มูลนิธิโครงการหลวง

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์
ตามโครงการวิจัยที่ 3015-3392 งบประมาณปี 2547

เรื่อง การตรวจหาฤทธิ์และสมบัติทางชีวเคมีของสารต่อต้านอนุมูลอิสระในพืชสมุนไพรบางชนิดในพื้นที่โครงการหลวง

(Antioxidative capacity and biochemical properties of some herbs in the Royal Project. Foundation)

โดย

นางสาวบุหรัน พันธุ์สวรรค์

รศ.ดร. สุพักตร์ พ่วงบางโพ

ผศ.ดร. คงศักดิ์ พร้อมเทพ

ดร.วาสนา ณ ฝั้น

มหาวิทยาลัยนเรศวร

บทคัดย่อ

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในส่วนสกัดของลาเวนเดอร์ ยูเอสเอมินท์ เลมอนบาล์ม ออริกาโน และมาโจแรม โดยใช้ตัวทำละลายในการสกัด 7 ชนิด ได้แก่ Diethyl ether, Dichloromethane, Ethanol, Methanol, Acetone, Acetic acid และน้ำกลั่น ซึ่งอาศัยหลักการยับยั้งการเกิดสีของABTS {(2,2'-azino-bis(3-ethylbenthiazoline-6-sulfonic acid)} ในปฏิกิริยา Peroxidase activity ของเมทไมโอโกลบิน 100 ไมโครโมลต่อลิตร และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 108 ไมโครโมลต่อลิตร ภายในเวลา 20 นาที เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ซึ่งแสดงในค่าของ TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) พบว่าตัวทำละลายทั้ง 7 ชนิด นั้นไม่มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากลาเวนเดอร์ ยูเอสเอมินท์ เลมอนบาล์ม ออริกาโน และมาโจแรม ซึ่ง Acetone เป็นตัวทำละลายที่สามารถสกัดพืชสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้สูงที่สุด ส่วน Methanol, Diethyl ether และ Dichloromethane เป็นตัวทำละลายที่สกัดพืชสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้น้อยที่สุด และจากการศึกษาพบว่าพืชสมุนไพรแม้จะต่างชนิดกันแต่ก็ไม่มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยพบว่าออริกาโนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด รองลงมา คือ มาโจแรม และลาเวนเดอร์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด ทั้งนี้ยังพบว่าตัวทำละลายต่างชนิดกันและชนิดของสมุนไพรที่แตกต่างกันมีผลทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน โดยออริกาโนที่ใช้ Acetone ในการสกัดจะทำให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด รองลงมาคือ ลาเวนเดอร์ที่สกัดด้วยน้ำ แต่จะเห็นว่าลาเวนเดอร์ที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและออริกาโนที่สกัดด้วย Acetone นั้นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกับลาเวนเดอร์ที่สกัดด้วย Diethyl ether, Dichloromethane และ Ethanol ยูเอสเอมิ้นท์และเลมอนบาล์มที่สกัดด้วย Ethanol และน้ำกลั่น ออริกาโนที่สกัดด้วย Diethyl ether, Methanol, และน้ำกลั่น มาโจแรมที่สกัดด้วย Dichloromethane ซึ่งจากผลการศึกษาดังกล่าวสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการสกัดแยกสารจากลาเวนเดอร์ ยูเอสเอมินท์ เลมอนบาล์ม ออริกาโน และมาโจแรม เพื่อให้ได้สารประกอบที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการนำพืชสมุนไพรดังกล่าวไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อเสริมบำรุงและรักษาสุขภาพ และควรที่จะได้มีการศึกษาถึงการออกฤทธิ์ชนิด และองค์ประกอบของสารต้านอนุมูลอิสระลาเวนเดอร์ ยูเอสเอมินท์ เลมอนบาล์ม ออริกาโน และมาโจแรมต่อไป

Abstract

The antioxidant capacities of five different western herbs in Combination with have been tested. The plant were Lavender (*Lavandula angustifolia*), U.S.A Mint (*Mentha peperita*), Lemon Balm (*Melissa Officinalis*), Oregano (*Origanum valgare*) and Marjoram (*Oreganum Majorana*), and were subjected to extraction with 7 solvents, diethyl ether, dichloromethane, ethanol, methanol, acetone, acetic acid, and distilled water. The method was based on inhibition in absorption of ABTS {(2,2'-azino-bis(3-ethylbenthiazoline-6-sulfonic acid)} generated in a peroxidase reaction of 100 μM Metmyoglobin and 108 μM hydrogen peroxide within a 20 minute-reaction period with a standard free radical inhibitor. The antioxidative capacity was recorded as TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). We found that all the seven solvents had no effect on potentiating or attenuating the antioxidant effect from the herb extracts. Acetone was the best solvent for extraction all five spices to give the highest antioxidant capacities. Methanol, diethyl ether, and dichloromethane, on the other hand, yielded very low antioxidant power. From the study, Oregano possessed the strongest antioxidant capacity, followed by Marjoram, with Lavender the least. Moreover, we found that different solvent worked best for a different plant, for example, Oregano extracted with acetone had unequal antioxidant capacity with Lavender extracted with distilled water. Lavender extracted with distill water was also different from Lavender extracted with diethyl ether, dichloromethane, and ethanol. Some did U.S.A. mint, and Lemon balm extracted with ethanol and distilled water, Oregano extracted with diethyl ether, methanol, and distilled water, and Marjoram extracted with dichloromethane. From this study we could obtain a criteria for extraction of Lavender, U.S.A. mint, Lemon balm, Oregano, and Marjoram to get an appreciable amount of antioxidant so as to incorporate into products. Moreover, structure, composition, and mode of action of these antioxidants needed to be characterized in the future.

สารบัญเรื่อง

(Table of contents)

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
สารบัญเรื่อง	III
สารบัญตาราง	IV
สารบัญภาพ	V
สารบัญกราฟ	VI
คำอธิบายคำย่อ	VII
บทนำ	1
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
วิธีดำเนินการวิจัย	31
ผลการทดลอง	37
สรุปและวิจารณ์	51
กิตติกรรมประกาศ	53
เอกสารอ้างอิง (1)	54
เอกสารอ้างอิง (2)	60
รายงานการใช้งบประมาณ	67

สารบัญตาราง (List of table)

หน้า

ตาราง 1 โครงสร้างสารต่อต้านอนุมูลอิสระที่ใช้ทางด้านอาหาร 22

ตาราง 2 โครงสร้างสารต่อต้านอนุมูลอิสระบางชนิดที่มีในพืชผัก 23

ตาราง 3 ผลของตัวทำละลายต่อน้ำหนักของสารสกัดจากลาเวนเดอร์ ยูเอสเอมินท์ เลมอนบาล์ม ออริกาโน และมาโจแรม 37

ตาราง 4 ผลของชนิดพืชสมุนไพรต่อน้ำหนักของสารสกัด 39

ตาราง 5 อิทธิพลร่วมของตัวทำละลายกับชนิดของสมุนไพรต่อน้ำหนักของสารสกัด 40

ตาราง 6 ผลของตัวทำละลายต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากลาเวนเดอร์ ยูเอสเอมินท์ เลมอนบาล์ม ออริกาโน และมาโจแรม 45

ตาราง 7 ผลของชนิดพืชสมุนไพรต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 47

ตาราง 8 อิทธิพลร่วมของตัวทำละลายกับชนิดของสมุนไพรต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 49

สารบัญภาพ (List of figure)

หน้า

ภาพ 1	โครงสร้างของวิตามินอี วิตามินซี และ Trolox	19
ภาพ 2	การเกิดปฏิกิริยาร่วมกันระหว่างวิตามินอี และวิตามินซี	20
ภาพ 3	โครงสร้างของฟลาโวนอยด์บางกลุ่ม	26
ภาพ 4	โครงสร้างของ flavan-3-ols และ proanthocyanidins	27
ภาพ 5	ลาเวนเดอร์	28
ภาพ 6	เลมอนบาล์ม	29
ภาพ 7	ออริกาโน	29
ภาพ 8	ยูเอสเอมิ้นท์	30
ภาพ 9	มาโจแรม	31

โครงการหลวง

สารบัญกราฟ (List of graph)

หน้า

กราฟ 1 ผลของตัวทำละลายต่อน้ำหนักของสารสกัดจากพืชทั้ง 5 ชนิด 38
กราฟ 2 ผลของชนิดพืชสมุนไพรต่อน้ำหนักของสารสกัด 39
กราฟ 3 การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ของ Trolox ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 42
กราฟ 4 การยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ ABTS (the percent inhibition) ของ Trolox 43
กราฟ 5 ผลของตัวทำละลายต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากพืชสมุนไพร 5 ชนิด 46
กราฟ 6 ผลของชนิดพืชสมุนไพรต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 48

โครงการหลวง

คำอธิบายคำย่อ

^{o}C	degree celsius
g	gram
mg	milligram
hr	hour
M	molarity
μM	micromolarity
ml	millilitre
μl	microlitre
nm	nanometer

โครงการหลวง

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ในสภาพสังคมไทยปัจจุบันประชาชนมีความเสี่ยงต่อภาวะการเกิดโรคต่าง ๆ เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งสาเหตุหนึ่งเนื่องมาจากอาหาร และมลพิษจากสิ่งแวดล้อมที่ร่างกายรับเข้าไปแล้วเกิดการสะสม จนมีปริมาณที่มากเกินความสามารถของร่างกายที่จะรับหรือขับออกได้จึงทำให้เกิดเป็นอันตรายต่อร่างกาย อีกทั้งกลไกต่าง ๆ ของร่างกายในการย่อยสลายหรือเปลี่ยนแปลงสารที่ก่อให้เกิดอันตรายแก่ร่างกาย สารดังกล่าวรู้จักกันในชื่อของ อนุมูลอิสระ (Free radical) ซึ่งหมายถึงสารที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยว (unpaired electrons) ในอะตอมหรือโมเลกุล[1] อนุมูลอิสระดังกล่าวนี้จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ว่องไวมาก สามารถดึงอิเล็กตรอนจากสารอื่นหรือให้อิเล็กตรอนแก่สารอื่นเพื่อทำให้อะตอมหรือโมเลกุลเสถียร (Stable) ในร่างกายมนุษย์และสัตว์พบอนุมูลอิสระในกระบวนการเมตาบอลิสมของสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ เช่น ในไมโตคอนเดรีย ไมโครโซมและเปอร์ออกซิโซม ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาการดึงอะตอมของไฮโดรเจนออกจากโมเลกุลของสารที่ประกอบด้วยไฮโดรเจน เช่น เปอร์ออกซิเดชันของไลปิด (Lipid peroxidation)[2] อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นเหล่านี้หากมีการสะสมอยู่ในร่างกายปริมาณที่มากเกินไปจะเกิดอันตรายต่อร่างกาย ก่อให้เกิดผลเสียต่อสุขภาพได้หลายประการ เช่น การเกิด lipid peroxidation ที่ไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ฉีกขาด เซลล์ตาย เนื้อเยื่อเสื่อมสภาพและเกิดความชรา โดยธรรมชาติร่างกายของมนุษย์และสัตว์ชั้นสูงจะมีวิธีการโดย ปอด ตับ ไต และลำไส้ในการทำลายสารพิษในร่างกายไม่ให้เกิดการสะสม โดยสารประกอบในร่างกาย เช่น Glutathione และเอนไซม์ ได้แก่ Peroxidase, Catalase, Superoxide dismutase (SOD) และ Glutathione peroxidase (GPX)[3-6] สารเหล่านี้ได้ชื่อว่าเป็นสารต้านอนุมูลอิสระหรือสารต้านออกซิเดชัน (Antioxidant) หรือสารเก็บขนอนุมูลอิสระ (Free radical scavenger) ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการทำลายหรือต้านอนุมูลอิสระให้กลายเป็นสารที่ไม่มีอันตราย แม้ว่าสารต้านออกซิเดชันจะพบในร่างกายอยู่แล้วแต่หากร่างกายสะสมสารที่ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระในปริมาณมากและเป็นระยะเวลานานจะทำให้สารต้านออกซิเดชันลดลง ดังนั้นร่างกายควรได้รับสารต้านออกซิเดชันเพิ่มเติมอยู่เป็นประจำเพื่อเป็นตัวทำลายอนุมูลอิสระในร่างกาย โดยเฉพาะจากอาหารที่รับประทาน เช่น พืชผัก พืชสมุนไพร ผลไม้และธัญพืช เป็นต้น ปัจจุบันพบว่าพืชผัก ผลไม้และสมุนไพรของประเทศไทยหลายชนิดที่มีสาร

ต้านออกซิเดชัน เช่น ใบตำลึง ใบชะพลู ผักบุ้ง ผักโขม พบสารเบต้าแคโรทีน มะเขือเทศ แตงโม มะละกอสุก พบสารไลโคปีน ฝรั่ง ยอดมะขาม มะขามป้อม ส้ม มะนาว พบวิตามินซี ผลแก่ของสมอไทย ฟ้าทะลายโจร เมล็ดสะตอ ทับทิมทั้งส่วนของเปลือกและใบ ใบฝรั่ง หัวปลี พบสารประกอบจำพวกแทนนิน (Tannin)[7,8] และจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าพืชสมุนไพรหลายชนิดสามารถนำมาใช้ในการบำรุงและรักษาสุขภาพ และใช้รักษาอาการของโรคต่าง ๆ ทดแทนยาได้ ทำให้ประเทศไทยลดการสั่งซื้อยาจากต่างประเทศ

ซึ่งในปัจจุบันมูลนิธิโครงการหลวงได้ปลูกพืชสมุนไพรมากมายหลายชนิด เช่น คาโมมาย ดอกแก้วเมืองจีน ชิโซ๊ะ เชอร์วิล ไชว์ส ซอร์เรล ซัมเมอร์ซาวอรี่ โสมตังกุย ทาย์ม ทาร์รากอน เบย์ ผักชีลาว มาโจแรม โรสแมรี่ ลาเวนเดอร์ เลมอนบาล์ม โหระพาฝรั่ง เสจ ออริกาโน อิตาเลี่ยนพาร์สเลย์ มินท์ และซัมเมอร์ทาย์ม เป็นต้น จึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาฤทธิ์และสมบัติทางชีวเคมีของสารต่อต้านอนุมูลอิสระในพืชสมุนไพรพื้นที่โครงการหลวง เพื่อให้ประชาชนชาวไทยได้เห็นคุณค่าของสมุนไพรและให้ความสนใจอาหารเสริมจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ตลอดจนเป็นแนวทางในการการอนุรักษ์ การขยายพันธุ์และการศึกษาค้นคว้าทั้งทางการแพทย์ และเภสัชกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสกัดและตรวจหาฤทธิ์สารต่อต้านอนุมูลอิสระในพืชสมุนไพรบางชนิดในพื้นที่โครงการหลวง

2. เพื่อศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของสารต่อต้านอนุมูลอิสระในพืชสมุนไพรบางชนิดในพื้นที่โครงการหลวง

ขอบเขตการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ครอบคลุมการศึกษาถึงข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับพืชสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด และฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งในการตรวจหาฤทธิ์ของสารต่อต้านอนุมูลอิสระในห้องปฏิบัติการนั้นใช้วิธีทาง spectroscopy ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษาคือพืชสมุนไพรที่มีอยู่ในโครงการหลวง 5 ชนิด ได้แก่ มาโจแรม ลาเวนเดอร์ เลมอนบาล์ม ออริกาโน ยูเอสเอมินท์ ซึ่งสาเหตุที่เลือกพืชทั้ง 5 ชนิด เนื่องจากเป็นพืชที่นิยมนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหาร

ประโยชน์ที่จะได้รับจากงานวิจัย

1. สามารถทราบฤทธิ์และคุณสมบัติทางชีวเคมีของสารต่อต้านอนุมูลอิสระในพืชสมุนไพรบางชนิดในพื้นที่โครงการหลวง

2. สามารถนำความรู้ที่ได้จากการศึกษาเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาชนิดและสูตรโครงสร้างของสารต่อต้านอนุมูลอิสระในพืชสมุนไพรบางชนิดในพื้นที่โครงการหลวง

3. เป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร หรือสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเสริมสุขภาพ ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับพืชสมุนไพร

4. สามารถนำความรู้ที่ได้จากการศึกษาส่งเสริมให้ประชาชนชาวไทยเห็นคุณค่าของพืชสมุนไพรและที่มีอยู่ในท้องถิ่น ซึ่งเป็นแนวทางในการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชที่ดีที่สุดวิธีการหนึ่ง

5. สามารถนำความรู้ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้เป็นแนวทางในการศึกษาวิจัยและพัฒนาการใช้ประโยชน์พืชสมุนไพรได้เป็นอย่างดี โดยเฉพาะการใช้ประโยชน์จากสารต่อต้านอนุมูลอิสระในการป้องกันและรักษาสุขภาพ

6. สามารถนำความรู้ที่ได้เป็นแนวทางในการศึกษาเพื่อประยุกต์ใช้ทั้งทางด้านเคมีชีวเคมี การแพทย์และเภสัชกรรม

โครงการหลวง

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อนุมูลอิสระ

1. นิยามของอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (free radical) หมายถึง สารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (unpaired electrons) ในอะตอมหรือโมเลกุล พบได้ทุกแห่งทั้งในสิ่งแวดล้อม ในสิ่งมีชีวิตและในเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกระบวนการผลิตพลังงานภายในเซลล์ ซึ่งออกซิเจนบางส่วนจะถูกปล่อยเข้าสู่ร่างกายเป็นอนุมูลอิสระจากกระบวนการเมตาบอลิสม (metabolism) โดยมีการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนออกจากโมเลกุลของออกซิเจนทำให้อิเล็กตรอนในโมเลกุลออกซิเจนไม่สมดุลกลายเป็นอนุมูลอิสระและว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยามาก สามารถดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่อิเล็กตรอนที่ขาดหายไปเพื่อให้ตัวเองเกิดความสมดุลหรือเสถียร (stable) ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ และเกิดขึ้นในเซลล์ตลอดเวลา อนุมูลอิสระที่สำคัญที่สุดที่เกิดในเซลล์ที่ใช้ออกซิเจน ได้แก่ Oxygen radical อนุพันธ์ของ Oxygen radical (เช่น Superoxide radical และ Hydroxyl radical) Hydrogen peroxide โลหะทรานซิชัน (transition metals) Carbonate radical (CO_3^{2-}) Nitrate radical (NO_3^-) Methyl radical (CH_3^-) Superoxide radical (O_2^-) Peroxyl radical (OOH^-) Hydroxyl radical (OH^-) Reactive oxygen species (ROS) เป็นต้น[1] โดยอนุมูลอิสระแต่ละตัวสามารถทำให้เกิดความไม่สมดุลของอิเล็กตรอนต่อโมเลกุลอื่น ๆ ได้หลายพันโมเลกุล นอกจากนี้อนุมูลอิสระสามารถทำลายสาร ชีวโมเลกุลทุกประเภท ทั้งในเซลล์และส่วนประกอบของเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น ลิปิด (lipid) โปรตีน (protein) เอ็นไซม์ (enzyme) ดีเอ็นเอ (DNA) อาร์เอ็นเอ (RNA) กรดนิวคลีอิก (nucleic acid) คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) เซลล์เมมเบรน (cell membrane) คอลลาเจน (collagen) ไมโตคอนเดรีย (mitocondria) และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissues) เป็นสาเหตุให้เซลล์ตาย การเกิดการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอในเซลล์ และก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคชรา (aging)[2-4] โรคมะเร็ง (cancer) โรคหัวใจขาดเลือด (coronary heart disease) โรคความจำเสื่อม (Alzheimer'disearse)[5-8] โรคข้ออักเสบ (arthritis) โรคภูมิแพ้ (allergies) โรคความดันโลหิต (blood pressure) โรคเหงือก (gum disease) โรคเกี่ยวกับสายตา (eye problem) โรค

ปอดและระบบประสาท (lung and nervous system) โรคเกี่ยวกับทางเดินหายใจ โรคเกี่ยวกับความผิดปกติของผิวหนัง และโรคลำไส้อักเสบ เป็นต้น ซึ่งร่างกายของมนุษย์และสัตว์ชั้นสูงจะมีกระบวนการในการทำลายสารพิษในร่างกายไม่ให้เกิดการสะสม โดยใช้กระบวนการในระบบทั้งที่มีเอ็นไซม์และไม่มีเอ็นไซม์ เช่น การใช้เอนไซม์เพื่อสลายเปอร์ออกไซด์ การใช้โปรตีนเพื่อจับโลหะทรานซิชัน และการใช้สารประกอบต่าง ๆ เพื่อยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ ซึ่งอนุมูลอิสระสามารถเกิดขึ้นได้ 3 ทาง คือ 1) เกิดจากการสลายพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) ของสารทั่วไป โดยที่ผลผลิตที่เกิดขึ้นจะได้รับอิเล็กตรอนเกิน 1 ตัว ทำให้เกิดอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยว 2) เกิดจากการสูญเสียอิเล็กตรอนหนึ่งตัวของสารทั่วไป 3) เกิดจากสารทั่วไปได้รับอิเล็กตรอนเพิ่มขึ้นหนึ่งตัว ซึ่งกระบวนการที่สามนี้เกิดขึ้นได้น้อยกว่ากระบวนการที่หนึ่งเนื่องจากต้องอาศัยพลังงานสูง ซึ่งอนุมูลอิสระอาจมีคุณสมบัติเป็นได้ทั้งประจุบวก ประจุลบหรือเป็นกลางทางประจุ ในการเขียนสัญลักษณ์ของอนุมูลอิสระใช้จุดแทน เช่น

การเกิด Radical formation โดย electron transfer: $A + e^- \rightarrow A^{\bullet -}$

การเกิด Radical formation โดย homolytic fission: $X : Y \rightarrow X^{\bullet} + Y^{\bullet}$

การเกิด Ion formation โดย heterolytic fission: $X : Y \rightarrow X:^- + Y^+$

2. Oxygen free radicals และ reactive oxygen species (ROS)

อนุมูลอิสระของออกซิเจน (oxygen free radicals) และอนุพันธ์ของอนุมูลอิสระของออกซิเจน (radical derivatives of oxygen) เป็นอนุมูลอิสระที่มีความสำคัญที่สุด เกิดจากปฏิกิริยารีดักชันของโมเลกุลของออกซิเจน โดยโมเลกุลของออกซิเจนจะรับอิเล็กตรอนหนึ่งตัวแล้วเกิดเป็นอนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์ (superoxide radical: $O_2^{\bullet -}$) ดังปฏิกิริยา

