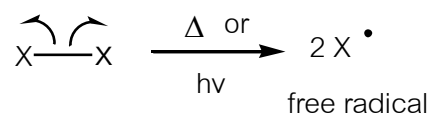


บทที่ 2

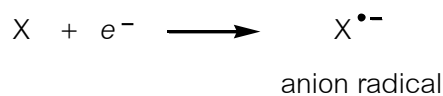
ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

อนุมูลอิสระ (free radical) หมายถึง อนุภาคทางเคมีที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวที่ไม่เข้าคู่อยู่ภายในอนุภาค (lone pair electron) เป็นอนุภาคที่ว่องไวต่อการทำปฏิกิริยาเคมี เพราะอนุมูลอิสระจะพยายามจับคู่อิเล็กตรอนกับอะตอมหรือโมเลกุลอื่น เพื่อเกิดเป็นสารประกอบที่มีเสถียรภาพทางเคมีดีขึ้น โดยปกติสามารถแบ่งชนิดของปฏิกิริยาและการเกิดอนุมูลอิสระได้ 3 ชนิด ดังนี้

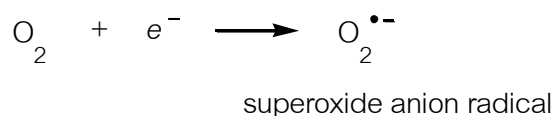
1. **อนุมูลอิสระ (free radical, $X^\bullet$)** เกิดจากการแตกหักพันธะของโมเลกุลแบบโฮโมลิติก (homolytic cleavage) โดยอาศัยความร้อนหรือแสง โดยที่อะตอมแต่ละข้างจะนำอิเล็กตรอนเดี่ยวไปด้วย 1 ตัว ทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้น 2 อะตอม ($2 X^\bullet$) เช่น การแตกหักพันธะของกลุ่มก๊าซฮาโลเจน (halogen gas) Cl_2 , Br_2 , I_2 และ F_2 เป็นต้น



2. **การเกิดอนุมูลประจุลบ (Anion radical, $X^{\bullet-}$)** เกิดจากการที่อะตอมหรือโมเลกุลรับอิเล็กตรอนเข้าไป 1 ตัว ทำให้เกิดอนุมูลประจุลบขึ้น (มีคุณสมบัติเป็นกลางทางไฟฟ้า)

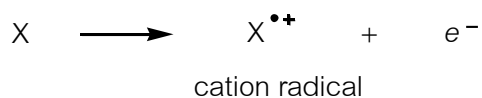


ตัวอย่าง เช่น โมเลกุลออกซิเจน (O_2) รับ 1 อิเล็กตรอนเข้าไปจะทำให้เกิด *Superoxide anion radical* ($O_2^{\bullet-}$) ดังสมการ

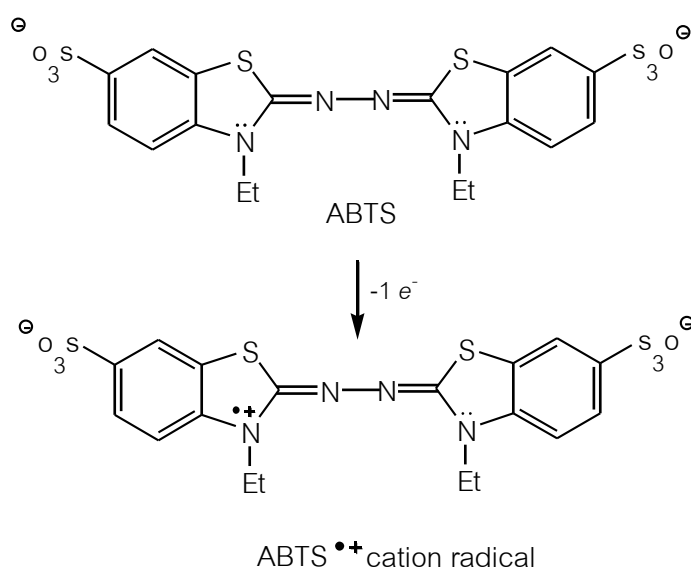


ซึ่งเป็นอนุมูลที่พบได้ง่ายในระบบสิ่งมีชีวิต

3. อนุมูลประจุบวก (Cation radical, $X^{\bullet+}$) เป็นอนุมูลที่เกิดจากอะตอมการที่อะตอมหรือโมเลกุลเสีย 1 อิเล็กตรอนออกไป นำไปสู่การเกิดอนุมูลประจุบวกเกิดขึ้น ดังสมการ



เช่น ABTS (2,2' – azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate]) หากเสีย 1 อิเล็กตรอนจะนำไปสู่ $ABTS^{\bullet+}$ cation radical



อนุมูลอิสระสามารถแบ่งออกได้ 3 ประเภท ดังนี้

1. กลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (Reactive Oxygen Species, ROS)

ได้แก่

$O_2^{\bullet-}$	superoxide anion radical
$HO^{\bullet}$	hydroxyl radical
$HOO^{\bullet}$	hydroperoxyl radical
$ROO^{\bullet}$	peroxyl radical
$RO^{\bullet}$	alkoxyl radical

2. กลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (Reactive Nitrogen Species, RNS)

ได้แก่

$\text{NO}^\bullet$	nitric oxide
$\text{NO}_2^\bullet, \text{NO}_2^{-\bullet}$	nitrogen dioxide
ONOO^-	peroxynitrite

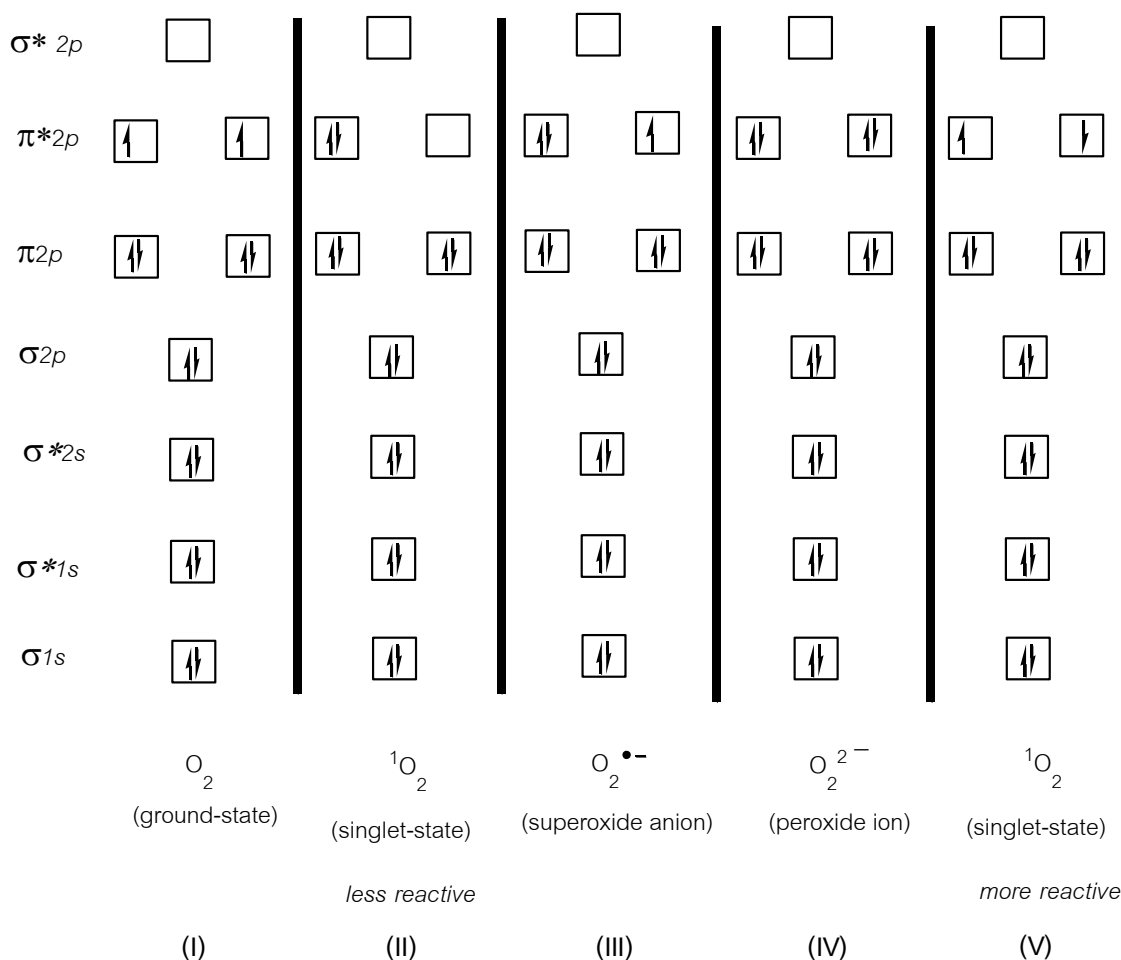
3. สารกลุ่มอื่น (Others) ได้แก่

$\text{Cl}^\bullet$	chlorine radical
$\text{RS}^\bullet$	thiyl radical
$^1\text{O}_2$	singlet oxygen

กรณี $^1\text{O}_2$ ไม่นับเป็นอนุมูลอิสระ แต่มีความว่องไวต่อปฏิกิริยาเคมีสูงมาก เนื่องจากไม่มีอิเล็กตรอนเดี่ยว (ซึ่งจะได้กล่าวต่อไป) ในที่นี้จะขอเน้นกลุ่มที่มีออกซิเจนและไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบหลัก เพราะมีความเกี่ยวข้องกับระบบทางชีววิทยาค่อนข้างมาก

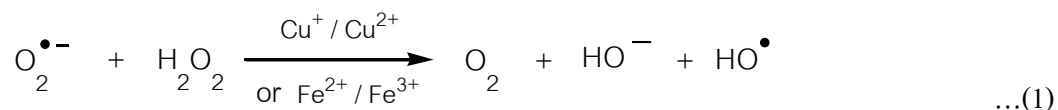
2.1 อนุมูลอิสระที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (ROS) (โอภา วัชรคุปต์ และคณะ, 2006)

ปกติโมเลกุลออกซิเจน (O_2) จะสามารถถูกกระตุ้นให้อยู่ในรูปที่ว่องไวต่อปฏิกิริยาเคมีได้ 2 แบบ คือ กรณีโมเลกุลออกซิเจน (O_2) รับอิเล็กตรอนเข้าไป จะนำไปสู่ superoxide anion radical ($\text{O}_2^{-\bullet}$) และหากรับเข้ามาอีก 1 อิเล็กตรอนจะนำไปสู่ peroxide ion (ภาพที่ 1) และอีกกรณีคือ โมเลกุลออกซิเจนถูกกระตุ้นให้เปลี่ยนแปลงจาก triplet ground state (I) ไปสู่ singlet state (V) (ภาพที่ 1) ซึ่งอิเล็กตรอนเดี่ยวอยู่ต่าง orbital กันและมี spin ตรงกันข้ามทำให้ $^1\text{O}_2$ singlet (V) มีความว่องไวต่อปฏิกิริยาเคมี ส่วน $^1\text{O}_2$ singlet (II) จะว่องไวต่อปฏิกิริยาเคมีน้อยกว่า เพราะอิเล็กตรอนเข้าคู่และอยู่ใน orbital เดียวกัน อนุมูล $\text{O}_2^{-\bullet}$ มีบทบาทในระบบสิ่งมีชีวิตและสามารถทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 นำไปสู่อนุมูล $\text{HO}^\bullet$ ในปฏิกิริยา “Haber – Weiss” (สมการ 1) โดยอาศัย

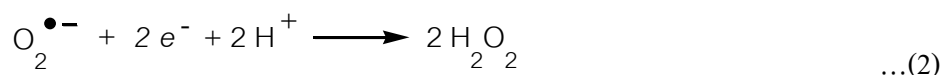


ภาพที่ 1 แสดง molecular orbital ของโมเลกุลคู่ของออกซิเจน

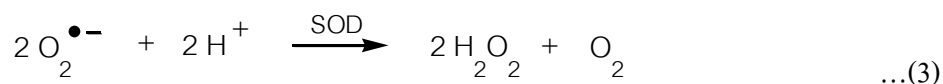
ไอออนโลหะ Cu^+ / Cu^{2+} หรือ Fe^{2+} / Fe^{3+} เป็น catalyst ซึ่ง $HO^\bullet$ มีความเป็นพิษสูง มีค่าครึ่ง



ชีวิตประมาณ ($t_{1/2}$) ~ 1 ns ที่ $37^\circ C$ (Gutteridge and Halliwell, 1994) สามารถทำอันตรายต่อเซลล์ในร่างกายมนุษย์ได้มาก เช่น ทำลาย DNA (D' Odorico *et al.*, 2001) เกิด protein oxidation (Mat and Blanca, 2000) และก่อให้เกิด lipid peroxidation (Stohs, 1995) โดยปกติ $O_2^{\bullet -}$ ที่เกิดขึ้นมักจะถูกกำจัดตามธรรมชาติ โดยทำปฏิกิริยากับ e^- และ H^+ นำไปสู่ hydrogen peroxide (H_2O_2) (สมการ 2)

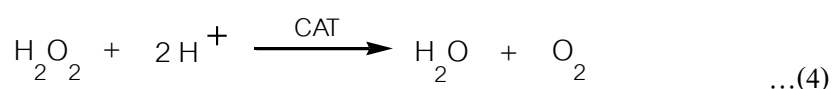


และบางส่วนต้องอาศัยเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ช่วยในการสลายตัวไปเป็น H_2O_2 และ O_2 (สมการ 3)



2.1.1 Hydrogen peroxide (H_2O_2) (Ahmad, 1995)

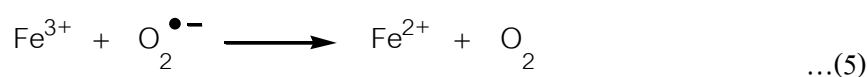
H_2O_2 ไม่ใช่อนุมูลอิสระ แต่เป็นสารตั้งต้นจะนำไปสู่ $\text{HO}^\bullet$ ได้ (ดังสมการ 1) เป็นสารที่ว่องไวต่อปฏิกิริยาเคมีระดับปานกลางและสามารถลอดผ่านผนังเซลล์ได้ดี โดยพบว่าเมื่อหายใจเอา H_2O_2 เข้าไปจะทำให้เซลล์ปอดเกิดการตายเฉพาะส่วนของเนื้อเยื่อ (Morio *et al.*, 2001) อย่างไรก็ตามในร่างกายจะมีเอนไซม์ catalase (CAT) ที่ทำหน้าที่เปลี่ยน H_2O_2 ไปเป็นน้ำและออกซิเจนได้ (สมการ 4)



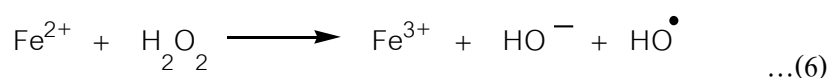
2.1.2 Hydroxyl Radical ($\text{HO}^\bullet$)

เป็นอนุมูลอิสระที่เป็นพิษกับร่างกายมากที่สุด เกิดขึ้นโดยผ่าน “ปฏิกิริยา Fenton” 2 ขั้นตอน

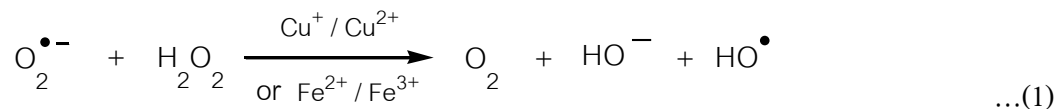
1. $\text{O}_2^{\bullet-}$ ให้ e^- แก่ไอออนโลหะทรานซิชัน เช่น Fe^{3+} หรือ Cu^{2+}



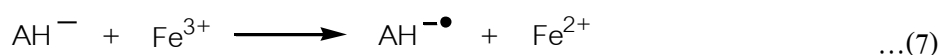
2. H_2O_2 ทำปฏิกิริยากับไอออนโลหะของสมการ 5 นำไปสู่อนุมูล $\text{HO}^\bullet$



หากรวมสมการ 5 และ 6 เข้าด้วยกันจะได้สมการ Haber – Weiss (สมการ 1)



Fe^{3+} จากสมการ 6 สามารถเกิดปฏิกิริยากับ ascorbate (AH^-) ได้ (สมการ 7)



ซึ่งเป็นการขัดขวางการเกิด $\text{HO}^\bullet$ นั้นเอง

2.1.3 Peroxyl Radical ($\text{ROO}^\bullet$)

เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นกับพวกกรดไขมันไม่อิ่มตัว (Polyunsaturated Free Fatty Acid, PUFAs) ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation โดยประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นที่ 1 ขั้นเริ่มต้น (Initiation step) กรดไขมัน (R-H) จะทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ (เช่น $\text{HO}^\bullet$) ที่เกิดขึ้นในร่างกาย นำไปสู่ alkoxyl radical ($\text{R}^\bullet$)



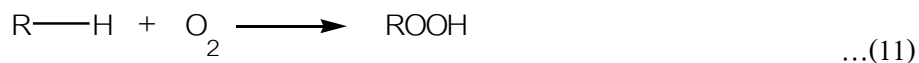
ขั้นที่ 2 ขั้นแพร่กระจาย (Propagation step), O_2 จะทำปฏิกิริยาการเพิ่มที่ $\text{R}^\bullet$ ทำให้เกิด peroxyl radical ($\text{ROO}^\bullet$) (สมการ 9)



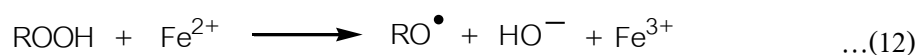
$\text{ROO}^\bullet$ จะไป abstract ไฮโดรเจนอะตอมจาก R-H ทำให้เกิด $\text{R}^\bullet$ (สมการ 10) ซึ่งจะไปเริ่มต้นปฏิกิริยา (สมการ 9) อีกครั้ง



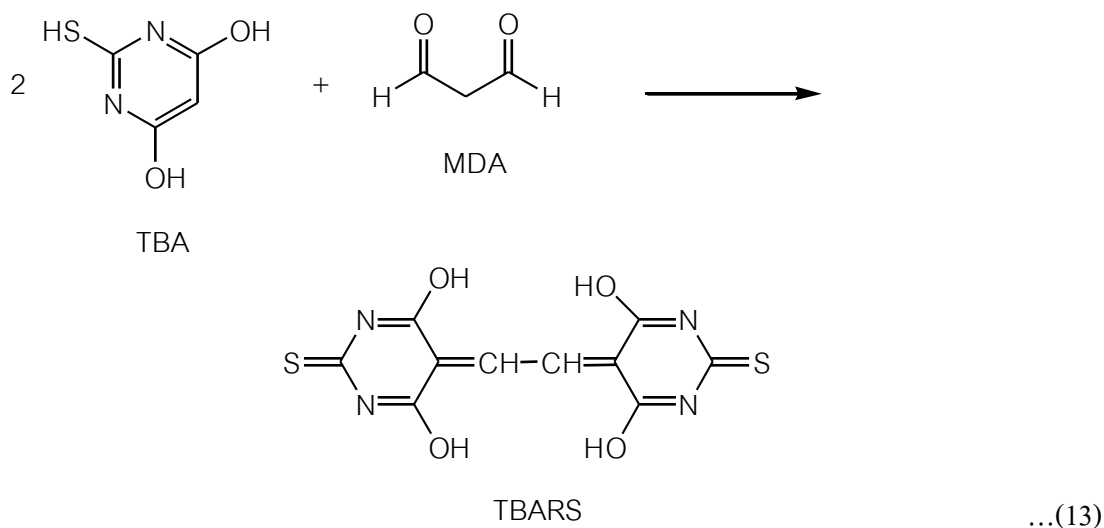
รวมสมการ 9 และ 10 เข้าด้วยกันจะได้



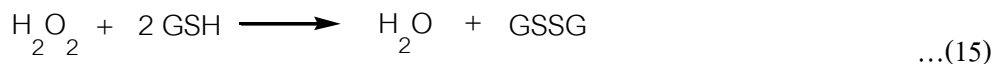
ROOH เป็นสารที่มีเสถียรภาพในร่างกาย แต่หากมีไอออนโลหะ เช่น Fe^{2+} จะทำให้ไอออนโลหะไปออกซิไดซ์ ROOH เกิดเป็น $\text{RO}^\bullet$ (สมการ 12) และเข้าสู่ขั้นตอนการแพร่กระจายอีกครั้ง



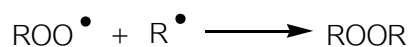
ROOH สามารถสลายตัวไปเป็นสารประกอบต่าง ๆ มากมายรวมทั้ง malondialdehyde (MDA) ที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับ thiobarbituric acid (TBA) ได้สารมีสี คือ thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) ดังนั้น การตรวจวัด MDA จึงเป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจสอบการเกิด lipid peroxidation ที่ค่อนข้างหนึ่ง เนื่องจากวิธีการวัดง่ายและเสียค่าใช้จ่ายน้อย (สมการ 13)



ในร่างกายมีเอนไซม์ glutathione peroxidase (GPX) ช่วยขจัด ROOH และ H_2O_2 โดยมี reduced glutathione (GSH) อยู่ด้วย (สมการ 14, 15)

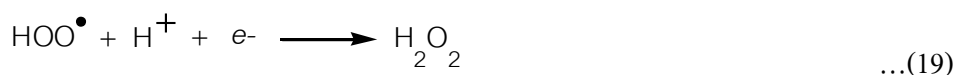


ขั้นที่ 3 ขั้นสิ้นสุดปฏิกิริยา (Terminating step) $\text{R}^\bullet$ จะ combined เข้าด้วยกันนำไปสู่โมเลกุลที่เป็นกลาง



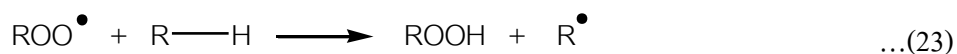
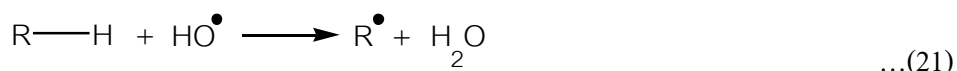
การเกิดอนุภาคที่เป็นพิษของออกซิเจน (Oxygen Radical Cascade)

ออกซิเจนจะถูกกระตุ้นด้วยปฏิกิริยาการส่งผ่านอิเล็กตรอน (electron transferred) แหล่งที่กำเนิด $\text{O}_2^{\bullet-}$ ได้แก่ catecholamines, ubihydroquinone และ oxidoreductases ได้แก่ hemoprotein และ เอนไซม์ flavin $\text{O}_2^{\bullet-}$ ที่เกิดดูเหมือนจะเกิดขึ้นในส่วน subcellular ได้แก่ cytosol, mitochondria, endoplasmic reticulum, nuclei และยังเกิดใน chloroplast ของพืชอีกด้วย $\text{O}_2^{\bullet-}$ จะอยู่ในสมดุลกับ hydroperoxide ($\text{HOO}^\bullet$) (สมการ 18) และเกิด dismutation ไปสู่ H_2O_2 (สมการ 19) ซึ่ง H_2O_2 จะสลายตัวโดยมีไฮดรอกซิลไอออนช่วย catalyzed ทำให้เกิด HO^- และ $\text{HO}^\bullet$ (สมการ 20)



2.1.4 Lipid peroxidation

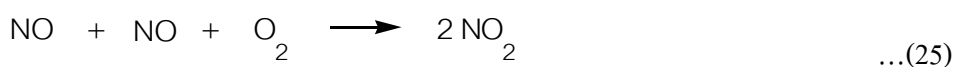
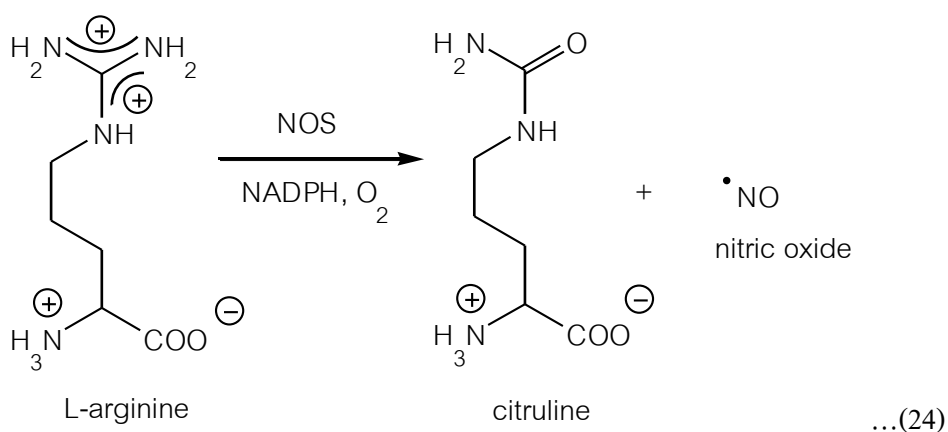
กรดไขมันไม่อิ่มตัว (PUFAs) สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (lipid peroxidation) ที่พอสรุปปฏิกิริยาได้ ดังนี้



2.2 อนุมูลอิสระที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (RNS)

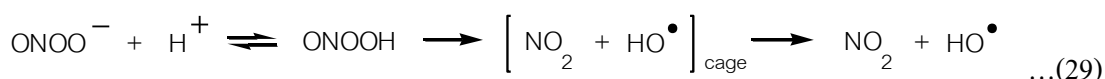
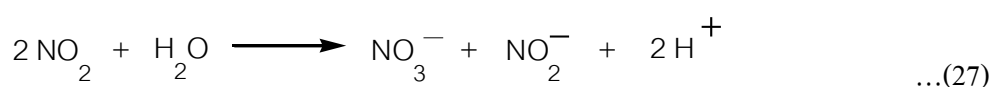
2.2.1 Nitric oxide ($^\bullet NO$ หรือ NO)

เป็นก๊าซไม่มีสี เป็น mild reducing agent มีค่าครึ่งชีวิต 1-10 s มีคุณสมบัติ paramagnetic ในร่างกายเกิดจากปฏิกิริยาการเปลี่ยน L-arginine ไปเป็น citrulline โดยใช้เอนไซม์ Nitric Oxide Synthase (NOS) (สมการ 24) NO สามารถเกิดปฏิกิริยา disproportionation โดยมี O_2 ร่วมอยู่ด้วยจะนำไปสู่ NO_2 ซึ่งเป็นก๊าซสีน้ำตาล เป็นพิษ และเป็น strong oxidizing agent (สมการ 25) (Moncada *et al.*, 1988) แต่หาก NO ทำปฏิกิริยากับ $O_2^{\bullet -}$ จะได้ผลิตภัณฑ์เป็น peroxynitrite ($ONOO^-$) (สมการ 26) (Blough and Zafiriou, 1985; Saran *et al.*, 1990)





สารผลิตภัณฑ์ NO_2 ในสมการ 25 ที่เกิดขึ้นสามารถเกิด disproportionation ในสารละลาย aqueous นำไปสู่ nitrate (NO_3^-) ได้ (สมการ 27) ส่วน ONOO^- จากสมการ 26 จะเปลี่ยนไปเป็น NO_3^- (สมการ 28) หรือทำปฏิกิริยากับ H^+ นำสู่ ONOOH ซึ่งจะสลายตัวต่อไปเป็น NO_2 และ $\text{HO}^\bullet$ (Beckman, 1990) และหลุดออกจาก solvent cage ประมาณ 40% (สมการ 29) (Yang *et al.*, 1992)



NO มีบทบาทในการยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือด (platelet aggregation) (Mellion, 1981)

2.2.2 Peroxynitrite (ONOO^-)

สามารถสร้างขึ้นจาก macrophage ที่ถูกกระตุ้นด้วย neutrophils เป็นสารที่มีความเป็นพิษสูง แต่มีความจำเพาะจะจงในการการเกิดปฏิกิริยากับเซลล์บางชนิดของร่างกาย มีฤทธิ์ทำลาย DNA ไขมัน โปรตีนในร่างกายได้ และยังเปลี่ยนเป็น $\text{HO}^\bullet$ เพื่อเริ่มกระบวนการ lipid peroxidation นอกจากนี้ยังสามารถทำให้เกิดการคลายตัวของหลอดเลือดและยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือด ONOO^- สามารถทำปฏิกิริยากับ glutathione และ cysteine ทำให้เกิด thiyl radical ($\text{RS}^\bullet$) สามารถทำปฏิกิริยา nitration กับ tyrosine ที่ตำแหน่ง *para*- ทำให้โปรตีนเสียสภาพและเกิดการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา phosphorylation และ ONOO^- ยังสามารถปฏิกิริยากับหมู่ sulphydryl, หมู่ zinc-thiolate และโมเลกุลของโปรตีนทำให้โปรตีนเสียสภาพการทำงานไป

อย่างไรก็ตาม ร่างกายมีกลไกปกป้องโดยใช้เอนไซม์ SOD ไปกำจัด $\text{O}_2^{\bullet-}$ ก่อนที่ NO จะไปทำปฏิกิริยากับ $\text{O}_2^{\bullet-}$ (สมการ 3)

2.3 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant agent)

ในสิ่งมีชีวิตที่อาศัยออกซิเจน (aerobic) ร่างกายจะตกอยู่ในสภาวะที่ออกซิเจนเกิดเป็นพิษได้ตลอดเวลา เช่น การที่โมเลกุลออกซิเจนถูกกระตุ้นให้เกิด $O_2^{\bullet-}$ หรือการเกิด H_2O_2 , $HO^{\bullet}$ เป็นต้น ซึ่งเป็นอนุภาคที่เป็นพิษทั้งสิ้น ดังนั้น เมื่อร่างกายใช้ประโยชน์จากออกซิเจนแล้วก็ต้องมีกลไกในการจัดการอนุภาคที่เป็นพิษของออกซิเจนด้วย แบ่งออกได้ 2 ชนิด

2.3.1 กลไกโดยเอนไซม์ (Primary antioxidant enzymes) เอนไซม์ที่สามารถลดปริมาณ $O_2^{\bullet-}$ สรุปได้ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (primary antioxidant enzymes)

Enzymes	Systematic Name	EC Number
Superoxide dismutase	Superoxide: superoxide dismutase	
	hydroperoxidase	1.15.1.1
Cytochrome- <i>c</i> peroxidase	Ferrocycytochrome- <i>c</i> : hydrogen-peroxide oxidoreductase	
Catalase	Hydrogen-peroxide: hydrogen-peroxide oxidoreductase	1.11.1.6
Alkyl hydroperoxidase	Not established	Not established
Peroxidase	Donor: hydrogen-peroxide Oxidoreductase	1.11.1.7
Ascorbate peroxidase	L-ascorbate: hydrogen -peroxide oxidoreductase	1.11.1.11
	Glutathione peroxidase	
Glutathione peroxidase (selenium dependent)	Glutathione: hydrogen -peroxide oxidoreductase	1.11.1.9
Glutathione transferase	RX: Glutathione <i>s</i> - transferase	2.5.1.18

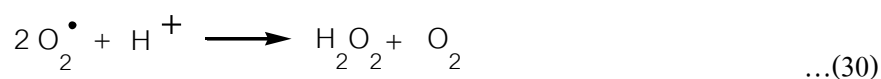
ตารางที่ 1. แสดงเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (primary antioxidant enzymes) (ต่อ)

Enzymes	Systematic Name	EC Number
Glutathione reductase		
Glutathione reductase	NAD(P)H: oxidized-glutathione oxidoreductase	1.6.4.2

(Ahmad S, 1995)

1. Superoxide dismutase (SOD)

ปฏิกิริยา dismutation ของ $O_2^{\bullet -}$ เกิดขึ้นที่ pH 7.8 ดังสมการ (Fridovich I, 1989)

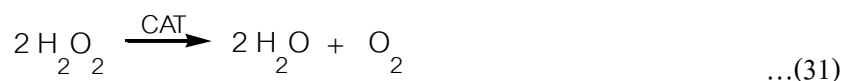


2. Hydorperoxidases

เป็นเอนไซม์ที่สลาย hydroperoxide (ROOH) หรือ H_2O_2

2.1 Catalase (CAT)

ทำหน้าที่ต่อจาก SOD เพื่อสลาย H_2O_2 (Chance, 1979)



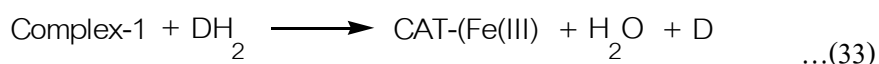
2.2 Alkyl hydroperoxidase

บางครั้งเรียกว่า “AHP reductase” ทำหน้าที่รีดิวส์ alkyl hydroperoxide (ROOH) ไปเป็น alcohol (ROH)

2.3 Peroxidase (HRP or POD)

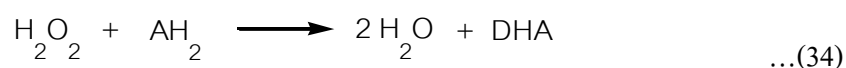
ทำหน้าที่สลาย H_2O_2 และ reductant ต่าง ๆ (DH_2 เช่น mono-, dihydroxyalcohol, phenol, dihydroquinone amine เป็นต้น) ดังสมการ





2.4 Ascorbate peroxidase (AP) (Grondon and Beck, 1979)

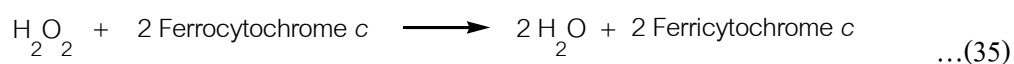
AH_2 ทำหน้าที่ขจัด H_2O_2 โดยมี ascorbate ร่วมอยู่ด้วย



ซึ่ง AH_2 จะถูกรีดิวซ์ให้กลายเป็น dehydroascorbate (DHA) ดังสมการ 34 เราพบ AP ในพืชแต่ยังไม่พบในสัตว์และ fungi

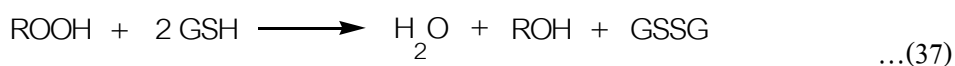
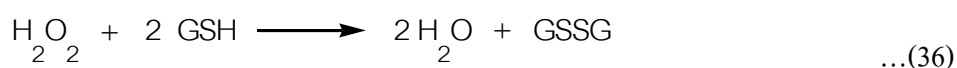
2.5 Cytochrome-c peroxidase (CCP)

CCP พบใน fungi ทำหน้าที่สลาย H_2O_2 (สมการ 35)



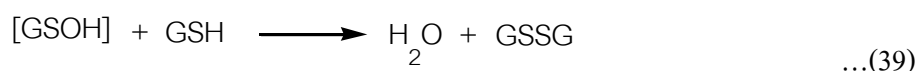
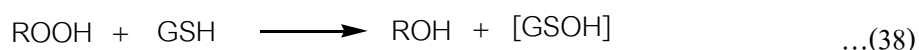
3. Glutathione peroxidases (GPX)

เป็นเอนไซม์ทำหน้าที่รีดิวซ์ H_2O_2 และ alkyl peroxide (ROOH) ไปเป็นน้ำและ alcohol ตามลำดับ (สมการ 36, 37) โดยอาศัย glutathione (GSH) เป็นตัวให้ไฮโดรเจนเพื่อเร่งปฏิกิริยาเคมี

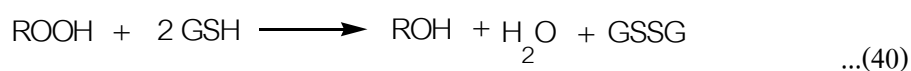


4. Glutathione transferase or Glutathione-S-transferase (GST)

GST จะลด oxidative stress โดยทำหน้าที่เป็น peroxidase activity (GSTpx) เพื่อรีดิวซ์ ROOH ในสองขั้นตอน (สมการ 38, 39)

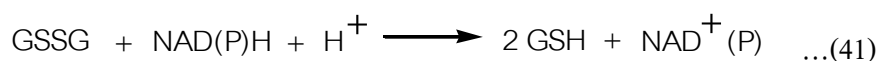


รวมสมการ 38 และ 39 เข้าด้วยกันจะได้สมการ 40 (overall reaction)



5. Glutathione reductase (GR)

ช่วยในการเปลี่ยน reduced glutathione (GSSG) กลับมาเป็น active form ของ glutathione (GSH) ดังสมการ 40



2.3.2 กลไกโดยอาศัยโปรตีน (Antioxidant protein) ได้แก่

1. Albumin

สามารถจับกับ Cu ได้ดี และกำจัด $\text{HO}^\bullet$ และลด lipid peroxidation

2. Transferrins

เป็นโปรตีนขนส่ง Fe (iron transport protein) ส่งผลให้ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation และการสร้าง $\text{HO}^\bullet$ (Halliwell and Gutteridge, 1985) โดยทำงานร่วมกับ ferritin

3. Ferritins

เป็นโปรตีนสะสม Fe ทำงานร่วมกับ transferrin เพื่อลด Fe อิสระใน plasma / serum และ intracellular ทำให้ Fe ถูกควบคุมไว้ได้

4. Metallothioneins

เป็นโปรตีนจับไอออนโลหะและทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) (Halliwell and Gutteridge, 1990)

5. Ceruloplasmin (CP)

ferritinase ทำหน้าที่เปลี่ยน Fe(II) ไปเป็น Fe(III) และ CP ยังทำงานร่วมกับ Fe ใน ferritin และเป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ

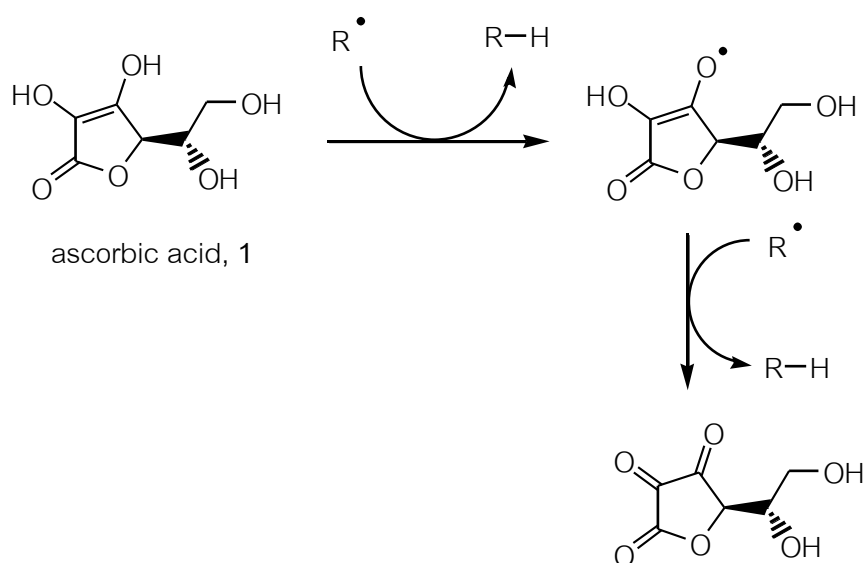
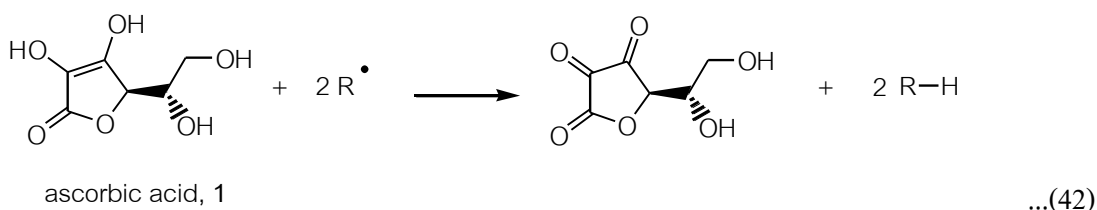
2.3.3 กลไกโดยอาศัยสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (Natural Products

Antioxidant)

เป็นที่ยอมรับโดยทั่วกันว่าอนุมูลอิสระก่อให้เกิดโรคหลายชนิด เช่น โรคในระบบหัวใจและหลอดเลือด (atherosclerosis disease) โรคหัวใจ (cardiovascular disease) หรือมะเร็ง (cancer) เป็นต้น Frei, B. (1994) ได้ทำการศึกษาการป้องกันโรคมะเร็งและโรคเกี่ยวกับหัวใจและหลอดเลือด โดยให้กลุ่มทดสอบได้รับสารอาหารเสริมที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant supplements) พบว่าสามารถช่วยขจัดอนุมูลอิสระและสามารถช่วยให้ร่างกายป้องกันโรคต่าง ๆ ได้ โดยที่อาหารเสริมเหล่านั้นไม่มีผลข้างเคียงที่รุนแรงต่อร่างกายและมีความเป็นพิษต่อร่างกายน้อยมาก สารต้านอนุมูลอิสระสามารถพบในพืชผักผลไม้ ซึ่งสามารถพอกกล่าวสรุปได้ ดังนี้

1. วิตามิน ซี (Vitamin C)

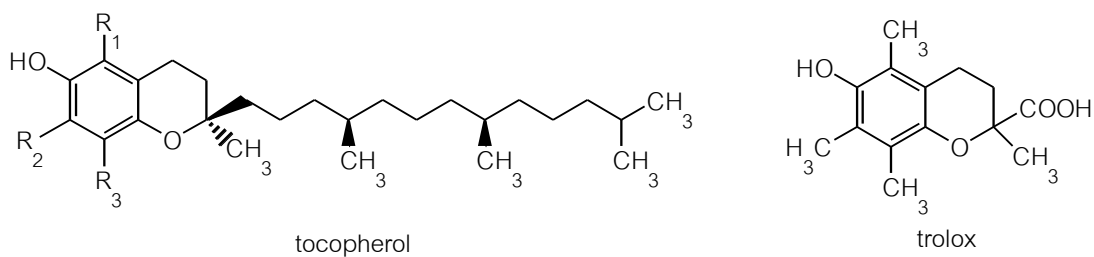
สามารถทำปฏิกิริยาหยุดอนุมูลอิสระในอัตราส่วน 2 : 1 ดังสมการ 42 กลไกการเกิดปฏิกิริยาแสดงดังภาพที่ 2 (Molymex P, 2003)



ภาพที่ 2 กลไกการต้านอนุมูลอิสระของวิตามิน ซี

2. วิตามิน อี (α -tocopherol)

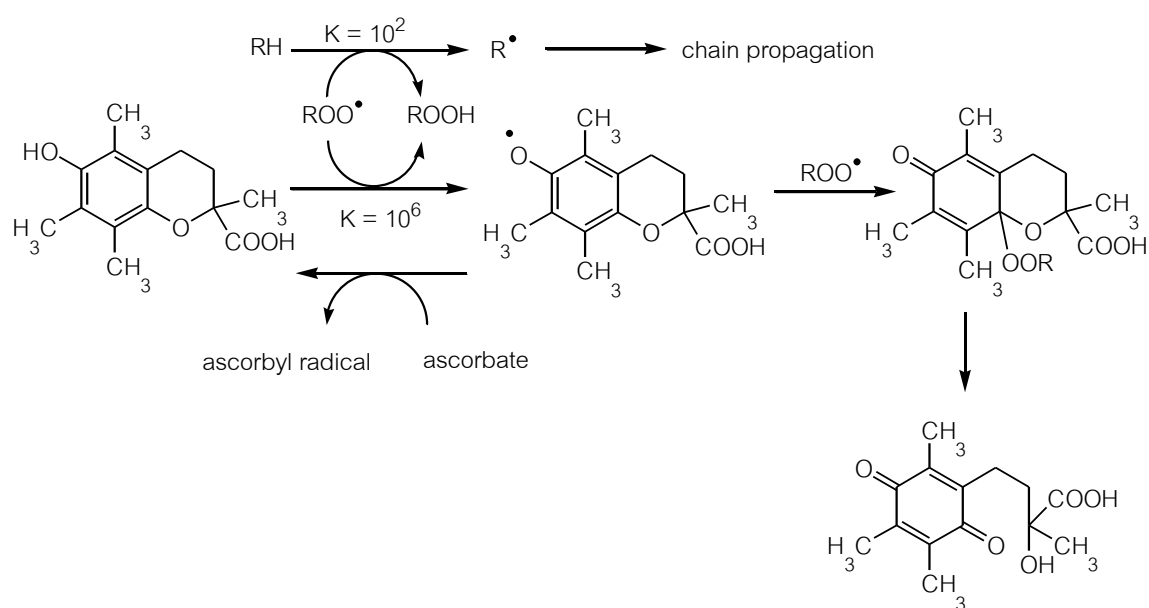
เป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยจะไปหยุด lipid peroxidation ซึ่ง α -tocopherol มีสารอนุพันธ์ β , γ และ δ - (ภาพที่ 3) ในการยับยั้ง peroxy radical พบว่าลำดับความว่องไวการเกิดปฏิกิริยา คือ $\alpha > \beta > \gamma > \delta$ - ตามลำดับ จากโครงสร้างทำให้วิตามิน อี ละลายได้ดีในชั้นไขมันแต่ไม่ละลายน้ำ จึงมีการแทนที่หมู่ $C_{16}H_{33}$ ด้วย $-COOH$ (trolox) เพื่อให้ละลายน้ำได้ดียิ่งขึ้น



Class	R ₁	R ₂	R ₃	Source
α -tocopherol	CH ₃	CH ₃	C ₁₆ H ₃₃	sunflower oil, and olive oil
β -tocopherol	CH ₃	H	C ₁₆ H ₃₃	corn oil
γ -tocopherol	H	CH ₃	C ₁₆ H ₃₃	soja rape and maize oil
δ -tocopherol	H	H	C ₁₆ H ₃₃	maize oil

ภาพที่ 3 โครงสร้างวิตามิน อีและสารอนุพันธ์

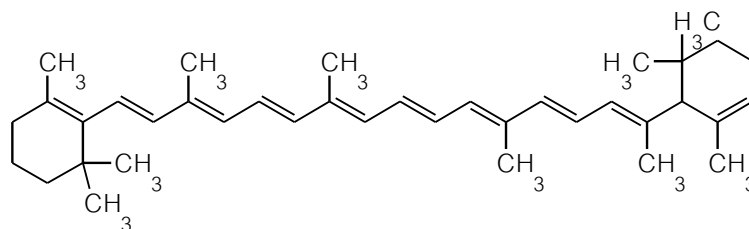
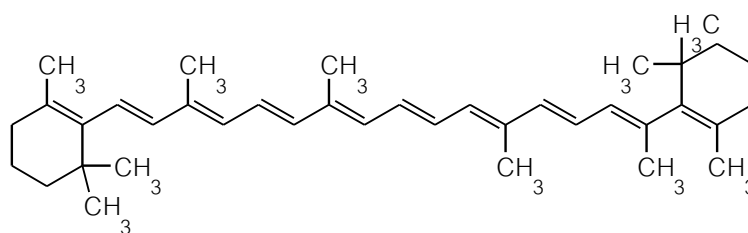
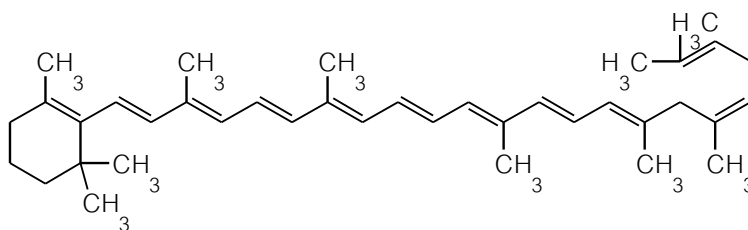
สาร trolox สามารถยับยั้ง lipid peroxidation (ภาพที่ 4) และสามารถคืนรูปโดยใช้ วิตามิน ซี (ascorbate) ช่วย (David *et al.* 1988)



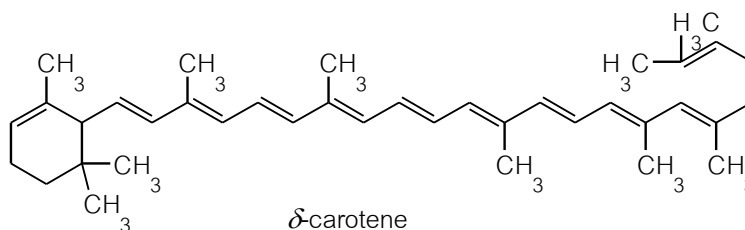
ภาพที่ 4 ปฏิกริยาร่วมระหว่าง trolox และ วิตามิน ซี ในการต้านอนุมูลอิสระ

3. β -carotene

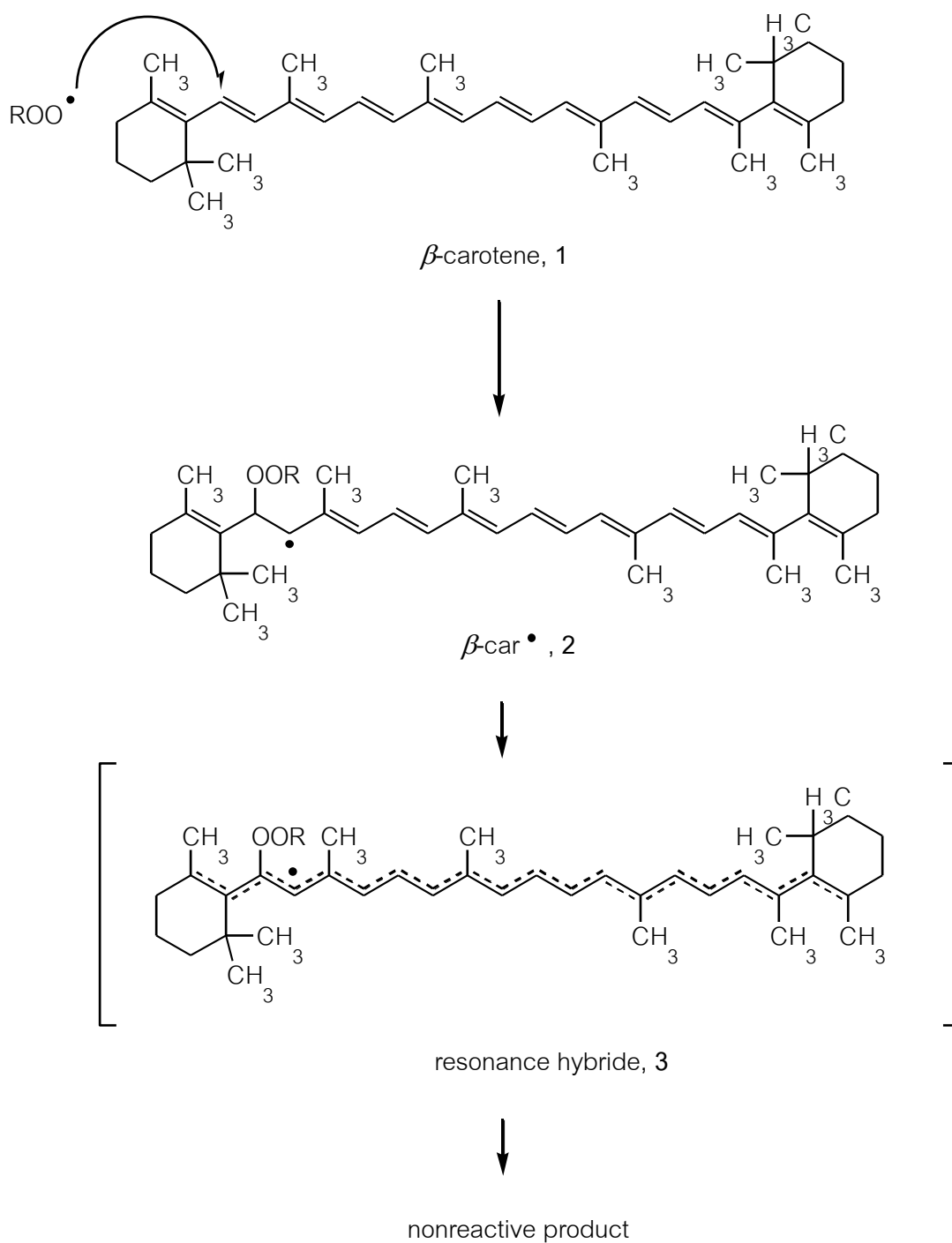
carotenoid เป็นสารมีสี มีอนุพันธ์ คือ α -, β -, γ - และ δ -carotene (ภาพที่ 5) β -carotene มี π -conjugation มากที่สุดจึงสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งพวก $\text{ROO}^\bullet$ ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (O_2) β -carotene radical ($\beta\text{-car}^\bullet$) ที่เกิดขึ้นจะเปลี่ยนเป็น inactive product (ภาพที่ 6) (ไมตรี สุทธจิตต์, 2541) แต่หากในปฏิกิริยามีออกซิเจนอยู่ด้วย จะทำให้เกิดปฏิกิริยาการเพิ่ม (addition) ของออกซิเจนนำไปสู่ $\text{-car-OO}^\bullet$ ซึ่งเป็นอินเทอร์มีเดียตในขั้นตอน propagation ของปฏิกิริยาลูกโซ่ ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันต่อเนื่องต่อไป (สมการ 43) (Roberfoide M and Calderon P B, 1995)

 α -carotene β -carotene

γ -carotene

 δ -carotene

ภาพที่ 5 โครงสร้าง carotenoids



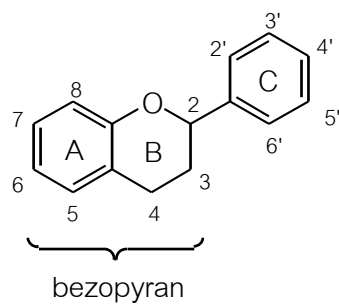
ภาพที่ 6 แสดงการจับอนุมูลอิสระของ β -carotene



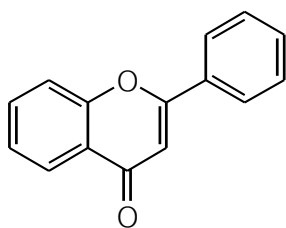
...(43)

4. Flavonoids (โอภา วัชรคุปต์, 2549 และ ไมตรี สุทธิจิตต์, 2541)

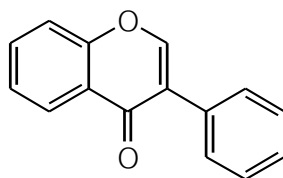
เป็นกลุ่มสารประกอบด้วยคาร์บอน 15 อะตอมจัดเรียงกันเป็น 3 วง ประกอบด้วยวง A, B (benzopyran) และ C (benzene ring) ตามลำดับ



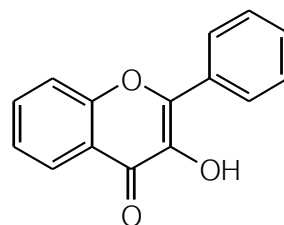
flavonoids มีสารอนุพันธ์และกลุ่มโครงสร้างหลักที่สำคัญ ดังนี้



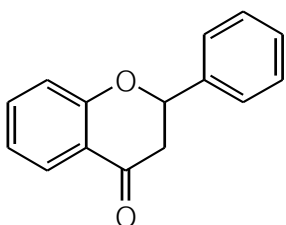
flavones



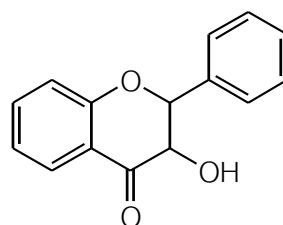
isoflavones



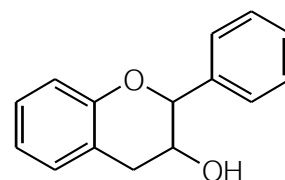
flavonols



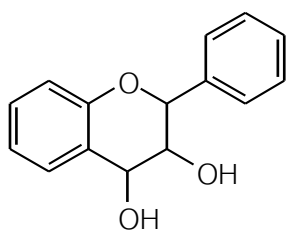
flavanones



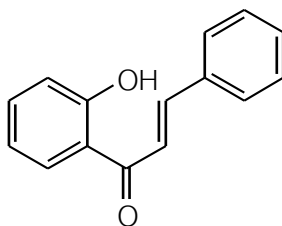
dihydroflavonols



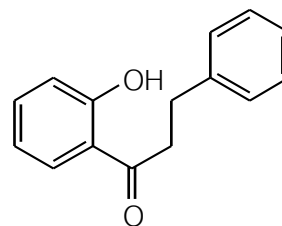
flavan-3-ol
(catechin)



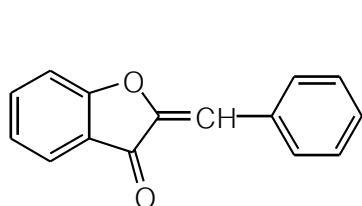
flavan-3,4-diols
(leucoanthocyanidins)



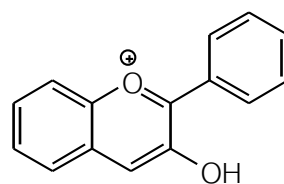
chalcones



dihydrochalcones

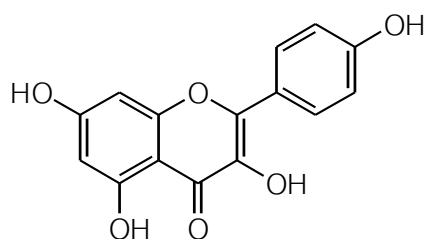


aurones

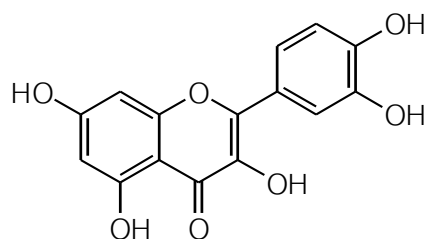


anthocyanidins

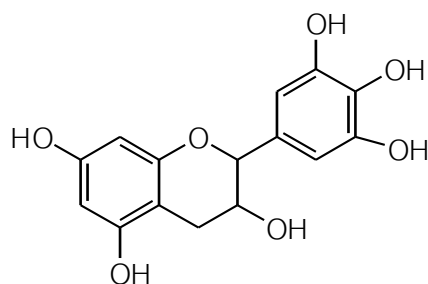
การแทนที่หมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl) ที่ตำแหน่งต่าง ๆ ในวงจะทำให้เกิดสารประกอบที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้แตกต่างกันออกไปโดยอาจแสดงในเทอมของค่า TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Activity) เช่น kaempferol (4), quercetin (5), catechin (6), eligallocatechin (EGC, 7) เป็นต้น



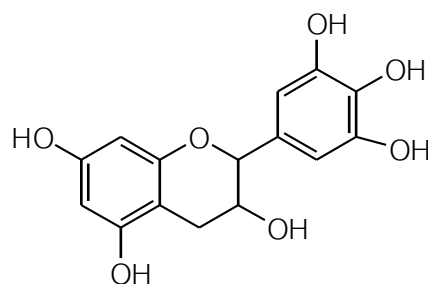
kaempferol, 4
(TEAC 1.34 mM)



quercetin, 5
(TEAC 4.7 mM)



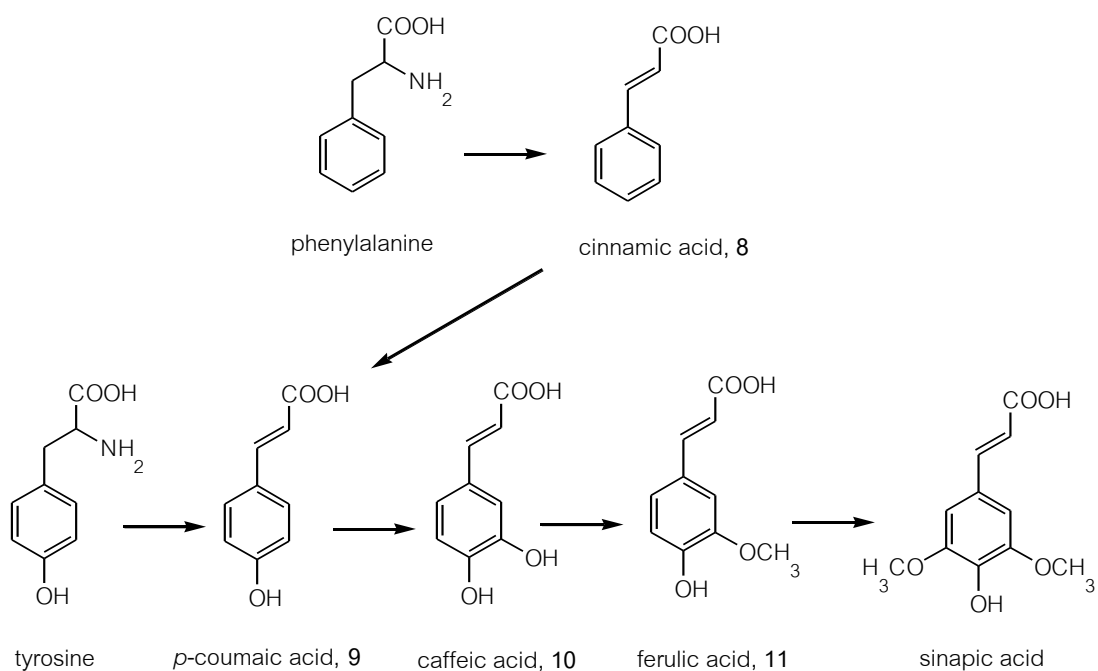
catechin, 6
(TEAC 2.4 mM)



epigallocatechin EGC, 7
(TEAC 3.82 mM)

5. Phenolic acids (โอภา วัชรกุลป์, 2549)

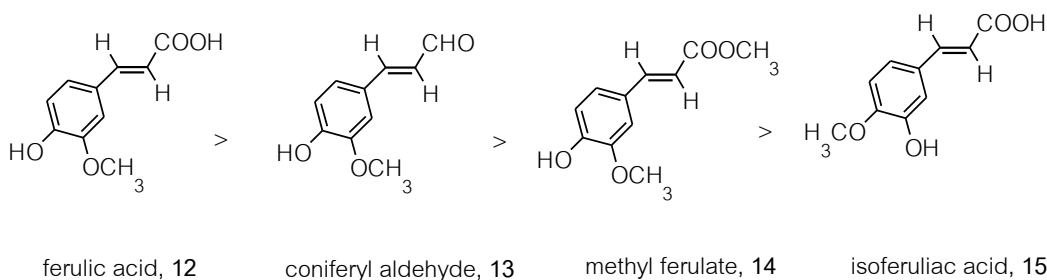
เป็นสารที่พบมากในพืช ได้แก่ cinnamic acid (8), *p*-coumaric acid (9), caffeic acid (10), ferulic acid (11) ซึ่งขบวนการ biosynthesis โดยเริ่มต้นจาก phenylalanine หรือ tyrosine ดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 แสดง biosynthesis ของ phenolic acids บางชนิด

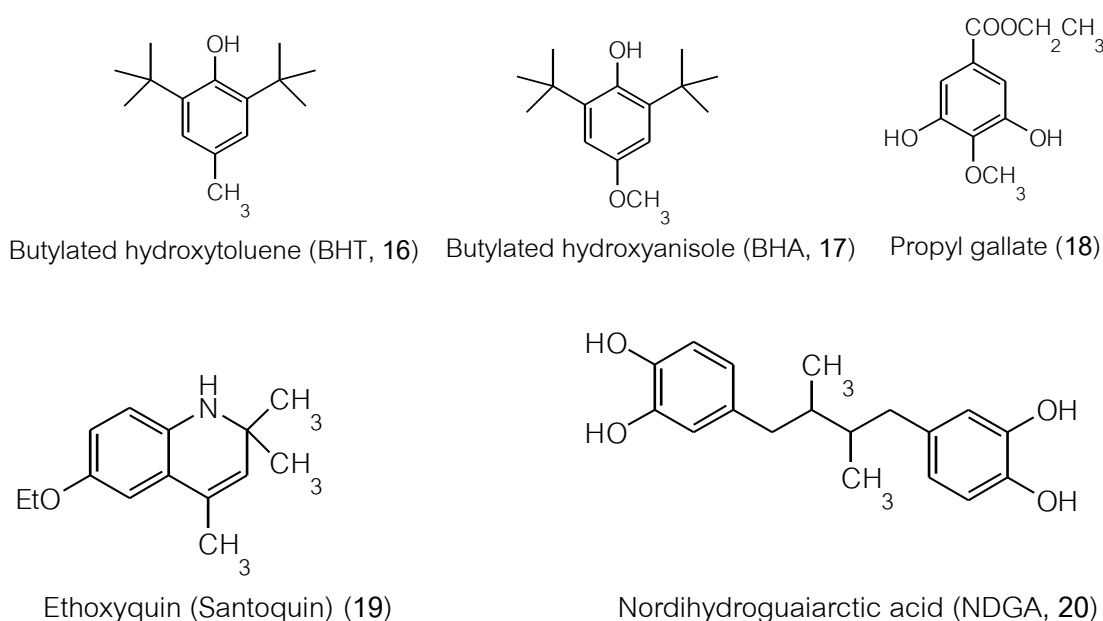
Karamać *et al.* (2005) ได้ทำการศึกษาผลของหมู่แทนที่อนุพันธ์ ferulic acid ได้แก่ ferulic acid (12), coniferyl aldehyde (13), methyl ferulate (14), และ isoferulic acid (15) ต่อฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระกับสารละลาย DPPH พบว่าสามารถเรียงลำดับความแรงได้เป็น

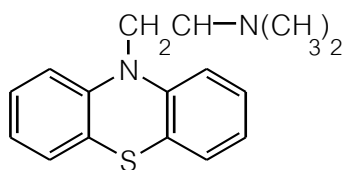
12 > 13 > 14 > 15 ตามลำดับ เขาได้เสนอว่าทั้งนี้เป็นผลจากความแรงของหมู่ดึงอิเล็กตรอน (electron withdrawing group) ซึ่ง -COOH เป็นหมู่ดึงอิเล็กตรอนที่มีความแรงมากที่สุดจึงทำให้ -OH มีความเป็นกรดสูงที่สุด (higher acidic) รองลงมาได้แก่ -CHO และ COOCH_3 ตามลำดับ



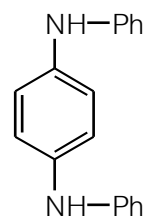
2.4 การประยุกต์ใช้งานสารต้านออกซิเดชันในทางอาหาร

ในการถนอมอาหาร เพื่อมิให้อาหารประเภทไขมันและน้ำมันถูกออกซิไดซ์และเกิดเหม็นหืน (rancidity) จึงมีการเติมสารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ลงไปในอาหาร ซึ่งสารเหล่านี้จะป้องกันการเกิดออกซิเดชันของไขมันและน้ำมันในอาหารทำให้เก็บรักษาได้นานยิ่งขึ้น เช่น Butylated hydroxytoluene (BHT, **16**), Butylated hydroxyanisole (BHA, **17**), Propyl gallate (**18**), Ethoxyquin (Santoquin) (**19**), Nordihydroguaiarctic acid (NDGA, **20**), Promethazine (**21**) และ *N,N'*-Diphenyl-*p*-phenylenediamine (DPPD, **22**) ซึ่งโครงสร้างและประโยชน์แสดงในภาพที่ 8 และตารางที่ 2 ตามลำดับ





Promethazine (21)

*N,N'*-Diphenyl-*p*-phenylenediamine (DPPD, 22)

ภาพที่ 8 แสดงโครงสร้างสารต้านออกซิเดชันบางตัว

ตารางที่ 2 แสดงประโยชน์ของสารต้านออกซิเดชันบางตัว

ชื่อ	ประโยชน์
1. Butylated hydroxytoluene (BHT, 16) ไฮโดรเจนอะตอม	นิยมผสมลงในอาหาร เป็นตัวให้
2. Butylated hydroxyanisole (BHA, 17)	ผสมในอาหาร
3. Propyl gallate (18)	ผสมลงในอาหาร ยับยั้ง lipid peroxidation ได้ดี ร่วมกับเหล็กได้ดี
4. Ethoxyquin (Santoquin, 19)	ผสมในอาหารกระป๋อง เป็นแอนไซม์ มีฤทธิ์สูงในร่างกาย
5. Nordihydroguaiarctic acid (NDGA, 20)	ผสมลงในอาหาร สารโพลิเมอร์ ยาง สารหล่อลื่น สามารถรวมกับเหล็กได้ดี
6. Promethazine (21)	ยับยั้ง lipid peroxidation ในห้องทดลอง
7. <i>N,N'</i> -Diphenyl- <i>p</i> -phenylenediamine (DPPD, 22)	นิยมใช้ในห้องทดลอง