บทที่ 2

ทบทวนเอกสาร

ความหมายของอนุมูลอิสระ (Free radical)

อนุมูลอิสระ คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็คตรอนไม่เป็นคู่ อยู่ในวงอิเล็คตรอนวงนอกสุด (outer orbital) เนื่องจากการมีอิเล็กตรอนที่โดดเดี่ยว (unpaired electron) อยู่ในวงโคจรของโมเลกุลทำให้ไม่เสถียร ทำให้อนุมูลอิสระเป็นสารที่มีความไวในการเข้าทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นสูงมาก โดยอนุมูลอิสระจะไปแย่งจับหรือดึงเอาอิเล็กตรอนจากโมเลกุลหรืออะตอมสารที่อยู่ข้างเคียงเพื่อให้ตัวมันเสถียร โมเลกุลที่อยู่ข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระชนิดใหม่ ซึ่งอนุมูลอิสระที่เกิดมาใหม่นี้จะไปทำปฏิกิริยากับสารโมเลกุลอื่นต่อไป เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) ต่อกันไปเรื่อยๆ (Halliwell, 1991) โดยที่อนุมูลอิสระก็มีสมบัติเหมือนสารทั่วๆไป ตรงที่ความสามารถในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารอื่นสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามอุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง (pH) และความชื้น เป็นต้น

อนุมูลอิสระมีทั้งที่อยู่ในสภาวะที่เป็นกลางทางไฟฟ้า และอนุมูลในสภาวะที่มีประจุไฟฟ้า โดยมีทั้งประจุบวกและประจุลบ สัญลักษณ์ทางเคมีของอนุมูลอิสระ คือ อิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระจะแสดงด้วยจุดในตำแหน่งข้างบนของสัญลักษณ์ทางเคมี เช่น อนุมูล $R^{\bullet}$ แทนอะตอมหรือโมเลกุลของอนุมูลอิสระที่ไม่จำเพาะเจาะจง ซึ่งอนุมูลอิสระมีทั้งที่เป็นประจุบวก ($R^{+\bullet}$) เช่น อนุมูล pyridinyl ($NAD^{+\bullet}$) และประจุลบ ($R^{-\bullet}$) เช่น อนุมูล superoxide ($O_2^{-\bullet}$) หรือเป็นกลาง เช่น อนุมูล peroxyl ($ROO^{\bullet}$) หรืออนุมูล thiyl ($RS^{\bullet}$) เป็นต้น ซึ่งจากคำจำกัดความนี้ส่งผลให้อะตอมของธาตุและสารละลายหลายชนิดถูกจัดเป็นอนุมูลอิสระด้วย เช่น คลอรีนอะตอม ($Cl^{\bullet}$) และซิลเวอร์อะตอม ($Ag^{\bullet}$) เป็นต้น (Roberfroid and Calderon, 1995)

อนุมูลอิสระที่มีความสำคัญในทางชีวภาพ ได้แก่ Hydroxyl radical ($HO^{\bullet}$), Superoxide anion radical ($O_2^{-\bullet}$) เป็นต้น อนุมูลเหล่านี้จัดเป็นอนุมูลที่ไวในการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นสูงมาก การเกิดอนุมูลอิสระมีได้หลายกลไกที่แตกต่างกัน ดังนี้

ก. การแตกของพันธะโควาเลนท์แบบไอโมไลซิส (Imolysis)

$$A : B \longrightarrow A^{\bullet} + B^{\bullet}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ข. การเพิ่มอิเล็กตรอน 1 ตัว ให้แก่อะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า

$A + e^{-} \rightarrow A^{-\bullet}$

ค. การสูญเสียอิเล็กตรอน 1 ตัว จากอะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า

$A \rightarrow A^{+\bullet} + e^{-}$

อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้องต่างๆในทางชีววิทยาที่สามารถเป็นตัวตั้งต้นที่ทำให้เกิดเป็นอนุมูลอิสระได้อีกหลายชนิด สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive oxygen species, ROS) กลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive nitrogen species, RNS) และกลุ่มที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive chlorine species, RCS) สารบางชนิดสามารถจัดอยู่ได้ 2 กลุ่ม เช่น เปอร์ออกซีไนไตรท์ (Peroxynitrite) ตัวอย่างอนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้องแสดงในตาราง 1 (โอภา และคณะ, 2549)

ตาราง 1 อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง (โอภา และคณะ, 2549)

อนุมูลอิสระ	สารที่เกี่ยวข้อง
Reactive oxygen species (ROS)	
Superoxide, Superoxide anion ($O_2^{-\bullet}$)	H_2O_2, Ozone (O_3)
Hydroxyl ($HO^{\bullet}$)	Hypobromous acid (HOBr)
Hydroperoxyl ($HO_2^{\bullet}$)	Hypochlorous acid (HOCl)
Peroxyl ($RO_2^{\bullet}$)	Singlet oxygen ($O_2\,{}^1\Delta g$)
Alkoxyl ($RO^{\bullet}$)	Organic peroxides (ROOH)
Carbonate ($CO_3^{-\bullet}$)	Peroxynitrite ($ONOO^{-}$)
Carbon dioxide ($CO_2^{-\bullet}$)	Peroynitrous acid (ONOOH)
Reactive nitrogen species (RNS)	
Nitric oxide ($NO^{\bullet}$)	Nitrous acid (HNO_2)
Nitrogen dioxide ($NO_2^{\bullet}$), ($NO_2^{-\bullet}$)	Nitrosyl cation (NO^{+}), Nitroxyl anion (NO^{-})
	Dinitrogen tetroxide (N_2O_4)
	Dinitrogen trioxide (N_2O_3)
	Peroxynitrite ($ONOO^{-}$)
	Peroynitrous acid (ONOOH)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 1 (ต่อ)

Reactive chlorine species (RCS)	
Atomic chlorine ($Cl^\bullet$)	Hypochlorous acid (HOCl)
	Chloramines
	Chlorine gas (Cl_2)
Other	
Thioyl radical ($RS^\bullet$)	

ปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation)

หมายถึงปฏิกิริยาที่โมเลกุลหรืออะตอมมีการสูญเสียอิเล็กตรอนจากวงโคจรให้กับโมเลกุลที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน เรียกสารที่ทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนว่า ตัวรีดิวซ์ (Reducing agent) และเรียกสารที่ทำหน้าที่รับอิเล็กตรอนนี้ว่า ตัวออกซิไดซ์ (oxidizing agent) โดยปฏิกิริยาออกซิเดชันมักจะเกี่ยวข้องกับออกซิเจน นอกจากนี้ออกซิเดชันยังหมายถึงการเสียไฮโดรเจนอะตอมออกจากโมเลกุลอีกด้วย ปฏิกิริยาออกซิเดชันและอนุมูลอิสระนั้นมีความเกี่ยวข้อง เนื่องจากปฏิกิริยานี้ทำให้เกิดอนุมูลอิสระของสารต่างๆได้มากมายหลายชนิด และอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารอื่นๆเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อไป (Garces, 2006)

ปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระจะเกิดปฏิกิริยาที่เป็นแบบปฏิกิริยาลูกโซ่ แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน คือ ขั้นแรกเป็นขั้นที่อนุมูลอิสระถูกสร้างหรือผลิตขึ้น เรียกขั้นตอนนี้ว่าขั้นตอนอินนิทิเอชัน (initiation step) ขั้นที่สองเป็นขั้นที่อนุมูลอิสระถูกเปลี่ยนไปเป็นอนุมูลอิสระตัวอื่นต่อๆกันไป เรียกว่าขั้นพรอพาเกชัน (propagation step) และขั้นสุดท้าย เรียกว่า ขั้นเทอร์มิเนชัน (termination step) เป็นขั้นหยุดปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระเป็นขั้นตอนที่มีการรวมกันของอนุมูลอิสระ 2 อนุมูล ได้เป็นสารที่มีความเสถียร (Hudson, 1990) โดยทั่วไปการที่โมเลกุลหรืออะตอมของสารที่มีอิเล็กตรอนเข้าคู่กันครบเสียอิเล็กตรอนไปกลายเป็นอนุมูลอิสระได้นั้น ต้องอยู่ในสภาวะอุณหภูมิสูง แต่ก็มีโมเลกุลอีกหลายชนิดที่กลายเป็นอนุมูลอิสระได้เมื่ออยู่ในสภาวะปกติ ซึ่งรวมถึงสารชีวโมเลกุลต่างๆที่พบในสิ่งมีชีวิตด้วย ซึ่งปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระที่มักพบในสภาวะปกติของสิ่งมีชีวิตมีดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขั้นอินนิทิเอชัน (chain initiation)

อนุมูลอิสระเกิดมาจากกลไกต่างๆกันได้หลายวิธี คือ การแตกพันธะของโมเลกุลที่เรียกว่า Homolysis หรือการแตกพันธะเนื่องจากแสง (photolysis) หรือผลของรังสี (radiolysis) หรือมาจากปฏิกิริยารีดอกซ์ (redox) ซึ่งปฏิกิริยาทั้ง 4 จัดเป็นกลไกพื้นฐานในการสร้างอนุมูลอิสระจากสารอินทรีย์ (Roberfroid and Calderon, 1995)

ก. Bond homolysis

โมเลกุลของสารอินทรีย์ที่มีอิเล็กตรอนวงนอกสุด (valence electron) เป็นจำนวนคู่แล้วในทางทฤษฎีสามารถแยกออกจากกันให้ผลลัพธ์เป็นอนุมูลอิสระได้ โดยในสภาวะที่อุณหภูมิปกติ การที่อิเล็กตรอนคู่ในพันธะโควาเลนท์สามารถแยกจากกันไปให้อะตอมแต่ละตัวได้นั้น ต้องเป็นโมเลกุลที่มีพลังงานระหว่างพันธะที่อ่อนมาก เช่น disulfide และการเกิดปฏิกิริยาจะมีอัตราที่ช้ามาก จึงคาดว่าไม่น่าจะเกิดในระบบของสิ่งมีชีวิตได้ ตัวอย่าง Bond homolysis แสดงได้ดังสมการต่อไปนี้

$$\mathrm{ROOR} \longrightarrow 2\mathrm{RO}^{\bullet}$$

ข. Photolysis

เป็นการแตกพันธะของโมเลกุลจากการดูดพลังงานแสง เช่น แสงอุลตร้าไวโอเลต ทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้น ที่พบมากคือการแตกพันธะของ hydrogen peroxide (H_2O_2) กลายเป็นอนุมูล hydroxyl ($HO^{\bullet}$) โดยในสิ่งมีชีวิตพลังงานแสงจะถูกดูดโดยโมเลกุลที่มีความไวต่อแสง เช่น รงควัตถุและสารอะโรมาติกคาร์บอนบางชนิด หลังดูดพลังงานแสงแล้วจะทำให้โมเลกุลอยู่ในสถานะที่ตื่นตัว (excited state) จึงต้องมีการปลดปล่อยพลังงานออกมาเพื่อให้โมเลกุลกลับเข้าสู่สถานะพื้น (ground state) ดังเดิม และวิธีหนึ่งของการคายพลังงาน คือ การแตกพันธะของโมเลกุลเกิดเป็นอนุมูลอิสระ 2 ตัว ดังนี้ (Hudson, 1990)

$$\mathrm{ROCl} \longrightarrow \mathrm{RO}^{\bullet} + \mathrm{Cl}^{\bullet}$$

$$(\mathrm{RCOO})_2 \longrightarrow 2\mathrm{RCOO}^{\bullet}$$

ค. Radiolysis

พลังงานจากรังสีชนิดต่างๆ เช่น รังสีแกมมา รังสีเอกซ์ และอิเล็กตรอนที่มีพลังงานสูงสามารถทำให้เกิดการแตกพันธะโควาเลนท์ของโมเลกุลสารได้ โดยเฉพาะโมเลกุลน้ำจะให้อนุมูลประจุบวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

($H_2O^{+\bullet}$) และอนุมูล hydroxyl ($HO^{\bullet}$) ซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้เป็นตัวที่มีความไวในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารอินทรีย์สูง ทำให้เกิดอนุมูลอิสระออกมามากมาย นอกจากนี้รังสียังทำให้เกิดอนุมูลอิสระได้โดยตรงจากสารองค์ประกอบเคมีของเซลล์อีกด้วย โดยเฉพาะสามารถก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันไม่อิ่มตัวในร่างกายสิ่งมีชีวิต ซึ่งปฏิกิริยานี้นับเป็นจุดเริ่มต้นที่สำคัญของปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ

ง. ปฏิกิริยารีดอกซ์

ปฏิกิริยารีดอกซ์หรือเรียกอีกอย่างว่า ปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นทั่วไปในระบบทางชีววิทยา ปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันบางชนิดมีประโยชน์ แต่มีปฏิกิริยาออกซิเดชันบางชนิดก่อให้เกิดความเสียหาย โดยสามารถก่อให้เกิดอนุมูลอิสระได้ ที่สำคัญคือโมเลกุลของอนุมูล superoxide ($O_2^{-\bullet}$) ซึ่งเป็นสารตัวกลาง (intermediate) ในกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในไมโตคอนเดรียและเยื่อหุ้มนิวเคลียส นอกจากนี้ปฏิกิริยารีดอกซ์ของไอออนโลหะในร่างกาย ก็จัดเป็นปฏิกิริยาที่สำคัญในการเกิดอนุมูลอิสระเช่นกัน โดยเฉพาะเหล็ก (Fe^{2+}) และทองแดง (Cu^{2+}) โดยไอออนโลหะเปรียบเสมือนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยารีดอกซ์ (Hudson, 1990)

ขั้นพรอพาเกชัน (chain propagation)

เป็นขั้นที่อนุมูลอิสระมีการทำปฏิกิริยาเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระของสารอื่น ซึ่งปฏิกิริยาจะดำเนินต่อๆกันไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ ได้อนุมูลอิสระชนิดใหม่ออกมาตลอดเวลา จัดเป็นการเปลี่ยนตำแหน่งของอิเล็กตรอนที่ไม่เข้าคู่ (unpaired electron) ซึ่งสามารถแบ่งกลไกของปฏิกิริยาในขั้นพรอพาเกชันได้ 3 ชนิด ที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบทางชีววิทยาที่เกี่ยวกับสิ่งมีชีวิต คือ

ก. การถ่ายทอดอะตอมหรือกลุ่มของอะตอม (atom or group transfer)

จัดเป็นกลไกที่เกิดมากที่สุดในลำดับของพรอพาเกชัน โดยปฏิกิริยาจะเกี่ยวข้องกับการดึงไฮโดรเจนดังสมการ (Hudson, 1990)

$$Cl^{\bullet} + RH \longrightarrow HCl + R^{\bullet}$$

$$R^{\bullet}_1 + R_2Cl \longrightarrow R_1Cl + R^{\bullet}_2$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ข. การถ่ายทอดอิเล็กตรอน (electron transfer)

เป็นการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจากอนุมูลอิสระที่เป็นกลางหรือมีประจุลบไปให้โมเลกุลที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระ (non-radical molecule) ซึ่งเป็นกลไกที่สำคัญของปฏิกิริยาออกซิเดชันไขมันในสิ่งมีชีวิต (Lipid peroxidation) (Roberfroid and Calderon, 1995)

ค. การเติมอนุมูลอิสระ (addition of radicals)

เป็นการเติมกลุ่มอนุมูลอิสระเข้าไปในโมเลกุลต่างๆดังสมการ

$$R^{\bullet} + O_2 \longrightarrow ROO^{\bullet}$$

ตัวอย่างของปฏิกิริยานี้ ได้แก่ การเติมอนุมูลอิสระของกรดไขมันไม่อิ่มตัว ปฏิกิริยาออกซิเดชันโมเลกุลของไขมัน (Lipid peroxidation) แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันแสดงได้ดังสมการ (Frankel, 1979)

Chain initiation :

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

Chain propagation :

$$L^{\bullet} \longrightarrow L\text{-}O\text{-}O^{\bullet}$$

$$L\text{-}O\text{-}O^{\bullet} \longrightarrow L\text{-}O\text{-}O\text{-}H + L^{\bullet}$$

Chain termination :

$$L^{\bullet} + L^{\bullet} \longrightarrow L - L$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขั้นเทอร์มิเนชัน (chain termination)

เป็นขั้นหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ ประกอบด้วย กลไกหลัก 3 ชนิด คือ

ก. การรวมตัวกันของอนุมูลอิสระ (Homolinking and cross-linking of radicals)

เป็นการรวมตัวกันของอนุมูลอิสระ 2 โมเลกุล โดยการนำอิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่ของแต่ละโมเลกุลอนุมูลอิสระมาสร้างพันธะกัน ได้เป็นสารโมเลกุลใหม่ที่มีพันธะร่วมกัน หากเป็นการรวมตัวกันระหว่างอนุมูลอิสระ 2 โมเลกุลที่เป็นชนิดเดียวกัน เรียกโมเลกุลสารใหม่ที่ได้ว่า homodimer แต่ถ้าเป็นการรวมตัวของอนุมูลอิสระต่างชนิดกันเรียก heterodimer ซึ่งกลไกนี้เป็นปฏิกิริยาที่สำคัญในการสร้างสารชีวโมเลกุลที่มีความเสถียรขึ้นมาใหม่ภายในเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น โปรตีน กรดนิวคลีอิก และไขมัน เป็นต้น การรวมตัวกันของอนุมูลอิสระแสดงได้ดังนี้ (Roberfroid and Calderon, 1995)

$$ROO^{\bullet} + R^{\bullet} \longrightarrow ROOR$$

$$2ROO^{\bullet} \longrightarrow ROO\text{-}OOR$$

$$2R^{\bullet} \longrightarrow R\text{-}R$$

ข. การกำจัดอนุมูลอิสระ (Radical scavenging)

คำว่า Scavenge หมายถึงการกำจัดเอาขยะและสิ่งที่ไม่ต้องการออกไป ซึ่งในกรณีนี้เปรียบอนุมูลอิสระได้กับสิ่งที่ไม่ต้องการ ซึ่งการกำจัดออกจะกระทำโดยสารกลุ่มหนึ่งที่เรียกว่า scavenger หรือสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) เช่น สารประกอบฟีนอลิกซึ่งจัดเป็น radical scavenger ที่มีประสิทธิภาพ รวมทั้งวิตามินซี วิตามินอี วิตามินเอ เป็นต้น

ค. การถ่ายทอดอิเล็กตรอน (Electron transfer)

เป็นการถ่ายทอดอิเล็กตรอนที่ไม่ได้จับคู่ของอนุมูลอิสระออกจากโมเลกุล หรือเป็นการรับเอาอิเล็กตรอน 1 ตัวจากภายนอกมาเข้าคู่กับอิเล็กตรอนเดิมที่ยังมีที่ว่างอยู่ในโมเลกุล ทำให้สภาวะการเป็นอนุมูลอิสระหมดไป เช่น อนุมูล superoxide ($O_2^{-\bullet}$) เกิดการถ่ายทอดอิเล็กตรอนกลายเป็นโมเลกุลออกซิเจนปกติ (O_2) เป็นต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ความหมายของสารต้านออกซิเดชัน (Antioxidant)

สารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) คือสารที่ทำหน้าที่ยับยั้งหรือต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน หรือสารที่สามารถขจัดอนุมูลอิสระออกจากร่างกาย ร่างกายมีระบบต้านออกซิเดชัน แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ ประเภทแรกป้องกันการเกิดสารอนุมูลอิสระ ได้แก่ เอนไซม์ superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, peroxidase, cytochrome C peroxidase ทองแดง สังกะสี ซีเลเนียม โปรตีนซึ่งมีทองแดงอยู่ในโมเลกุล (ceruloplasmin) ส่วนอีกประเภทหนึ่งคือ สารต้านออกซิเดชัน ในกลุ่มที่ทำลายปฏิกิริยาลูกโซ่นี้ได้แก่ วิตามินอี เบต้า-แคโรทีน วิตามินซี ubiquinone, uric acid, bilirubin, albumin, sulfhydryl groups ในกรดอะมิโน cysteine ซึ่งมีอยู่ในโปรตีน เช่น เนื้อสัตว์ นอกจากวิธีนี้ยังมีสารประกอบฟีโนลิก (phenolic compounds) และสารกลุ่ม flavanoids ที่เป็นสารต้านออกซิเดชันที่น่าสนใจอีกด้วย (มลศิริ, 2540)

สารต้านออกซิเดชัน สามารถแบ่งตามกลไกการยับยั้งได้เป็น 3 ชนิด ดังนี้ (Strain and Benzie, 1999)

1. Preventive antioxidant	ป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ
2. Scavenging antioxidant	ทำลายหรือยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น
3. Chain breaking antioxidant	ทำให้ลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระสิ้นสุดลง

ตัวอย่างสารต้านออกซิเดชันบางชนิด

วิตามินเอ

ในธรรมชาติวิตามินเอจะพบเฉพาะในสัตว์เท่านั้น แต่ในพืชจะมีสารประกอบแคโรทีนอยด์ที่สามารถเปลี่ยนเป็นวิตามินเอได้ จัดเป็น Precursor ของวิตามินเอ เรียกว่า โปรวิตามินเอ มักพบในพืชผักใบเขียว ผักและผลไม้ที่มีสีเหลือง หรือสีส้มแดง (Packer *et al.,* 1999)

วิตามินซี

มีชื่อทางเคมีว่า กรดแอสคอร์บิค (Ascorbic acid) เป็นวิตามินที่ละลายได้ในน้ำ จะสลายตัวเมื่อถูกความร้อนหรือทิ้งไว้ในอากาศที่มีความชื้น วิตามินซีมีสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน โดยจะเข้าทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อนุมูล hydroxyl และอนุมูล peroxyl (Basu *et al.,* 1999)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นอกจากวิตามินซีสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระแล้ว ยังทำหน้าที่เป็นตัวส่งเสริมประสิทธิภาพของสารต้านออกซิเดชัน ของวิตามินอีด้วย โดยทำให้อนุมูล α-tocopherol$^{\bullet}$ (TO$^{\bullet}$) เปลี่ยนกลับไปเป็น α-tocopherol (TOH) ดังเดิม ดังสมการ (Cadenas and Packer, 1996)

$$TO^{\bullet} + AH^{-} \longrightarrow TOH + A^{\bullet}$$

วิตามินอี

เป็นวิตามินที่ละลายได้ในไขมันเป็นสารต้านออกซิเดชันที่สำคัญ โดยวิตามินอีทำงานร่วมกับสารต้านออกซิเดชัน ตัวอื่นๆ เช่น วิตามินซีและซิลิเนียมเป็นต้น วิตามินอีช่วยปรับให้ร่างกายสามารถนำเอาวิตามินเอมาใช้ ซึ่งจะช่วยในการป้องกันสารที่เป็นพิษที่มีผลมาจากโลหะ เช่น ตะกั่ว ในธรรมชาติมีวิตามินอีอยู่หลายชนิด ปัจจุบันแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ โทโคฟีรอล และ โทโคไทอินอล แต่ละกลุ่มยังแยกเป็นวิตามินย่อยๆ อีก 4 ชนิด ได้แก่ อัลฟ่า (α-) เบต้า (β-) แกมม่า (γ-) และเดลต้า (δ-) วิตามินอีทำหน้าที่เป็นตัวให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูล peroxyl ดังสมการ

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

อนุมูล α- tocopherol$^{\bullet}$ ที่เกิดขึ้น สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูล peroxyl ตัวอื่นทำให้ได้สารที่มีความเสถียร (LOO-α- tocopherol) ดังสมการ เป็นผลให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันหยุดลง (Basu *et al*., 1999)

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

ซิลิเนียม ทองแดง และสังกะสี

เป็นสารต้านออกซิเดชันทางอ้อม เนื่องจากเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชัน มีการศึกษาวิจัยที่แสดงว่าการใช้ซิลิเนียม และวิตามินอีร่วมกันช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการป้องกันการเกิดโรคมะเร็งบางชนิด ซึ่งพบได้ในอาหารตามธรรมชาติ เนื่องจากสารต้านออกซิเดชันมีหน้าที่หลายอย่าง เช่น ทำหน้าที่เป็นสารรีดิวซ์ (reducing agent) เป็นตัวขับไล่อนุมูลอิสระจับกับไอออนโลหะที่เร่งให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ด้วยหน้าที่ต่างๆเหล่านี้ จึงทำให้มีผลต่อการชะลอ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

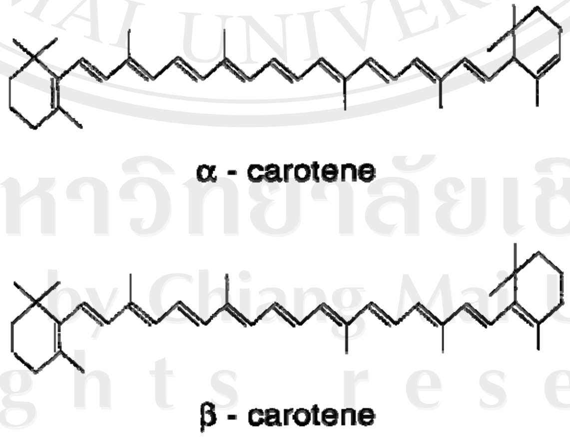
หรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน หรือสามารถหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ และทำให้เป็นสารที่มีความเสถียร หรือเป็นสารที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกซิเดชันอีกต่อไป หรือเป็นสารที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระ (non-radical product) (Basu *et al.,* 1999)

แคโรทีนอยด์

แคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุที่พบทั่วไปในธรรมชาติ จะถูกสังเคราะห์ขึ้นในคลอโรพลาสต์ของพืช และพบมากในผักและผลไม้สุก (Tomas-Barberan and Robins, 1997) โครงสร้างพื้นฐานของแคโรทีนอยด์ประกอบด้วยโครงสร้างหลักที่เรียกว่า tetraterpene skeleton ซึ่งอาจมีวงแหวนที่บริเวณปลายด้านใดด้านหนึ่งหรือทั้งสองด้านของโมเลกุล วงแหวนนี้อาจเป็นวงแหวนห้าหรือหกเหลี่ยมก็ได้ แคโรทีนอยด์สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ตามองค์ประกอบของโครงสร้างในโมเลกุลดังนี้ (Packer *et al.,* 1999)

แคโรทีน (Carotene) เป็นแคโรทีนอยด์ที่โครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยคาร์บอนและไฮโดรเจนเท่านั้น เช่น เบต้า-แคโรทีน (β-carotene) อัลฟ่า-แคโรทีน (α-carotene) แกมม่า-แคโรทีน (γ-carotene) ไลโคปีน (lycopene) เป็นต้น และซึ่ง เบต้า-แคโรทีน เป็นสารตั้งต้นของวิตามินเอ การเปลี่ยนรูปจากเบต้า-แคโรทีนไปเป็นวิตามินเอโดยการแตกพันธะคู่ที่ตำแหน่งกึ่งกลางของโมเลกุล โดยเอนไซม์ carotene deoxygenase

เมื่อเบต้า-แคโรทีน สามารถดักจับอนุมูลอิสระเข้าไว้ในโมเลกุลแล้ว โมเลกุลของเบต้า-แคโรทีนจะอยู่ในลักษณะที่มีความเสถียร



ภาพ 1 โครงสร้างทางเคมีของ อัลฟ่า-แคโรทีน (α-carotene) และเบต้า-แคโรทีน (β-carotene) (Agriculture and Consumer Protection, 1995)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ออกโซแคโรทีนอยด์ (oxocarotenoid) หรือ แซนโทฟีล (xanthophyll) เป็นแคโรทีนอยด์ที่โครงสร้างโมเลกุลบริเวณวงแหวนประกอบด้วยกลุ่มอื่นนอกเหนือจากคาร์บอนและไฮโดรเจน เช่น เบต้า-คริบโทแซนทิน (β-cryptoxanthin) และลูทีน (lutein) (Packer *et al.,* 1999)

สารประกอบฟีโนลิก (phenolic compounds)

สารประกอบฟีโนลิกเป็นสารที่พบได้ในพืชทั่วไป มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อยหนึ่งหมู่หรือมากกว่านั้น สามารถละลายน้ำได้ ที่พบในพืชมักจะรวมอยู่ในโมเลกุลของน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ (glycosides) และพบได้ในส่วนของช่องว่างภายในเซลล์ (cell vacuole) สารประกอบฟีโนลิกที่พบในธรรมชาติมีมากมายหลายชนิด มีลักษณะสูตรโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน ซึ่งกลุ่มใหญ่ที่สุดที่พบจะเป็นสารประกอบพวกฟลาโวนอยด์ (flavonoids) นอกจากนั้นยังมีสารประกอบต่างๆ เช่น simple monocyclic phenol, phenyl propanoid, phenolic quinine และ polyphenolic ซึ่งได้แก่พวก lignin, tannin เป็นต้น รวมทั้งยังพบว่ามีสารประกอบที่มีกลุ่มฟีนอล (phenolic unit) รวมอยู่ในโมเลกุลของโปรตีนอัลคาลอยด์ (alkaloid) และเทอร์พีนอยด์ (terpenoid) เป็นต้น (อัญชนา, 2544)

พบว่าสารประกอบฟีโนลิกหลายชนิดมีสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน เช่น ฟลาโวนอยด์ กรดฟีโนลิก และ แทนนิน เป็นต้น สารประกอบฟีโนลิกทำหน้าที่เป็นตัวขับไล่อนุมูลอิสระที่สำคัญคือ อนุมูล peroxyl (Packer *et al.,* 1999) โดยมีกลไก 2 แบบคือ เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นต่ำเมื่อเทียบกับสารออกซิไดซ์ สารประกอบฟีโนลิกจะป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน นอกจากนี้อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาจะถูกทำให้เป็นสารที่มีความเสถียร ดังนั้นจึงสามารถป้องกันการเกิดขั้นตอนพลอพาเกชันได้ นอกจากนี้สารประกอบฟีโนลิกบางชนิดยังทำหน้าที่เป็นสารคีเลต ดักจับไอออนของโลหะเข้าไว้ในโมเลกุล เช่น เคอร์ซิทิน (quercetin)

สารประกอบฟีโนลิกยังทำหน้าที่ทั้งเป็นสารให้อิเล็กตรอน หรือเป็นตัวให้ไฮโดรเจน และกำจัดออกซิเจนที่อยู่ในรูปแอคทีฟ ด้วยหน้าที่ต่างๆ ดังกล่าวจึงทำให้สารประกอบฟีโนลิกเป็นสารต้านออกซิเดชัน ที่สำคัญชนิดหนึ่งในพืชทั่วไป (Rice-Evans and Miller, 1996)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ฟลาโวนอยด์ (ไบโอฟลาโวนอยด์) (Buhler and Miranda, 2000)

ฟลาโวนอยด์ เป็นสารประกอบฟีนอลิกที่พบมากชนิดหนึ่ง จะพบมากในพืชผักและผลไม้ มีหน้าที่สองอย่าง คือ เป็นรงควัตถุ ทำหน้าที่กรองแสงที่มีความยาวคลื่นที่จำเพาะเจาะจง และทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชัน โดยไปกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในเซลล์พืชออกไป ความสามารถของการต้านออกซิเดชันขึ้นอยู่กับโครงสร้างของฟลาโวนอยด์ และคุณสมบัติของฟลาโวนอยด์ ยังสามารถช่วยลดการอักเสบ ช่วยให้หลอดเลือดแข็งตัว ทำให้การไหลเวียนเลือดดีขึ้น ต่อต้านแบคทีเรียและไวรัส ลดโคเลสเตอรอล และช่วยเสริมการทำงานของวิตามินซี พบได้ในพืชหลายชนิด เช่น ส้ม พริกไทย และพวกเบอร์รี่ต่างๆ เป็นต้น ฟลาโวนอยด์แบ่งได้เป็น 5 ประเภทใหญ่ๆ คือ

1. แอนโธไซยานิดิน (anthocyanidin), แอนโธคลอร์ส (anthochlors) และออโรนัส (auronus)

แอนโธไซยานิดิน เป็นรงควัตถุในพืชให้สีน้ำเงินแดง (red-blue) คือ ให้สีช่วงสีแดงถึงสีน้ำเงินขึ้นกับชนิดของพืช พบใน บลูเบอร์รี่ เชอรี่ องุ่นแดง หัวหอม กะหล่ำปลี เป็นต้น
แอนโธคลอร์ส เป็นรงควัตถุที่ให้สีเหลือง พบมากในดอกไม้

2. ฟลาโวนอยด์ที่พบน้อย (minor flavonoid)

ฟลาโวนอยด์ที่พบน้อยในธรรมชาติ ได้แก่ ฟลาโวโนน (flavonones) ฟลาวาน-3-ออล (flava-3-ols) ไดไฮโดรฟลาโวน (dihydroflavone) และไดไฮโดรชาล์โคน (dihydrochalcones) กลุ่มนี้พบในพืชตระกูลส้ม (citrus) ได้แก่ ส้ม องุ่น แต่จะพบในส่วนที่เป็นน้ำ

3. ฟลาโวน (flavone) และฟลาโวนอล (flavonols)

เป็นกลุ่มที่พบมากที่สุดของฟลาโวนอยด์ พบใน บลูเบอร์รี่ เชอรี่หวาน บลอคคอลี่ หัวหอม ชาดำ ชาเขียว ไวน์แดง มันฝรั่ง มะเขือเทศ แครท ผักขม ส้ม ลูกแพร แอปเปิ้ล องุ่น เป็นต้น

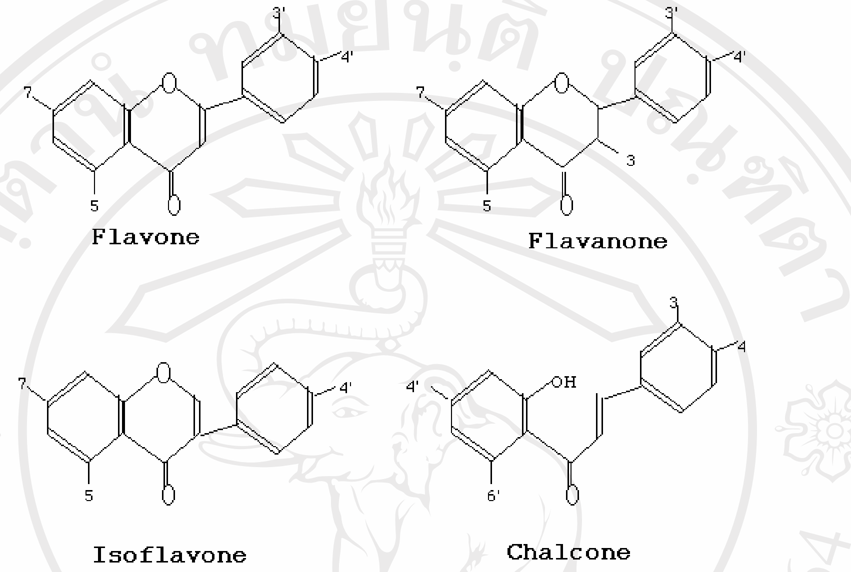
4. ไอโซฟลาโวนอยด์ (isoflavonoid)

พบมากในพืชตระกูลถั่ว (*Leguminosae*; Legume) พวกนี้สามารถเปลี่ยนเป็นไอโซฟลาโวน (isoflavone) เทอโรคาร์แปนส์ (terocarpans) ไอโซฟลาวาน (isoflavans) และโรทีนอยด์ (rotenoid) ได้โดยทั่วไปจะรวมถึง เจนีสทีน (genistein) ไบโอชานิน เอ (biochanin a) และไดด์ซีน (daidzein)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. แทนนิน (tannin)

แทนนิน หรือโปรแอนโธไซยานิดิน เป็นสารประเภทโพลีฟีนอล (polyphenols) แทนนินสามารถเพิ่มค่าการต้านออกซิเดชัน เนื่องจากสามารถจับกับโปรตีนได้



ภาพ 2 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟีนอลิกชนิดต่างๆ (Watanabe, 2000)

สารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ (โอภา และคณะ, 2549)

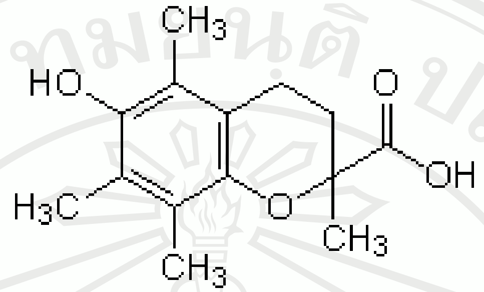
สารต้านออกซิเดชันที่พัฒนาสังเคราะห์ขึ้นส่วนใหญ่จะออกแบบให้มีโมเลกุลขนาดเล็ก และใช้โครงสร้างของสารต้านออกซิเดชัน ที่มีในธรรมชาติ นำมาดัดแปลงให้มีคุณสมบัติทางเคมีและมีฤทธิ์ที่ดีขึ้น เช่น สารต้านออกซิเดชันที่พัฒนาจากสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ โดยพัฒนามาจากโครงสร้างของวิตามินอี และโครงสร้างสารโพลีฟีนอล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Trolox

หรือ 6-hydroxy-2, 5, 7, 8- tetramethylchroman-2-carboxylic acid มีสูตรโมเลกุลทางเคมีคือ $C_{14}H_{18}O_4$เป็นอนุพันธ์ของวิตามินอีที่ดัดแปลงโครงสร้างโดยการเปลี่ยนสายอัลเคนเป็นหมู่คาร์บอกซิลิก มีสูตรโครงสร้างทำให้มีความสามารถละลายได้ดีในน้ำ แต่เนื่องจากความสามารถในการละลายน้ำได้ดีดีจึงทำให้การออกฤทธิ์เร็วกว่าวิตามินอี โดยวิตามินต้องใช้เวลานานเป็นชั่วโมงหรือเป็นวัน ในขณะที่

Trolox ออกฤทธิ์เกือบจะทันทีในวิธีการตรวจสอบหลายวิธี ในการวิจัยนิยมใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐานในการตรวจสอบกิจกรรมต้านออกซิเดชัน (โอภา และคณะ, 2549)

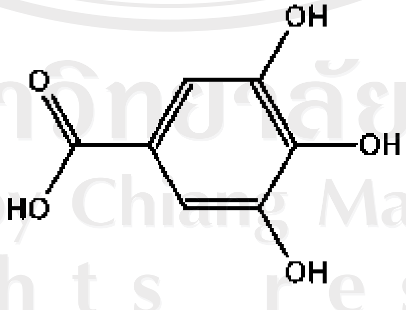


ภาพ 3 โครงสร้างทางเคมีของ Trolox

(Calbiochem®, 2003)

Gallic acid

หรือ 3, 4, 5-hydroxybenzoic acid เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีสูตรโมเลกุลทางเคมีคือ $C_7H_6O_5$ Gallic acid เป็นส่วนประกอบของแทนนิน พบมากในองุ่น ใบชา เปลือกไม้โอ๊ค และพืชอื่นๆ โดยทั่วไปจะใช้เกี่ยวกับอุตสาหกรรมทางยา คุณสมบัติของ Gallic acid คือ สามารถยับยั้งเชื้อรา เชื้อไวรัส และมีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันได้ดี (Reynolds and Wilson, 1991)



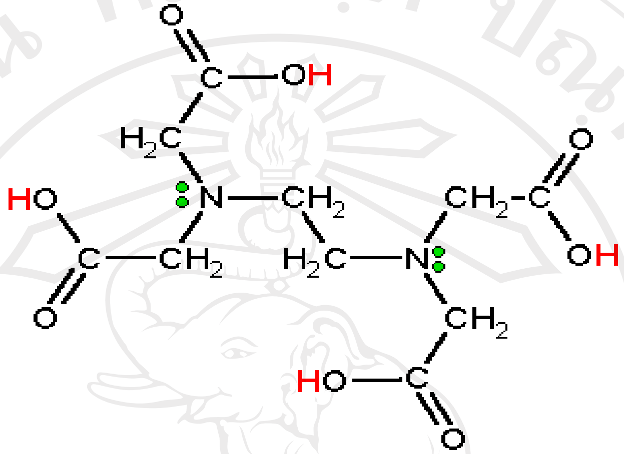
ภาพ 4 โครงสร้างทางเคมีของ Gallic acid

(Anonymous, No date)

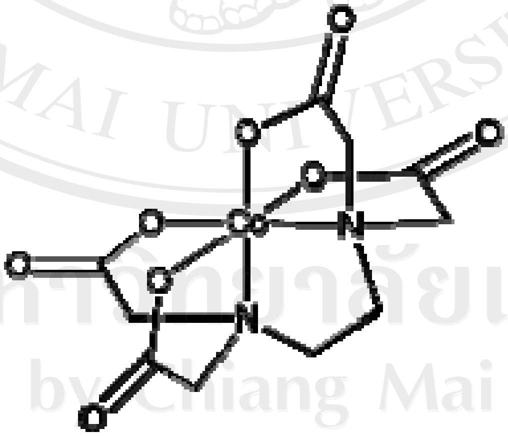
EDTA

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หรือ Ethylenediaminetetraacetic acid มีสูตรโมเลกุลทางเคมีคือ $C_{10}H_{16}N_2O_8$ มีคุณสมบัติเป็นสารคีเลต โดยการจับกับธาตุโลหะที่มีประจุ เช่น ตะกั่ว เหล็ก สังกะสี แคดเมียม แมงกานีส และทองแดง ซึ่งประโยชน์ทางการแพทย์สามารถนำมาใช้กำจัดไอออนของโลหะต่างๆได้ (Holleman and Wiberg, 2001)



ภาพ 5 โครงสร้างทางเคมีของ EDTA (Sinex, 2007)



ภาพ 6 โครงสร้างทางเคมีของ EDTA จับกับไอออนของโลหะ

(Harrison, 1997)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติมีมากมายหลายชนิด ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำลายสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ และทำให้เกิดโรคต่างๆตามมา อนุมูลที่สำคัญ ได้แก่ Superoxide radical, Hydroxyl radical, สารอัลดีไฮด์ต่างๆที่เกิดจากกระบวนการ Lipid peroxidation ฯลฯ จึงมีการคิดวิธีสังเคราะห์อนุมูลอิสระเหล่านี้ในหลอดทดลอง และทดสอบความสามารถของสารในการยับยั้งอนุมูลอิสระเหล่านี้ จึงมีหลายวิธีที่นิยมใช้ในการทดสอบ ดังนี้

วิธีการวัดความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ 7 วิธี ได้แก่

1. วิธี Scavenging activity of ABTS radical (Re *et al.*, 1999)

วิธีนี้เป็นวิธีวัดทางอ้อมโดยใช้สาร 2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) หรือ ABTS มีสูตรโมเลกุล $C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$ มาทำให้เป็นอนุมูลอิสระโดยการถูกออกซิไดซ์ด้วยโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ให้กลายเป็น $ABTS^{+\bullet}$ ซึ่งเป็นอนุมูลที่มีสีฟ้า-เขียว มี λ_{max} ที่ 660, 734 และ 820 nm แต่จะนิยมวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm โดยปรับค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้น $ABTS^{+\bullet}$ ให้เป็น 0.700 ± 0.02 เมื่อเติมสารทดสอบที่มีกิจกรรมต้านออกซิเดชัน จะทำให้ $ABTS^{+\bullet}$ ลดลง ซึ่งทำให้สีจางลง และสามารถนำไปคำนวณเป็น % inhibition ได้ตามสมการ

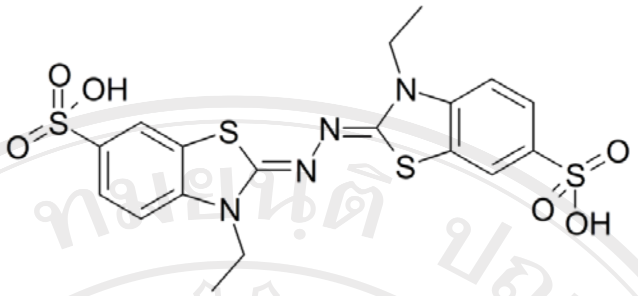
$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{734\ control} - A_{734\ test\ sample}) / A_{734\ control}] \times 100$$

ผลการวิเคราะห์จะคำนวณเป็นค่าที่สัมพันธ์กับสารต้านออกซิเดชันมาตรฐาน Trolox จึงมีชื่อว่า Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)

ข้อดีของวิธีนี้ คือ ทำได้ง่าย อนุมูล $ABTS^{+\bullet}$ จะทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับสารต้านออกซิเดชัน อนุมูล $ABTS^{+\bullet}$ ละลายได้ทั้งในน้ำและสารทำละลายอินทรีย์ จึงทำให้ศึกษาได้ทั้งในสารที่ละลายในน้ำหรือละลายในไขมัน ส่วนข้อเสียของวิธีนี้ คือ ABTS ไม่เป็นสารตามธรรมชาติที่ก่อให้เกิดอนุมูลในเซลล์หรือร่างกาย

$$\underset{\lambda_{max}\,734\ nm}{\mathbf{ABTS^{+\bullet}}} \xrightarrow{+\ antioxidant} \underset{colourless}{\mathbf{ABTS}}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 7 โครงสร้างทางเคมีของ ABTS [2, 2’-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)] (Lemi, 2007)

2. วิธี DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical (Hou *et al.*, 2001)

อนุมูล $DPPH^{\bullet}$ เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัว มีสีม่วง อยู่ในรูปอนุมูลอยู่แล้ว โดยไม่ต้องทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดอนุมูลเหมือนกับกรณีอนุมูล $ABTS^{+\bullet}$ การวิเคราะห์เป็นการวัดความสามารถของสารทดสอบในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยวิธีให้ไฮโดรเจนอะตอม การวัดทำโดยใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) วัดการลดลงของสี เมื่อเติมสารต้านออกซิเดชันลงไป โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

DPPH radical ใช้ในการทดสอบความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระของสารตัวอย่าง (scavenging activity) สารละลายของ $DPPH^{\bullet}$ มีสีม่วงในเอทานอล และเมื่อได้รับ H จะเปลี่ยนเป็นสารละลายสีเหลือง ตามสมการดังนี้ (Blois, 1958)

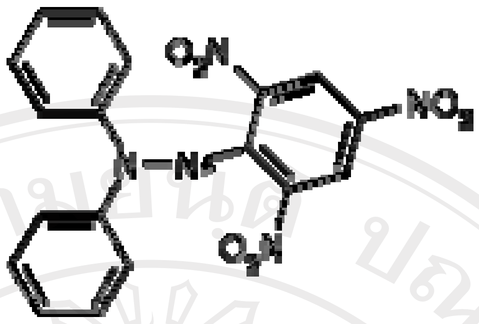
$$DPPH^{\bullet} + RH \longrightarrow DPPH\text{-}H + R^{\bullet}$$

สีม่วง	ตัวอย่างทดสอบ		สีเหลือง	

ค่าที่วัดได้จะแสดงความสามารถในการสารต้านออกซิเดชันออกมาในค่า % inhibition ตามสมการดังนี้

$$\% \text{ inhibition} = [(A_{517\ control} - A_{517\ test\ sample}) / A_{517\ control})] \times 100$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 8 โครงสร้างทางเคมีของ DPPH radical
(KubáĈek, 2004)

ข้อดีของวิธีนี้คือ ทำได้ง่าย นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลของสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ

ข้อเสียของวิธีนี้คือ อนุมูล DPPH• มีความคงตัวไม่ไวต่อการทำปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลที่เกิดในเซลล์หรือร่างกาย ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่สามารถแยกแยะจัดอันดับอนุมูลที่มีความไวสูงได้

3. วิธี Hydroxyl (OH) radical scavenging activity (Ohkawa *et al.*, 1979)

Hydroxyl radical (OH•) เป็นอนุมูลอิสระที่ว่องไว สามารถจู่โจมชีวโมเลกุลที่สำคัญในร่างกายโดยการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่อย่างต่อเนื่อง (Spencer *et al.*, 1994) สิ่งมีชีวิตสามารถสร้าง OH• radical โดย 2 กลไก ได้แก่

a. ปฏิกิริยาของไอออนโลหะทรานซิชันกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) แม้ว่าเกลือของโลหะทรานซิชันทั่วไปทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 ได้ OH• แต่ในร่างกายนั้น เป็นไปได้ว่าเกิดจากเหล็ก Fe^{2+} ทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 ได้ OH• โดยเรียกปฏิกิริยานี้ว่า Fenton reaction ดังสมการ

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{2+} + OH^{\bullet} + OH^{-} \quad \text{(Fenton reaction)}$$

b. การแตกตัวของน้ำ เนื่องจากการถูกแสงหรือรังสี ดังสมการ

$$H_2O + hv \longrightarrow H_2O^{+\bullet} + e^{-}$$
$$H_2O^{+\bullet} + H_2O \longrightarrow OH^{\bullet} + H_3O^{+}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในการศึกษาความสามารถในการยับยั้ง $OH^{\bullet}$ radical ของสารตัวอย่าง ต้องทำการสังเคราะห์ Hydroxyl radical ($OH^{\bullet}$) จากน้ำตาล deoxyribose โดยปฏิกิริยา Fenton reaction model system เมื่อเติมสาร Thiobarbituric acid (TBA) และ Trichloroacetic acid จะเกิดเป็นสีชมพู เมื่อเติมสารที่ต้องการทดสอบที่มีความสามารถในการยับยั้ง $OH^{\bullet}$ radical ลงไป จะทำให้สีชมพูของสารละลายจางลง โดยสามารถตรวจสอบได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 nm (Mathew and Abraham, 2006) จากนั้นนำไปคำนวณเป็น % inhibition ได้ตามสมการ

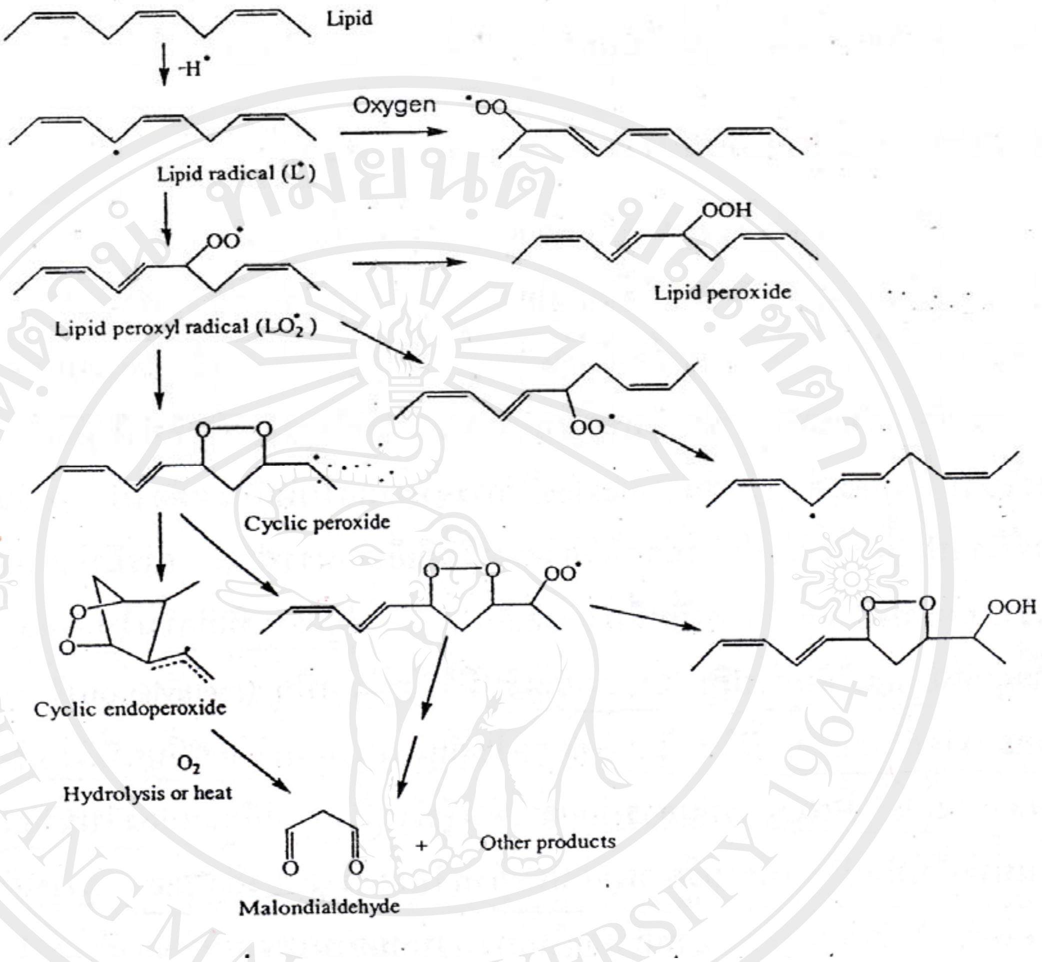
$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{532\ control} - A_{532\ test\ sample}) / A_{532\ control}] \times 100$$

4. วิธี Lipid peroxidation in liver homogenates (Halliwell *et al.*, 1987)

เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันแบบลูกโซ่ของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว อนุมูลอิสระเพียง 1 อนุมูลสามารถทำให้เกิดลิปิดเปอร์ออกไซด์ เป็นจำนวนหลายร้อยโมเลกุลก่อนที่จะสิ้นสุดปฏิกิริยา เนื่องจากปฏิกิริยา Lipid peroxidation สามารถเกิดได้ง่ายกับเยื่อหุ้มเซลล์ ที่ประกอบด้วยลิปิด 2 ชั้นการเกิดลิปิดออกซิเดชันกับลิปิดในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ มีคุณสมบัติที่เปลี่ยนไป ยังส่งผลกระทบต่อเอนไซม์และรีเซพเตอร์ที่ฝังตัวอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เอนไซม์และรีเซพเตอร์มีการทำงานที่เสียไป เป็นสาเหตุในเกิดโรคต่างๆ ได้อีกด้วย ผลผลิตที่เกิดขึ้นมาจาก Lipid peroxidation ได้แก่ สารไฮโดรคาร์บอน เช่น อีเทน อีทีน และเพนเทน รวมถึง สารคีโตน และสารอัลดีไฮด์ เป็นต้น ซึ่งสารอัลดีไฮด์ที่มีความสำคัญ คือ มาลอนไดอัลดิไฮด์ (Malondialdehyde, MDA)

Lipid peroxidation เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่ ปฏิกิริยาเริ่มต้นของการเกิดโซ่ ปฏิกิริยาการทวีเพิ่มขึ้น และการสิ้นสุดปฏิกิริยา ปฏิกิริยาลูกโซ่เริ่มต้นด้วยการมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้น และอนุมูลอิสระนี้เข้าทำปฏิกิริยากับลิปิดและทำให้เกิดอนุมูลลิปิด ($L^{\bullet}$ หรือ $R^{\bullet}$) ดังภาพ 9 ที่แสดงถึงกลไกการเกิดปฏิกิริยา Lipid peroxidation (โอภา และคณะ, 2549)

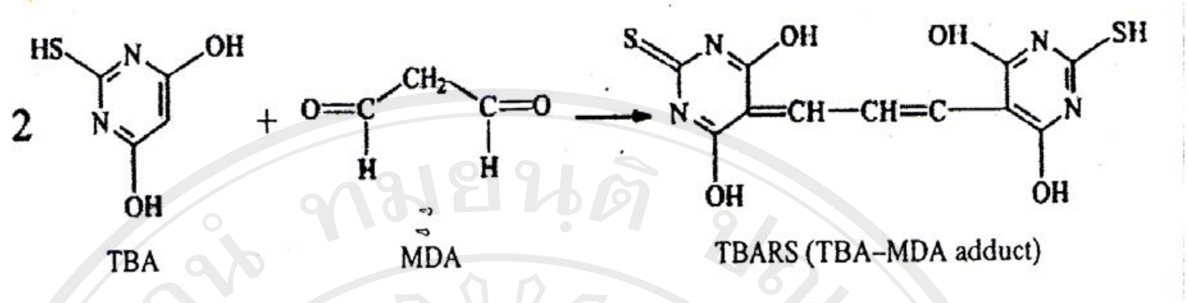
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 9 กลไกการเกิดปฏิกิริยา Lipid peroxidation (โอภา และคณะ, 2549)

วิธีนี้เป็นการวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้ง Lipid peroxidation ของสารสกัดทดสอบ โดยใช้ตับหนูมาทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน แล้วทำให้เกิดผลผลิตจากปฏิกิริยา Lipid peroxidation ได้เป็นสารมาลอนไดอัลดีไฮด์ (Malondialdehyde, MDA) จากนั้นเติมกรดไทโอบาร์บิทูริกในสภาวะกรด สาร MDA จะทำปฏิกิริยากับกรดไทโอบาร์บิทูริก ได้เป็นสารมีสีเรียกว่า TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) ดังภาพ 10 เมื่อเติมสารสกัดทดสอบที่มีความสามารถในการยับยั้ง Lipid peroxidation ลงไป จะทำให้สารสีจางลง จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 nm (โอภา และคณะ, 2549)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 10 ปฏิกิริยาการเกิด TBARS (โอภา และคณะ, 2549)

ข้อดีของวิธีการนี้ คือ ทำการศึกษาง่าย สะดวก ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาสูง แต่มีข้อเสีย คือ ต้องใช้สิ่งมีชีวิตในการทำการทดลอง ทำให้ลดความนิยมลง

เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงแล้วนำไปคำนวณหา % inhibition ตามสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = [\ (\ A_{532\ control} - A_{532\ test\ sample}\ )\ /\ A_{532\ control}]\ x\ 100$$

5. วิธี Metal chelating activity (Dinis *et al.*, 1994)

การวัดความสามารถในการแย่งจับกับโลหะเป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในการหาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารที่ต้องการทดสอบ เพราะโลหะไอออนเป็นตัวการสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาทำให้เกิดสารอนุมูลอิสระต่างๆมากมายหลายชนิด โดยเฉพาะธาตุเหล็กที่อยู่ในรูปเฟอร์รัส หรือ Fe^{2+} จะทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับออกซิเจนในอากาศ เกิดเป็นสารอนุมูล Superoxide anion radical ($O_2^{-\bullet}$) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระตัวเริ่มต้นที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระตัวอื่นๆต่อไป ดังนั้นวิธีการวัดความสามารถในการแย่งจับโลหะ Fe^{2+} ของสารที่ต้องการทดสอบนั้น อาศัยจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 562 nm ที่มีค่าลดลง โดยเมื่อเติมสาร Ferrozine ลงไป สารนี้จะไปจับกับ Fe^{2+} แล้วอยู่ในรูป Ferrozine - Fe^{2+}complex ซึ่งจะให้สีแดง และถ้าสารที่ต้องการทดสอบมีความสามารถในการแย่งจับกับ Fe^{2+} จะอยู่ในรูป Antioxidant - Fe^{2+} complex แล้วจะทำให้สีแดงของ Ferrozine - Fe^{2+}complex จางลงได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงแล้วนำไปคำนวณหา % inhibition ตามสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{562\ control} - A_{562\ test\ sample}) / A_{562\ control}] \times 100$$

6. วิธี Superoxide radical scavenging (Nikishimi *et al.*, 1972)

Superoxide anion radical ($O_2^{-\bullet}$) เป็นอนุมูลเริ่มแรกที่เกิดขึ้นในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตและเป็นตัวเริ่มต้นที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระตัวอื่นๆอีกมากมายจากการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ นอกจากจะทำให้อนุมูลอิสระมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นแล้ว ฤทธิ์และความแรงของอนุมูลอิสระที่เกิดจากปฏิกิริยาลูกโซ่เป็นอันตรายสูงขึ้นด้วย แต่ตัวของ $O_2^{-\bullet}$ จะมีความว่องไวน้อยกว่า $OH^{\bullet}$ ซึ่งการเกิด $O_2^{-\bullet}$ เป็นดังสมการ

$$O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{-\bullet}$$

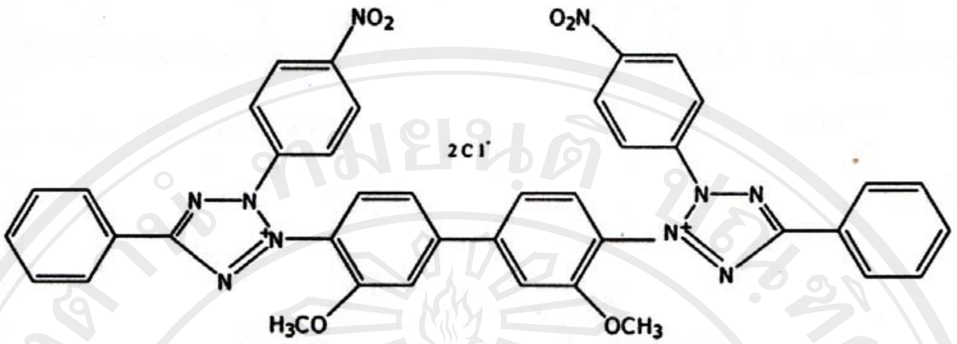
$$O_2^{-\bullet} + O_2^{-\bullet} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

เมื่อ $O_2^{-\bullet}$ ทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 จะทำให้เกิด $OH^{\bullet}$ เรียกปฏิกิริยานี้ว่า Haber-Weiss reaction (Kappus, 1992) ดังสมการ

$$O_2^{-\bullet} + H_2O_2 + H^+ \longrightarrow OH^{\bullet} + O_2 + H_2O$$

การศึกษาสมบัติการเป็นสารจับ $O_2^{-\bullet}$ ของสารตัวอย่าง ซึ่ง $O_2^{-\bullet}$ จะผลิตมาจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารในระบบ Phenazine methosulphate (PMS) – Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) อนุมูล $O_2^{-\bullet}$ ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับสาร Nitroblue tetrazolium (NBT) ซึ่งมีสีเหลือง โดยมีโครงสร้างทางเคมีดังภาพ 11

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 11 โครงสร้างทางเคมีของ Nitroblue tetrazolium (NBT)
(โอภา และคณะ, 2549)

ปฏิกิริยาระหว่าง $O_2^{-\bullet}$ กับสาร NBT ให้ผลิตภัณฑ์เป็นสาร diformazan (DF) ที่มีสีน้ำเงิน และสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ 560 nm จากนั้นนำไปคำนวณเป็น % inhibition ได้ตามสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{560\ control} - A_{560\ test\ sample}) / A_{560\ control}] \times 100$$

7. วิธี Reducing power (Oyaizu, 1986)

ความสามารถของการเป็นตัวให้อิเล็กตรอนในปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันของสารที่ต้องการทดสอบ สามารถใช้ในการหาความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้

วิธีนี้เป็นการศึกษาความสามารถในการรีดิวซ์ หรือให้อิเล็กตรอนของสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบแก่สารอนุมูลอิสระที่สังเคราะห์ขึ้นภายในระบบ โดยสารที่ต้องการทดสอบจะเป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระแล้วทำให้เปลี่ยนเป็นสารที่คงตัว อีกทั้งยังสามารถหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระอีกด้วย โดยอาศัยจากการวัดปฏิกิริยา reduction ของ $Fe^{3+}(CN^-)_6$ ไปเป็น $Fe^{2+}(CN^-)_6$ ซึ่งจะทำให้มีสีน้ำเงินที่เข้มขึ้น สามารถตรวจสอบความสามารถในการรรีดิวซ์ได้ จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 nm ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นแสดงถึง ความสามารถในการรีดิวซ์ที่มากขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

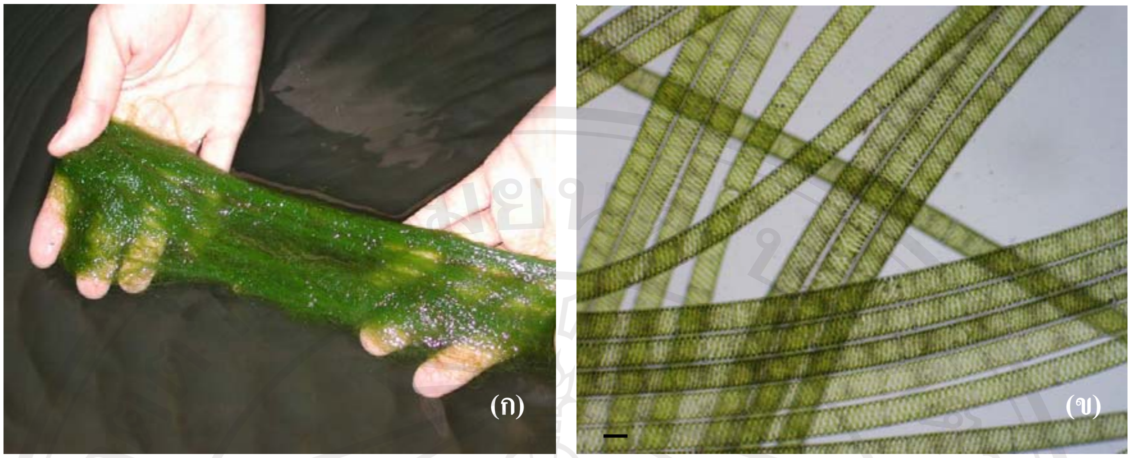
ความรู้เกี่ยวกับสาหร่าย *Spirogyra* spp. (ยุวดี, 2549)

สาหร่ายชนิดนี้จัดอยู่ใน Division Chlorophyta, Order Zygnematales, Class Zygnemaphyceae, Family Zygnemataceae มักเกิดรวมกันเป็นกลุ่ม อาจอยู่กันก้นบ่อกับก้อนดิน ก้อนหิน หรืออาจจะลอยอยู่บริเวณผิวน้ำ จีนัสนี้มีประมาณ 290 ชนิด แต่ละชนิดมีความแตกต่างกันตามขนาดและรูปร่างของเซลล์ จำนวนของคลอโรพลาสต์ การสืบพันธุ์ ขนาด และสีของไซโกต

ลักษณะของสาหร่ายชนิดนี้จะเป็นเส้นสายยาว ไม่แตกแขนง คล้ายเส้นผมสีเขียวสด จับดูจะรู้สึกลื่นมือ เนื่องจากมีเมือกหุ้มอยู่ภายนอก เซลล์จะมีรูปร่างเป็นรูปทรงกระบอก ซึ่งมีขนาดตั้งแต่ความยาวเท่าความกว้าง จนถึงความยาวมากกว่าความกว้างหลายเท่า ผนังเซลล์มี 3 ชั้น ชั้นในและชั้นกลางเป็นพวกเซลลูโลส ส่วนชั้นนอกเป็นพวกเพคโตส (pectose) ภายในเซลล์มีแวคิวโอลตรงกลางอันใหญ่ มีนิวเคลียสแขวนลอยอยู่ โดยมีสายไซโตพลาสซึม (cytoplasmic strand) เชื่อมโยงและยึดไว้กับผนังเซลล์ ภายในไซโตพลาสซึมอาจเกิดปรากฏการณ์ไซโคลซิส (cyclosis) คลอโรพลาสต์อาจมีตั้งแต่ 1 อัน หรือหลายๆอันขึ้นอยู่กับอายุและชนิด มีลักษณะเป็นเส้นขดจากปลายเซลล์ข้างหนึ่งไปยังอีกข้างหนึ่ง ลักษณะการขดของคลอโรพลาสต์เป็นลวดลายคล้ายริบบิ้น บนเส้นสายคลอโรพลาสต์จะมีไพรีนอยด์เรียงเป็นแถวตลอดสาย ผนังเซลล์ด้านขวางจะเชื่อมโยง โดยมีความกว้างระหว่างเซลล์ต่อเซลล์ มองดูเป็นรูปตัว H สาหร่ายในจีนัสนี้บางชนิดสามารถเคลื่อนที่ได้แบบร่อน (gliding) (ภาพ 12)

Spirogyra spp. นี้มีชื่อสามัญว่า เตา หรือเทา หรือเทาน้ำ นำมารับประทานได้โดยเฉพาะในแถบภาคเหนือนิยมนำมาปรุงเป็นอาหารที่เรียกว่า ยำเตา คุณค่าทางโภชนาการของสาหร่ายชนิดนี้ประกอบด้วยโปรตีน 18.63-23.76% ไขมัน 2.86-5.21 % คาร์โบไฮเดรต 53.98-56.31% เส้นใย (fiber) 6.24-7.66% และเถ้า 11.78% โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (บุญมี, 2530; Peerapornpisal *et al.*, 1997) นับว่ามีคุณประโยชน์ทางโภชนาการพอสมควร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 12 สาหร่าย *Spirogyra* spp. (ก) ภาพในภาคสนาม (ข) ภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Scale bar = 50 µm)

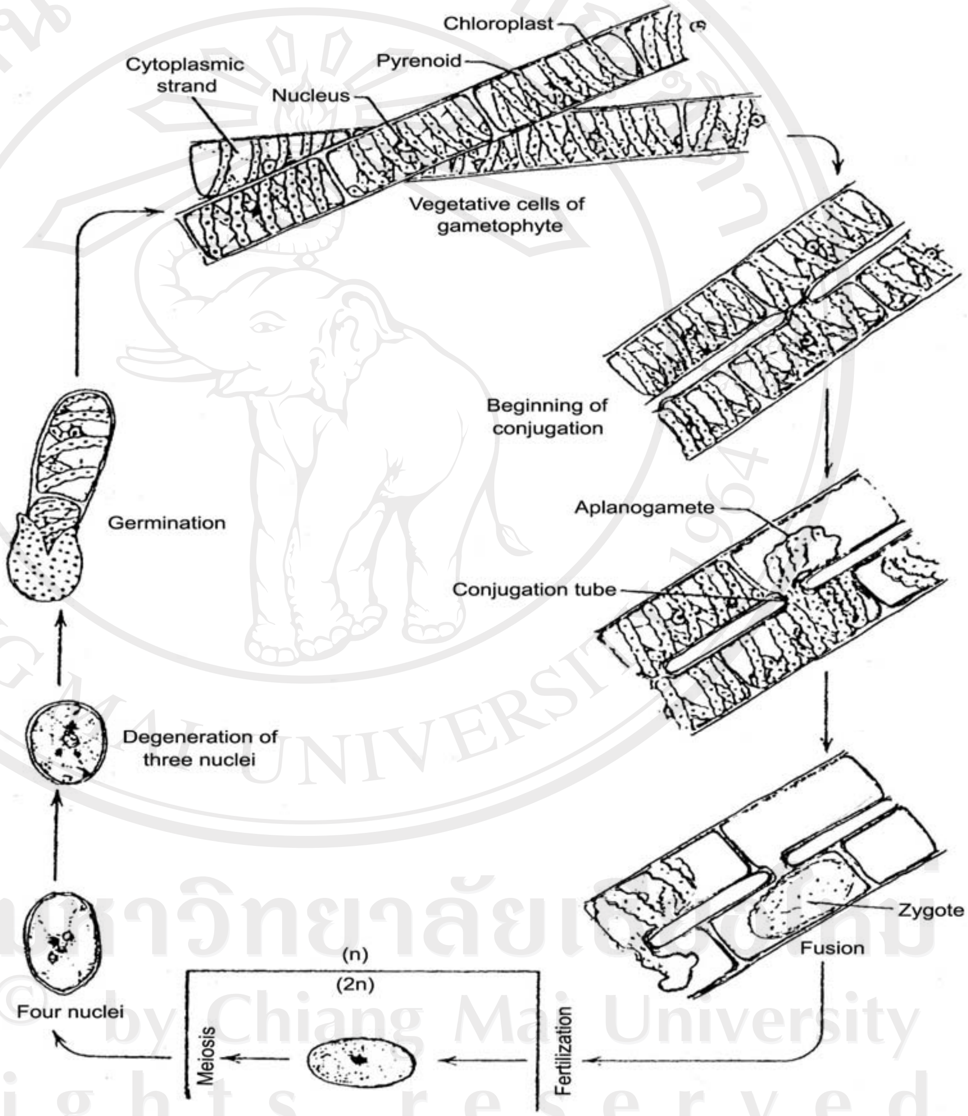
Spirogyra spp. มีการสืบพันธุ์มี 2 แบบ คือ แบบไม่อาศัยเพศโดยการขาดเป็นท่อน และการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการรวมกันของแกมมีท ซึ่งจะเคลื่อนที่ผ่านท่อคอนจูเกชัน ซึ่งมี 2 แบบ คือ สคาลาริฟอร์มคอนจูเกชัน (scalariform conjugation) และแลเทอรัลคอนจูเกชัน (lateral conjugation) หรือเทอมินัลคอนจูเกชัน (terminal conjugation) มีรายละเอียดดังนี้

(ก) สคาลาริฟอร์มคอนจูเกชัน วิธีการนี้เป็นการผสมต่างสาย หรือต่างทัลลัส โดยที่เซลล์ทุกเซลลในสายจะสร้างแกมมีทเพศเดียวกันตลอดสาย หรือสร้างแกมมีททั้งสองเพศในสายเดียวกัน แกมมีทแต่ละแกมมีทเกิดจากโปรโตพลาสต์ในแต่ละเซลล์นั่นเอง เมื่อถึงระยะเวลาผสมพันธุ์ *Spirogyra* spp. 2 สาย จะเข้ามาใกล้กันแบบคู่ขนาน แล้วปล่อยเมือกออกมาหุ้มสายทั้งสองไว้ ต่อมาผนังเซลล์ด้านที่อยู่ใกล้กันจะโป่งออกมาแล้วยื่นมาแตะกัน ในที่สุดก็เชื่อมกันเป็นท่อ เรียกว่า ท่อคอนจูเกชันขณะเดียวกันโปรโตพลาสต์จะหดตัวรวมกันเป็นก้อน โปรโตพลาสต์ซึ่งเป็นแกมมีทเพศผู้จะเคลื่อนที่ผ่านท่อคอนจูเกชันไปรวมกับโปรโตพลาสต์ของแกมมีทเพศเมียกลายเป็นไซโกตต่อไป (ภาพ 13)

(ข) แลเทอรัลคอนจูเกชัน หรือเทอมินัลคอนจูเกชัน วิธีการนี้เกิดในสาย หรือทัลลัสเดียวกันเมื่อถึงระยะเวลาผสมพันธุ์ ผนังเซลล์ที่กั้นระหว่างเซลล์ 2 เซลล์ ซึ่งแต่ละเซลล์จะทำหน้าที่เป็นแกมมีทจะขาดออกเป็นรูเล็กๆ ส่วนผนังเซลล์ที่เชื่อมต่อระหว่างเซลล์ทั้งสองจะโป่งออกเป็นโปรโตพลาสต์ที่ทำหน้าที่เป็นแกมมีทเพศผู้จะเคลื่อนที่ผ่านช่องทางนี้มารวมกับโปรโตพลาสต์ที่ทำหน้าที่เป็นแกมมีทเพศเมียกลายเป็นไซโกต (Zygote) และไซโกสปอร์ (Zygospore) ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไซโกสปอร์ มีหลายรูปร่าง เช่น subspherical, ovoid, ellipsoidal, flattened หรือ lens-shaped ผนังชั้นนอกของไซโกสปอร์ เป็นเซลลูโลส โปร่งแสง ย่นหรือมีลวดลายเป็นจุดๆ แต่ไม่ชัดเจน ผนังชั้นกลาง จะบางและเรียบ สีของไซโกสปอร์มีตั้งแต่สีเหลืองอ่อนไปจนถึงสีน้ำตาลแก่



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 13 วงจรชีวิตของ *Spirogyra* spp. (Haynes, 1975)

การจัดจำแนกชนิดของสาหร่าย *Spirogyra* spp. ใช้หลักการของลักษณะทางสัณฐานวิทยาหลายองค์ประกอบ เช่น ขนาดความกว้างความยาวของเส้นสาย ลักษณะของผนังกั้นระหว่างเซลล์ อาจเป็นแบบระนาบ (end wall plane) หรือมีลักษณะซ้อนพับเป็นวงแหวน (replicate) หรืออาจมีลักษณะเป็นปลอกรอบระหว่างรอยต่อระหว่างเซลล์ (colligate) จำนวนของคลอโรพลาสต์ จำนวนของรอบหมุนเป็นเกลียวของคลอโรพลาสต์ ลักษณะของการคอนจูเกชัน เช่น เป็นแบบ ladder-like หรือ lateral รูปร่างของท่อคอนจูเกชัน และลักษณะของไซโกสปอร์ เช่น ขนาด สี รูปร่าง (John *et al*., 2002)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสาหร่ายชนิดต่างๆ

มีรายงานการวิจัยความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสาหร่ายน้ำจืด ธนิษฐา (2550) ทำการศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของสาหร่ายน้ำจืด 3 ชนิด คือ สาหร่ายไก (*Cladophora glomerata* Kützing) สาหร่ายลอน (*Nostochopsis lobatus* Wood em Guitler) และสาหร่าย *Spirogyra* นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ และเอทานอล แล้วนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{+\bullet}$ radical พบว่าสาหร่ายที่มีคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชันมากที่สุดคือ สารสกัดด้วยน้ำของสาหร่าย *Spirogyra* sp. โดยมีความเข้มข้นที่ยับยั้งได้ 50% (IC_{50}) เท่ากับ 0.52 mg/ml รองลงมาคือ สารสกัดด้วยเอทานอลของสาหร่าย *Spirogyra* sp. สารสกัดด้วยน้ำของสาหร่ายไก สารสกัดด้วยเอทานอลของสาหร่ายลอน สารสกัดด้วยน้ำของสาหร่ายลอน และสารสกัดด้วยเอทานอลของสาหร่ายไก ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.06, 2.93, 5.36, 25.79 และ 31.62 mg/ml และปาวลี (2550) ทำการศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสาหร่ายสีเขียว *Caulerpa recemosa* var. *corynephora* (Montagne) Weber-van Bosse ด้วยตัวทำละลายต่างๆ 5 ชนิด พบว่าปริมาณ % yield ในสาหร่ายที่สกัดด้วย เมทานอล มีปริมาณมากที่สุด รองลงมาคือเอทานอล ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซีเตท และอะซีโตน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 5.673, 1.839, 1.273, 0.440 และ 0.126 ตามลำดับ สำหรับการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{+\bullet}$ radical พบว่า สารสกัดสาหร่ายด้วยอะซีโตน มีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระมากที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดด้วยเอทิลอะซีเตท สารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน สารสกัดด้วยเอทานอล และสารสกัดด้วยเมทานอล โดยมีค่าเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox เท่ากับ 0.525 $\pm$ 0.022, 0.396 $\pm$ 0.005, 0.388 $\pm$ 0.008, 0.297 $\pm$ 0.002 และ 0.280 $\pm$ 0.006 µmol Trolox /g ของสารสกัด ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยเกี่ยวกับความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสาหร่ายทะเลหลายชนิด ดังเช่น Matsukawa *et al.* (1997) ศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลจากสาหร่ายทะเล 17 ชนิด โดยทดสอบความสามารถในการยับยั้ง $DPPH^{\bullet}$ radical พบว่าสารสกัดของสาหร่ายสีน้ำตาล *Sargassum* มีความสามารถในการยับยั้ง $DPPH^{\bullet}$ radical สูงสุด Jiménez-Escrig *et al.* (2001) ศึกษาความสามารถการต้านออกซิเดชันของสารสกัดด้วยน้ำของตัวอย่างสาหร่ายทะเลสดและตากแห้ง 5 ชนิดคือ *Fucus vesiculosus*, *Laminaria ochroleuca*, *Undaria pinnatiffina*, *Chondurs crispus stackh*, *Porphyra umlibicalis* โดยวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และทดสอบความสามารถในการยับยั้ง $DPPH^{\bullet}$ radical, ferric-reducing antioxidant power พบว่าสารสกัดของสาหร่ายทะเล *Fucus* มีความสามารถในการยับยั้ง $DPPH^{\bullet}$ radical และมีความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ Fe^{2+} ได้มากที่สุดโดยเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox มีค่า 0.18 และ0.07 mmol of Trolox ตามลำดับ และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุดและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการยับยั้งออกซิเดชัน ต่อมา Ismail and Hong (2002) ได้ทำการศึกษาความสามารถในการออกซิเดชันของสาหร่ายทะเล 4 ชนิดคือ Nori (*Porphyra* sp.), Kumbu (*Laminaria* sp.), Wakame (*Undaria* sp.) และ Hijiki (*Hijikia* sp.) นำมาสกัดด้วยน้ำและเอทานอล และทดสอบความสามารถในการยับยั้ง $DPPH^{\bullet}$ radical จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงที่ความยาวคลื่น 517 nm พบว่าสารสกัดด้วยน้ำของ Kumbu มีความสามารถในการยับยั้งสูงที่สุด คือ 63% เมื่อเทียบกับสาหร่ายชนิดอื่น โดยที่สารสกัดของน้ำของ Kumbu, Nori และHijiki มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันมากกว่า Wakame แต่ Wakame ที่สกัดด้วยเอทานอล แสดงความสามารถในการยับยั้งได้สูงสุดคือ 58% และมีค่าIC_{50}= 0.42 mg/ml และ Lim *et al.* (2002) ทำการศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล (*Sargassum siliquastrum*)โดยวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดจากส่วนต่างๆที่แยกได้จากโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ และศึกษาการยับยั้ง Hemolysis ของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ถูกเหนี่ยวนำโดย 2, 2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) radical การยังยั้ง Lipid peroxidation และการเข้าจับ Superoxide radical พบว่า สารสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาลในชั้นของไดคลอโรมีเทน ที่แยกได้หลังจากสกัดด้วยเมทานอล แสดงสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูงสุด แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และเป็นสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล Santoso *et al.* (2004) ได้ทำการศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสาหร่ายทะเลในประเทศอินโดนีเซีย 7 ชนิด คือ *Caulerpa sertularoider*, *Cladophoropsis vauchaeriaeformis*, *Halimeda macroloba* และ *Ulva reticulate* และสาหร่ายสีน้ำตาล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3 ชนิด คือ *Padina australis*, *Sargassum polycystum* และ*Turbinaria conoides* นำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย คือ เมทานอล แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี antioxidant activity in a fish oil emulsion system พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลของสาหร่ายทุกชนิด มีปริมาณ peroxide value (POV) ต่ำกว่าชุดควบคุม และสารสกัดจาก *Caulerpa sertularoider* มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้สูงที่สุด และยังมีความสามารถในการจับกับโลหะ Fe^{2+} ได้สูงสุด Kuda *et al.* (2005) ได้ทำการศึกษาสาหร่ายทะเล 4 ชนิดจาก Noto Peninsula ประเทศญี่ปุ่น สาหร่ายที่ทำการสกัดคือ สาหร่ายสีน้ำตาล 3 ชนิด คือ *Scytosiphon lomentaria*, *Papenfussiela Kuromo*, *Nemacystus decipiens* และสาหร่ายสีแดง 1 ชนิด คือ *Porphyra* โดยทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ น้ำและเอทานอล จากนั้นหาปริมาณสารฟีนอลและทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชัน 5 วิธี คือ ศึกษาการยับยั้ง hemoglobin ของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ถูกเหนี่ยวนำโดย linoleic acid peroxidation, ความสามารถในการรีดิวซ์หรือให้อิเล็กตรอน (reducing power), ศึกษาการแย่งจับกับโลหะ Fe^{2+}, การยับยั้ง DPPH$^{\bullet}$ radical และการยับยั้ง Superoxide radical พบว่า สารสกัดด้วยน้ำมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในช่วง 2.2-9.4 mg calechin equivalent (CE)/g สารตัวอย่างแห้งและมีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันที่มากกว่าสารสกัดด้วยเอทานอลของสาหร่าย ต่อมา Nahas *et al.* (2006) ทำการศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสาหร่ายทะเล 13 ชนิด จากทะเลอีเจียน โดยใช้วิธีศึกษาการยับยั้ง DPPH$^{\bullet}$ radical และ chemiluminescence (CL) ในการทดสอบ พบว่า สารสกัดของสาหร่ายสีน้ำตาล *Taonia atomaria* มีความสามารถในการยับยั้ง DPPH$^{\bullet}$ radical ได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับสาหร่ายชนิดอื่น และมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน เมื่อใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ ในการแยกสารสกัดของ *Taonia atomaria* ผลที่ได้ คือ สามารถแยกได้ 6 ชนิด คือ taondiol, isoepitaondiol, stypodiol, stypodione, sargaquinone และsargaol ซึ่งเป็นสารที่มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้ Senevirathne *et al.* (2006) ทำการศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดของสาหร่ายสีน้ำตาล *Ecklonia cava* โดยใช้วิธีศึกษาการยับยั้ง DPPH$^{\bullet}$ radical การยับยั้ง superoxide radical การยับยั้ง Hydrogen peroxide การยับยั้ง Hydroxyl radical การยับยั้ง Nitric oxide การยับยั้งการแย่งจับโลหะ Fe^{2+} ศึกษาควาสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ และการยับยั้ง Lipid peroxidation พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอล 70% มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ทุกวิธี และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สูง และพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจะพบมากในสารละลายที่มีขั้วมากกว่าสารละลายที่ไม่มีขั้ว และShanab (2007) ศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสาหร่าย 3 ชนิด คือ *Sargassum dentifolium, Laurencia papillosa และ Jania corniculata* จาก Suez Canal ประเทศอียิปต์ มาทำการสกัดด้วยตัวทำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ละลาย เอทานอลและไดคลอโรมีเทน จากนั้นนำมาทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชัน 2 วิธี คือ การยับยั้ง DPPH• radical และการยับยั้ง Lipid peroxidation พบว่า สารสกัดด้วย ไดคลอโรมีเทน ของสาหร่ายแต่ละชนิดมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้ดีสารสกัดด้วยเอทานอล โดย *Sargassum dentifolium* มีความสามารถในการยับยั้ง DPPH• radical สูงที่สุด รองลงมาคือ *Laurencia papillosa* และ *Jania corniculata* อีกทั้ง สารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนของ *Laurencia papillosa* มีความสามารถในการยับยั้ง Lipid peroxidation ได้สูงที่สุด รองลงมาคือ *Sargassum dentifolium* และ *Jania corniculata* อีกทั้งสารสกัดของสาหร่ายทั้ง 3 ชนิด ยังมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย 4 ชนิด และยับยั้งเชื้อได้ 2 ชนิด อีกด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved