บทที่ 2

ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การสำรวจข้อมูลทางพฤกษศาสตร์

ลำไยมีชื่อภาษาอังกฤษว่า Longan มีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า *Nephelium* Canb. หรือ *Euphorialongana* Lamk. อยู่ในวงศ์ Sapedadceae จากเปลือกเมล็ดลำไยจะมีสารประกอบประเภทฟีนอลิกหรือโพลีฟีนอล ประกอบด้วย กรดแกลลิก (gallic acid) กรดแอลลาจิก (ellagic acid) โปรไซยานิดีนบี-2 (procyanidine B-2) และโปรไซยานิดีนแบบเอไดมเมอร์ (procyanidine A-type dimmers) ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ในกลุ่มที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ จากการรวบรวมเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยครั้งนี้มีงานวิจัยทางด้านการสกัดและพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อใช้ในทางการแพทย์และเภสัชกรรม นั้นมีหลายเทคนิคที่นำมาใช้ในการสกัดและการวิเคราะห์แยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ การสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ และการสกัดด้วยเครื่องมือที่ทันสมัย เช่น Supercritical fluid extraction เป็นต้น ซึ่งเทคนิคการสกัดที่รวดเร็วและสกัดสารออกมาได้ปริมาณสูง ก็จะช่วยให้การวิเคราะห์แยกสารออกฤทธิ์ได้ดียิ่งขึ้น และวิธีการวิเคราะห์แยกสารออกฤทธิ์ก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญมาก และจะต้องให้การวิเคราะห์ที่ถูกต้อง แม่นยำ ดังนั้นผู้วิจัยจึงเล็งเห็นถึงความสำคัญของการพัฒนาการสกัดพืชสมุนไพรและพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารสำคัญทางชีวภาพเพื่อลดต้นทุนการสกัดและการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว แม่นยำสูง

จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีกลุ่มนักวิจัยหลายกลุ่มได้ทำการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสมุนไพรต่างๆ เช่น การสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ และการสกัดด้วยเครื่องมือที่ทันสมัย เช่น Supercritical fluid extraction และการสกัดทำให้สารเข้มข้นด้วยเทคนิค SPE ก่อนทำการวิเคราะห์เป็นต้น มีงานวิจัยที่ได้ทำการศึกษาและค้นคว้าวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญทางชีวภาพจากสมุนไพรด้วยเทคนิค Spectrophotometric methods, Flow injection analysis, HPLC, Capillary electrophoresis, Electrochemical method และ Biosensor เป็นต้น

สำหรับวิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดแอลลาจิก ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญตัวหนึ่งที่สกัดได้จากสารสกัดลำไยนั้นมีอยู่หลายเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์ ซึ่งเทคนิคทางโครมาโทกราฟีนั้นได้รับความนิยมอย่างมาก เป็นเทคนิคที่สะดวกและรวดเร็ว แต่ก็มีข้อด้อยคือสิ้นเปลืองตัวทำละลาย ตัวทำละลายมีราคาแพง และอุปกรณ์ที่ใช้ในการแยกมีราคาแพง

การประยุกต์ทางพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล (molecular imprinted polymers) ร่วมกับเทคนิคการวิเคราะห์แบบออนไลน์ (online analysis) และอาศัยเทคโนโลยีไมโครฟลูอิดิก ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในระบบ HPLC และแลปออนอะชิพ สำหรับวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งอาศัยสมบัติทางโมเลกุลาร์อิมพริ้นเต็ดโพลีเมอร์ในการลอกแบบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สนใจ ซึ่งวิธีนี้มีความเฉพาะเจาะจงสูง และสามารถวิเคราะห์แบบแบบออนไลน์ และอาศัยเทคโนโลยีไมโครฟลูอิดิก ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในระบบแลปออนอะชิพ และทำการตรวจวัด เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล (MIP) เป็นแมคโครโมเลกุลที่มีความจำเพาะเจาะจงสูงกับแม่แบบ เทคนิค MIP มีข้อดีคือสามารถเลือกความจำเพาะกับโมเลกุลได้ และการเตรียมไม่ยุ่งยาก โดยทั่วไปแล้วการสังเคราะห์ทำได้โดย การนำแม่แบบและมอนอเมอร์มาผสมกันตามอัตราส่วน เพื่อให้เกิดสารเชิงซ้อนก่อนการทำให้เกิดพอลิเมอร์จากนั้นเติมสารกระตุ้น (initiator) และ Cross-linking agent ในสารผสมดังกล่าว และให้ความร้อนหรือรังสียูวี เพื่อทำให้เกิดพอลิมอร์ขึ้น หลังเสร็จขบวนการการเกิดพอลิเมอร์จะกำจัดโมเลกุลแม่แบบออก และโครงร่างที่เหลือภายในเนื้อพอลิเมอร์จะมีความเหมาะสม (complementary) ทั้งขนาดและการจัดเรียงตัวของหมู่ฟังก์ชันกับแม่แบบที่ลอกมา ดังนั้นพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลจะมีความจำเพาะเจาะจงสูงกับกับแม่แบบที่ลอกมา การทำให้ความสามารถให้การจดจำ (recognition) โมเลกุลแม่แบบอาจทำได้โดยการเพิ่มบริเวณยึดจับที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง (selectivity and specificity) ให้มากขึ้น โดยศึกษาการเกิดสารเชิงซ้อนระหว่างแม่แบบ-มอนอเมอร์ก่อนการเกิดพอลิเมอร์ ซึ่งพบว่าหากมีบริเวณยึดจับที่มีการยึดจับที่แน่น และมีความจำเพาะสูง จะได้พอลิเมอร์ที่มีความเสถียร

การวิเคราะห์แบบออนไลน์เป็นเทคนิคการวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้นมา เนื่องจากในการวิเคราะห์โดยทั่วไปจำเป็นต้องมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างก่อนขั้นตอนการวิเคราะห์ซึ่งอาจ

