บทที่ 2
เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระ

2.1.1 อนุมูลอิสระ (free radical)

อนุมูลอิสระ (free radical) หมายถึง สารใดๆ ก็ตามซึ่งมีอิเล็กตรอนที่ไม่ได้จับคู่ (unpaired electron) มากกว่าหรือเท่ากับหนึ่งอิเล็กตรอนในวงโคจรของโมเลกุล

อนุมูลอิสระส่วนมากเป็นสารที่ไม่เสถียร มีช่วงครึ่งอายุ (half life) สั้น โดยทั่วไปจะทำปฏิกิริยากับสารอื่นๆ ใน 2 รูปแบบ ได้แก่ การดึงอะตอมของไฮโดรเจนมาจากโมเลกุลของสารข้างเคียง และการเพิ่มอะตอมของออกซิเจนเข้าไป เพื่อให้เกิดเป็นอนุมูลเพอร์ออกซิล (peroxyl radical) เนื่องจากสารประเภทอนุมูลอิสระมีอิเล็กตรอนที่ไม่ได้จับคู่อยู่ในโมเลกุล ดังนั้น สารประเภทดังกล่าวจึงมีความไวสูงในการทำปฏิกิริยากับสารอื่น (อัญชนา, 2544) นอกจากนั้น อนุมูลอิสระยังสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยา autocatalytic ซึ่งจะทำให้เกิดอนุมูลอิสระโมเลกุลใหม่ขึ้นมาเรื่อยๆ เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายอย่างต่อเนื่อง

อนุมูลอิสระในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต อาจเกิดได้จากสาเหตุหลายประการ ทั้งจากปัจจัยภายในร่างกายและปัจจัยจากสิ่งแวดล้อม สำหรับปัจจัยที่มาจากภายนอก ได้แก่ การได้รับพลังงานจากรังสีบางชนิด เช่น รังสีอัลตราไวโอเลต (ultraviolet radiation) รังสีเอ็กซ์ (X-ray) คลื่นอัลตราซาวน์ (ultrasound) (Milowska and Gabryelak, 2007) หรืออาจเกิดจากการได้รับยาหรือสารเคมีบางประเภท เช่น สารเคมีแปลกปลอมจากมลพิษ ควันไฟ หรือสารเคมีที่ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรม โดยสารเหล่านี้จะไปกระตุ้นปฏิกิริยาชีวเคมี (metabolism) ของเอนไซม์ (enzymes) บางชนิดในร่างกาย ทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นภายในเซลล์ (Campanella, *et al*., 2007 ; Arita, *et al*., 2007)

ส่วนปัจจัยภายในร่างกายที่มีผลทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ได้แก่ กระบวนการเมตาบอลิสม์ต่างๆ ภายในเซลล์ตามธรรมชาติของสิ่งมีชีวิต โดยพบว่า 2-3% ของออกซิเจนที่แต่ละเซลล์ได้รับ จะถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็นอนุมูลอิสระ ซึ่งตามปกติแล้ว อะตอมของธาตุทั่วไปสามารถมีอิเล็กตรอนที่ไม่ได้จับคู่ได้ แต่อนุมูลอิสระที่พบในกระบวนการทางสรีรวิทยาของสิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่จะเป็นอนุมูลอิสระที่มีองค์ประกอบของออกซิเจน ไนโตรเจน และคาร์บอน (Campanella, *et al*., 2007) ตัวอย่างของอนุมูลอิสระที่สำคัญ ได้แก่ nitric oxide (NO) และ singlet oxygen ($^1O_2$) ซึ่งเป็นโมเลกุลของออกซิเจนในสถานะที่ถูกกระตุ้น (excited state) (อัญชนา, 2544)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากข้อเท็จจริงที่ว่า ปกติแล้วในกระบวนการหายใจของสิ่งมีชีวิต ออกซิเจนจะถูกรีดิวซ์และได้น้ำเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย โมเลกุลของออกซิเจนจะต้องคายอิเล็กตรอนทั้งหมด 4 อิเล็กตรอน เมื่อถูกออกซิไดส์โดย oxidase cytochrome ซึ่งจากปฏิกิริยาดังกล่าว ออกซิเจนจะเปลี่ยนเป็นสารตัวกลาง (intermediate) ทั้งหมด 3 ชนิดก่อนที่จะเปลี่ยนเป็นน้ำ (H_2O) ดังสมการต่อไปนี้

$$O_2 \xrightarrow{+e^-} O_2^{\cdot -} \xrightarrow[2H^+]{+e^-} H_2O_2 \xrightarrow[H^+]{+e^-} OH^- \xrightarrow[H^+]{+e^-} H_2O$$

สารตัวกลางทั้ง 3 ชนิดในปฏิกิริยาดังกล่าว ได้แก่ ซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide anion : $O_2^{\cdot -}$) ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide : H_2O_2) และอนุมูลไฮดรอกซิล (hydroxyl radical : $OH^{\cdot}$) เรียกโดยรวมว่า reactive oxygen species หรือ ROS ซึ่งเกิดจากกิจกรรมของ oxidative enzyme ในหลายๆ ส่วนของเซลล์ ได้แก่ ไมโตคอนเดรีย (mitochondria) ไซโตโซม (cytosome) ไลโซโซม (lysosome) เพอรอกซี่โซม (peroxysome) และเยื่อหุ้มองค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ (plasma membrane) (Campanella, *et al*., 2007) ROS เป็นโมเลกุลที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา โดยอาจเป็นอนุมูลอิสระหรือไม่ก็ได้ (พรทิพย์, 2546) อย่างไรก็ตามโมเลกุลของ ROS แต่ละชนิดจะมีความไวในการทำปฏิกิริยาต่างกัน โดยไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\cdot -}$) จัดเป็น ROS ที่มีความไวต่อปฏิกิริยาต่ำกว่าอนุมูลไฮดรอกซิล ($OH^{\cdot}$) ซึ่งเท่ากับว่า ความเสียหายที่เกิดจากปฏิกิริยาดังกล่าวจะต่างกันออกไปด้วย (Pervaiz and Clement, 2007)

ตามธรรมชาติ การเกิดอนุมูลอิสระและ ROS ในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นอกจากจะมีสาเหตุมาจากกระบวนการเมตาบอลิสม์ต่างๆ ภายในเซลล์แล้ว ยังสามารถเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆ ที่ฝังตัวอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane-bound enzyme system) (Pervaiz and Clement, 2007) ซึ่งเป็น integral membrane protein หรือที่เรียกว่า receptor ของกระบวนการรับส่งสัญญาณภายในเซลล์ (cell signaling) นั่นเอง (Karp, 2002)

กระบวนการรับส่งสัญญาณของเซลล์เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดอนุมูลอิสระ เช่น การกระตุ้นการทำงานของ G-protein coupled receptors, receptor tyrosine kinases และ receptor serine/threonine kinases ซึ่งเป็น receptor protein ในเซลล์ทั่วๆ ไป (Pervaiz and Clement, 2007) นอกจากนั้น การเกิดอนุมูลอิสระเนื่องจากการรับส่งสัญญาณของเซลล์ยังสามารถเกิดขึ้นได้จากการรับส่งสัญญาณของเซลล์เม็ดเลือดขาวจับกิน (phagocyte) เช่น มาโครฟาจ (macrophage) สามารถหลั่งสารที่มีคุณสมบัติกระตุ้นการอักเสบ เช่น prostaglandin E2 (PGE2), reactive oxygen species (ROS), reactive nitrogen species (RNS) (ได้แก่ nitric oxide (NO) และ peroxynitrite anion ($ONOO^-$)) และ cytokines เป็นต้น โดยโมเลกุลของสารเหล่านี้จะเกิดขึ้นจากกระบวนการรับส่งสัญญาณของเซลล์ซึ่งมีสารประเภท lipopolysaccharides เป็นตัวกระตุ้น (stimulus) (Choi and Hwang, 2004)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นอกจากในมนุษย์และสัตว์แล้ว พบว่ากระบวนการสังเคราะห์แสง (photosynthesis) ของพืชก็สามารถก่อให้เกิดอนุมูลอิสระได้ โดยมีสาเหตุมาจากปฏิกิริยาภายในไมโตคอนเดรีย (mitochondria) คลอโรพลาสต์ (chloroplast) เพอรอกซี่โซม (peroxisome) และเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) นอกจากนั้น อาจเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase) และเพอรอกซิเดส (peroxidase) เพื่อการตอบสนองต่อสภาพเครียดจากสิ่งแวดล้อม เช่น การเข้าทำลายของจุลินทรีย์ การขาดน้ำ ความเข้มแสงที่สูงเกินไป และสารเคมีแปลกปลอม เช่น พาราควอท (paraquat) (Lui, *et al*., 2007)

ปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระจัดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (free radical chain reaction) ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเกิดปฏิกิริยามีหลายประการ ได้แก่ อุณหภูมิ ความเข้มข้นของอนุมูลอิสระ คุณสมบัติเฉพาะของสารละลาย ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) เป็นต้น ขั้นตอนในการเกิดปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระ แบ่งเป็นทั้งหมด 3 ขั้นตอน ได้แก่ ขั้นตอนเริ่มต้น (initiation step) ขั้นตอนเพิ่มจำนวน (propagation step) และขั้นตอนสุดท้าย (termination step) ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้ (อัญชนา, 2544)

1) ขั้นตอนเริ่มต้น (initiation step)

ขั้นตอนแรกของปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระ เกิดจากสารต่างๆ และปฏิกิริยาการแตกตัวของสารดังที่ได้ระบุไว้ ทั้งหมดนี้ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระ (R) ดังสมการที่ 1

$$RH \longrightarrow R\bullet \qquad \text{----------> สมการที่ 1}$$

เมื่อ singlet oxygen ทำปฏิกิริยากับไขมัน (RH) จะทำให้เกิดไฮโดรเพอร์ออกไซด์ (hydroperoxide : ROOH) ดังสมการที่ 2 โดยปฏิกิริยาตามสมการดังกล่าว อาจเกิดจากปฏิกิริยาของ triplet oxygen ($^3O_2$) ซึ่งเป็นโมเลกุลของออกซิเจนในสภาวะพื้น (ground state) ได้ แต่ต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไลพ็อกซิเจนเนส (lypoxygenase)

$$RH + {}^1O_2 \longrightarrow ROOH \qquad \text{----------> สมการที่ 2}$$

พันธะ O-O ในไฮโดรเพอร์ออกไซด์เป็นพันธะที่สลายง่าย ทำให้เกิดเป็นอนุมูลอิสระในรูปแบบต่างๆ ดังสมการที่ 3-5

$$ROOH \rightleftharpoons RO\bullet + H\bullet \qquad \text{----------> สมการที่ 3}$$

$$ROOH \rightleftharpoons RO\bullet + OH\bullet \qquad \text{----------> สมการที่ 4}$$

$$2ROOH \rightleftharpoons RO\bullet + H_2O + ROO\bullet \qquad \text{----------> สมการที่ 5}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไอออนของสารประเภทโลหะ สามารถเร่งการสลายโมเลกุลของไฮโดรเพอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นการเร่งปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระ ดังสมการที่ 6-7 มีรายงานว่า ธาตุเหล็ก (Fe) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่สำคัญในการเปลี่ยนซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\cdot-}$) ให้เป็นอนุมูลไฮดรอกซิล ($OH^{\cdot}$) ซึ่งมีความรุนแรงในการทำปฏิกิริยามากกว่า (Fenton reaction) (Afanas'ev, *et al*., 2000)

$$ROOH + M^{N+} \rightleftharpoons RO\bullet + OH\bullet + M^{(N+1)} \quad \text{---------> สมการที่ 6}$$

$$ROOH + M^{(N+1)} \rightleftharpoons RO\bullet + OH\bullet + M^{N+} \quad \text{---------> สมการที่ 7}$$

2) ขั้นตอนเพิ่มจำนวน (propagation step)

ปฏิกิริยาในขั้นตอนพรอบพาเกชั่น จะเกิดขึ้นใน 2 ลักษณะ ได้แก่ การดึงอะตอมของไฮโดรเจนออกจากโมเลกุลของสารข้างเคียง หรือการทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของออกซิเจนที่อยู่ในสภาวะพื้นทำให้ได้อนุมูลอิสระโมเลกุลใหม่ ดังสมการที่ 8-10

$$RH + R^{1}\bullet \rightleftharpoons R\bullet + R^{1}H \quad \text{--------> สมการที่ 8}$$

$$R\bullet + {}^{3}O_2 \rightleftharpoons ROO\bullet \quad \text{---------> สมการที่ 9}$$

$$ROO\bullet + RH \rightleftharpoons ROOH + R\bullet \quad \text{---------> สมการที่ 10}$$

3) ขั้นตอนสุดท้าย (termination step)

ในขั้นตอนเทอร์มิเนชัน ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นคือปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลอิสระ 2 โมเลกุลมารวมกันทำให้เกิดสารที่มีความเสถียร เป็นผลให้ปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระจบสิ้นลง ดังสมการที่ 11-12

$$ROO\bullet + ROO\bullet \rightleftharpoons ROOR + O_2 \quad \text{---------> สมการที่ 11}$$

$$ROO\bullet + R\bullet \rightleftharpoons ROOR \quad \text{---------> สมการที่ 12}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระและ ROS มีผลกระทบต่อร่างกายในหลายรูปแบบ โดยรวมคือการทำลายสมดุลของระบบต่างๆ หรือก่อให้เกิดความเสียหายแก่องค์ประกอบของเซลล์ เช่น ทำลายองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ได้แก่ lipid bilayer และ integral protein เป็นผลให้เกิดความผิดปกติและการตายของเซลล์ (อัญชนา, 2544) นอกจากนั้น พบว่าการปรากฏของ ROS ปริมาณสูงในไซโตพลาสม์ (cytoplasm) จะช่วยเร่งการสร้างไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ของไมโตคอนเดรีย ทำให้เยื่อหุ้มไมโตคอนเดรียถูกทำลายเร็วขึ้น (Park and Park, 2007)

อนุมูลอิสระสามารถทำลายพันธะเปปไทด์ (peptide bond) ของสารประเภทโปรตีน ซึ่งกรดอะมิโน (amino acid) ที่เป็นองค์ประกอบย่อยของโปรตีนต่างๆ นั้น มีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) สูง โดยเฉพาะการทำปฏิกิริยากับอนุมูลไฮดรอกซิล (OH^-) ทำให้เกิดการแตกหักหรือเปลี่ยนแปลงของพันธะ ซึ่งจะนำไปสู่ความผิดปกติและการเสื่อมสภาพของเอนไซม์ต่างๆ โดยกรดอะมิโนทุกชนิดล้วนเป็นเป้าหมายของปฏิกิริยาดังกล่าว แต่โมเลกุลของกรดอะมิโนที่สำคัญในกรณีนี้ ได้แก่ ไทโรซีน (tyrosine) ฮิสทิดีน (histidine) เมไธโอนีน (methionine) และซิสเทอีน (cysteine) (Campanella, *et al*., 2007)

นอกจากนั้น อนุมูลอิสระยังสามารถทำลายดีเอ็นเอ (DNA: deoxyribonucleic acid) ซึ่งโดยทั่วไปแล้ว เป็นที่ทราบกันดีว่า ความเสียหายของดีเอ็นเอส่วนมากมักเกิดจากการได้รับรังสีต่างๆ แต่ความเสียหายโดยตรงที่ดีเอ็นเอได้รับจากรังสีนั้นเป็นเพียง 20% ของความเสียหายทั้งหมดเท่านั้น สาเหตุหลักที่แท้จริงของความเสียหายของดีเอ็นเอดังกล่าว มาจาก ROS ซึ่งเกิดจากการแตกตัวของโมเลกุลของน้ำเนื่องจากการได้รับรังสี (Tian, *et al*., 2007) โดยปฏิกิริยาดังกล่าวจะเกิดจากอนุมูลไฮดรอกซิล (OH^-) เป็นหลัก ซึ่งซูเปอร์ออกไซด์ (O_2^-) และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) จะไม่ทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอโดยตรง แต่จะทำปฏิกิริยากับธาตุโลหะบางชนิด เช่น ธาตุเหล็ก (Fe) ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว (Afanas'ev, *et al*., 2000) และทองแดง (Cu) ทำให้เกิดเป็นอนุมูลไฮดรอกซิล (OH^-) เพื่อทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอต่อไป

ROS สามารถก่อความเสียหายแก่ DNA ได้ในหลายรูปแบบ ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงของเบสทั้งหมดหรือการทำลายเบสในบางจุด เช่น การสูญหายของเบส (deletion) ทำให้การสังเคราะห์โปรตีนตามลำดับโคดอน (codon) เปลี่ยนแปลงไป (frameshift) หรือเกิดการแตกหักของพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) ระหว่างดีเอ็นเอ ทำให้ดีเอ็นเอแยกออกจากกัน (strand break) หรืออาจทำให้เกิด DNA protein cross-links ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของโปรตีนที่เชื่อมระหว่างดี-เอ็นเอกับโปรตีนฮิส-โตน (histone) ทำให้ดีเอ็นเอแยกตัวออกจากโครงสร้างดังกล่าวของโครโมโซม (chromosome) นอกจากนั้น อนุมูลอิสระยังมีผลทำให้เกิดการเรียงตัวและจับคู่ใหม่ของโครโมโซม (chromosomal rearrangement) และการแลกเปลี่ยนซิสเตอร์โครมาติด (sister chromatid) (Ray, *et al*., 2000) ซึ่งทั้งหมดนี้จะทำให้การแสดงออกของยีน (gene expression) เกิดการเปลี่ยนแปลงไปในทางลบ โดยเฉพาะหากเกิดการเปลี่ยนแปลงในบริเวณที่เป็น promoter หรือ enhancer ซึ่งจะทำให้ยีนในบริเวณข้างเคียงไม่มีการแสดงออก เช่น การเปลี่ยนแปลงของ tumor suppressor gene ซึ่งจะนำไปสู่จุดเริ่มต้นของการเกิดโรคมะเร็ง (Anonymous, 2000)

โดยทั่วไปปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เป็นสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอ มักจะเกิดขึ้นในบริเวณที่มีเบสกวานีน (guanine : G) และไซโตซีน (cytosine : C) ทำให้เกิดเป็น 8-oxo-G ซึ่งเป็นสารตัวกลางในกระบวนการเกิดมะเร็ง (Ray, *et al*., 2000)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระในกระบวนการชีวเคมีของสิ่งมีชีวิต นำไปสู่การเกิดพยาธิสภาพต่างๆ ได้แก่ โรคหลอดเลือดหัวใจตีบตัน (cardiovascular disease) โรคเบาหวาน (diabetes) โรคมะเร็ง (cancer) (Sakanaka, *et al*., 2004) โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) โรคความจำเสื่อม (Alzheimer's disease) (Tepe, *et al*., 2004) อาการอักเสบ (inflammatory) อาการผื่นคันที่ไม่ทราบสาเหตุ (atopic eczema) (Choi and Hwang, 2003) โรคไขข้ออักเสบ (rheumatism) และต้อกระจก (cataract) (อัญชนา, 2544) เป็นต้น ตลอดจนเป็นปัญหาหลักที่สำคัญอย่างหนึ่งในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจาก อนุมูลอิสระก่อให้เกิดการเหม็นหืน (rancid) ของผลิตภัณฑ์ ซึ่งทำให้อายุการเก็บรักษาน้อยลง (Zhang, *et al*., 2006)

โดยทั่วไปในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดจะมีกระบวนการป้องกันอันตรายจากอนุมูลอิสระโดยเฉพาะ ROS ซึ่งกระบวนการป้องกันดังกล่าวอาจเกิดขึ้นเนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์หรือไม่ก็ได้ เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ได้แก่ superoxide dismutase (SOD), catalase, guaiacol peroxidase และเอนไซม์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับ ascorbate-glutathione cycle เช่น ascorbate peroxidase, monohydroascorbate, dehydroascorbate, glutathione reductase และ glutathione peroxidase เป็นต้น (Huang, *et al*., 2007 ; Pervaiz and Clement, 2007)

SOD, catalase และ glutathione peroxidase เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญมากในกระบวนการรักษาสมดุลของอนุมูลอิสระและ ROS ภายในเซลล์ โดย SOD เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\cdot-}$) ให้เป็นออกซิเจน เอนไซม์ catalase ทำหน้าที่สลายโมเลกุลของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ให้เป็นออกซิเจนและน้ำ ส่วน glutathione peroxidase ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจาก glutathione (GSH) ที่ถูกรีดิวส์ไปสู่โมเลกุลของอนุมูลไฮดรอกซิล ($OH^{\cdot}$) หรือไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) (Campanella, *et al*., 2007) ซึ่งโดยหลักการแล้ว เอนไซม์เหล่านี้ช่วยให้อนุมูลอิสระและ ROS กลายเป็นสารที่มีความเสถียรเพื่อหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระนั่นเอง

ส่วนสารที่พบในเซลล์ตามธรรมชาติซึ่งเกี่ยวข้องกับการควบคุมระดับของอนุมูลอิสระ และ ROS แต่ไม่ใช่เอนไซม์ ได้แก่ glutathione (GSH), lipoic acid, ceruloplasmin, albumin, transferrin, haptoglobin, hemopexin, uric acid, bilirubin และ cysteine เป็นต้น (พรทิพย์, 2546)

อย่างไรก็ตาม เมื่ออนุมูลอิสระและ ROS มีความสามารถในการทำลายโครงสร้างของโปรตีนและเอนไซม์ชนิดต่างๆ ดังนั้น เอนไซม์ทั้งหมดที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการควบคุมระดับของอนุมูลอิสระภายในเซลล์ก็สามารถถูกทำลายโดยอนุมูลอิสระและ ROS ได้เช่นกัน เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะที่มีปริมาณอนุมูลอิสระมากเกินกว่าที่ระบบดังกล่าวจะสามารถควบคุมได้ หรือที่เรียกว่า oxidative stress (พรทิพย์, 2546) หรือมีการสะสมของสารเคมีบางอย่างที่มีคุณสมบัติกระตุ้นปฏิกิริยาการเกิด ROS เช่น สารประกอบของธาตุสังกะสี (Zinc : Zn) และปรอท (Mercury : Hg) ซึ่งมีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับ glutathione (GSH) โดยเฉพาะ glutathione reductase (GR) (Bishop, *et al*., 2007 ; Park and Park, 2007) ซึ่งจะก่อให้เกิดปัญหาต่างๆ ต่อเซลล์ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ดังนั้น เพื่อป้องกันการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เกิดสภาวะดังกล่าวขึ้น ร่างกายของสิ่งมีชีวิตต่างๆ จึงจำเป็นที่จะต้องได้รับสารเคมีบางประเภทที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระและ ROS เพื่อช่วยเสริมการทำงานของเอนไซม์และสารต่างๆ ในร่างกายที่มีคุณสมบัติดังกล่าว ซึ่งสารเคมีเหล่านั้นคือ สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants)

2.1.2 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ หมายถึง สารเคมีหรือเอนไซม์ ที่สามารถชะลอหรือป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารตั้งต้น (substrate) ที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาได้ โดยสารตั้งต้นดังกล่าวจะรวมถึงสารเกือบทุกชนิดในร่างกาย ได้แก่ ไขมัน คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และดีเอ็นเอ (พรทิพย์, 2546) ทั้งนี้ ในการเกิดปฏิกิริยายับยั้งอนุมูลอิสระดังกล่าว สารต้านอนุมูลอิสระจะต้องมีความเข้มข้นต่ำ เมื่อเทียบกับความเข้มข้นของสารตั้งต้น ที่เป็นเป้าหมายของปฏิกิริยาออกซิเดชันและต้องสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระได้อย่างมีนัยสำคัญ (Black, 2004)

2.1.2.1 ประเภทของสารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ มีทั้งสารที่มาจากธรรมชาติ (natural antioxidants) และสารสังเคราะห์ (synthetic antioxidants) สารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากธรรมชาติ ได้แก่ กรดอะมิโน (amino acid) วิตามินซี (ascorbic acid) แคโรทีนอยด์ (carotenoids) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เมลานอยดิน (melanoidin) โทโคฟีรอล (tocopherol) แทนนิน (tannins) เปบไตด์ (peptides) และกรดอินทรีย์อื่นๆ ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นสารสังเคราะห์นั้นมีมากมายหลายชนิด ตัวอย่างเช่น tert-butyl-4-hydroxytoluene (BHT) และ tert-butylthioquinone (TBHQ) เป็นต้น โดยทั่วไป สารต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งได้เป็น 5 ประเภท (อัญชนา, 2544) ดังนี้

1) Primary antioxidant ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิค (phenolic compound) และโทโคฟีรอล (tocopherol) รวมถึงสารโทโคฟีรอลสังเคราะห์บางชนิด เช่น alkyl gallate, BHA, BHT และ TBHQ เป็นต้น สารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มนี้จะทำหน้าที่หยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันโดยการให้อิเล็กตรอนแก่โมเลกุลของอนุมูลอิสระ ให้เป็นสารที่มีความเสถียร

2) Oxygen scavenger ได้แก่ วิตามินซี (ascorbic acid) และอนุพันธ์ เช่น ascorbyl palmitate, erythorbic acid (isoascorbic acid) และ sodium erythorbate เป็นต้น สารในกลุ่มนี้จะเข้าทำปฏิกิริยากับออกซิเจน ซึ่งจะเป็นการกำจัดโมเลกุลของออกซิเจนส่วนเกินในระบบปิด

3) Secondary antioxidant ได้แก่ dilauryl thiopropionate และ thiopropinic acid เป็นต้น สารในกลุ่มนี้จะทำหน้าที่สลาย lipid hydroperoxide ให้กลายเป็นสารที่มีความเสถียร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

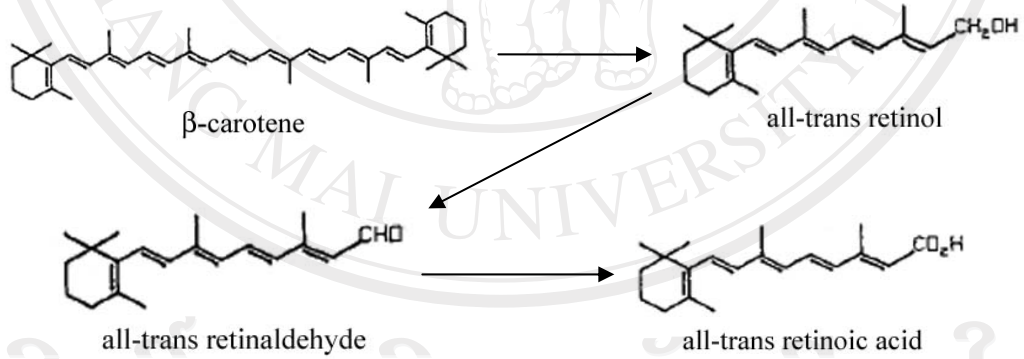
4) Enzymic antioxidant ได้แก่ เอนไซม์ต่างๆ ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระ เอนไซม์เหล่านี้แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ primary antioxidant enzyme และ ancillary antioxidant enzyme ซึ่งสารเหล่านี้จะทำหน้าที่กำจัดออกซิเจนและอนุพันธ์ โดยเฉพาะไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

5) Chelating agent หรือ Sequestrant ได้แก่ กรดซิตริก (citric acid) กรดอะมิโน (amino acid) และ ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA) เป็นต้น สารกลุ่มนี้จะทำหน้าที่จับกับไอออนของโลหะ เช่น เหล็กและทองแดง ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระ ให้กลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีความเสถียร

2.1.2.2 ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติ

กลไกการยับยั้งปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระโดยสารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ จะแตกต่างกันออกไป ตามคุณสมบัติของสารนั้นๆ เช่น คุณสมบัติการละลายในน้ำหรือไขมัน (Le Prell, *et al*., 2007) ดังตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ ต่อไปนี้

1) เบต้าแคโรทีน (β-carotene) เมื่อเข้าสู่เซลล์ (*in vivo*) เบต้าแคโรทีนจะเปลี่ยนเป็นวิตามินเอ โดยการแตกหักของพันธะคู่ที่ตำแหน่งกึ่งกลางโมเลกุล ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 การสังเคราะห์วิตามินเอจากเบต้าแคโรทีน (อัญชนา, 2544)

ปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระของเบต้าแคโรทีนคือการกำจัด singlet oxygen ($^1O_2$) เพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไขมัน ดังสมการ

$$^1O_2 + {}^1\beta\text{-carotene} \rightleftharpoons {}^3O_2 + {}^3\beta\text{-carotene}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากสมการจะเห็นว่า เมื่อเบต้าแคโรทีนทำปฏิกิริยากับ singlet oxygen ($^1O_2$) แล้วจะได้เป็น triplet oxygen ($^3O_2$) หรือออกซิเจนที่อยู่ในสภาวะพื้น (ground state) และ β-carotenyl radical ซึ่งเป็นสารที่มีความเสถียรและอยู่ในรูปเรโซแนนซ์ (resonance) (อัญชนา, 2544)

2) วิตามินอี (tocopherols) ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต วิตามินอีจะปรากฏเป็นสารประเภทไขมัน (Le Prell, *et al*., 2007) แบ่งย่อยได้ทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ α-tocopherol, β-tocopherol, ρ-tocopherol และ δ-tocopherol ขึ้นอยู่กับจำนวนและตำแหน่งของหมู่เมธิลที่ติดอยู่กับ chromane ring (อัญชนา, 2544) วิตามินอีมีคุณสมบัติเป็นโมเลกุลที่ให้อิเล็กตรอน (electron donor) ซึ่งจะทำปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) กับอนุมูลเพอรอกซิล (peroxyl radical) เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระในขั้นตอนพรอบพาเกชั่น (propagation step) (Le Prell, *et al*., 2007) ดังสมการต่อไปนี้

$$\alpha\text{-tocopherol} + LOO^{\cdot} \longrightarrow \alpha\text{-tocopherol}^{\cdot} + LOOH$$

$$\alpha\text{-tocopherol}^{\cdot} + LOO^{\cdot} \longrightarrow LOO\text{-}\alpha\text{-tocopherol}$$

จากสมการจะเห็นว่า เมื่อ α-tocopherol ทำปฏิกิริยากับอนุมูลเพอรอกซิลแล้ว จากนั้นจะเกิดอนุมูล α-tocopherol ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลเพอรอกซิลโมเลกุลอื่น และได้เป็นสารที่มีความเสถียร และหยุดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นลง (อัญชนา, 2544)

3) วิตามินซี (ascorbic acid) วิตามินซีสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระโดยการทำปฏิกิริยารีดักชั่น ซึ่งปฏิกิริยาของวิตามินซีจะเกิดขึ้นภายในบริเวณของเซลล์ที่ประกอบไปด้วยน้ำ (aqueous phase) ซึ่งต่างกับปฏิกิริยาที่เกิดจากวิตามินอีซึ่งเกิดขึ้นในเยื่อหุ้มองค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์ (Le Prell, *et al*., 2007) ปฏิกิริยาในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระของวิตามินซีจะเกิดขึ้นดังสมการดังต่อไปนี้

$$AH^{-} + OH^{\cdot} \longrightarrow H_2O + A^{-\cdot}$$

$$AH^{-} + O_2^{-\cdot} + H^{+} \longrightarrow H_2O_2 + A^{-\cdot}$$

$$AH^{-} + ROO^{\cdot} \longrightarrow ROOH + A^{-\cdot}$$

$$AH^{-} + H_2O_2 + H^{+} \longrightarrow 2H_2O + A$$

จากสมการจะเห็นว่า วิตามินซีจะเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระและ ROS ได้สารที่เรียกว่า semidehydroascorbate ($A^{-\cdot}$) และ hydroascorbate (A) ซึ่งนอกจากวิตามินซีจะสามารถทำปฏิกิริยากับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อนุมูลอิสระได้แล้ว ยังสามารถเสริมการทำงานของวิตามินอีได้ โดยการเข้าทำปฏิกิริยากับ α-tocopherol ทำให้อนุมูล α-tocopherol เปลี่ยนเป็น α-tocopherol เหมือนเดิม ดังสมการ (อัญชนา, 2544)

$$\alpha\text{-tocopherol}^{\cdot} + AH^{-} \longrightarrow \alpha\text{-tocopherol} + A^{-\cdot}$$

4) สารประกอบฟีนอลิค (phenolic compound) สารประกอบฟีนอลิคเป็นสารที่พบได้ในพืชทั่วไป มีโครงสร้างหลักเป็นวงแหวนอโรมาติก (aromatic ring) และมีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) อยู่ในโมเลกุลอย่างน้อย 1 หมู่ มีคุณสมบัติละลายในน้ำได้ ส่วนมากพบรวมกับโมเลกุลของน้ำตาลในรูปสารประกอบไกลโคไซด์ (glycoside) สารประกอบฟีนอลิคในธรรมชาติมีหลายกลุ่ม และมีองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ลิกนิน (lignin) เมลานิน (melanin) และแทนนิน (tannin) เป็นต้น

สารประกอบฟีนอลิคทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระโดยเฉพาะอนุมูลเพอรอกซิล โดยทำให้อนุมูลอิสระกลายเป็นสารที่มีความเสถียร ช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาในขั้นตอนพรอบพาเกชั่น และทำหน้าที่เป็น chelating agent ช่วยดักจับไอออนของโลหะซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) การเกิดอนุมูลอิสระไว้ในโมเลกุล อีกทั้งยังช่วยทำหน้าที่เป็นสารรีดิวซ์ ทำหน้าที่ให้ไฮโดรเจน และกำจัด ROS ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิคขึ้นอยู่กับค่า redox potential ของหมู่ไฮดรอกซิลในโมเลกุล และคุณสมบัติเฉพาะตามโครงสร้างเคมีของสารดังกล่าว (อัญชนา, 2544)

2.2 วิธีการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระ

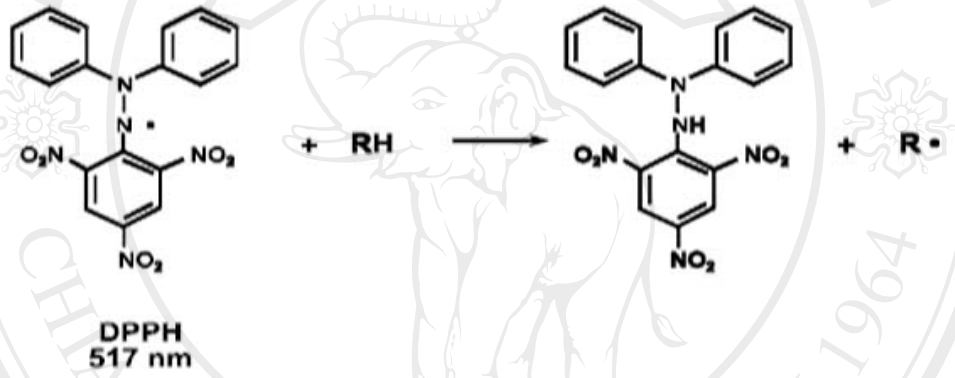
เนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระสามารถจำแนกออกได้เป็นหลายประเภท และมีกลไกในการทำปฏิกิริยาแตกต่างกันออกไปตามคุณสมบัติเฉพาะตัวดังรายละเอียดที่ได้กล่าวมาแล้ว ดังนั้น การวิเคราะห์หรือทดสอบความสามารถในการยับยั้งหรือป้องกันการเกิดปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระจึงไม่สามารถทำได้อย่างสมบูรณ์โดยใช้วิธีการใดวิธีการหนึ่งเพียงวิธีเดียว เนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติย่อมมีความซับซ้อนของคุณสมบัติในทางเคมี (Tepe, *et al*., 2005)

วิธีการทดสอบปฏิกิริยาของสารต้านอนุมูลอิสระ ปัจจุบันมีหลายวิธี โดยทั่วไปจะอาศัยหลักการของการเกิดเรโซแนนซ์ (electron spin resonance : ESR) และความสามารถในการปลดปล่อยพลังงานแสงของสารเคมี (chemiluminescence) เพื่อวัดปฏิกิริยาของสารต้านอนุมูลอิสระต่ออนุมูลอิสระและ ROS (Aruna, 2001) โดยต่อไปนี้ คือ รายละเอียดเกี่ยวกับวิธีการทดสอบหาประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นที่นิยมในปัจจุบัน ได้แก่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.1 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay (DPPH assay)

วิธี DPPH เป็นวิธีการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระที่เป็นที่นิยมมากที่สุด เนื่องจากเป็นวิธีที่ทำได้รวดเร็วและประหยัด นอกจากนั้นยังสามารถใช้ทดสอบได้ทั้งสารต้านอนุมูลอิสระที่มีสถานะเป็นของแข็งและเป็นของเหลว วิธี DPPH มีหลักการคือ อิเล็กตรอนที่ไม่ได้จับคู่ (unpaired electron) ในโมเลกุลของอนุมูล DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) สามารถดูดกลืนพลังงานแสงได้ที่ความยาวคลื่นสูงสุด 517 นาโนเมตร ทำให้มองเห็นเป็นสีม่วง และเมื่ออนุมูล DPPH ถูกรีดิวซ์โดยสารต้านอนุมูลอิสระที่มีคุณสมบัติเป็น hydrogen donor อนุมูล DPPH จะเปลี่ยนเป็น DPPH-H (ภาพที่ 2) ซึ่งการสูญเสียอิเล็กตรอนดังกล่าวจะทำให้อนุมูล DPPH สามารถดูดกลืนพลังงานแสงได้น้อยลง สารดังกล่าวจึงเปลี่ยนเป็นสีเหลือง (Aruna, 2001 ; Kulisic, *et al*., 2004)



ภาพที่ 2 ปฏิกิริยาระหว่างอนุมูล DPPH และสารต้านอนุมูลอิสระ (Aruna, 2001)

จากปฏิกิริยาดังกล่าว จะสามารถหาค่า percent radical scavenging activity (%RSA) ได้จากปริมาณอนุมูล DPPH (สีม่วง) ที่เหลืออยู่หลังจากเกิดปฏิกิริยา เทียบกับปริมาณอนุมูล DPPH ที่เหลืออยู่ในชุดควบคุม (control) ซึ่งไม่มีสารต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณอนุมูล DPPH สามารถตรวจสอบได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ค่าความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (Kulisic *et al*., 2004)

2.2.2 β-carotene bleaching assay (BCB assay)

วิธี BCB เป็นวิธีการทดสอบประสิทธิภาพการเป็น oxygen scavenger ของสารต้านอนุมูลอิสระ โดยตรวจวัดจากอัตราการสูญเสียสีเหลืองของเบต้าแคโรทีนในสารละลาย β-carotene linoleic acid อันเนื่องมาจากปฏิกิริยาระหว่างเบต้าแคโรทีนกับ conjugated diene hydroperoxides ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นระหว่างออกซิเจนที่ให้แก่ระบบกับสารละลายกรดลิโนเลอิค โดยอัตราการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ฟอกจางสีเหลืองของเบต้าแคโรทีนจะลดลงตามความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารที่นำมาทดสอบ (Kulisic, *et al*., 2004 ; Tepe, *et al*., 2005)

ประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบโดยวิธี BCB จะอยู่ในรูป percent antioxidant activity (%AA) ซึ่งคำนวณจากอัตราการฟอกจางสีของเบต้าแคโรทีนในการทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระในช่วงเวลาหนึ่ง เทียบกับอัตราการฟอกจางสีของเบต้าแคโรทีนในชุดควบคุมซึ่งไม่มีสารต้านอนุมูลอิสระดังกล่าว ซึ่งอัตราการฟอกจางสีจะคำนวณได้จากค่าการดูดกลืนแสงของสารผสม (emulsion) ที่ค่าความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร (Zhang *et al*., 2006)

อย่างไรก็ตาม มีการรายงานเกี่ยวกับผลการทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระบางชนิดที่ในทางทฤษฎีสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาของ ROS ได้ เช่น วิตามินซี แต่เมื่อทดสอบโดยวิธี BCB แล้วพบว่าสารนั้นไม่มีคุณสมบัติในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า polar paradox เนื่องจากสารดังกล่าวเป็นสารประกอบที่มีขั้ว และจะปรากฏอยู่ในส่วนที่เป็นน้ำของสารผสม (aqueous phase of emulsion) ซึ่งในส่วนที่เป็นไขมัน (lipid phase) ความเข้มข้นของสารดังกล่าวจะลดลง ซึ่งหมายถึงการลดลงของความสามารถในการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของกรดลิโนเลอิคด้วย (Kulisic, *et al*., 2004)

2.2.3 Thiobarbituric acid reactive substance assay (TBARs assay)

วิธี TBARs เป็นวิธีการทดสอบประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระ โดยอาศัยการวัดปริมาณสารสีชมพู (pink pigment) ที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง thiobarbituric acid (TBA) กับสารต่างๆ ที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับสารดังกล่าว เช่น malondialdehyde (MDA) (Kulisic *et al*., 2005) โดยประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบโดยวิธี TBARs จะอยู่ในรูป percent antioxidant index (%AI) ซึ่งคำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตรของสารละลายในการทดลองเทียบกับชุดควบคุม (Linsley *et al*., 2005)

2.2.4 Oxygen radical absorbance capacity assay (ORAC assay)

วิธี ORAC เป็นวิธีการทดสอบประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระโดยอาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของโปรตีนที่เรืองแสงได้ เช่น β-phycoerythrin หรือ γ- phycoerythrin (PE) เป็นต้น โดยใช้สาร 2,2′- azobis (2-amidino-propane) dihydrochloride เป็นสารตั้งต้นของการเกิดอนุมูลเพอรอกซิลเพื่อทำปฏิกิริยากับ PE และใช้ trolox (α-tocopherol) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน (Sanchez *et al*., 2007) ซึ่งผลการทดสอบจะอยู่ในรูปของค่า ORAC (ORAC value) หรือจำนวนโมล (μmol) สมมูลของ trolox ต่อ 1 ลิตรของตัวอย่าง (μmol trolox equivalence/l) (Bonanni, *et al*., 2007)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โดยค่า ORAC จะคำนวณจากพื้นที่ใต้กราฟเมื่อค่าคงที่ของอัตราการเรืองแสงของ PE ลดลงถึง lag phase (Wang *et al*., 2004)

2.2.5 2,2' -azinobis-(3-ethylbensothiazoline)-6-sulfonic acid assay (ABTs assay)

วิธี ABTs เป็นวิธีการทดสอบประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระที่คล้ายกับวิธี DPPH โดยมีหลักการเกี่ยวกับการทดสอบหาความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการเป็น hydrogen donor เหมือนกัน (Aruna, 2001) แต่ในวิธี ABTs อนุมูลอิสระจะถูกสร้างขึ้นในสารละลาย potassium persulfate แล้วจึงเติมสารต้านอนุมูลอิสระที่ผสมกับ ABTs ลงไปทำปฏิกิริยา และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร (Sanchez, *et al*., 2007)

2.2.6 Ferric reducing ability of plasma (FRAP)

FRAP เป็นวิธีการทดสอบประสิทธิภาพของอนุมูลอิสระที่คิดค้นขึ้นมาในครั้งแรกเพื่อทดสอบประสิทธิภาพดังกล่าวของพลาสม่า อย่างไรก็ตาม วิธีนี้ยังสามารถใช้เพื่อทดสอบของเหลวประเภทอื่นได้ด้วย หลักการของ FRAP คือการวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการรีดิวซ์ ferric-tripyridyltriazine (Fe^{3+}-TPTZ) ให้อยู่ในรูป Fe^{2+} โดยจะวัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร (Jamroz and Behowski, 2001)

นอกจากวิธีการทดสอบประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระทั้ง 6 วิธีดังกล่าว ยังมีวิธีการอีกมากมายที่ใช้บ่งชี้ถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารต่างๆ ซึ่งโดยหลักการแล้ว ทุกวิธีมีความคล้ายคลึงกัน คือการสร้างอนุมูลอิสระขึ้น แล้วเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไป จากนั้นจึงตรวจวัดอนุมูลอิสระหรือสารต้านอนุมูลอิสระที่เหลือจากปฏิกิริยา (พรทิพย์, 2546) ซึ่งการเลือกใช้วิธีการตรวจสอบดังกล่าว รวมถึงการเลือกใช้สารละลายมาตรฐาน จะต้องคำนึงถึงกลไก คุณสมบัติและประเภทของสารต้านอนุมูลอิสระที่ต้องการทดสอบด้วย ดังตัวอย่างจากการเปรียบเทียบวิธีการต่างๆ ในการทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระ (Kulisic *et al*., 2004) พบว่า วิธี BCB เหมาะกับการทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระที่มีคุณสมบัติละลายในไขมัน เนื่องจากสารเคมีที่ใช้ล้วนประกอบไปด้วยสารผสมที่เป็นไขมัน (emulsified lipid) ซึ่งหากนำวิธี BCB ไปใช้ทดสอบสารที่ไม่ละลายในน้ำมัน เช่น วิตามินซี จะทำให้เกิดปรากฏการณ์ polar paradox ซึ่งจากผลการทดสอบจะทำให้สารดังกล่าวได้รับการประเมินว่าเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพต่ำ (weak antioxidant)

วิธี DPPH เป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็วกว่า BCB นอกจากนั้นยังสามารถประยุกต์ใช้ได้ทั้งกับสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายในไขมันและที่ละลายในน้ำ เช่นเดียวกับวิธี TBARs ซึ่งทั้งสองวิธีดังกล่าวมีความไวในการทำปฏิกิริยาสูง (sensitive) อย่างไรก็ตาม ผลการทดสอบทั้งจากวิธี DPPH และ TBARs

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เป็นเพียงการระบุในขั้นต้นเท่านั้นว่าสารที่นำมาทดสอบมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระหรือไม่ จึงอาจกล่าวได้ว่า ความละเอียดของทั้งสองวิธีนี้ยังไม่เพียงพอ

2.3 แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระ

โดยพื้นฐานแล้ว การป้องกันความเสียหายอันอาจเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นโดยอนุมูลอิสระในร่างกายสามารถทำได้โดยการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมการบริโภคใน 3 รูปแบบ (Black, 2004) ได้แก่

1. ลดการบริโภคสารอาหารที่ให้พลังงานสูง เพื่อลดระดับของอนุมูลอิสระที่เป็นอันตรายซึ่งเกิดขึ้นจากการสูญเสียอิเล็กตรอนเนื่องจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ dehydrogenase และการถ่ายทอดอิเล็กตรอน (electron transport chain) เพราะหากพลังงานในระบบมีมาก การเกิดอนุมูลอิสระก็จะมากขึ้นตามไปด้วย

2. ลดการบริโภคสารอาหารต่างๆ ที่มีองค์ประกอบของโมเลกุลบางประเภทที่มีคุณสมบัติเพิ่มการเกิดปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระ เช่น โมเลกุลของไขมันไม่อิ่มตัว

3. บริโภคสารอาหารที่มีองค์ประกอบของสารต้านอนุมูลอิสระ เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นในเซลล์อันเนื่องมาจากอนุมูลอิสระ

แหล่งที่มาสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระคืออาหาร โดยเฉพาะอาหารที่มีแหล่งที่มาจากพืช ได้แก่ ผักและผลไม้ มีการรายงานเกี่ยวกับประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของผักและผลไม้หลายชนิดเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน (standard antioxidants) ดังตารางที่ 1 และ 2 (Aruna, 2001)

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระของสารละลายมาตรฐาน

ชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระ	ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ (TE/100 กรัม)
วิตามินซี	442,000
Trolox (α-tocopherol)	400,000
วิตามินอี	201,000
BHT	395,000

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของผักและผลไม้ชนิดต่างๆ

ชนิดของพืช	ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ (TE/100 กรัม)
องุ่นแดง (red grape)	1,350
กะหล่ำแดง (red cabbage)	1,000
บร็อคโคลี่ (broccoli)	500
ผักโขม (spinach)	500
องุ่นเขียว (green grape)	400
มะเขือเทศ (tomato)	300
ถั่วแขก (green bean)	175
กะหล่ำปลี (green cabbage)	150
ถั่วแระ (lima bean)	1,055
ถั่วแดง (red bean)	11,459
บลูเบอร์รี่ (blueberry)	3,300
ลูกเกด (raisin)	5,900
รำข้าวสาลี (wheat bran)	4,620
แป้งสาลี (wheat flour)	600

นอกจากนั้น แหล่งที่มาสำคัญอีกประการหนึ่งของสารต้านอนุมูลอิสระ คือ น้ำมันหอมระเหย (essential oil) จากพืชสมุนไพร (medicinal plants) และพืชที่มีกลิ่นหอม (aromatic crops) มีรายงานมากมายเกี่ยวกับการค้นพบสารต้านอนุมูลอิสระในพืชเหล่านี้ รวมถึงความสามารถของสารเคมีต่างๆ จากพืชดังกล่าวในการป้องกันการเกิดโรคที่เกิดจากปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระ เช่น โรคมะเร็ง เป็นต้น (Zhang, *et al*., 2006)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4 น้ำมันหอมระเหย

2.4.1 คำจำกัดความและคุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหย (essential oil) คือ น้ำมันที่มีคุณสมบัติระเหยเป็นไอซึ่งได้จากการนำพืชมาสกัดด้วยไอน้ำ (steam distillation) ซึ่งหากยึดตามความหมายนี้ จะสามารถแยกน้ำมันหอมระเหยออกจากไขมันประเภทอื่น (fatty oil) ได้ อย่างไรก็ตาม การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืชสามารถทำได้โดยวิธีการอื่นนอกเหนือจากการสกัดด้วยไอน้ำ เช่น การสกัดน้ำมันอัลมอนด์ขม (bitter almond) และน้ำมันมัสตาร์ด (mustard) โดยอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ หรือการสกัดน้ำมันมะนาว (lemon) และส้ม (orange) โดยการคั้น (pressing) (Guenther, 1948)

น้ำมันหอมระเหยมีคุณสมบัติทางกายภาพ คือ สามารถระเหยได้ที่อุณหภูมิห้อง (ambient temperature) มีกลิ่นและรสชาติเฉพาะตัวตามชนิดของพืชที่นำมาสกัด มีค่าดัชนีการหักเหของแสงเฉพาะ ค่าความถ่วงจำเพาะอยู่ระหว่าง 0.842-1.172 และจุดเดือดอยู่ระหว่าง 150-300 องศาเซลเซียส ส่วนมากเป็นน้ำมันที่เบากว่าน้ำ ไม่ละลายหรือละลายในน้ำได้เล็กน้อย และละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvents) และแอลกอฮอล์ (alcohol) (พฤษภา, 2546)

น้ำมันหอมระเหยจากพืชแต่ละชนิด มีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งเมื่อพิจารณาจากโครงสร้างทางเคมีแล้ว จะสามารถจำแนกน้ำมันหอมระเหยออกได้เป็น 4 ประเภทใหญ่ๆ ได้แก่ (Guenther, 1948)

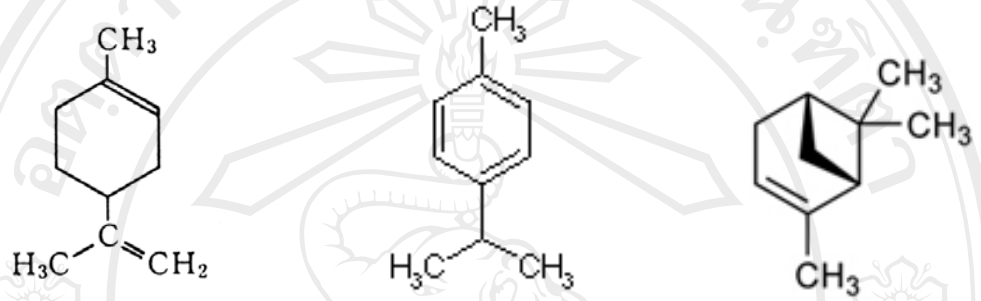
1) Terpenes รวมถึง isoprene และ isoterpene
2) สารประกอบที่มีโครงสร้างเป็น straight chain ไม่มี side chain
3) อนุพันธ์ของ benzene (benzene derivatives)
4) อื่นๆ ซึ่งเป็นสารเคมีที่มีลักษณะโครงสร้างต่างจาก 3 ข้อที่ระบุ

อย่างไรก็ตาม แม้น้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดจะมีโครงสร้างที่แตกต่างกันออกไปดังกล่าวแต่น้ำมันหอมระเหยส่วนมากที่พบในธรรมชาติจะมีคุณสมบัติเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีโครงสร้างหลักเป็น $C_{10}H_{16}$ รวมกับกลุ่มของสารประกอบออกซิเจน ซึ่งมีโครงสร้างพื้นฐานเป็น $C_{10}H_{16}O$ และ $C_{10}H_{18}O$ ซึ่งสารเคมีเหล่านี้เรียกว่า terpene และ camphor ซึ่งคำว่า camphor ในอดีตหมายถึงสารประกอบออกซิเจนที่เป็นผลึก (crystalline oxygen compound) เช่น thyme camphor และ peppermint camphor ซึ่งหมายถึง thymol และ menthol ตามลำดับ และปัจจุบันสารประเภท camphor ได้ถูกจัดรวมให้อยู่ในสารกลุ่ม terpene แล้ว (Guenther, 1948)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นอกจากนั้น น้ำมันหอมระเหยซึ่งเป็นสารประเภท terpene ยังสามารถแบ่งออกได้เป็น 8 ประเภท ตามองค์ประกอบหลักทางเคมี (พฤษภา, 2546) ได้แก่

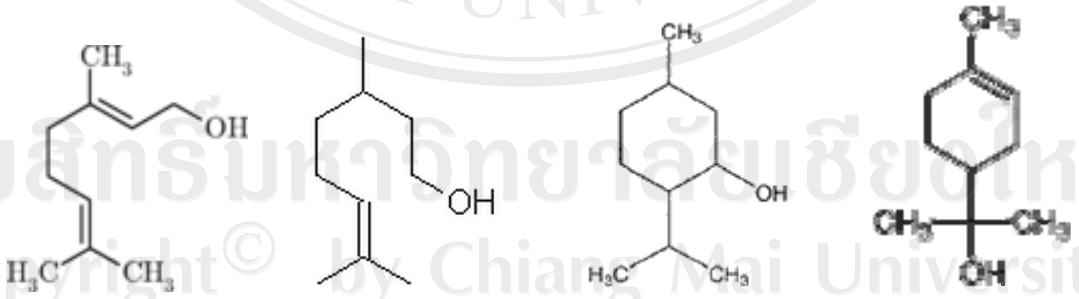
1) น้ำมันหอมระเหยที่มีไฮโดรคาร์บอนเป็นองค์ประกอบหลัก (hydrocarbon volatile oil) ได้แก่ limonene, p-cymene ที่พบในส้ม กระวาน และสน ซึ่งเป็นสารประเภท hydrocarbon monocyclic terpene และ pinene ที่พบในลูกผักชีและอบเชย ซึ่งเป็นสารประเภท bicyclic monoterpene (ภาพที่ 3)



ก) ข) ค)

ภาพที่ 3 โครงสร้างของ (ก) limonene, (ข) p-cymene และ (ค) α-pinene

2) น้ำมันหอมระเหยที่มีแอลกอฮอล์เป็นองค์ประกอบหลัก (alcohol volatile oil) ได้แก่ geraniol, citronellol ซึ่งเป็น acyclic alcohol และ menthol, α-terpineol ซึ่งเป็น monocyclic alcohol สารเหล่านี้พบได้ในเปปเปอร์มินท์ ผลกระวาน ดอกส้ม และดอกกุหลาบ (ภาพที่ 4)



ก) ข) ค) ง)

ภาพที่ 4 โครงสร้างของ (ก) geraniol, (ข) citronellol, (ค) menthol และ (ง) α-terpineol

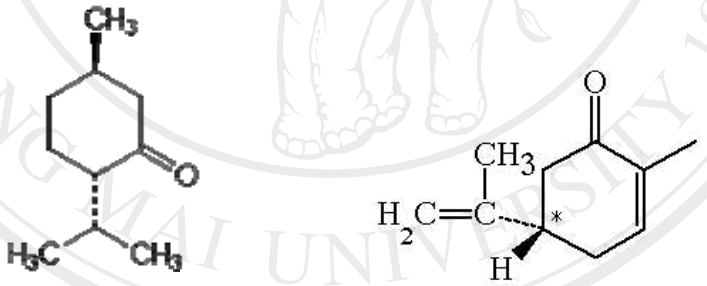
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3) น้ำมันหอมระเหยที่มีอัลดีไฮด์เป็นองค์ประกอบหลัก (aldehyde volatile oil) ได้แก่ geranial (citral a) และ neral (citral b) ซึ่งพบในอบเชยและตะไคร้หอม (ภาพที่ 5)

ก) ข)

ภาพที่ 5 โครงสร้างของ (ก) geranial และ (ข) neral

4) น้ำมันหอมระเหยที่มีคีโตนเป็นองค์ประกอบหลัก (ketone volatile oil) ได้แก่ menthone, carvone ซึ่งเป็น monocyclic ketone และ thujone ซึ่งจัดเป็น bicyclic ketone โดยพบว่า camphor ก็จัดอยู่ในประเภทหลังนี้เช่นกัน สารกลุ่มนี้จะพบได้ในการบูรและเปปเปอร์มินท์ (ภาพที่ 6)



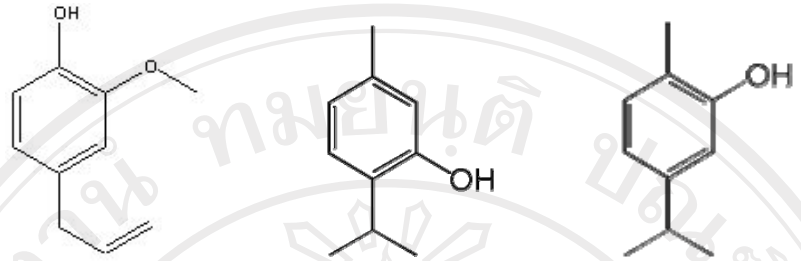
ก) ข)

ค) ง)

ภาพที่ 6 โครงสร้างของ (ก) menthone, (ข) carvone, (ค) thujone และ (ง) camphor

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

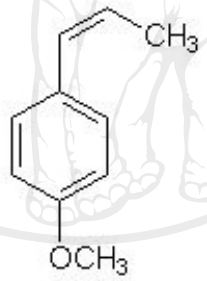
5) น้ำมันหอมระเหยที่มีฟีนอลเป็นองค์ประกอบหลัก (phenol volatile oil) ได้แก่ eugenol, thymol และ carvacrol ซึ่งพบได้ในกานพลูและไทม์ (ภาพที่ 7)



ก) ข) ค)

ภาพที่ 7 โครงสร้างของ (ก) eugenol, (ข) thymol และ (ค) carvacrol

6) น้ำมันหอมระเหยที่มีฟีโนลิคอีเธอร์เป็นองค์ประกอบหลัก (phenolic ether volatile oil) ได้แก่ anethole ที่พบในโป๊ยกั๊ก (ภาพที่ 8)



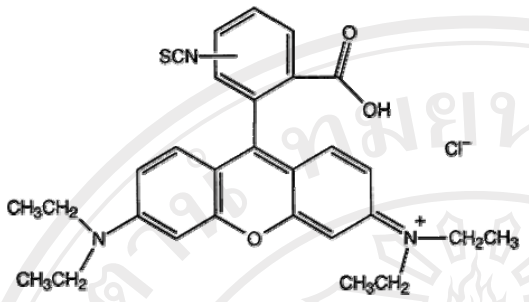
ภาพที่ 8 โครงสร้างของ anethole

7) น้ำมันหอมระเหยที่มีออกไซด์เป็นองค์ประกอบหลัก (oxide volatile oil) ได้แก่ cineole หรือที่เรียกว่า eucalyptol ซึ่งพบในยูคาลิปตัส (ภาพที่ 9)

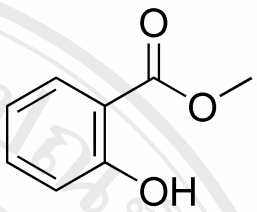
ภาพที่ 9 โครงสร้างของ cineole (eucalyptol)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

8) น้ำมันหอมระเหยที่มีเอสเทอร์เป็นองค์ประกอบหลัก (ester volatile oil) ได้แก่ isothiocyanate ที่พบในมัสตาร์ด และ methyl salicylate ที่พบใน wintergreen (ภาพที่ 10)



ก)



ข)

ภาพที่ 10 โครงสร้างของ (ก) isothiocyanate และ (ข) methyl salicylate

2.4.2 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหยจากพืชแต่ละชนิด ส่วนมากจะมีคุณสมบัติหลายอย่าง (multifunctional properties) นอกเหนือจากประโยชน์ดั้งเดิมในการเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นและรสชาติอาหาร ยังมีการค้นพบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรีย (antibacterial) เชื้อรา (antifungal) และระงับอาการอักเสบ (anti-inflammatory) นอกจากนั้น ยังมีการรายงานเกี่ยวกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในน้ำมันหอมระเหยของพืชหลายชนิด (Zhang *et al*., 2006) ตัวอย่างเช่น

1) Parsley (*Petroselinum crispum* Nym.)

โดยทั่วไปจะมีการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบและเมล็ด parsley เพื่อใช้เป็นสารแต่งกลิ่นและรสชาติ องค์ประกอบหลักของน้ำมัน parsley ได้แก่ myristicin, apiol, α-pinene, β-pinene, β-phellandrene และ myrcene น้ำมันหอมระเหยจาก parsley มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH และ BCB ซึ่งพบว่าองค์ประกอบหลักที่มีผลดังกล่าวคือ apiol และ myristicin นอกจากนั้นยังพบว่าน้ำมันหอมระเหยจาก parsley ยังมีผลในการยับยั้งสภาวะเหม็นหืนในถั่วลิสงอีกด้วย (Zhang, *et al*., 2006)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2) ออริกาโน (Oregano : *Origanum vulgare* L.)

ออริกาโนเป็นพืชเครื่องเทศที่ใช้ประกอบอาหารในแถบเมดิเตอเรเนียน น้ำมันหอมระเหยจากออริกาโนมีองค์ประกอบหลักคือ thymol และ carvacrol ซึ่งพบว่าองค์ประกอบดังกล่าวมีคุณสมบัติยับยั้งการเกิดไฮโดรเพอร์ออกไซด์ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH, TBARs และ BCB (Kulisic, *et al*., 2004)

3) ดาวเรือง (*Tagetes erecta* L.)

น้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากดอกดาวเรือง มีองค์ประกอบหลัก ได้แก่ β-caryophyllene, limonene, methyleugenol, (E)-ocimene, piperetone, piperitenone และ α-terpinolene ซึ่งพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากดอกดาวเรืองมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH และ BCB แต่ไม่มีการรายงานเกี่ยวกับองค์ประกอบที่มีฤทธิ์ดังกล่าว นอกจากนั้นยังพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากดอกดาวเรืองยังสามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชั่นของน้ำตาล deoxyribose ในดีเอ็นเอได้อีกด้วย (Martha, *et al*., 2006)

4) ตะไคร้หอม (Lemongrass : *Cymbopogon citratus* Stapf.)

น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอมมีสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบหลักคือ citral ซึ่งเป็นสารประเภท monoterpene aldehyde มีคุณสมบัติยับยั้งอาการติดเชื้อ (antiseptic) ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (antimicrobial) ยับยั้งอาการอักเสบ (anti-inflammatory) ขับลม (carminative) ขับปัสสาวะ (diuretic) และกระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง (CNS stimulating) นอกจากนั้นยังพบว่า น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอมยังสามารถยับยั้งการเกิดมะเร็ง (anticancer) ในต่อมหมวกไต (prostate gland) และยับยั้งภาวะการเกิดความเสียหายของโครโมโซม (anti-clastogenic) ในสัตว์ทดลองอีกด้วย

Citral เป็นสารเคมีที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ และนอกจาก citral แล้ว องค์ประกอบอื่นๆ ของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอม ได้แก่ geraniol, myrcene, citronellal, limonene, linalool และ dipentene ก็ไม่มีรายงานว่าเป็นสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagen) (Rabbani, *et al*., 2005)

5) Erva Cidreira (*Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown)

Erva Cidreira เป็นพืชพื้นเมืองของอเมริกาใต้และอาฟริกา มีลักษณะเป็นไม้พุ่ม (shrub) ซึ่งชาวพื้นเมืองใช้พืชดังกล่าวเป็นสมุนไพรรักษาโรคเกี่ยวกับทางเดินอาหาร มีชื่อสามัญในภาษาอื่นนอกจากบราซิล ได้แก่ Prontoalivio (โคลัมเบีย), Juanilama (คอสตาริกา), Salvia morada (อาร์เจนตินา) เป็นต้น (United nation, 2005) น้ำมันหอมระเหยของ Erva Cidreira มีองค์ประกอบหลักคือ carvone, limonene, bicyclosesquiphellandrene, piperitone, piperitenone และ β-bourbonene ซึ่งเมื่อทดสอบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระโดยการตรวจวัดการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของกรดลิโนเลอิค พบว่าน้ำมัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หอมระเหยจากพืชดังกล่าวมีกลไกการยับยั้งอนุมูลอิสระในรูปแบบเดียวกับวิตามินอี และองค์ประกอบหลักที่มีบทบาทในกรณีนี้คือ S-carvone, limonene และ carvone ตามลำดับ (Stashenko, *et al*., 2004)

6) Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire)

Mate เป็นพืชอีกชนิดสำหรับอุตสาหกรรมชานอกเหนือจาก *Camellia sinensis* ซึ่งพบว่าองค์ประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยของพืชดังกล่าว คือ limonene และ linalool ซึ่งองค์ประกอบดังกล่าวจะมีปริมาณลดลงเมื่อผ่านการแปรรูปเป็นชา เมื่อทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FTC (Folin-Ciocalteau assay) พบว่า mate ที่ยังไม่ผ่านการแปรรูป มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่า เนื่องจากการคงอยู่ของ phenolic acid, chlorogenic acid และ caffeic acid (Bastos, *et al*., 2006)

7) ผักเบี้ยทะเล (*Sesuvium portulacastrum* L.)

ผักเบี้ยทะเล เดิมเป็นพืชไม้ประดับพื้นเมืองของอาฟริกา พบในภาคเหนือ ตะวันตก และภาคกลางของซิมบับเว (Zimbabwe) ชาวพื้นเมืองใช้พืชชนิดนี้เป็นสมุนไพรรักษาอาการอักเสบ โรคเกี่ยวกับไต อาการไข้ และโรคเลือดออกตามไรฟัน (scurvy) น้ำมันหอมระเหยของพืชชนิดนี้มีองค์ประกอบหลัก คือ O-cymene, 2-β-pinene, 1,8-cineole, limonene, α-terpinene, α-terpinolene, camphene และ α-pinene ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหลายชนิด ได้แก่ *Acetobacter calcoaceticus*, *Bacillus subtilis*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium sporogenes*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae* และ *Pseudomonas aeruginosa* โดยเฉพาะผลจาก limonene และ O-cymene ซึ่งน้ำมันหอมระเหยดังกล่าวมีผลในการยับยั้งอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี BCB แต่ไม่มีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแยกตามองค์ประกอบต่างๆ (Magwa, *et al*., 2006)

8) พริกไทยดำ (Black pepper : *Piper nigrum* L.)

มีการรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเจริญของเชื้อราบางชนิดของสารสกัดจากพริกไทยดำ โดยพบว่าองค์ประกอบหลักของสารสกัดคือ β-caryophyllene, limonene, sabinene, β-bisabolene และ α-copaene ซึ่งน้ำมันหอมระเหยจากพืชดังกล่าว สามารถยับยั้งการเจริญของ *Fusarium graminearum* ได้ 100% ส่วนสารสกัดอะซิโตน (acetone) สามารถชะลอการเจริญของเส้นใยของ *Aspergillus ochrareus* และ *Penicillium viridcatum* และยังพบว่า ทั้งสารสกัดอะซิโตนและน้ำมันหอมระเหยจากพริกไทยดำ มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน butylated hydroxyanisole (BHA) และ butylated hydroxytoluene (BHT) (Singh, *et al*., 2004)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

9) ทำมัง (*Litsea petiolata* Hook.f.)

ทำมังหรือไม้แมงดา เป็นพืชพื้นเมืองของไทย พบตามป่าดิบเขาในเขตภาคใต้ มีคุณสมบัติเป็นพืชสมุนไพร ช่วยขับลม แก้อาการจุกเสียดหรือท้องเฟ้อ มีรายงานเกี่ยวกับคุณสมบัติของสารสกัดหยาบจากใบทำมังในการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาของสารก่อมะเร็ง (Nakahara, *et al*., 2002) ซึ่งพบว่าคุณสมบัติดังกล่าวอยู่ในระดับที่ดีมาก อย่างไรก็ตาม ยังไม่พบรายงานโดยตรงที่เกี่ยวข้องกับการทดสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยหรือสารสกัดหยาบจากใบทำมัง หรือรายงานที่เกี่ยวข้องกับองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากพืชดังกล่าว

10) ตะไคร้ต้น (*Litsea cubeba* Pers.)

ตะไคร้ต้น เป็นพืชในตระกูลเดียวกับทำมัง ซึ่งสารสกัดหยาบจากใบทำมังมีฤทธิ์ต้านมะเร็งหรืออาจอนุมานได้ว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดังที่ได้ระบุไว้ นอกจากนั้นยังมีรายงานมากมายเกี่ยวกับการใช้ประโยชน์จากตะไคร้ต้นทั้งในทางยาและทางโภชนาการ รวมถึงข้อมูลเกี่ยวกับองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหย ซึ่งสามารถเชื่อมโยงอย่างคร่าวๆ ได้กับหลักการของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้น ตะไคร้ต้นจึงเป็นพืชที่น่าสนใจสำหรับการทดสอบในประเด็นดังกล่าว ซึ่งต่อไปนี้ จะเป็นข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับตะไคร้ต้นที่เคยมีการรายงานมาก่อน

2.5 ตะไคร้ต้น

2.5.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและธรรมชาติของตะไคร้ต้น

ตะไคร้ต้น (*Litsea cubeba* Pers.) เป็นพืชในวงศ์ Lauraceae เจริญตามพื้นที่ป่าที่ระดับความสูง 500-3,200 เมตรจากระดับน้ำทะเลปานกลาง พบในบริเวณป่าโปร่งที่มีความชื้นในดินสูงและแสงแดดปานกลางในประเทศจีนถึงภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Plant for a future database, 2005) ตะไคร้ต้นแบ่งเป็น 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Litsea cubeba* var. *cubeba* และ *Litsea cubeba* var. *formosana* ซึ่งมีลักษณะเด่น ดังนี้ (พฤษภา, 2546)

Litsea cubeba var. *cubeba* มีลักษณะเป็นไม้ยืนต้น สูง 10-15 เมตร ลำต้นอ่อนมีเปลือกสีเขียว เมื่อแก่จะมีสีน้ำตาลปนเทา ผิวกิ่งย่อยเรียบ ใบเดี่ยวเรียงตัวแบบสลับ (alternate) ก้านใบเรียบ รูปร่างใบเป็นแบบ elliptic, oblong หรือ lanceolate ฐานใบเป็นแบบ cuneate ขอบใบเรียบ ปลายใบแหลม ผิวใบทั้งสองด้านเรียบ ดอกเกิดที่ซอกใบและปลายยอด แยกเพศและแยกต้น (dioecious) มีช่อดอกแบบ umbelliform raceme ดอกไม่มีขนและมี 4-6 ดอกย่อยต่อช่อดอก ผลเป็นแบบ berry มี 1 เมล็ดต่อผล พบต่อมน้ำมันจำนวนมากในชั้น mesocarp ผลสุกมีสีดำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Litsea cubeba var. *formosana* มีลักษณะเป็นไม้พุ่มขนาดเล็กสูง 2-5 เมตร ผลัดใบ ลำต้นอ่อนมีเปลือกสีเขียว เมื่อแก่จะมีสีน้ำตาลปนเหลือง บริเวณผิวกิ่งย่อย ตา และผิวใบด้านบนมีขนอ่อนนุ่มขนาดเล็กปกคลุมเล็กน้อย ส่วนผิวใบด้านล่างมีขนอ่อนนุ่มขนาดเล็กปกคลุมจำนวนมาก ใบเดี่ยวเรียงตัวแบบสลับ (alternate) รูปร่างเป็นแบบ ovate ฐานใบเป็นแบบ cuneate ขอบใบเรียบ ปลายใบแหลม ดอกเกิดที่ซอกใบและปลายยอด แยกเพศและแยกต้น (dioecious) มีช่อดอกแบบ umbelliform raceme มีดอกย่อย 4-6 ดอกต่อช่อ ผลแบบ berry มี 1 เมล็ดต่อผล พบต่อมน้ำมันจำนวนมากในชั้น mesocarp ผลสุกมีสีดำ

ในประเทศไทย ตะไคร้ต้นจะเริ่มออกดอกตั้งแต่ช่วงเดือนมกราคม-มีนาคม จากนั้นจะเริ่มติดผลตั้งแต่ช่วงเดือนเมษายน-ตุลาคม และผลจะสุกตั้งแต่ช่วงประมาณเดือนพฤศจิกายน-ธันวาคม อย่างไรก็ตาม ช่วงเวลาดังกล่าวอาจไม่แน่นอน ขึ้นอยู่กับสถานที่และสภาพแวดล้อมในการเจริญของตะไคร้ต้นแต่ละต้น (พฤษภา, 2546)

2.5.2 น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต้น

น้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากส่วนผลของตะไคร้ต้นทั้งสองสายพันธุ์มีสีเหลือง กลิ่นคล้ายตะไคร้ มีองค์ประกอบหลักได้แก่ geranial, *cis*-citral และ limonene ซึ่งปริมาณขององค์ประกอบดังกล่าวจะแตกต่างกันออกไปตามสภาพแวดล้อมและพื้นที่ในการเจริญเติบโต (พฤษภา, 2546)

นอกจากนั้นยังมีการรายงานเกี่ยวกับองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยในใบของตะไคร้ต้นจากพื้นที่สถานีเกษตรหลวงอ่างขาง โดยองค์ประกอบส่วนใหญ่จะเป็นสารประเภท terpene ได้แก่ α-thujene, α-pinene, sabinene, β-pinene, myrcene, β-phellandrene, γ-terpinene, *trans*-sabinene hydrate และ *cis*-sabinene hydrate นอกจากนั้นยังมีสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มี oxide เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ 1,8-cineole, α-terpineol และ terpinen-4-ol โดยผลการศึกษาดังกล่าวได้สอดคล้องกับผลการวิจัยเกี่ยวกับน้ำมันหอมระเหยในใบตะไคร้ต้นที่เกาะชวา (มทินา, 2547)

2.5.3 แนวโน้มในการมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตะไคร้ต้น

ตะไคร้ต้นเป็นพืชสมุนไพรและพืชเครื่องเทศของชนเผ่าต่างๆ บนที่สูงมาเป็นเวลาช้านาน ชาวจีนฮ่อเรียกพืชชนิดนี้ว่า กวาเจา มีการนำส่วนผลมาใช้เป็นเครื่องเทศปรุงอาหารและรับประทานกับลาบ นอกจากนั้นยังมีการนำส่วนกิ่งและลำต้นมาต้มกับน้ำเพื่อใช้อาบ หรือบริโภคเพื่อรักษาโรคเกี่ยวกับมดลูก (ชูศรีและปริทรรศน์, 2543)

ส่วนเปลือกของตะไคร้ต้นเป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านในภูมิภาคเอเชีย ซึ่งมีคุณสมบัติในการรักษาอาการอักเสบผื่นคันที่ไม่ทราบสาเหตุ (atopic eczema) และโรคหลอดเลือดหัวใจตีบตัน (coronary heart

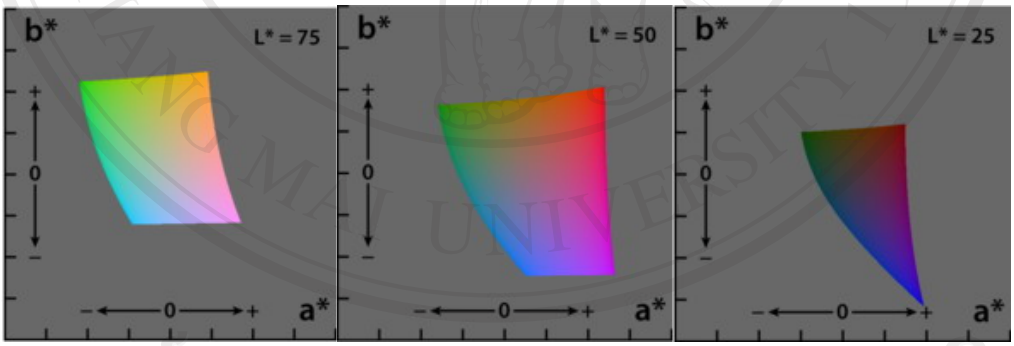
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

disease) มีรายงานว่าสารสกัดเมธานอล คลอโรฟอร์ม บิวทานอล และน้ำ ของส่วนเปลือกลำต้น (bark) ของตะไคร้ต้น มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระสูงใกล้เคียงหรือมากกว่าคุณสมบัติดังกล่าวใน α-tocopherol และ ascorbic acid เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH, peroxidase guaiacol assay และ TBA method (Choi and Hwang, 2003) นอกจากนั้น ยังพบว่าไม่มีความเป็นพิษ (cytotoxic) ต่อเซลล์เนื้อเยื่อของสัตว์ทดลองและยังมีผลในการลดปริมาณของสารที่มีคุณสมบัติชักนำให้เกิดอาการอักเสบ (inflamatory mediator) ได้แก่ NO, PGE_2 และ ROS ซึ่งผลิตโดย macrophage ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสารก่ออาการแพ้ โดยสารสกัดที่ให้ผลการทดลองดีที่สุดคือสารสกัดเมธานอล (Hwang, *et al*., 2005)

2.6 ระบบสี L*a*b*

การศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยาของตะไคร้ต้นนับเป็นส่วนหนึ่งของการวิจัยนี้ ซึ่งขอบเขตของการศึกษาจะครอบคลุมถึงการศึกษาด้านสีของตะไคร้ต้นแต่ละตัวอย่างด้วย ซึ่งระบบการวัดสีที่เลือกใช้จะเป็นระบบ L*a*b* ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้ (Wikipedia, 2007)

ระบบ L*a*b* เป็นระบบที่แสดงถึงมิติ (dimension) ของสีที่ตรงกันข้าม โดยค่า L แสดงถึงความสว่าง ส่วนค่า a และ b จะอยู่ในรูปคู่อันดับ แสดงถึงโทนสีตามระดับของค่า L ดังภาพที่ 11



ภาพที่ 11 คู่อันดับของค่า a และ b ที่แสดงถึงโทนสีต่างๆ ตามระดับของค่า L

ค่า L จะมีค่าอยู่ระหว่าง 0-100 โดยค่า L เท่ากับ 0 คือสีดำ และค่า L เท่ากับ 100 คือสีขาว จากภาพที่ 11 จะเห็นว่า ค่า a และ b จะมีทั้งค่าที่เป็นบวกและลบ สำหรับค่า a จะแสดงถึงช่วงสีระหว่างสีแดง-ม่วงถึงสีน้ำเงิน-เขียว ค่า a ที่เป็นลบแสดงถึงช่วงของสีน้ำเงิน-เขียวและค่า a ที่เป็นบวกแสดงถึงช่วงของสีแดง-ม่วง ส่วนค่า b แสดงถึงช่วงสีระหว่างสีน้ำเงินถึงสีเขียว โดยค่า b ที่เป็นลบแสดงถึงช่วงของสีน้ำเงินและค่า b ที่เป็นบวกแสดงถึงช่วงของสีเขียว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ระบบสี L*a*b* เป็นระบบที่ออกแบบมาเพื่อให้เข้ากับลักษณะการมองเห็นสีต่างๆ ของมนุษย์ ซึ่งต่างจากระบบสีแบบอื่นเช่น RGB และ CMYK ที่ออกแบบตามหลักการของสีในทางฟิสิกส์ซึ่งมาจากการวิเคราะห์ของคอมพิวเตอร์ ดังนั้น ระบบสี L*a*b* จึงเป็นระบบสีที่เหมาะสมที่สุดสำหรับเลือกใช้ในการศึกษานี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved