

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความหมายของอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ หมายถึง สารใด ๆ ที่มีอิเล็กตรอนที่ไม่ได้จับคู่ (unpaired electron) มากกว่าหรือเท่ากับหนึ่งอิเล็กตรอนในวงโคจรของโมเลกุล การเขียนสัญลักษณ์ของอนุมูลอิสระโดยใช้จุดที่ตำแหน่งบนขวาของสูตรโมเลกุลเดิมเพื่อแสดงถึงอิเล็กตรอนที่ไม่ได้จับคู่ ปกติจะใช้สัญลักษณ์ R แสดงถึงอนุมูลอิสระที่ไม่เฉพาะเจาะจง โดยทั่วไปอนุมูลอิสระมีทั้งที่เป็นอนุมูลประจุบวก เรียกว่า อนุมูลแคทไอออน (cation radical) ใช้สัญลักษณ์ $(R)^{+ \cdot}$ เช่น อนุมูล pyridinyl อนุมูลประจุลบ เรียกว่า อนุมูลแอนไอออน (anion radical) ใช้สัญลักษณ์ $(R)^{- \cdot}$ เช่น อนุมูล superoxide $(O_2)^{- \cdot}$ หรืออนุมูลที่มีประจุเป็นกลาง (neutral radical) ใช้สัญลักษณ์ $(R)^{\cdot}$ เช่น อนุมูล hydroxyl $(OH)^{\cdot}$ อนุมูล alkoxyl $(C_nH_{(2n+1)}O)^{\cdot}$ อนุมูล alkylperoxyl $(C_nH_{(2n+1)}OO)^{\cdot}$ อนุมูล alkylthiyl $(C_nH_{(2n+1)}S)^{\cdot}$ เป็นต้น (Roberfroid and Calderon , 1995)

อนุมูลอิสระส่วนใหญ่เป็นสารที่ไม่เสถียร มีช่วงครึ่งอายุ (half life) สั้น โดยทั่วไปอนุมูลอิสระจะทำปฏิกิริยากับสารอื่นใน 2 รูปแบบ คือ โดยการดึงเอาอะตอมไฮโดรเจนมาจากสารโมเลกุลอื่นที่อยู่ข้างเคียง และโดยการเพิ่มโมเลกุลของออกซิเจนเข้าไป เพื่อให้เกิดเป็นอนุมูลเปอร์ออกซิล (peroxyl radical) (Steven and Harry , 1997) เนื่องจากอนุมูลอิสระมีอิเล็กตรอนที่ไม่ได้จับคู่อยู่ในโมเลกุล จึงมีความไวสูงในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลในร่างกาย ทำลายสมดุลของระบบต่างๆในร่างกาย โดยการทำลายองค์ประกอบหลักของเซลล์ เช่น ทำลายหน้าที่ของเซลล์เมมเบรนอันนำไปสู่การตายของเซลล์ ทำลายดีเอ็นเอโดยไปจับกับหมู่ฟอสเฟตและน้ำตาลดีออกซีไรโบส อนุมูลอิสระยังสามารถแตกพันธะเปปไทด์ของโปรตีน ทำให้โปรตีนไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ ซึ่งสิ่งเหล่านี้เป็นสาเหตุของการเกิดการกลายพันธุ์และการเกิดมะเร็ง นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดสภาวะทางพยาธิสภาพในโรคสำคัญบางโรค ได้แก่ โรคหัวใจ ไขมันอุดตันในเส้นเลือด ไขข้ออักเสบ ต้อกระจก เป็นต้น อนุมูลอิสระที่มีมาทั้งแหล่งภายในร่างกาย ได้แก่ มลพิษในอากาศ โอโซน ไนโตรสออกไซด์ ไนโตรเจนไดออกไซด์ ฝุ่น คาร์บอนหรือ อาหารที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวหรือธาตุเหล็กมากกว่าปกติ

แสงแดด ความร้อน รังสีแกมมา ยาบางชนิด เป็นต้น และแหล่งภายในร่างกาย ได้แก่ ออกซิเจน เป็นต้น

1.2 คุณสมบัติของอนุมูลอิสระ

เนื่องจากอิเล็กตรอนที่อยู่ในโมเลกุลของอนุมูลอิสระ ทำให้อนุมูลอิสระมีคุณสมบัติทางฟิสิกส์ คือ ดึงดูดในสนามแม่เหล็กอย่างอ่อน สามารถตรวจสอบและวิเคราะห์ได้โดยเทคนิคที่เรียกว่า electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy แต่อนุมูลอิสระส่วนน้อยเท่านั้นที่มีความเสถียรพอที่จะตรวจสอบโดยเทคนิคนี้ได้ที่อุณหภูมิห้อง วิธีที่นิยมมากที่สุดในการใช้ตรวจสอบอนุมูลอิสระที่สลายตัวง่าย คือ การใช้เทคนิคที่เรียกว่า spin trapping โดยวิธีนี้จะใช้โมเลกุลอินทรีย์ที่มีสมบัติเป็น diamagnetic ซึ่งเรียกว่า spin trap ให้ทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระที่ต้องการตรวจสอบ เพื่อให้เป็นอนุมูลอิสระที่มีความเสถียรมากขึ้น และสามารถตรวจสอบได้โดยเทคนิค EPR ดังกล่าว อนุมูลอิสระมีความไวสูงในการเกิดปฏิกิริยาทางเคมี สิ่งที่มีอิทธิพลต่อการเกิดปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระมีหลายอย่าง เช่น อุณหภูมิ ความเข้มข้นของโมเลกุลอนุมูลอิสระ ธรรมชาติของสารละลาย pH และคุณสมบัติอื่นๆ (Roberfroid and Calderon, 1995)

1.3 ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระ

ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระจัดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (free radical chain reaction) ซึ่งมีกลไกในการเกิดปฏิกิริยา 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกเรียกว่าขั้นตอนอินิทิเอชัน (initiation step) เป็นขั้นตอนที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ขั้นตอนที่สองเรียกว่าขั้นตอนพรอพากะชัน (propagation step) เป็นขั้นตอนที่อนุมูลอิสระถูกเปลี่ยนไปเป็นอนุมูลตัวอื่น และขั้นตอนสุดท้ายเรียกว่าขั้นตอนเทอร์มิเนชัน (termination step) เป็นขั้นตอนที่มีการรวมกันของอนุมูลอิสระ 2 อนุมูล ได้เป็นสารที่มีความเสถียร (Hudson, 1990)

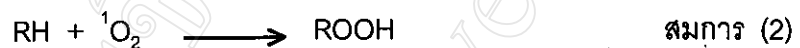
1.3.1 ขั้นตอนอินิทิเอชัน (initiation step)

ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระในเซลล์ มักเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการสลายพันธะด้วยน้ำ (hydrolysis) แสง (photolysis) รังสี (radiolysis) หรือปฏิกิริยารีดอกซ์ (redox reaction) นอกจากนี้ก็ยังมีเอนไซม์อื่นๆอีกหลายชนิดที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในเซลล์ รวมถึงโมเลกุลที่มีความไวสูงในการทำปฏิกิริยา เช่น nitric oxide (NO) และ singlet oxygen (1O_2) ซึ่งหมายถึงออกซิเจนในสถานะที่ถูกกระตุ้น (excited

state) สิ่งเหล่านี้ล้วนทำให้เกิดขั้นตอนอินิทิเอชันของปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระ (Roberfroid and Calderon , 1995) ดังสมการที่ (1)



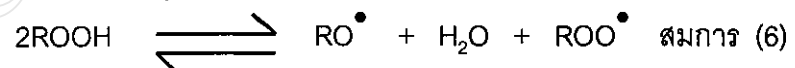
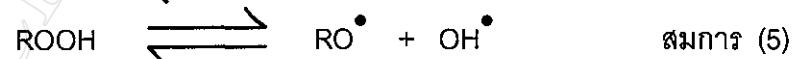
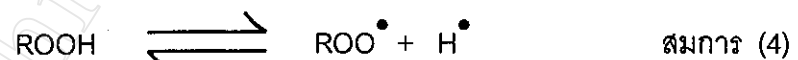
singlet oxygen เมื่อทำปฏิกิริยากับไขมัน (RH) จะทำให้เกิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (Hudson , 1990) ดังสมการที่ (2)



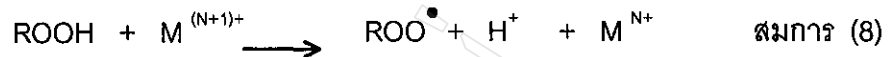
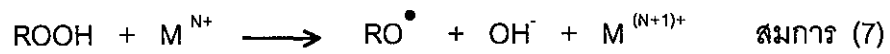
นอกจากนี้ไฮโดรเปอร์ออกไซด์ยังเกิดขึ้นได้ในปฏิกิริยาที่มีออกซิเจนในสถานะ ground state ซึ่งเรียกว่า triplet oxygen (${}^3\text{O}_2$) และมีเอนไซม์ lipoxygenase อยู่ด้วย ดังสมการที่ (3)



พันธะ O-O ในโมเลกุลของไฮโดรเปอร์ออกไซด์เป็นพันธะที่อ่อน จึงถูกสลายได้ง่าย ทำให้เกิดเป็นอนุมูลอิสระ ซึ่งถือเป็นขั้นตอนอินิทิเอชันของปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระ ดังสมการที่ (4) - (6)



ในปฏิกิริยาที่มีโลหะไอออน เช่น เหล็ก และทองแดง พบว่าจะเป็นการช่วยเร่งการสลายโมเลกุลของไฮโดรเปอร์ออกไซด์ ทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้น ดังสมการที่ (7) และ (8)



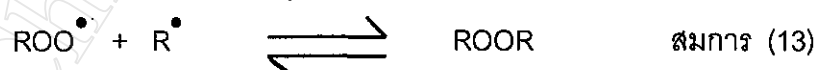
1.3.2 ขั้นตอนพรอพาเกชัน (propagation step)

อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในขั้นตอนอินิทิเอชันจะดำเนินปฏิกิริยาต่อไปในขั้นตอนพรอพาเกชัน โดยเกิดปฏิกิริยาขึ้น 2 ทาง คือ โดยการดึงเอาอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลข้างเคียง หรือโดยการทำปฏิกิริยากับโมเลกุลออกซิเจนที่อยู่ในสถานะ ground state ทำให้ได้อนุมูลอิสระตัวใหม่ ดังสมการที่ (9) - (11)



1.3.3 ขั้นตอนเทอร์มิเนชัน (termination step)

ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น 2 อนุมูลมารวมกันได้เป็นสารที่มีความเสถียร จึงเป็นการหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระ ดังสมการที่ (12) และ (13)



1.4 ออกซิเจน และรีแอคทีฟ ออกซิเจน สปีชีส์ (reactive oxygen species)

ออกซิเจนเป็นก๊าซที่ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น และไม่มีรส สามารถละลายน้ำได้ถึง 3.08 มล. (ที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน) ในน้ำ 100 มล. ที่อุณหภูมิ 20 °C ละลายในสารละลายอินทรีย์ (เช่น carbontetrachloride) ได้ ที่อุณหภูมิต่ำกาซออกซิเจนจะควบแน่นเป็นของเหลวสีฟ้า มีจุดเดือด -183 °C โมเลกุลของออกซิเจน (หรือเรียกว่าไดออกซิเจน ; O_2) มีสมบัติเป็นพาราแมกเนติก (paramagnetic) มีสถานะ ground state เรียกว่า triplet

oxygen และเมื่ออยู่ในสถานะ excited state จะเรียกว่า singlet oxygen (Steven and Harry , 1997) แม้ว่าออกซิเจนเป็นก๊าซที่จำเป็นสำหรับมนุษย์และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ แต่มีรายงานที่แสดงว่าออกซิเจนทำให้เป็นพิษต่อเซลล์ได้ โดยทั่วไปภายในเซลล์สิ่งมีชีวิต อนุมูลอิสระส่วนใหญ่เกิดขึ้นระหว่างการถ่ายเทอิเล็กตรอนจากโมเลกุลของออกซิเจนไปยังโมเลกุลของน้ำ เรียกว่า reactive oxygen species หรือ ROS สารในกลุ่มนี้ เช่น อนุมูล hydroxyl อนุมูล superoxide anion อนุพันธ์ของออกซิเจนบางชนิด เช่น hydrogenperoxide (H_2O_2) และ hypochlorus (HOCl) เป็นต้น (วัลยา และพัชร , 2542) ROS เหล่านี้เกิดขึ้นในกระบวนการเมตาบอลิซึมที่ใช้ออกซิเจนภายในเซลล์ เช่น ในลูกโซ่ขนส่งอิเล็กตรอนในไมโทคอนเดรีย นอกจากนี้สิ่งแวดล้อมต่างๆ เช่น มลพิษในอากาศ ควัน สารเคมีในโรงงานอุตสาหกรรม รังสี สิ่งเหล่านี้มีส่วนทำให้เกิด ROS ในเซลล์อีกด้วย (Sami , 1995)

1.5 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

สารต้านอนุมูลอิสระ หรือแอนติออกซิแดนท์ (antioxidant) คือสารเคมีที่ทำหน้าที่ต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (มลศิริ , 2540) ในที่นี้รวมถึงสารที่สามารถยับยั้งและควบคุมอนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน จึงช่วยยับยั้งอนุมูลอิสระไม่ให้ทำลายองค์ประกอบของเซลล์ (วัลยา และพัชร , 2542) สารต้านอนุมูลอิสระมีทั้งที่เป็นสารจากธรรมชาติ (natural antioxidant) แสดงดังในตารางที่ 1.1 และสารสังเคราะห์ (synthetic antioxidant) ซึ่งได้แก่ tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) tert-butyl-4-hydroxytoluene (BHT) และ tert-butylhydroquinone (TBHQ) เป็นต้น

ตาราง 1.1 สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติบางชนิด (Huang et. al. , 1992)

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

โดยทั่วไปสารต้านอนุมูลอิสระแบ่งเป็น 5 ประเภทใหญ่ๆ (Hudson , 1990) ดังนี้

(1) primary antioxidant

สารในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ได้แก่สารประกอบฟีนอลิก (phenolic substance) ทำหน้าที่หยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระในปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน นอกจากนี้ยังรวมถึงสารโทโคฟีรอลธรรมชาติและสังเคราะห์ (natural and synthetic tocopherol) alkyl gallate BHA BHT TBHQ และอื่นๆ ซึ่งสารในกลุ่มดังกล่าวทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเลคตรอน

(2) oxygen scavenger

สารในกลุ่มนี้ได้แก่กรดแอสคอร์บิกหรือวิตามินซี ascorbyl palmitate erythorbic acid (isoascorbic acid) และ sodium erythorbate เป็นต้น สารในกลุ่มนี้จะเข้าทำปฏิกิริยากับออกซิเจน จึงเป็นการช่วยกำจัดออกซิเจนในระบบปิดได้

(3) secondary antioxidant

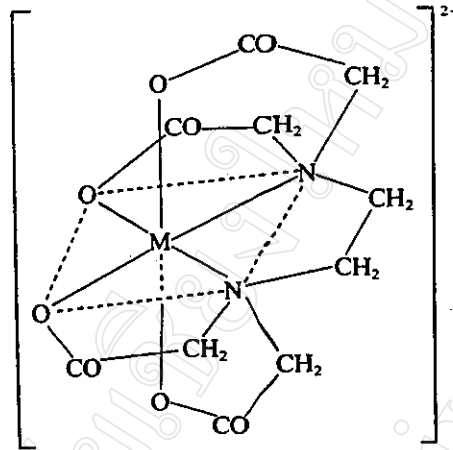
สารในกลุ่มนี้ได้แก่ dilauryl thiopropionate และ thiopropionic acid ทำหน้าที่สลายโมเลกุลของ lipid hydroperoxide ให้เป็นสารที่มีความเสถียร

(4) enzymic antioxidant

สารในกลุ่มนี้ได้แก่เอนไซม์ต่างๆ ซึ่งแบ่งเป็น primary antioxidant enzyme และ ancillary antioxidant enzyme สารในกลุ่มนี้ทำหน้าที่กำจัดออกซิเจนหรืออนุพันธ์ของออกซิเจน โดยเฉพาะไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

(5) chelating agent หรือ sequestrant

สารในกลุ่มนี้ เช่น กรดซิตริก กรดอะมิโน ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA) เป็นต้น สารในกลุ่มนี้ทำหน้าที่ไปจับกับไอออนของโลหะ เช่น เหล็ก และทองแดง ซึ่งไอออนเหล่านี้เป็นไอออนที่ส่งเสริมและเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน ทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่เสถียร ดังรูปที่ 1.1



รูป 1.1 โครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง EDTA กับโลหะไอออน
(Hudson , 1990)

1.6 ผลของสารต้านอนุมูลอิสระ

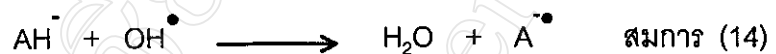
เนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระมีหน้าที่หลายอย่าง เช่น ทำหน้าที่เป็นสารรีดิวซ์ (reducing agent) เป็นตัวจับไล่อนุมูลอิสระ จับกับไอออนโลหะที่เร่งให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ยับยั้งการเกิดออกซิเจนในรูปแอคทีฟซึ่งพบในขั้นตอนอินิทิเอชันของปฏิกิริยาออกซิเดชัน ด้วยหน้าที่ต่างๆเหล่านี้จึงทำให้มีผลในการชะลอหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน หรือสามารถหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่โดยการทำปฏิกิริยากับอนุมูล peroxy เพื่อให้เป็นสารที่มีความเสถียร หรือเป็นสารที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกซิเดชันอีกต่อไป หรือเป็นสารที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระ (non-radical product) (Basu et. al. , 1999 ; Huang et. al. , 1992)

1.7 สารต้านอนุมูลอิสระบางชนิด

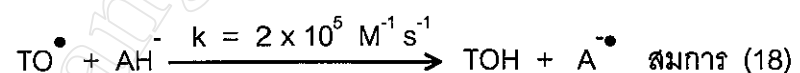
1.7.1 วิตามินซี

วิตามินซีเป็นสารที่ละลายน้ำได้ ลักษณะเป็นผลึกสีขาว ไม่มีกลิ่น มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่ากรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) ซึ่งเป็นภาษาละติน หมายถึงภาวะที่ไม่มีเลือดออกตามไรฟัน วิตามินซีมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมตาบอลิซึมของกรดอะมิโน และทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ของปฏิกิริยาทางชีวเคมีต่างๆในร่างกาย

นอกจากนี้วิตามินซียังเป็นส่วนหนึ่งของกลุ่มสารชีวเคมีที่สร้างคอลลาเจน (collagen) ซึ่งเป็นโปรตีนส่วนหนึ่งของโครงสร้างกระดูกของมนุษย์ วิตามินซีเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญชนิดหนึ่งในกระบวนการเมตาบอลิซึมในร่างกาย โดยพบว่าวิตามินซีจะเข้าทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อนุมูล hydroxyl อนุมูล peroxy และ singlet oxygen ได้เป็นสารที่เรียกว่า semidehydroascorbate ($A^{\cdot-}$) และ dehydroascorbate (A) ดังสมการที่ (14) - (17) (Basu et. al., 1999)



นอกจากวิตามินซีสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระแล้ว ยังทำหน้าที่เป็นตัวส่งเสริมประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระของวิตามินอีด้วย โดยทำให้อนุมูล α -tocopherol ($TO^{\cdot}$) เปลี่ยนกลับไปเป็น α -tocopherol (TOH) ดังเดิม ดังสมการที่ (18) (Cadenas and Packer, 1996)

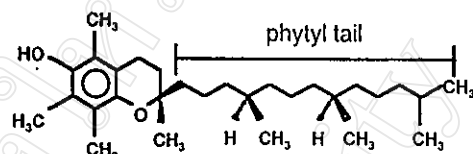
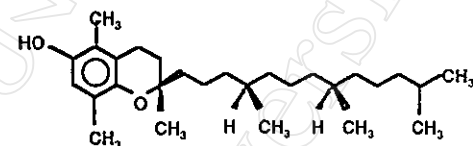
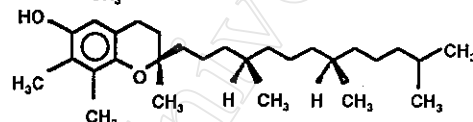
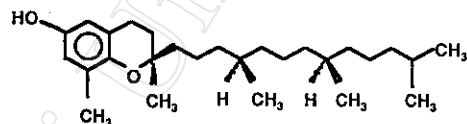


1.7.2 วิตามินอี

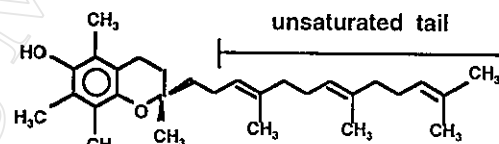
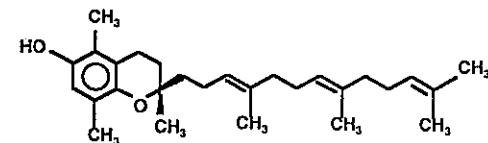
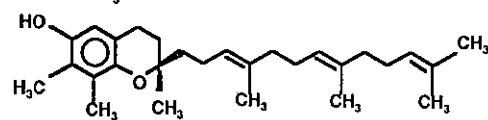
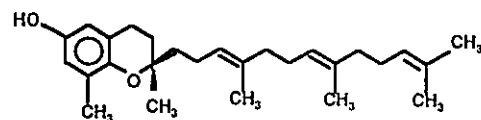
วิตามินอี เป็นวิตามินที่ละลายในไขมัน มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดๆ ในช่วงแรกๆมีการตั้งชื่อวิตามินอีว่า วิตามินป้องกันการเป็นหมัน (antisterility vitamin) เนื่องจากพบว่าวิตามินอีเป็นสารที่จำเป็นสำหรับการสืบพันธุ์ในหนูตัวเมีย ถ้าขาดวิตามินอีจะทำให้ลูกอ่อนตายในครรภ์และแท้งลูก นอกจากนี้ยังพบมีการเรียกวิตามินอีว่า โทโคฟีรอล (tocopherol) ซึ่งเป็นคำที่มาจากภาษากรีก 2 คำรวมกัน คือ คำว่า toco หรือ tokos แปลว่า การคลอดบุตร (มาจากคำว่า childbirth) และคำว่า phero แปลว่า นำมาซึ่ง (มาจากคำว่า to bring) (Michael and Robert ,

1968) ในธรรมชาติมีวิตามินอีอยู่หลายชนิด ปัจจุบันแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ โทโคฟีรอล และโทโคไทรอินอล (tocotrienol) แต่ละกลุ่มยังแยกเป็นวิตามินย่อยๆ อีก 4 ชนิด มีชื่อเรียกตามพญานะในภาษาละตินว่า แอลฟา (α) เบต้า (β) แกมมา (γ) และเดลต้า (δ) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับจำนวนและตำแหน่งของหมู่เมธิลที่ติดกับวงแหวนโครเมน (chromane ring) โทโคฟีรอลแตกต่างจากโทโคไทรอินอลตรงที่โครงสร้างของโทโคฟีรอลมีแขนข้างเป็น 4', 8', 12' - trimethyltridecyl เรียกว่า phytol หรือ phytyl side chain ส่วนโทโคไทรอินอลมีแขนข้างที่มีพันธะคู่ที่ตำแหน่ง 3', 7' และ 11' เรียกว่า unsaturated side chain (Cadenas and Packer, 1996) โครงสร้างโมเลกุลของโทโคฟีรอลและโทโคไทรอินอล แสดงดังรูปที่ 1.2 (Packer et. al., 1999)

A.

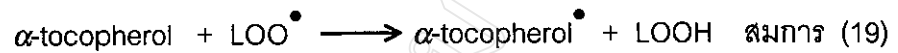
 α -tocopherol β -tocopherol γ -tocopherol δ -tocopherol

B.

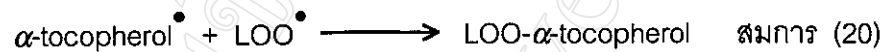
 α -tocotrienol β -tocotrienol γ -tocotrienol δ -tocotrienol

รูป 1.2 โครงสร้างโมเลกุลของวิตามินอี (A) โทโคฟีรอล และ (B) โทโคไตรเอนอล

วิตามินอีทำหน้าที่เป็นตัวให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูล peroxyyl ดังสมการที่ (19)



อนุมูล $\alpha\text{-tocopherol}^\bullet$ ที่เกิดขึ้นในสมการ (19) สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูล peroxyyl ตัวอื่น ทำให้ได้สารที่มีความเสถียร ($\text{LOO-}\alpha\text{-tocopherol}$) ดังสมการที่ (20) เป็นผลให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันหยุดลง (Basu et. al. , 1999)

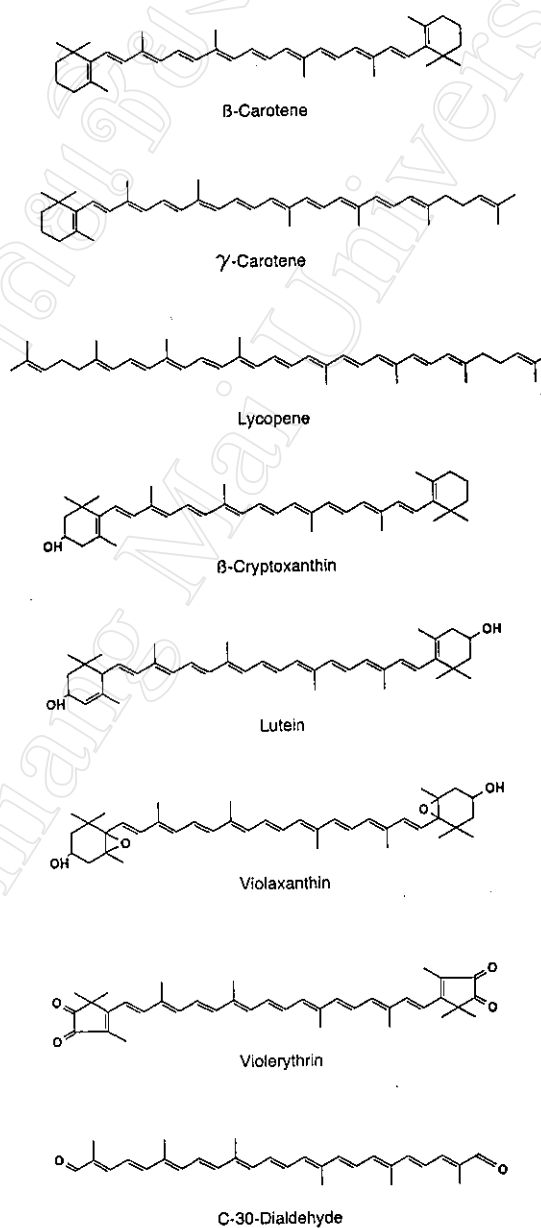


1.7.3 แคโรทีนอยด์

แคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เป็นสารสำคัญที่พบในคลอโรพลาสต์ของพืช มีบทบาทในการสังเคราะห์แสงเช่นเดียวกับคลอโรฟิลล์ โดยทำหน้าที่ช่วยคลอโรฟิลล์ในการดักจับพลังงานแสง ในผักและผลไม้ที่ยังไม่สุกจะพบแคโรทีนอยด์น้อยกว่าผักและผลไม้ที่สุกแล้ว เนื่องจากปกติผักใบเขียวหรือผักและผลไม้ที่ยังดิบอยู่ แคโรทีนอยด์จะอยู่ในส่วนของคลอโรพลาสต์ ในขณะที่ผักหรือผลไม้สุก แคโรทีนอยด์จะถูกสังเคราะห์ขึ้นในโครโมพลาสต์เป็นปริมาณมากเนื่องจากเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์มีมากขึ้น (Tomas-Barberan and Robins , 1997) โครงสร้างพื้นฐานของแคโรทีนอยด์ประกอบด้วยโครงสร้างหลักที่เรียกว่า tetraterpene skeleton ซึ่งอาจมีวงแหวนที่บริเวณปลายด้านใดด้านหนึ่งหรือทั้งสองด้านของโมเลกุล วงแหวนนี้อาจเป็นวงแหวนห้าหรือหกเหลี่ยมก็ได้ ดังรูปที่ 1.3 แคโรทีนอยด์สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ตามองค์ประกอบของโครงสร้างโมเลกุล ดังนี้ (Packer et. al. , 1999)

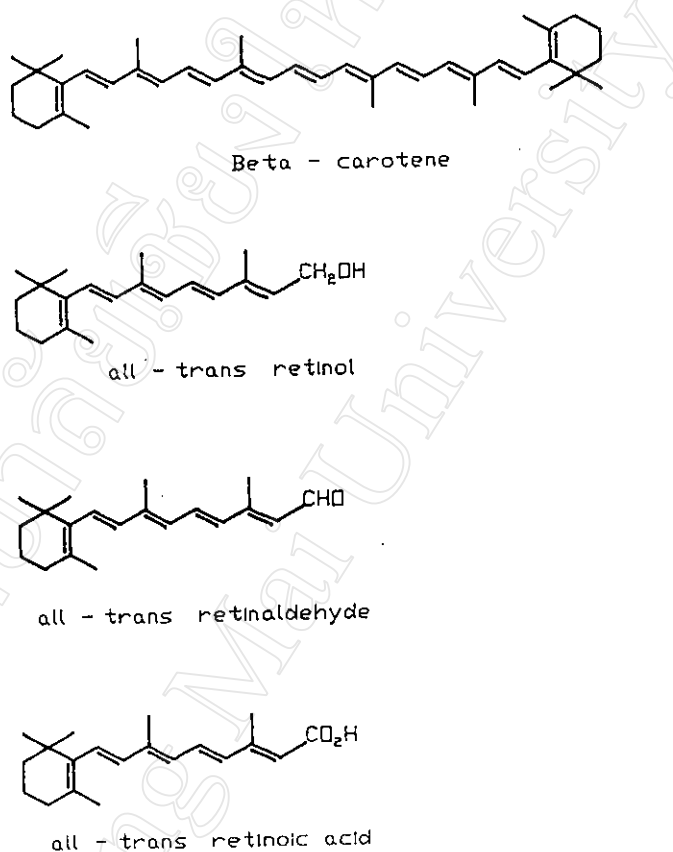
1. แคโรทีน (carotene) เป็นแคโรทีนอยด์ที่โครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยคาร์บอนและไฮโดรเจนเท่านั้น เช่น เบต้า-แคโรทีน ($\beta\text{-carotene}$) อัลฟา-แคโรทีน ($\alpha\text{-carotene}$) แกมมา-แคโรทีน ($\gamma\text{-carotene}$) ไลโคปีน (lycopene) เป็นต้น

2. ออกโซแคโรทีนอยด์ (oxocarotenoid) หรือแซนโทฟิลล์ (xanthophyll) เป็นแคโรทีนอยด์ที่โครงสร้างโมเลกุลบริเวณวงแหวนประกอบด้วยกลุ่มอื่นนอกเหนือจากคาร์บอนและไฮโดรเจน เช่น เบต้า-คริปโทแซนทิน (β -cryptoxanthin) และลูทีน (lutein) มี hydroxyl group violerythrin มี keto group และ violaxanthin มี epoxy group เป็นต้น



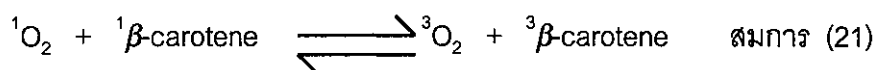
รูป 1.3 โครงสร้างโมเลกุลของแคโรทีนอยด์บางชนิด (Packer et. al. , 1999)

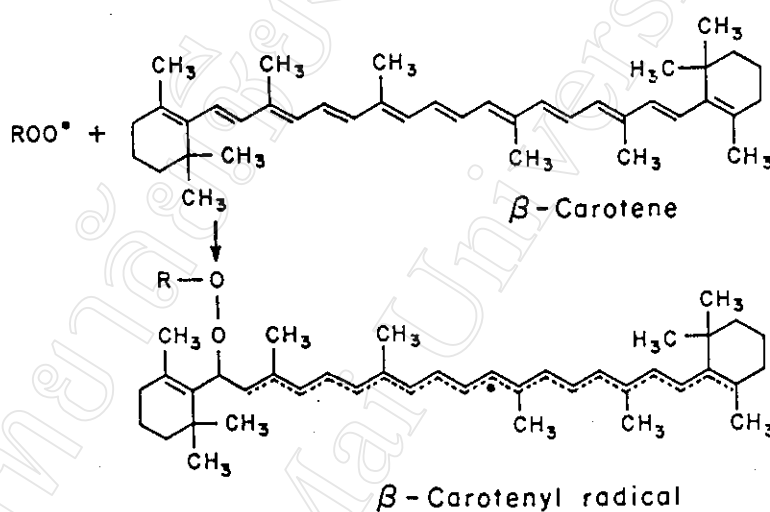
เบต้า-แคโรทีนเป็นสารตั้งต้นของวิตามินเอ การเปลี่ยนรูปจากเบต้า-แคโรทีนไปเป็นวิตามินเอโดยการแตกพันธะคู่ที่ตำแหน่งกึ่งกลางของโมเลกุล โดยเอนไซม์ carotene deoxygenase ดังรูปที่ 1.4



รูป 1.4 การสังเคราะห์วิตามินเอจากสารตั้งต้นเบต้า-แคโรทีน (Cadenes and Packer, 1996)

แคโรทีนอยด์ โดยเฉพาะเบต้า-แคโรทีนเป็นสารที่มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัด singlet oxygen ดังนั้นจึงมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยป้องกันการเกิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์ในสภาวะที่มี singlet oxygen ดังสมการที่ (21)



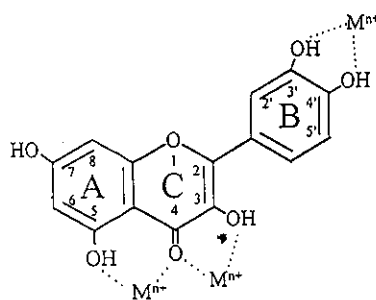


รูป 1.5 โครงสร้างเรโซแนนซ์ของโมเลกุลเบต้า-แคโรทีน (Cadenes and Packer , 1996)

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่พบได้ในพืชทั่วไป มีคุณสมบัติเป็นสารอินทรีย์ที่มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนอะโรมาติก (aromatic ring) ที่มีจำนวน hydroxyl group อย่างน้อยหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งหมู่ในโมเลกุล สามารถละลายได้ในน้ำ ส่วนใหญ่สารประกอบฟีนอลิกมักพบอยู่รวมกับน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ (glycoside) สารประกอบฟีนอลิกที่พบในธรรมชาติมีหลายกลุ่ม และมีลักษณะสูตรโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกัน กลุ่มใหญ่ที่พบจะเป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์ (flavonoid) นอกจากนั้นยังมีสารประกอบต่างๆ เช่น simple monocyclic phenol phenyl propanoid phenolic quinone และ polyphenolic ซึ่งได้แก่

พวก ลิกนิน (lignin) เมลานิน (melanin) และแทนนิน (tannin) เป็นต้น รวมทั้งยังพบว่ามีสารประกอบที่มีกลุ่มฟีนอล (phenolic unit) รวมอยู่ในโมเลกุลของโปรตีน อัลคาลอยด์ (alkaloid) และเทอร์ปีนอยด์ (terpenoid) เป็นต้น

หน้าที่ของสารประกอบฟีนอลิกเหล่านี้ บางชนิดก็ทราบแน่ชัด เช่น ลิกนิน ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างให้ความแข็งแรงแก่ผนังเซลล์ของพืช สารในกลุ่มแอนโทไซยานิน (anthocyanin) เป็นสารที่ให้สีในดอกไม้ สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์มีความสำคัญในการควบคุมการเจริญของพืชจำพวกถั่ว เป็นต้น (ศิริวรรณ และสุวรรณา, 2527) นอกจากนี้พบว่าสารประกอบฟีนอลิกหลายชนิดมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น ฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิก และแทนนิน เป็นต้น สารประกอบฟีนอลิกทำหน้าที่เป็นตัวจับไล่อนุมูลอิสระ ที่สำคัญคืออนุมูล peroxy (Packer et. al., 1996) โดยมีกลไก 2 แบบ คือ เมื่ออยู่ในสถานะที่มีความเข้มข้นต่ำเมื่อเทียบกับสารออกซิไดส์ สารประกอบฟีนอลิกจะหน่วงเหนี่ยวหรือป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน นอกจากนี้อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาจะถูกทำให้เป็นสารที่มีความเสถียร ดังนั้นจึงสามารถป้องกันการเกิดขั้นตอน propagation ได้ (Basu et. al., 1999) นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิกบางชนิดยังทำหน้าที่เป็น chelating agent ดักจับไอออนของโลหะเข้าไปในโมเลกุล เช่น เควอร์ซีทิน (quercetin) โดยโครงสร้างของเควอร์ซีทินมีตำแหน่ง (binding site) ที่สามารถดักจับไอออนของโลหะ เช่น ทองแดง ได้ 3 บริเวณ คือบริเวณ 3',4'-dihydroxy ของวงแหวน B บริเวณ 3-hydroxy, 4-keto ของวงแหวน C และบริเวณระหว่างตำแหน่ง 5-hydroxy ของวงแหวน A กับตำแหน่ง 4-keto ของวงแหวน C ดังรูปที่ 1.6 (Packer et. al., 1999)

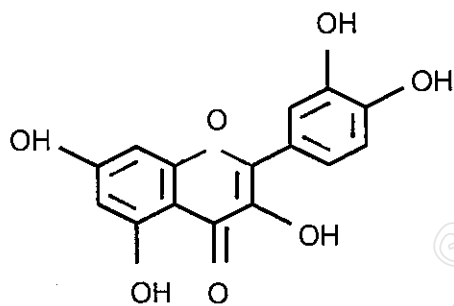


รูป 1.6 บริเวณ binding site ของเควอร์ซีทินที่จับกับไอออนของโลหะ

สารประกอบฟีนอลิกยังทำหน้าที่เป็นสารรีดิวซ์ เป็นตัวให้ไฮโดรเจน และกำจัดออกซิเจนที่อยู่ในรูปแอคทีฟ (Rice-Evans and Miller, 1996) ด้วยหน้าที่ต่างๆดังกล่าวจึงทำให้สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญชนิดหนึ่งในพืชทั่วไป

ศักยภาพของสารประกอบฟีนอลิกในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระนั้นขึ้นกับค่า redox potential ของ hydroxyl group ในโมเลกุล และโครงสร้างทางเคมีซึ่งแตกต่างกันไป แสดงดังรูปที่ 1.7 โดยประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกจะมีมากขึ้นถ้าในโครงสร้างโมเลกุลมีตำแหน่งดังต่อไปนี้ (Rice-Evans and Miller, 1996)

1. 3-hydroxyl group ของวงแหวน C : เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างระหว่าง quercetin และ luteolin พบว่า luteolin มีแอกติวิตีของสารต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่า quercetin เนื่องจาก luteolin ไม่มีตำแหน่ง 3-hydroxyl group ที่วงแหวน C
2. 2,3-double bond และ 4-oxo group ของวงแหวน C : เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างระหว่าง quercetin และ taxifolin พบว่า taxifolin มีแอกติวิตีของสารต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่า quercetin เนื่องจาก taxifolin ไม่มีพันธะคู่ที่ตำแหน่งดังกล่าว
3. 3',4'-hydroxyl group ของวงแหวน B : เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างระหว่าง quercetin และ kaempferol พบว่า kaempferol มีแอกติวิตีของสารต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่า quercetin เนื่องจาก kaempferol ไม่มี hydroxyl group ที่ตำแหน่ง 3' ของวงแหวน B



A : flavone / flavonol

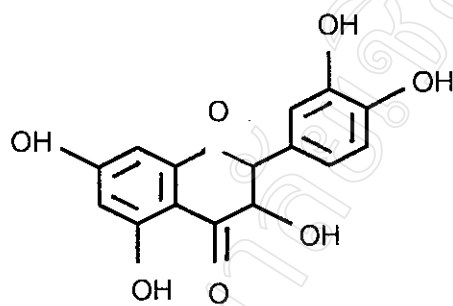
quercetin = OH : 3, 5, 7, 3', 4'

kaempferol = OH : 3, 5, 7, 4'

luteolin = OH : 5, 7, 3', 4'

apigenin = OH : 5, 7, 4'

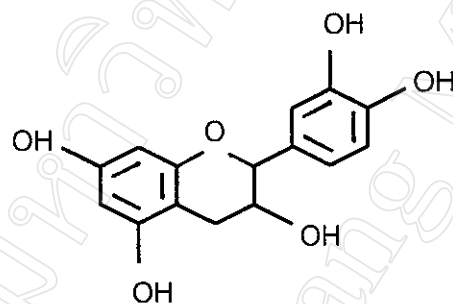
chrysin = OH : 5, 7



B : flavanone / flavanonol

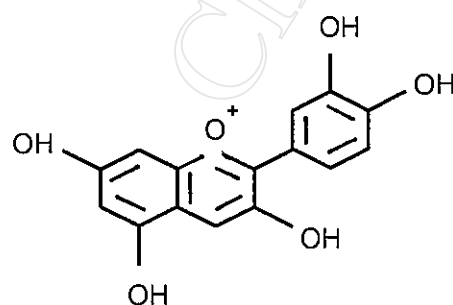
taxifolin = OH : 3, 5, 7, 3', 4'

naringenin = OH : 5, 7, 4'



C : flavanol

catechin = OH : 3, 5, 7, 3', 4'



D : anthocyanidin

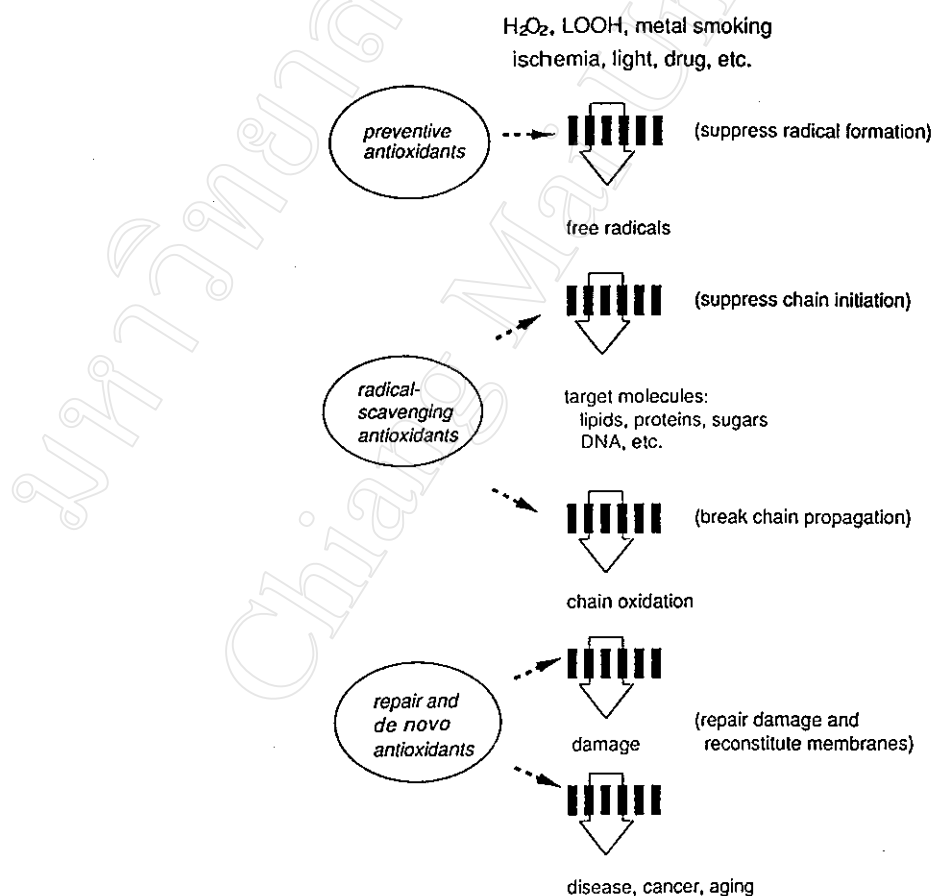
cyanidin = OH : 3, 5, 7, 3', 4'

delphinidin = OH : 3, 5, 7, 3', 4', 5'

รูป 1.7 โครงสร้างสารประกอบฟีนอลิคบางชนิด (Rice-Evans and Miller, 1996)

1.7.5 เอนไซม์ และโปรตีนบางชนิด

เมื่อร่างกายอยู่ในสภาวะเครียด (oxidative stress) ซึ่งเป็นสภาวะที่ร่างกายไม่สามารถควบคุมและป้องกันปริมาณของอนุมูลอิสระให้อยู่ในระดับปกติที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ได้ ร่างกายจะมีระบบป้องกันอนุมูลอิสระที่เรียกว่า antioxidant defense system ซึ่งได้แก่ สารในกลุ่มของเอนไซม์ โปรตีน และสารอาหารต่างๆ เช่น วิตามินซี และวิตามินอี (วัลยา และพัทธ์ , 2542) สารต้านอนุมูลอิสระในระบบดังกล่าวจะทำหน้าที่ยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ ยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ และซ่อมแซมเซลล์ที่ได้รับความเสียหายเนื่องจากอนุมูลอิสระ โดยมีกลไกแสดงดังรูปที่ 1.8 ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำหน้าที่ต่างๆในระบบ antioxidant defense system แสดงดังตารางที่ 1.2



รูป 1.8 การทำงานของ antioxidant defense system ในร่างกาย
(Cadenes and Packer , 1996)

ตาราง 1.2 ตัวอย่างชนิดและหน้าที่ของสารต้านอนุมูลอิสระใน antioxidant defense system (Cadenes and Packer, 1996)

1. Preventive antioxidants: suppress the formation of free radicals	
(a) Nonradical decomposition of hydroperoxides and hydrogen peroxide	
catalase	decomposition of hydrogen peroxide $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
glutathione peroxidase (cellular)	decomposition of hydrogen peroxide and fatty acid hydroperoxide $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$ $\text{LOOH} + 2\text{GSH} \rightarrow \text{LOH} + \text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$
glutathione peroxidase (plasma)	decomposition of hydrogen peroxide and phospholipid hydroperoxides $\text{PLOOH} + 2\text{GSH} \rightarrow \text{PLOH} + \text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$
phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase	decomposition of phospholipid hydroperoxide
glutathione-S-transferase	decomposition of hydrogen peroxide and lipid hydroperoxide $\text{LOOH} + \text{AH}_2 \rightarrow \text{LOH} + \text{H}_2\text{O} + \text{A}$ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{AH}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{A}$
(b) Sequestration of metal by chelation	decomposition of lipid hydroperoxides
transferrin, lactoferrin	sequestration of iron
haptoglobin	sequestration of hemoglobin
hemopexin	stabilization of heme
ceruloplasmin, albumin	sequestration of copper
(c) Quenching of active oxygens	
superoxide dismutase (SOD)	disproportionation of superoxide $2\text{O}_2^{\cdot -} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
carotenoids	quenching of singlet oxygen
2. Radical-scavenging antioxidants: scavenge radicals to inhibit chain initiation and break chain propagation	
hydrophilic: vitamin C, uric acid, bilirubin, albumin	
lipophilic: vitamin E, ubiquinol, carotenoids	
3. Repair and <i>de novo</i> enzymes: repair the damage and reconstitute membranes	
lipase, protease, DNA repair enzymes, transferase	
4. Adaptation: generate appropriate antioxidant enzymes and transfer them to the right site at the right time and in the right concentration	

อย่างไรก็ตาม เนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มของสารอาหารนั้น ร่างกายมีจำกัดและไม่เพียงพอ ดังนั้นสารในกลุ่มของเอนไซม์และโปรตีนจึงมีความจำเป็นต่อระบบดังกล่าว (Sami, 1995)

สารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มของเอนไซม์แบ่งเป็น 2 ประเภท ดังนี้

(ก) primary antioxidant enzyme : เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีหลายชนิด เช่น

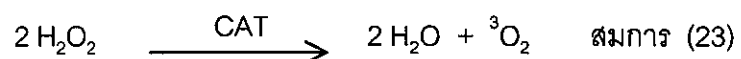
1. เอนไซม์ superoxide dismutase (SOD)

เอนไซม์ SOD ยังแบ่งเป็นชนิดย่อยได้ 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 ($O_2^{\bullet-}$) ดังสมการที่ 22



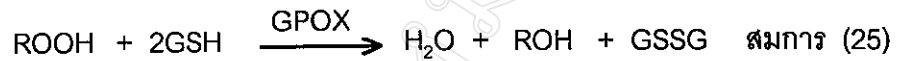
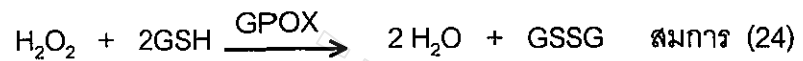
2. เอนไซม์ catalase (CAT)

เอนไซม์ CAT พบในสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอตเป็นส่วนใหญ่ มีบทบาทสำคัญในการสลายโมเลกุลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ไปเป็นน้ำและออกซิเจน ดังสมการที่ 23



3. เอนไซม์ glutathione peroxidase (GPOX)

เอนไซม์ GPOX มีบทบาทในการสลายโมเลกุลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปเป็นน้ำ 2 โมเลกุล และยังสามารถสลายโมเลกุลของไฮโดรเปอร์ออกไซด์ให้เป็นน้ำและแอลกอฮอล์ด้วย โดยใช้ glutathione ในสถานะที่เป็น reduced state (GSH) ดังสมการที่ 24 และ 25 ตามลำดับ



(ข) ancillary antioxidant enzyme

เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีหลายชนิด เช่น NAD(P)H dehydrogenase (quinone) หรือ DT-diaphorase ascorbate recyling enzyme และ antioxidant protease เป็นต้น

สำหรับโปรตีนที่แสดงสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระมีหลายชนิด และมีหน้าที่แตกต่างกันไป ซึ่งสรุปดังตารางที่ 1.3

ตาราง 1.3 ชนิดและหน้าที่ของสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มของโปรตีน (Sami, 1995)

protein	functionality
albumin	Cu scavenging
ceruloplasmin	ferro- O_2 -oxidoreductase (EC 1.16.3.1)
heat shock proteins	stress repair proteins
metallothioneins	metal binding proteins
transferrins	Fe transport proteins
ferritins (phytoferritins)	Fe storage proteins

(ก) อัลบูมิน (albumin)

โปรตีนอัลบูมินจัดเป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญที่พบในพลาสมา โดยโปรตีนอัลบูมินสามารถเข้าจับกับไฮดรอกซิทองแดงได้อย่างรวดเร็ว จึงเป็นการขจัดไฮดรอกซิทองแดงทางอ้อม เป็นผลให้อนุมูลอิสระเกิดขึ้นน้อยลง

(ข) ทรานส์เฟอริน (transferrin)

โปรตีนทรานส์เฟอรินเป็นไกลโคโปรตีนที่พบในพลาสมา เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่งเหล็ก (iron transporting protein) และมีบทบาทหน้าที่ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระร่วมกับโปรตีนเฟอริติน

(ค) เฟอริติน (ferritin)

เฟอริตินเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่สะสมเหล็ก เฟอริตินที่พบในพืชจะเรียกว่า phytoferritin ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะพบเฟอริตินสะสมในส่วนของไฮโดรซอลและยังพบในซีรัมเป็นส่วเล็กน้อยอีกด้วย

(ง) เมทัลโลไธโอนีน (metallothionein)

โปรตีนเมทัลโลไธโอนีนไม่สามารถที่จะทำหน้าที่กำจัดโลหะไอออนดังเช่นโปรตีนชนิดอื่น แต่โปรตีนชนิดนี้สามารถทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระได้โดยตรง

(จ) เซรูโลพลาสมิน (ceruloplasmin)

เซรูโลพลาสมิน เป็นโปรตีนที่มีไอออนทองแดงอยู่ในโมเลกุล (copper containing protein) มีสมบัติเป็นเอนไซม์ ferrioxidase ซึ่งจะออกซิไดส์ Fe^{2+} ไปเป็น Fe^{3+} เป็นการส่งเสริมให้เหล็กรวมเข้าไปในโมเลกุลของโปรตีนเฟอริตินได้ เซรูโลพลาสมินจึงมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เพราะช่วยกำจัดไอออนของเหล็กให้รวมอยู่กับโปรตีนเฟอริติน

(ฉ) heat shock protein

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

1.8 งานวิจัยที่เกี่ยวกับสารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน และปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระ ดังนั้นจึงมีผลในการป้องกันโรคต่างๆที่มีสาเหตุจากอนุมูลอิสระทำลายเซลล์อย่างไรก็ตาม สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาตินับได้ว่ามีความปลอดภัยมากที่สุดต่อการบริโภคเพื่อยับยั้งและป้องกันอนุมูลอิสระ งานวิจัยต่างๆจึงมุ่งเน้นไปที่แหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ เช่น ในเครื่องดื่มประเภทชา โดยเฉพาะอย่างยิ่งชาเขียว มีสารประกอบฟีนอลิกที่สำคัญ คือ epigallocatechin gallate (EGCG) มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพมากกว่าอัลฟา-โทโคฟีรอล หรือ tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) โดยประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกในชาเขียวเรียงลำดับจากน้อยไปมาก ดังนี้ epicatechin < epicatechin gallate < epigallocatechin < epigallocatechin gallate (Prakash, 1997)

Wiseman (1996) ได้ทำการวิจัยเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระระหว่างสารสกัดจากชาเขียวและชาดำ พบว่าสารสกัดเอธานอลจากชาเขียวมีประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระดีกว่าชาดำ

Kasuga et. al. (1995) ค้นพบสารต้านอนุมูลอิสระในเห็ดป่าชนิดหนึ่งที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Suillus bovinus* (L : Fr.) O. Kuntz ซึ่งสารดังกล่าวจำแนกได้ 2 ชนิด คือ variegatic acid เป็นรงควัตถุสีส้ม และ diboviquinone - 4, 4 เป็นรงควัตถุสีส้มแดง สารทั้ง 2 ชนิดนี้มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยพบว่า variegatic acid มีประสิทธิภาพดีกว่า diboviquinone -4, 4

Miranda et. al. (1998) ศึกษาประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระในสาหร่ายเกลียวทอง (*Spirulina maxima*) ทั้งในสภาวะในการทดลอง (*in vitro*) และในสภาวะธรรมชาติ (*in vivo*) ของเซลล์ พบว่าสาหร่ายเกลียวทองแสดงสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระทั้ง 2 สภาวะที่ทดลอง โดยสารสำคัญในสาหร่ายเกลียวทองที่แสดงสมบัติสารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารประกอบฟีนอลิก โทโคฟีรอล และเบต้า-แคโรทีน

นอกจากสาหร่ายเกลียวทองแล้ว สาหร่ายพวงกุหลาบก็พบสารต้านอนุมูลอิสระเช่นกัน จากงานวิจัยของ Takeyama et. al. (1997) พบว่าสาหร่าย *Euglena gracilis* Z. สามารถผลิตสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด เช่น วิตามินซี วิตามินอี และเบต้า-แคโรทีน โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารดังกล่าวให้ได้ปริมาณสูงสุด พบว่าสภาวะที่ดีที่สุด คือ การเพาะเลี้ยงเซลล์ในลักษณะ 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกให้เซลล์เจริญในสภาวะ

photoheterotrophic condition เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ จากนั้นจึงเปลี่ยนสภาวะการเจริญเป็น photoautotrophic condition เพื่อให้เซลล์มีการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระดังกล่าวเพิ่มมากขึ้น

Rice-Evans and Miller (1996) ศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระในอาหารหลายชนิด พบว่าสารต้านอนุมูลอิสระในน้ำแอปเปิ้ล ได้แก่ chlorogenic acid และ phloretin ในน้ำส้ม ได้แก่ วิตามินซี hesperidin และ narirutin ในลูกเกด ได้แก่ anthocyanin ส่วนในชา สารต้านอนุมูลอิสระที่พบ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิกประเภท catechin

Paganga et al. (1999) ศึกษาสารประกอบฟีนอลิกที่ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในผักและผลไม้บางชนิด เช่น ในมะเขือยาว พบ chlorogenic acid เป็นองค์ประกอบหลัก และพบ delphinidin ในส่วนของเปลือก ในแอปเปิ้ลพบสารประกอบฟีนอลิกหลายชนิดที่ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น chlorogenic acid procyanidin catechin rutin และ phloridzin เป็นต้น ส่วนในหัวหอมพบ quercetin glycoside

นอกจากสารต้านอนุมูลอิสระประเภทสารประกอบฟีนอลิกจะพบได้ในอาหารประเภท ผัก ผลไม้ หรือเครื่องดื่มแล้ว ยังพบในเมล็ดธัญพืชต่างๆด้วย เช่น ข้าวบาร์เลย์ (Maillard et al., 1996) โดยพบสารประกอบฟีนอลิกที่สำคัญ 3 กลุ่ม คือ flavan - 3 - ols อนุพันธ์ของ hydroxycinnamic acid และ flavonol

Zielinski and Kozłowska (2000) ศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระในเมล็ดธัญพืชหลายชนิด เช่น ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวไรน์ ข้าวโอ๊ต และ buckwheat พบว่าสารสกัดด้วยเมธานอล 80% ของเมล็ดธัญพืชดังกล่าวทุกชนิดแสดงสมบัติสารต้านอนุมูลอิสระ โดยเรียงลำดับประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระจากมากไปน้อย ดังนี้ buckwheat > ข้าวบาร์เลย์ > ข้าวโอ๊ต > ข้าวสาลี = ข้าวไรน์ ในส่วนของรำข้าวที่แสดงสมบัติสารต้านอนุมูลอิสระเรียงลำดับประสิทธิภาพจากมากไปน้อย ได้แก่ รำข้าว buckwheat > รำข้าวโอ๊ต > รำข้าวบาร์เลย์ อย่างไรก็ตาม การทดลองนี้พบว่าสารสกัดด้วยน้ำจากรำข้าว buckwheat เท่านั้นที่แสดงสมบัติสารต้านอนุมูลอิสระ

Miranda et al. (2000) ศึกษาสารประกอบฟีนอลิกในฮ็อพ (hop) และเบียร์ คือ สารในกลุ่ม prenylated flavonoid ซึ่งได้แก่ prenylchalcone และ prenylflavanone ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL (Low-Density Lipoprotein) ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย copper sulfate เข้มข้น 2 μM . พบว่า prenylchalcone สามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL ได้ทั้งที่ความเข้มข้น 5 และ 25 μM . ส่วน prenylflavanone มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำกว่า prenylchalcone เล็กน้อย นอกจากนี้ยังพบว่า xanthohumol ซึ่งเป็นสาร

ในกลุ่ม prenylchalcone ที่พบมากที่สุดคือในฮอปและเบียร์ มีประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระสูงมากในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL โดยมีประสิทธิภาพสูงกว่าอัลฟา-โทโคฟีรอล และ genistin แต่ต่ำกว่า quercetin

Eriksson and Na (1995) รายงานว่าแม้ว่าในอาหารจะพบสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มของเอนไซม์ เช่น เอนไซม์ superoxide dismutase glutathione peroxidase glucose oxidase และ catalase แต่ส่วนใหญ่เอนไซม์เหล่านี้จะถูกทำให้เสื่อมสภาพ (inactive) เนื่องจากความร้อนในระหว่างกระบวนการแปรรูปอาหาร ในขณะที่สารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่เอนไซม์ เช่น สารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ โทโคฟีรอล และสารประกอบฟีนอลิกสามารถทนต่อความร้อนที่ใช้ในกระบวนการแปรรูปอาหารได้ดี อย่างไรก็ตาม ปฏิกิริยาบางชนิดที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการแปรรูปอาหาร เช่น ปฏิกิริยา Maillard (Maillard reaction) ปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนด้วยน้ำ (protein hydrolysis) และกระบวนการหมักโดยแบคทีเรียแลคติก (lactic acid bacteria) กลับทำให้เกิดสารประกอบบางชนิดที่มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ ตัวอย่างที่เห็นได้ชัด คือ ในการอบหรือย่างเนื้อจะทำให้เกิดสารชนิดหนึ่งเป็นรงควัตถุที่เรียกว่า nitrosylhaem ซึ่งสามารถทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระและป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่จะเกิดขึ้นในชิ้นเนื้อนั้นได้

Antony et. al. (2000) ทำการวิจัยพบว่าผลผลิตที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา Maillard มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยจากการทดลองให้เกิดปฏิกิริยา Maillard ขึ้นระหว่างน้ำตาลและกรดอะมิโนไลซีนโดยการนำไปรีฟลักซ์ด้วยน้ำเป็นเวลา 4 , 8 , 12 , 16 และ 20 ชั่วโมง จากนั้นนำผลผลิตที่ได้จากการปฏิกิริยาดังกล่าวไปวัดค่า pH และค่าการดูดกลืนแสงของรงควัตถุสีน้ำตาลที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร พบว่าค่า pH ที่วัดได้ลดลงจาก 4.2 - 3.65 ตามระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นจาก 0.6 - 1.6 ตามระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา ส่วนประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระพบว่ามีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา

Brennan et. al. (2000) ได้ทำการวิจัยถึงผลของการรับประทานอาหารเสริมไม่ว่าจะเป็นวิตามินซีหรือวิตามินอีที่มีต่อการทำลายดีเอ็นเอซึ่งถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยให้อาสาสมัครซึ่งมีสุขภาพดีและต้องไม่เป็นผู้ที่สูบบุหรี่ทั้งเพศชายและหญิงอายุระหว่าง 25-53 ปี จำนวน 14 คน รับประทานอาหารเสริมวิตามินซีปริมาณ 1000 มก. เป็นประจำทุกวันเป็นเวลา 42 วัน หรือรับประทานอาหารเสริมวิตามินอีปริมาณ 800 มก. เป็นประจำทุกวันเป็นเวลา 42 วัน ในขณะที่เดียวกันอาสาสมัครทุกคนต้องไม่มีการเปลี่ยนแปลง

พฤติกรรมในการบริโภคของตนเอง จากนั้นศึกษาการทำลายดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เรียกว่า peripheral blood lymphocytes (PBL) ทั้งในภาวะที่มีและไม่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นตัวเหนี่ยวนำ รวมทั้งศึกษาเอนไซม์ superoxide dismutase catalase และ glutathione peroxidase ด้วย จากผลการทดลองพบว่าภายหลังที่อาสาสมัครได้รับประทานอาหารเสริมไม่ว่าจะเป็นวิตามินซีหรือวิตามินอี การทำลายดีเอ็นเอซึ่งถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ superoxide dismutase และ glutathione peroxidase ถูกยับยั้งตลอดช่วงที่อาสาสมัครได้รับประทานอาหารเสริม ซึ่งแสดงว่าทั้งวิตามินซีและวิตามินอีในอาหารเสริมเป็นสารหลักในการทำหน้าทีลดการทำลายดีเอ็นเอในเซลล์เม็ดเลือดขาวดังกล่าว

1.9 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติส่วนใหญ่ได้มาจากอาหาร ซึ่งปัจจุบันมีการแปรรูปในลักษณะของสารสกัดเพื่อใช้เป็นอาหารเสริมหรือในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง อย่างไรก็ตาม การได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจากอาหารธรรมชาติโดยตรงน่าจะปลอดภัยและมีประสิทธิภาพดีกว่า โดยแหล่งอาหารที่น่าสนใจ คือ ผักพื้นบ้านและสมุนไพรไทย เนื่องจากหาได้ง่ายและราคาถูก ส่วนใหญ่พืชเหล่านี้เป็นพืชที่ขึ้นเองตามธรรมชาติ แต่ยังไม่เป็นที่นิยมในการบริโภคเท่าใดนัก เมื่อเทียบกับพืชผักเศรษฐกิจอื่นๆ หากได้มีการวิจัยถึงสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของพืชผักพื้นบ้านและสมุนไพรไทยเหล่านี้ จะทำให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการเลือกบริโภคอาหารที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นการช่วยส่งเสริมการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรธรรมชาติ ในขณะที่เดียวกันก็ถือเป็นการช่วยอนุรักษ์พันธุ์พืชของท้องถิ่นโดยทางอ้อม เพราะแทนที่จะเป็นการเก็บจากแหล่งธรรมชาติมาบริโภคเท่านั้น แต่จะทำให้มีการเพาะปลูกให้แพร่หลายในท้องถิ่น อีกทั้งยังช่วยส่งเสริมให้ผักพื้นบ้านและสมุนไพรไทยมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และทางอุตสาหกรรมอาหาร และ/หรืออุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอางในอนาคตยิ่งขึ้น

ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในผักพื้นบ้านของท้องถิ่นภาคเหนือ และสมุนไพรไทยบางชนิด วิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี วิตามินอี แคโรทีนอยด์ และสารประกอบฟีนอลิก รวมทั้งแยกและศึกษาธรรมชาติของสารประกอบฟีนอลิกที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ทั้งนี้เพื่อที่จะได้ทราบว่าองค์ประกอบใดในพืชผักและสมุนไพรที่ทำหน้าที่หลักในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ให้เป็นประโยชน์ได้ต่อไปในอนาคต

1.10 ขอบเขตการวิจัย

ขอบเขตการวิจัย แบ่งออกเป็นข้อๆ ดังนี้

1. จัดหาพืชผักพื้นบ้านในท้องถิ่นภาคเหนือ และสมุนไพรไทยที่น่าสนใจ
2. ตรวจสอบและเปรียบเทียบสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพืชผักและสมุนไพร เพื่อคัดเลือกตัวอย่างที่มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูง
3. วิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี วิตามินอี แคโรทีนอยด์ และสารประกอบฟีนอลิกในพืชผักและสมุนไพรไทยแต่ละชนิด
4. แยกและศึกษาธรรมชาติทางชีวเคมีของสารประกอบฟีนอลิกที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระของพืชตัวอย่างบางชนิดที่มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูง