บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แนวคิด ทฤษฎี

1. มะหาด

มะหาด (*Artocarpus lakoocha* Roxb.) อยู่ในวงศ์ Moraceae พรรณไม้ที่อยู่ในวงศ์เดียวกันได้แก่ ขนุนสำปะลอ (*Artocarpus altilis* (Parkison) Fosberg ExT) ไสน (*Artocarpus altissimus* J. J. Sm. T) หาดส้าน (*Artocarpus chaplasha* Roxb.) หาดรุม (*Artocarpus dadah* Miq. T) กะออก (*Artocarpus elasticus* Rienw. ex Blume T) หาดหนุน (*Artocarpus gomezianus* Wall. ex Tre′cul T) ขนุน (*Artocarpus hetero*phyllus Lam. ExT) จำปาดะ (*Artocarpus integer* (Thunb.) Merr. ExT) ขนุนป่า (*Artocarpus kemando* Miq. T) (กรมป่าไม้, 2544: 56-57)

มะหาด หรือ หาด เป็นพรรมไม้ที่มักพบตามบริเวณป่าดงดิบทางภาคตะวันออกเฉียงใต้ ภาคตะวันตกเฉียงใต้ และภาคใต้ของประเทศไทย มีชื่ออื่นๆ คือ กาแย, ตาแป, ตาแปง (มาเล-นราธิวาส) มะหาดใบใหญ่ (ตรัง) มะหาดเป็นพรรณไม้ยืนต้น ขนาดใหญ่ ลำต้นมีความสูงราว 15-20 เมตร ลักษณะของลำต้นตั้งตรง ผิวเปลือกนอกค่อนข้างขรุขระ แตกเป็นรอยสะเก็ดเล็กๆ มีสีน้ำตาลดำ หรือเป็นสีเทาแกมน้ำตาล และบริเวณเปลือกของลำต้นมักจะมีรอยแตกและมียางไหลซึมออกมา แห้งติด ใบมีลักษณะเป็นใบเดี่ยว ออกเรียงสลับกัน ใบเป็นรูปไข่หรือรูปยาวรี ปลายใบแหลม ส่วนโคนใบเว้ามน ใบมีขนาดกว้างประมาณ 2-8 นิ้ว ยาวประมาณ 4-12 นิ้ว ใบอ่อนมีขนแต่พอแก่ขึ้น ขนนั้นก็จะหลุดไปทำให้ใบเกลี้ยงเรียบ ดอกออกเป็นช่อเล็กๆ ตามบริเวณง่ามใบ มีสีเหลือง ดอกช่อหนึ่งจะมีทั้งดอกเพศผู้และเพศเมียอยู่ในต้นเดียวกัน ลักษณะของดอกเพศเมียกลีบดอกเป็นรูปค่อนข้างกลมมน โคนกลีบดอกเชื่อมติดกันเป็นหลอด และลักษณะของดอกเพศผู้กลีบเป็นรูปขอบขนาน ปลายกลีบหยักกลีบดอกยาวประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร ผลมีลักษณะเป็นรูปกลมใหญ่ มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5-8 เซนติเมตร เปลือกนอกมีผิวขรุขระ เนื้อค่อนข้างนุ่ม ผลอ่อนมีสีเขียว แต่พอแก่หรือสุกเต็มที่มีสีเหลืองส้ม

ภาพที่ 2.1 แสดงลักษณะทางพฤษศาสตร์ของมะหาด

สรรพคุณทางยา เปลือกลำต้น ใช้เปลือกสด นำมาต้มเอาน้ำกินเป็นยาแก้ไข้ หรือยาขับพยาธิแก่นไม้ ใช้แก่นไม้สด นำมาหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำมาเคี่ยวให้เป็นฟอง จากนั้นช้อนฟองออกมาตากแดดให้แห้ง แล้วบดให้เป็นผงละเอียดใช้ชงกินกับน้ำเย็น เป็นยาช่วยขับพยาธิตัวตืด และไส้เดือน แก้ท้องอืดเฟ้อ แก้โรคกระษัย แก้เบื่ออาหาร แก้กระหายน้ำ แก้ฝีในท้อง แก้ปวด แก้ลม ขับโลหิต แก้เคือง และแก้ปัสสาวะกะปริดกะปรอย ราก ใช้รากสดหรือแห้ง นำมาต้มเอาน้ำกินเป็นยาแก้ไข้ แก้พิษร้อนใน แก้กระษัยในเส้นเอ็น และช่วยขับพยาธิ (วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม, 2542: 643-644; นันทวัน บุญยะประภัศร และ อรนุช โชคชัยเจริญพร, 2542: 724-726)

สรรพคุณของสมุนไพรที่ใช้รักษาโรคต่างๆ ขึ้นอยู่กับการออกฤทธิ์ของสารเคมีที่อยู่ในสมุนไพร ดังนั้นการวิจัยเกี่ยวกับสารเคมีต่างๆ ในพืชทำให้ได้ข้อมูลที่สำคัญและเป็นประโยชน์ สำหรับงานวิจัยที่เกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา มีดังนี้

1. ลดความดันโลหิต
2. ต้านไวรัสที่ก่อโรคพืช
3. ต้านแบคทีเรีย ต้านไมโครแบคทีเรีย
4. ฆ่าพยาธิตัวตืด
5. การทดสอบความเป็นพิษ พบว่าเมื่อฉีดสารสกัดส่วนที่อยู่เหนือดิน

2. การสกัด (Extraction)

การสกัดเป็นกระบวนการที่ใช้แยกสารที่ต้องการแยกออกจากของผสมหรือสารละลาย โดยใช้ตัวทำละลาย และวิธีการที่เหมาะสม ถ้าตัวถูกละลายที่ต้องการสกัดอยู่ในสารตัวอย่างที่เป็นของแข็งสามารถทำการสกัดด้วยตัวทำละลายของเหลวได้ ซึ่งเรียกว่าวิธีการสกัดนี้ว่า Solid-liquid extraction การสกัดจะได้ผลดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับการละลายของตัวถูกละลายในตัวสกัด หรือตัวทำละลายของเหลว และระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดจะขึ้นอยู่กับลักษณะของตัวถูกละลายที่อยู่ในสาร

ตัวอย่างของแข็ง ถ้าตัวถูกละลายเพียงดูดซับที่ผิวของของแข็ง การสกัดก็จะใช้เวลาน้อย แต่ถ้าตัวถูกละลายอยู่ภายในโครงร่างของของแข็งก็ต้องใช้เวลามากกว่า และถ้าการแพร่ของตัวทำละลายสู่ภายในโครงร่างของของแข็งเกิดได้ช้ามากจำเป็นต้องบดของกแข็งให้มีขนาดเล็กลงก่อนทำการสกัดเพื่อช่วยลดระยะเวลาในการสกัดให้สั้นลง การสกัดของแข็งหรือการทำ Solid-liquid extraction สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับการสกัดสารทางชีววิทยา สารอินทรีย์ ตลอดจนเกลือของสารอนินทรีย์ วิธีการสกัดของแข็งสามารถทำได้ 2 วิธี คือ

2.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction)

การสกัดด้วยตัวทำละลายเป็นวิธีหนึ่งที่มีประโยชน์มากในเคมีอินทรีย์ สำหรับแยกสารและทำสารให้บริสุทธิ์ เช่น การสกัดแยกสารประกอบผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ การสกัดแยกสารที่เป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการออกจากของผสมในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ต่างๆ หลักการของการสกัดจะเป็นการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมละลายสารที่ต้องการออกมาจากของผสม

ถ้าตัวถูกละลายอยู่ในสารตัวอย่างของแข็งเพียงแต่ดูดซับที่ผิว และการละลายของตัวถูกละลายในตัวสกัดมีค่าสูง การสกัดสามารถทำได้โดยเติมตัวสกัด หรือตัวทำละลายลงไปในสารตัวอย่างภายในบีกเกอร์ หรือขวดรูปชมพู่ จากนั้นคนด้วยเครื่องคน (magnetic stirrer) หรือใช้เครื่องเขย่า (Shaker) หรืออาจใช้วิธีการแช่ในตัวทำละลาย (Maceration) ที่อุณหภูมิห้อง จนกระทั่งตัวถูกละลายละลายในตัวสกัดหมดแล้ว ให้ใช้วิธีการกรองเอาของแข็งออกจากสารละลายจะสามารถแยกตัวถูกละลายออกมาจากสารตัวอย่างของแข็งได้

2.2 การสกัดด้วยเครื่องซอกเล็ต (Soxhlet extractor)

ถ้าตัวถูกละลายเป็นสารประกอบอินทรีย์ หรือสารทางชีววิทยา ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีการละลายในตัวสกัดต่ำหรือการสกัดจะสมบูรณ์ได้ต้องใช้เวลานาน จำเป็นตังใช้เทคนิคการสกัดด้วยเครื่องซอกเล็ต โดยบรรจุของแข็งที่ต้องการสกัดลงในถุงผ้า แล้วใส่ลงในหลอดแก้ว ตัวสกัดคือตัวทำละลายอินทรีย์ที่ระเหยกลายเป็นไอได้บรรจุอยู่ในขวดก้นกลม โดยการให้ความร้อนแก่ตัวสกัดในขวดก้นกลมจะทำให้ตัวสกัดระเหยกลายเป็นไอผ่านหลอดแก้วไปยังตัวควบแน่น เมื่อตัวสกัดถูกควบแน่นกลายเป็นของเหลวจะไหลตกลงมาบนของแข็งที่ต้องการสกัด เมื่อตัวถูกสกัดถูกสะสมในหลอดแก้วมากเพียงพอ ของเหลวจะเกิดการไหลกลับมายังขวดก้นกลม สารที่ถูกสกัดจะออกมากับตัวสกัด และสะสมในขวดก้นกลม ส่วนตัวสกัดจะถูกความร้อนทำให้กลายเป็นไอแล้วควบแน่นมาใช้ใหม่ได้อีกอย่างต่อเนื่อง

การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระออกจากพืช จัดเป็นการสกัดของแข็งด้วยของเหลว (Solid-liquid extraction) ซึ่งต้องทำการศึกษาตัวแปรที่มีผลต่ออัตราการสกัด และปัจจัยในการเลือกตัวทำละลายเพื่อให้ได้อัตราการสกัดสูงที่สุด

ตัวแปรที่มีอิทธิผลต่อการสกัด

1. **ขนาดอนุภาค (particle size)** ขนาดอนุภาคถ้ามีขนาดเล็กจะทำให้พื้นที่ผิวในการถ่ายเทมวลสารมากขึ้น และระยะทางของตัวถูกละลายที่อยู่ภายในของแข็งจะสั้นลงทำให้ตัวถูกละลายแพร่กระจากออกสู่ตัวทำละลายได้เร็วขึ้น

2. ตัวทำละลาย (solvent) ตัวทำละลายที่ดีควรมีขั้วที่เหมาะสมกับตัวถูกละลาย และมีความหนืดต่ำ เพื่อให้มีการไหลเวียนที่ดี โดยทั่วไปจะใช้ตัวทำละลายบริสุทธิ์ ตัวทำละลายบริสุทธิ์จะไม่มีตัวถูกละลายอยู่เลย ระหว่างการสกัดความเข้มข้นของตัวถูกละลายในตัวทำละลาย และตัวอย่างที่นำมาสกัดจะมีค่าลดลง ทำให้สกัดตัวถูกละลายได้ลดลง

3. อุณหภูมิของตัวทำละลาย เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้อัตราการสกัดสูงขึ้น เนื่องจากเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นสัมประสิทธิ์การแพร่กระจาย (Diffusivity) มีค่าเพิ่มขึ้น

เวลาในการสกัด ถ้าใช้เวลาในการสกัดน้อย สารที่ต้องการสกัดจะถูกสกัดออกมาได้น้อย ดังนั้นจะต้องใช้เวลาในการสกัดที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ปริมาณสารสกัดมากที่สุด

4. **การกวนของการไหล** เป็นสิ่งสำคัญมาก เพราะจะช่วยเพิ่มอัตราการสกัดเนื่องจากเกิดการแพร่ในสภาวะปั่นป่วนทำให้อัตราการแพร่ ทำให้การสกัดดีขึ้น

ปัจจัยในการเลือกตัวทำละลาย

การเลือกตัวทำละลายในการสกัดผลิตภัณฑ์จากพืช มีปัจจัยสำคัญที่ต้องคำนึงถึงดังนี้

1. ตัวทำละลายที่ดีควรละลายสารที่ต้องการสกัดได้ดี (partition coefficient, K สูง) ซึ่งพิจารณาได้จากสภาพขั้วที่คล้ายคลึงกัน

2. ไม่ละลายปนเป็นเนื้อเดียวกันกับสารละลายของของผสมที่จะถูกสกัด

3. ไม่ควรละลายสิ่งเจือปนหรือสารที่ไม่ต้องการ

4. ควรมีจุดเดือดไม่สูงมากนัก เพื่อที่จะกำจัดออกไปจากสารที่ต้องการได้ง่ายภายหลังการสกัด

5. ต้องไม่ทำปฏิกิริยากับสารหรือตัวทำละลายอื่นๆ ที่จะใช้ร่วม

6. ตัวทำละลายควรมีราคาไม่แพง ไม่ควรมีพิษ และไม่ควรติดไฟง่าย (ถ้าจำเป็นต้องใช้ให้หลีกเลี่ยงการจุดตะเกียงหรือเครื่องทำความร้อนในขณะทำการสกัด)

ตัวทำละลายที่นิยมใช้สกัดสารในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ไดเอทิลอีเทอร์ (diethyl ether) ปิโตรเลียมอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต เมธานอล และ เมทธานอล เป็นต้น (วิจิตร เอื้อประเสริฐ และคณะ, 2548: 51-61)

3. สารต้านอนุมูลอิสระหรือแอนติออกซิแดนท์ (Antioxidant)

อนุมูลอิสระ (Free radical) เป็นสารที่มีอิสระอยู่ในวงนอกของอะตอมหรือโมเลกุล ที่มีความว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยา โดยรับอิเล็กตรอนจากสารอื่นๆ ใกล้เคียงมีผลให้ตัวมันเองเสถียรมากขึ้น ในขณะเดียวกันก็ชักนำให้สารที่ให้อิเล็กตรอนไปนั้นมีไม่ครบคู่จนอาจกลายเป็นสารที่มีความรุนแรง ซึ่งถ้าเกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิตอาจทำลายส่วนประกอบสำคัญของเซลล์รอบๆบริเวณนั้นไม่ว่าจะเป็นโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต หรือ ดีเอนเอ (DNA) ทำให้สารชีวโมเลกุลเหล่านั้นเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและเสียหน้าที่การทำงานไป (มลศิริ วีโรทัย, 2545: 1-15)

สารต้านอนุมูลอิสระ หรือ แอนติออกซิแดนท์ (antioxidant) คือสารเคมีที่ทำหน้าที่ต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ((มลศิริ วีโรทัย, 2545: 1-15) รวมถึงสารที่สามารถยับยั้งและควบคุมอนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน จึงช่วยยับยั้งอนุมูลอิสระไม่ให้ทำลายองค์ ประกอบของเซลล์ (วัลยา เนาวรัตน์วัฒนา และพัชรี บุญศิริ. 2542: 196-198) เป็นสารที่สามารถยับยั้งออกซิเดชันในสิ่งมีชีวิตจะมีระบบป้องกันการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อจากอนุมูลอิสระอยู่แล้ว ซึ่งประกอบได้ด้วยแอนติออกซิแดนท์มากมายหลายชนิดที่ทำหน้าที่แตกต่างกันไป บางตัวเป็นเอนไซม์ บางตัวเป็นสารประกอบ บางตัวเป็นสารที่ละลายในน้ำได้ บางตัวละลายได้ในไขมัน แอนติออกซิแดนท์เหล่านี้ทำหน้าที่ในการเป็นตัวป้องกันและกำจัดการก่อตัวของอนุมูลอิสระ นอกนั้นยังทำหน้าที่ซ่อมแซมส่วนที่ถูกทำลาย (สุเขตร์ ศรีบุญเรือง, 2548: 19-23) สารต้านอนุมูลอิสระแบ่งได้เป็น 5 กลุ่ม ดังนี้

3.1 **สารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิ** เป็นสารที่หยุดปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระโดการให้อนุมูลไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระโดยตรงเป็นผลให้อนุมูลนั้นกลายเป็นสารที่มีความเสถียรมากขึ้น สารที่มีสมบัติดังกล่าว เช่น สารประกอบฟีนอลิก หรือสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากการสังเคราะห์ เช่น บิวทิเลเตต ไฮดรอกซี่ โทลูอีน (Butylated hydroxy toluene, BHT) เป็นต้น

3.2 **สารต้านอนุมูลอิสระทุติยภูมิ** สารต้านอนุมูลอิสระประเภทนี้ไม่ทำปฏิกิริยา โดยตรงกับอนุมูลอิสระแต่จะทำหน้าที่คล้ายไฮโดรเพอร์ออกไซด์ ของไขมันทำให้เกิดเป็นสารที่มีความเสถียร เช่น กรดไทโอโพรพิโอนิก (Thiopropionic acid) เป็นต้น

3.3 **สารที่ทำหน้าที่ดักจับออกซิเจน** เป็นสารที่ทำปฏิกิริยากับออกซิเจน แล้วกำจัดออกไปจากระบบได้ซึ่งสารจับออกซิเจนจะช่วยเสริมฤทธิ์ หรือเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) เป็นต้น

3.4 **เอนไซม์ที่ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ** เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่กำจัดออกวิเจน เช่น กลูโคสออกซิเดส (Glucose oxidase) หรือกำจัดสารที่เกิดการออกซิเดชันได้ เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมูแทรส (Superoxide dismutase)

3.5 **สารที่ทำหน้าที่จับอนุมูลอิสระ** เป็นสารที่ทำหน้าที่จับกับอนุมูลโลหะ ซึ่งอนุมูลโลหะ เช่น เหล็ก ทองแดง จะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน สารที่ทำหน้าที่จับอนุมูลอิสระนี้เป็นตัวส่งเสริมการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิ ซึ่งสารเหล่านี้อาจมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเล็กน้อยหรืออาจไม่มีเลย เช่น กรดซิตริก (Citric acid) กรดอะมิโน (Amino acid) (ชัยรัตน์ พึ่งเพียร, 2552: 49-60)

4. กลไกลการทำหน้าที่ของสารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระมีกลไกลการทำงานแบ่งออกเป็น 6 กลุ่มดังนี้

4.1 การดักจับอนุมูลอิสระ (Radical scavenging) สารต้านอนุมูลอิสระ (AH) เหล่านี้สามารถชะลอหรือยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของไขมันได้ในระยะเพิ่มจำนวน โดยการให้อนุมูลไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ ดังสมการ

$$LOO^{\circ} + AH \longrightarrow LOOH + A^{\circ}$$

$$LO + AH \longrightarrow LOH + A^{\circ}$$

$$A^{\circ} + LOOH \longrightarrow AH + LOO^{\circ}$$

$$A^{\circ} + LOO^{\circ} \longrightarrow AOOL$$

$$A^{\circ} + A^{\circ} \longrightarrow \text{non-radical products}$$

4.2 การสลายเพอร์ออกไซด์ (Peroxide decomposing) สารประกอบฟีนอลิกบางชนิดสามารถทำหน้าที่สลายเพอร์ออกไซด์ของไขมัน ให้เกิดเป็นสารที่มีความเสถียร เช่น แอลกอฮอล์ คีโตน หรือ แอลดีไฮด์

4.3 การยับยั้งการทำงานของ Singlet oxygen (Singlet oxygen quenching) โดยปกติออกซิเจนที่อยู่ในสถานะพื้น (Ground state) จะอยู่ในรูปของ Triplet oxygen ($^3O_2$) จะไม่ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับกรดไขมัน แต่เมื่อ Triplet oxygen ได้รับพลังงานกระตุ้นจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ Singlet oxygen ($^1O_2$) ซึ่งจะไวต่อการเข้าทำปฏิกิริยากรดไขมัน ซึ่งสารที่มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ Singlet oxygen อาจไปยับยั้งสารที่ไปกระตุ้นการเกิด Singlet oxygen หรืออาจเข้าจับกับ Singlet oxygen โดยไม่ทำปฏิกิริยาเคมี หรืออาจเข้าทำปฏิกิริยากับ Singlet oxygen (Meryer, et al., 2002: 124-174)

4.4 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Enzyme inhibiting) สารประกอบฟีนอลิกบางชนิด เช่น ฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิก และแกลเลต (Gallates) สามารถ

ยับยั้งการทำงานของเอนไซด์ลิพอกซีจิเนส ได้โดยการเข้าจับกับไอออนของเหล็กซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ จึงส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว (ปณัฐฐา ไชยมุติ, 2547: 1-13)

4.5 การจับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Metal chelating) อนุมูลโลหะ เช่น เหล็ก ทองแดง เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันโดยสารที่ทำหน้าที่จับกับโลหะเหล่านี้ เช่น ฟลาโวนอยด์ กรดซิตรก เอทิลีน ไดอะมินเททรา แอซิติกแอซิด (Ethylenediamine tetraacetic acid; EDTA) นอกจากนี้ กรดอะมิโน เฟปไทด์ และแลตโตเฟอริน (Lactoferrin) ก็มีความสามารถในการจับกับอนุมูลโลหะเช่นกัน (Meryer, et al., 2002: 124-174)

4.6 การดักจับออกซิเจน (Oxygen scavenging) กรดแอสคอร์บิกมีสมบัติในการจับกับออกซิเจน สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับซุปเปอร์ออกไซด์ ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (Hydrogenperoxide) อนุมูลไฮดรอกซิล อนุมูลเพอร์รอกซิล และ Singlet oxygen กรดแอสคอร์บิก ทำหน้าที่เป็นรีดิวซิง (Reducing agent) ซึ่งจะถ่ายไฮโดรเจนอะตอม (H) ให้กับออกซิเจน จึงทำให้ออกซิเจนไม่สามารถทำปฏิกิริยาต่อไป นอกจากนี้กรดแอสคอร์บิกยังทำหน้าที่เป็นตัวเสริมฤทธิ์ (Synergist) ให้กับโทโคฟีรอล (Tocopherols) โดยจะช่วยให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลแอลฟา-โทโคฟีรอล เพอร์รอกซิล เปลี่ยนรูปกลับไปเป็นแอลฟา-โทโคฟีรอล ซึ่งมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระได้อีกครั้ง (ปณัฐฐา ไชยมุติ, 2547: 1-13)

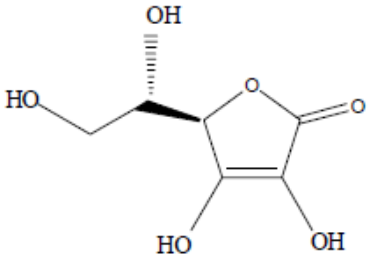
5. แหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มดังนี้

5.1 สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (Natural antioxidants) เป็นสารที่พบได้ในธรรมชาติไม่ว่าจะมาจากพืช จุลินทรีย์ หรือเนื้อเยื่อของสัตว์ แบ่งกลุ่มสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติเป็น 4 กลุ่มได้แก่ กลุ่มโมเลกุลเล็ก เช่น กรดแอสคอร์บิก โทโคฟีรอล แคโรทีนอยด์ และ โพลีฟีนอล กลุ่มของเอนไซม์ เช่น ซุปเปอร์ออกไซด์ ดิสมูเทรส กลูทาไทโอนเพอร์ออกซิเดส (Glutathaione peroxidase) กลุ่มสารโมเลกุลใหญ่ เช่น อัลบูมิน (Albumin) เฟอติน (Ferritin) เป็นต้น

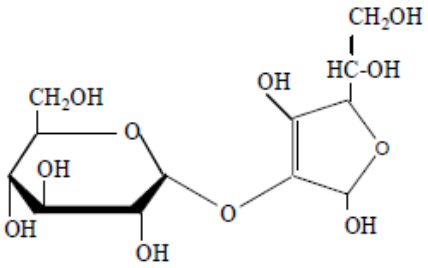
สารในธรรมชาติที่มีสมบัติเป็นสารแอนติออกซิแดนท์ได้จะเกี่ยวข้องกับความสามารถในการให้ไฮโดรเจนของหมู่ OH ในสารประกอบฟีนอล ความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของสาร (antioxidant activity, AOA) ขึ้นอยู่กับตำแหน่งและจำนวนของหมู่ OH รวมทั้งโครงสร้างอื่น ๆ ของโมเลกุล สารแอนติออกซิแดนท์ในธรรมชาติที่สำคัญมีดังนี้ (สุภามาส อินทฤทธิ์, 2547: 156-163)

5.1.1 วิตามินซี (Ascorbic Acid)

วิตามินซีเป็นสารที่ละลายน้ำได้ ลักษณะเป็นผลึกสีขาว ไม่มีกลิ่น มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า กรดแอสคอร์บิค (ascorbic acid) ในธรรมชาติจะพบ 2 รูปแบบ คือ Ascorbic acid (Reduced Form) และ Dehydro-ascorbic acid (Oxidized Form) สะสมมากที่บริเวณต่อมหมวกไต รองลงมาคือตับและม้าม ตามลำดับ วิตามินซีมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมตาบอลิซึมของกรดอะมิโน และทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ของปฏิกิริยาทางชีวเคมีต่างๆในร่างกาย นอกจากนี้วิตามินซียังเป็นส่วนหนึ่งของกลุ่มสารชีวเคมีที่สร้างคอลลาเจน (collagen) ซึ่งเป็นโปรตีนส่วนหนึ่งของโครงสร้างกระดูกมนุษย์ วิตามินซีเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญชนิดหนึ่งในกระบวนการเมตาบอลิซึมในร่างกายเป็นสารสำคัญในปฏิกิริยาสายโซ่ของเอนไซม์ที่สำคัญ นอกจากนี้ยังเป็นตัวที่ทำให้วิตามินอีนั้นกลับคืนมาได้ใหม่อีกครั้ง วิตามินซีเป็นตัวก่อให้เกิดและปกป้องคอลลาเจน เสริมสร้างหน้าที่ของระบบภูมคุ้มกันให้ดีขึ้น เป็นตัวปรับน้ำตาลในเลือด ปกป้องดวงตาจากการทำลายของแสงอัลตราไวโอเลต ป้องกันการก่อตัวของคลอเลสเตอรอลในผนังเลือดแดง ป้องกันการแข็งตัวของเลือด ช่วยทำให้ปอดทำงานได้ดีขึ้น ช่วยให้มีการดูดซึมเหล็กได้ดีขึ้นที่ลำไส้เล็ก ป้องกันการเปลี่ยนรูปของสารไนไตรท์เป็นสารไนโตรซามีน ซึ่งเป็นสารก่อตัวมะเร็ง และเป็นตัวร่วมในการสร้างฮอร์โมนที่เป็นตัวลดระดับภาวะตึงเครียดและภาวการณ์อักเสบ (สุเขตร์ ศรีบุญเรือง, 2548: 19-23)



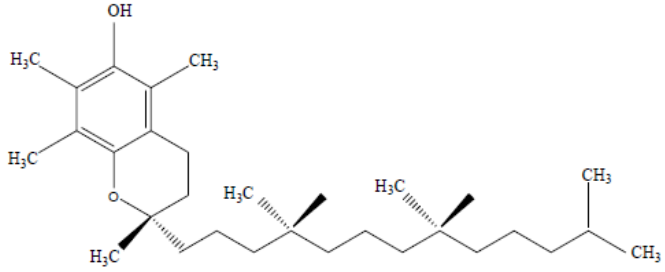
ภาพที่ 2.2 แสดงโครงสร้างของวิตามินซี (Ascorbic Acid)



ภาพที่ 2.3 แสดงโครงสร้างของวิตามินซี (Ascorbic Acid-2-Glucoside)

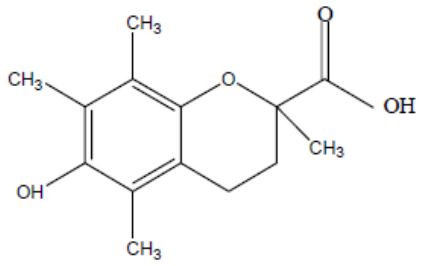
5.1.2 วิตามินอี (α -Tocopherol)

เป็นโมเลกุลที่ละลายได้ดีในน้ำมันหรือลิพิด ดังนั้นจึงสามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าได้ วิตามินอีช่วยปกป้องผนังเซลล์จากอนุมูลอิสระ การสะสมวิตามินอีบนผิวหนัง พบว่าช่วยปกป้องผิวจากแสงแดด และป้องกันมะเร็งจากผิวหนัง รวมทั้งช่วยซ่อมแซมผิวและให้ภูมิคุ้มกันผิวหนังอีกด้วย (โอภา วัชระคุปต์ และ มาลีรักษ์ อัตต์สินทอง, 2549: 75-76) ซึ่งปริมาณวิตามินอีในเลือดของคนปกติมีค่า 1.0 mg ต่อ 90% ของวิตามินอีในเนื้อเยื่อซึ่งจะอยู่ในรูป Tocopherol สะสมในอวัยวะต่างๆ เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์ทั่วๆไป คือ ตับ กล้ามเนื้อ เนื้อเยื่อไขมัน และต่อมต่างๆ วิตามินอีมีประสิทธิภาพในการทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิแดนท์ได้ดีมากจะป้องกันกระบวนการออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัว ซึ่งเป็นส่วนประกอบของฟอสโฟลิปิดของแมมเบรนของออร์แกนเนล เนื่องจากวิตามินอีละลายในไขมันได้ดีจะแทรกตัวอยู่ตามเมมเบรน โดยเมื่อเกิด Liquid Peroxidation จะมีการสร้าง Peroxyl Radicals และ Alkoxyl Radicals ขึ้น วิตามินอีจะเข้าจับกับสารดังกล่าวก่อนที่ Peroxyl Radicals และAlkoxyl Radicals จะไปจับกับกรดไขมันอื่นในช่วงของ Propagation อีกทั้งวิตามินอียังทำงานร่วมกับ Glutathione Peroxidase และธาตุ Selenium โดยในช่วงแรกๆ มีการตั้งชื่อวิตามินอีว่า วิตามินป้องกันการเป็นหมัน (antisterility vitamin) เนื่องจากพบว่าวิตามินอีเป็นสารที่จำเป็นสำหรับการสืบพันธุ์ในหนูตัวเมีย ถ้าขาดวิตามินอีจะทำให้ลูกอ่อนตายในครรภ์และแท้งลูก นอกจากนี้ยังพบมีการเรียกวิตามินอีว่า โทโคฟีรอล (tocopherol) ในธรรมชาติมีวิตามินอีอยู่หลายชนิด ปัจจุบันแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ โทโคฟีรอล และโทโคไทรอินอล (tocotrienol) แต่ละกลุ่มยังแยกเป็นวิตามินย่อยๆอีก 4 ชนิด มีชื่อเรียกตามพยัญชนะในภาษาละตินว่า แอลฟา (α) เบต้า (β) แกมมา (γ) และเดลต้า (δ) ขึ้นอยู่กับจำนวนและตำแหน่งของหมู่เมธิลที่ติดกับวงแหวนโครเมน (chromane ring) โทโคฟีรอลแตกต่างจากโทโคไทรอินอลที่โครงสร้างของโทโคฟีรอลมีแขนงข้างเป็น 4’, 8’, 12’- trimethyltridecyl เรียกว่า phytol หรือ phytyl side chain ส่วนโทโคไทรอินอลมีแขนงข้างที่มีพันธะคู่ที่ตำแหน่ง 3’, 7’ และ 11’ เรียกว่า unsaturated side chain (Cadenas and Packer, 1996)



ภาพที่ 2.4 แสดงโครงสร้างวิตามินอี (α -Tocopherol)

โทรลอก (trolox) เป็นอนุพันธ์ของวิตามินอีที่ดัดแปลงโครงสร้างโดยการเปลี่ยนสายอัลเคนเป็นหมู่คาร์บอกซิลิก (-COOH group) ทำให้สามารถละลายได้ดีในน้ำ แต่เนื่องจากความสามารถในการละลายน้ำได้ดี จึงทำให้ออกฤทธิ์เร็วกว่าวิตามินอี โดยวิตามินอีต้องใช้เวลานานเป็นชั่วโมงหรือเป็นวัน ในขณะที่ trolox ออกฤทธิ์เกือบจะทันทีในหลายโมเดล (โอภา วัชระคุปต์ และมาลีรักษ์ อัตต์สินทอง, 2549: 75-76) trolox เป็นแอนติออกซิแดนท์ที่กำจัดพวกเปอร์ออกซิล และอัลคอกซิล เรดิคัล จากนั้นจะเปลี่ยนรูปเป็น trolox radical โดยมีวิตามินซี เป็นตัวช่วยให้คืนรูปกลับมา (สุเขตร์ ศรีบุญเรือง, 2548: 19-23)



ภาพที่ 2.5 แสงโครงสร้างของโทรลอก (trolox)

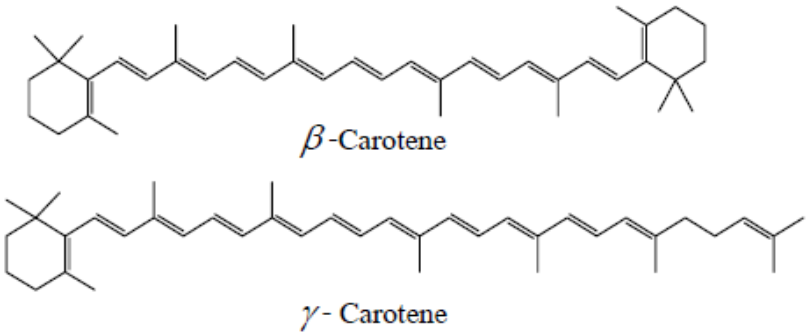
5.1.3 สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (Carotenoid)

แคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เป็นสารสำคัญที่พบในคลอโรพลาสต์ของพืชมีบทบาทในการสังเคราะห์แสงเช่นเดียวกับคลอโรฟิลล์ โดยทำหน้าที่ช่วยคลอโรฟิลล์ในการดักรับพลังงานแสง ในผักและผลไม้ที่ยังไม่สุกจะพบแคโรทีนอยด์น้อยกว่าผักและผลไม้ที่สุกแล้ว เนื่องจากปกติผักใบเขียวหรือผักและผลไม้ที่ยังดิบอยู่ แคโรทีนอยด์จะอยู่ในส่วนของ คลอโรพลาสต์ ในขณะที่ผักหรือผลไม้สุกแคโรทีนอยด์จะถูกสังเคราะห์ขึ้นในโครโมพลาสต์เป็นปริมาณมากเนื่องจากเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์มีมากขึ้น โครงสร้างพื้นฐานของแคโรทีนอยด์ประกอบด้วยโครงสร้างหลักที่เรียกว่า tetraterpene skeleton ซึ่งอาจมีวงแหวนที่บริเวณปลายด้านใดด้านหนึ่งหรือทั้งสองข้างของโมเลกุล วงแหวนนี้อาจเป็นวงแหวนห้าหรือหกเหลี่ยมก็ได้ แคโรทีนอยด์สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ตามองค์ประกอบของโครงสร้างในโมเลกุล ดังนี้

1. แคโรทีน (Carotene) เป็นแคโรทีนอยด์ที่โครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยคาร์บอนและไฮโดรเจนเท่านั้น เช่น เบต้า-แคโรทีน (β-carotene) แอลฟา-แคโรทีน (α-carotene) แกมมา-แคโรทีน (γ-carotene) และไลโคพีน (lycopene) เป็นต้น

2. ออกโซแคโรทีนอยด์ (Oxocarotenoid) หรือแซนโทฟิลล์ (xanthophylls) เป็นแคโรทีนอยด์ที่โครงสร้างโมเลกุลบริเวณวงแหวนประกอบด้วยกลุ่มอื่น นอกเหนือจากคาร์บอนและไฮโดรเจน

เช่น เบต้า-คริบโทแซนทิน (β-cryptoxanthin) และลูทีน (lutein) มี hydroxyl group, Violerythrin มี keto group และ Violaxanthin มี epoxy group เป็นต้น



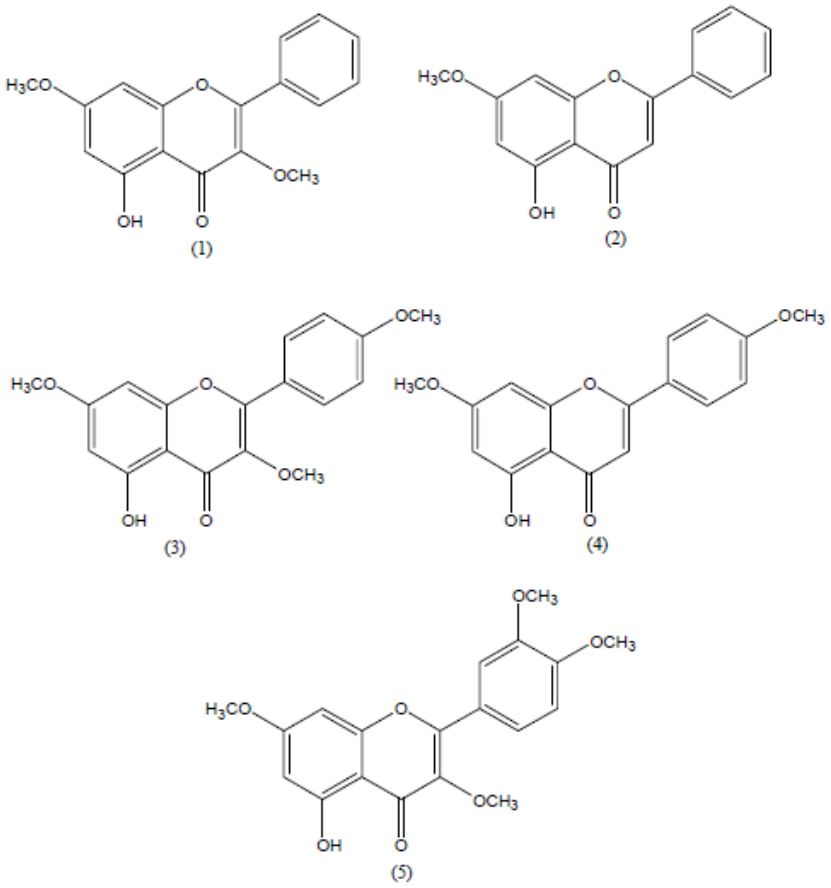
ภาพที่ 2.6 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของแคโรทีนอยด์บางชนิด

5.1.4 สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

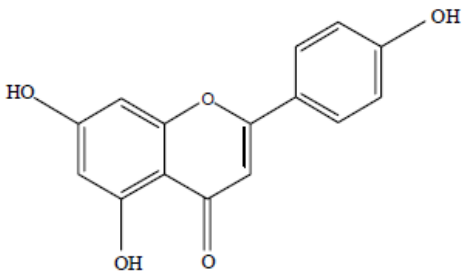
เป็นสารกลุ่มที่พบมากที่สุดในธรรมชาติ พบอยู่ทั่วไปในพืชที่มีสีเขียว และพบในทุกส่วนของพืช ไม่ว่าจะเป็นใบ ราก เนื้อไม้ เปลือกต้น ดอก ผล หรือเมล็ด เป็นสารที่ให้สี (pigments) ในสัตว์สามารถพบได้บ้าง โดยเชื่อว่ามาจากพืชที่บริโภคเข้าไปมากกว่าการเกิดชีวสังเคราะห์ในร่างกายของสัตว์เอง ฟลาโวนอยด์จัดเป็นสาระสำคัญของกลุ่มโพลีฟีนอล (ปรีชา บุญจูง, 2549: 124-127)

สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ นอกจากจะเป็นสารที่ทำให้ดอกหรือผลมีสีสวย เช่น สีเหลือง ชมพู แดง ฟ้า หรือม่วง ซึ่งมีประโยชน์ใช้ล่อแมลง นก หรือผึ้งเข้ามาผสมเกสร เพื่อแพร่กระจายพันธุ์แล้ว มีรายงานการยืนยันถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารฟลาโวนอยด์ที่ใช้ป้องกันและรักษาโรคต่างๆ เช่นโรคเกี่ยวกับหัวใจและหลอดเลือด ฤทธิ์ต้านมะเร็ง การต้านแบคทีเรีย ต้านการอักเสบ ต้านแพ้ ต้านไวรัส เป็นต้น คุณสมบัติเหล่านี้มีความสัมพันธ์กับคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของฟลาโวนอยด์ (ปรีชา บุญจูง, 2549: 124-127)

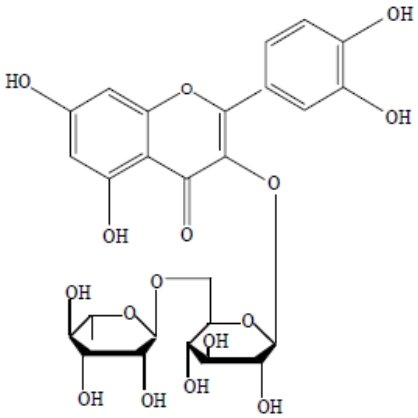
ฟลาโวนอยด์ที่มีความสำคัญทางเภสัชกรรมและการแพทย์แผนปัจจุบันในขณะนี้ เช่น รูทิน (rutin) ที่มีฤทธิ์ช่วยเพิ่มความต้านทานของหลอดเลือดฝอย และสารสกัดจากใบแป๊ะก้วยช่วยเพิ่มการไหลเวียนของโลหิตไปสมองและช่วยทำลายอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดความเสื่อมของเนื้อเยื่อในร่างกายมนุษย์ ฟลาโวนอยด์เป็นสารที่มีสมบัติในการยับยั้งการเกิด ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ดีมากในอาหารประเภทไขมันและไขมันผสมน้ำ



ภาพที่ 2.7 แสดงโครงสร้างของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)



ภาพที่ 2.8 แสดงโครงสร้างของโพลีฟีนอล (Polyphenol)

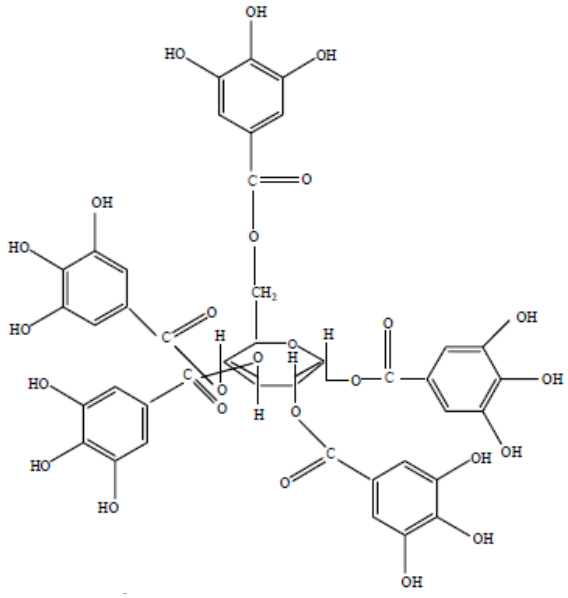


ภาพที่ 2.9 แสดงโครงสร้างของรูทิน (Rutin)

5.1.5 สารกลุ่มแทนนิน (Tannins)

แทนนิน คือ กลุ่มของสารประกอบที่ได้มาจากส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น เปลือก ใบ ผล เปลือกผล ซึ่งมีคุณสมบัติละลายได้ดีในน้ำ สามารถรวมตัวกับโปรตีนในหนังสัตว์ ในปัจจุบันได้มีการนิยามว่า แทนนิน คือ สารประกอบฟีนอลิคที่ได้จากธรรมชาติที่มีน้ำนักโมเลกุลระหว่าง 500 และ 3,000 ทั้งยังมีหมู่ฟีนอลิคไฮดรอกซี (phenolic hydroxyl) อิสระอยู่จำนวนหนึ่ง (1-2 หมู่ต่อ 100 หน่วยน้ำหนักโมเลกุล) ที่สามารถเกิดการเชื่อมโยงได้กับสารโปรตีนและสารไบโอโพลิเมอร์ (biopolymer) เช่น เซลลูโลส (cellulose) และ เพคติน (pectin) ได้สารใหม่ที่มีคุณสมบัติคงตัว

ธรรมชาติของแทนนินนั้น พบว่ามีการกระจายตัวอยู่ในอาณาจักรของพืชเกือบทุกวงศ์ และเกิดเป็นองค์ประกอบที่สำคัญที่เด่นมากในพืชใบเลี้ยงคู่จำนวนมากมาย แต่ในพืชชั้นต่ำ เช่น เชื้อรา สาหร่าย มอสส์ ลิฟเวอร์เวิร์ท (liverworts) ตลอดจนพวกหญ้าทั้งหลาย พบว่ามีแทนนินเป็นองค์ประกอบอยู่น้อยมาก บทบาททางนิเวศวิทยาของแทนนินที่พบอยู่ในพืชยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด และโดยทั่วไปแล้วพืชทั้งหลายมักจะมีแทนนินเป็นองค์ประกอบ (สุเขตร์ ศรีบุญเรือง, 2548: 19-23)



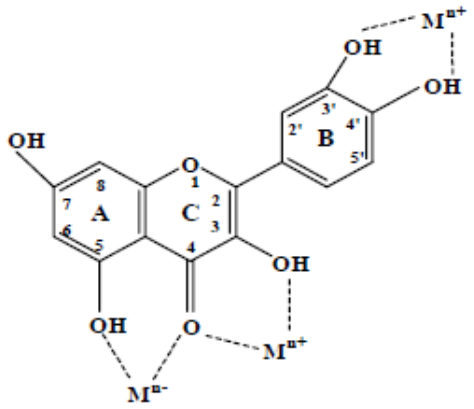
ภาพที่ 2.10 แสดงโครงสร้างของแทนนิน (Tannins)

5.1.6 สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compound)

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่พบได้ในพืชทั่วไป พบได้มากในธรรมชาติอันได้แก่ ผักสีเขียว ผลไม้ ชาเขียว ชาดำ ชอกโกแลต และไวน์แดง เป็นต้น ในปัจจุบันสารประกอบฟีนอลิกมากกว่า 8,000 ชนิด ในธรรมชาติ (ปรีชา บุญจูง, 2549: 124-127) มีคุณสมบัติเป็นสารอินทรีย์ที่มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนอะโรมาติก (aromatic ring) ที่มีจำนวน hydroxyl group อย่างน้อยหนึ่งโมเลกุล สามารถละลายได้ในน้ำ ส่วนใหญ่สารประกอบฟีนอลิกมักพบอยู่รวมกับน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ (glycoside) สารประกอบฟีนอลิกที่พบในธรรมชาติมีหลายกลุ่ม และมีลักษณะสูตรโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกัน กลุ่มใหญ่ที่พบจะเป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์ (flovonoid) นอกจากนั้นยังมีสารประกอบต่างๆ เช่น simple monocyclic phenol, phenyl propanoid, phenolic, quinine และ polyphenolic ซึ่งได้แก่ ลิกนิน (lignin) เมลานิน (melanin) และแทนนิน (tannin) รวมทั้งยังพบว่ามีสารประกอบที่มีกลุ่มฟีนอล (phenolic unit) รวมอยู่ในโมเลกุลของโปรตีนอัลคาลอยด์ (alkaloid) และเทอร์ฟีนอยด์ (terpenoid) เป็นต้น

สารประกอบฟีนอลิกมีคุณสมบัติที่หลากหลายตามชนิดของสารนั้นๆ เช่น ลิกนินทำหน้าที่เป็นโครงสร้างให้ความแข็งแรงแก่ผนังเซลล์ของพืช สารในกลุ่มแอนโธไซยานิน (anthocyanin) เป็นสารที่ให้สีในดอกไม้ สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์มีความสำคัญในการควบคุมการเจริญของพืชจำพวกถั่ว เป็นต้น นอกจากนี้พบว่าสารประกอบฟีนอลิกหลายชนิดมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น ฟลาโว

นอยด์ กรดฟีนอลิก และแทนนิน เป็นต้น สารประกอบฟีนอลิกทำหน้าที่เป็นตัวขับไล่อนุมูลอิสระ ที่สำคัญคืออนุมูล peroxyl โดยมีกลไก 2 แบบ คือ เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นต่ำเมื่อเทียบกับสารออกซิไดซ์ สารประกอบฟีนอลิกจะหน่วงเหนี่ยวหรือป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน นอกจากนี้อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาจะถูกทำให้เป็นสารที่มีความเสถียร ดังนั้นจึงสามารถป้องกันการเกิดขั้นตอน propagation ได้ (Basu et. al., 1999) นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิกบางชนิดยังทำหน้าที่เป็น chelating agent ดักจับไอออนของโลหะเข้าไว้ในโมเลกุล เช่น เคอร์ซิทิน (quercetin) โดยโครงสร้างของเคอร์ซิทินมีตำแหน่ง (binding site) ที่สามารถดักจับไอออนของโลหะ เช่น ทองแดง ได้ 3 บริเวณ คือบริเวณ 3',4'-dihydroxyl ของวงแหวน B บริเวณ 3-hydroxyl, 4-ketoของวงแหวน C และบริเวณระหว่างตำแหน่ง 5-hydroxy ของวงแหวน A กับตำแหน่ง 4-keto ของวงแหวน C ดังรูปภาพที่ 2.11



ภาพที่ 2.11 แสดงบริเวณ bingding site ของเคอร์ซิทินที่จับกับไอออนของโลหะ

สารประกอบฟินอลิกยังทำหน้าที่เป็นสารรีดิวซ์ เป็นตัวให้ไฮโดรเจนและกำจัดออกซิเจนที่อยู่ในรูปแอคทีฟ ด้วยทำหน้าที่ต่างๆ ดังกล่าวจึงทำให้สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญชนิดหนึ่งในพืชทั่วไป

5.18 เอนไซม์ และโปรตีนบางชนิด

เมื่อร่างกายอยู่ในสภาวะเครียด (oxidative stress) ซึ่งเป็นสภาวะที่ร่างกายไม่สามารถควบคุมและป้องกันปริมาณของอนุมูลอิสระให้อยู่ในระดับปกติที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ได้ ร่างกายจะมีระบบป้องกันอนุมูลอิสระที่เรียกว่า antioxidant defense system ซึ่งได้แก่ สารในกลุ่มของเอนไซม์ โปรตีน และสารอาหารต่างๆ เช่น วิตามินซี และวิตามินอี (วัลยา เนาวรัตน์วัฒนา และ พัชรี

บุญศิริ, 2542: 196-198) สารต้านอนุมูลอิสระในระบบดังกล่าวจะทำหน้าที่ยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ ยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระและซ่อมแซมเซลล์ที่ได้รับความเสียหายเนื่องจากอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มของเอนไซม์แบ่งเป็น 2 ประเภท ดังนี้

เอนไซม์ primary antioxidant เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีหลายชนิด เช่น

1. เอนไซม์ Superoxide Dismutase (SOD) แบ่งเป็นชนิดย่อยได้ 3 ชนิด คือ ชนิดที่มีแมงกานีสในโมเลกุล เรียกว่า manganese containing enzyme (MnSOD) ชนิดที่มีเหล็กในโมเลกุล เรียกว่า iron containing enzyme (FeSOD) และชนิดที่มีทั้งทองแดงและสังกะสีในโมเลกุล เรียกว่า copper/zinc containing enzyme (CuZnSOD) ทั้ง MnSOD และ FeSOD เป็นเอนไซม์ที่พบในสิ่งมีชีวิตพวกโปรคาริโอต ส่วน CuZnSOD พบในสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอต เอนไซม์ SOD มีบทบาทสำคัญในการกำจัดอนุมูล superoxide ($O_2^{\cdot-}$) ดังสมการ

$$2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + {}^3O_2$$

2. เอนไซม์ Catalase (CAT) เอนไซม์ CAT พบในสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอตเป็นส่วนใหญ่ มีบทบาทสำคัญในการสลาย โมเลกุลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ไปเป็นน้ำและออกซิเจน ดังสมการ

$$2H_2O_2 \xrightarrow{CAT} 2H_2O + {}^3O_2$$

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

$$ROOH + 2GSH \xrightarrow{GPOX} H_2O + ROH + GSSG$$

3. เอนไซม์ Aauxiliary Aantioxidant เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีหลายชนิด เช่น NAD(P)H dehydrogenase (quinine) หรือ DT-diaphorase ascorbate reclying enzyme และ antioxidant protease เป็นต้น

5.1.8 เอนไซม์ และโปรตีนบางชนิด

สำหรับโปรตีนบางชนิดที่แสดงสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระมีหลายชนิด และมีหน้าที่ที่แตกต่างกันไป ซึ่งสรุปดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงชนิดและหน้าที่ของสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มของโปรตีน

Protein	functionality
Albumin	Cu scavenging
Ceruloplasmin	Ferro-O_2-oxidoreductase
Heat shock proteins	Stress repair proteins
Metallothioneins	Metal binding proteins
Transferrins	Fe transport proteins
Ferritins (phytoferritins)	Fe storage proteins

1. อัลบูมิน (Albumin) โปรตีนอัลบูมินเป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญมาก ที่พบในพลาสมา โดยโปรตีนอัลบูมินสามารถเข้าจับกับไอออนทองแดงได้อย่างรวดเร็ว จึงเป็นการขับไล่ไอออนทองแดงทางอ้อม เป็นผลให้อนุมูลอิสระเกิดขึ้นน้อยลง

2. ทรานส์เฟอริน (Transferrin) โปรตีนทรานส์เฟอรินเป็นกลไกโคโปรตีนที่พบในพลาสมา เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่งเหล็ก (iron transporting protein) และมีบทบาทหน้าที่ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระร่วมกับโปรตีนเฟอริติน

3. เฟอริติน (Ferritin) เฟอริตินเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่สะสมเหล็ก เฟอริตินที่พบในพืชจะเรียกว่า phyto ferritinในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะพบเฟอริตินสะสมในส่วนของไซโตซอลและในซีรัม

4. เมทัลโลไธโอนีน (Metallothionein) โปรตีนเมทัลโลไธโอนีนไม่สามารถที่จะทำหน้าที่กำจัดโลหะไอออนดังเช่นโปรตีนชนิดอื่น แต่โปรตีนนี้สามารถทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระได้โดยตรง

5. เซรูโลพลาสมิน (Ceruloplassmin) เซรูโลพลาสมินเป็นโปรตีนที่มีไอออนทองแดงอยู่ในโมเลกุล (Copper containing protein) มีสมบัติเป็นเอนไซม์ ferrioxidase ซึ่งจะออกซิไดส์ Fe^{2+} ไปเป็น Fe^{3+} เป็นการส่งเสริมให้เหล็กรวมเข้าไปในโมเลกุลของโปรตีนเฟอริตินได้ เซรูโลพลาสมินจึงมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเพราะช่วยกำจัดไอออนของเหล็กให้รวมกับโปรตีนเฟอริติน

6. Heat shock protein เป็นโปรตีนที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยสัมพันธ์กับความเครียด (stress) และความร้อนอย่างฉับพลัน (heat shock) ของเซลล์ บทบาทของโปรตีนชนิดนี้ คือสามารถกำจัด Hg^{2+} ซึ่งเป็นไอออนที่ทำให้เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

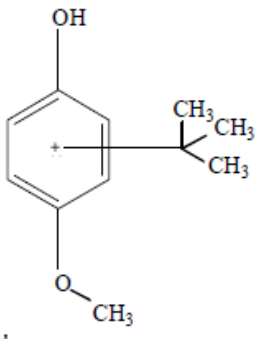
5.2 สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (Synthesis antioxidants) เป็นสารประกอบฟีนอลิกที่สังเคราะห์ขึ้น โดยในโครงสร้างจะมีการเติมหมู่แอลคิล เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติให้เหมาะสมกับการละลายในไขมัน นำไปใช้เพื่อป้องกันการเกิดออกซิเดชันของไขมัน สารสังเคราะห์เหล่านี้ เช่น บีเอชเอ บีเอชที และบีเอชคิว โดยในปริมาณไม่เกิน 0.02%

สารแอนติออกซิแดนท์ที่ได้จากการสังเคราะห์มีโครงสร้างได้หลายแบบและยับยั้งการเกิดออกซิเดชันด้วยกลไกที่แตกต่างกันดังนี้ (สุภามาส อินทฤทธิ์, 2547: 156-163)

สารแอนติออกซิแดนท์สังเคราะห์ชนิด proper antioxidants คือสารที่มีสมบัติเป็นตัวยับยั้งที่มีกลไกการป้องกันการเกิดออกซิเดชันด้วยตัวของมันเอง เป็นสารที่เติมลงไปเพื่อรับเอาอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นหลังจากสารอินทรีย์เสียไฮโดรเจนไปแล้ว เพื่อให้เกิดเป็นสารใหม่ที่เสถียรกว่าจึงสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ได้ ซึ่งมีด้วยกัน 4 ชนิด คือ

5.2.1 Butylated Hydroxyanisole (BHA)

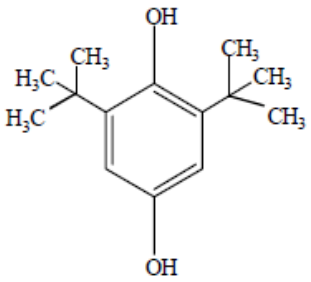
เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่นิยมใช้กันมากชนิดหนึ่งโดยเฉพาะอย่างยิ่งในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทที่มีไขมันและน้ำมันเป็นส่วนประกอบ มีลักษณะเป็นของแข็งมันวาวสีขาว ละลายได้ในไขมันแต่ไม่ละลายในน้ำ



ภาพที่ 2.12 แสดงโครงสร้างของสาร Butylated Hydroxyanisole (BHA)

5.2.2 Butylated Hydroxytoluene (BHT)

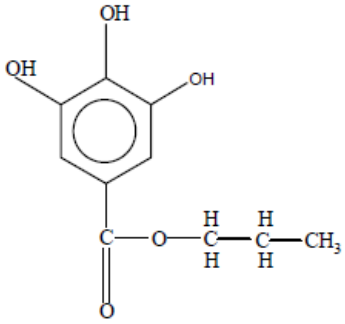
มีลักษณะเป็นผลึกสีขาวเป็นสารต้านอนุมูลอิสระอีกชนิดหนึ่งที่นิยมใช้กัน เช่นเดียวกับ BHA แต่มีประสิทธิภาพดีกว่าเล็กน้อย



ภาพที่ 2.13 แสดงโครงสร้างของสาร Butylated Hydroxytoluene (BHT)

5.2.3 Propyl Gallate (PG)

เป็นเอสเทอร์ของกรดแกลลิค มีลักษณะเป็นผงสีขาวละลายน้ำ เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพดีมาก ช่วยป้องกันการเกิดเพอร์ออกไซด์ได้ดี

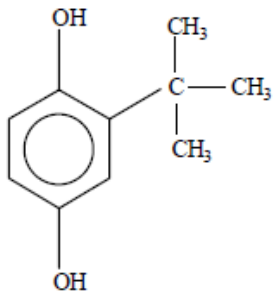


ภาพที่ 2.14 แสดงโครงสร้างของสาร Propyl Gallate (PG)

5.2.4 Tertiary Butylhydroquinone (TBHQ)

มีลักษณะเป็นผงสีขาวคล้ำ เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดสำหรับผลิตภัณฑ์อาหารประเภททอด ช่วยป้องกันเรื่องการเปลี่ยนแปลงของสีและการเกิดออกซิเดชัน นอกจากนี้ยังละลายได้ดีใน

น้ำมันและไขมัน สารบางชนิดต้องทำงานร่วมกับสารแอนติออกซิแดนท์ชนิดอื่น ๆ จึงจะมีสมบัติในการป้องกันการเกิดออกซิเดชันได้ เช่น กรดซิทริก กรดทาร์ทาริก และกรดแอสคอร์บิก



ภาพที่ 2.15 แสดงโครงสร้างของสาร Tertiary Butylhydroquinone (TBHQ)

6. การวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

ปัจจุบันได้มีผู้คิดค้นและพัฒนาวิธีการวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระไว้หลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธีมีหลักการที่แตกต่างกันออกไป เช่น

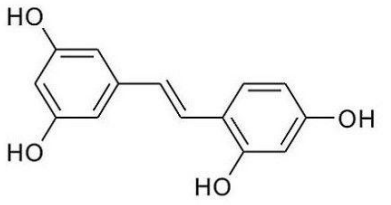
1. trolox equivalent antioxidanct capacity (TEAC) assay
2. total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) assay
3. enhanced chemiluminescence (ECL)
4. thiobarbituric acid assay (TBA)
5. 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothazoline-6-sulphonic acid) diasonium salt (ABTS)
6. N,N-diphynyl-p-phenylenediamine (DMPD) assay
7. ferric reduce ability of plasma (FRAP) assay
8. oxygen radical abssorpton capacity (ORAC) assay
9. 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay

สำหรับในการวิจัยในครั้งนี้ ใช้วิธี DPPH assay ในการวัดฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก ใช้เวลาไม่นาน และให้ผลเร็ว DPPH assay เป็นวิธีการวัดความสามารถของสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant activity) โดยอาศัยการจับ (scavenge) กับ stable radical DPPH (2,2 Diphenyl-1-picrylhydrazyl) จัดเป็นวิธีการที่ง่ายและให้ผลเร็ว ซึ่งสามารถแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารต้านออกซิเดชันได้ เนื่องจากเมื่อสารต้านออกซิเดชันนั้นถ่ายเทอิเล็กตรอน 1 ตัว ให้แก่ DPPH radical (DPPH $^{\circ}$) และเปลี่ยนให้อยู่ในรูป DPPH-H ที่มีความคงตัวทำให้ DPPH $^{\circ}$ ซึ่งมีสีม่วงถูกเปลี่ยนให้มีสีเหลืองอ่อนและทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่นในช่วง 515-520 นาโนเมตร ลดลง (สุเขตร์ ศรีบุญเรือง, 2548: 19-23)

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

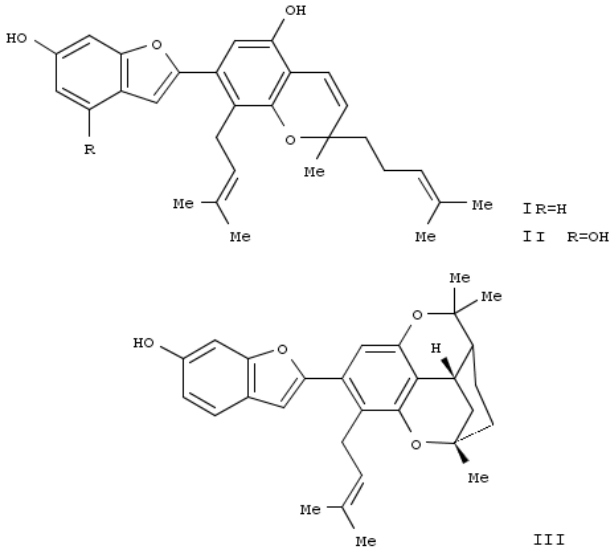
Kondo และคณะ (1998) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดที่ได้จากพืช 22 ชนิด ได้แก่ *Artocarpus lakoocha* Roxb., *Streblus asper* Lour., *Blumea balsamifera* DC., *Pluchea indica* (L.) Less., *Coccinia indica* Wight & Arnott, *Coccinia grandis* Voight, *Gloriosa superba* L., *Heliotropium indicum* R. Br., *Hibiscus sabdariffa* L., *Mammea siamensis Kosterm*., *Michelia champaca* L., *Murraya paniculata* Jack, *Mitragyna speciosa* (Korth.) Havil., *Morinda citrifolia* L., *Randia siamensis* Craib., *Solanum trilosatum* L., *Diospyros mollis* Griff., *Elephantopus scber* L., *Mesua ferrea* L., *Micromelum minutum* Seem., *Orthosiphon stamineus*, และ *Solanum violaceum* Ortega. พบว่าสารสกัดทั้ง 22 ชนิดมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพ มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ยับยั้งการเกิดเม็ดสี (melanin generation) และมีฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation จากผลการทดลองดังกล่าวสามารถนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับผิวพรรณได้

Tengamnuay และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากแก่นต้นมะหาด (*Artocarpus lakoocha* Roxb.) พบว่าจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสในระดับหลอดทดลอง และมีผลต่อการสร้างเม็ดสีของคน โดยทำการศึกษาในระดับสัตว์ทดลอง จากการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบและสาร oxyresveratrol ซึ่งเป็นสารหลักที่พบในแก่นมะหาดจะแสดงค่า IC_{50} เท่ากับ 0.76 and 0.83 µg/mL ตามลำดับ



ภาพ**ที่ 2.16** แสดงโครงสร้างสาร oxyresveratrol

Sritularak และคณะ (2010) สามารถแยกสารชนิดใหม่ 3 ชนิดจากส่วนรากของมะหาด คือ prenylated2-arylbenzofurans-artolakoochol (**I**), 4-hydroxy-artolakoochol (**II**) และ cycloartolakoochol (**III**) โดยทำการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี และเปรียบเทียบข้อมูลกับผู้วิจัยที่เคยรายงานไว้แล้ว

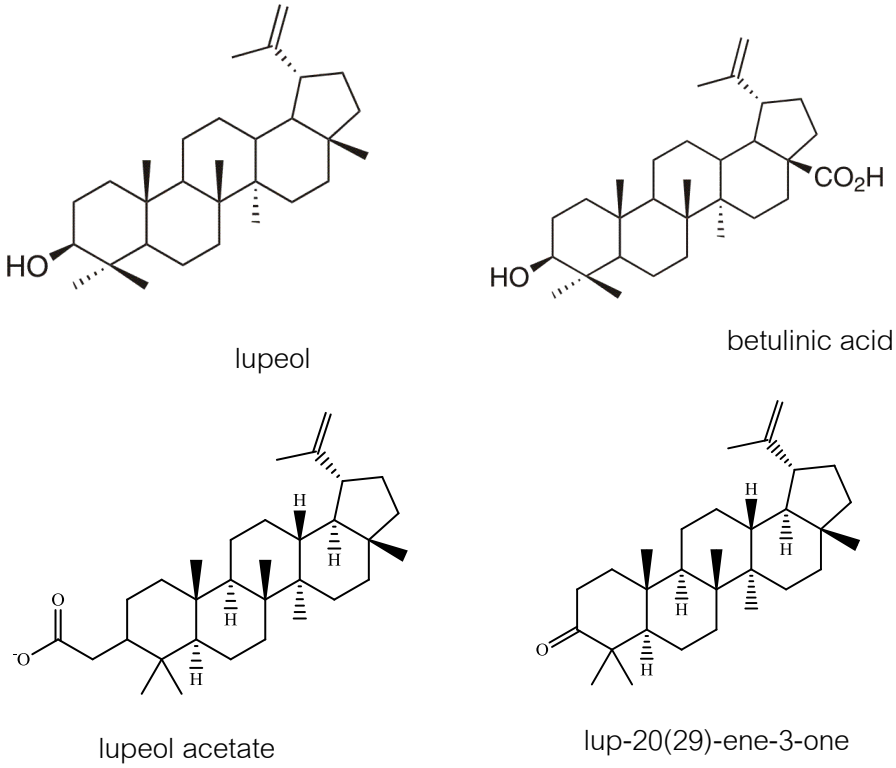


ภาพที่ 2.17 แสดงโครงสร้างของสาร prenylated-2-arylbenzofurans-artolakoochol (**I**), 4-hydroxy-artolakoochol (**II**) และ cycloartolakoochol (**III**)

Povicit และคณะ (2010) สามารถแยกสาร oxyresveratrol ได้จากแก่นของมะหาด (*Artocarpus lakoocha* Roxb.) เมื่อนำสารดังกล่าวไปทดสอบฤทธิ์ต้านการเกิดไกลเคชัน (antiglycation) และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสาร oxyresveratrol จะแสดงฤทธิ์ต้านการเกิดไกลเคชัน มีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.0 ± 0.03 µg/mL และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.1 ± 0.01 µg/mLเมื่อทดสอบวิธี DPPH และมีค่าเท่ากับ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.43 ± 0.03 µg/mL เมื่อทดสอบด้วยวิธี TBARS

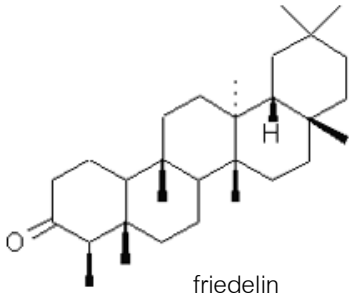
Singhatong และคณะ (2010) ได้ทำการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากแก่นมะหาดด้วยวิธี ABTS (2,2-azinobis-(3-ethylbenzothazoline-6-sulphonic acid)), วิธี DPPH และวิธี H_2O_2 scavenging assay โดยใช้สาร Trolox เป็นสารมาตรฐาน นอกจากนี้ยังได้ทำการทดสอบหาปริมาณโพลีฟีนอลิก ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟราโวนอยด์ และปริมาณแทนนิน จากการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจะมีค่าเท่ากับ 128.30 ± 0.13, 55.86 ± 0.01 และ 463.49 ± 0.01 µmol Trolox/g สารสกัด เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี ABTS, DPPH และวิธี H_2O_2 scavenging assay ตามลำดับ และจากการตรวจสอบปริมาณสารพบว่าใน 1 กรัมของสารสกัดหยาบจะมีปริมาณฟีนอลทั้งหมดเท่ากับ 325.63 ± 2.99 มิลลิกรัม มีปริมาณฟราโวนอยด์เท่ากับ 521.98 ± 0.01 มิลลิกรัม และปริมาณแทนนินเท่ากับ 124.03 ± 0.46 มิลลิกรัม

Nguyen และคณะ (2010) ได้ทำการแยกสารจากส่วนสกัดชั้นเฮกเซนและเอทธิลอะซิเตรต ของมะหาดที่เก็บจากจังหวัดสงขลา สามารถแยกสารประเภท triterpene ได้ทั้งหมด 4 ชนิดคือ lupeol หรือ lup-20(29)-ene-3β-ol, lupeol acetate หรือ lup-20(29)-ene-3β-acetate, lup-20(29)-ene-3-one และ betulinic acid หรือ 3β-hydroxylup-20(29)-en-28-oic acid โดยทำการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี และเปรียบเทียบข้อมูลกับผู้วิจัยที่เคยรายงานไว้แล้ว

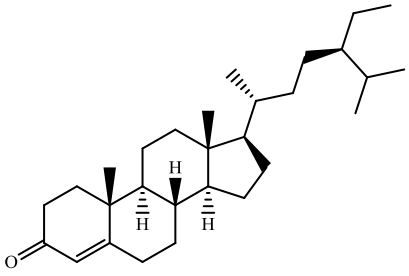


ภาพที่ 2.18 แสดงโครงสร้างสาร lupeol, lupeol acetate, lup-20(29)-ene-3-one และ betulinic acid

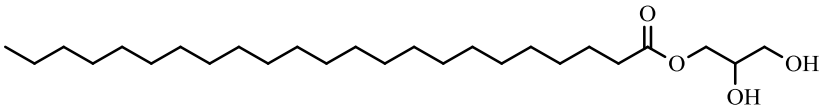
Nguyen และคณะ (2011) ได้ทำการแยกสารจากส่วนสกัดชั้นเฮกเซนและเอทธิลอะซิเตต ของมะหาดทีประเทศเวียดนาม สามารถแยกสารใหม่ได้ 3 ชนิด คือ friedelin หรือ friedelan-3-one, β-sitostenone หรือ stigmast-4-en-3-one และ 1-tricosanoyl-glycerol โดยทำการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี และเปรียบเทียบข้อมูลกับผู้วิจัยที่เคยรายงานไว้แล้ว



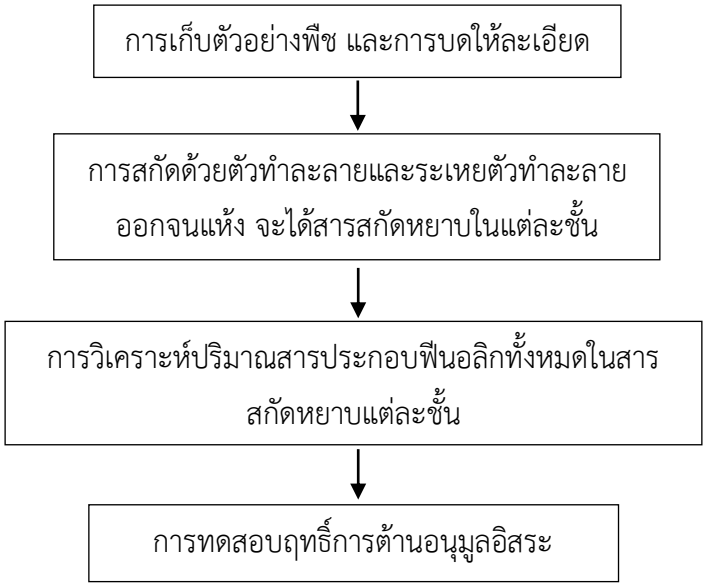
friedelin



β-sitostenone



1-tricosanoyl-glycerol

ภาพที่ 2.19 แสดงโครงสร้างสาร friedelin, β-sitostenone และ 1-tricosanoyl-glycerol

กรอบแนวคิดในการวิจัย