ก่อให้เกิดความคลาดเคลื่อนของผลการวิเคราะห์ ดังนั้นการวิเคราะห์แบบออนไลน์จะช่วยแก้ปัญหานี้ได้รวมทั้งช่วยลดเวลาในการวิเคราะห์ด้วยเนื่องจากเป็นการรวมทั้งการเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์ในขั้นตอนเดียว เช่น ระบบวิเคราะห์สารที่มีปริมาณในตัวอย่างด้วยเทคนิคออนไลน์ไมโครแทรปร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี เป็นต้น

สำหรับวิธีการตรวจวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสามารถทำได้โดยใช้เทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตรี (spectrophotometry) โครมาโทรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography) และการวิเคราะห์โดยวิธีเคมีไฟฟ้า (electrochemical method) ตลอดจนพัฒนาเทคนิคใหม่ๆ ที่พัฒนาขึ้น เช่น biosensor และ lab on a chip เป็นต้น ที่สามารถวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำๆ มีความไวและความแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์สูง นอกจากนี้เครื่องมือที่ใช้ก็ไม่ยุ่งยากซับซ้อน อาจใช้ร่วมกับระบบโฟลอินเจคชันอะนาลิซีส (flow injection analysis) หรือ อาจเป็นตัวตรวจวัดในระบบอื่นๆ

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากพืชสมุนไพรเพื่อนำไปใช้ในทางเภสัชกรรมจะต้องมีความบริสุทธิ์เพียงพอและปราศจากสารปนเปื้อนอื่นๆ เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค ดังนั้นจึงจำเป็นจะต้องมีการพัฒนาวิธีการสกัดที่มีประสิทธิภาพสูง และในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากพืชสมุนไพรก็จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการพัฒนาต่อไปเนื่องจากเทคนิคที่ใช้ในปัจจุบันเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตรี (spectrophotometry) โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography) และการวิเคราะห์โดยวิธีเคมีไฟฟ้า (electrochemical method) มี sensitivity ไม่เพียงพอ แล้วยังต้องใช้สารละลายอินทรีย์จำนวนมาก อีกทั้ง reference standard ของตัวยาที่จะนำมาเป็นสารอ้างอิงในการวิเคราะห์ปริมาณก็มีราคาค่อนข้างแพง

2.2 โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

ระบบของการแยกในเทคนิค HPLC มี 2 ชนิด ตามลักษณะการใช้เฟสเคลื่อนที่ คือ

Isocratic elution – การแยกโดยใช้องค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่แบบเดียวตลอดการแยก

Gradient elution – การแยกโดยมีการปรับเปลี่ยนองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ในระหว่างการแยกแบบต่อเนื่องหรือแบบทีละขั้น (stepwise)

เครื่อง HPLC (high performance liquid chromatography) เป็นเครื่องมือใช้สำหรับแยกสารประกอบที่สนใจที่ผสมอยู่ในตัวอย่างโดยกระบวนการแยกสารประกอบที่สนใจจะเกิดขึ้นระหว่างเฟส 2 เฟส คือ เฟสคงที่ (analytical column) กับเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งสารจะถูกแยกออกมาในเวลาที่ต่างกัน โดยสารผสมที่อยู่ในตัวอย่างสามารถถูกแยกออกจากกันได้นั้น ขึ้นอยู่กับความสามารถในการเข้ากันได้ดีของสารนั้นกับเฟสเคลื่อนที่ หรือเฟสคงที่ สารประกอบตัวไหนที่สามารถเข้ากันได้ดีกับเฟสเคลื่อนที่จะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ได้เร็วสารนั้นก็จะถูกแยกออกมาก่อน ส่วนสารที่เข้ากันได้ไม่ดีกับเฟสเคลื่อนที่ หรือเข้ากันได้ดีกับเฟสคงที่จะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ได้ช้า ก็จะถูกแยกออกมาทีหลัง โดยสารที่ถูกแยกออกมาได้นี้จะถูกตรวจวัดสัญญาณด้วยตัวตรวจวัด สัญญาณที่บันทึกได้จากตัวตรวจวัดจะมีลักษณะเป็นพีค ซึ่งจะเรียกว่า โครมาโทรแกรมโดย HPLC สามารถทดสอบได้ทั้งเชิงคุณภาพ และทดสอบเชิงปริมาณ โดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

ส่วนประกอบหลักของเครื่อง HPLC

Mobile phase/Solvent หรือตัวทำละลายที่ใช้ในการชะหรือแยกตัวอย่าง เป็นเฟสเคลื่อนที่ มีลักษณะเป็นของเหลวทำหน้าที่ในการนำสารตัวอย่างและตัวทำละลายเข้าสู่เฟสคงที่ (ในที่นี้คือคอลัมน์) เพื่อให้เกิดกระบวนการแยกภายในคอลัมน์

Degasser ทำหน้าที่กำจัดฟองอากาศที่มีอยู่ในเฟสเคลื่อนที่เพื่อไม่ให้ฟองอากาศเข้าสู่คอลัมน์และตัวตรวจวัด

Pump ทำหน้าที่ขับเคลื่อนตัวทำละลาย (mobile phase) เข้าสู่ระบบ HPLC

Injector/Autosampler ทำหน้าที่ในการฉีดสารตัวอย่างเข้าระบบ HPLC

Column หรือจะเรียกว่า เฟสคงที่ มีลักษณะเป็นของแข็งหรือเจล เป็นเฟสอยู่กับที่ ทำหน้าที่ให้เกิดกระบวนการแยกของสารที่สนใจ โดยการบวนการแยกเกิดขึ้นระหว่างเฟสเคลื่อนที่กับเฟสคงที่ แต่สำหรับ HPLC Agilent 1100 มีอุปกรณ์เพิ่มเติมที่สามารถควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ จึงเรียกว่า Column thermostat

Detector คือ ตัวตรวจวัดสัญญาณ ทำหน้าที่ในการตรวจวัดสัญญาณของสารที่สนใจที่ได้จากกระบวนการแยกมีหลายชนิดด้วยกันการเลือกใช้ขึ้นกับตัวอย่างที่สนใจว่าสามารถตอบสนองกับตัวตรวจวัดสัญญาณชนิดไหนได้ดี

ความสำคัญในการหาเทคนิควิธีทางวิทยาศาสตร์ที่เหมาะสมในการสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณสาระสำคัญทางชีวภาพ โดยใช้เทคนิคผสมผสานทางเคมีตลอดจนวิธีวิเคราะห์ขั้นสูงเพื่อนำไปสู่กระบวนการควบคุมคุณภาพและยกระดับคุณค่าของพืชสมุนไพรไทยเพื่อนำมาผลิตเป็นยาหรือเครื่องสำอางต่อไป

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการรวบรวมเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเตรียมและการสกัดหาปริมาณของ กรดแกลลิกและกรดแอลลาจิกจากตัวอย่างลำไย มีเทคนิคต่างๆ ที่นำมาใช้วิเคราะห์ปริมาณของ กรดแกลลิกและกรดแอลลาจิก ดังนี้

Wang และคณะ (2000) ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณของ Catechins, Caffeine และกรดแกลลิก จากตัวอย่างชาโดยใช้เทคนิค HPLC ด้วยระบบ Isocratic elution ใช้แยกสารจากตัวอย่างชาด้วยคอลัมน์ C18 เฟสเคลื่อนที่เป็น methanol/water/ortho-phosphoric acid ตรวจวัดด้วยเครื่องยูวี ในการวิเคราะห์ได้คำนวณหาค่าความแม่นยำจากการทำซ้ำ และตรวจสอบความถูกต้องของวิธี ซึ่งวิธีที่นำเสนอนี้พบค่าขีดจำกัดของการตรวจวัดที่ต่ำสำหรับตรวจหา (+)-catechin และ (-)-gallocatechin gallate โดยใช้การบวนสกัดชาเขียวผ่านกรรมวิธีให้ความร้อน

Rui และคณะ (2012) ได้พัฒนาวิธี SPE-HPLC สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณกรดแกลลิก Catechin และ Epicachin ในตัวอย่างผักต้มชนิดหนึ่ง ซึ่งวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ใช้คอลัมน์ C18 catridge ในการสกัดตัวอย่าง และใช้คอลัมน์ Agilent Zorbax SB-C18 (250 x 4.6 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร) ในการวิเคราะห์แยกสารด้วยระบบ Gradient elution เฟสเคลื่อนที่คือ Methanol (0.06% formic acid) และน้ำ (0.1% formic acid) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบค่าความเข้มข้นที่มีความเป็นเส้นตรงที่ 4.66-23.3, 5.80-29.0 และ 2.00-10.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของกรดแกลลิก, Catechin และ Epicatechin (r^2 > 0.999) ตามลำดับ และ %RSD (intra-day และ inter-day) มีค่าเท่ากับ 0.12 % และ 2.23 % ตามลำดับ มีค่าร้อยละของการ

กลับคืนเท่ากับ 87.9% ถึง 103% วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นวิธีที่ง่าย มีความแน่นอนถูกต้องและแม่นยำ

Patel และคณะ (2010) ได้ศึกษาสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์ผลไม้ของมะขามป้อม สมอพิเภก และสมอไทย สมุนไพรชนิดนี้ได้นำมาเตรียมในยาอายุรเวท โดยผ่านกระบวนการทางเคมีที่ใช้รักษาโรคภัยไข้เจ็บ เช่น อาการท้องผูก โรคโลหิตจาง โรคหืด โรคดีซ่าน โรคเรื้อรัง และอื่นๆ ซึ่งใช้เทคนิค RP-HPLC ในการแยกและวิเคราะห์หาปริมาณของกรดแกลลิกและกรดแอลลาจิก วิธีนี้ได้ทำการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี โดยใช้คอลัมน์ RP18 ด้วยระบบ gradient elution สามารถแยกกรดแกลลิกและกรดแอลลาจิกได้ในเวลา 30 นาที จากการศึกษาการทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี พบว่าวิธนี้มีสภาพไว เป็นความเป็นเส้นตรง มีความถูกต้องและมีความแม่นยำสูง

Soong และคณะ (2006) ได้พิสูจน์เอกลักษณ์และวิเคราะห์ปริมาณของกรดแกลลิก (GA) และกรดแอลลาจิก (EA) ในเมล็ดลำไยและเนื้อในมะเมล็ดมะม่วง โดยใช้เทคนิค Reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) ตรวจวัดด้วย Photodiode array detection (DAD) จากสารสกัดเมล็ดลำไยด้วยเอทานอล พบปริมาณของ GA และ EA เท่ากับ 23.3 และ 156 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสารสกัดเนื้อในเมล็ดมะม่วงด้วยเอทานอลมีปริมาณสาร GA เท่ากับ 87% ซึ่งมีมากกว่าในเมล็ดลำไย และมี EA เท่ากับ 32% ซึ่งน้อยกว่า EA ในเมล็ดลำไย จากนั้นศึกษาวิธีการสกัดตัวอย่างผ่านกรรมวิธีโดยให้ความร้อนและ Hydrolysis เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด พบว่าสาร GA และ EA ได้มาจากเมล็ดลำไยและเนื้อในเมล็ดมะม่วง ยังคงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอยู่

วีรสุข แซ่มี และคณะ (2007) ได้วิเคราะห์หาปริมาณกรดแกลลิก (GA), catechin (CA), rutin (RU), กรดแอลลาจิก (EA) และ quercetin (QU) พร้อมกัน ด้วยเทคนิค HPLC ตรวจวัดด้วยเครื่องยูวีที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร แยกด้วยคอลัมน์ Luna C18 reverse phase column (46 x 250 มิลลิเมตร) เส้นผ่าศูนย์กลาง 5 ไมโครเมตร ด้วยระบบ gradient elution ที่มีอัตราส่วนระหว่าง solvent A [water-acetic acid (25:1, โดยปริมาตร) และ solvent B (methanol) อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที กราฟมาตรฐานที่ได้อยู่ในช่วง 2.62-21.00, 10.85-86.80, 10.00-80.00, 10.05-80.40 และ 10.05-80.40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของ

GA, CA, RU, EA และ QU ตามลำดับ ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงและขีดจำกัดที่ตรวจวัดได้มีค่าเท่ากับ 0.9994-0.9999 และ 0.3709-1.3191 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากผลการวิจัยพบว่าปริมาณของ GA, CA, RU, EA และ QU ในการสกัดดอกจำปี หางนกยูงไทย และบัวหลวง มีค่าเท่ากับ 5.0, 6.8, 9.2, 9.8 และ 11.3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

Amakura และคณะ (2000) ได้พัฒนาเทคนิค HPLC ใช้สำหรับในการวิเคราะห์ปริมาณกรดแอลลาจิก (EA) ในผลไม้สดและนำผลไม้สดมาแปรรูปด้วยการใช้เทคนิคการสกัดด้วย Reflux โดยใช้ตัวทำละลายเป็นเมทานอลในการสกัด และนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC โดยตัวอย่างผลไม้ที่นำมาวิเคราะห์เป็นผลไม้สด 40 ชนิด และผลไม้แปรรูป 11 ชนิด พบว่าสามารถตรวจพบ EA ในผลเบอร์รี่ สับปะรด และฝรั่ง

ส่วนงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเตรียมพอลิเมอร์มีเทคนิคต่างๆ ที่นำมาใช้ในการเตรียมพอลิเมอร์ ดังนี้

Cirillo และคณะ (2011) ได้พัฒนาวิธีสกัดและทำสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค MISPE ซึ่งใช้เทคนิค MIP ในการวิเคราะห์รากชะเอม เพื่อทำให้สารบริสุทธิ์โดยการใช้ Methacrylic acid (MAA) เป็นโมโนเมอร์ ซึ่งใช้ในการสังเคราะห์ Glycyrrhizic acid (GL), 2-(dimethylamino), Ethyl methacrilate (EDAEM) หรือ Hydroxyethyl-metacrylate (HEMA) และใช้ Ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) เป็น Cross linking agent ต่อมานำพอลิเมอร์ที่ใช้เป็นของแข็งพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล และใช้ SPE ที่เป็นตัวดูดซับ พบว่าเทคนิคของ MISPE-HPLC สามารถสกัดสารออกมาจากรากชะเอมได้ถึง 80% จึงทำให้เทคนิคนี้เป็นที่นิยมและมีความแม่นยำในการวิเคราะห์

Pan และคณะ (2010) ได้พัฒนาเทคนิคพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล ซึ่งแสดงถึงความเฉพาะเจาะจงและมีความคล้ายคลึงของโมเลกุลต้นแบบ โดยเลือกใช้ Methimazole (MMZ) เป็นต้นแบบโมเลกุลและใช้ Methacrylic acid เป็นโมโนเมอร์ และใช้ Ethylene glycol dimethacrylate เป็น cross-linking ได้พอลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติเป็นตัวดูดซับที่ดี และพัฒนาใช้พอลิเมอร์เป็นตัวดูดซับร่วมกับ HPLC-UV โดยใช้ MMZ เป็นสารมาตรฐานที่มีช่วงความเข้มข้นของกราฟมาตรฐานมีค่าเท่ากับ 0.5 ไมโครกรัมต่อลิตร ถึง 150 ไมโครกรัมต่อลิตร (r^2 = 0.994) ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (LOD ที่ S/N =3) และขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดเชิง

ปริมาณ (LOQ ที่ S/N =10) พบว่าในตัวอย่างไต ตรวจวัดได้เท่ากับ 0.63 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ 2.10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่างตับ ตรวจวัดได้เท่ากับ 0.15 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ 1.70 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่างกล้ามเนื้อ ตรวจวัดได้เท่ากับ 0.56 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ 1.86 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ค่าร้อยละกลับคืนและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD, n = 9) และค่าความแม่นยำมีค่าเท่ากับ 71.14 % ถึง 88.41 % และ 2.53 % ถึง 6.18 % ตามลำดับ

Li และคณะ (2005) ได้พัฒนาวิธีการสกัดและทำให้ Chlorogenic acid มีความบริสุทธิ์ โดยใช้เทคนิคพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล ซึ่งเตรียมโดยใช้ Chlorogenic acid เป็นต้นแบบ ใช้ Tetrahydrofuran และ isooctane เป็นตัวทำละลายผสม (porogen) และใช้ Methacrylic acid และ Ethyl glycol dimthacrylate เป็นโมโนเมอร์ และตัวเชื่อมโยง ตามลำดับ นำพอลิเมอร์ของ Chlorogenic acid ที่เป็นต้นแบบ และแยกสาร Chlorogenic acid และสารรบกวนอื่นๆ ด้วยเทคนิค HPLC จากสารสกัดจากใบลิลลี่

ธีรพล เปียฉ่ำ (2010) นำพอลิเมอร์ลอกแบบที่จำเพาะเป็นพอลิเมอร์ร่างแหที่สร้างขึ้นและทำหน้าที่เสมือนแอนติบอดี หรือรีเซฟเตอร์เทียมรวมไปถึงเอนไซม์ ซึ่งมีความคงทนค่อนข้างสูงจึงได้ถูกนำมาใช้ในงานทางด้านการวิเคราะห์หาสารที่สนใจมากมาย อาทิ เป็นเซนเซอร์ทางชีวภาพ, การสังเคราะห์ยา, การนำส่งยาและการแยกสารให้บริสุทธิ์ในการศึกษาชิ้นนี้ได้ทำการสร้างพอลิเมอร์ลอกแบบจับจำเพาะและพอลิเมอร์ลอกแบบจับจำเพาะแบบเม็ดอนุภาคนาโนที่มีคุณสมบัติในการจับจำเพาะกับวิตามินอี (tocopherol) และอนุพันธ์ของวิตามินอี ซึ่งประกอบไปด้วย Tocopherol succinate ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านมะเร็ง Tocopherol nicotinate และ Tocopherol acetate โดยใช้เทคนิคทางพอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุล ด้วยการใช้โมโนเมอร์ฟังค์ชั่นเป็น Methacrylic acid โมโนเมอร์ตัวเชื่อมเป็น Ethylene glycol dimethacrylate และตัวทำละลายชนิดต่างๆ อาทิเช่น Dichlorometane, Acetonitrile และใช้ตัวกระตุ้นปฏิกิริยาชนิด AIBN เพื่อทำให้เกิดการสานกันเป็นร่างแหและมีลอยประทับของโมเลกุลเป้าหมาย หลังจากสร้างพอลิเมอร์ลอกแบบเป็นผลสำเร็จ จะนำไปทำการทดสอบการจับจำเพาะ ซึ่งพบว่าพอลิเมอร์ลอกแบบจับจำเพาะที่ได้จากการเตรียมโดยใช้วิตามินอี และอนุพันธ์เป็นโมเลกุลเป้าหมายนั้นสามารถจับกับวิตามินอีได้ดีที่ 2 มิลลิกรัมต่อกรัม ในสารละลายเอทานอล

ผสมกับน้ำในอัตราส่วน 3 ต่อ 2 และในส่วนพอลิเมอร์ควบคุมนั้น สามารถจับวิตามินอีได้น้อยมาก และได้เตรียมพอลิเมอร์เม็ดกลมโดยวิธี Precipitation polymerization ซึ่งได้พอลิเมอร์ลอกแบบจับจำเพาะชนิดเม็ดกลม ขนาด 200-400 นาโนเมตร และทำการทดสอบการจับจำเพาะ ซึ่งพบว่าพอลิเมอร์ลอกแบบจับจำเพาะชนิดเม็ดกลมมีความสามารถจับจำเพาะได้ดีในสารละลายเอทานอลผสมกับน้ำในอัตราส่วน 4 ต่อ 1 นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาและทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างโมเลกุลเป้าหมายและโมโนเมอร์ฟังค์ชั่นโดยใช้วิธีการทางคอมพิวเตอร์ซึ่งจากผลงานวิจัยข้างต้นในการสร้างพอลิเมอร์ลอกแบบจับจำเพาะต่อวิตามินอีและอนุพันธ์นั้นจักเป็นประโยชน์ในทางการประยุกต์ใช้ในทางวิทยาศาสตร์การแพทย์เพื่อเป็นตัวนำส่งยารวมไปถึงการแยกสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในเชิงอุตสาหกรรมต่อไป กรดนิโคตินิกหรือวิตามินบี 3 เป็นสารอาหารสำคัญที่หน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบการทำงานและการป้องกันภาวะไขมันสูงในร่างกาย การศึกษาชิ้นนี้จึงได้ทำการสังเคราะห์สารประกอบของโลหะเชิงซ้อนที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากกรดนิโคตินิก และ อนุพันธ์ของกรดคาร์บอกซิลิก ซึ่งประกอบไปด้วย Phthalic, Salicylic และ Anthranilic acids จากการทดสอบคุณสมบัติพบว่าสารประกอบโลหะเชิงซ้อนที่ได้มีคุณสมบัติเสมือนเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส และมีคุณสมบัติของการต่อต้านจุลชีพที่น่าสนใจ ซึ่งสารประกอบของ Nicotinicphthalic acids (CuNA/Ph) ให้ SOD activity ที่ IC_{50} เท่ากับ 34.42 ไมโครโมลาร์ และ anti-microbial activity ต่อ Bacillus subtilis ATCC 6633, MIC เท่ากับ 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รวมไปถึงได้ศึกษาคุณสมบัติของสารประกอบเชิงซ้อนผ่าน Density functional theory (DFT) พบว่า SOD activity มีความสัมพันธ์กับ Electron affinity (EA), highest occupied molecular orbital (HOMO) และ Lowest unoccupied molecular orbital (LUMO) ซึ่งพบว่าสารประกอบโลหะเชิงซ้อนของคอปเปอร์ที่มี SOD activity สูงที่สุดจะให้ค่าพลังงาน HOMO ต่ำที่สุด บ่งชี้ว่าการพัฒนาสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะกับวิตามินจักเป็นประโยชน์ในด้านการเพิ่มมูลค่าของสารและนำไปสู่การผลิตยาเพื่อการรักษาต่อไป

2.4 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ หมายถึง สารใดๆ ที่มีอิเล็กตรอนที่ไม่ได้จับคู่ (unpaired electron) มากกว่าหรือเท่ากับหนึ่งอิเล็กตรอนในวงโคจรของโมเลกุล การเขียนสัญลักษณ์ของอนุมูลอิสระโดยการใช้จุดที่ตำแหน่งบนขวาของสูตรโมเลกุลเดิมเพื่อแสดงถึงอิเล็กตรอนที่ไม่ได้จับคู่ ปกติจะ

ใช้สัญลักษณ์ R แสดงถึงอนุมูลอิสระที่ไม่เฉพาะเจาะจง โดยทั่วไปอนุมูลอิสระมีทั้งที่เป็นอนุมูลประจุบวก เรียกว่า อนุมูลแคทไอออน (cation radical) ใช้สัญลักษณ์ $(R)^{+\bullet}$ เช่น อนุมูล Pyridinyl อนุมูลประจุลบ เรียกว่า อนุมูลแอนไอออน; anion radical) ใช้สัญลักษณ์ $(R)^{-\bullet}$ เช่น อนุมูล superoxide $(O_2)^{+\bullet}$ หรืออนุมูลที่มีประจุเป็นกลาง; neutral radical) ใช้สัญลักษณ์ $(R)^{\bullet}$ เช่น อนุมูล Hydroxyl $(OH)^{\bullet}$ อนุมูล alkoxyl $(C_nH_{(2n+1)}O)^{\bullet}$ อนุมูล Alkylperoxyl $(C_nH_{(2n+1)}OO)^{\bullet}$ อนุมูล Alkylthiyl $(C_nH_{(2n+1)}S)^{\bullet}$ เป็นต้น

อนุมูลอิสระส่วนใหญ่เป็นสารที่ไม่เสถียร มีช่วงครึ่งอายุ (half life) สั้น โดยทั่วไปอนุมูลอิสระจะทำปฏิกิริยากับสารอื่นใน 2 รูปแบบ คือ โดยการดึงเอาอะตอมไฮโดรเจนมาจากสารโมเลกุลอื่นที่อยู่ข้างเคียง และโดยการเพิ่มโมเลกุลของออกซิเจนเข้าไป เพื่อให้เกิดเป็นอนุมูลเปอร์ออกซิล (peroxyl radical) เนื่องจากอนุมูลอิสระมีอิเลคตรอนที่ไม่ได้จับคู่อยู่ในโมเลกุล จึงมีความไวสูงในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลในร่างกาย ทำลายสมดุลของระบบต่างๆ ในร่างกาย อนุมูลอิสระมีที่มาทั้งแหล่งภายนอกร่างกาย ได้แก่ มลพิษในอากาศ โอโซน ไนตรัสออกไซด์ ไนโตรเจนไดออกไซด์ ฝุ่น ควันบุหรี่ อาหารที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวหรือธาตุเหล็กมากกว่าปกติ แสงแดด ความร้อน รังสีแกมม่า ยาบางชนิด เป็นต้น และแหล่งภายในร่างกาย ได้แก่ ออกซิเจน เป็นต้น

ออกซิเดชัน (oxidation) คือ ปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนให้แก่ธาตุหรือสาร หรือการลดจำนวนอิเล็กตรอนในธาตุ ธาตุโลหะที่ถูกเติมออกซิเจนจะหมดสภาพความเป็นโลหะ ธาตุคาร์บอนอินทรีย์ที่ถูกเติมออกซิเจนจนกลายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ จะหมดศักยภาพความที่เป็นสารที่มีพลังงานชีวภาพ

ในเมตะบอลิซึมของเซลล์ เช่น ในไมโตรคอนเดรีย ในไมโครโซม มีออกซิเดชันตลอดเวลา ออกซิเดชันอาจเป็นพิษได้ หากมีการเติมออกซิเจน หรือการลดอิเล็กตรอนเดี่ยวออกจากธาตุและโมเลกุลบางชนิด เช่น กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว โปรตีนและดีเอ็นเอ ปฏิกิริยาที่ขาดการควบคุม ขาดรีดักชัน ปฏิกิริยาจะเกิดต่อเนื่องไปเรื่อยๆ ออกซิเดชันจะกลับเป็นอันตรายต่อเซลล์ ถ้าทำให้เกิด Lipid peroxidation ที่ไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ฉีกขาด ทำให้เซลล์ตายเนื้อเยื่อเสื่อมสภาพและเกิดความชรา ตามอายุขัย ถ้าเกิดที่โปรตีนใด โปรตีนนั้นจะเสื่อมสภาพตามธรรมชาติ

Lipid peroxidation เป็นกระบวนการทำลาย Poly-unsaturated lipids โดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน อนุมูลอิสระทำให้เกิดการสร้าง Fatty acid hydroperoxides และสารประกอบ Aldehyde ตัวอย่างที่รู้จักกันดีของ Lipid peroxidation คือการหืน (rancidity) ที่เกิดกับน้ำมันหรือไขมันที่มีองค์ประกอบของ Carbon-carbon double covalent bonds

ขั้นตอนของการเกิด Lipid peroxidation ประกอบด้วย

1. Initiation หรือ first-chain initiation เป็นขั้นตอนการเกิด Peroxidation ของเมมเบรนหรือ Poly-unsaturated fatty acids (PUFA) ที่เกิดจาก Species ใดๆ ที่มีความไวเพียงพอที่จะดึง Hydrogen atom (H^+) ออกจาก Fatty acid (LH) ได้เป็น Lipid radical ($L^\bullet$)

$$LH + OH^\bullet \rightarrow L^\bullet + H_2O$$

$$L^\bullet + O_2 \rightarrow LOO^\bullet$$

2. Propagation เป็นขั้นตอนที่เมื่อเกิด Lipid peroxyl radical ($LOO^\bullet$) ขึ้นแล้ว สามารถดึง Hydrogen atom (H^+) จากไลปิดโมเลกุลอื่น ทำให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อไป

$$LOO^\bullet + LH \rightarrow LOOH + L^\bullet$$

3. Termination ปฏิกิริยาการเกิดของ Lipid peroxidation เป็นการเกิดและทำลายกรดไขมันอย่างต่อเนื่องแต่ในความเป็นจริงแล้ว Radical-radical interactions สามารถเกิดขึ้นได้ในสภาวะที่เหมาะสม ส่งผลให้ปฏิกิริยาลูกโซ่ของ Lipid peroxidation ถูกตัดตอนเนื่องจาก Product ที่ได้มีคุณสมบัติเป็น Non-radical

$$L^\bullet + L^\bullet \longrightarrow \text{Non-radical products}$$

$$LOO^\bullet + L^\bullet \longrightarrow \text{Non-radical products}$$

สารต้านอนุมูลอิสระ หรือแอนติออกซิแดนท์ (antioxidant) คือสารเคมีที่ทำหน้าที่ต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ในที่นี้รวมถึงสารที่สามารถยับยั้งและควบคุมอนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน จึงช่วยยับยั้งอนุมูลอิสระไม่ให้ทำลาย

องค์ประกอบของเซลล์ สารต้านอนุมูลอิสระมีทั้งที่เป็นสารจากธรรมชาติ (natural antioxidant) แสดงดังในตาราง 2.1 และสารสังเคราะห์ ซึ่งได้แก่ Tert-butyl-4-hydroxyanisol (BHA), Tert-butyl-4-hydroxytoluene (BHT) และ Tert-butylhydroquinone (TBHQ) เป็นต้น

ตาราง 2.1 สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติบางชนิด

Some components of natural antioxidants	
Amino acid	Other organic acid
Ascorbic acid	Reductions
Carotenoids	Peptides
Flavonoids	Tannins
Melanoidin	Tocopherols

โดยทั่วไปสารต้านอนุมูลอิสระแบ่งเป็น 5 ประเภทใหญ่ๆ ดังนี้

(1) Primary antioxidant สารในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ได้แก่สารประกอบฟีนอลิค (phenolic substance) ทำหน้าที่หยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระในปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน นอกจากนี้ยังรวมถึงสารโทโคฟีรอลธรรมชาติและสังเคราะห์ (natural and synthetic tocopherol) alkyl gallate BHA BHT TBHQ และอื่นๆ ซึ่งสารในกลุ่มดังกล่าวทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน

(2) Oxygen scavenger สารในกลุ่มนี้ได้แก่กรดแอสคอร์บิคหรือวิตามินซี (ascorbyl palmitate erythorbic acid (isoascorbic acid)) และ Sodium erythorbate เป็นต้น สารในกลุ่มนี้จะเข้าทำปฏิกิริยากับออกซิเจน จึงเป็นการช่วยกำจัดออกซิเจนในระบบปิดได้

(3) Secondary antioxidant สารในกลุ่มนี้ได้แก่ Dilauryl thiopropionate และ Thiopropionic acid ทำหน้าที่สลายโมเลกุลของ Lipid hydroperoxide ให้เป็นสารที่มีความเสถียร

(4) Enzymatic antioxidant สารในกลุ่มนี้ได้แก่เอ็นไซม์ต่างๆ ซึ่งแบ่งเป็น Primary antioxidant enzyme และ Ancillary antioxidant enzyme สารในกลุ่มนี้ทำหน้าที่กำจัดออกซิเจนหรืออนุพันธ์ของออกซิเจนโดยเฉพาะไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

(5) Chelating agent หรือ Sequestrant สารในกลุ่มนี้ เช่น กรดซิตริก กรดอะมิโน และ Ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA) เป็นต้น สารในกลุ่มนี้ทำหน้าที่ไปจับกับไอออนของโลหะ เช่น เหล็ก และทองแดง ซึ่งไอออนเหล่านี้เป็นไอออนที่ส่งเสริมและเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน ทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่เสถียร

ผลของสารต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระมีหน้าที่หลายอย่าง เช่น ทำหน้าที่เป็นสารรีดิวซ์ (reducing agent) เป็นตัวขับไล่อนุมูลอิสระ จับกับไอออนโลหะที่เร่งให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ยับยั้งการเกิดออกซิเจนในรูปแอคทีฟซึ่งพบในขั้นตอนอินนิทิเอชันของปฏิกิริยาออกซิเดชัน ด้วยหน้าที่ต่างๆ เหล่านี้จึงทำให้มีผลในการชะลอหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน หรือสามารถหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่โดยการทำปฏิกิริยากับอนุมูล Peroxyl เพื่อให้เป็นสารที่มีความเสถียร หรือเป็นสารที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกซิเดชันอีกต่อไป หรือเป็นสารที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระ (non-radical product)

สารต้านอนุมูลอิสระบางชนิด

วิตามินซี เป็นสารที่ละลายน้ำได้ ลักษณะเป็นผลึกสีขาว ไม่มีกลิ่น มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า กรดแอสคอร์บิค วิตามินซีมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมตาบอลิสมของกรดอะมิโนและทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ของปฏิกิริยาทางชีวเคมีต่างๆ ในร่างกาย นอกจากนี้วิตามินซียังเป็นส่วนหนึ่งของกลุ่มสารชีวเคมีที่สร้างคอลลาเจน (collagen) ซึ่งเป็นโปรตีนส่วนหนึ่งของโครงสร้างกระดูกของมนุษย์ วิตามินซีเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญชนิดหนึ่งในกระบวนการเมตาบอลิสมในร่างกาย โดยพบว่าวิตามินซีจะเข้าทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อนุมูล Hydroxyl อนุมูล Peroxyl และ Singlet oxygen ได้เป็นสารที่เรียกว่า Semidehydroascorbate (A) และ Dehydroascorbate (A) ดังสมการ 1-4

$$AH^- + OH^\bullet \longrightarrow H_2O + A^{-\bullet} \quad (1)$$

$$AH^- + O_2^{-\bullet} + H^+ \longrightarrow H_2O_2 + A^{-\bullet} \quad (2)$$

$$AH^- + ROO^\bullet \longrightarrow ROOH + A^{-\bullet} \quad (3)$$

$$AH^- + H_2O_2 + H^+ \longrightarrow 2H_2O + A \quad (4)$$

นอกจากวิตามินซีสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระแล้ว ยังทำหน้าที่เป็นตัวส่งเสริมประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระของวิตามินอีด้วยโดยทำให้อนุมูล α-tocopherol (TOH) ดังสมการ 5

$$TO^{\bullet} + AH^{-} \xrightarrow{k=2x10^{5}M^{-1}S^{-1}} TOH + A^{-\bullet} \qquad (5)$$

วิตามินอี เป็นวิตามินที่ละลายในไขมัน มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดๆ ในธรรมชาติมีวิตามินอีอยู่หลายชนิด ปัจจุบันแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ โทโคฟีรอล และโทโคไทรอินอล (tocotrienol) แต่ละกลุ่มยังแยกเป็นวิตามินย่อยๆ อีก 4 ชนิด มีชื่อเรียกตามพยัญชนะในภาษาละตินว่า แอลฟ่า (α) และเดลต้า (δ) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับจำนวนและตำแหน่งของหมู่เมทิลที่ติดกับวงแหวนโครเมน (chromane ring) โทโคฟีรอลแตกต่างจากโทโคไทรอินอลตรงที่โครงสร้างของโทโคฟีรอลมีแขนงข้างเป็น 4′8′12′- trimethyltridecyl เรียกว่า Phytol หรือ Phytyl side chain ส่วนโทโคไทรอินอลมีแขนงข้างที่มีพันธะคู่ที่ตำแหน่ง 3′7′ และ 11′ เรียกว่า unsaturated side chain

วิตามินอีทำหน้าที่เป็นตัวให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูล peroxyl ดังสมการ 6

$$\alpha\text{-tocopherol} + LOO^{\bullet} \longrightarrow \alpha\text{-tocopherol}^{\bullet} + LOOH \qquad (6)$$

อนุมูล α-tocopherol$^{\bullet}$ ที่เกิดขึ้นในสมการ (6) สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูล Peroxyl ตัวอื่น ทำให้ได้สารที่มีความเสถียร (LOO-α-tocopherol) ดังสมการ (7) เป็นผลให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันหยุดลง)

$$\alpha\text{-tocopherol}^{\bullet} + LOO^{\bullet} \longrightarrow LOO\text{-}\alpha\text{-tocopherol} \qquad (7)$$

แคโรทีนอยด์ เป็นรงควัตถุที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติเป็นสาระสำคัญที่พบในคลอโรพลาสต์ของพืช มีบทบาทในการสังเคราะห์แสงเช่นเดียวกับคลอโรฟิลล์ โดยทำหน้าที่ช่วยคลอโรฟิลล์ในการดักรับพลังงานแสง ในผักและผลไม้ที่ยังไม่สุกจะพบแคโรทีนอยด์น้อยกว่าผักและผลไม้ที่สุกแล้ว เนื่องจากปกติผักใบเขียวหรือผักและผลไม้ที่ยังดิบอยู่ แคโรทีนอยด์จะอยู่ในส่วนของคลอโรพลาสต์ ในขณะที่ผักหรือผลไม้สุก แคโรทีนอยด์จะถูกสังเคราะห์ขึ้นในโครโม

พลาสต์เป็นปริมาณมากเนื่องจากเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์มีมากขึ้น โครงสร้างพื้นฐานของแคโรทีนอยด์ประกอบด้วยโครงสร้างหลักที่เรียกว่า Tetraterpene skeleton ซึ่งอาจมีวงแหวนที่บริเวณปลายด้านใดด้านหนึ่งหรือทั้งสองด้านของโมเลกุล วงแหวนนี้อาจเป็นวงแหวนห้าหรือหกเหลี่ยมก็ได้

สารประกอบฟีนอลิค เป็นสารที่พบได้ในพืชทั่วไป มีคุณสมบัติเป็นสารอินทรีย์ที่มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนอะโรมาติก (aromatic ring) ที่มีจำนวน Hydroxyl group อย่างน้อยหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งหมู่ในโมเลกุล สามารถละลายได้ในน้ำ ส่วนใหญ่สารประกอบฟีนอลิคมักพบอยู่รวมกับน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ (glycoside) สารประกอบฟีนอลิคที่พบในธรรมชาติมีหลายกลุ่ม และมีลักษณะสูตรโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกัน กลุ่มใหญ่ที่พบจะเป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์ (flavonoid) นอกจากนั้นยังมีสารประกอบต่างๆ เช่น Simple monocyclic phenol phenyl propanoid phenolic quinone และ polyphenolic ซึ่งได้แก่ พวกลิกนิน (lignin) เมลานิน (melanin) และแทนนิน (tannin) เป็นต้น รวมทั้งยังพบว่ามีสารประกอบที่มีกลุ่มฟีนอล (phenolic unit) รวมอยู่ในโมเลกุลของโปรตีนอัลคาลอยด์ (alkaloid) และเทอร์พีนอยด์ (terpenoid) เป็นต้น สารประกอบฟีนอลิคทำหน้าที่เป็นตัวขับไล่อนุมูลอิสระ ที่สำคัญคืออนุมูล peroxyl โดยมีกลไก 2 แบบ คือ เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นต่ำเมื่อเทียบกับสารออกซิไดส์สารประกอบฟีนอลิคจะหน่วงเหนี่ยวหรือป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันนอกจากนี้อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาจะถูกทำให้เป็นสารที่มีความเสถียร นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิคบางชนิดยังทำหน้าที่เป็น chelating agent ดักจับไอออนของโลหะเข้าไว้ในโมเลกุล เช่น เคอร์ซิทิน (quercetin) สารประกอบฟีนอลิคยังทำหน้าที่เป็นสารรีดิวซ์ เป็นตัวให้ไฮโดรเจน และกำจัดออกซิเจนที่อยู่ในรูปแอคทีฟ ด้วยหน้าที่ต่างๆ ดังกล่าวจึงทำให้สารประกอบฟีนอลิคเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญชนิดหนึ่งในพืชทั่วไป

การทดสอบฤทธิ์แอนติออกซิแดนของสมุนไพร

เริ่มจากการเตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในเอทานอล โดยนำสารละลายมาทดสอบกับ 165 ไมโครโมลาร์ ของ DPPH ในเอทานอล หลังจากนั้น 30 นาที วัดการเปลี่ยนแปลงของความเข้มสีที่อัตราส่วนต่างๆ ของสารสกัด ด้วยการวัดการดูดกลืนแสง

ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยสารจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง แล้วนำค่าที่อ่านได้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดฤทธิ์แอนติออกซิแดนของสมุนไพร

$$\%\text{การยับยั้ง} = \frac{\text{ค่าดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH} - \text{ค่าดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง} \times 100}{\text{ค่าดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH}}$$

จากนั้นนำผลที่ได้มาพล็อตกราฟระหว่าง %การยับยั้งกับความเข้มข้นของสารสกัด เพื่อคำนวณหาค่า IC_{50} จากกราฟที่ได้

DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging assay เป็นวิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากความสามารถของตัวอย่างในการกำจัด 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical ดังสมการ โดย DPPH free radical จะมีสีม่วงมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 517 นาโนเมตร และจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองเมื่ออยู่ในรูป Reduced form (ได้รับ Hydrogen atom)

$$DPPH^{o+} + AH \longrightarrow DPPH\text{-}H + A^{o+}$$

จากหลักการดังกล่าว ถ้าในปฏิกิริยามีสารต้านอนุมูลอิสระมาก ก็จะทำให้ปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีจากสีม่วงกลายเป็นสีเหลือง ในทางตรงกันข้ามถ้าในปฏิกิริยามีสารต้านอนุมูลอิสระน้อยจะทำให้ขบวนการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาลดลงตามลำดับ