บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

2.1 สารอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (free radical) คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนไม่ครบคู่ (single or unpaired electrons) ในภาวะปกติอะตอมจะเสถียรเมื่อมีอิเล็กตรอนครบคู่ ดังนั้นการที่อะตอมมีอิเล็กตรอนไม่ครบคู่ จะทำให้โมเลกุลนั้นมีความไม่คงตัว มีฤทธิ์ว่องไวขึ้น และจะพยายามหาอิเล็กตรอนอีกตัวหนึ่งมาเป็นคู่ โดยการแย่งอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาไว้บนตัวมัน ซึ่งจะเรียกปฏิกิริยานี้ว่า ออกซิเดชัน อนุมูลอิสระที่เกิดจากการสลายพันธะโควาเลนท์ จะส่งผลให้อิเล็กตรอนถูกดึงแยกออกจากกัน ซึ่งการแตกพันธะมี 2 แบบ คือ Homolytic และ Heterolytic fission (Halliwell and Gutteridge, 1999)

1. การแตกพันธะแบบเสมอภาค (Homolytic cleavage)

เป็นการแตกพันธะโดยคู่อิเล็กตรอนของพันธะแยกออกจากกันไปอยู่ที่อะตอมข้างละ 1 ตัว เมื่อมีการแตก เรียกแต่ละข้างที่แตกออกไปนี้ว่าแรดิคัล (radical) หรืออนุมูลอิสระ (free radical) ซึ่งมีสมบัติเป็นกลาง ไม่มีประจุ เรียกปฏิกิริยาที่มีการแตกพันธะแบบนี้ว่าเป็นปฏิกิริยาแบบแรดิคัล (radical reaction)

$$A : B \rightarrow A^{\bullet} + B^{\bullet} \text{ (homolytic fission)}$$

2. การแตกพันธะแบบไม่เสมอภาค (Heterolytic cleavage)

เป็นการแตกพันธะโดยที่คู่อิเล็กตรอนของพันธะนั้นแยกไปอยู่ที่อะตอมใดอะตอมหนึ่ง ในขณะที่อะตอมอีกข้างหนึ่งจะไม่ได้รับอิเล็กตรอนเลย การแตกพันธะแบบนี้จะทำให้ข้างที่ได้รับอิเล็กตรอนมีประจุลบ (anion) และข้างที่ขาดอิเล็กตรอนมีประจุบวก (cation) เรียกปฏิกิริยาที่มีการแตกพันธะแบบไม่เสมอภาคนี้ว่า ปฏิกิริยาแบบไอออนนิค (Ionic reaction)

$$A : B \rightarrow A^{+} + B^{-} \text{ (heterolytic fission)}$$

ดังนั้นอนุมูลอิสระจึงมีทั้งที่เป็นอนุมูลประจุบวก เรียกว่า อนุมูลแคทไอออน (cation radical) ใช้สัญลักษณ์ ($R^{\bullet+}$) เช่น pyridinyl อนุมูลประจุลบ เรียกว่า อนุมูลแอนไอออน (anion radical) ($R^{\bullet-}$) เช่น alkoxyl ($C_nH_{(2n+1)}O^{\bullet}$), superoxide ($O_2^{\bullet-}$) และ hydroxyl radicals ($OH^{\bullet-}$) เป็นต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

อนุมูลอิสระที่พบในร่างกาย อาจมาจากสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น ก๊าซออกซิเจน และสารเคมี รวมทั้งอนุมูลอิสระที่ร่างกายสร้างขึ้นเองจากกระบวนการเมตะโบลิสม แบบใช้ออกซิเจน ซึ่งอนุมูลอิสระที่พบในร่างกาย เช่น peroxyl radical ($ROO^{\bullet}$), superoxide radical ($O_2^{\bullet-}$), hydroxyl radical ($OH^{\bullet}$) และ hydrogen peroxide (H_2O_2) โดยเรียกสารกลุ่มนี้ว่า reactive oxygen species (ROS) (Cadenas and Packer, 1996) ซึ่งเป็นสารที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ และมีทั้งสารที่เป็นอนุมูลอิสระ และไม่ใช่อนุมูลอิสระ จากการศึกษาพบว่าการเกิด ROS พบได้ในไมโตรคอนเดรีย (Figure 2.1) โดย 1-3 % ของ O_2 จะถูกเปลี่ยนเป็น $O_2^{\bullet-}$ หรืออาจกล่าวได้ว่า คนที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 70 กิโลกรัม ร่างกายจะผลิต $O_2^{\bullet-}$ ประมาณ 2 กิโลกรัม/ปี ซึ่งขึ้นอยู่กับระดับการสลายสารอาหารเพื่อให้ได้พลังงาน และกลไกการกำจัดเชื้อโรค หรือสิ่งแปลกปลอมในร่างกาย

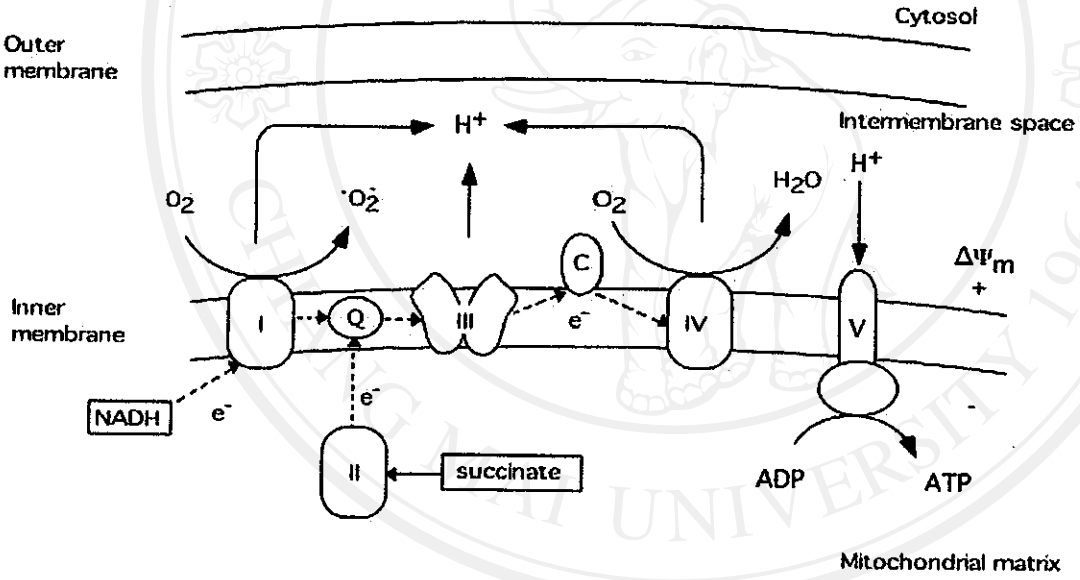


Figure 2.1 Superoxide production in mitochondrial electron transport chain (Kristian and Siesjo, 1998).

นอกจากนี้สารอนุมูลอิสระที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบจะเรียกว่า reactive nitrogen species (RNS) เช่น nitric oxide ($NO^{\bullet}$), nitrogen dioxide ($NO_2^{\bullet}$)และ peroxy nitrite (ONO_2^-) รวมทั้งสารอนุมูลอิสระอื่น ๆ ที่พบได้ในร่างกายของสิ่งมีชีวิต (Table 2.1) (Steven and Salem, 1997) ซึ่งการเกิด RNS จะพบได้ทั้งในเซลล์ คือ สร้างจากไมโตรคอนเดรีย และอนุมูลอิสระนี้ก็จะแพร่กระจายออกไปอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ (Figure 2.2) อนุมูลอิสระที่มีมากขึ้นก็จะไปทำลายเยื่อบุส่วนที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ และโครงสร้างของโปรตีนของเซลล์ข้างเคียง ส่งผลให้เกิด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สภาวะเซลล์เสื่อมสภาพ สูญเสียการทำงาน ทำให้เกิดความผิดปกติ เช่น เซลล์ประสาทบกพร่อง โรคเบาหวาน รวมทั้งโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของเยื่อบุ เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน โรคไขข้ออักเสบ และเกิดความผิดปกติที่ตับ (Hazel, 2006)

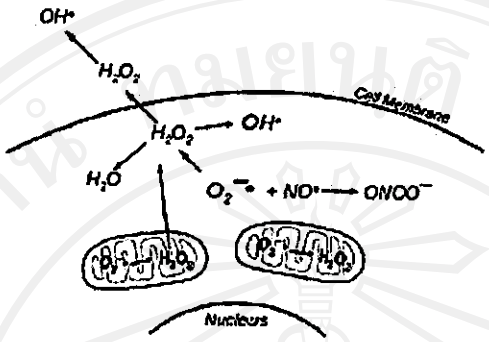


Figure 2.2 Formation of intracellular reactive oxygen and nitrogen species (Hazel, 2006).

Table 2.1 ROS, RNS, and other free radicals in biological systems (Steven and Salem, 1997)

Reactive oxygen species		Reactive nitrogen species		Miscellaneous	
		Free radicals			
Hydroxyl	$HO^{\bullet}$	Nitric oxide (monoxide)	$NO^{\bullet}$	Thiyl	$RS^{\bullet}$
Superoxide	$O_2^{\bullet-}$	Nitrogen dioxide	$NO_2^{\bullet}$	Hydrogen atom	$H^{\bullet}$
Alkoxyl	$LO^{\bullet}$			Carbon-centered radicals	$CCL_3^{\bullet}$
Hydroperoxyl	$HO_2^{\bullet}$				
Peroxyl	$LO_2^{\bullet}$				
		Nonradicals			
Hydrogen peroxide	H_2O_2	Dinitrogen trioxide	N_2O_3	Thiol	RSH
Singlet oxygen	$^1\Delta GO_2$	Dinitrogen tetroxide	N_2O_4		
Lipid peroxide	LO_2H	Dinitrogen pentoxide	N_2O_5		
Ozone	O_3	Peroxynitrite	ONO_2^-		
		Alkyl peroxynitrites	LO_2NO^-		
		Nitrocarbonate	$O_2NOCO_2^-$		
		Nitrosoperoxycarbonate	$ONO_2CO_2^-$		

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 คุณสมบัติของอนุมูลอิสระ

อิเล็กตรอนไม่ครบคู่ในอนุมูลอิสระ มีคุณสมบัติในการดึงดูดสนามแม่เหล็กอย่างอ่อน สามารถตรวจสอบและวิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy แต่อนุมูลอิสระบางส่วนไม่เสถียรที่อุณหภูมิห้อง จึงมีวิธีที่ใช้วัดอนุมูลอิสระที่สลายตัวง่าย คือ การใช้เทคนิค spin trapping โดยวิธีนี้จะใช้สารอินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นสนามแม่เหล็ก หรือเรียกว่า spin trap ทำหน้าที่เป็นตัวจับกับอนุมูลอิสระที่ต้องการทดสอบ เพื่อให้ได้สารที่มีความเสถียรเพิ่มขึ้น และสามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิค EPR (Roberfroid and Calderon, 1995) หรืออาจเรียกวิธีนี้ว่า electron spin resonance (ESR) เป็นวิธีที่นิยมใช้วัดสารอนุมูลอิสระ เช่น hydroxyl radicals ($OH^{\bullet}$), superoxide ($O_2^{\bullet -}$) และ ผลผลิตที่ได้จากการเกิด lipid peroxidation โดยสารที่ใช้จับกับอนุมูลอิสระ ได้แก่ สารในกลุ่ม nitroso, nitrone และอนุพันธ์ของ *N*- oxide อย่างไรก็ตามในร่างกายมีสารที่ทำหน้าที่จับกับอนุมูลอิสระเช่นกัน คือ cellular reducing agent ได้แก่ ไวตามินซี รวมทั้งสารที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวนจะมีความสามารถในการจับกับ $HO^{\bullet -}$ ได้ดีเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน โดยเรียกเทคนิคนี้ว่า aromatic hydroxylation reaction และยังใช้วัด $HO^{\bullet -}$ ในการทดลองแบบ *in vivo* โดยการวัดการเกิดสีที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้ MS/GC เพื่อวัดสารประกอบที่เกิดขึ้น ต่อมามีการใช้ HPLC แบบต่าง ๆ ในการวิเคราะห์สารอนุมูลอิสระจากปฏิกิริยา aromatic hydroxylation เช่น ตรวจสอบด้วยระบบ ultraviolet (UV) absorbance, fluorescence หรือ electrochemical detection (ECD) (Steven and Salem, 1997)

2.3 ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระ

2.3.1 การเกิดอนุมูลอิสระแบบปฏิกิริยาลูกโซ่ (Free radical chain reaction) ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังนี้

1.ขั้นปฐมภูมิ (Roberfroid and Calderon, 1995; Steven and Salem, 1997)

ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระในเซลล์ เกิดจากการสลายพันธะด้วยน้ำ (hydrolysis) แสง (photolysis) รังสี (radiolysis) หรือปฏิกิริยารีดอกซ์ นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์อื่น ๆ อีกหลายชนิดที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระและสารที่มีความไวในการทำปฏิกิริยาสูง เช่น ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide;NO) และ singlet oxygen ($^1O_2$) ซึ่งหมายถึงออกซิเจนในสถานะที่ถูกกระตุ้น (excited state) ดังสมการที่ 1 (Roberfroid and Calderon, 1995)

สมการที่ 1; $RH \rightarrow R^{\bullet}$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Singlet oxygen เมื่อทำปฏิกิริยากับไขมัน (RH) จะทำให้เกิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์ ดังสมการที่ 2 (Steven and Salem, 1997)

สมการที่ 2; $RH + {}^1O_2 \rightarrow ROOH$

นอกจากนี้ไฮโดรเปอร์ออกไซด์ยังเกิดขึ้นได้ในปฏิกิริยาที่มีออกซิเจนในสถานะ ground state ซึ่งเรียกว่า triplet oxygen ($^3O_2$) โดยเอนไซม์ lipoxygenase ดังสมการที่ 3 โดยความแตกต่างของเกิดปฏิกิริยาระหว่างออกซิเจนอิสระ $^1O_2$ และ $^3O_2$ กับกรดไขมัน คือ ออกซิเจนแต่ละตัวจะทำลายตำแหน่งพันธะคู่ที่แตกต่างกัน ดังนั้นสารทั้งสองจึงทำให้เกิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์ได้เช่นเดียวกัน (Table 2.2)

สมการที่ 3; $RH + {}^3O_2 \xrightarrow[\text{lipoxygenase}]{} ROOH$

Table 2.2 Hydroperoxides were formed by singlet and triplet oxygen during oxidation of fatty acids (Min and Boff, 2002)

	Oleate	Linoleate	Linolenate
Singlet Oxygen	9-OOH		
	10-OOH		
Conjugated Hydroperoxides		9-OOH	9-OOH
		13-OOH	12-OOH
			13-OOH
			16-OOH
Nonconjugated Hydroperoxides		10-OOH	10-OOH
		12-OOH	15-OOH
Triplet Oxygen	8-OOH		
	9-OOH		
	10-OOH		
	11-OOH		

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

พันธะ O-O ในโมเลกุลของไฮโดรเปอร์ออกไซด์เป็นพันธะแบบอ่อน จึงถูกสลายได้ง่าย ทำให้เกิดอนุมูลอิสระดังสมการที่ 4-6

สมการที่ 4; $ROOH \leftrightarrow RO^{\bullet} + H^{\bullet}$

สมการที่ 5; $ROOH \leftrightarrow RO^{\bullet} + OH^{\bullet}$

สมการที่ 6; $2ROOH \leftrightarrow RO^{\bullet} + H_2O + ROO^{\bullet}$

ในปฏิกิริยาที่มีโลหะอิออน เช่น เหล็ก ทองแดง โครเมียม และวาเนเดียม (Steven and Salem, 1997) เป็นต้นพบว่าจะเป็นการช่วยเร่งสลายโมเลกุลของไฮโดรเปอร์ออกไซด์ได้อนุมูลอิสระ ดังสมการที่ 7 และ 8

สมการที่ 7; $ROOH + M^{N+} \leftrightarrow RO^{\bullet} + OH^{\bullet} + M^{(N+1)+}$

สมการที่ 8; $ROOH + M^{(N+1)+} \leftrightarrow ROO^{\bullet} + H^{+} + M^{N+}$

โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่พบในเซลล์ทั่วไปจะเกิดปฏิกิริยาระหว่างซุปเปอร์ออกไซด์กับโปรตอน และถูกเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระได้ง่ายเมื่อเป็นอิเล็กตรอนของเหล็ก ดังนั้นสารประกอบอินทรีย์ที่มีเหล็กเป็นองค์ประกอบ สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันขึ้นได้ง่าย ซึ่งเรียกว่า ปฏิกิริยาเฟนตัน (Fenton reaction) (สมการที่ 9) เป็นการสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยเหล็กอิออน (ferrous^{Fe2+}) ได้สารอนุมูลไฮดรอกซิล ซึ่งพบได้มากในกระบวนการ phagocytosis ของเม็ดเลือดขาวที่ทำลายเชื้อแบคทีเรีย แต่สารประกอบที่มี ferric (Fe^{3+}) สามารถทำปฏิกิยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ได้อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์ และทำปฏิกิริยากับอนุมูลออกไซด์ได้ออกซิเจน (Steven and Salem, 1997) (สมการที่ 9-11)

Fenton reaction

สมการที่ 9; $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + 2OH^{\bullet}$

สมการที่ 10; $H_2O_2 + Fe^{3+} \rightarrow O_2^{-} + Fe^{2+}$

สมการที่ 11; $O_2^{-\bullet} + Fe^{3+} \rightarrow O_2 + Fe^{2+}$

นอกจากนี้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เองก็สามารถทำปฏิกิริยากับซุปเปอร์ออกไซด์ได้อนุมูลไฮดรอกซิล อิออน และอนุมูลไฮดรอกซิล เรียกปฏิกิริยานี้ว่า Harber-Weiss reaction (สมการที่ 12)

Haber-Weiss reaction

สมการที่ 12; $H_2O_2 + O_2^{-\bullet} \longrightarrow O_2 + OH^{\bullet} + OH^{-}$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และเหล็กเท่านั้นที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่และอนุมูลอิสระมากมาย อย่างไรก็ตาม Fe^{2+} สร้างได้จาก Fe^{3+} โดยสารต้านอนุมูอิสระที่พบได้ในเซลล์ เช่น ไวตามินซี (Steven and Salem, 1997)

2. ขั้นทุติยภูมิ (Steven and Salem, 1997)

ปฏิกิริยาเกิดขึ้น 2 แบบ คือ การดึงไฮโดรเจนจากโมเลกุลข้างเคียง และการทำปฏิกิริยากับออกซิเจนที่อยู่ในสภาวะ ground state ดังสมการที่ 13-15

สมการที่ 13; $RH + R^{I\bullet} \rightarrow R^{\bullet} + R^{I}H$

สมการที่ 14; $R^{\bullet} + {}^{3}O_2 \rightarrow ROO^{\bullet}$ (lipid peroyl radical)

สมการที่ 15; $ROO^{\bullet} + RH \rightarrow ROOH$ (lipid hydroperoxide) $+ R^{\bullet}$

3. ขั้นตติยภูมิ (Steven and Salem, 1997)

เป็นขั้นตอนที่รวม 2 อนุมูลอิสระ ให้ได้เป็นสารที่มีความเสถียร มีโมเลกุลที่ซับซ้อนขนาดใหญ่ขึ้น (complex compound) และสิ้นสุดปฏิกิริยาลูกโซ่ ดังสมการที่ 16 และ 17

สมการที่ 16; $2ROO^{\bullet} \rightarrow ROOR$ (cyclic peroxide) $+ O_2$

สมการที่ 17; $ROO^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow ROOR$

2.3.2 ผลกระทบทางชีวภาพของอนุมูลอิสระ

ในกระบวนการเมตะโบลิสมของร่างกายจะมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นส่งผลทำให้เกิดโรคต่าง ๆ ซึ่งสารที่เป็นตัวบ่งชี้ว่าเกิดการออกซิเดชันสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ ในร่างกายมีหลายชนิดขึ้นอยู่กับสารตั้งต้นที่ถูกทำปฏิกิริยา (Figure 2.3) (Packer *et al.*, 1999)

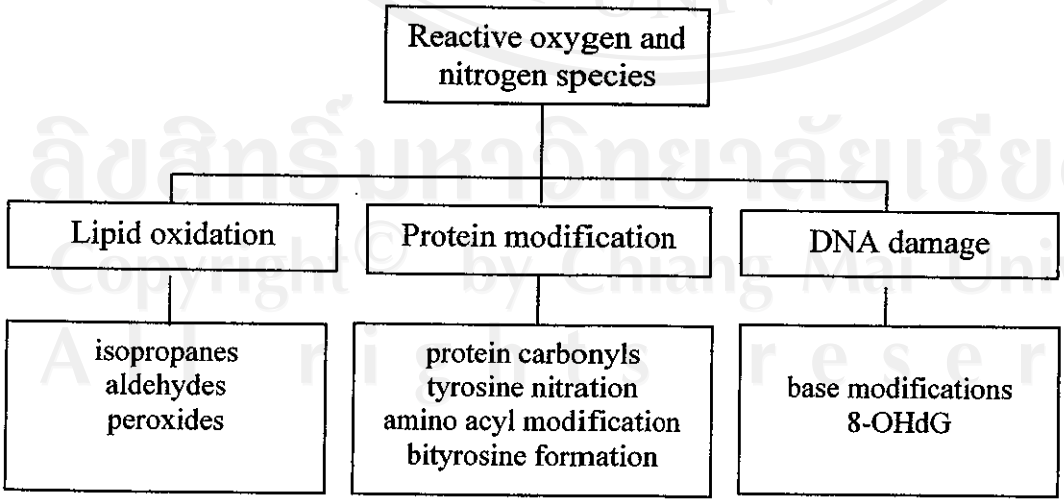
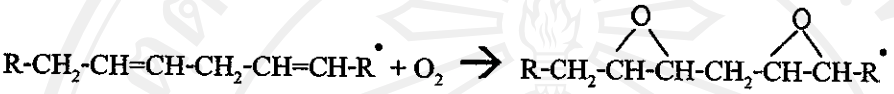


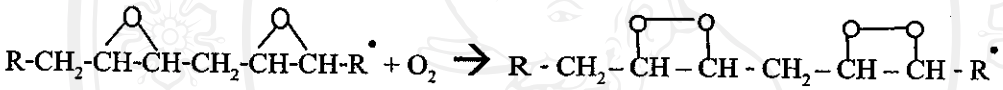
Figure 2.3 Biomarkers of oxidative damage (Packer *et al.*, 1999).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

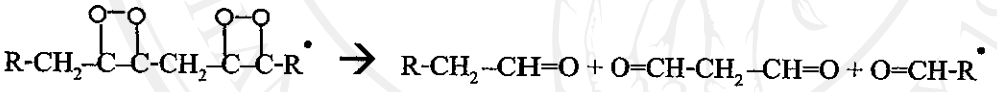
อย่างไรก็ตามร่างกายมีกลไกควบคุมการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวไม่ให้เกิดภาวะเป็นพิษได้ ทั้งนี้ อนุมูลอิสระจะเพิ่มขึ้นได้ก็ต่อเมื่อเกิดปฏิกิริยาดังกล่าว ซึ่งการเกิดอนุมูลอิสระอาจเกิดจากสารตัวกลางของการเมตะโบลิสมสารจำพวกไขมันกับเอนไซม์ lipid peroxidase โดยเฉพาะโมเลกุลของกรดไขมันไม่อิ่มตัวหรือฟอสโฟลิปิด พบได้ทั่วไปในเยื่อหุ้มเซลล์ การเกิดปฏิกิริยามีหลายขั้นตอน สารตัวสุดท้ายที่เกิดขึ้นคือ malondialdehyde ซึ่งทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของโมเลกุลของโปรตีนและกรดนิวคลีอิก โดยการเกิดปฏิกิริยามีขั้นตอนดังนี้ การออกซิเดชันของกรดไขมัน ทำให้เกิด epoxide โดยอิเล็กตรอนเข้าจับที่พันธะคู่ (Packer *et al.*, 1999)



1. การเกิดออกซิเดชันซ้ำอีก ทำให้เกิดเปอร์ออกไซด์ (peroxide)



2. การเกิดอัลดีไฮด์ (dialdehyde)



Malondialdehyde

3. การเชื่อมโมเลกุลของโปรตีน หรือกรดนิวคลีอิกด้วย malondialdehyde (MDA)

2.4 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

สารที่ทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระจะเรียกว่า สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) หรืออาจเรียกว่า free radical scavenger หมายถึง สารที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ ทำให้อนุมูลอิสระกลายเป็นสารที่ไม่มีพิษต่อร่างกายในที่สุด (Packer *et al.*, 1999)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4.1 ชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระ แบ่งได้เป็น 2 แบบ ดังนี้

2.4.1.1 สารต้านอนุมูลอิสระที่พบภายในเซลล์ (Intracellular antioxidant) ได้แก่ สารในกลุ่มเอนไซม์ เช่น catalase, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GSR) และ glutathione s-transferase (GST) โดยเอนไซม์เหล่านี้จะทำงานร่วมกันกับสารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากภายนอกร่างกาย และสารต้านอนุมูลอิสระที่พบได้ภายในร่างกาย ได้แก่ histones, lipoic acid, ceruloplasmin, transferin, hemopexin, กรดยูริค, บิลิรูบิน และสารในกลุ่ม thiol protein โดยเฉพาะสารกลูตาไธโอน จะทำหน้าที่สำคัญร่วมกับไวตามินอี และซีในการป้องกันเซลล์จากสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น

2.4.1.2 สารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากภายนอกเซลล์ (Extracellular antioxidant) เป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กกว่าสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย เช่น ไวตามินซี ไวตามินอี (α-tocopherol) แคโรทีนอยด์ และ สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Packer *et al.*, 1999) เช่น แอนโธไซยานิน (Sarma and Sharma, 1999 ; Ling *et al.*, 2001 ; Wang *et al.*, 1997) รวมทั้งแกมมาโอไรซานอล (Huang, 2003 ; Xu *et al.*, 2001)

สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในเยื่อหุ้มเซลล์ ได้แก่ ไวตามินอี เบต้าแคโรทีน ubiquinine (coenzyme Q) ส่วนสารที่พบในระบบหมุนเวียนเลือดที่ได้จากอาหาร ได้แก่ ไวตามินอี แคโรทีนอยด์ แอสคอร์เบทอิออน โพลีฟีนอล ฟลาโวนอยด์ glucosinolates โปรไซยานิดิน และ สารที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระอย่างอ่อน ได้แก่ albumin, transferrin และ lactoferrin นอกจากนี้สารต้านอนุมูลอิสระที่สังเคราะห์ขึ้นได้แก่ butyrated hydroxytoluene (BHT) และ butyrated hydroxyanisole (BHA)

2.4.2 กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ แบ่งตามขั้นตอนได้ 3 กลุ่ม ดังนี้

2.4.1.1 สารต้านอนุมูลอิสระขั้นปฐมภูมิ

ทำหน้าที่ป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ และเปลี่ยนอนุมูลอิสระที่มีอยู่ให้กลายเป็นโมเลกุลที่ไม่มีอันตราย ก่อนที่มันจะไปทำลายเซลล์ หรือทำปฏิกิริยากับสารโมเลกุลอื่น สารในกลุ่มนี้ได้แก่ เอนไซม์ที่ทำหน้าที่เป็นตัวกำจัดอนุมูลอิสระ (enzymic antioxidant) โดยเฉพาะไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ออกซิเจน หรืออนุพันธ์ของออกซิเจน (Packer *et al.*, 1999)

1. Superoxide dismutase (SOD) ทำหน้าที่เปลี่ยนอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\bullet}$) ไปเป็น hydrogen peroxide (H_2O_2)

$$O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \xrightarrow{\text{(Cu/Zn, superoxiide dismutase)}} H_2O_2 + O_2$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. Catalase ทำหน้าที่เปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ให้เป็นน้ำและออกซิเจนที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{(Fe, catalase)}} H_2O + O_2$$

3. Glutathione peroxidase (GPx) ทำหน้าที่เปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และลิปิดเปอร์ออกไซด์ ไปเป็นโมเลกุลที่ไม่เป็นอันตราย โดยมีซีลิเนียม (Se) เป็นโคแฟคเตอร์ โดยปฏิกิริยาจะเกิดที่พลาสมาของเลือด

$$H_2O_2 + 2G\text{-}SH \xrightarrow{\text{(Se, glutathione peroxidase)}} H_2O + GSSG$$

$$G\text{-}SH + ROO^{\bullet} \longrightarrow GSSG + ROH$$

$$GSSG + NADPH + H^{+} \longrightarrow 2G\text{-}SH + NADP^{+}$$

โดยการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายสร้างขึ้น ที่พบได้ในส่วนต่าง ๆ ทั้งภายนอกและภายในเซลล์สามารถแสดงได้ดังภาพ (Figure 2.4)

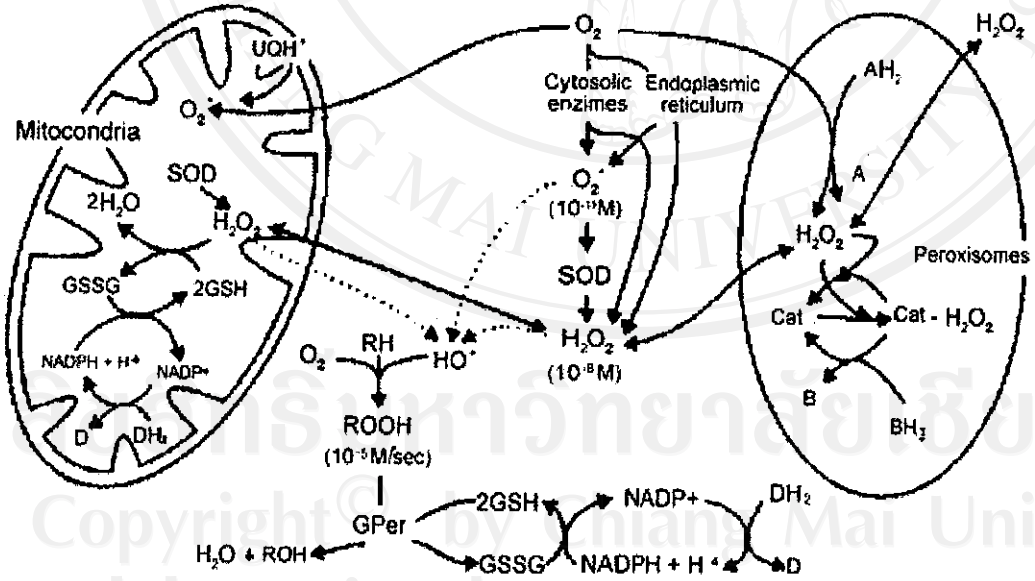


Figure 2.4 Scheme of cellular hydroperoxide metabolism indicating the subcellular sources of the intermediates of the partial reduction of oxygen and the corresponding detoxification pathways (Valdez *et al.*, 2000).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. สารในกลุ่มคีเลต (chelating agent) ทำหน้าที่จับกับไอออนของโลหะ เช่น เหล็ก และทองแดง สารในกลุ่มนี้ได้แก่ กรดซิตริค ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA) กรดอะมิโน และ protein เช่น ferritin ส่วน ceruloplasmin ทำหน้าที่จับกับ ferric ion (Fe^{3+}) เพื่อไม่ให้เกิดอนุมูลไฮดรอกซิล ($OH^{\bullet}$) ป้องกันการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน และทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่เสถียร

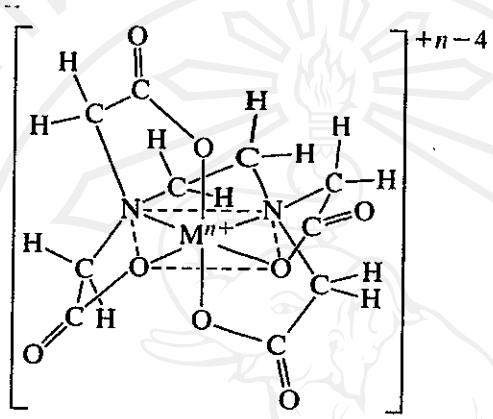


Figure 2.5 Structure of metal-EDTA complex (Petrucci *et al.*, 2002).

2.4.2.2 สารต้านอนุมูลอิสระขั้นทุติยภูมิ

ทำหน้าที่จับกับอนุมูลอิสระเพื่อป้องกันปฏิกิริยาลูกโซ่ คือเกิดการแย่งอิเล็กตรอนของสารโมเลกุลอื่นถ่ายทอดกันเป็นลูกโซ่ ทำให้มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นไม่สิ้นสุด สารที่ทำหน้าที่ในกลุ่มนี้ได้แก่ ไวตามินอี ไวตามินซี เบต้า-แคโรทีน กรดยูริค อัลบูมิน บิลิรูบิน และ สารที่ทำหน้าที่สลายโมเลกุลของ lipid hydroperoxide ทำให้เป็นสารที่มีความเสถียร นอกจากนี้ยังพบว่าไวตามินซี หรือ isoascorbic acid และ sodium erythorbate เป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็น oxygen scavenger คือสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับออกซิเจน จึงเป็นตัวช่วยกำจัดออกซิเจนในระบบปิดได้ โดยการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายสร้างขึ้นกับสารที่ได้จากอาหารจะออกฤทธิ์ที่ตรงส่วนต่างๆ ภายในเซลล์สามารถแสดงได้นี้ (Figure 2.6) (Packer *et al.*, 1999)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

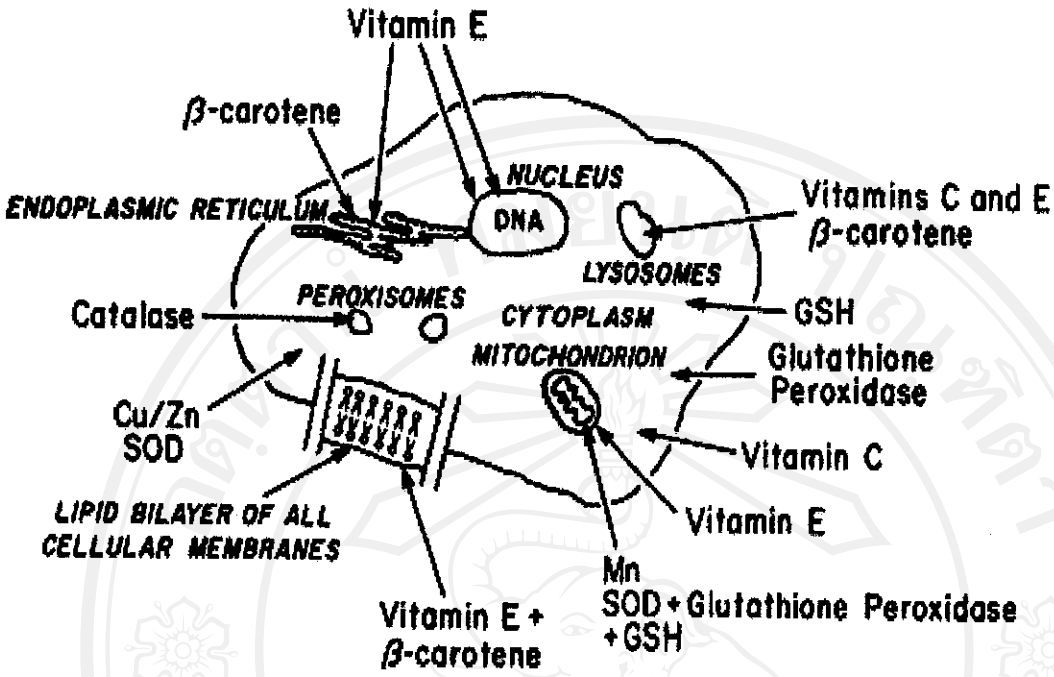


Figure 2.6 Antioxidant protection within the cell (Machlin and Bendich, 1987).

2.4.2.3 สารต้านอนุมูลอิสระขั้นตติยภูมิ

ทำหน้าที่ซ่อมแซมสารชีวโมเลกุลที่ถูกทำลายโดยอนุมูลอิสระ เช่น DNA-repaired enzymes และ methioneine sulphoxide reductase เป็นต้น (Packer *et al.*, 1999)

2.5 การวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ

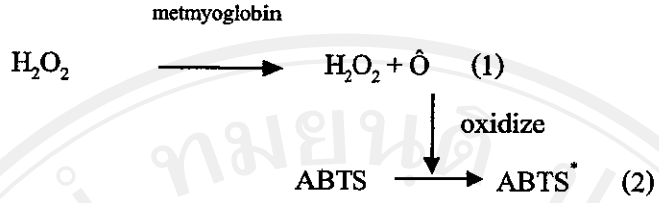
การตรวจวัดฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระในปัจจุบันทำได้หลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธีมีความแตกต่างกัน เพราะสารที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาออกซิเดชันมีหลากหลาย ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์จึงซับซ้อนต่างกัน (Table 2.3) โดยการวัดสารต้านอนุมูลอิสระมีดังนี้

2.5.1 การวัดค่า total antioxidant capacity

เป็นการวัดการเกิดออกซิเดชันของสารที่ทำให้เกิดสี ซึ่งนิยมใช้ 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) โดยตามวิธีของ Miller *et al.* (1993) ในปฏิกิริยาจะอาศัยเอนไซม์ peroxidase จาก metmyoglobin เป็นตัวเร่งการเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ให้เป็นน้ำ และสาร active oxygen (Ô) ที่จะไปออกซิไดซ์ ABTS ให้เป็น $ABTS^{\bullet+}$ ซึ่งเป็นสารที่มีสีเขียวอมฟ้า (สมการที่ 1-2) จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร ดังนั้นถ้าสารที่นำมา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทดสอบมีฤทธิ์การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระก็จะไปยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของ ABTS ทำให้การเกิดสีช้าลง (ทิวาพร, 2542) โดยจะวัดเปรียบเทียบกับต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน เช่น trolox



ดังนั้นจึงเรียกการวัดแบบนี้ว่า ABTS method หรือ ferryl myoglobin/ABTS assay ต่อมา Re *et al.* (1998) พัฒนาการวัดที่ใช้ ABTS ให้สามารถวัดสารต้านอนุมูลอิสระที่ชอบน้ำ และไม่ชอบน้ำ รวมทั้งสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ แคโรทีนอยด์ และ สารต้านอนุมูลอิสระในพลาสมา หลักการคือ นำ ABTS มาออกซิไดซ์ด้วย $K_2S_2O_8$ เพื่อให้อยู่ในรูป $ABTS^{\cdot+}$ ซึ่งเป็นสารที่มีสี จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการทดสอบ และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร ซึ่งจากคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ จะทำหน้าที่เป็นตัวให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ ส่งผลให้สีที่เกิดในปฏิกิริยาจางลง ดังนั้นจึงเรียกการวัดแบบนี้ว่า decolorization assay มีข้อดีคือปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องและไม่ต้องอาศัยสารตัวกลาง ($\hat{O}$) เหมือนวิธีแรก และการเตรียม metmyoglobin ค่อนข้างซับซ้อน และเอนไซม์ที่ได้อาจไม่คงตัวในการทดสอบแต่ละครั้ง

2.5.2 การวัดอนุมูลเปอร์ออกไซด์

หลักการ ของวิธี Total (peroxyl) radical-trapping antioxidant potential (TRAP) จะใช้ oxygen electrode วัดออกซิเจนที่เหลือจากการเกิดออกซิไดซ์กรดไขมัน ลิโนเลอิก ซึ่งถ้าสารตัวอย่างมีสารต้านอนุมูลอิสระมาก ก็จะไปจับกับอนุมูล peroxyl ที่ได้จากการสลายตัวของ 2,2'-Azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride (ABAP) ที่ทำหน้าที่เป็นอนุมูลอิสระ ส่งผลให้ยับยั้งการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของกรดไขมัน และปริมาณของออกซิเจนที่เหลืออยู่ (Metsä *et al.*,1991)

2.5.3 การวัดค่า Enhanced chemiluminescence (ECL)

หลักการ ใช้แอนติบอดีที่เชื่อมกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่จะย่อยสาร luminol ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่ทำให้เกิดสารเรืองแสงออกมาในรูปโฟตอน โดยมี Enhancer เป็นตัวช่วย ถ้าสารตัวอย่างมีสารต้านอนุมูลอิสระมาก หมายถึง การมีแอนติเจนมาก จะทำให้แอนติบอดีมาจับได้มาก ทำให้เหลือเอนไซม์ไปย่อย luminal ได้น้อยลง การเรืองแสงจะเกิดน้อยกว่าตัวอย่างที่มีสารต้านอนุมูลอิสระสูง ๆ (Whitehead *et al.*, 1992)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.5.4 การวัดปริมาณกลูตาไธโอนในเม็ดเลือดแดง

คุณสมบัติและโครงสร้างทางเคมีของกลูตาไธโอน

กลูตาไธโอนเป็นไตรเปปไทด์ที่มีหมู่ซัลเฟอร์ (sulfur) เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในการเป็น reducing agent ประกอบด้วยกรดอะมิโน 3 ชนิดคือ cysteine, glutamic acid และ glycine เป็นสารประเภท non-protein thiol ที่สำคัญพบได้ในเซลล์สัตว์และเซลล์พืช และแบคทีเรีย กลูตาไธโอนจัดเป็น primary antioxidant ตำแหน่งที่สำคัญในการทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์สารตัวอื่น คือ ส่วนที่เป็นหมู่ thiol (-SH) ของ cysteine โดยกลูตาไธโอนที่พบอยู่ในเซลล์สัตว์ส่วนใหญ่อยู่ในรูป reduce form (GSH) 95% และปริมาณอีกร้อยละ 5 จะอยู่ในรูป oxidized form (GSSG) และรูป mixed disulphide (Figure 2.7)(Packer *et al.*, 1999)

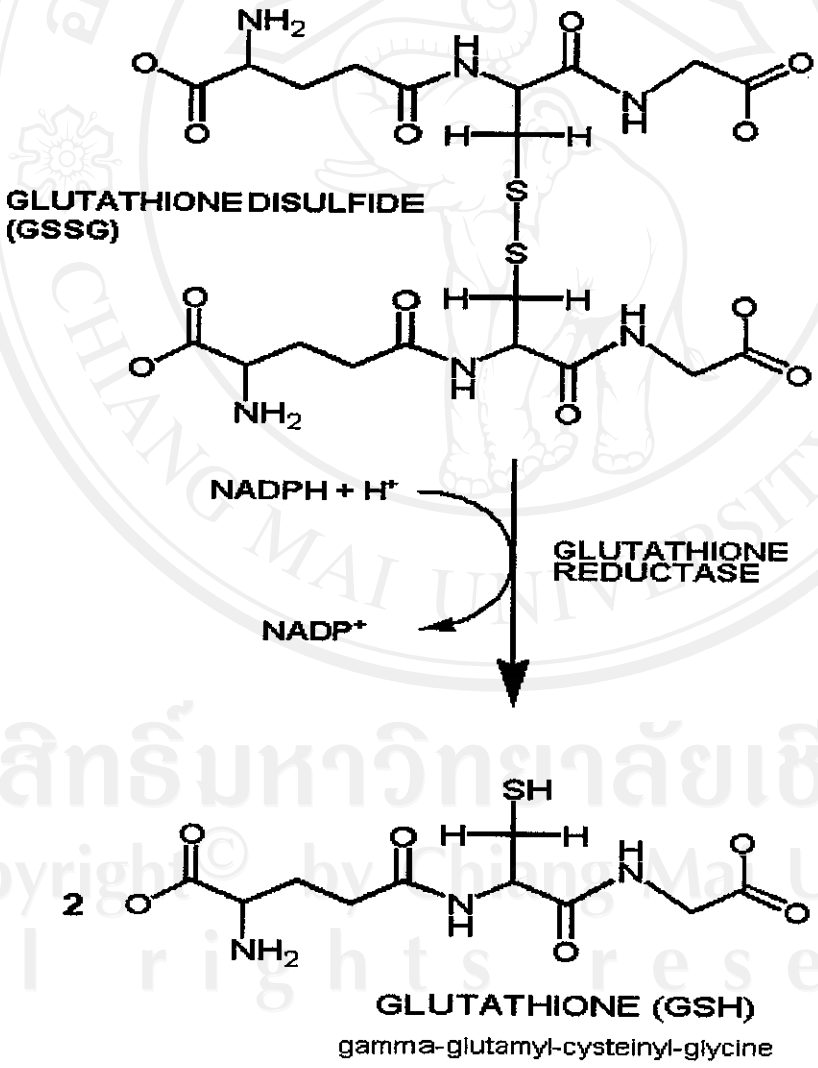


Figure 2.7 Reduction of GSSG to two moles of GSH (King and Sergio, 2003).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หน้าที่สำคัญของกลูตาไธโอน คือ เปลี่ยนอนุมูลอิสระ ให้กลายเป็นโมเลกุลที่ไม่เป็นอันตรายก่อนที่อนุมูลอิสระจะทำปฏิกิริยากับสารอื่น อีกทั้งทำหน้าที่เป็นปัจจัยร่วม (cofactor) และสารสำคัญที่ช่วยในการคงตัว ของเซลล์เม็ดเลือดแดง ช่วยรักษาสภาพของฮีโมโกลบิน (hemoglobin) ซึ่งมีเหล็ก (ferrous ion) เป็นแกนกลางของโมเลกุล ป้องกันการเกิดออกซิเดชันของหมู่ซัลฟ์ไฮดริล (sulfhydryl; -SH) ในฮีโมโกลบิน รักษาสภาพ reduce ของกรดอะมิโน cysteine ในฮีโมโกลบิน และในโปรตีนของเซลล์เม็ดเลือดแดง ซึ่งช่วยไม่ให้ผนังเม็ดเลือดแดงเสื่อมสภาพ หรือแตกง่าย และช่วยในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ organic peroxide ซึ่งเป็นสารพิษต่อเม็ดเลือดแดง นอกจากนี้ยังทำหน้าที่ร่วมกับกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสในการลดภาวะ oxidative stress ที่เกิดจากการขนส่งออกซิเจนของฮีโมโกลบิน และอนุมูลอิสระต่างๆ ที่เกิดขึ้นได้ง่ายภายในเซลล์เม็ดเลือดแดง (King and Sergio, 2003) โดยในการตรวจวัดจะใช้ DTNB [5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)] เป็นสารที่เกิดสีได้เมื่อทำปฏิกิริยากับกลูตาไธโอน โดยในการทดลองจะวัดปริมาณของโปรตีนที่มีหมู่ thiol group ด้วยเครื่องเสปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร (Boyne and Ellman, 1972) โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแสดงได้ดังนี้

$$2\,GSH + 2\,DTNB \longrightarrow GSSG + 2\,TNB^{*-} + 2H$$

yellow

2.5.5 การวัดค่า Malondialdehyde (MDA) ด้วยวิธี Thiobarbituric acid assay (TBA)

หลักการ ถ้าภายในร่างกายมีสารอนุมูลอิสระสูงจะเกิดการออกซิไดซ์กรดไขมันสายยาวที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ได้เป็น Malondialdehyde (MDA) (Figure 2.8) หลังจากที่เก็บเลือดมาปั่นแยกพลาสมาและหยุดปฏิกิริยาด้วย Trichloroacetic acid (TCA) (Packer *et al.*, 1999) จากนั้นให้ทำปฏิกิริยากับ Thiobarbituric acid (TBA) ที่ 100 °C นาน 15 นาที สารที่ได้เป็นสีชมพู นำไปวัดปริมาณ MDA-TBA ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องเสปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ถ้ามีสารต้านอนุมูลอิสระมาก ปริมาณสารที่ทำปฏิกิริยากันก็จะเกิดขึ้นน้อยลง

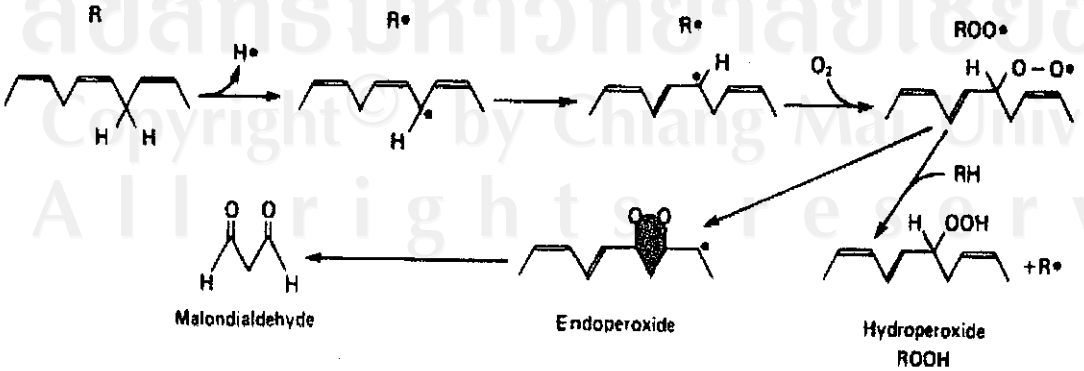


Figure 2.8 Oxidation chain mechanism of polyunsaturated fatty acid by free radical (Packer *et al.*, 1999).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.5.6 การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ ด้วยเทคนิค Thiocyanate method

ทำการบ่มสารตัวอย่างที่คาดว่าจะมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ กับ linoleic acid ที่อุณหภูมิ 40 °C ในที่มืด จากนั้นทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วย Ammonium thiocyanate (NH_4SCN) และ Ferrous chloride นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร

Table 2.3 Antioxidant capacity measurement (พรทิพย์, 2549)

Author	Radical generator	Radical detector	Measuring time
Emanuel *et al.*, 1961	Methyl oleate + O_2	Peroxide	12-16 h
Stocks *et al* ., 1974	Brain homogenate + O_2	O_2 consumption	1 h
Frank *et al* ., 1982	Oil + O_2	Electr. Conductivity	1-3 h
Wayner *et al* ., 1985	ABAP	O_2 consumption	30 -60 min
Popov *et al.*, 1985	Luminol + UV-A	Chemiluminescence	1-3 min
Niki *et al.*, 1985	ABAP	O_2 consumption	30-60 min
Klebanov *et al.*, 1988	Egg yolk + Fe^{2+}	Chemiluminescence	10-20 min
Miller *et al.*, 1993	ABTS + peroxidase +	VIS	5 min
TEAC-Test	H_2O_2	spectrophotometry	
Cao *et al.*, 1995	AAPH	Fluorescence, R/β-	70min/sample
ORAC-Test		phycoerythrin	(12 parallel)
Nakano *et al.*, 1994	Meth-Hb	Luminescence, O_2	20-40 min
Ghiselli *et al.*, 1995	ABAP	Fluorescence, R/β-	20-40 min
TRAP-Test		phycoerythrin	
Saramet *et al.*, 1996	Luminol + H_2O_2	Chemiluminescence	10-20 min

ABAP: 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropane)

ABTS: 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6 sulforic acid)

AAPH: 2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride

Both ABAP and AAPH are the same kind substants.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.6 สารต้านอนุมูลอิสระที่พบได้ในธรรมชาติ

สารในกลุ่มนี้จัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากภายนอกร่างกาย ส่วนใหญ่พบได้ในอาหารที่มาจากพืชผัก ผลไม้และธัญพืชต่าง ๆ เช่น สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ หรือสารเสตียรอยด์ในพืช (phytosterol) รวมทั้งไวตามิน อี และ ซี โดยการทำหน้าที่ของสารต้านอนุมูลอิสระแต่ละตัวภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิต จะแตกต่างกันตามคุณสมบัติของสาร เช่นสารที่ชอบน้ำ (hydrophilic) ได้แก่ ไวตามิน ซี และสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ส่วนสารที่ไม่ชอบน้ำหรือสารที่ละลายได้ในไขมัน (lipophilic) ได้แก่ ไวตามิน อี และแกมมาโอไรซานอล แต่อย่างไรก็ตามสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้จะทำงานร่วมกัน ตั้งแต่การป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันแบบลูกโซ่ จนถึงการซ่อมแซมสารชีวโมเลกุลต่างที่ถูกอนุมูลอิสระทำลาย เช่น ไขมันที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ โปรตีน และ DNA (Table 2.4-2.5)

Table 2.4 Defense system *in vivo* against oxidative damage (Pokorny *et al.*, 2001) (continued)

1. Preventive antioxidants: suppress the formation of free radicals.	
a. Non-radical decomposition of hydroperoxide:	
Catalase	Decomposition of hydrogen peroxide $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$
Glutathione peroxidase (cellular)	Decomposition of hydrogen peroxide and free fatty acid hydroperoxides $H_2O_2 + 2GSH \rightarrow 2\,H_2O + GSSG$ $LOOH + 2GSH \rightarrow LOH + H_2O + GSSG$
Glutathione peroxidase (plasma)	Decomposition of hydrogen peroxide and phospholipids hydroperoxides $PLOOH + 2GSH \rightarrow PLOH + H_2O + GSSG$
Phospholipid hydroperoxide Glutathione peroxidase	Decomposition of phospholipid hydroperoxides
Peroxidase	Decomposition of hydrogen peroxide and lipid hydroperoxides $LOOH + AH_2 \rightarrow LOH + H_2O + A$ $H_2O_2 + AH_2 \rightarrow 2H_2O + A$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Table 2.5 Defense system *in vivo* against oxidative damage

Glutthione-S-transferase	Decomposition of lipid hydroperoxides
b. Sequestration of metal by chelation:	
Transferrin, lactoferrin	Sequestration of iron
Heptoglobin	Sequestration of haemoglobin
Haemopexin	Sequestration of haem
Ceruloplasmin, albumin	Sequestration of copper
c. Quenching of active oxygens:	
Superoxide dismutase (SOD)	Disproportionation of superoxide $2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
Carotenoid, vitamin E	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, flavonoids

3. Repair and *de novo* enzymes: repair the damage and reconstitute membranes lipase, protease, DNA repair enzymes, transferase.

4. Adaptation: generate appropriate antioxidant enzymes and transfer them to the correct site at the correct time and in the correct concentration.

อย่างไรก็ตามแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่ควรให้ความสนใจในเมืองไทย ควรจะเป็นข้าว เพราะมีการบริโภคเป็นอาหารหลัก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.7 สารต้านอนุมูลอิสระในข้าว

ข้าวมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Oryza sativa* L. เมล็ดข้าวมีองค์ประกอบของ แป้งอยู่ในส่วนของ endosperm และมีส่วนของรำ (rice bran) เป็นเนื้อเยื่อที่ห่อหุ้มส่วนที่เป็น endosperm ไว้ (Figure 2.9) ซึ่งรำจะมีความหนาบางต่างกันไปขึ้นกับพันธุ์ข้าวแต่ละพันธุ์ ส่วนของจมูกข้าว (endosperm) จะอยู่ที่ปลายเมล็ดข้าวด้านที่ติดกับก้านเป็นจุดเริ่มของการงอกเป็นต้นข้าว ซึ่งในรำและจมูกข้าวประกอบไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระจำนวนมาก กว่า 100 ตัว ที่จำแนกออกเป็นหลายกลุ่ม โดยในตารางจะระบุปริมาณความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระบางตัวที่พบได้ในเมล็ดข้าว (Table 2.6) ซึ่งแกมมาออไรซานอลเป็นสารต้านอนุมูลอิสระตัวหนึ่งที่มีปริมาณมาก และยังช่วยในเรื่องของการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน จึงเป็นสารที่น่าสนใจที่จะนำมาศึกษา

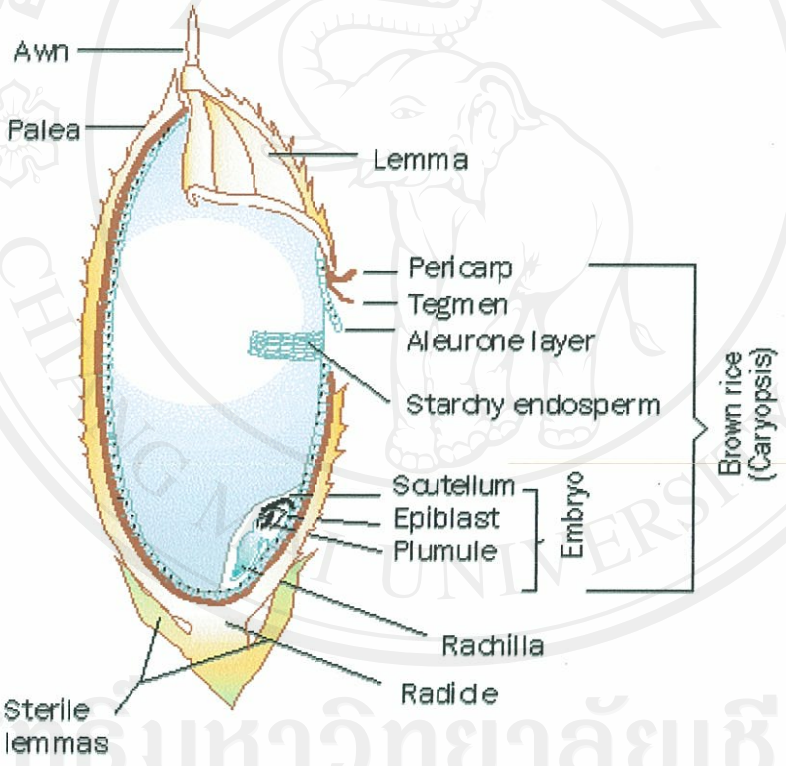


Figure 2.9 Structure of rice grain (อ้างโดย สมวงษ์, 2547).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Table 2.6 Antioxidant in rice bran (สมวงษ์, 2547).

A.	B.	C.	D.
<u>γ-Oryzanol</u>: (2206-3000 ppm) Cycloartenyl Ferulate 24-Methylene Cycloartanyl Ferulate Campesteryl Ferulate B-Sitosteryl Ferulate Stigmasteryl Ferulate	Tocopherols & Tocotrienols: (220-320 ppm) a -Tocopherol B - Tocopherol y - Tocopherol 8 - Tocopherol a- Tocotrienol B - Tocotrienol y - Tocotrienol 8 - Tocotrienol Tocotrienols (Artifacts	Phytotsterols: (2230-4400ppm) 4-Demethysterols, 4-Methyl Sterol & Brassino Steroids B -Sitosterol Campesterol Stigmasterol ^5 Avinsterol ^7 Stigmasterol Gramisterol Isofucosterol B - Amyrin Citrostadienol Obtusifoliol Branosterol 28 - Homotyphasterol 28 - Homosteasteronic Acid 6 - Deoxycastasterone	Amino Acids: (ppm) Tryptophan (2100) Histidine (3800) Metheonine (2500) Cystine (336-448) Cysteine (3200) Arginine (10800
E.	F.	G.	H.
Polyphenols: a –Lipoic Acid Ferulic Acid Methyl Ferulate p-Coumaric Acid p-Sinapic Acid	Flavones and Proanthocyanidins: Iso Vitexin Flavone Glycosides Olegomeric Proanthocyanidins	Other Antioxidants: (ppm) Inositol / Myo Inositol (1200-1880) Phytic Acid / Phytates (1500-1710) Biotin (0.1-0.22) Choline (930-1150)	Carotenoids: (0.9-1.6 ppm) a- carotene B- carotene Lycopene Lutein Zeaxanthine
I.	J.	K.	L.
Enzymes: Glutathione Peroxidase Methionine Reductase Super Oxide Dismudase Polyphenol Oxidase Aspartate Amino Trasferase Isoenzymes AAT-1 AAT-2 Coenzyme Q10	B-Complex Vitamins: (ppm) Thiamine (22-31) Riboflavin (2.2-3.5) Niacin (370-660) Pantathenic Acid (36-50) Pyridoxine (29-42)	Polysaccharides: Cycloartenol Ferulic Acid Glycoside Diferulic Acid Complex Diferulic Acid+3 Glucose+2 Calcium ions complex	Metal Chelators: (ppm) Magnesium (6250-8440) Calcium (303-500) Phosperous (14700-17000)
M.			
Phospholipids: Phosphatidyl Choline Phosphatidyl Ethanolamine Lysolecithin			

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากการศึกษาพบว่าแกมมาโอไรซานอลมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้มีประสิทธิภาพสูงกว่าไวตามินอี ดังนั้นจึงมีงานวิจัยถึงผลของแกมมาโอไรซานอลออกมามากขึ้น

2.7.1 แกมมาโอไรซานอล

คุณสมบัติของแกมมาโอไรซานอล (gamma oryzanol)

แกมมาโอไรซานอล เป็นส่วนของสาร unsponifiable ซึ่งพบอยู่ในน้ำมันรำข้าวประมาณ 1.56 % และในข้าวเหนียวดำจะมีแกมมาโอไรซานอล 2.4677 % (Teltathum, 2004) และในโมเลกุลของแกมมาโอไรซานอล จะมีหมู่ไฮดรอกซิล ทำให้มีคุณสมบัติในการต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและจัดเป็นสารในกลุ่มของ ferulic acid ซึ่งประกอบด้วยพันธะเอสเตอร์ของ triterpene alcohols และ plant sterols (Karladee *et al.*, 2003) (Figure 2.10) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของสารที่ใช้ในการทดลอง

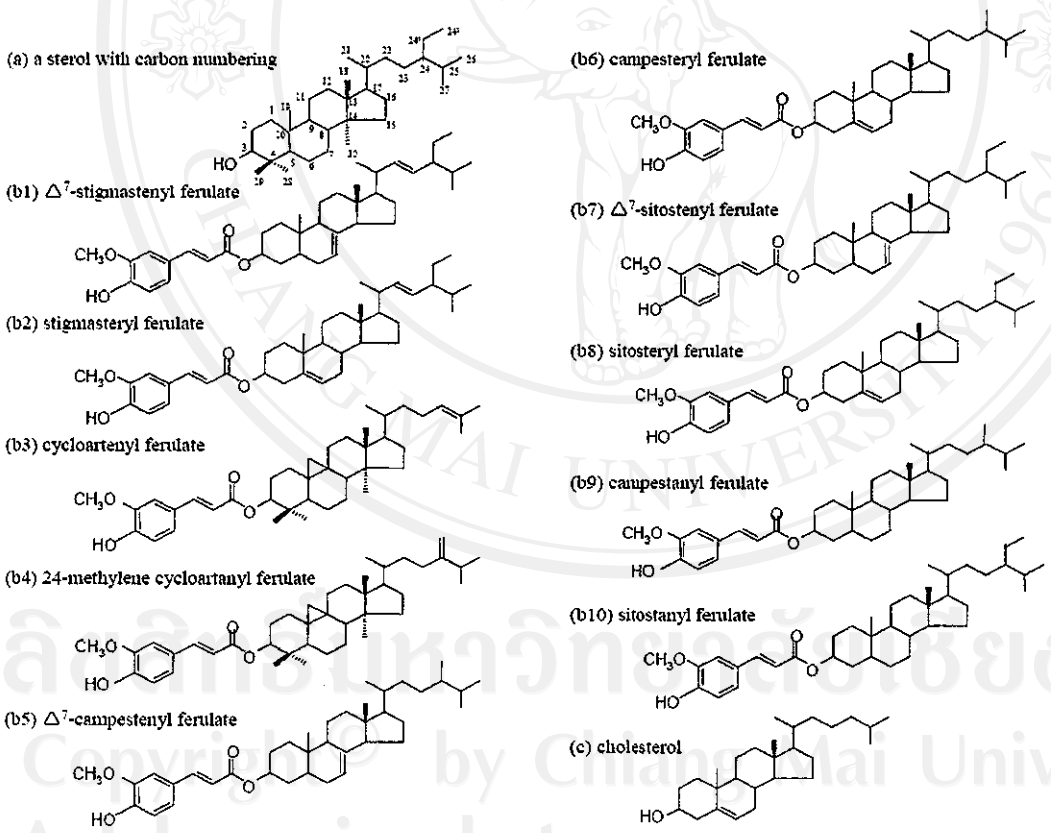


Figure 2.10 Chemical structures of (a) a sterol with carbon numbering, (b1)-(b10) gamma-oryzanol components and (c) cholesterol (Huang, 2003).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในการศึกษา แกมมาโอไรซานอล ที่ประกอบด้วย ferulic acid ซึ่งเป็น ester ของ triterpene alcohols มีองค์ประกอบหลัก 3 ชนิด คือ cycloarternyl ferulate เช่น cycoartenol (CA 106 mg%) 24-methylene cycloartanol (494 mg%) และ campesteryl ferulate (Huang, 2003)

2.7.2 ผลของแกมมาโอไรซานอล

2.7.2.1 ศึกษาการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันแบบ *in vitro*

จากการศึกษาการวัดประสิทธิภาพของแกมมาโอไรซานอล ในด้านการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเปรียบเทียบกับไวตามินอี โดยการนำมาบ่มกับเซลล์ในหลอดทดลอง จากนั้นกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ผลการทดลองพบว่า จำนวนเซลล์ที่อยู่รอดเมื่อบ่มกับแกมมาโอไรซานอลสูงถึง 81.8 % ซึ่งสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับ α-tocopherols ที่มีเซลล์เหลืออยู่ 74.6 % และกลุ่มควบคุมที่มีเซลล์รอดอยู่เพียง 54.5 % เนื่องจากสารที่เป็นองค์ประกอบหลักของแกมมาโอไรซานอลทั้ง 3 ชนิดก็มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าไวตามินอี โดยมีประสิทธิภาพมากกว่า tocopherols 10 เท่า ทั้งนี้เนื่องจากโครงสร้างภายในโมเลกุลของแกมมาโอไรซานอลที่ประกอบด้วย hydrogen-bonded methoxyphenols ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระได้รวดเร็วกว่าไวตามินอี (Huang, 2003) นอกจากนี้ การศึกษาในรำข้าวสาลีพบว่า ferulic acid ที่เชื่อมพันธะต่อกับผังเซลล์พืชในส่วนที่เป็นโมเลกุลของ arabinoxylan ได้เป็นสารประกอบ feruloyl oligosaccharide เป็นเยื่อใยในอาหารที่ไม่ละลายในน้ำ และโครงสร้างของสารนี้มีคุณสมบัติต้านการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ถึง 91.7 % และช่วยกำจัดอนุมูลอิสระได้ (Yuan *et al.*, 2005)

2.7.2.2 ศึกษาการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันแบบ *in vivo*

โดยส่วนประกอบของแกมมาโอไรซานอลที่มีประสิทธิภาพที่สุดคือ 24-methylene cycloartanyl ferulate และเมื่อเปรียบเทียบการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ พบว่าไวตามินอีจะทำหน้าที่กำจัดสารประเภท peroxyl radicals ($ROO^{\bullet}$) ส่วนสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์จะทำหน้าที่กำจัด peroxyl radicals ($ROO^{\bullet}$) superoxide anion radicals ($O_2^{\bullet-}$) hydroxyl radicals ($OH^{\bullet-}$) และ phynoxy radicals นอกจากนี้ยังพบว่า ferulic acid ช่วยกำจัดอนุมูลอิสระและป้องกันไม่ให้เซลล์ประสาทถูกทำลาย ซึ่งทำให้ลดความเสี่ยงในการเกิดโรคอัลไซเมอร์ (Kanski *et al.*, 2002) และ ferulic acid ยังมีคุณสมบัติช่วยป้องกันรังสีอุลตร้าไวโอเลต จากปฏิกิริยาออกซิเดชันในเม็ดเลือดแดง และไลโปโปรตีนนิดความหนาแน่นต่ำ (low -density lipoprotein; LDL) ได้อีกด้วย (Anselmi *et al.*, 2004)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.8 ข้าวเหนียวก่ำ

ข้าวก่ำ มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Oryza sativa* L. *indica* เป็นข้าวสายพันธุ์หนึ่งที่นิยมปลูกมากในทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ลักษณะเด่นคือ เมล็ดข้าวจะมีสีแดงไปจนถึงม่วงเข้ม (Figure 2.11) เพราะต้นข้าวจะมีรงควัตถุ (pigments) ที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ ฟลาโวนอยด์ (กอบเกียรติ, 2540) โดยสารประเภทดังกล่าวนี้และสารโพลีฟีนอล เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของสาร secondary metabolite พบได้มากในต้นพืช เช่นสารในกลุ่ม โปรแอนโธไซยานิดิน (proanthocyanidin ; PA) (Steven and Salem, 1997) ซึ่งสารกลุ่มนี้มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน และกำจัดสารอนุมูลอิสระได้

Figure 2.11 Purple glutinous rice (Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, CMU.).

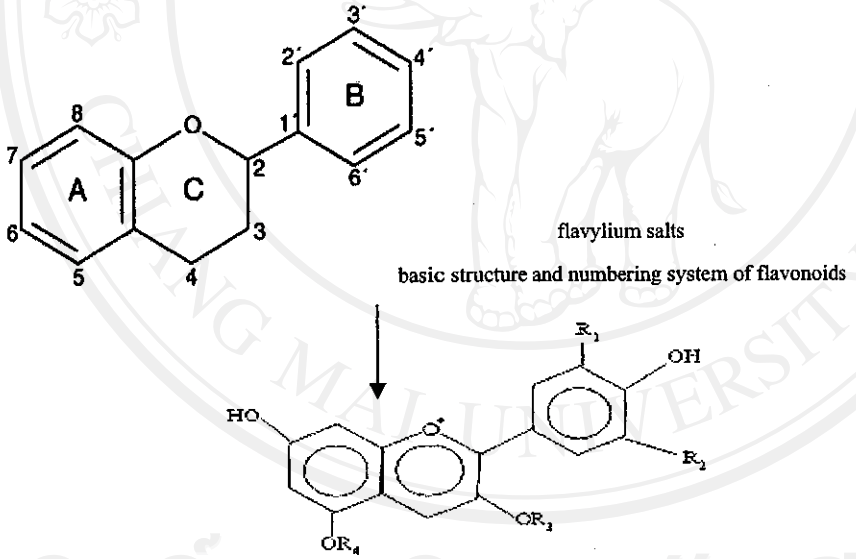
2.8.1 แอนโธไซยานิน และโปรแอนโธไซยานิดิน

โครงสร้างของแอนโธไซยานินในพื้นฐานจะประกอบไปด้วยโมเลกุลของน้ำตาลที่สร้างพันธะไกลโคไซด์กับโครงสร้างวงแหวน 3 วง ที่ประกอบด้วยอนุพันธ์โพลีไฮดรอกซีและโพลีเมทอกซี ที่เชื่อมกับสารประกอบ 2-phenylbenzopyrylium หรือ flavylium salts (Figure 2.12) โดยความจำเพาะเจาะจงของอนุพันธ์แอนโธไซยานินจะขึ้นอยู่กับตำแหน่งของ หมู่ไฮดรอกซิลและหมู่เมทธิล ซึ่งตามสภาพในธรรมชาติก็จะสัมพันธ์กับชนิดของโมเลกุลน้ำตาลที่มาเกาะด้วย คุณสมบัติโดยทั่วไปแอนโธไซยานินสามารถละลายได้ในสารละลายที่มีขั้ว เช่น น้ำ และแอลกอฮอล์ รวมทั้งโครงสร้างยังมีการเปลี่ยนแปลงได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง ซึ่งส่งผลต่อความเข้มสีของสารละลาย โดยพบว่าเพื่อค่าความเป็นกรดเพิ่มขึ้นสีม่วงจะจางลง และสีจะ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เข้มขึ้นเมื่อสภาพเป็นด่าง ดังนั้นอาจนำสารแอนโธไซยานินมาใช้เป็นอินดิเคเตอร์ในการบ่งบอกค่าความเป็นกรด-ด่างในธรรมชาติได้ (Mazza and Miniati, 1993)

โปรแอนโธไซยานิดิน หรือ Condensed tannin โครงสร้างจะเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของฟลาโวนอยด์เชื่อมต่อกันเป็นสายยาว (Figure 2.13) โดยอนุพันธ์โปรไซยานิดิน หรือ โปรแอนโธไซยานิดิน ในข้าวจะประกอบด้วย สารประกอบเชิงซ้อนของ polyphenolic และหมู่ hydroxyl group ที่ C ตำแหน่งต่าง ๆ ซึ่งการสลาย โปรแอนโธไซยานิดิน ในสภาพที่มีกรด หรือแอลกอฮอล์ จะได้สารแอนโธไซยานิน (Figure 2.12) ที่มีอนุพันธ์ cyanidin 3-glucoside (C3G) เป็นองค์ประกอบหลัก รองลงมาคือ peonidin 3-glucoside (P3G) (Ryu *et al.*,1998) ส่วนอนุพันธ์ที่มีอยู่จำนวนน้อย ได้แก่ cyanidin-3-gentioboside, cyanidin-3-rhamnoside, cyanidin-3,5-diglucoside cyanidin-3-rhamnoglucoside



No.	Compound	R_1	R_2	R_3	R_4
1	cyanin-3 glucoside (C3G)	OH	H	Glu	H
2	peonidin-3 glucoside (P3G)	OCH_3	H	Glu	H

Figure 2.12 Anthocyanin derivative structure from black rice (ดัดแปลงจาก Ryu *et al.*, 1998).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

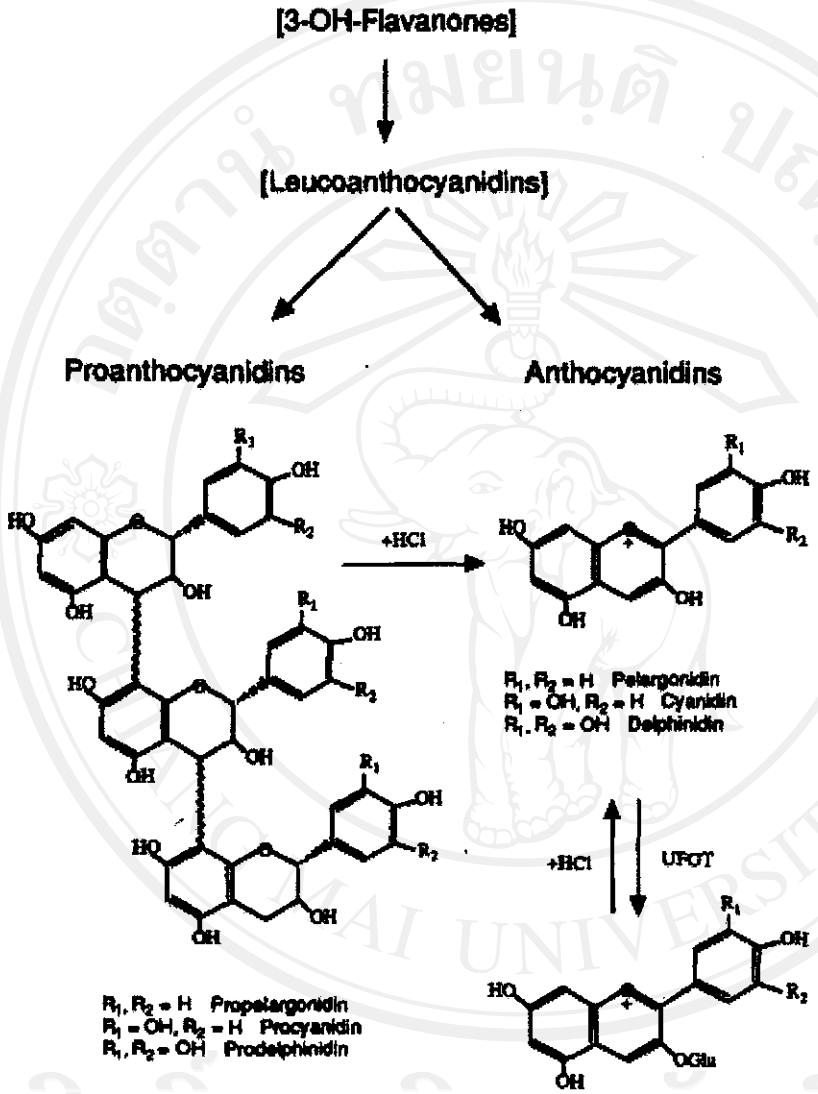


Figure 2.13 Proanthocyanidins and anthocyanidins synthesis (Todd and Vodkin, 1993).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากการศึกษาของ Ling *et al.* (2002) พบว่ารำข้าวดำมีโปรตีน แร่ธาตุบางตัวและไวตามินสูงกว่ารำข้าวขาว (Table 2.6)

Table 2.7 Composition of black rice pigment fraction and white rice outer layer fraction (Ling *et al.*, 2002)

Ingredient	Black rice pigment fraction	White rice outer layer fraction
	units/100 g	
Protein, g	13.90	12.20
Fat, g	13.20	14.10
Carbohydrate, g	47.36	50.95
Moisture, g	9.80	7.96
Crude fiber, g	8.32	7.04
Minerals, mg	7420	7750
Phosphorus	1694.10	1542.50
Calcium	60.20	45.30
Potassium	673.70	624.60
Magnesium	79.40	80.40
Sodium	2.11	4.35
Iron	16.46	6.30
Zinc	8.96	4.92
Copper	1.49	0.91
Selenium	0.15	0.06
Vitamins, mg		
Vitamin B-1	2.30	1.20
Vitamin B-2	0.40	0.14
Vitamin E	0.60	0.03
Nicotinic acid	21.00	13.00
Flavonoids, g	6.40	1.17

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.8.2 ผลของแอนโธไซยานินในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

2.8.2.1 ศึกษาการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันแบบ *in vitro*

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ของแอนโธไซยานิน และ Trolox (สารที่คล้ายไวตามินอี) ด้วยการวัดค่า oxygen radical absorbance capacity (ORAC) พบว่าแอนโธไซยานินมีแอคติวิตีสูงกว่า Trolox ประมาณ 3.5 เท่า (Wang *et al.*, 1997) ซึ่งสอดคล้องกับ Rice-Evan *et al.* (1995) ที่รายงานว่า cyaniding 3-glucoside มีแอคติวิตีมากกว่า Trolox ถึง 4 เท่า จากการศึกษาผลของแอนโธไซยานินในหนูที่ถูกกระตุ้นให้เกิดภาวะตับอักเสบพบว่า ผลการวิเคราะห์เนื้อเยื่อตับของหนูที่ได้รับสารสกัดจะมีการอักเสบลดลง และมีระดับกลูตาไธโอนเพิ่มขึ้น และการสร้าง MDA ลดลง (Wang *et al.*, 2000)

2.8.2.2 ศึกษาการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันแบบ *in vivo*

โปรแอนโธไซยานิดิน และ แอนโธไซยานิน เป็นสารที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ที่ทำให้เซลล์ในร่างกายทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยปริมาณที่แนะนำให้คนบริโภค วันละ 180-215 มก. (Hertog *et al.*, 1993) นอกจากนี้ยังพบว่าสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย ต้านการเกิดเซลล์เนื้องอก และยับยั้งไวรัส ได้ จากโครงสร้าง (Figure2.13) จะเห็นได้ว่าหมู่ไฮดรอกซิลที่อยู่บนวงแวน B และตรงตำแหน่งพันธะคู่ของ C2-C3 ที่วงแหวน C สามารถให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระได้ และช่วยยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน ในขณะที่หมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแน่งที่ 7 บนวงแหวน A จะเป็นตัวให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูลซุเปอร์ออกไซม์ ส่งผลให้ลดการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ superoxide dismutase (Steven and Salem, 1997) จากการศึกษาพบว่าสารสกัดแอนโธไซยานินที่ได้จากข้าวสีดำ *(Oryza sativa* L. *indica)* ช่วยกำจัดอนุมูลอิสระ และช่วยป้องกันไม่ให้สายดีเอ็นเอสายคู่ (supercoiled DNA strand) ถูกทำลายโดย peroxyl radical และ hydroxyl radicals เพราะแอนโธไซยานินจับตัวรวมกับโมเลกุลดีเอ็นเอได้เป็น cyandin-DNA-copigmentation เพื่อป้องกันดีเอ็นเอ ไม่ให้ถูกออกซิเดชัน (Sarma and Sharma, 1999) และยังช่วยลดการเกิดออกซิเดชันของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ รวมทั้งยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ nitric oxide synthase ที่สร้าง nitric oxide ในเซลล์แมคโครฟาจ (Hu *et al.*, 2003) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Wang *et al.* (1999) ที่พบว่าแอนโธไซยานินที่สกัดได้จากเชอร์รี่สามารถยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ได้ประมาณ 39-75 % ซึ่งโมเลกุลของแอนโธไซยานินสามารถทำงานร่วมกับสารต้านอนุมูลอิสระอื่น ๆ ได้ด้วยโดย Sarma *et al.* (1997) ได้ศึกษาอนุพันธุ์ไซยานิดิน ที่สกัดจากข้าว พบว่าแอนโธไซยานินไม่เพียงแต่จะเป็นคีเลตจับกับอิออนของโลหะได้เท่านั้น แต่ยังสามารถจับกับไวตามินซีที่ถูกออกซิไดซ์ด้วย Cu^{2+} ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เป็นสารประกอบเชิงซ้อนอยู่ในรูปของ ascorcic aid-metal-anthocyanin complex (copigment) ทำให้ไวตามินซีกลับมาอยู่ในรูปรีดิวซ์ และทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระได้อีกครั้ง นอกจากนี้ Ghiselli *et al.* (1998) ได้ทำการศึกษาเรื่องการต้านอนุมูลอิสระของสารที่พบในไวน์แดง พบว่า แอนโธไซยานินในไวน์แดงมีผลต่อการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของลิโปโปรตีน (lipoprotein oxidation) และยังช่วยลดระดับ ไลโปโปรตีนนิดความหนาแน่นต่ำ ที่ถูกออกซิไดซ์ด้วย (Pawlowicz *et al.* 2000) ในการทดลองของ Ling *et al.* (2001) ที่ทำการทดลองกระต่ายโดยให้อาหารที่มีโคเลสเตอรอลสูง ร่วมกับการเสริมรำข้าว เปรียบเทียบกับรำข้าวสีแดงและรำข้าวสีดำ พบว่าระดับโคเลสเตอรอล และMDA ในเลือดของกลุ่มที่ได้รับรำข้าวสีแดงและสีดำจะมีระดับต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับรำข้าวสีขาว ซึ่งบ่งชี้ได้ว่าการเสริมข้าวที่มีสีจะช่วยปรับปรุงการเกิด lipid peroxidation ภายในตัวสัตว์ได้ จึงสรุปได้ว่าแอนโธไซยานินเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ ซึ่งสามารถควบคุมการเกิด oxidative stess ได้ จึงได้มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับแอนโธไซยานินเกิดขึ้นมากมาย เพื่อที่จะสกัดสารนี้มาใช้ประโยชน์ให้มากที่สุด

ข้อมูลการศึกษาวิจัย เพื่อการนำไปพัฒนาต่อยอดด้านการเป็นอาหารเพื่อสุขภาพในคนนั้น นักวิจัยมักจะใช้สุกรเป็นต้นแบบ เนื่องจากสรีระวิทยา เช่น ลักษณะฟัน และ ระบบทางเดินอาหารของคนและสุกรมีความใกล้เคียงกัน ซึ่งถูกจัดอยู่ในกลุ่มของสัตว์ที่กินทั้งพืชและสัตว์เป็นอาหาร (Omnivore) เหมือนกัน เมื่อเปรียบเทียบคนและสุกร พบว่า ความต้องการของโภชนะกลไกการย่อย การดูดซึมสารอาหาร และการเมทาบอลิซึมในร่างกาย ยังมีความใกล้เคียงกันมาก ดังนั้นจึงใช้สุกรมาเป็นต้นแบบในการศึกษาในเรื่องต่างๆ เช่น สรีระวิทยาของไต สรีระวิทยาของหลอดเลือดหัวใจ พยาธิสภาพการไหลเวียนเลือด (hemodynamics) ภาวะอ้วน (obesity) การเกิดโรคเบาหวาน ภาวะอปกติวิทยา (teratology) โรคผิวหนัง พิษวิทยา การเมตาบอลิสมของยา การศัลยกรรม ภาวะลำไส้อักเสบ ด้านพฤติกรรม ภูมิคุ้มกันวิทยา การเกิดความเครียด (stress) และด้านโภชนศาสตร์ เป็นต้น (Miller and Ullrey, 1987)

ปัจจุบันปัญหาที่พบในการเลี้ยงลูกสุกรที่อยู่ในช่วงอายุหลังหย่านม ในช่วงแรกที่ทำการหย่านม ลูกสุกรต้องปรับตัวมาก ทั้งการเปลี่ยนสภาพแวดล้อม เปลี่ยนอาหาร และการขนย้าย ซึ่งทำให้เกิดความเครียด ส่งผลให้ร่างกายเกิดภาวะ oxidative stress ได้ง่าย อาจทำให้การเจริญเติบโตช้า ดังนั้นการให้อาหารที่มีสารต้านอนุมูลอิสระก็จะช่วยลดปัญหาดังกล่าวได้ อย่างไรก็ตามในสภาพธรรมชาติอาหารสุกรส่วนใหญ่จะใช้รำข้าวเป็นส่วนประกอบ เพราะเป็นวัสดุเหลือใช้ได้ทางการเกษตร อีกทั้งจากการศึกษาพบว่าในส่วนของรำหรือเยื่อหุ้มเล็ดข้าวนี้ ยังอุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด โดยเฉพาะสารแกมมาโอไรซานอล และโปรแอนโธไซยานิดิน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้นำรำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ข้าวก่ำมาศึกษา เพื่อการวัดผลด้านการยับยั้งการเกิดภาวะออกซิเดชัน และสมรรถภาพการผลิตในลูกสุกรหลังหย่านม

2.9 การวิเคราะห์ปริมาณแกมมาโอไรซานอล

โดยทั่วไปเทคนิคการวัดปริมาณแกมมาโอไรซานอลจะใช้วิธี High performance liquid chromatography (HPLC) และ UV spectrophotometry (Bucci *et al.*2003) จากโครงสร้างพบว่าแกมมาโอไรซานอลเป็นสารละลายที่ไม่มีขั้ว ดังนั้นการสกัดจึงใช้สารที่ไม่มีขั้ว โดยทั่วไปจะใช้เฮกเซน เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดมากกว่าหนึ่งชนิด เช่น ไอโซโพรพานอล:เฮกเซน (1:1) กับสารสกัดเพียงตัวเดียวคือ ไอโซโพรพานอล, เฮกเซน และเมทานอล พบว่าไอโซโพรรานอลและเมทานอลเป็นตัวสกัดแกมมาโอไรซานอลออกมามากที่สุด (Chen and Bergman, 2005) และจากรายงานการจำแนกองค์ประกอบของแกมมาโอไรซานอลในน้ำมันรำข้าวด้วย GC/MS พบว่า องค์ประกอบของแกมมาโอไรซานอล มีทั้งหมด 10 ชนิด คือ Δ^7-stigmastenyl ferulate, stigmasteryl ferulate, cycloartenyl ferulate, 24-methylene cycloartanyl ferulate, Δ^7-campestenyl ferulate, campesteryl ferulate, Δ^7-sitostenyl ferulate, sitosteryl ferulate, compestanyl ferulate, sitostanyl ferulate, cycloartenyl ferulate, 24-methylenecycloartanyl ferulate และcampesteryl ferulate (Xu and Godber, 1999) นอกจากนี้การวัดปริมาณแกมมมาโอไรซานอลโดยรวมในวัตถุดิบทั่วไป ด้วยการใช้เครื่องเสปกโตรโฟโตมิเตอร์ก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ง่าย รวดเร็วและประหยัดกว่าการใช้ HPLC แต่อย่างไรก็ตามการใช้ค่าความยาวคลื่นเพียงค่าเดียวอาจได้ค่าโดยประมาณเท่านั้น จึงมีการพัฒนาเทคนิคการวัดที่ซับซ้อนขึ้นโดยเพิ่มช่วงความยาวคลื่นหลาย ๆ ค่าและใช้โปรแกรมในการคำนวณหาค่าแกมมาโอไรซานอล โดยพบว่าช่วงคลื่นที่เหมาสมคือ 310 – 360 นาโนเมตร (Bucci *et al.*, 2003)

2.10 การวิเคราะห์ปริมาณแอนโธไซยานิน

จากคุณสมบัติของแอนโธไซยานินที่เป็นสารที่ละลายได้ในสารละลายที่มีขั้ว จึงสามารถสกัดได้โดยใช้เมทานอล (methanol) ซึ่งที่กรดไฮโดรคลอริก หรือกรดฟอร์มิกเล็กน้อย แต่กรดนี้จะทำให้ pH ของสารละลายต่ำลง และเกิดการย่อยสลายของ non-acylated anthocyanin pigment (หรือเรียกว่าเกิด pigment degradation) ต่อมา Ghiselli *et al.* (1998) ได้ทำการสกัดแอนโธไซยานินโดยใช้ acetone เปรียบเทียบกับเทคนิค acidified methanol พบว่าการใช้ acetone มีประสิทธิภาพดีและได้สารสกัดจำนวนมากกว่าการใช้เมทานอล สามารถทำได้ที่อุณหภูมิที่ต่ำและได้สารละลายที่เข้มข้นมากกว่า เช่นเดียวกับการทดลองของ Dalzell and Kerven (1998) ซึ่งใช้ 70 % aqueous acetone ในการสกัด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เนื่องจากเป็นตัวละลายที่ประสิทธิภาพดีที่สุดในการสกัดสารโปรแอนโธไซยานิน ส่วนการพัฒนาเทคนิควิธีการสกัดและวิเคราะห์โครงสร้างของแอนโธไซยานินก็เกิดขึ้นเรื่อยมา (Kong *et al.*, 2003) เช่น thin layer chromatographhy, proton-NMR spectroscropy, UV-VIS spectroscropy และ standard organic method และ cochromatography (Reddy, 1996) และจากงานวิจัยเมื่อไม่นานมานี้ พบว่า การใช้ electrospray mass spectrum เป็นเครื่องมือที่มีสมรรถภาพสูงในการหาน้ำหนักโมเลกุลและหมู่เคมีของสาร ส่วนการระบุโครงสร้างของแอนโธไซยานินนั้นต้องใช้ mass spectrometry ร่วมกับ HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) (Zhang *et al.*, 2004) สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณแอนโธไซยานิน ในข้าวสีดำสายพันธุ์ที่ปลูกในประเทศจีนด้วยการใช้ HPLC พบว่าข้าว100 กรัม จะมีแอนโธไซยานินอยู่ในช่วง 0-493 มก. ซึ่งจะมี Cyanidin 3-glucoside อยู่ถึง 95.3 % ของแอนโธไซยานินทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบว่า Cyanidin 3-glucoside มีคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า Peonidin 3-glucoside อีกด้วย (Ryu *et al.*, 1998) ต่อมามีรายงานว่าแอนโธไซยานินทั้งหมดที่พบในส่วนของเมล็ดข้าวจะมีประมาณ 0.16 % และพบอยู่ในส่วนเยื่อหุ้มเมล็ดประมาณ 1.36 % สำหรับปริมาณแอนโธไซยานินที่พบในข้าวทั้งต้นจะมีสูงถึง 85 % (Teresa *et al.*, 2004) และพบว่าในข้าวข้าว100 กรัม จะมีแอนโธไซยานินตั้งแต่ 0-493 มก. โดยขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ (Ryu *et al.*, 1998)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved