* 2007 |

2.2 **การสกัดสารและตัวทำละลายที่สำคัญ** (Extraction and solvent of active constituents) (รัตนา, 2547)

วัตถุประสงค์ของการสกัด คือ เพื่อสกัดแยกสารสำคัญ และเพื่อให้ได้สารสกัดที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น หลังจากที่ทำการเตรียมตัวอย่างแล้วควรเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมกับชนิดของสารสกัดที่ต้องการสกัด โดยตัวทำละลายควรมีความสามารถในการละลายสารสำคัญมากที่สุดและไม่ละลายหรือละลายองค์ประกอบอื่นได้น้อย (มี Selectivity สูง) เนื่องจากสารสำคัญส่วนใหญ่ เป็นสารประกอบอินทรีย์ ดังนั้นควรพิจารณาถึงสภาพหรือรูปแบบของสารที่ต้องการสกัดนอกเหนือจากความมีขั้วของสารดังกล่าว ในการเลือกตัวทำละลายมีหลักการโดยทั่วไปว่า ถ้าสารสำคัญมีคุณสมบัติเป็นสารที่มีขั้วก็ควรเลือกตัวทำละลายที่มีขั้วเช่นเดียวกันในการสกัด อีกทั้งตัวทำละลายที่ใช้จะต้องมีความคงตัวดี หาง่าย ราคาถูก ไม่เป็นพิษต่อร่างกายและไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป (รัตนา, 2547) ซึ่งตัวทำละลายที่นิยมใช้คือ

2.2.1 **น้ำ**

จัดเป็นตัวทำละลายที่ดี หาง่ายและราคาถูก แต่การใช้น้ำอย่างเดียวเป็นตัวทำละลายมีข้อเสียหลายประการคือสามารถละลายองค์ประกอบที่ไม่ต้องการออกมาได้มาก เช่นเดียวกับสารที่ต้องการ สารเฉื่อยที่ละลายออกมากับน้ำ เช่น น้ำตาล แป้ง ล้วนเป็นอาหารที่ดีของเชื้อจุลินทรีย์ จึงทำให้เกิดการบูดเสียของสารสกัดเนื่องจากจุลินทรีย์ได้ นอกจากนี้น้ำระเหยได้ที่อุณหภูมิสูงถ้าต้องการให้สารสกัดมีความเข้มข้นขึ้นจะต้องใช้อุณหภูมิสูงในการระเหยน้ำออกไป ซึ่งอาจเกิดความเสียหายกับสารสำคัญได้

2.2.2 **แอลกอฮอล์**

จัดเป็นตัวทำละลายที่ดีมากเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำ แอลกอฮอล์มีข้อดีกว่าน้ำกล่าวคือ มีความจำเพาะในการละลายมากกว่าน้ำ เนื่องจากสามารถละลายองค์ประกอบที่ต้องการออกมาได้มากกว่า มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และหากต้องการให้สารสกัดเข้มข้นขึ้นจะระเหยได้ง่าย แต่จะมีราคาแพงกว่าน้ำ

2.2.3 **คลอโรฟอร์ม** (chloroform) **และ อีเทอร์** (ether)

จัดเป็นตัวทำละลายที่มีขั้ว (polarlity) ปานกลาง ใช้สกัดองค์ประกอบที่ไม่มีขั้ว (non-polar component) ไปจนถึงสารที่มีขั้วปานกลาง

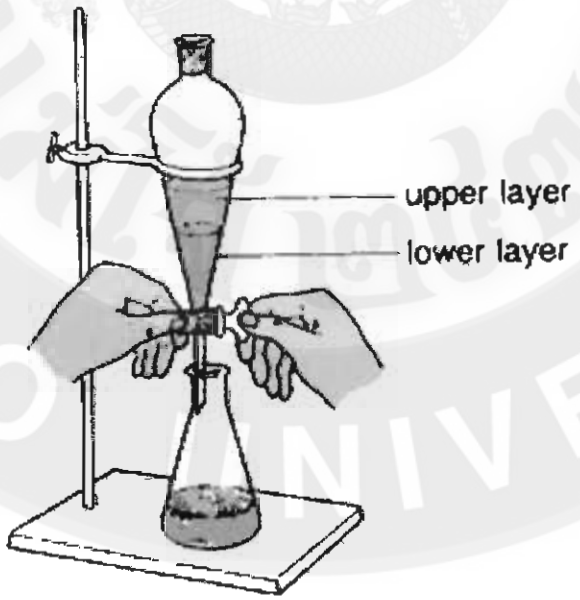
2.2.4 **เมทานอล** (methanol)

จัดเป็นตัวทำละลายที่ใช้สกัดสารที่มีขั้ว เช่นเดียวกับแอลกอฮอล์ แต่นิยมใช้แอลกอฮอล์มากกว่าเพราะราคาถูกกว่าและเป็นพิษน้อยกว่า

**2.3 วิธีการสกัด**

สำหรับการเลือกวิธีการสกัดควรพิจารณาจากความสามารถในการละลายของสารสำคัญในน้ำยาสกัด ถ้าละลายได้ง่ายนิยมใช้วิธีดัวดูดซับ แต่ถ้าละลายได้น้อยก็จำเป็นต้องใช้วิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง ความคงตัวของสารสำคัญในตัวอย่างต่อความร้อน คุณค่าของสารสกัดและค่าใช้จ่ายในการสกัดและความต้องการที่จะให้ได้การสกัดที่สมบูรณ์หรือเกือบสมบูรณ์ หากต้องการสารสกัดเจือจางการใช้วิธีมาเซเรชันก็เพียงพอแล้ว แต่ถ้าต้องการสารสกัดที่เข้มข้นก็ควรใช้วิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง (รัตนา, 2547)

**2.3.1 มาเซเรชัน (maceration)** เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญโดยวิธีการหมักกับน้ำยาสกัด น้ำยาสกัดสามารถแทรกเข้าไปละลายองค์ประกอบออกมาได้ การหมักควรทำในภาชนะที่มีฝาปิดสนิทในน้ำยาสกัดที่เหมาะสมจะทำเป็นเวลา 7 วัน หรือจนกระทั่งองค์ประกอบที่ต้องการละลายออกมาหมด ในระหว่างการหมักควรเขย่าหรือคนเป็นครั้งคราวเพื่อเพิ่มอัตราเร็วในการสกัด เมื่อครบกำหนดเวลาจึงกรองแยกกาก (marc) ออกจากน้ำยาสกัด (ภาพที่ 2.3) วิธีการสกัดนี้ใช้น้ำยาในการสกัดน้อย จึงประหยัดเนื่องจากเป็นวิธีที่ไม่ใช้ความร้อนจึงเหมาะกับการสกัดสารที่ไม่ทนความร้อน (รัตนา, 2547) ซึ่งจะทำการสกัดสาร ณ อุณหภูมิห้อง (Cunha *et al.*, 2004) แต่วิธีการสกัดนี้มักจะไม่สมบูรณ์เนื่องจากไม่ค่อยมีการเคลื่อนที่ของน้ำยาสกัด

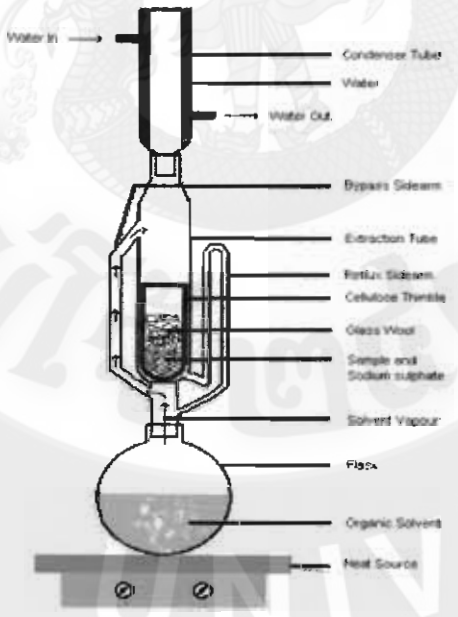



**ภาพที่ 2.3** การสกัดแบบมาเซเรชัน (maceration)

ที่มา : http://firstyear.chem.usyd.edu.au/prelab/i mages/E28extractionimage3.gif

**2.3.2 การสกัดแบบต่อเนื่อง (continous extraction)** เป็นวิธีการสกัดสารที่ใช้ความร้อนเข้าช่วย (รัตนา, 2547) และวิธีการสกัดแบบต่อเนื่องนี้จะสกัดสารตัวอย่างที่เป็นของแข็งโดยใช้สารละลาย นิยมใช้อุปกรณ์สกัดที่เรียกว่าซอกซ์เลดเอกซ์แทรกเตอร์ (soxhlet extractor) (ภาพที่ 2.4) ซึ่งการทำงานนั้นจะเป็นระบบปิดโดยใช้ตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ เมื่อได้รับความร้อนจากฮีทติงแมนเทิล (heating mantle) หรือหม้ออังไอน้ำ น้ำยาสกัดในภาชนะระเหยขึ้นไปแล้วกลั่นตัวลงมาในทิมเบอร์ (thimble) ซึ่งบรรจุตัวอย่างไว้ น้ำยาสกัดผ่านลงตัวอย่างซ้ำแล้วซ้ำอีกเรื่อยๆ จนกระทั่งองค์ประกอบในตัวอย่างถูกสกัดออกมา เมื่อน้ำยาสกัดในเอกซ์แทรกติงแชมเบอร์ (extracting chamble) สูงจนถึงระดับเกิดกาลักน้ำ สารสกัดจะไหลลงภาชนะวนเวียนเช่นนี้จนการสกัดสมบูรณ์

วิธีการสกัดแบบต่อเนื่องเหมาะกับการสกัดองค์ประกอบที่ทนความร้อนและใช้น้ำยาในการสกัดน้อยไม่สิ้นเปลือง แต่มีข้อเสียคือ ไม่เหมาะที่จะใช้กับองค์ประกอบที่ไม่ทนความร้อนและน้ำยาสกัดที่ใช้ไม่ควรเป็นของผสม เพราะจะเกิดการแยกตัวของตัวทำละลายแต่ละชนิดเนื่องจากจุดเดือดต่างกัน จะทำให้สัดส่วนของน้ำยาสกัดแตกต่างไปจากเดิมและผลการสกัดไม่ดีเท่าที่คาดเอาไว้ (รัตนา, 2547)




**ภาพที่ 2.4** ซอกซ์เลดเอกแทรกเตอร์ (soxhlet extractor)

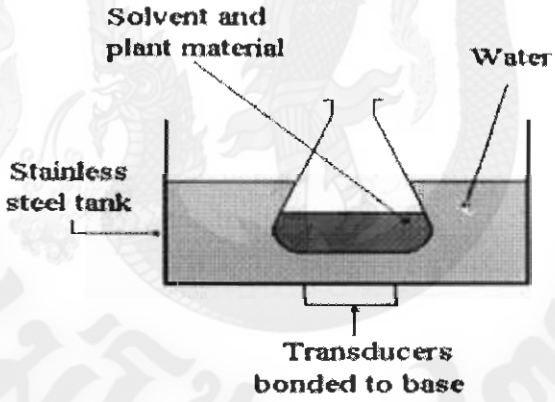
ที่มา : http://web2.slc.qc.ca/jmc/www/Chemweb/oldchemweb/extractionmethods.htm

**2.3.3 การสกัดแบบใช้คลื่นรังสีไมโครเวฟ (microwave assisted extraction, MAE)**

วิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้คลื่นรังสีไมโครเวฟในการให้ความร้อนแก่ตัวทำละลาย ตัวทำละลายจะแพร่ความร้อนไปสู่ตัวอย่างทำให้เกิดการแยกขององค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างไปสู่ตัวทำละลาย (Trusheva *et al.*, 2007) วิธีการสกัดแบบนี้เหมาะกับการสกัดองค์ประกอบที่ทนความร้อนและใช้น้ำยาในการสกัดน้อยไม่สิ้นเปลือง ใช้เวลาในการสกัดน้อยมาก

**2.3.4 การสกัดแบบใช้เครื่องล้างความถี่สูง (ultrasound sonicator extraction, UE)**

วิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้คลื่นเสียงในการทำปฏิกิริยากับตัวอย่างแล้วทำให้องค์ประกอบเคมีของตัวอย่างแพร่สู่ตัวทำละลาย (ภาพที่ 2.5) วิธีการสกัดแบบนี้ใช้เวลาในการสกัดน้อย เหมาะกับการสกัดองค์ประกอบที่ไม่ทนความร้อนและใช้น้ำยาในการสกัดน้อยไม่สิ้นเปลือง (Trusheva *et al.*, 2007)




**ภาพที่ 2.5** การสกัดแบบใช้เครื่องล้างความถี่สูง (ultrasound sonicator extraction, UE)
ที่มา : http://www.gpo.or.th/rdi/ html/ Ultrasound.html

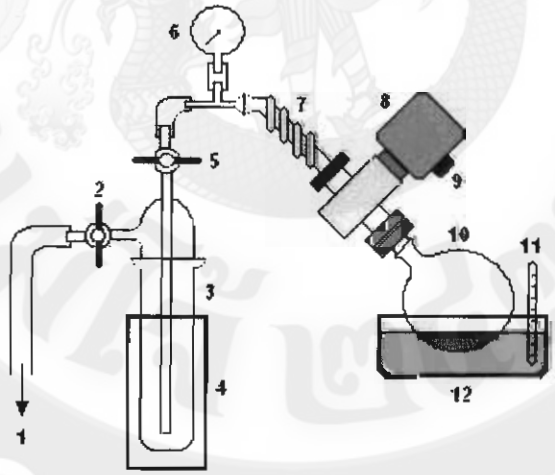
**2.4 การทำให้สารสกัดจากตัวอย่างให้เข้มข้น (preconcentration)**

สารสกัดอย่างหยาบที่ได้จะมีปริมาณมากและเจือจางทำให้นำไปแยกองค์ประกอบได้ไม่สะดวกและไม่มีประสิทธิภาพ จึงต้องนำมาทำให้มีความเข้มข้นเสียก่อนด้วยวิธีดังนี้ (รัดนา, 2547)

**2.4.1 การระเหย (free evaporation)** เป็นการนำตัวทำละลายออกจากน้ำยาสกัดโดยใช้ความร้อนจากหม้ออังไอน้ำ (water bath) วิธีนี้อาจทำให้สารสกัดสลายตัวได้เนื่องจากอุณหภูมิสูงจนเกินไป และหากใช้สารละลายอินทรีย์ในการสกัด การระเหยโดยใช้ความร้อน

โดยตรงบนแผ่นความร้อนอาจเกิดอันตรายได้ง่าย นอกจากนี้ควรคำนึงถึงอุณหภูมิที่จะทำให้เกิดการสลายตัวของสารสำคัญเมื่อใช้ความร้อน

**2.4.2 การกลั่นในสุญญากาศ** จัดเป็นวิธีที่นิยมมากที่สุดเป็นการระเหยเอาตัวทำละลายออกจากน้ำยาสกัดโดยการกลั่นที่อุณหภูมิต่ำ พร้อมทั้งลดความดันลงให้เกือบเป็นสุญญากาศ โดยใช้ปั๊มสุญญากาศ เครื่องมือนี้เรียกว่าโรตารีอีวาโพเรเตอร์ (rotary evaporator) (ภาพที่ 2.6) ซึ่งประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ 3 ส่วนคือ ภาชนะบรรจุสารสกัดอย่างหยาบที่จะกลั่น ส่วนคอนเดนเซอร์หรือส่วนควบแน่นไอสารละลาย และภาชนะรองรับสารละลายหลังจากการกลั่น โดยการสกัดอย่างหยาบซึ่งบรรจุอยู่ในภาชนะจะแช่อยู่ในหม้ออังไอน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิได้ และจะหมุนตลอดเวลาที่ทำงาน เพื่อให้มีการกระจายความร้อนอย่างทั่วถึงและสม่ำเสมอ ภาชนะบรรจุสารอย่างหยาบนี้จะต่อเข้ากับส่วนควบแน่น ซึ่งมีระบบทำความเย็นหล่อตลอดเวลา ปลายของส่วนควบแน่นจะมีภาชนะรองรับโดยทั้งระบบจะต่อเข้ากับระบบสุญญากาศ สารที่ระเหยออกจากภาชนะบรรจุควบแน่นที่คอนเดนเซอร์และหยดลงมาภาชนะรองรับสารละลายหลังการกลั่น ซึ่งสารละลายดังกล่าวสามารถนำไปทำให้บริสุทธิ์และสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้




**ภาพที่ 2.6** เครื่องโรตารีอีวาโพเรเตอร์ (rotary evaporator)

ที่มา : http://en.citizendium.org/images/3/3b/Rotary_Evaporation.png

**2.5 การกำจัดไข (wax extraction)**

ในสารสกัดที่ได้จากวิธีการสกัดต่างๆ นั้นจะมีไขปนมาด้วย ต้องมีการกำจัดไขออกโดยการนำไปแช่แข็งค้างคืนเพื่อที่จะทำให้ไขเกิดการจับตัวกันและตกตะกอนลงมาของไข จากนั้นนำไปกรองที่อุณหภูมิประมาณ 0 องศาเซลเซียส เพื่อกำจัดไขออกจากสารสกัด (Cunha *et al.* 2004)

**2.6 โครมาโทกราฟี** (chromatography) (สุภาพและเกสร, 2540)

โครมาโทกราฟีเป็นเทคนิคที่นิยมใช้มากในปัจจุบัน สำหรับทำสารให้บริสุทธิ์ แยกสารผสมออกจากกันและระบุ (identify) สารอินทรีย์และสารชีวเคมี เป็นต้นว่า amino acid, lipid, carbohydrate, alkaloid ฯลฯ คำว่า โครมาโทกราฟี แปลว่า การแยกออกเป็นสีๆ (the production of color scheme) ทั้งนี้เนื่องจาก Tswett ชาวรัสเซีย ผู้เริ่มใช้เทคนิคนี้เป็นคนแรกในปี ค.ศ. 1906 ได้แยกสารที่สกัดออกจากใบไม้ออกได้เป็นสีต่างๆ ในคอลัมน์ นอกจากใช้แยกสารที่มีสีได้แล้ว เทคนิคโครมาโทกราฟียังสามารถแยกสารที่ไม่มีสีได้อีกด้วย

วิธีทางโครมาโทกราฟีเกี่ยวข้องกับการแจกแจง (distribution) ของสารระหว่างสองเฟส โดยเฟสหนึ่งอยู่กับที่ เรียกว่า เฟสคงที่ (stationary phase) ส่วนอีกเฟสหนึ่งเคลื่อนที่ได้ เรียกว่า เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เราสามารถแบ่งโครมาโทกราฟีอย่างกว้างๆ ได้เป็น 2 พวก ตามลักษณะของเฟสที่เกี่ยวข้อง คือ

ก. โครมาโทกราฟีแบบดูดซับ (adsorption chromatography) ในกรณีนี้ เฟสคงที่เป็นของแข็ง เช่น อะลูมินาหรือซิลิกาเจล ส่วนเฟสเคลื่อนที่อาจเป็นแก๊สหรือเป็นของเหลวก็ได้ ตัวอย่างได้แก่ column chromatography, thin layer chromatography (TLC), gas-solid chromatography

ข. โครมาโทกราฟีแบบแบ่งส่วน (partition chromatography) ในกรณีนี้ เฟสคงที่เป็นของเหลว ส่วนมากมักจะเป็นน้ำซึ่งถูกพยุงอยู่ด้วยของแข็ง (supporter) ที่พรุน เช่น ดินเบา (kieselguhr) หรือเซลลูโลส (cellulose) ส่วนเฟสเคลื่อนที่อาจเป็นแก๊สหรือของเหลวก็ได้ ตัวอย่างได้แก่ paper chromatography, gas-liquid chromatography

เทคนิคทางโครมาโทกราฟีที่ทำการทดลองได้ง่ายและไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง เช่น

1. คอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography)
2. ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (thin layer chromatography, TLC)
3. เปเปอร์โครมาโทกราฟี (paper chromatography)

ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (TLC) วิธีนี้เราให้ตัวดูดซับที่เป็นของแข็งเป็นชั้นหรือเป็นฟิลม์บางๆ หนา 0.25-1 mm ติดอยู่บนแผ่นกระจก โดยมากมักจะใช้แผ่นกระจกไมโครสโคปสไลด์เพราะสะดวกและรวดเร็ว แล้วนำสารตัวอย่างที่จะแยกจำนวนเล็กน้อยไปจุด (spot) บนตัวดูดซับที่ใกล้ปลายกระจกข้างหนึ่ง โดยใช้หลอดรูเล็ก (capillary tube) เมื่อตัวทำละลายระเหยไปแล้ว สารจะติดอยู่บนตัวดูดซับ นำแผ่นสไลด์นี้ไปใส่ในภาชนะที่มีตัวทำละลายชนิดหนึ่ง (อาจเป็นตัวทำละลายผสมก็ได้) โดยให้ระดับของตัวทำละลายอยู่ต่ำกว่าจุดของสาร เมื่อปิดภาชนะเพื่อให้ภายในภาชนะอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย ตัวทำละลายจะซึมขึ้นมาข้างบนตามแนวดิ่งผ่านจุดที่มีสาร สารต่างๆ จะเคลื่อนที่ตามตัวทำละลายขึ้นมาด้วยอัตราเร็วที่ต่างกัน ขึ้นอยู่กับธรรมชาติของสารตัวอย่าง ตัวทำละลายและตัวดูดซับ

การที่จะทราบว่าสารที่ไม่มีสีเคลื่อนที่มาอยู่ตรงไหน ทำได้หลายวิธี เช่น ตรวจด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (ในกรณีที่รังสีนี้ทำให้สารนั้นเรืองแสงได้) หรือสเปรย์ด้วยรีเอเจนต์บางชนิดไปบนตัวดูดซับสำหรับตรวจหาสาร หรือเคลือบตัวดูดซับด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ เมื่อสารอยู่ที่ตำแหน่งใดตรงนั้นจะมืดเพราะสารไปบังการเรืองแสง นอกจากนั้นวิธีที่เป็นประโยชน์มากอีกวิธีหนึ่งก็คือ นำแผ่นสไลด์ที่มีสารนี้ไปใส่ในภาชนะปิดที่มีไอโอดีน สารอินทรีย์ส่วนมากจะเกิดสารเชิงซ้อนอย่างอ่อนที่ผันกลับได้ (reversible weak complex) กับไอโอดีนให้จุดที่มีสีน้ำตาล เวลาที่ใช้อาจเร็วเป็น 5-10 วินาที หรืออาจนานถึง 10-15 นาที แล้วแต่ว่าสารนั้นดูดกลืน (absorb) ไอโอดีนเร็วหรือช้า

ตัวดูดซับที่ใช้อาจเป็นซิลิกาเจลหรืออะลูมินา ในกรณีของซิลิกาเจลอำนาจในการดูดซับขึ้นอยู่กับปริมาณของน้ำที่มีด้วย ถ้ามีน้ำอยู่ด้วยมาก ความสามารถในการดูดซับจะลดลง ในการเตรียมแผ่นสไลด์ของตัวดูดซับ เรามักจะกวนซิลิกาเจลหรืออะลูมินากับน้ำจนเป็น slurry แล้วให้กระจายบนแผ่นสไลด์ให้ทั่วถึงอย่างสม่ำเสมอ แล้วนำแผ่นสไลด์ที่เคลือบแล้วนี้ไปก่อกัมมันต์ (activate) โดยทำให้ร้อน เช่น อังหลอดไฟฟ้า 60 วัตต์หรือนำไปใส่ในเตาอบที่อุณหภูมิประมาณ 100-120°C ประมาณ 10 นาที แผ่นสไลด์ที่เคลือบไว้นานๆ อาจสูญเสียกัมมันตภาพ (activity) ไปบ้าง ให้นำมาก่อกัมมันต์ใหม่ โดยอังหลอดไฟหรือเข้าเตาอบดังกล่าวแล้ว แต่ถ้าใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ระเหยง่าย เช่น คลอโรฟอร์ม เมื่อเคลือบตัวดูดซับลงบนแผ่นสไลด์เรียบร้อยแล้ว ปล่อยให้คลอโรฟอร์มระเหยไปจนหมด ก็นำแผ่นสไลด์นี้ไปใช้ได้ทันทีโดยไม่ต้องทำให้ร้อนก่อน

ตัวทำละลายที่ใช้ได้มีมาก ตัวทำละลายแต่ละชนิดจะทำให้อัตราเร็วในการแยกสารต่างๆ ออกจากตัวดูดซับหรืออำนาจการชะ (eluting power) ไม่เท่ากัน ตัวทำละลายสามัญที่ใช้เรียงตามลำดับของอำนาจการชะหรือสภาพมีขั้ว (polarity) จากน้อยไปหามาก คือ

1. petroleum ether หรือ hexane
2. cyclohexane
3. carbon tetrachloride
4. benzene

5. chloroform 6. ether

7. acetone 8. ethanol

9. methanol 10. water

11. organic acid

ถ้าต้องการตัวทำละลายที่มีอำนาจการชะพอเหมาะ อาจต้องผสมตัวทำละลายสองชนิดหรือมากกว่าเข้าด้วยกัน เบนซีนและคาร์บอนเททระคลอไรด์เป็นสารที่มีพิษ เวลาใช้ต้องระมัดระวังมาก

วิธีนี้ใช้แยกสารจำนวนน้อยออกจากกันและใช้สำหรับระบุสาร เพราะเหตุว่าถ้าใช้ตัวดูดซับเดียวกัน ใช้ระบบตัวทำละลายที่เหมือนกัน ที่อุณหภูมิและภาวะเดียวกัน สารหนึ่งๆ จะมีค่า "rate of flow" หรือ ค่า $R_f$ ($R_f$ value) คงที่

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

2.6.1 การศึกษาพรอพอลิสด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Gomez-Caravaca *et al.*, 2006)

ในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพรอพอลิสด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีนั้น stationary phase และ mobile phase แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับโครงสร้างขององค์ประกอบของสารในพรอพอลิสนั้นๆ แต่อย่างไรก็ตาม siliga gel (precoated solvent) นิยมนำมาใช้เป็น stationary phase เพื่อใช้ในการแยกสารกลุ่ม apolar flavonoid เช่น flavonols และ isoflavonols ขณะที่ mobile phase ในการศึกษาสารสกัดพรอพอลิสมีความหลากหลายซึ่งได้แก่ ethanol/water (55:45, v/v) petroleum ether/ethyl acetate (70:30), petroleum ether/ acetone/formic acid (35:10:5), chloroform/ethyl acetate (60:40), toluene/chloroform/ acetone (40:25:35), *n*-hexane/ethyl acetate/acetic acid (31:14:5) หรือ (60:40:3) และ chloroform/methanol/formic acid (44.1:3:2.35)

การสังเกตจุดของสาร (visualization) สามารถทำได้โดยการมองภายใต้คลื่นแสง UV และสามารถใช้สารหลายชนิดเพื่อทำให้สามารถสังเกตการเคลื่อนที่ได้

## 2.7 คุณสมบัติและสรรพคุณของพรอพอลิส

### 2.7.1 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อไวรัส และเชื้อรา

เนื่องจากในปัจจุบันนี้จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตหรือเพิ่มปริมาณมากขึ้น ซึ่งทำให้เป็นปัญหาสำคัญอย่างมากทางด้านการแพทย์ จากงานวิจัยของ Cushnie and Andrew (2005) พบว่าสารประกอบฟลาโวนอยด์ในพรอพอลิสมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโต หรือการเพิ่มปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย เชื้อไวรัส และเชื้อรา โดยป้องกันไม่ให้แพร่พันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Kujumgivev *et al*., 1999)

### 2.7.2 ฤทธิ์ต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน

สารประกอบฟลาโวนอยด์ในพรอพอลิสมีคุณค่าสูงในการบำรุงรักษาหลอดเลือดฝอยให้อยู่ในสภาพที่ดี โดยเสริมประสิทธิภาพการทำงานในหลอดเลือด ปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นสาเหตุให้ร่างกายเสื่อมโทรม แก่เร็ว เพราะกลุ่มอนุมูลอิสระในเซลล์จะถูกยึดไว้ ไม่สามารถปฏิบัติหน้าที่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังช่วยขับสารพิษที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย อันเกิดจากการผลิตของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดด้วย (Cushnie and Andrew, 2005)

### 2.7.3 ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory)

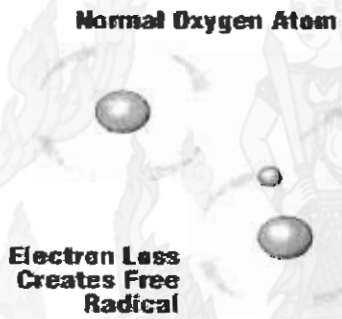
ลดการอักเสบของเซลล์เยื่อหุ้มสมอง ดังนั้นจึงลดอัตราการเกิดโรคพาร์กินสันและโรคความจำเสื่อม เพราะสาเหตุหลักของทั้งสองโรคนี้เกิดจากการอักเสบของเซลล์เยื่อหุ้มสมอง กลไกที่ฟลาโวนอยด์ลดการอักเสบโดยการทำให้เนื้อเยื่อเซลล์หุ้มสมองที่แข็งอ่อนตัวลง (Mankhetkorn, 2004)

จากฤทธิ์ดังกล่าวจะเห็นได้ว่าพรอพอลิสเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และมีประโยชน์ในด้านต่างๆ มากมาย อีกทั้งยังมีสรรพคุณทางการแพทย์ เช่น มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อไวรัส และเชื้อรา ดังนั้นหากมีการศึกษาและสกัดสารจากพรอพอลิสมาใช้ประโยชน์ในด้านการปรับปรุงพัฒนา จะสามารถแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นกับสุขภาพได้

2.8 **อนุมูลอิสระ** (free radicals)

2.8.1 **ความหมายของอนุมูลอิสระ** (โอภา วัชรคุปต์และคณะ, 2550)

อนุมูลอิสระ หรือ อนุมูล คือ อะตอม โมเลกุลหรือ สารประกอบที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวอยู่ในออร์บิทัลวงนอกสุดที่มีระดับพลังงานสูง ซึ่งรวมถึงอะตอมของไฮโดรเจนและอิออนของโลหะทรานซิชันส่วนใหญ่ นอกจากนี้ยังรวมถึงโมเลกุลของออกซิเจน แม้ว่ามีอิเล็กตรอนจำนวน 2 อิเล็กตรอน แต่ละอิเล็กตรอนแยกกันอยู่เป็นอิเล็กตรอนเดี่ยวในแต่ละออร์บิทัล และการหมุนรอบตัวของอิเล็กตรอนทั้งสองจะสปินแบบคู่ขนานในทิศทางเดียวกัน (ภาพที่ 2.7)




**ภาพที่ 2.7** อนุมูลอิสระ (free radicals)

ที่มา : http://www.knowcancer.com/blog/wp-content/uploads/2009/07/antioxidants-free-radical-body-fasting-guide.jpg

อนุมูลอิสระมีทั้งที่อยู่ในสภาวะเป็นกลางทางไฟฟ้า และอนุมูลในสภาวะที่มีประจุไฟฟ้า โดยมีทั้งประจุบวกและประจุลบ สัญลักษณ์ทางเคมีของอนุมูลอิสระคือ อิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลซึ่งจะแสดงด้วยจุดในตำแหน่งข้างบนของสัญลักษณ์ทางเคมี เช่น อนุมูล $A^{\bullet}$ อนุมูล $A^{\bullet-}$ และอนุมูล $A^{+\bullet}$ โดยเฉพาะอนุมูลที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะไวต่อการเกิดปฏิกิริยามากกว่าอนุมูลที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เนื่องจากอิเล็กตรอนเดี่ยวจะไม่เสถียรและพยายามจับคู่กับอิเล็กตรอนเดี่ยวอื่น ดังนั้นอนุมูลอิสระจึงมีคุณสมบัติเฉพาะ คือ มีความไวสูงในการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นๆ แต่อย่างไรก็ตามอนุมูลอิสระที่มีความเสถียรก็มีแต่มีจำนวนน้อยชนิด ตัวอย่างอนุมูลอิสระที่มีความสำคัญทางชีวภาพ ได้แก่ อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ($O_2^{\bullet-}$) อนุมูลไฮดรอกซี ($^{\bullet}OH$) อนุมูลอิสระเหล่านี้จัดเป็นอนุมูลที่มีความไวในการเกิดปฏิกิริยาสูงมาก

การเกิดอนุมูลอิสระมีหลายกลไกที่แตกต่างกันดังนี้

1. การแตกของพันธะโควาเลนท์แบบโฮโมไลซิส (Homolysis)

$$A:B \longrightarrow A^{\bullet} + B^{\bullet}$$

2. การเพิ่มอิเล็กตรอน 1 ตัวให้แก่อะตอมที่เป็นกลาง ทางไฟฟ้า

$$A + e^{-} \longrightarrow A^{-\bullet}$$

3. การสูญเสียอิเล็กตรอน 1 ตัวจากอะตอมที่เป็นกลาง ทางไฟฟ้า

$$A \longrightarrow A^{+\bullet} + e^{-}$$

**2.8.2 ชนิดของอนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง**

อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้องกับอนุมูลที่มีบทบาททางชีววิทยา แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive oxygen species, ROS) กลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive nitrogen species, RNS) และกลุ่มที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive chlorine species, RCS) นอกจากนี้การศึกษาและวิจัยพบว่ามีสารหลายชนิดที่ไม่อยู่ในสภาวะอนุมูล แต่มีความเกี่ยวข้องหรือเป็นผลผลิตของอนุมูล และมีความไวต่อปฏิกิริยาสูง สารเหล่านี้มีทั้งที่เป็นสารที่ให้กำเนิดอนุมูล เนื่องจากมีความคงตัวต่ำ สลายตัวได้ง่าย เช่น โอโซน หรือสารที่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นเกิดเป็นอนุมูล เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ รวมถึงสารที่เป็นผลผลิตของอนุมูลที่มีอันตรายสูง ได้แก่ เปอร์ออกซีไนเตรท ซึ่งเรียกโดยรวมว่าสารไวต่อปฏิกิริยา (reactive species, RS)

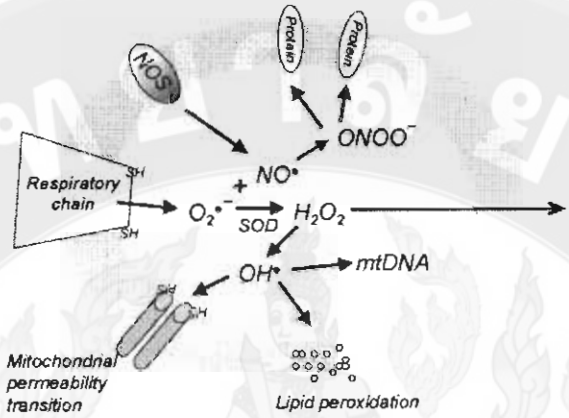
**2.8.3 อนุมูลอิสระในระบบของสิ่งมีชีวิต**

การเกิดอนุมูลอิสระในสิ่งมีชีวิตเกิดจากการเผาผลาญของเซลล์ในการใช้ออกซิเจน อนุมูลซุปเปอร์แอนอิออน ($O_2^{-\bullet}$) อนุมูลไฮดรอกซี ($^{\bullet}OH$) เป็นอนุมูลที่พบมากที่สุดในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต สาเหตุที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระมีหลายสาเหตุดังนี้

2.8.3.1 ไมโตคอนเดรียทำงานผิดปกติ

ไมโตคอนเดรียทำหน้าที่สร้างพลังงาน ATP โดยกระบวนการฟอสโฟริเลชันซึ่งจำเป็นต้องใช้ออกซิเจน โดยปกตินั้นกระบวนการสร้างพลังงานในไมโตคอนเดรียนี้จะทำให้เกิดอนุมูลซุปเปอร์แอนอิออน ($O_2^{-\bullet}$) อยู่แล้ว แต่มีปริมาณไม่มากร่างกายสามารถกำจัดได้โดยเอนไซม์และสารต้านออกซิเดชัน แต่อย่างไรก็ตาม การเกิดออโตออกซิเดชัน (autooxidation) ในองค์ประกอบต่างๆภายในเซลล์ เช่น เยื่อหุ้มเซลล์ เยื่อหุ้มนิวเคลียส เอนโดพลาสมิกเรติคิวลัม และ เปอร์รอกซิโซมนั้น สามารถทำให้เกิดอนุมูลซุปเปอร์แอนอิออน ($O_2^{-\bullet}$) และส่งผลเสียต่อไมโตคอนเดรียโดยเฉพาะดีเอ็นเอของไมโตคอนเดรีย โดยความเสียหายจะเพิ่มขึ้นตามเวลาหรืออายุในแบบทวีคูณ ส่งผลทำให้โปรตีนซึ่งมีบทบาทสำคัญในการถ่ายทอดอิเล็กตรอน เกิดความ

ผิดปกติ จึงทำให้เกิดการรั่วไหลของอนุมูลซุปเปอร์แอนอิออน ($O_2^{\cdot-}$) เพิ่มมากขึ้นเกินกว่าที่กระบวนการป้องกันจะขจัดได้ (ภาพที่ 2.8)




**ภาพที่ 2.8** อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในไมโตคอนเดรีย

ที่มา : http://www.aapsj.org/view.asp?art=aapsj080362

นอกจากนี้อนุมูลซุปเปอร์แอนอิออน ($O_2^{\cdot-}$) สามารถออกซิไดส์เอนไซม์ที่มีกลุ่ม [4Fe-4S] ทำให้เกิดเหล็กในรูปอิสระ ($Fe^{2+}$) ซึ่งเป็นตัวเร่งให้เกิดอนุมูลไฮดรอกซีจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยปฏิกิริยาเฟนตัน (Fenton reaction) และเกิดอนุมูลไฮดรอกซี ($^{\cdot}OH$) โดยปฏิกิริยาฮาเบอร์ไวส์ (Haber-Weiss) จากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้

ปฏิกิริยาเฟนตัน (Fenton reaction)

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + {}^{\cdot}OH + OH^{-}$$

ปฏิกิริยาฮาเบอร์ไวส์ (Haber-Weiss)

$$O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \longrightarrow O_2 + {}^{\cdot}OH + OH^{-}$$

2.8.3.2 กระบวนการเมตาบอลิซึม

อนุมูลซุปเปอร์แอนอิออน ($O_2^{\cdot-}$) สามารถเกิดขึ้นโดยกระบวนการเมตาบอลิซึมที่ใช้เอนไซม์ ได้แก่ กระบวนการเมตาบอลิซึมของ arachidonic acid โดยเอนไซม์ cyclooxygenase (COX) ไปเป็น prostraglandin และ leukotriene กระบวนการเมตาบอลิซึมของ xanthine และ hypoxanthine โดยเอนไซม์

xanthine oxidase ไปเป็น uric acid และการทำงานเอนไซม์ NADPH oxidase แต่อย่างไรก็ตามการเกิดอนุมูลซุปเปอร์แอนอิออน ($O_2^{\cdot-}$) จากกระบวนการเหล่านี้นับว่ามีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับการผิดปกติของไมโตคอนเดรีย และไม่เกิดอันตรายแก่เซลล์หากระบบกำจัดอนุมูลทำงานเป็นปกติ

1. กรดอะมิโนที่มีฤทธิ์กระตุ้นเซลล์ประสาทและระบบสื่อประสาท

กรดกลูตามิกและกรดแอสปาร์ติก รวมทั้งอนุพันธ์ของกรดอะมิโนทั้งสองนี้ มีฤทธิ์กระตุ้นเซลล์ประสาทและระบบสื่อประสาท เมื่อมีกรดอะมิโนเหล่านี้ในปริมาณที่มากผิดปกติ จะสามารถทำให้เกิดปรากฏการ์ณต่อเนื่อง นำไปสู่ความเสียหายแก่เซลล์ประสาทโดยตรง และอาจจะทำให้เซลล์นั้นตายในที่สุด

กรดกลูตามิกเมื่อจับกับตัวรับแล้วนั้นจะมีผลทำให้แคลเซียมเพิ่มขึ้น การเพิ่มขึ้นของแคลเซียมภายในเซลล์นำไปสู่การเกิดอนุมูลอิสระหลายทิศทาง ซึ่งกระบวนการสำคัญหนึ่งคือแคลเซียมกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเทส (NOS) ทำให้ไนตริกออกไซด์ในเซลล์มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น และสามารถเข้าสู่ไมโตคอนเดรียทำให้เกิดอนุมูลอิสระได้ หากไนตริกออกไซด์มีปริมาณสูง จะเป็นพิษโดยทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับ อนุมูลซุปเปอร์แอนอิออน ($O_2^{\cdot-}$) เกิดเป็นเปอร์ออกซีไนเตรท ($ONOO^-$) ซึ่งจัดเป็น reactive species ที่มีความเป็นพิษสูง สามารถทำปฏิกิริยาต่อไปเกิดเป็นอนุมูลไฮดรอกซี ($^{\cdot}OH$) ได้

2. เมตาบอลิซึมของสารสื่อประสาท

เมตาบอลิซึมของสารสื่อประสาทในสมอง เช่น โดพามีน ทำให้เกิดอนุมูลและสารที่เป็นพิษ พบว่าในภาวะเนื้อเยื่อหรืออวัยวะขาดเลือด หรือสภาวะมีระดับออกซิเจนต่ำ โดพามีนมีปริมาณเพิ่มขึ้น โดพามีนจะถูกออกซิไดส์แล้วให้ผลผลิตเป็นอนุมูลอิสระ สารประกอบควิโนน ซึ่งโดพามีนถูกเปลี่ยนเป็นสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้โดยเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส (MAO) อีกด้วย ซึ่งส่งผลทำให้เซลล์สมองถูกทำลายได้

2.8.3.3 สารพิษต่อเซลล์ประสาท (neurotoxin)

ความเป็นพิษหรือฤทธิ์ทำลายเซลล์ประสาทของสารจำนวนมากมีสาเหตุจากการเกิดอนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้องที่มีความไวสูง จึงนำไปสู่สมมติฐานที่ว่าการเกิดอนุมูลอิสระอาจเป็นกลไกในการออกฤทธิ์ช่วงสุดท้ายของสารพิษกลุ่มนี้ สารที่ทำให้เกิดภาวะออกซิไดส์ในสมองได้แก่ ปรอท โทลูอีน 6-OHDA สารไซยานายด์ และแมงกานีส เป็นต้น

2.8.3.4 ภาวะขาดเลือด (Ischemia/Reperfusion, I/R)

ปัจจุบันไมโตคอนเดรียถือว่าเป็นจุดเริ่มต้นสำคัญของความผิดปกติเมื่อเกิดภาวะขาดเลือด

เฉพาะที่ เมื่อไมโตคอนเดรียมีความผิดปกติ ทำให้ระดับ ATP ในเซลล์ลดลง ATP ที่มีอยู่แล้วถูกเปลี่ยนไปเป็น AMP อย่างรวดเร็วโดยปฏิกิริยา dephosphorylation AMP ถูกเมตาบอไลน์ต่อไปเปลี่ยนเป็นอะดีโนซีนและไฮโปแซนทีนตามลำดับ

การที่ ATP ลดลงจะส่งผลทำให้แคลเซียมภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้น ซึ่งทำให้แคลเซียมกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสให้เปลี่ยนแอนไซม์แซนทีน ดีไฮโดรจีเนสไปเป็นแอนไซม์แซนทีน ออกซิเดส ในกรณีที่เกิดภาวะขาดเลือดชั่วขณะและเซลล์หรือเนื้อเยื่อยังไม่ตายและมีภาวะตามมาคือมีเลือดและออกซิเจนมาเลี้ยงใหม่ (reperfusion) ทำให้สารไฮโปรแซนทีนถูกเปลี่ยน เป็นแซนทีนและกรดยูริค ทั้งสารไฮโปรแซนทีและแซนทีน เมื่อมีออกซิเจนและแซนทีนออกซิเดสร่วมอยู่ด้วย จะกระตุ้นการเกิดอนุมูลซุปเปอร์แอนไอออน ($O_2^{-\bullet}$)

อนุมูลซุปเปอร์แอนไอออน ($O_2^{-\bullet}$) มีความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทโดยตรงและสามารถเริ่มต้นปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระที่เป็นพิษรุนแรงยิ่งขึ้น อนุมูลซุปเปอร์แอนไอออน ($O_2^{-\bullet}$) ทำปฏิกิริยากับไนตริกออกไซด์อย่างรวดเร็ว ได้เป็นเปอร์ออกซีไนไตรท ($ONOO^-$) ซึ่งจะทำให้เกิดอันตรายกับเซลล์และเนื้อเยื่ออวัยวะสำคัญคือ หัวใจ สมอง ตับ ปอด เป็นต้น ดังนั้นแนวทางการป้องกันจึงมุ่งเน้นการใช้สารต้านอนุมูลควบคุมปริมาณ อนุมูลซุปเปอร์แอนไอออน ($O_2^{-\bullet}$) และควบคุมปริมาณ เปอร์ออกซีไนไตรท ($ONOO^-$) ด้วยสารยับยั้งเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ซิเทส

2.8.3.5 ภาวะช็อกและการอักเสบ

ในภาวะช็อกไซโตไคน์ในกระบวนการอักเสบจะถูกกระตุ้นก่อให้เกิดอนุมูลอิสระ เช่น อนุมูลซุปเปอร์แอนไอออน ($O_2^{-\bullet}$) ทำปฏิกิริยากับไนตริกออกไซด์ ได้เป็นเปอร์ออกซีไนไตรท ($ONOO^-$) ซึ่งส่งผลทำให้เกิดผลเสียกับส่วนต่างๆของเซลล์

**2.8.4 อันตรายจากอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์**

ความเสียหายหรืออันตรายที่เกิดขึ้นจากอนุมูลซุปเปอร์แอนไอออน ($O_2^{-\bullet}$) ซึ่งเป็นอนุมูลเริ่มแรกที่เกิดขึ้นในเซลล์ แบ่งได้เป็น ความเสียหายหรืออันตรายที่เกิดโดยตรง และความเสียหายหรืออันตรายที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาลูกโซ่ โดยมีอนุมูลซุปเปอร์แอนไอออน ($O_2^{-\bullet}$) เป็นอนุมูลเริ่มต้น จากปฏิกิริยาลูกโซ่จะทำให้ได้อนุมูลชนิดอื่นรวมทั้งสารที่มีความไวสูงกว่าเดิมเกิดขึ้น นอกจากจะทำให้อนุมูลอิสระมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นแล้ว ฤทธิ์ความแรงของอนุมูลและสารที่เกิดจากปฏิกิริยาลูกโซ่ยังสูงขึ้นและอันตรายยิ่งขึ้นด้วย

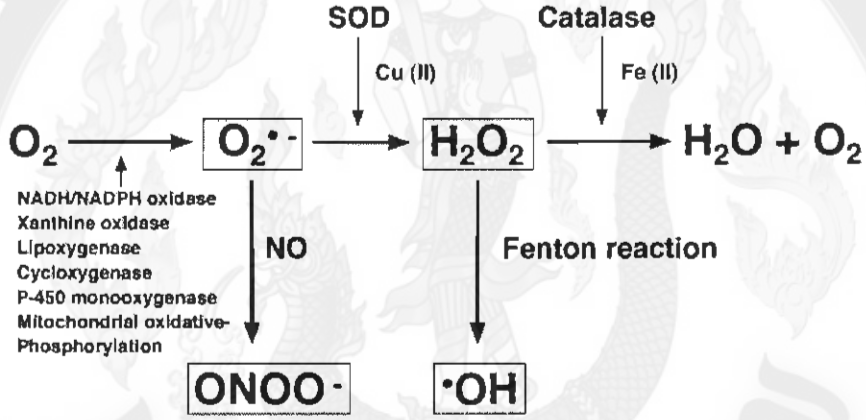
2.8.4.1 อันตรายที่เกิดโดยตรงจากอนุมูลซุปเปอร์แอนไอออน ($O_2^{-\bullet}$)

ความเป็นพิษของอนุมูลซุปเปอร์แอนไอออน ($O_2^{-\bullet}$) เกิดขึ้นได้โดยตรงกับสารชีวโมเลกุลต่างๆ เช่น ลิพิด สารสื่อประสาทกลุ่ม cathecholamine และดีเอ็นเอ เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถลดประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ชนิดต่างๆที่ทำหน้าที่ต้านออกซิเดชันได้ด้วย เช่น เอนไซม์คาตาเลส เอนไซม์กลูตาไทโอน

เปอร์ออกซิเดส เป็นต้น อนุมูลซุปเปอร์แอนอิออน ($O_2^{\cdot-}$) มีบทบาทสำคัญในการก่อให้เกิดการอักเสบและการปวด ทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรังอันนำไปสู่การบาดเจ็บของเซลล์ โดยมีกลไกหลากหลายเช่น ทำให้เซลล์บุผนังหลอดเลือดเสียหาย มีคุณสมบัติเปลี่ยนไป ควบคุมโมเลกุลที่ทำหน้าที่ในการจับและเกาะกัน เป็นต้น

2.8.4.2 อันตรายจากอนุมูลหรือสารที่เกิดจากอนุมูลซุปเปอร์แอนอิออน ($O_2^{\cdot-}$) เป็นอนุมูลเริ่มต้น

อนุมูลและสารที่เกิดจากอนุมูลซุปเปอร์แอนอิออน ($O_2^{\cdot-}$) เป็นอนุมูลเริ่มต้น ได้แก่ อนุมูลไฮดรอกซีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ เปอร์ออกซีไนเตรท สารเหล่านี้มีความไวสูงและมีฤทธิ์สูงกว่าอนุมูลเริ่มต้น (ภาพที่ 2.9)




**ภาพที่** 2.9 อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์แอนอิออนเป็นอนุมูลเริ่มต้นของอนุมูลอิสระอื่นๆ

ที่มา : http://www.chinaphar.com/1671-4083/25/977.htm

อนุมูลไฮดรอกซี (•OH)

เป็นอนุมูลที่มีความรุนแรงและไวในการทำปฏิกิริยา จึงมีความเป็นพิษหรืออันตรายต่อเซลล์มากกว่าอนุมูลตั้งต้น มีผู้เสนอปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลไฮดรอกซี (•OH) 2 ปฏิกิริยาคือ ฮาร์เบอร์และไวน์กล่าวว่าอนุมูลไฮดรอกซี (•OH) เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง อนุมูลซุปเปอร์แอนอิออน ($O_2^{\cdot-}$) และ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เมื่อมีอิออนของโลหะทรานซิชั่นทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เรียกปฏิกิริยานี้ว่าปฏิกิริยาฮาเบอร์ไวส์ (Haber-Weiss)

ปฏิกิริยาฮาเบอร์ไวส์ (Haber-Weiss)

$$O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \longrightarrow O_2 + {}^{\cdot}OH + OH^-$$

ปฏิกิริยาชนิดที่สองคือ ปฏิกิริยาเฟนตัน (Fenton reaction) ซึ่งกล่าวว่าธาตุเหล็กในร่างกายในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ปฏิกิริยาเฟนตัน (Fenton reaction)

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + {}^{\bullet}OH + OH^{-}$$

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ($H_2O_2$)

เอนไซม์ SOD ทำหน้าที่เปลี่ยนอนุมูล $O_2^{-\bullet}$ ให้เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ($H_2O_2$) ซึ่งสามารถเป็นได้ทั้งสารออกซิไดส์และสารรีดิวส์แต่มีความไวต่ำที่ pH ของร่างกาย ดังนั้น ดีเอ็นเอ ลิพิดและโปรตีนส่วนใหญ่ไม่ถูกออกซิไดส์ในหลอดทดลองด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ระดับมิลลิโมลาร์ แต่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บางชนิดโดยตรง เช่น เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับหมู่ไทออล (-SH) ที่อยู่ในบริเวณที่ใช้จับกับซับสเตรตของเอนไซม์ glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ SOD ทั้งสองชนิดได้แก่ CuZnSOD และ FeSOD นอกจากนี้ยังสามารถทำให้อิออนเหล็กในชีวโมเลกุล เช่น ไมโอโกลบิน ฮีโมโกลบิน และไซโตโครมซี เสื่อมสภาพจากการที่อิออนเหล็กหลุดออกมาได้เช่นเดียวกัน

เปอร์ออกซีไนเตรท ($ONOO^{-}$)

เป็นสารออกซิไดส์ที่แรงเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาระหว่างไนตริกออกไซด์กับอนุมูลซุปเปอร์แอนอิออน ($O_2^{-\bullet}$) เมื่อเกิดขึ้นแล้วจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ร่างกายมาก เช่นก่อให้เกิดอาการอักเสบ ทำให้โปรตีนต่างๆ ผิดปกติสูญเสียสภาพการทำงาน มีผลต่อเอนไซม์พรอสทาไซคลินที่มีบทบาทต่อกระบวนการสร้างสารย่อยลิ่มเลือดและสารสื่อที่ทำให้หลอดเลือดคลายตัว

**2.8.5 บทบาทของอนุมูลอิสระกับการเกิดโรคและการป้องกัน**

ลิพิด โปรตีน และดีเอ็นเอ เป็นชีวโมเลกุลที่ถูกอนุมูลอิสระทำให้เกิดความเสียหาย ทั้งนี้เพราะโมเลกุลเหล่านี้มีอิเล็กตรอนหรืออะตอมไฮโดรเจนที่หลุดออกได้ง่าย ทำให้อนุมูลอิสระเข้าไปทำปฏิกิริยาโดยเข้าจับคู่กับอิเล็กตรอนของชีวโมเลกุลหรือ ดึงอิเล็กตรอนหรืออะตอมไฮโดรเจนออกจากโมเลกุลนั้นๆ กล่าวคือ โมเลกุลลิพิด โปรตีน และดีเอ็นเอสามารถถูกออกซิไดส์โดยอนุมูลอิสระ ซึ่งทำให้คุณสมบัติและทำงานของชีวโมเลกุลเปลี่ยนไป เกิดความบกพร่องหรือถูกทำลาย อันเป็นสาเหตุของการเกิดโรค

ลิพิดสามารถถูกออกซิไดส์ได้โดยอนุมูลเรียกว่า ลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน เป็นกระบวนการที่กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวและฟอสโฟลิพิดเกิดการเสื่อมสภาพหรือเสียสภาพจากการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ ทำให้เกิดลิพิด

เปอร์ออกไซด์ขึ้นในเยื่อหุ้มเซลล์ ลิพิดในเลือด และในของเหลวของร่างกาย นอกจากนี้ทำให้เกิดการตายของเซลล์ และทำให้เกิดการเสื่อมสลายได้สารประกอบจำนวนมาก ได้แก่ ไฮโดรคาร์บอนต่างๆ เช่น อีทีน อีเทน และเพนเทน เป็นต้น รวมถึง คีโตน อัลดีไฮด์ โดยอัลดีไฮด์ที่เป็นผลผลิตจากการเสื่อมสลายที่เกิดขึ้นที่สำคัญ คือ มาลอนอัลดีไฮด์ (MDA) ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยากับชีวโมเลกุลต่างๆในร่างกายได้

ดีเอ็นเอ สามารถเกิดความเสียหายจากอนุมูลอิสระได้เช่นกัน และเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงชักนำให้พัฒนากลายเป็นมะเร็งได้ อนุมูลอิสระสามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของดีเอ็นเอเช่น การจับคู่เบสในดีเอ็นเอผิด การจัดเรียงนิวคลีโอไทด์ผิด การหายไปของนิวคลีโอไทด์หรือดีเอ็นเอบางส่วน การมีนิวคลีโอไทด์บางส่วนเข้าสอดแทรกและการเพิ่มขึ้นของดีเอ็นเอ มีผลทำให้เกิดการกลายพันธุ์ ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นในเซลล์และทำให้เกิดความเสียหายกับดีเอ็นเอได้แก่ การเติมหมู่เมทิล การกำจัดหมู่พิวรีน และการกำจัดหมู่อะมิโน เป็นต้น

โปรตีน สามารถถูกออกซิไดส์โดยอนุมูลอิสระได้เช่นกัน โปรตีนในเซลล์มีบทบาทสำคัญเช่นทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา การขนส่งสารต่างๆในเซลล์ เป็นตัวรับและสารสื่อประสาท รวมทั้งควบคุมการเจริญเติบโตและพัฒนาการของเซลล์ การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของโปรตีน ทำให้โปรตีนเสียสภาพ เอนไซม์ ตัวรับและสารสื่อประสาทต่างๆ ซึ่งมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบไม่สามารถทำงานได้ตามปกติหรือมีประสิทธิภาพการทำงานลดลง กลไกการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนจากอนุมูลอิสระ เช่น การเปลี่ยนฮิสทิดีนเป็นออกโซฮิสทิดีน การเปลี่ยนเมทไทโอนีนเป็นเมทไทโอนีนซัลฟอกไซด์ เป็นต้น

**อนุมูลอิสระกับการเกิดโรค**

อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการเผาผลาญในร่างกายและหลุดลอดออกมาทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันก่อให้เกิดความเสียหาย และมีผลกระทบโดยตรงต่อเยื่อหุ้มเซลล์ โปรตีน และดีเอ็นเอ โดยปกติแล้วร่างกาย มีขบวนการป้องกันโดยเอนไซม์ SOD เอนไซม์ GPx และเอนไซม์ CAT ทำหน้าที่กำจัดอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์และอนุมูลเปอร์ออกไซด์ ก่อนที่อนุมูลทั้งสองจะทำปฏิกิริยาต่อโดยมีโลหะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้เกิดอนุมูลหรือสารที่มีฤทธิ์รุนแรงขึ้นกว่าเดิม อย่างไรก็ตามอนุมูลหรือสารที่มีฤทธิ์รุนแรงจากปฏิกิริยาลูกโซ่เปอร์ออกซิเดชันเริ่มต้น อาจจะมีอนุมูลที่รอดพ้นจากการทำลายโดยเอนไซม์ข้างต้น ซึ่งก็จะถูกทำลายโดยสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

แต่อย่างไรก็ตามความไม่สมดุลของการเกิดอนุมูลอิสระทำให้มีอนุมูลมากเกินสมดุล และเกิดภาวะที่เซลล์และร่างกายถูกออกซิไดส์เกินสมดุล ภาวะดังกล่าวมีบทบาทต่อการเกิดโรคต่างๆ มากกว่า 100 โรค เช่น ภาวะขาดเลือดชั่วขณะที่สมองและหัวใจ โรคเกี่ยวกับการเสื่อมของประสาท โรคภูมิแพ้ โรคมะเร็ง เป็นต้น ปริมาณอนุมูลอิสระที่ไม่สมดุลยังสัมพันธ์กับลักษณะโรคหรืออาการ

ผิดปกติอื่นๆ คือโรคอัลไซเมอร์ โรคพาร์กินสัน อาการสมองและไขสันหลังอักเสบ โรคเนื้องอกเรื้อรัง Down's syndrome โรคตับอักเสบ เป็นต้น

**2.8.6 การป้องกันอันตรายและความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ**

เซลล์และร่างกายมีกลไกเพื่อควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระไม่ให้สูงจนเกิดอันตราย กลไกสำคัญที่ทำหน้าที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระมีกลไกหลัก 3 กลไก ทำหน้าที่ลดผลกระทบที่เป็นอันตรายของอนุมูลต่อเซลล์ ในสภาวะปกติกลไกเหล่านี้ถือว่าเพียงพอต่อการรักษาปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุลได้ แต่หากเกิดความผิดปกติกลไกป้องกันเหล่านี้บกพร่องไม่สามารถควบคุมภาวะสมดุลได้ จะนำไปสู่ภาวะที่อนุมูลและสารออกซิแดนท์มีมากเกินสมดุล (oxidative stress) และเกิดโรคต่างๆขึ้นในร่างกายได้

กลไกสำคัญที่ทำหน้าที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุลได้แก่

1. เอนไซม์

ในระดับเซลล์เอนไซม์เป็นกลไกสำคัญขั้นแรกที่ทำหน้าที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุล เอนไซม์ที่สำคัญได้แก่

เอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (SOD) ทำหน้าที่ขจัดอนุมูลเริ่มแรกในร่างกายคือ อนุมูลซุปเปอร์แอนอิออน ($O_2^{-\bullet}$) โดยเร่งปฏิกิริยาดิสมิวเตสในการเปลี่ยนอนุมูล $O_2^{-\bullet}$ ให้เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และจะถูกกำจัดต่อโดยเอนไซม์คาตาเลสและเอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส

$$2O_2^{-\bullet} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

เอนไซม์คาตาเลส (CAT) เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในเปอร์รอกซิโซม มีฮีมเป็นองค์ประกอบ ทำหน้าที่เปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไปเป็นโมเลกุลของน้ำและออกซิเจน

$$H_2O_2 + 2H^+ \xrightarrow{CAT} H_2O + O_2$$

เอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส (GPx) เป็นเอนไซม์ที่มีธาตุซิลีเนียมเป็นองค์ประกอบสำคัญอยู่ในโครงสร้างของเอนไซม์ ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยารีดักชันของสารประกอบไฮโดรเปอร์ออกไซด์ ได้แก่ ลิพิดเปอร์ออกไซด์ (ROOH) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยมีการออกซิไดส์กลูทาไทโอน (GSH) ร่วมในปฏิกิริยาด้วย เป็นเอนไซม์ที่ช่วยป้องกันไม่ให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เกิดปฏิกิริยาเฟนตัน

$$H_2O_2 + 2GSH \xrightarrow{GPx} GSSG + H_2O$$

GPx

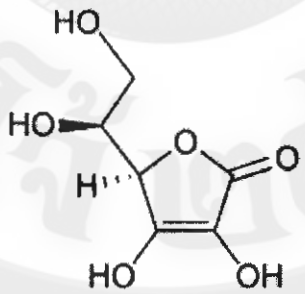
$$ROOH + 2GSH \longrightarrow ROH + GSSG + H_2O$$

2. สารต้านอนุมูลอิสระ

เป็นคำศัพท์ที่แปลมาจากคำว่า antiradical ปัจจุบันคำศัพท์นี้ได้ถูกบัญญัติใหม่เป็นสารขจัดหรือกำจัดอนุมูล (radical scavenger) หรืออาจจะใช้คำว่า สารแอนติออกซิแดนท์ (antioxidant) ก็ได้ สารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารที่สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยตรง เพื่อกำจัดอนุมูลให้หมดไป หรือหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ไม่ให้ดำเนินต่อ สารขจัดอนุมูลที่มีอยู่ตามธรรมชาติ เช่น กรดยูริค บิลิรูบินจะกำจัดอนุมูลส่วนวิตามินซี วิตามินอี กลูตาไทโอน เบตาแคโรทีน และยูบิควิโนน จะหยุดการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลและมีบทบาทสำคัญทำให้ลิพิดเปอร์ออกซิเดชันสิ้นสุดลง สารต้านอนุมูลอิสระมีโครงสร้างเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่แตกต่างกัน

วิตามินซี (vitamin C)

วิตามินซีหรือกรดแอสคอร์บิก ($AscH_2$) มีหมู่ไฮดรอกซี 2 หมู่ที่แตกตัวให้ไฮโดรเจนได้ (ภาพที่ 2.10) ดังนั้นจึงจัดเป็นกรดชนิดหนึ่ง มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี จึงทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์และอวัยวะที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก ในร่างกายวิตามินซีจะอยู่ในรูป $AscH^-$ เป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นกลไกในการต้านอนุมูลของวิตามินซีคือ $AscH^-$ จะให้อิเล็กตรอน 1 ตัว ร่วมกับอะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ นอกจากนี้วิตามินซีมีความสัมพันธ์กับวิตามินอีโดยทำหน้าที่เปลี่ยนวิตามินอีในรูปอนุมูลให้กลับเป็นวิตามินอี

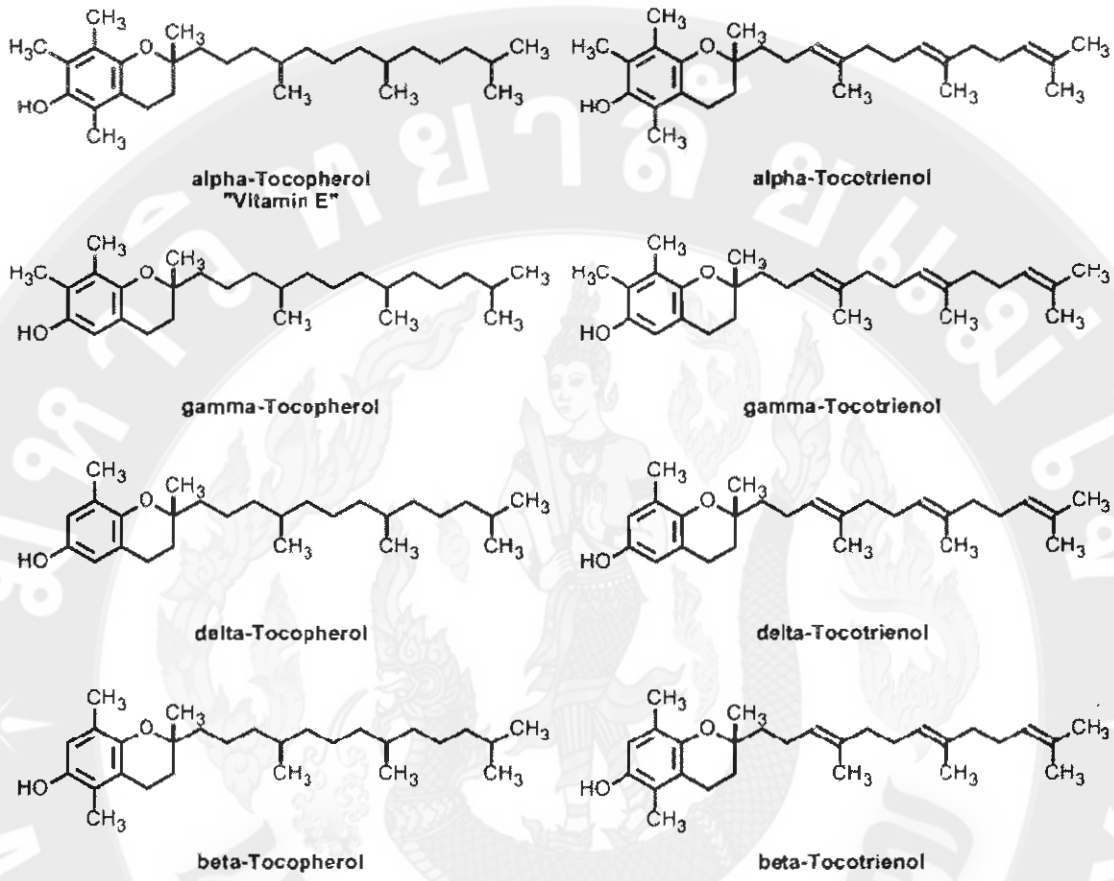



**ภาพที่ 2.10** โครงสร้างของวิตามินซี (vitamin C)

ที่มา : www.globalherbalsupplies.com/.../vitamin-c.htm

วิตามินอี (vitamin E)

เป็นวิตามินที่ละลายได้ดีในไขมัน จากโครงสร้างมีได้หลายไอโซเมอร์ รูปแบบ α-tocolpherol เป็นไอโซเมอร์ที่มีฤทธิ์สูงสุดจากบรรดาไอโซเมอร์ทั้งแปด (ภาพที่ 2.11) วิตามินอีเป็นสารต้านอนุมูลที่สำคัญของเมมเบรนซึ่งมีลิพิดเป็นองค์ประกอบ โดยปกป้องไม่ให้เกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน



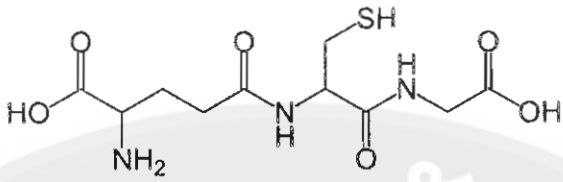

**ภาพที่** 2.11 โครงสร้างของวิตามินอี (vitamin E)

ที่มา : www.vita-dose.com/structure-of-vitamin-e.html

ในการทำหน้าที่วิตามินอีจะให้ไฮโดรเจนแก่ลิพิดที่อยู่ในรูปอนุมูลคือ อนุมูลลิพิด ($L^{\bullet}$) หรือ อนุมูลลิพิดเปอร์ออกซี ทำให้ลิพิดพ้นสภาพอนุมูล

กลูทาไทโอน (gluthathione: GSH)

กลูทาไทโอนจัดเป็นสารต้านอนุมูลในกลุ่มที่มีหมู่ไทออล GSH (ภาพที่ 2.12) มีโครงสร้างเป็นเปปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 3 ตัว GSH ละลายน้ำได้ดีมีอยู่ในเซลล์ปริมาณมาก ปกติเซลล์มีกลูทาไทโอน 2 แบบคือ กลูทาไทโอนในรูปรีดิวส์ (GSH) และ กลูทาไทโอนในรูปออกซิไดส์ (GSSG)



<u>ภาพที่ 2.12</u> โครงสร้างกลูทาไทโอน (glutathione)
ที่มา : www.bio.davidson.edu/.../LSHMain.html

กลไกการต้านออกซิเดชันของสารที่มีหมู่ไทออลคือการให้อิเล็กตรอนเดี่ยวแก่อนุมูลอิสระ เมื่อให้อิเล็กตรอนไปแล้วหมู่ไทออลจะเปลี่ยนเป็นหมู่ไทอิล (GS•) อนุมูลไทออล 2 หมู่ รวมกันได้เป็น กลูทาไทโอนในรูปออกซิไดส์ (GSSG)

$$GSH + R^{\bullet} \longrightarrow GS^{\bullet} + RH$$

$$GS^{\bullet} + GS^{\bullet} \longrightarrow 2GSSG$$

สารต้านอนุมูลอิสระในอุดมคติควรมีคุณสมบัติดังนี้ มีความเฉพาะเจาะจงสูงในการเข้าจับอนุมูลอิสระโดยตรงและกำจัดอนุมูลให้หมดสิ้นไป (quenching) สามารถทำปฏิกิริยาคีเลทกับโลหะได้ เป็นสารต้านออกซิเดชัน และไม่มีผลกระทบต่อการแสดงออกของยีน

3. สารคีเลทโลหะ (metal chelator)

นอกจากเอนไซม์และสารต้านอนุมูลอิสระดังกล่าวข้างต้นแล้ว การขจัดโลหะทรานซิชันโดยใช้สารคีเลทโลหะ เป็นอีกกลไกหนึ่งที่ใช้ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุล ทั้งนี้เพราะโลหะทรานซิชัน เช่น ธาตุเหล็ก และทองแดง มีส่วนสำคัญในการเกิดอนุมูลอิสระ สารคีเลทโลหะส่วนใหญ่เป็นโปรตีนทำหน้าที่จับกับโลหะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน โลหะจึงไม่สามารถทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระได้ ซึ่งได้แก่ ทรานเฟอร์ริน (transferrin) เฟอร์ริทิน (ferritin) แลกโทเฟอร์ริน (lactoferrin) เซรูโลพลาสมิน (ceruloplasmin) ฮีโมเพล็กซิน (hemoplexin) แฮบโทโกลบิน (haptoglobin) และอัลบูมิน (albumin)

ดังนั้นเมื่อเซลล์หรือร่างกายขาดความสมดุลระหว่างปริมาณของอนุมูลอิสระและขบวนการป้องกันและสารต้านอนุมูลอิสระ นำไปสู่การเกิดโรค ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้ทำการวิจัยพัฒนาเพื่อรักษาสมดุลดังกล่าว ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระเป็นกลุ่มสารที่ได้รับความสนใจและมี

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยแม่โจ้

การศึกษาพัฒนาอย่างต่อเนื่อง โดยสามารถแบ่งได้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่พัฒนาสังเคราะห์เลียนแบบสารต้านอนุมูลที่มีในธรรมชาติ เช่น วิตามินอี สารโพลีฟีนอล และเคอร์คูมินจากขมิ้นชัน เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามสารต้านอนุมูลควรมีความสามารถดังที่กล่าวมาข้างต้นแล้วนั้น สารต้านอนุมูลที่ดี ควรมีความสามารถในการดูดซึมหรือส่งผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ เนื้อเยื่อต่างๆ โดยมีความเข้มข้นเพียงพอที่สามารถออกฤทธิ์ได้ สารต้านอนุมูลอิสระที่มีตามธรรมชาติในอาหารเช่น ผัก ผลไม้ สมุนไพร

## 2.9 สารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในพรอพอลิส

### 2.9.1 สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound)

สารประกอบฟีนอลิก (polyphenolic compound) เป็นกลุ่มสารที่ให้สีในพืช สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolism) จากพืช สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารอนุพันธ์ของเบนซินที่มีหมู่ไฮดรอกซิลต่ออยู่เป็นหลัก สารฟีนอลิกพื้นฐานมีหมู่ฟีนอล (phenol group) เป็นหลัก ซึ่งประกอบด้วยวงแหวนเบนซิน 1 วง และมีหมู่ไฮดรอกซิล 1 หมู่ (ทรงพล, กรรณิการ์และขนิษฐา. 2009 : online) จากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารกลุ่มฟีนอลิกจะขึ้นอยู่กับหมู่ไฮดรอกซิลในโมเลกุล คุณสมบัติในการดึงอิเล็กตรอนของหมู่คาร์บอกซิลิกในกรดเบนโซอิก จะส่งผลให้ความสามารถในการให้ไฮโดรเจน ของ Hydroxybenzoate น้อยลง สารโพลีฟีนอลิกเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญเนื่องจากมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา ต้านการอักเสบ ต้านไวรัส (Khezri, *et al* 2006 อ้างถึงใน Grange and Davey, 1990)

### 2.9.2 สารประกอบฟลาโวนอยด์ (flavonoid compound)

สารประกอบฟลาโวนอยด์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ประกอบด้วยหมู่ซุปเปอร์ออกไซด์และหมู่ไฮดรอกซิล ที่สามารถป้องกันการเสื่อมของเซลล์ต่างๆ อันเนื่องมาจากอนุมูลอิสระที่ได้มาจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) อีกทั้งพบว่าฟลาโวนอยด์มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา และต้านไวรัส (Khezri *et al.* 2006 อ้างถึงใน Grange and Davey, 1990) ซึ่งฟลาโวนอยด์นั้นเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าชนิดอื่นแต่ก็ต้องขึ้นอยู่กับโครงสร้างทางเคมีของสารนั้นด้วย คุณสมบัติที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบันของฟลาโวนอยด์ คือ เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูงรวมทั้งคุณสมบัติในการช่วยลดการอักเสบ การยับยั้งเอนไซม์ การต้านอนุมูลอิสระ การบำรุงหลอดเลือด และยับยั้งการเกิดเนื้องอก (Cushnie and Andrew, 2005) ฟลาโวนอยด์ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลจะเป็นตัวไปชะลอ หรือยับยั้งกระบวนการออกซิเดชันของคลอเลสเตอรอล LDL (Low density lipoprotein) ซึ่ง

กระบวนการออกซิเดชันเพื่อสลายคลอเรสเตอรอล LDL นั้นจะทำให้เกิดการแข็งตัวของเกล็ดเลือด ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือดหัวใจ เพราะฉะนั้นสารพวกฟลาโวนอยด์จึงมีประโยชน์ต่อสุขภาพ คือ ช่วยป้องกันไขมันจับกับหลอดเลือด (Maisuthiskul et al. 2007) ป้องกันกระบวนการออกซิเดชันของคลอเรสเตอรอล LDL และช่วยลดความดันโลหิต

2.9.3 **ประเภทของสารประกอบฟลาโวนอยด์**

2.9.3.1 **ฟลาโวน** (Flavones) เป็นสารประกอบไม่มีสี ตัวอย่างเช่น อะจิพินิน (agipenin) ลูเตโอลีน (luteolin) และไตรซีติน (tricetin) (นิธิยา, 2548) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kosalec et al. (2004) ที่พบว่าฟลาโวนเป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์ประเภทหนึ่งที่มีอยู่ในพรอพอลิส

2.9.3.2 **ฟลาโวนอล** (Flavonol) เกิดจากสารประกอบฟลาโวนมีการแทนที่ของหมู่ไฮดรอกซิลเพิ่มขึ้นที่ตำแหน่ง 3 ตัวอย่างของฟลาโวนอล ได้แก่ เคอร์ซีติน (quercetin) แคมพ์เฟอรอล (kaempferol) และไมริซีติน (myricetin) อะไกโคน (aglycone) ที่เป็นอนุพันธุ์ของฟลาโวน และฟลาโวนอลที่ทราบโครงสร้าง มีอีกประมาณ 60 ชนิด ซึ่งแตกต่างกันที่หมู่ไฮดรอกซี และหมู่เมทอกซี (นิธิยา, 2548) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kosalec et al. (2004) ที่พบว่าฟลาโวนอลเป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์ประเภทหนึ่งที่มีอยู่ในพรอพอลิส

2.9.3.3 **ฟลาวาโนนอล** (Flavanonols) มีสูตรโครงสร้างคล้ายฟลาวาโนน แต่หมู่ ไฮดรอกซิลเพิ่มขึ้น ที่ตำแหน่งที่ 3 (นิธิยา, 2548)

2.9.3.4 **ฟลาวาโนน** (Flavanone) มีสูตรโครงสร้างคล้ายฟลาโวน แต่พันธะระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3 เป็นพันธะเดี่ยว เป็นฟลาโวนอยด์ที่พบในผลไม้ตระกูลส้ม ตัวอย่างไกลโคไซด์ เช่น เฮสเพอริดิน (hesperidin) และนารินจิน (naringin) ที่พีเอชเป็นด่าง วงแหวนที่อยู่ภายในโมเลกุลของเฮสเพอริดินจะเปิดออกได้เป็นชาลโคน (chalcone) เหมือนการสลายตัวของแอนโทไซยานิน (anthocyanin) ชาลโคนจะให้สีเหลืองถึงน้ำตาล (นิธิยา, 2548) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kosalec et al. (2004) ที่พบว่าฟลาวาโวน เป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์ประเภทหนึ่งที่มีอยู่ในพรอพอลิส

# บทที่ 3
# อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods)

## 3.1 อุปกรณ์การทดลอง

### 3.1.1 ตัวอย่าง

พรอพอลิส (propolis) จากพื้นที่ อำเภอร้องกวาง จังหวัดแพร่

### 3.1.2 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองนี้เป็น analytical grade

3.1.2.1 ethanol

3.1.2.2 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH)

3.1.2.3 α-tocopherol

3.1.2.4 ascorbic acid

3.1.2.5 sodium phosphate buffer pH 7

3.1.2.6 2-deoxyribose

3.1.2.7 $FeSO_4$-EDTA

3.1.2.8 hydrogen peroxide

3.1.2.9 trichroacetic acid

3.1.2.10 triobarbituric acid

3.1.2.11 sodium carbonate buffer pH 10.5

3.1.2.12 xanthine

3.1.2.13 EDTA

3.1.2.14 bovine serum albumin (BSA)

3.1.2.15 nitroblue tetrazolium (NBT)

3.1.2.16 xanthine oxidase enzyme (XOD)

3.1.2.17 cuprous chloride (CuCl)

3.1.2.18 aluminium chloride hexahydrate ($AlCl_3.6H_2O$)

3.1.2.19 potassium acetate ($CH_3COOK$)

3.1.2.20 quercetin

3.1.2.21 Folin-Ciocaltau reagent

3.1.2.22 sodium carbonate ($Na_2CO_3$)

3.1.2.23 gallic acid

3.1.2.24 silicagel 60 $F_{254}$ plate

3.1.2.25 hexane

3.1.2.26 ethyl acetate

3.1.2.27 acetic acid

3.1.2.28 iodine

3.1.2.29 น้ำกลั่น (distilled water)

**3.1.3 เครื่องมือ**

3.1.3.1 เครื่องระเหยแห้ง (rotary evaporator) ยี่ห้อ Steroglass รุ่น STRIKE 102A

3.1.3.2 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (analytical balance) ยี่ห้อ ADAM รุ่น AFP-2100L

3.1.3.3 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (analytical balance) ยี่ห้อ ADAM รุ่น AAA 250L

3.1.3.4 เครื่องผสมสาร (vortex mixer) ยี่ห้อ VELP

3.1.3.5 เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (centrifuge) ยี่ห้อ ORTO รุ่น Lincer

3.1.3.6 กรวยกรองบุชเนอร์ (buchner funnel)

3.1.3.7 ตู้อบความร้อน (hot air oven) ยี่ห้อ WTB Binder รุ่น FD 115

3.1.3.8 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ยี่ห้อ THERMO SCIENTIFIC รุ่น HELIOS $\alpha$

**3.1.4 อุปกรณ์และเครื่องแก้ว**

3.1.4.1 กระบอกตวง (cylinder) ขนาด 20, 50 และ 100 มิลลิลิตร

3.1.4.2 หลอดทดลอง (test tube) ขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร

3.1.4.3 ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 10, 25, 50 และ 100 มิลลิลิตร

3.1.4.4 ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร

3.1.4.5 ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 20-200 และ 100-1,000 ไมโครลิตร

3.1.4.6 ทิป (tip) ที่ใช้กับไมโครปิเปต ขนาด 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

3.1.4.7 กระดาษกรอง (paper filter) ยี่ห้อ Whatman เบอร์ 1

3.1.4.8 อะลูมิเนียมฟอยล์ (aluminium foil)

3.1.4.9 พาราฟิล์ม (parafilm)

3.1.4.10 แท่งแก้วคนสาร (stirring rod)

3.1.4.11 ช้อนตักสารเคมี (spatula)

3.1.4.12 ที่วางหลอดทดลอง (rack)

**3.2 วิธีการทดลอง**

**3.2.1 การสกัดสารจากพรอพอลิสโดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย** (propolis)

นำพรอพอลิส น้ำหนัก 35 กรัม มาทำให้ละเอียด หลังจากนั้นนำไปสกัดด้วยตัวทำละลาย 70 % เอทานอล โดยอัตราส่วนระหว่างพรอพอลิสและตัวทำละลายเป็น 1 ต่อ 10 และสกัดด้วยเครื่อง ultrasonicator เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำส่วนผสมที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 และนำสารสกัดไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกสารสกัดและตะกอนออกจากกัน หลังจากนั้นนำสารสกัดพรอพอลิสที่ได้นำไประเหยเพื่อเอาตัวทำละลายออก โดยใช้เครื่องระเหยแห้ง (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นำสารสกัดที่ระเหยตัวทำละลายแล้วนำมาชั่งน้ำหนักและเก็บให้พ้นแสง ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

**3.2.2 การศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพรอพอลิส** (propolis) **โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุดการทดลอง**

3.2.2.1. DPPH radical-scavenging activity

นำผงของสารสกัดที่ได้มาละลาย 70% เอทานอล โดยมีความเข้มข้นที่ต่างกัน นำสารสกัดปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลาย DPPH ที่มีความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร และเติม 70% เอทานอล ปริมาตร 2.4 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ในที่ไม่มีแสง เมื่อครบเวลา นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทำการบันทึกผล โดยใช้ $\alpha$-tocopherol และ ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เป็น positive control นำค่าที่ได้มาคิดเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดังนี้

$$\% \text{ DPPH radical scavenging activity} = \frac{\{A_0 - (A_1 - A_s)\}}{A_0} \times 100$$

เมื่อ $A_0$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH

$A_1$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดพรอพอลิสที่ทำปฏิกิริยากับ DPPH

$A_S$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดพรอพอลิส

3.2.2.2 Hydroxyl radical scavenging

สารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ประกอบด้วย 0.1 โมลาร์ sodium phosphate buffer ปริมาตร 0.90 มิลลิลิตร pH 7.0, 10 มิลลิโมลาร์ 2-deoxyribose ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร, 10 มิลลิโมลาร์ $FeSO_4$-EDTA ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตรและ 10 มิลลิโมลาร์ $H_2O_2$ ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไป 0.125 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมสารสกัดพรอพอลิสในตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 0.075 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 4 ชั่วโมง ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย 2.8 เปอร์เซ็นต์ trichloroacetic acid ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตรและ 1.0 เปอร์เซ็นต์ 2-triobarbitutic acid ซึ่งเตรียมใน 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร นำไปต้มเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นทำให้เย็นและนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร ทำการบันทึกผล โดยใช้ $\alpha$-tocopherol และ ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เป็น positive control

3.2.2.3 Superoxide anion scavenging

ทำการเติมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ตามลำดับ ดังนี้ เติม 0.05 M sodium carbonate buffer pH 10.5 ปริมาตร 1.3 มิลลิลิตร, 3 mM xanthine ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร, 3mM EDTA ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร, 0.15%w/v bovine serum albumin (BSA) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร, 0.75 mM nitroblue tetrazolium (NBT) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมสารสกัดพรอพอลิสในตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลา เติมเอนไซม์ xanthine oxidase (XOD) ความเข้มข้น 6 mU ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที นำมาเติม 6 mM CuCl เพื่อทำการหยุดปฏิกิริยา นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ทำการบันทึกผล โดยใช้ $\alpha$-tocopherol และ ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เป็น positive control

3.2.2.4 Hydrogen peroxide scavenging

นำผงของสารสกัดที่ได้มาละลายในเอทานอล โดยมีความเข้มข้นที่ต่างกัน เติมลงใน 43 มิลลิโมลาร์ $H_2O_2$ ที่เตรียมใน 0.1 M phosphate buffer ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่

อุณหภูมิห้อง เวลา 10 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 230 นาโนเมตร ทำการบันทึกผล โดยใช้ α-tocopherol และ ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เป็น positive control

**3.3 การศึกษาหาปริมาณสารที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) และ โพลีฟีนอล (polyphenol) ในพรอพอลิส**

**3.3.1 การศึกษาหาปริมาณฟลาโวนอยด์ (flavonoid)**

ปริมาณของฟลาโวนอยด์ หาได้โดยวิธี Aluminium Chloride Colorimetry นำสารสกัดพรอพอลิส 0.5 มิลลิลิตร เติม 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติม 0.1 มิลลิลิตร ของ 10 เปอร์เซ็นต์ aluminium chloride hexahydrate, 0.1 มิลลิลิตรของ 1 โมลาร์ potassium acetate และ น้ำกลั่น 2.8 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลา นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ทำการบันทึกผล โดยนำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ quercetin

**3.3.2 การศึกษาหาปริมาณโพลีฟีนอล (polyphenol)**

ปริมาณโพลีฟีนอล (polyphenol) หาได้โดย Folin-Ciocalteau Colorimetric method นำสารสกัด 0.2 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไป 0.8 มิลลิลิตร, 1 มิลลิลิตรของ Folin-Ciocalteau reagent ที่เจือจางแล้ว 4 เท่า และ 5 มิลลิลิตรของ 0.4 M $Na_2CO_3$ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลา นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ทำการบันทึกผล โดยนำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ gallic acid

**3.4 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพรอพอลิส โดยเทคนิค Thin Layer Chromatography**

เตรียมสารสกัดพรอพอลิสที่ความเข้มข้น 1 mg/ml จุดสารสกัดปริมาตร 1 µl ลงบนแผ่น TLC plate ชนิด silica gel 60 $F_{254}$ จากนั้นนำแผ่น TLC ไปแช่ใน mobile phase ซึ่ง mobile phase ประกอบด้วย hexane : ethyl acetate : acetic acid (60:40:1 %v/v) ตรวจสอบการเคลื่อนที่ของสารด้วยไอของไอโอดีน (Iodine vapour) ทำเครื่องหมายตรง solvent front และคำนวณหาระยะทางที่สารเคลื่อนที่ได้ บันทึกระยะทางที่สารเคลื่อนที่ คำนวณค่า Retention factor ($R_f$) ของสารสกัดแต่ละชนิด

3.5 **การทดสอบทางสถิติ**

นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างตัวอย่างโดยใช้วิธี Duncan's multiple range test

3.6 **สถานที่ทำการทดลองหรือเก็บข้อมูล**

สถานที่ในการทำการทดลองที่ อาคารปฏิบัติการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ

3.7 **ระยะเวลาทำการวิจัย**

การวิจัยครั้งนี้จะใช้เวลาตั้งแต่เดือนตุลาคม 2550 ถึง เดือนกันยายน 2551 รวมเวลาวิจัย 1 ปี

**ตารางที่** 3.1 แผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย

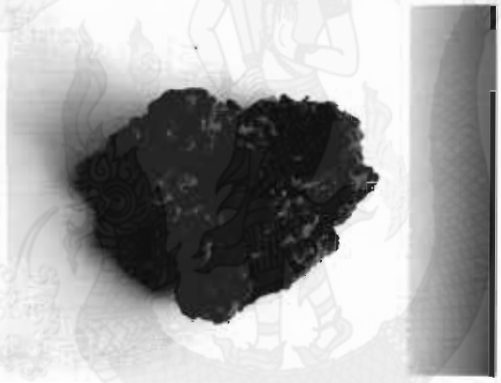
| งานที่ปฏิบัติ | เดือน | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 10 | 11 | 12 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| 1. เตรียมเครื่องแก้ว สารเคมี | ✓ | ✓ | | | | | | | | | | |
| 2. ทำการสกัดพรอพอลิส | | ✓ | ✓ | | | | | | | | | |
| 3. ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ | | | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | | | | |
| 4. ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี | | | | | | | ✓ | ✓ | ✓ | | | |
| 5. วิเคราะห์ข้อมูล | | | | | | | | ✓ | ✓ | ✓ | | |
| 6. เขียนรายงาน | | | | | | | | | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| 7. ประเมินผลและส่งรายงานฉบับเต็ม | | | | | | | | | | | ✓ | ✓ |

# บทที่ 4

# ผลการทดลอง (Results)

## 4.1 ลักษณะของพรอพอลิสและสารสกัดพรอพอลิสในตัวทำละลายเอทานอล

พรอพอลิสที่ใช้ในการทดลองได้มาจากเกษตรกรในพื้นที่อำเภอร้องกวาง จังหวัดแพร่ มีสีน้ำตาลเข้ม ไม่มีกลิ่นและมีลักษณะเหนียว (ภาพที่ 4.1) เมื่อนำพรอพอลิสมาสกัดโดยใช้ตัวทำละลายเอทานอลมีสีเหลืองอ่อน หลังจากที่นำสารสกัดพรอพอลิสมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้ง (rotary evaporator) จากนั้นชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้ และคำนวณหาผลผลิตร้อยละของสารสกัด พบว่าสารสกัดพรอพอลิสในตัวทำละลายเอทานอลมีค่าเท่ากับ 6.67 %w/w (ตาราง 4.1)



ภาพที่ 4.1 ลักษณะของพรอพอลิสที่ได้จากอำเภอร้องกวาง จังหวัดแพร่

## 4.2 การศึกษาหาปริมาณสารโพลีฟีนอล (polyphenol) และฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ในสารสกัดพรอพอลิส

จากการศึกษาพบว่า สารสกัดพรอพอลิสในตัวทำละลายเอทานอลมีสารโพลีฟีนอลและฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบ ซึ่งปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลสามารถวิเคราะห์หาได้โดยวิธี โดย Folin-Ciocalteau Colorimetry พบว่ามีปริมาณของสารโพลีฟีนอล 1.295 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัดพรอพอลิส ในขณะที่ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทำการวิเคราะห์โดยวิธี วิธี Aluminium Chloride Colorimetry พบว่ามีปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ 0.35 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัดพรอพอลิส (ตาราง 4.1)

**ตาราง 4.1** ผลผลิตร้อยละ ปริมาณโพลีฟีนอล และปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดพรอพอลิส ในตัวทำละลายเอทานอล

| | ผลผลิตร้อยละ (% w/w) | ปริมาณโพลีฟีนอล * mg/g dry weight# | ปริมาณฟลาโวนอยด์** mg/g dry weight# |
|---|---|---|---|
| สารสกัดพรอพอลิส | 6.67 | 1.295 | 0.35 |

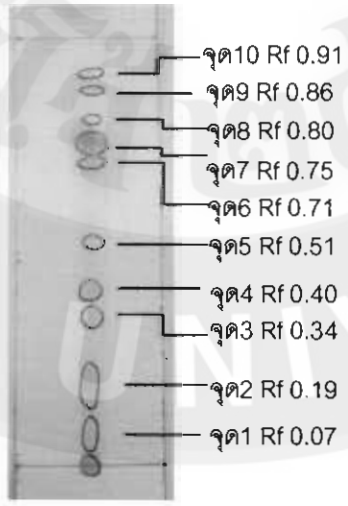
*วิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลโดยวิธี folin-ciocalteu colorimetry

**วิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์โดยวิธี aluminium chloride colorimetry

#มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัดพรอพอลิสในตัวทำละลายเอทานอล

### 4.3 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดพรอพอลิสด้วยวิธี Thin layer chromatrography

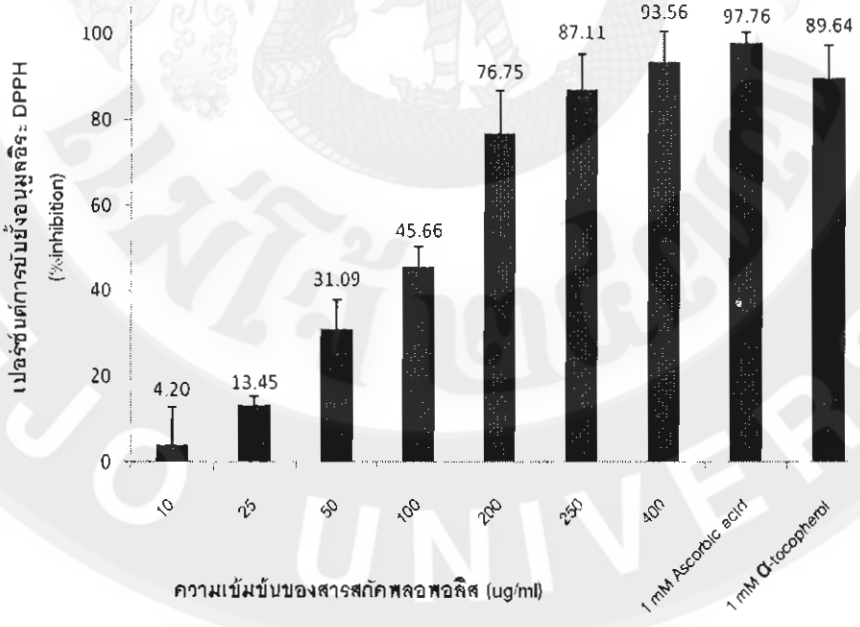
จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดพรอพอลิสโดยการแยกด้วยวิธี Thin layer chromatography ชนิด silica gel 60 $F_{254}$ และ mobile phase ที่ประกอบด้วย hexane : ethyl acetate : acetic acid (60:40:1%v/v) และตรวจสอบการเคลื่อนที่ของสารสกัดด้วยไอของไอโอดีน (iodine vapour) จากนั้นคำนวณค่า retention factor ($R_f$) หรือระยะทางการเคลื่อนที่ของสารสกัด พบว่าสารสกัดพรอพอลิสในตัวทำละลายเอทานอลเกิดโครมาโทแกรมขึ้นดังภาพที่ 4.2 โดยเกิดการแยก 10 จุดด้วยกันซึ่งมีค่า $R_f$ จากจุดที่ 1 ถึงจุด 10 ตามลำดับดังนี้ 0.07, 0.19, 0.34, 0.40, 0.51, 0.71, 0.75, 0.80, 0.86 และ 0.91




**ภาพที่ 4.2** โครมาโทแกรมของสารสกัดพรอพอลิสในตัวทำละลายเอทานอล บนแผ่น TLC ขนาด 10 ซม. × 2.5 ซม. ชนิด silica gel 60 $F_{254}$ และ mobile phase คือ hexane : ethyl acetate : acetic acid (60:40:1%v/v) ตรวจสอบระยะการเคลื่อนที่ของสารด้วยไอของไอโอดีน

**4.4 การศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ** DPPH **ของสารสกัดพรอพอลิส** (DPPH scavenging assay)

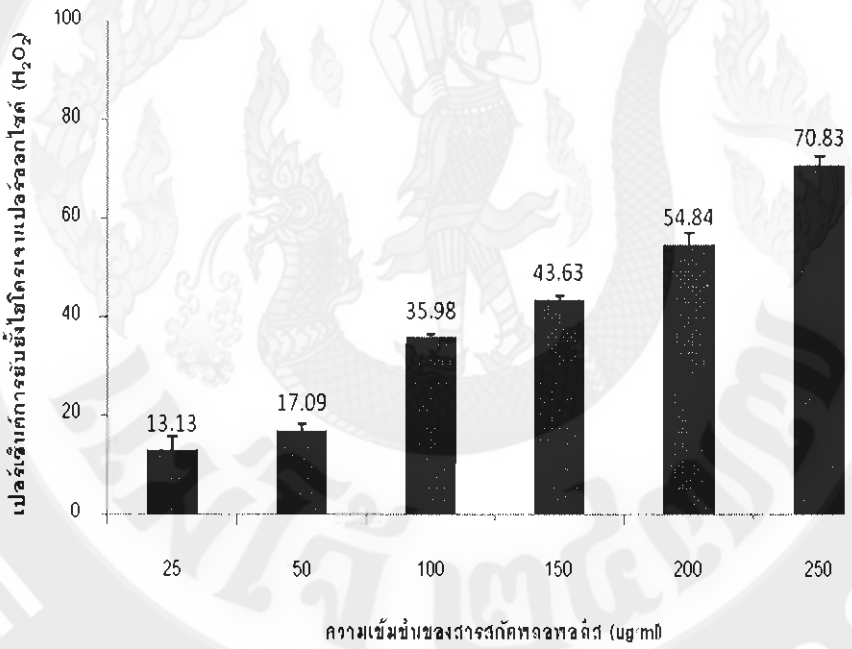
อนุมูล DPPH เป็นอนุมูลอิสระสังเคราะห์ มีสีม่วง ซึ่งการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระนั้น ทำได้โดยวัดการลดลงของสีด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ซึ่งการศึกษานี้ได้นำสารสกัดพรอพอลิสในตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 10-400 ug/ml ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูล DPPH พบว่าสารสกัดพรอพอลิสมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ตั้งแต่ความเข้มข้น 10 ug/ml ซึ่งยับยั้งได้ 4.20 เปอร์เซ็นต์ และสามารถยับยั้งได้ใกล้เคียงห้าสิบเปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้น 100 ug/ml ในขณะที่ที่ความเข้มข้น 200 ug/ml 250 ug/ml และ 400 ug/ml สามารถยับยั้งได้ 76.75 เปอร์เซ็นต์, 87.11 เปอร์เซ็นต์ และ 93.56 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยสารสกัดพรอพอลิสที่ความเข้มข้น 400 ug/ml สามารถยับยั้งอนุมูล DPPH ได้สูงที่สุด และสูงกว่าสารมาตรฐาน 1 mM alpha-tocopherol ที่ยับยั้งได้ 89.64 เปอร์เซ็นต์ แต่อย่างไรก็ตามฤทธิ์ในการยับยั้งยังน้อยกว่าสารมาตรฐาน 1mM ascorbic acid (ภาพที่ 4.3)




**ภาพที่** 4.3 ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล DPPH ของสารสกัดพรอพอลิสที่ความเข้มข้น 10-400 ug/ml และสารมาตรฐาน ascorbic acid และ alpha tocopherol ที่ความเข้มข้น 1 mM

**4.5 การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของสารสกัดพรอพอลิส**

จากการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของสารสกัดพรอพอลิสในตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 25-250 ug/ml พบว่าสารสกัดพรอพอลิสมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ตั้งแต่ความเข้มข้น 25 ug/ml ซึ่งยับยั้งได้ 13.13 เปอร์เซ็นต์ และสามารถยับยั้งได้ห้าสิบเปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้น 200 ug/ml ในขณะที่ความเข้มข้น 250 ug/ml สามารถยับยั้งได้สูงสุด 70.83 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.4) แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ไม่สามารถทำการศึกษาสารสกัดพรอพอลิสที่ความเข้มข้น 400 ug/ml และสารมาตรฐาน 1 mM alpha-tocopherol และ 1mM ascorbic acid ทั้งนี้เพราะเมื่อนำสารผสมกันดังปฏิกิริยาแล้วนั้นเกิดความขุ่นจึงไม่สามารถวัดการดูดกลืนแสงได้




**ภาพที่ 4.4** ความสามารถในการยับยั้งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ของสารสกัดพรอพอลิส ความเข้มข้น 25-250 ug/ml

**4.6 การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้ง superoxide anion ของสารสกัดพรอพอลิส**

Superoxide anion ในการศึกษานี้เกิดขึ้นจากระบบ xanthine-xanthine oxidase system และทำการตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของพรอพอลิสโดยวัดการเปลี่ยนแปลงสีของ nitroblue tetrazolum salt (NBT) ซึ่งถ้าสารสกัดมีความสามารถในการยับยั้ง

superoxide anion ได้ การเปลี่ยนแปลงสีของ nitroblue tetrazolum salt (NBT) จากสีเหลืองไปเป็นสีน้ำเงินจะเกิดขึ้นได้น้อยหรือไม่เกิดขึ้นเลย และสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร จากการศึกษานี้พบว่าในหลอดทดลองที่เติมสารสกัดพรอพอลิสความเข้มข้นต่างๆนั้น มีสีน้ำเงินเกิดขึ้น ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าสารสกัดพรอพอลิสไม่สามารถยับยั้งการเกิด superoxide anion ในระบบ xanthine-xanthine oxidase ได้

**4.7 การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้ง hydroxyl radical ของสารสกัดพรอพอลิส**

Hydroxyl radical ในการศึกษานี้เกิดขึ้นจาก Fenton reaction และทำการตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของพรอพอลิสโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร จากการศึกษานี้พบว่าในหลอดทดลองที่เติมสารสกัดพรอพอลิสความเข้มข้นต่างๆนั้น มีสีน้ำเงินเกิดขึ้น ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าสารสกัดพรอพอลิสไม่สามารถยับยั้งการเกิด hydroxyl radical จาก Fenton reaction ได้

# บทที่ 5
# วิจารณ์ผลการทดลอง (Discussion)

พรอพอลิสที่นำมาศึกษาครั้งนี้ได้มาจากพื้นที่อำเภอร้องกวาง จังหวัดแพร่ มีสีน้ำตาลเข้ม ไม่มีกลิ่น มีลักษณะเหนียวแต่ไม่จับตัวเป็นก้อน เมื่อเปรียบเทียบกับพรอพอลิสจากอำเภอหนองผึ้ง จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งสุพรรณีและพัทยา (2549) และ ภัทราพรรณ (2552) ได้ทำการศึกษาพบว่าพรอพอลิสดังกล่าวมีสีน้ำตาลเข้มจนเกือบเป็นสีดำ ไม่มีกลิ่น มีลักษณะแข็งจับตัวกันเป็นก้อนและเหนียว ความแตกต่างดังกล่าวเป็นไปได้ว่าเกิดจากระยะเวลาในการเก็บรักษาพรอพอลิส โดยการศึกษานี้นำพรอพอลิสที่เก็บจากรังผึ้งแล้ว 1 สัปดาห์มาสกัดและศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ แต่พรอพอลิสจากอำเภอหนองผึ้ง จังหวัดเชียงใหม่ มีอายุการเก็บรักษามากกว่า 1 เดือน ดังนั้นจึงเป็นสาเหตุทำให้มีลักษณะเหนียวและจับตัวเป็นก้อนแข็ง แต่อย่างไรก็ตามในปี 2004 Kumazawa *et al.* ได้ทำการศึกษาพรอพอลิสจากประเทศต่างๆรวมทั้งประเทศไทย รายงานว่าพรอพอลิสจากประเทศไทยมีสีน้ำตาลเข้มและไม่มีกลิ่นซึ่งสอดคล้องกับลักษณะของพรอพอลิสในการศึกษานี้

พรอพอลิสถูกสกัดในตัวทำละลายเอทานอลโดยเทคนิค ultrasonic extraction (UE) ซึ่ง Trusheva *et al.* (2007) ศึกษาเปรียบเทียบวิธีสกัดพรอพอลิสจากยุโรป 3 วิธีได้แก่ maceration, microwave assisted extraction (MAE) และ ultrasonic extraction (UE) พบว่าวิธี UE เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดเพราะสามารถสกัดพรอพอลิสได้ในปริมาณมาก ในระยะเวลาสั้นและมีปริมาณของไขปนกับสารสกัดน้อยกว่าวิธีอื่นๆ นอกจากนี้การศึกษาของสุพรรณีและพัทยารายงานว่าการสกัดพรอพอลิสโดยวิธี maceration นั้นจะได้ไขปนกับสารสกัดในปริมาณมาก ซึ่งส่งผลรบกวนต่อการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและการวิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลและฟลาโวนอยด์ ในปี 2551 พรสวรรค์และรุ่งนภา เปรียบเทียบวิธีการสกัดพรอพอลิสจากจังหวัดเชียงใหม่ด้วย 3 วิธี พบว่าวิธี UE เป็นวิธีที่ดีที่สุดเช่นกัน ซึ่งสารสกัดที่ได้มีปริมาณผลผลิตร้อยละเท่ากับ 2.25%w/w การศึกษานี้สามารถสกัดพรอพอลิสได้ในปริมาณมากกว่าซึ่งเท่ากับ 6.67 %w/w เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ของสารสกัดพบว่ามีปริมาณ 1.295 mg/g dryweight และ 0.35 mg/g dryweight ตามลำดับ ซึ่งปริมาณของสารประกอบโพลีฟีนอลิกที่ได้มีปริมาณสูงกว่างานวิจัยของรุ่งนภา (2551) ซึ่งมีค่า 0.055 mg/g dryweight แต่อย่างไรก็ตามปริมาณของสารประกอบโพลีฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์จากการศึกษานี้มีค่าน้อยกว่าปริมาณที่วิเคราะห์ได้จากงานวิจัยของ Kumazawa *et al.* (2004) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 31.2 mg/g dryweight และ 2.5 mg/g dryweight ตามลำดับ

นอกจากนี้ Kumazawa *et al.* ได้วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของพรอพอลิสโดยเทคนิค HPLC พบว่าสารสกัดพรอพอลิสจากประเทศไทยไม่แสดงโครมาโทแกรมของสารชนิดใดๆ เลย แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดพรอพอลิสโดยเทคนิค TLC พบว่าสามารถแยกชนิดของสารได้ถึง 10 จุดด้วยกัน โดยจุดที่ 8 มีค่า $R_f$ 0.75 มีความเข้มของจุดมากกว่าจุดอื่นๆ และจากการศึกษาของภัทราพรรณ (2552) ทำการศึกษาองค์ประกอบของสารสกัดพรอพอลิสจากเชียงใหม่ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทานอลและน้ำตามลำดับ โดยเทคนิค TLC และใช้ mobile phase เช่นเดียวกับการศึกษานี้ พบว่าสารสกัดจากตัวทำละลายทั้งสี่ชนิดแสดงโครมาโทแกรมเช่นกัน และเมื่อพิจารณาโครมาโทแกรมของสารสกัดจากตัวทำละลายเอทานอล สามารถพบค่าที่ใกล้เคียงกับการศึกษาครั้งนี้คือ $R_f$ 0.50, 0.76 และ 0.84 ซึ่งจุดที่มีค่า $R_f$ 0.84 นั้นเป็นจุดที่มีความเข้มมากที่สุด แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากพรอพอลิสจากประเทศไทยมีสารสำคัญเป็นองค์ประกอบเช่นกัน นอกจากนี้แสดงให้เห็นว่าพรอพอลิสจากจังหวัดแพร่ และเชียงใหม่น่าจะมีความแตกต่างทางองค์ประกอบทางเคมีเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับ Burdock *et al.*,1998 ที่กล่าวว่าความแตกต่างทางด้านภูมิประเทศ ภูมิอากาศ โดยเฉพาะทางด้านพันธุ์พืชในแต่ละท้องถิ่นนั้น ส่งผลทำให้เกิดความแตกต่างขององค์ประกอบทางเคมีของพรอพอลิสในแต่ละท้องถิ่นหรือประเทศ แต่อย่างไรก็ตาม Kumazawa *et al.* (2004) ได้รายงานว่าไม่ทราบแหล่งที่มาของพรอพอลิสจากประเทศไทย จากผลการศึกษานี้พรอพอลิสจากจังหวัดแพร่จึงมีความน่าสนใจนำมาศึกษาเพื่อจำแนกชนิดขององค์ประกอบทางเคมีต่อไป

เมื่อนำสารสกัดพรอพอลิสในตัวทำละลายเอทานอลมาศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสารสกัดสามารถยับยั้งอนุมูล DPPH ได้ ซึ่งสังเกตได้จากการเปลี่ยนสีของสารละลายจากสีม่วงไปเป็นสีเหลือง แสดงว่า DPPH ได้รับโมเลกุลไฮโดรเจนและทำให้เกิดสภาวะเสถียร เป็นไปได้ว่าในสารสกัดพรอพอลิสมีสารที่สามารถให้ไฮโดรเจนแก่พรอพอลิสได้ สารกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มีกลไกดังกล่าว เมื่อเปรียบเทียบความสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระกับสารสกัดพรอพอลิสจากเชียงใหม่ ซึ่งสกัดด้วยเทคนิค UE เช่นกัน พบว่าสารสกัดพรอพอลิสจากเชียงใหม่ที่ความเข้มข้น 50 ug/ml มีความสามารถการยับยั้งได้ใกล้เคียง 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในสารสกัดพรอพอลิสจากแพร่ต้องใช้ความเข้มข้นที่ 100 ug/ml จึงจะสามารถยับยั้งได้ใกล้เคียง 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นไปได้ว่าความแตกต่างของฤทธิ์ยับยั้งอาจจะเกิดจากความแตกต่างขององค์ประกอบของพรอพอลิสในแต่ละพื้นที่ จากนั้นนำสารสกัดพรอพอลิสมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระที่สำคัญคือ อนุมูลไฮดรอกซิล พบว่าสารสกัดพรอพอลิสสามารถยับยั้งสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้เช่นกัน แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีผู้รายงานกลไกดังกล่าวของพรอพอลิส

แม้ว่าสารสกัดพรอพอลิสที่ความเข้มข้น 25-400 ug/ml สามารถยับยั้งอนุมูล DPPH และ สารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ แต่จากการศึกษานี้พบว่าสารสกัดพรอพอลิสตามความเข้มข้นดังกล่าว ไม่สามารถยับยั้งอนุมูลไฮดรอกซิลและซุปเปอร์ออกไซด์แอนอิออนได้ โดยอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์แอนอิออนศึกษาในระบบ xanthine-xantine oxidase และอนุมูลไฮดรอกซิลทำให้เกิดขึ้นจาก fenton reaction เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Nagai *et al.* (2003) ซึ่งทำการศึกษาสารสกัดพรอพอลิสจากประเทศบราซิล พบว่าสารสกัดดังกล่าวสามารถยับยั้งอนุมูลทั้งสองได้ แต่อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของสารสกัดเริ่มต้นจากความเข้มข้น 1 mg/ml ถึง 100 mg/ml ซึ่งสูงกว่าความเข้มข้นของสารสกัดในการศึกษานี้มาก ซึ่งการเตรียมสารสกัดพรอพอลิสให้มีความเข้มข้นสูงนั้น ต้องทำการรวบรวมพรอพอลิสเริ่มต้นจากแหล่งต่างๆในปริมาณมาก จึงจะทำให้สามารถเตรียมความเข้มข้นสูงได้ ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าสารสกัดพรอพอลิสจากแพร่ที่ความเข้มข้นสูงอาจจะสามารถยับยั้งอนุมูลไฮดรอกซิลและซุปเปอร์ออกไซด์แอนอิออนได้ ซึ่งต้องมีการศึกษาต่อไป

# เอกสารอ้างอิง

## References of Literature cited


ทัศนีย์ พรหมสุข. 2552. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดพรอพอลิส ด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน. แพร่ : วิชาสัมมนา ชว 390, มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ.

นิธิยา รัตนาปนนท์. 2548. เคมีอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. หน้า 428.

พรสวรรค์ ต๊ะเสี้ยว. 2551. การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพรอพอลิส. แพร่ : วิชาสัมมนา ชว 390, มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ.

พัทยา พรหมมิ และ สุพรรณี รักษาพล. 2549. การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของพรอพอลิส. แพร่ : วิทยานิพนธ์ปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ.

ภัทราพรรณ พรหมแก้ว. 2552. ผลของสารสกัดพรอพอลิสในตัวทำละลายที่ต่างกัน. แพร่ : วิชาสัมมนา ชว 390, มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ.

รุ่งนภา กาวิชัย. 2551. อิทธิพลของวิธีการสกัดที่มีต่อสารต้านอนุมูลอิสระของพรอพอลิส. แพร่ : วิชาสัมมนา ชว 390, มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ.

รัตนา อินทราปกรณ์. 2547. การตรวจสอบและการแยกสารสำคัญจากสมุนไพร. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุภาพ บุณยะรัตเวช และ เกสร วีรชาโต. 2540. ปฏิบัติการเคมีอินทรีย์. พิมพ์ครั้งที่ 6. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. หน้า 56.

โอภา วัชรคุปต์ และคณะ. 2550. สารต้านอนุมูลอิสระ (radical scavenging agents). พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : บริษัทนิวไทยมิตรการพิมพ์ (1996) จำกัด.

Bankova V. ; M. Popova ; S. Bogdanov and A.G. Sabatini. 2005. Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. *Z Naturforsch.* 57c:530–3.

Burdock G. A. 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. Food and Chemical Toxicology. 36 : 347–363.

Chen C. ; C. Wu ; H. Shy and J. Lin. 2003. Cytotoxic Prenylflavanones from Taiwanese *Propolis. J. Nat. Prod. 66, 503-506.*

Cunha I. B. S. ; A. C. H. F. Sawaya, F. M. Caetano, M. T. Shimizu, M. C. Marcucci, F. T. Drezza, G. S. Povia and P. O. Carvalho. 2004. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. J Braz Chem Soc.15: 964-970.

Cuesta Rubio O. ; B.A. Frontana-Uriba ; T. Ramirez-Apan and J. Cardenas. 2002. Polyisoprenylated benzophenones in Cuban propolis; biological activity of nemorosone. *Z Naturforsch*.57c:372–8.

Cushnie, T. P. T. and J. L. Andrew. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *Journal of Antimicrobial Agents*. 26 : 343-356.

Gomez-Caravaca A.M.; M. Gomez-Romero ; D. Arraez-Roman ; A. Segura-Carretero and A. Fernandez-Gutierrez . 2006. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41:1220-1234.

Khezri, M. ; S.Postami ; R. S. Riseh and A. Alizadeh. 2006. Effect of Propolis and Clotrimazole on Controlling Aflatoxin in Pistachio. (Pistacia vera L.). *International journal of agriculture & biology*. 1560-8530.

Kosalec I., M. Bakmaz, S. Pepeljnjak and S. Vladimir-Knezevic. 2004. Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta Pharm*. 54 : 65 – 72.

Kujumgiev, A.; I. Tsvetkova ; Y. Serkedjieva ; V. Bankova ; R. Christov and S. Popov. 1999. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*. 64:235-40.

Kumazawa S. ; M. Yoned ; I. Shibata ; J. Kanaeda ; T. Hamasaka and T. Nakayama. 2003. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. Chem Pharm Bull. 51:740–2.

Kumazawa, S.; T. Hamasaka and T. Nakayama. 2004. Antioxidant of propolis of various geographic origins. Food Chem. 84,329-339.

Kumazawa, S.; R. Ueda; T. Hamasaka; S. Fukomoto; T. Fujimoto and T.Nakayama. 2007. Antioxidant prenylated flavonoids from propolis collected in Okinawa, Japan.J. Agric. Food Chem. 55, 7722–7725

Kumazawa S. ; J. Nakamura ; M. Murase ; M. Miyagawa ; M. Ahn and S. Fukumoto. 2008. Plant origin of Okinawan propolis: honeybee behavior observation and phytochemical analysis. Naturwissenschaften.DOI 10.1007/s00114-008-0383-y

Mankhetkorn, S. 2004. Spontaneous mitochondrial membrane potential change during apoptotic induction by quercetin in K562 and K562/adr cells. Journal *Physiol Pharmacol*. 82 : 1084-1090.

Marcucci, M.C. 1995. Propolis:chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*. 26 : 83-99.

Marcucci, M.C. and A.H. Banskota. 1999. Chemical composition, plant origin and biological activity of Brazillian propolis. *Curr Top Phytochem*. 2 ; 115-23.

Nagai T.; R. Inoue; H. Inoue and N. Suzuki. 2003. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. Food Chemistry. 80. 29–33

Sawaya, A. C. H. F., Sousa, K. S. Marcucci M. C., Cunha, I. B. S. and Shimizu, M. T. (2004). Analysis of the composition of brazilian propolis extracts by chromatography and evaluation of their *in vitro* acivity against gram-positive bacteria. *Brazillian Journal of Microbiology*. 35 : 104-109.

Salatino A. ; É. W. Teixeira ; G Negri and D. Message. 2005. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. eCAM. ;2(1)33–38.

Trusheva, B.; D. Trunkov. and V. Bankova. 2007. Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. Chemistry Central Journal. 1 : 13.