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

การเกิดปฏิกิริยารีดักชันของโมเลกุลออกซิเจน ที่เกิดจากโมเลกุลออกซิเจนได้รับอิเล็กตรอนสองตัวทำให้เกิดเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ดังปฏิกิริยา

$$O_2 + 2e^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2$$

ซึ่งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสิ่งมีชีวิต สามารถเกิดได้จากการรวมตัวของซุปเปอร์ออกไซด์ 2 โมเลกุล แล้วเกิดเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และออกซิเจน ดังปฏิกิริยา

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

นอกจากนี้อนุมูลอิสระ 2 โมเลกุล สามารถรวมตัวกันเกิดเป็นสารที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระได้ ซึ่งปฏิกิริยานี้เรียกว่า “ปฏิกิริยา dismutation” เป็นปฏิกิริยาที่สามารถเกิดขึ้นได้เอง แต่จะเกิดช้า หรืออาจเกิดจากการเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ superoxide dismutase แม้ว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะมิใช่อนุมูลอิสระแต่จัดว่าเป็น reactive oxygen species (ROS) ซึ่งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสารประกอบที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอนุมูลอิสระ เนื่องจากสามารถแตกตัวได้ง่าย โดยเฉพาะในสภาวะที่มีโลหะทรานซิชันอยู่ด้วย โดยทำให้เกิด Hydroxyl radical ($OH^{\bullet}$) ที่มีความว่องไวในการออกฤทธิ์ทำลายปฏิกิริยาได้สูง ซึ่งปฏิกิริยาที่แท้จริงมีความซับซ้อนกว่าที่กล่าวมา และปฏิกิริยาดังกล่าวเรียกว่า “iron-catalysed Haber-Weiss reaction” ส่วนปฏิกิริยาที่เป็น “non-catalysed Haber-Weiss reaction” ได้แก่ปฏิกิริยาที่ซุปเปอร์ออกไซด์ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ดังปฏิกิริยา

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

ปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้เองแต่มีโอกาสเกิดขึ้นได้ยากในสิ่งมีชีวิตเนื่องจากความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่อยู่ในสภาวะ steady-state มีค่าต่ำ ส่วนปฏิกิริยาที่ถูกเร่งด้วย Fe หรือ Cu จะขึ้นอยู่กับซุปเปอร์ออกไซด์ซึ่งเป็นสารที่ให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จากปฏิกิริยา dismutation และสามารถเป็นสาร reductant ของโลหะทรานซิชันได้ ดังปฏิกิริยา

$$O_2^{\bullet -} + Fe^{3+} \longrightarrow Fe^{2+} + O_2^{\bullet -}$$

$$O_2^{\bullet -} + Cu^{2+} \longrightarrow Cu^+ + O_2$$

ซึ่งเฟอร์รัส (Fe^{2+}) และคิวปริส (Cu^{+}) สามารถทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 ได้ดีกว่ารูปที่ถูกออกซิไดซ์ (Fe^{3+} และCu^{2+}) ตามลำดับ ส่วน autoxidation ของตัวรีดิวซ์โลหะทรานซิชัน (reduced transition metals) ก็สามารถทำให้เกิดซุปเปอร์ออกไซด์ได้ ดังปฏิกิริยา

$$Fe^{2+} + O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + O_2^{\bullet -}$$

$$Cu^{+} + O_2 \longrightarrow Cu^{2+} + O_2^{\bullet -}$$

ปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถย้อนกลับได้ (reversible redox reaction) และเป็นปฏิกิริยาที่สำคัญมากในการสร้างอนุมูลอิสระ ความสัมพันธ์ระหว่างโลหะทรานซิชันและออกซิเจนในการทำให้เกิดอนุมูลอิสระสามารถดูได้จากงานวิจัยของ Halliwell Bและ Gutteridge JMC[1] และจากสมการ ข้างต้นจะเห็นได้ว่าตัวการสำคัญที่ทำให้เกิด oxygen free radicals ได้แก่ ออกซิเจน (O_2), ซุปเปอร์ออกไซด์, ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์, โลหะทรานซิชัน และไฮดรอกซิลแรดดิคอล ซึ่งสาร 4 ตัวแรกจะทำให้เกิด oxygen free radicals ได้ แต่ไฮดรอกซิลแรดดิคอลต้องอาศัยกระบวนการต่าง ๆ ที่สลับซับซ้อนยิ่งขึ้น

2.1 Superoxide ($O_2^{\bullet -}$)

ซุปเปอร์ออกไซด์เป็นสารที่ไม่มีอันตรายแม้ว่าจะเป็นอนุมูลอิสระ แต่มีความสำคัญในแง่ที่เป็นแหล่งกำเนิดของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และเป็นตัวรีดิวซ์โลหะทรานซิชัน นอกจากนี้ซุปเปอร์ออกไซด์สามารถทำปฏิกิริยากับไนโตรเจนออกไซด์ (NO) แล้วทำให้ Endothelium Derived Relaxing Factor ซึ่งมีความสำคัญทางสรีรวิทยา[2] ซุปเปอร์ออกไซด์ที่ pH ต่ำหรือเป็นกรด จะได้รับไฮโดรเจนมา 1 ตัว ได้เป็น perhydroxyl radical ($OH_2^{\bullet}$) ซึ่งมีฤทธิ์มากกว่าแต่สารนี้พบได้น้อยกว่า 1%

2.2 Hydrogenperoxide (H_2O_2)

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นตัวออกซิไดซ์ แต่ไม่มีฤทธิ์สูงนัก ความสำคัญของ H_2O_2 เป็นแหล่งกำเนิดของไฮดรอกซิลแรดดิคอล (Hydroxyl radical) เมื่อมีโลหะทรานซิชัน แต่ในสภาวะที่ไม่มีโลหะ ทรานซิชันซุปเปอร์ออกไซด์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะถูกกำจัดได้อย่างรวดเร็วและไม่ก่อให้เกิดอันตราย

2.3 Hydroxyl radical ($OH^{\bullet}$)

Hydroxyl radical เกิดจากการออกซิไดซ์แล้วเกิดเป็นอนุมูลอิสระ ซึ่งมีฤทธิ์สูงมาก และก่อให้เกิดอันตรายต่อสารชีวโมเลกุลเกือบทุกชนิดด้วย diffusion-controlled rates และมักจะแพร่กระจายไปได้ไม่ไกลนักภายในเซลล์ จึงทำให้เกิดอันตรายต่อสารที่อยู่ใกล้เคียง และมี half-life สั้น จึงทำอันตรายต่อเซลล์ในบริเวณแคบ

2.4 Singlet oxygen

Singlet oxygen มิใช่อนุมูลอิสระแต่จัดว่าเป็น reactive oxygen species (ROS) อีกชนิดหนึ่ง มักเกิดร่วมกับ oxygen free radical ซึ่ง singlet oxygen เกิดจากปฏิกิริยาของ อนุมูลอิสระและสามารถทำให้เกิดอนุมูลอิสระได้เช่นกัน

นอกจาก oxygen free radical ยังมีอนุมูลอิสระอื่น ๆ ที่มีความสำคัญอาทิ carbon-centred radicals ($R^{\bullet}$) ซึ่งอนุมูลอิสระชนิดนี้เกิดจากการทำปฏิกิริยาของ oxidizing radical ($OH^{\bullet}$) กับสารชีวโมเลกุล (RH) เช่น ไขมัน, กรดนิวคลีอิก, คาร์โบไฮเดรต และโปรตีน สารเหล่านี้สามารถทำปฏิกิริยาได้ว่องไวมากกับออกซิเจนเกิดเป็น peroxyl radicals ($ROO^{\bullet}$) ตามแต่ประเภทของสาร ชีวโมเลกุลนั้น ๆ peroxyl radicals ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยาต่อเป็น alkoxyl radicals ($RO^{\bullet}$) ซึ่งโมเลกุลของซัลเฟอร์สามารถทำหน้าที่เป็นศูนย์กลางของอนุมูลอิสระได้ (center for free radicals :thiyl radicals; $RS^{\bullet}$) เช่น ในปฏิกิริยาออกซิเดชันของ glutathione ขณะที่มีสารแปลกปลอม (foreign compounds) เข้าไปทำให้สามารถกระตุ้นเกิดเป็นอนุมูลอิสระได้เช่นกันซึ่งจะได้กล่าวต่อไปในหัวข้อ 3

3. การสร้างอนุมูลอิสระในเซลล์ (Production of free radicals in cells)

อนุมูลอิสระสามารถเกิดขึ้นได้เองหรืออาจเกิดจากมีสิ่งกระตุ้นให้เกิดเป็นอนุมูลอิสระ โดยทั่วไปเกิดขึ้นจากกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน (electron transfer reaction) ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ เช่น ใน mitochondria ซึ่งอาศัยการทำงานของเอนไซม์หรือไม่ก็ได้ในปฏิกิริยารีดอกซ์ของโลหะทรานซิชัน ซึ่งสารสำคัญที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาดังกล่าว ได้แก่ ซุปเปอร์ออกไซด์ นอกจากกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน เอนไซม์อื่น ๆ ก็สามารถผลิตซุปเปอร์ออกไซด์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ เช่น เอนไซม์กลุ่ม flavin oxidase ต้องอาศัย ascorbic acid (vitamon C), thiols (glutathione, cysteine), adrenaline และ flavin co-enzymes ซึ่งเอนไซม์ในกลุ่มนี้สามารถผลิตอนุมูลอิสระได้มากมาย เมื่อมีโลหะทรานซิชันอยู่ด้วย ดังนั้นเซลล์จึงเก็บโลหะทรานซิชันไว้เป็นอย่างดี โดยการแยก (sequestered) เพื่อป้องกันอันตรายแก่เซลล์ซึ่งจัดเป็นกลไกการป้องกันอันตรายแบบหนึ่งของเซลล์ที่อาจใช้เอนไซม์

หรือไม่ใช้เอนไซม์เพื่อให้เซลล์จัดการกับอนุมูลอิสระที่ผลิตขึ้นมาอย่างสม่ำเสมอจากกระบวนการหายใจ นอกจากนี้การได้รับรังสีอย่างรุนแรง (ionizing radiation) ก็เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิด อนุมูลอิสระได้เช่นกัน ส่วนในสัตว์อนุมูลอิสระก็สามารถเกิดขึ้นได้เช่นกัน โดยเกิดจากการจงใจทำให้เกิดอนุมูลอิสระ และนำอนุมูลอิสระดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ เช่น เอนไซม์ ribonucleotide reductase อาศัยการเกิดอนุมูลอิสระที่ active site เพื่อเร่งปฏิกิริยา[10-11] อนุมูลเหล่านี้มิได้เป็นอิสระแต่จะถูก กักเก็บไว้สำหรับทำปฏิกิริยาเท่านั้น ซึ่ง activated phagocytes เองก็สามารถสร้างซุปเปอร์ออกไซด์เพื่อใช้ประโยชน์ในการฆ่าแบคทีเรีย[12] อนุมูลอิสระที่ผลิตขึ้นจะอยู่ที่ผิวของ phagocyte plasma membrane กับผิวของแบคทีเรีย แต่อาจมีการเร่งของซุปเปอร์ออกไซด์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ ROS อื่น ๆ เกิดขึ้นได้เสมอ ๆ

สารแปลกปลอมที่เข้าสู่เซลล์สามารถกระตุ้นให้เซลล์สร้างอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นได้ ตัวอย่างที่ชัดเจนที่สุด ได้แก่ carbon tetrachloride จะถูกย่อยสลายให้เป็น trichloromethyl free radical โดย cytochrome P-450 ในตับ[13-14] ซึ่งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นมีมากจนเกินกว่าความสามารถในการป้องกันของตับจะทำได้ จึงทำให้เกิดการทำลายของ cellular membranes และ tissue damage ส่วนสารพิษอื่น ๆ ก็ใช้วิธีเดียวกันนี้ในการทำให้เกิดอนุมูลอิสระ สารเหล่านี้เรียกว่า “redox-cycling compounds” เป็นสารที่รับอิเล็กตรอนได้ง่ายและเกิดเป็นอนุมูลอิสระ จากนั้นก็ส่งอิเล็กตรอนต่อให้กับออกซิเจนเกิดเป็นซุปเปอร์ออกไซด์และสร้างเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ต่อมาเอนไซม์ GSH-peroxidase พยายามที่จะลด hydrogen peroxide ที่เกิดขึ้นอย่างตลอดเวลาจึงทำให้ GSH ลดลงอย่างกะทันหันและทำให้เกิดการทำลายเซลล์[15-16]

4. อันตรายของอนุมูลอิสระ (Damaging reaction of free radicals)

สารชีวโมเลกุลทุกชนิดสามารถถูกทำลายได้โดยอนุมูลอิสระ แต่ลิปิดมีโอกาสถูกทำลายได้มากที่สุด ซึ่งเยื่อหุ้มเซลล์จะประกอบด้วย polyunsaturated fatty acids (PUFAs) มากที่สุด สามารถถูกออกซิไดซ์ได้ง่ายจากอนุมูลอิสระ การถูกทำลายของ PUFAs หรือที่รู้จักกันในฐานะ lipid peroxidation มีผลเสียหายมาก เพราะเกิดการดำเนินไปแบบ self-perpetuating chain-reaction[17] ดังแสดงตามปฏิกิริยาข้างล่าง

$$LH + R^{\bullet} \longrightarrow L^{\bullet} + RH$$

$$L^{\bullet} + O_2 \longrightarrow LOO^{\bullet}$$

$$LOO^{\bullet} + L'H \longrightarrow LOOH + L'^{\bullet}$$

$$LOOH \longrightarrow LO^{\bullet}, LOO^{\bullet}, \text{aldehydes}$$

LH คือ PUFAs ที่เป็นเป้าหมายของ oxidizing radical เริ่มต้นด้วย $R^{\bullet}$ Oxidation ของ PUAF ทำให้เกิด fatty acid radical ($L^{\bullet}$) สามารถรวมกับออกซิเจนได้อย่างรวดเร็วเกิดเป็น fatty acid peroxyl radical ($LOO^{\bullet}$) ซึ่ง peroxyl radicals เป็นตัวที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ โดยการออกซิไดซ์โมเลกุล PUAF ต่อ ๆ ไป และสร้างปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อ ๆ ไปได้เป็น lipid hydroperoxides (LOOH) ซึ่งแตกตัวให้ผลผลิตเป็น radical มากขึ้นหรืออาจเป็นสารอื่น ๆ อีกมากมายอันได้แก่ aldehydes[18-19] การแตกตัวของ lipid hydroperoxides (LOOH) มักจะอาศัยโลหะทรานซิชันเป็นตัวเร่งปฏิกิริยซึ่งเหมือนกับปฏิกิริยาของ hydroperoxide ที่กล่าวไปแล้วข้างต้น และให้ผลลัพธ์เป็น lipid peroxyl, alkoxyl radicals และ aldehydes ซึ่ง aldehydes หลายชนิดมีฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเฉพาะอย่างยิ่ง aldehydes ในกลุ่ม hydroxyakernals ซึ่งอยู่ในกลุ่มของ 4-hydroxynonenal สามารถแพร่จากบริเวณที่ถูกสร้างไปยังบริเวณอื่นภายในเซลล์ได้[20-21] โดยสรุป lipid peroxidation เป็นผลเสียหายที่ใหญ่หลวงของเซลล์อันเกิดจากอนุมูลอิสระเพราะสามารถเกิดได้ง่ายมากเนื่องจากมี PUAFs ที่มีอยู่มากใน membranes และเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ที่สร้างความเสียหายให้แก่โครงสร้างของ membranes โดยตรงและผลิต aldehydes สามารถสร้างความเสียหายให้แก่ส่วนประกอบของเซลล์โดยทางอ้อมได้[22] โดยมีรายงานว่า aldehydes เกิดพิษได้ด้วยตัวเองเนื่องจาก carbon tetrachloride นอกจากนี้การเกิด atherosclerosis สามารถเกิดได้จากวิธีดังกล่าว [23-24] อนุมูลอิสระจะทำลายโปรตีนและกรดนิวคลีอิกได้ยากกว่า PUAFs เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ดำเนินไปได้อย่างรวดเร็วมีโอกาสเกิดได้น้อยกว่า การถูกทำลายโปรตีนจากอนุมูลอิสระต้องอาศัยเอนไซม์ เช่น การจับกับ Cu โดยใช้ histidine residue แต่ถ้าโปรตีนถูกทำลายไม่มากก็จะไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ การทำปฏิกิริยาระหว่างโลหะทรานซิชันกับ hydrogen peroxide เกิดเป็น hydroxyl radical ซึ่งมีผลทำลาย metal-binding site หรือบริเวณ ใกล้เคียง ซึ่งรู้จักกันในนามของ “site-specific”[25-29] ส่วน DNA มีโอกาสถูกทำลายได้จากอนุมูลอิสระได้น้อยเช่นเดียวกันกับโปรตีน ซึ่ง DNA จะเกิดความเสียหายได้อย่างมากก็ต่อเมื่อเกิด site-specific damage ซึ่งถ้าการซ่อมแซมของ DNA ไม่ทันต่อขบวนการจำลองก็จะทำให้เกิดการกลายพันธุ์จากการออกซิไดซ์เอนไซม์ ribonucleases ซึ่งการตรวจวัดปัสสาวะจะเป็นหลักฐานที่บ่งชี้ถึงการถูกทำลายของ DNA อย่างต่อเนื่อง[30-31] แต่ไม่ว่าระบบการ

ซ่อมแซม DNA จะมีประสิทธิภาพเพียงใด หากความเสียหายเพียงเล็กน้อยเหล่านี้เกิดการสะสมก็อาจจะทำให้เกิด mutation หรือเกิดเป็นมะเร็งได้

5. ขบวนการป้องกันอนุมูลอิสระ (Defence against free radicals)

เนื่องจากอนุมูลอิสระบางชนิดถูกผลิตขึ้นในเซลล์สัตว์อย่างเลี่ยงไม่ได้ เมื่อผลิตขึ้นมาแล้วก็จะสร้างความเสียหายอย่างมากต่อเซลล์ จึงต้องมีระบบการคุ้มกันเกิดขึ้น ซึ่งสามารถจัดแบ่งได้เป็น 3 ประเภท คือ ประเภทที่ 1 การป้องกันขบวนการสร้างอนุมูลอิสระ ประเภทที่ 2 การจัดการกับอนุมูลอิสระที่สร้างขึ้น[32] อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นทั้ง 2 ประเภทเกิดขึ้นทั้งในส่วนละลายน้ำ (aqueous) และ เยื่อหุ้มเซลล์ (membrane compartments) และสามารถใช้เอนไซม์หรือไม่ใช้เอนไซม์ก็ได้ ประเภทที่ 3 กระบวนการซ่อมแซม

ประเภทที่ 1 (การป้องกันขบวนการสร้างอนุมูลอิสระ) ได้แก่ การทำงานอย่างมีประสิทธิภาพของการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอน (electron transfer) และการแยกโลหะทรานซิชันเหล็กซึ่งจะจับกับโปรตีน[1,33] อีกวิธีการหนึ่งได้แก่การกำจัด peroxides เช่น hydrogen peroxides ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการ lipid peroxidation ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับโลหะทรานซิชันเกิดเป็นอนุมูลอิสระได้ เช่นกัน นอกจากนี้มีตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีอยู่ใน peroxisomes กับ glutathione peroxidase อยู่ใน cytosol ของเซลล์หลายชนิด ซึ่งถือว่าเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลาย peroxide ได้อย่างปลอดภัย[34]

$$2H_2O_2 \longrightarrow \text{catalase} \longrightarrow 2H_2O + O_2$$

$$ROOH + 2GSH \longrightarrow \text{GSH peroxidase} \longrightarrow ROH + GEEG$$

ประเภทที่ 2 (การจัดการกับอนุมูลอิสระที่สร้างขึ้น) คือ กระบวนการที่จะกำจัดอนุมูลอิสระที่ถูกสร้างขึ้น ซึ่งมีเพียงเอนไซม์เพียงตัวเดียวที่รู้ว่าอนุมูลอิสระเป็น substrate นั่นก็คือ superoxide dismutase แต่ส่วนใหญ่ตัวกำจัดอนุมูลอิสระจะไม่ใช่เอนไซม์ เช่น α-tocopherol เป็นสารในกลุ่มวิตามินอี[35-37] สารโมเลกุลนี้รู้จักกันในนาม “chain-breaking antioxidant” (เป็นสารต้าน อนุมูลอิสระ) ทำหน้าที่ในการยับยั้ง lipid peroxyl radicals ($LOO^{\bullet}$) ในปฏิกิริยาของ lipid peroxidation ดังปฏิกิริยา

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

เกิดเป็น tocopheroxyl radical ที่มีความเสถียรขึ้น และในสภาวะที่ไม่ปกติก็จะเข้าสู่ปฏิกิริยา lipid peroxidation ด้วยตัวเอง ซึ่ง α-tocopherol เป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้เป็นอย่างดี ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระอื่น ๆ ที่สามารถแตกตัวได้ในลิปิด เช่น ubiquinol เป็นสารที่คงสภาพมากแต่ยังต้องมีการตรวจสอบคุณสมบัติให้มากกว่านี้[38]

สารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถละลายได้ในน้ำ เช่น Ascorbic acid (Vitamin C) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญทั้งในเซลล์และใน plasma[39] ภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต Ascorbic acid (Vitamin C) ทำให้ tocopheroxyl radical กลับสู่ α-tocopherol ได้[40] แต่ภายนอกเซลล์วิตามินซีและวิตามินอีจะถูกจำกัดการกระทำดังกล่าว[41] ส่วน Uric acid ใน plasma[39] และ glutathione ในเซลล์ cytosol[40] จะสามารถเป็นตัวกำจัดอนุมูลอิสระที่แรง ซึ่งคุณสมบัติในการป้องกันหรือต้าน อนุมูลอิสระของสารดังกล่าวจะแสดงขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อใดก็ตามที่มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้น สภาวะ ดังกล่าวบางครั้งก็สามารถชักจูงให้อนุมูลอิสระทำลายเซลล์และอวัยวะของสิ่งมีชีวิตได้ มีสาร ชีวโมเลกุลจำนวนมากที่สามารถออกซิไดซ์อนุมูลอิสระ และบางทีก็เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ แต่สารชีวโมเลกุลดังกล่าวไม่สามารถเปลี่ยนกลับเป็น reactive radical ได้ด้วยตัวเองและเพื่อเป็นการป้องกันจึงควรมีการแยกสารชีวโมเลกุล[42]

ประเภทที่ 3 เป็นกระบวนการซ่อมแซม หรือเป็นการเคลื่อนย้ายสารอนุมูลอิสระที่สะสม โดยการออกซิไดซ์หรือทำลาย เช่น ใน nucleic acids ต้องซ่อมแซมด้วยเอนไซม์ที่เฉพาะเจาะจง การออกซิไดซ์โปรตีนโดยใช้ proteolytic systems และการออกซิไดซ์ลิปิดที่ membrane กระทำได้โดยใช้เอนไซม์ lipase, peroxidases และ acyl transferases

ซึ่งประเภทสุดท้ายนี้เป็นความพยายามเพื่อผลิตสารต้านอนุมูลอิสระในรูปของยาเพื่อรักษาและป้องกันอนุมูลอิสระที่ทำลายเนื้อเยื่อ ดังนั้นสารประกอบควรประกอบด้วย metal-chelating agents และ radical scavengers (กำจัดอนุมูลอิสระ) ซึ่งสารประกอบบางอย่างเป็นสารที่ใช้เกี่ยวกับคลีนิก หรือหาได้จากอาหารเสริมสุขภาพ เป็นที่น่าสังเกตว่า Probucol ที่ใช้ในคลีนิกเป็น lipid-lowering drug และตั้งแต่นั้นเป็นต้นมาพบว่าผลของสารต้านอนุมูลอิสระสามารถช่วยป้องกันการอุดตันของไขมันในเส้นเลือดโดยการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ low density lipoprotein (LDL)[43]

ปัญหาที่สำคัญที่สุดอย่างหนึ่งของการทดสอบที่เกี่ยวกับสารต้านอนุมูลอิสระก็คือ ปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระไม่สามารถเจาะจงเป้าหมายและการกำจัดในระบบสารชีวโมเลกุลได้ อนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (hydroxyl radical) เป็นตัวอย่างของอนุมูลอิสระที่ให้ผลในทางปฏิบัติได้อย่างรวดเร็วซึ่งตรงกับความหมายของคำว่า “specific $OH^{\bullet}$ scavenger” ในระบบของสารชีวโมเลกุล

6. การก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ของอนุมูลอิสระ (Free radicals in human disease)

เชื่อกันว่าอนุมูลอิสระทำให้เกิดโรคต่าง ๆ หลายชนิดในมนุษย์ และบางโรคหาสาเหตุไม่ได้ จึงถูกสงสัยว่าน่าจะเกิดจากอนุมูลอิสระด้วย ทั้งนี้อนุมูลอิสระมีอายุสั้นมาก อยู่ในช่วง microsecond และยากที่จะตรวจหาปริมาณได้ ซึ่งการวัดปริมาณผลิตผลอนุมูลอิสระจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น หรือเรียกว่า “footprint” ของปฏิกิริยา ซึ่งเกิดเพียงระยะเวลาสั้น ๆ วิธีการใหม่ ๆ ที่ใช้ในการตรวจวัดอนุมูลอิสระมีมากขึ้น เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูง ควรจะใช้เพื่อพิสูจน์หาอนุมูลอิสระในบริเวณที่ได้รับความเสียหาย สิ่งสำคัญคือ จะต้องแยกให้ออกระหว่างอนุมูลอิสระที่เป็นสาเหตุของความผิดปกติกับอนุมูลอิสระที่เกิดมาจากความผิดปกติ การจะแยกความแตกต่างได้ต้องทราบระยะเวลาของการเกิดอนุมูลอิสระ (time course) อย่างไรก็ตามการตรวจวัดปริมาณอนุมูลอิสระทำได้ยากจึงหวังว่าจะทราบบทบาทของอนุมูลอิสระต่อการเกิดโรคในมนุษย์

7. การวัดปริมาณของอนุมูลอิสระ (Measurement of free radical)

ดังที่ทราบแล้วว่าอนุมูลอิสระมีความว่องไวต่อปฏิกิริยามาก มี half-lifes สั้น และมี migration distance สั้น จึงเป็นการยากที่จะวัด อนุมูลอิสระออกซิเจน สามารถตรวจวัดได้ทางภายนอกเซลล์ (in vitro) วิธีเดียว คือ electron spin resonance (ESR) ซึ่งเป็นวิธีทางฟิสิกส์เป็นการวัดแบบ in vitro เท่านั้น อนุมูลอิสระออกซิเจนสามารถตรวจวัดได้ทาง in vitro โดยการใช้ spin trap แล้วตรวจหาโดยใช้ ESR นอกจากนี้ยังสามารถใช้ trap in vivo แล้วตรวจวัดแบบ ex vivo โดยการให้ทำปฏิกิริยากับ salicylic acid เนื่องจากปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับอนุมูลอิสระออกซิเจนทำให้เกิด chemiluminescence จึงทำให้สามารถติดตามจากอวัยวะได้ทั้งแบบ in vitro และ in vivo จนถึงปัจจุบันนี้วิธีการวัดที่พบได้บ่อยที่สุด คือ การวัดผลิตผลของอนุมูลอิสระที่เข้าทำปฏิกิริยากับ biological substrate ของอนุมูลอิสระออกซิเจน ที่เข้าทำปฏิกิริยากับ lipids, proteins, carbohydrates และ nucleic acids ซึ่งสามารถตรวจวัดได้ทั้งหมด บางวิธีเป็นการวัดแบบหยาบ ๆ อาศัยปฏิกิริยา chemical derivatization เพียงปฏิกิริยาเดียว บางวิธีสลับซับซ้อนต้องอาศัยการแยก ผลผลิตแต่ละชนิดด้วย high performance liquid chromatography (HPLC),gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) และ Nuclear magnetic resonance (NMR) เป็นวิธีที่ทำให้สามารถศึกษาการเปลี่ยนแปลงของผลผลิตหลาย ๆ ตัวได้พร้อมกัน ซึ่งใช้ได้กับตัวอย่างหลายประเภทและอาจจะไม่ต้องมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง การตรวจวัดขบวนการป้องกัน อนุมูลอิสระก็มีความสำคัญเช่นกัน การตรวจวัดหาสารต้านอนุมูลอิสระเอนไซม์ หรือสารอื่น ๆ มีกระบวนการตั้งแต่ง่าย ๆ ไปจนถึงยาก เมื่อพบว่ามีการเปลี่ยนระดับสารต้าน

อนุมูลอิสระบางตัว ต้องระวังอย่างมากก่อนจะสรุปผล การเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระทำให้ผลของการป้องกันมีความซับซ้อนมากกว่าการกระทำของอนุมูลอิสระชนิดเดียว เนื่องจากการวัดส่วนใหญ่ใน ex vivo วัดเพียงทีละ 1 ชนิด โดยการใช้เนื้อเยื่อหรือสารละลายสัมผัสกับอนุมูลอิสระออกซิเจน เพียง 1 ชนิด จึงทำให้การวัดมีลักษณะได้ค่าที่ไม่แท้จริง ปัญหาอันหนึ่งของการวัดปริมาณอนุมูลอิสระและ ผลิตผลของอนุมูลอิสระ in vivo คือ สารตัวอย่างที่เป็นเนื้อเยื่อที่เกิดจากการอักเสบจะมีปริมาณ leucocyte จำนวนมากซึ่งสามารถสร้างอนุมูลอิสระได้ การตัดชิ้นส่วนเพื่อการตรวจวัดแบบ biopsy หรือ physical handing และการเตรียมเนื้อเยื่อกระตุ้นให้ leucocyte ผลิตอนุมูลอิสระทันที จึงทำให้ปริมาณ อนุมูลอิสระที่วัดได้มาจาก leucocyte ที่มีอยู่มากกว่าปริมาณอนุมูลอิสระที่มีอยู่จริงทำให้แปลผลผิดพลาด ในกรณีของอาหารเมื่อถูกตัดออกมาแล้วจะมีการเปลี่ยนแปลงของผลิตผลอนุมูลอิสระและปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระถึงแม้ว่าจะเก็บที่ $-70^{\circ}C$ ดังนั้นนอกจากปัญหาในการวิเคราะห์แล้วปัญหาอีกด้านหนึ่งก็คือเกี่ยวกับการเก็บรักษาตัวอย่างด้วย[44]

สารต้านอนุมูลอิสระ (ANTIOXIDANTS)

มีผู้ให้คำจำกัดความของสารต้านอนุมูลอิสระมากมายหลายท่าน โดยมีผู้ให้คำจำกัดความหรือการให้ความหมายของสารต้านอนุมูลอิสระดังนี้ Britton ให้ความหมายของสารต้านอนุมูลอิสระหมายถึง สารหรือโมเลกุลที่ทำให้เกิดการต้านอนุมูลอิสระ (effective antioxidant) เช่น carotenoid จะทำหน้าที่เคลื่อนย้ายอนุมูลอิสระออกจากระบบ เมื่อเกิดปฏิกิริยาแล้วจะทำให้เกิด ผลผลิตที่ไม่เป็นอันตราย หรือการทำปฏิกิริยาแล้วทำให้โมเลกุลของอนุมูลอิสระแตก[45] Tsuchihashi เสนอว่าสารต้านอนุมูลอิสระสามารถตรวจพบได้จากปัจจัยทั่วไป เช่น เมื่อเกิดอนุมูลอิสระสารต้านอนุมูลอิสระก็จะเข้ามาทำปฏิกิริยาทางเคมีต้านอนุมูลอิสระ[46] ซึ่งการเกิดปฏิกิริยาจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระในสิ่งแวดล้อมระดับย่อย ความเสถียร และอนุพันธ์ของสารต้านอนุมูลอิสระเกิดจากอนุมูลอิสระและการทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระตัวอื่น รูปแบบสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นลิปิด (lipid antioxidants) มี 2 กลุ่ม ด้วยกัน คือ primary antioxidants หรือ chain-breaking antioxidants และ secondary antioxidants หรือ preventive antioxidants

คำจำกัดความของสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ก็คือ สารตั้งต้น (substance) มีความเข้มข้นต่ำเมื่อเทียบกับตัวออกซิไดซ์ (oxidizable substrate) ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระนี้จะทำให้

เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันช้าลง หรือป้องกันการเกิดปฏิกิริยา นอกจากนี้สารต้านอนุมูลอิสระยังสามารถทำลายแหล่งของการออกซิไดซ์ได้[47] Krinsky ได้ให้คำจำกัดความของสารต้านอนุมูลอิสระทางชีววิทยาไว้ว่า เป็นสารประกอบที่สามารถป้องกันมิให้ระบบถูกทำลายได้โดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน[48] โดยทั่วไปตัวออกซิไดซ์จะประกอบด้วย ลิปิด (lipids) โปรตีน (proteins) คาร์โบไฮเดรต (carbohydrates) และ ดีเอ็นเอ (DNA) ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระอื่น ๆ เช่น วิตามินอี (vitamin E) และวิตามินซี (vitamin C) เป็นสารที่เกิดปฏิกิริยาแล้วสามารถกลับเข้ามาสู่กลไกได้อีกครั้ง[49]

1. คำจำกัดความและชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระ (Definition and types of Antioxidants)

สารต้านอนุมูลอิสระถือว่ามีความสำคัญต่อกระบวนการออกซิไดซ์อนุมูลอิสระ ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระสามารถพบได้ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น vitamin C (เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ cytosolic) vitamin E (เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ membrane) และ glutathione (เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ป้องกันอันตรายจากอนุมูลอิสระที่ cytosol และ membranes) เอนไซม์ก็ทำหน้าเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้เช่นกัน ได้แก่ glutathione peroxidase (GPX) glutathione reductase และ glutathione transferase ซึ่งทำหน้าที่ทำให้โมเลกุลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นออกซิเจนและน้ำ ส่วนเอนไซม์ superoxid dismutase (SOD) สามารถเปลี่ยน $O_2^{\bullet -}$ เป็น H_2O_2 ซึ่ง SOD จากไมโตคอนเดรีย (mitochondrial) คล้ายกับ SOD ของแบคทีเรียมาก สารต้านอนุมูลอิสระอื่น ๆ ที่สำคัญได้แก่ carotenoids และ ubiquinones เป็นสารต้านอนุมูลอิสระสามารถป้องกันอนุมูลอิสระออกซิเจน (oxygen free radicals; OFRs) ทั้ง intracellular และ extracellular สารต้านอนุมูลอิสระอื่นที่ใช้ในการศึกษา OFRs และ ROS อื่น ๆ เช่น dimethyl sulphoxide (DMSO) และ butylated hydroxytoluene (BHT) ส่วนสารเคมีที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น chelating agents เป็นสารที่สามารถป้องกันการเกิด OFRs เช่น ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA) และ desferrioxamine ซึ่งทำหน้าที่ย้ายโลหะไอออน (metal ions) ไม่ให้เกิดปฏิกิริยากับ OFRs ซึ่งจะทำให้เกิดอันตรายได้

ดังนั้นสารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งในสิ่งมีชีวิตจะมีระบบการป้องกันการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อจากอนุมูลอิสระ ซึ่งประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระมากมายหลายชนิดที่ทำหน้าที่แตกต่างกันไป มีทั้งที่เป็นเอนไซม์ สารประกอบที่ละลายในน้ำ และละลายในไขมัน สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ทำหน้าที่ในการป้องกันและกำจัดอนุมูลอิสระ นอกจากนี้

ยังทำหน้าที่ซ่อมแซมส่วนที่ถูกทำลาย ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระที่อยู่ในอาหารสามารถแบ่งออกได้เป็น 5 ชนิด ดังนี้

1.1 Primary antioxidants เป็นสารประกอบที่มี phenolic substances เป็นองค์ประกอบหลักทำหน้าที่หยุดหรือตัดสายโซ่ของอนุมูลอิสระ (free radical chains) ในปฏิกิริยา lipid oxidation[50-51] สารต้านอนุมูลอิสระชนิดนี้มีทั้งในธรรมชาติและสังเคราะห์ขึ้น ได้แก่ tocopherols, alkyl gallites, butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT) และ tertiary butyl hydroquinone (TBHQ) เป็นต้น สารต้านอนุมูลอิสระชนิดนี้ทำหน้าที่ให้อิเล็กตรอน

1.2 Oxygen scavengers ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระชนิดนี้ ได้แก่ ascorbic acid (vitamin C), ascorbyl palmitate, erythorbic acid (D-isomer of ascorbic acid) และ sodium salt เป็นต้น[52] ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับออกซิเจนและหยุดปฏิกิริยาโดยเคลื่อนย้ายออกซิเจนออกจากระบบแล้วเกิดเป็น phenolic antioxidants[40] ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเห็นได้จาก ascorbic acid ในผักและผลไม้

1.3 Secondary antioxidants ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระชนิดนี้ ได้แก่ dilauryl thiopropionate และ thiodipropionic acid[50,53] เป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดนี้ทำหน้าที่ย่อย lipid hydroperoxides ให้กลับสู่สภาวะเสถียร[54] ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระชนิดนี้จะมีอยู่ในอาหารของชาวอเมริกัน (american Food) และ drug aministration (FDA)

1.4 Enzymic antioxidants ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระชนิดนี้ ได้แก่ glucose oxidase, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase เป็นต้น[54-55] ทำหน้าที่โดยการทำให้ออกซิเจนละลายหรือเกาะติดกับ glucose oxidase หรือย้าย oxidative species (ออกจากระบบอาหาร) โดยใช้ superoxide dismutase

1.5 Chelating agents หรือ sequestrants ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระชนิดนี้ ได้แก่ citric acid, amino acid และ ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA) เป็นต้น[50,53,56] ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับ chelate metallic ions เช่น copper และ iron กระตุ้นปฏิกิริยา lipid oxidation โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา (catalytic action) ซึ่ง chelates บางครั้งเกี่ยวข้องกับ phenolic antioxidants บางครั้งสารต้านอนุมูลอิสระชนิดนี้ออกฤทธิ์ได้น้อยหรือไม่ออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ยกเว้นกรดอะมิโน[57-60] หรือ pro-oxidant[61] นอกจากนี้ phospholipids เช่น cephalin เป็น antioxidant synergists[62] ได้เช่นกันในบางระบบ

2. วิตามินบางชนิดที่มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ (Properties of some vitamins as antioxidant)

2.1 วิตามินซี (Vitamin C)

วิตามินซี (Vitamin C) เป็นสารที่สำคัญในปฏิกิริยาสายโซ่ของเอนไซม์ และเป็น โคแฟคเตอร์ (cofactor) ในปฏิกิริยา hydroxylation reactions ของคอลลาเจน จึงทำหน้าที่ในการ ป้องกันคอลลาเจน ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันดีขึ้น สามารถปรับระดับน้ำตาลในกระแสเลือดได้ ป้องกันการเกาะของคอเลสเตอรอลในเส้นเลือดและป้องกันการแข็งตัวของเลือด ป้องกันดวงตาจากแสงแดด ช่วยให้ปอดทำงานได้ดีขึ้น ช่วยในการดูดซึมเหล็กในลำไส้เล็ก สามารถป้องกันการเปลี่ยนจากสารไนไตรท์เป็นสารไนโตรซามินที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็งได้ ซึ่งโครงสร้างของวิตามินซีแสดงดังภาพ 1 วิตามินซีสามารถกำจัด superoxide, hydrogen peroxide, hyperchloric acid, peroxyl radicals และ singlet oxygen ได้ ทำให้ป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง[63-64] การทำปฏิกิริยาของวิตามินซีในการแสดงสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ โดย ascorbate ได้รับอิเล็กตรอน 2 ตัว จากปฏิกิริยา oxidation กลายเป็น dehydroascorbic acid (เกิดจากการออกซิไดซ์ vitamin C) และได้สารตัวกลางระหว่างการเกิดปฏิกิริยาก็คือ ascorbyl radical อย่างไรก็ตาม dehydroascorbic acid ก็ไม่เสถียรโดยจะถูกไฮโดรไลด์(เติมน้ำ, hydrolyzed) กลายเป็น L-2,3-diketogulonic acid อย่างรวดเร็วและสามารถกลับสู่รูป ascorbate ได้ นอกจากนี้ ascorbate สามารถเกิดพันธะแมมเบรน (membrane-bond) และไลโพโปรตีน (lipoprotein) กับ α-tocopherol ได้ ซึ่งกลไกของปฏิกิริยาแสดงดังภาพ 2[65]

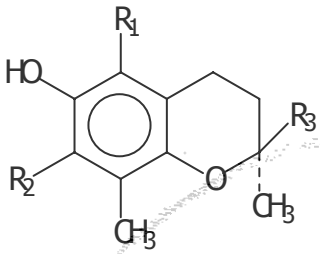
2.2 วิตามินอี (α-tocopherol or vitamin E)

α-tocopherol หรือรู้จักกันในนาม “Vitamin E” เป็นสารที่ละลายได้ในไขมันใน plasma และ LDL โครงสร้างแสดงดังภาพ 1 ซึ่ง Vitamin E สามารถทำลายสายโซ่อนุมูลอิสระ (chain-breaking antioxidant) ได้ [63-65] สามารถป้องกันการเกิด lipid peroxidation และลดกลไกการ ย่อยสลายของ arachidonic acid โดยเอนไซม์ lipoxygenase หรือ cyclooxygenase นอกจากนี้วิตามินอีสามารถลดการเกิดโรคหัวใจและโรคมะเร็งได้ ไอโซเมอร์ของวิตามินอี ได้แก่ β-, γ-, และ δ-tocopherol ซึ่งมีอยู่ปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับ α-tocopherol และเมื่อเทียบการออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเป็นดังนี้ $\alpha>\beta>\gamma>\delta$ ซึ่งการทำงานร่วมกันระหว่างวิตามินซีกับวิตามินอีเป็น ดังภาพ 2

2.3 Trolox

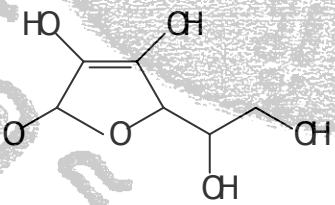
Trolox สามารถละลายได้ในน้ำจากส่วนของ α-tocopherol และเป็น analog ของวิตามินอี[1] โดยมีการแทนที่ของส่วนที่ไม่ละลายน้ำด้วยหมู่ COOH โครงสร้างแสดงดังภาพ 1 ซึ่ง Trolox เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีในการกำจัด peroxyl และ alkoxyl radicals จากนั้นจะเปลี่ยนรูปของ Trolox radical กลับคืนสู่สภาพเดิมโดยใช้ ascorbate

โครงการหลวง

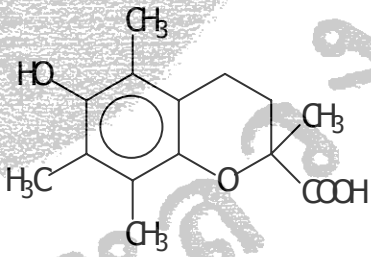


Vitamin E

	R_1	R_2	R_3
α- Tocopherol	CH_3	CH_3	$C_{16}H_{33}$
β - Tocopherol	CH_3	H	$C_{16}H_{33}$
γ - Tocopherol	H	CH_3	$C_{16}H_{33}$
δ - Tocopherol	H	H	$C_{16}H_{33}$

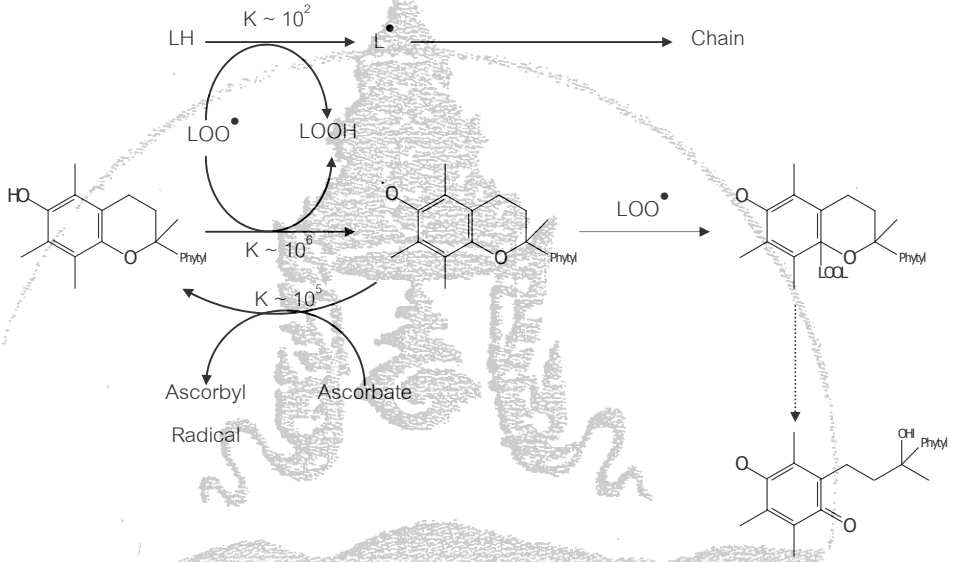


Vitamin C



Trolox

ภาพ 1 โครงสร้างของวิตามินอี วิตามินซี และ Trolox [25-26]



ภาพ 2 การเกิดปฏิกิริยาร่วมกันระหว่างวิตามินอี (vitamin E) และวิตามินซี (vitamin C)[65]

3. สารต่อต้านอนุมูลอิสระอื่น ๆ (Other antioxidants)

ปัจจุบันได้มีสารต่อต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ขึ้นมากมาย เช่น สังเคราะห์ขึ้นเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมยางเพื่อป้องกันการออกซิไดซ์ copper-catalyze ของ polypropylene ในอุตสาหกรรมโพลีเมอร์ใช้ในการป้องกันการรีดิวซ์จาก UV (UV-induced free radical) ของพลาสติก และในด้านอาหารใช้ในการป้องกันการถูกออกซิไดซ์ของลิปิด ในระหว่างการเก็บหรือป้องกันการเหม็นหืน การให้ความร้อน การสเตอร์ไลส์ (sterilize) โดยใช้การฉายรังสี ซึ่งตาราง 1 แสดงถึงโครงสร้างของสารต่อต้านอนุมูลอิสระที่ใช้ทางด้านอาหาร โดยสารส่วนใหญ่มีกลุ่มฟีนอล (A-OH) และอะโรมาติกเอมีน (aromatic amines; A-NH--) ซึ่งสามารถแตกสายโซ่ได้เช่นเดียวกันกับ vitamin E โดยให้อะตอมของไฮโดรเจนกับ peroxyl และ alkoxyl radicals ดังปฏิกิริยาข้างล่าง

$$A\text{-}OH + RO_2^{\bullet}(RO^{\bullet}) \longrightarrow A\text{-}O^{\bullet} + RO_2H(ROH)$$

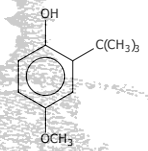
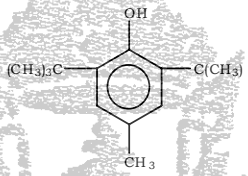
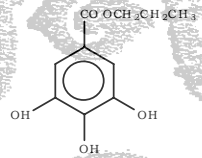
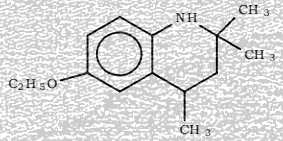
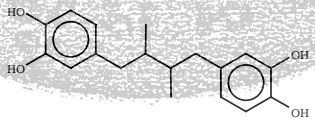
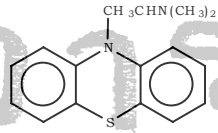
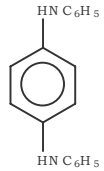
$$A\text{-}NH\text{--} + RO_2^{\bullet}(RO^{\bullet}) \longrightarrow A\text{-}N^{\bullet}\text{--} + RO_2H(ROH)$$

ซึ่งไนโตรเจน หรือออกซิเจน จะเป็นศูนย์กลางของ antioxidant radical ($A\text{-}N^{\bullet}$--, $A\text{-}O^{\bullet}$) ดังนั้นทำให้ไฮโดรเจนไม่เพียงพอเพราะเกิด delocalization ของอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวกลายเป็นวง อะโรมาติก (aromatic ring) นอกจากนี้ยังมีกลไกของปฏิกิริยาที่ทำให้สารต่อต้านอนุมูลอิสระกลับคืนสู่สภาพได้ กลไกของการเกิดปฏิกิริยาเป็นดังสมการข้างล่าง ซึ่งประกอบด้วย self-reaction ของ radicals โดย $A^{\bullet}$ เป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระ

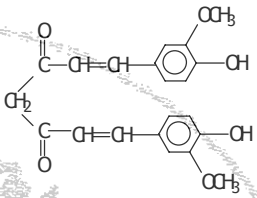
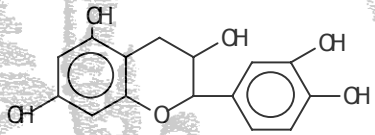
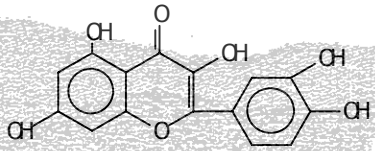
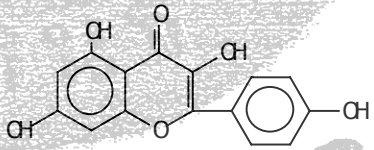
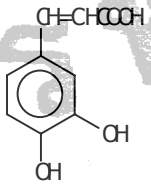
$$\left.\begin{array}{l} RO_2^{\bullet} + A^{\bullet} \\ RO^{\bullet} + A^{\bullet} \\ A^{\bullet} + A^{\bullet} \end{array}\right. \longrightarrow \text{non-radical products.}$$

สารต่อต้านอนุมูลอิสระต่าง ๆ แสดงดังตาราง 1 และ 2 ซึ่งส่วนใหญ่จะแสดงสมบัติอื่นมากกว่าการแตกสายโซ่ เช่น สารกลุ่มฟีนอลจะสามารถต่อต้านสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะไอออนได้ สารประกอบเชิงซ้อน โดยเฉพาะเกิดการเชื่อมต่อกับกลุ่ม –OH อย่างไรก็ตามการแตกสายโซ่ก็ยังเกิดมากกว่าระบบ peroxidize lipid system เนื่องจากสารต่อต้านอนุมูลอิสระที่เป็นฟีนอลิกสามารถยับยั้งกระบวนการ peroxidation โดยทั่วไปในพืชผักจะมีฟลาโวนอยด์ (flavonoid) และโพลีฟีนอล (polyphenol) ที่ทำให้เกิดการแตกสายโซ่ได้ ซึ่งสารดังกล่าวแสดงดังตาราง 2 เช่น quercetin และ catechin ที่สามารถเกิด metal-binding ได้

ตาราง 1 แสดงโครงสร้างของสารต่อต้านอนุมูลอิสระที่ใช้ทางด้านอาหาร

ชื่อ	โครงสร้าง	การใช้
Butylated hydroxyanisole (BHA)		เป็นตัวที่ใช้ผสมลงในอาหารเป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระที่ให้อะตอมของไฮโดรเจน
Butylated hydroxytoluene (BHT)		ใช้ผสมในอาหาร
Propyl gallate		ละลายน้ำได้ปานกลาง ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ใช้ผสมในอาหารสารมารถรวมตัวกับเหล็กได้
Ethoxyquin (Santoquin)		ผสมลงในผลไม้กระป๋อง
Nordihydroguaiarctic acid (NDGA)		ผสมลงในอาหารและโพลิเมอร์ เช่น ยาง สารหล่อลื่น และสามารถรวมตัวกับเหล็กได้
Promethazinc		ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ในหลอดทดลอง
N,N'-Diphenyl-*p*-phenylene diamine (DPPD)		ใช้เป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง (popular antioxidant *in vitro*)

ตาราง 2 แสดงโครงสร้างของสารต่อต้านอนุมูลอิสระบางชนิดที่มีในพืชผัก[47]

ชื่อ	โครงสร้าง
Curcumin	
Catechin	
Quercetin	
Kaempferol	
Caffeic acid	

3.1 ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

ฟลาโวนอยด์ หรือ bioflavonoids เป็นกลุ่มที่มีสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound; polyphenols) มากกว่า 4,000 ชนิด มีลักษณะโครงสร้างคล้ายคลึงกัน โดยธรรมชาติพบอยู่ในพืชผักและผลไม้ ฟลาโวนอยด์พบมากมายในพืชสมุนไพรและพืชที่ใช้เป็นยาแผนโบราณ[66] สามารถแบ่งฟลาโวนอยด์ออกเป็น 5 กลุ่ม[67] ดังนี้

3.1.1 Anthocyanidins anthochlors และ aurones ซึ่ง anthocyanidin มีสีแดง-น้ำเงิน (เช่น สีแดงและน้ำเงินในส่วนต่าง ๆ ของพืช) ส่วน anthochlors และ aurones มีสีเหลืองพบในส่วนของดอก

3.1.2 Minor flavonoids ประกอบด้วย flavanones, flavan-3-ols, dihydroflavones และ dihydrochalcones นอกจากนี้ยังสามารถแบ่ง minor flavonoids ได้ออกเป็น flavanol หรือ เกิดจาก 2 โมเลกุล ของ flavan-3-ols รวมตัวกัน ประกอบด้วย (+)-catechin และ epigallocatechin 3-gallate (EGCG) และ flavanols หรือ flavan-3-ols เกิดจาก pycnogenols

3.1.3 Flavones และ flavonols ทั้ง 2 กลุ่มนี้เป็นสารที่พบได้บ่อย สารกลุ่มนี้ได้แก่ flavonol aglycones, quercetin, kaempferol, quercetin, rutin และ myricetin

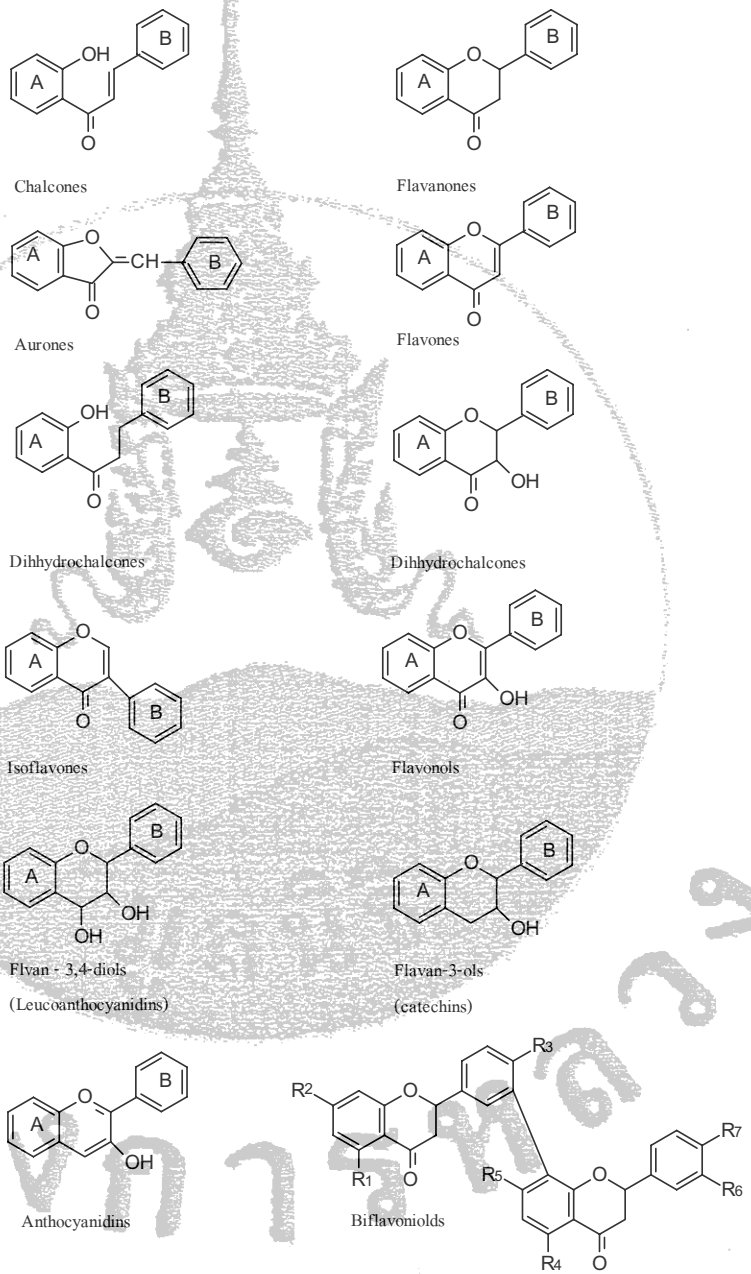
3.1.4 Isoflavonoids พบมากใน Leguminosea family (legumes) และมีอนุพันธ์ เช่น isoflavones, isoflavonones, pterocarpans, isoflavans และ rotenoids ปกติ isoflavonoids จะประกอบด้วย genistein, daidzein และ biochanin A

3.1.5 Tannins ประกอบด้วย proanthocyanidins และ gallic acid phenolics (gallo- และ ellagi-tannins) แทนนินสามารถรวมตัวโปรตีนได้ และละลายน้ำได้ดี ซึ่ง proanthocyanidins เป็นไดเมอร์ของ flavanols ส่วนใหญ่ในพืชจะมีสารพวกฟลาโวนอยด์ เช่น ผลของส้ม และมะนาว จะมีสารกลุ่ม flavones และ flavanones ขณะที่ชาเขียวจะมี catechins (17-30% ของน้ำหนักแห้ง) และ gallic acid phenolics สูง ส่วน anthocyanidins พบในผลไม้ที่มีสีแดงน้ำเงิน และม่วง เช่น เบอร์รี่ (berries) และองุ่น (grapes) และ OPC พบมากในสับปะรด และเมล็ดองุ่น[68] ซึ่งฟลาโวนอยด์ที่มีมวลโมเลกุลสูง ก็คือ แทนนิน (tannins) ซึ่งโครงสร้างของสารฟลาโวนอยด์และแทนนินแสดงดังภาพ 3 และ 4 แทนนินเป็นสารประกอบเชิงซ้อนฟีนอลลิก ประกอบด้วย

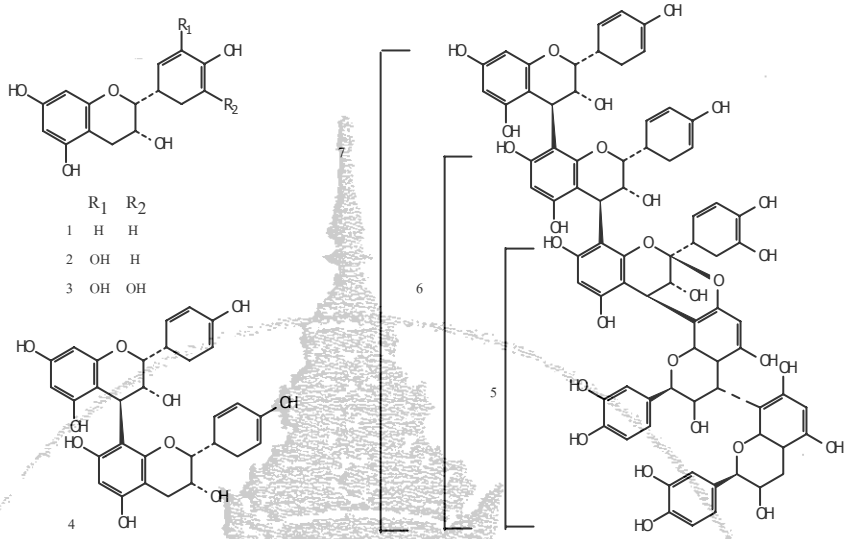
คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจนมีรูปผลึกไม่แน่นอน และไม่สามารถตกผลึกได้ สามารถแบ่งชนิดของแทนนินได้ออกเป็น 2 ประเภท คือ

3.1.5.1 ไฮโดรไลซ์เซเบิลแทนนิน (hydrolyzable tannins) หรือ pyrogallo tannin เป็นแทนนินที่มีโครงสร้างเป็นสารประกอบโพลีฟีนอลที่ซับซ้อน สามารถสลายตัวได้ง่ายเมื่อทำการแยกสลายด้วยน้ำ แทนนินชนิดนี้เป็นเอสเทอร์ระหว่างน้ำตาล 1 โมเลกุล กับกรดโพลีคาร์บอกซิลิก (polycarboxilic acid) อีก 1 หรือมากกว่า 1 โมเลกุล น้ำตาลส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลกลูโคสเกิดการเชื่อมโยงแบบเดปไซด์ (depside linkage) ทำให้แทนนินถูกไฮโดรไลซ์ได้ง่ายด้วยกรด-ด่าง และเอนไซม์บางชนิด

3.1.5.2 คอนเดนซ์แทนนิน (condensed tannin) หรือ catechin หรือ phlobatannin เป็นแทนนินชนิดรวมตัวกันแน่นเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างซับซ้อนมาก จัดเป็นสารโพลีฟีนอล มีมวลโมเลกุล 500-3,000 ถูกย่อยสลายได้ยาก ประกอบด้วยโพลีไฮดริกฟีนอล (polyhydric phenols) เชื่อมต่อกันเป็นโมเลกุลที่ใหญ่ขึ้นด้วย C-C linkage ไม่สามารถไฮโดรไลซ์ได้ด้วยกรด-ด่าง แต่ละลายได้ดีในน้ำร้อน แอลกอฮอล์ และอะซิโตน พบมากในพืชชั้นสูงกว่า hydrolyzable tannins ซึ่ง คอนเดนซ์แทนนินทุกตัวเกิดจาก catechin (3,5,7,3,4-pentahydroxy flavan) หรือ flavanol (5,7,3,4-tetrahydroxy flavan 3-ol) แทนนินชนิดนี้สามารถรวมตัวกับกรดหรือสารอินทรีย์ต่าง ๆ และเมื่อนำคอนเดนซ์แทนนินไปต้มกับกรดจะเกิดการ polymerization ได้ตะกอนแดง เรียกว่า tannin red ซึ่ง แทนนินชนิดนี้ ได้แก่ 3-galloyl catechin พบในใบชา leucoanthocyanin พบในผลไม้สุก



ภาพ 3 แสดงโครงสร้างของฟลาโวนอยด์บางกลุ่ม เช่น flavanols, flavanones, flavones และ anthocyanidins[69]



ภาพ 4 แสดงโครงสร้างของ flavan-3-ols และ proanthocyanidins[63]

(1) (-)-epiafzelechin

(2) (-)-epicatechin

(3) (-)-epigallocatechin

(4) epiafzelechin-(4β→8)–epiafzelechin

(5) epicatechin-(4β → 8, 2β→ 0 → 7)–epicatechin-(4β→ 8)–epicatechin

(6) epicatechin-(4β → 8)- spicatechin-(4β → 8, 2β → 0 → 7)–epicatechin-(4β → 8)–epicatechin

(7) epicatechin-(4β → 8)-spicatechin-(4β → 8)- epicatechin-(4β → 8, 2β → 0 → 7)–epicatechin-(4β → 8)–epicatechin (7)

4. อนุพันธ์ของสารต่อต้านอนุมูลอิสระจากพืช (Properties of some antioxidants derived from plants)

4.1 เคอร์คิวมิน (Curcumin) เป็นสารที่สามารถป้องกันการเกิดโรคมะเร็งได้ [70-72] จากการศึกษาพบว่า Curcumin เป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระที่ดี และสามารถยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ได้โดยใช้เหล็กเป็น chelator จากการศึกษาพบว่า phenolic group หรือ methoxy group ของวงเบนซินไม่มีความสำคัญในการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ที่มีเหล็กเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

1,3-diketone เป็นลิแกนด์ สำหรับโลหะ เช่น เหล็ก จากสเปกตรัมพบว่า Curcumin สามารถเกิดปฏิกิริยากับ Fe^{2+} เกิดเป็น Fe^{3+} ซึ่งโครงสร้างของ Curcumin แสดงดังตาราง 2

4.2 Oligomeric proanthocyanidins (OPC) เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ flavan-3-ol 2-3 โมเลกุล เชื่อมต่อกัน โดยแต่ละโมเลกุลของ flavanol นั้นเรียกว่า monomer แต่ถ้า flavanol รวมกันสองโมเลกุลเรียกว่า dimer และถ้า flavanol รวมกันสามโมเลกุล เรียกว่า trimer ซึ่งโมโนเมอร์จะประกอบกันเป็น OPC และถ้าไดเมอร์และไตรเมอร์ประกอบกันจะเรียกว่า oligomers ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง และเมื่อสารดังกล่าวรวมตัวกันใหญ่ขึ้นจะเกิดเป็นแทนนิน ซึ่งแท้จริงแล้ว OPC จะไม่ค่อยมีสีแต่สีน้ำเงินหรือแดงจะได้จากกระบวนการของเอนไซม์ OPC เป็นสารที่ส่งเสริมและบำรุงสุขภาพซึ่งพบในส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ในเมล็ดองุ่น และสับปะรด ซึ่ง OPC เป็นสารโพลีฟีนอลซึ่งแสดงการต่อต้านอนุมูลอิสระได้ดี [73]

พืชสมุนไพรที่ทำการศึกษา

1. ลาเวนเดอร์

ภาพ 5 ลาเวนเดอร์

ชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Lavandula angustifolia* เป็นไม้พุ่ม เขียวตลอดปี ใบแหลมยาว ดอกมีลักษณะเป็นช่อสีม่วงคราม มีกลิ่นหอมทั้งต้น นิยมนำส่วนใบ และดอกมาทำเป็นเครื่องดื่มและผสมในไอศกรีม ทำให้แผลหายเร็ว คลายเครียด ลดความวิตกกังวล บรรเทาอาการปวดศีรษะและกล้ามเนื้อ

2. เลมอนบาล์ม

ภาพ 6 เลมอนบาล์ม

ชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Melissa Officinalis* มีลักษณะคล้ายมินท์ สะระแหน่และกระเพราของประเทศไทย ต้นและใบมีขนปกคลุมมาก ใบเป็นรูปหัวใจ ขอบใบหยัก ต้นเป็นไม้เนื้ออ่อน การเจริญเติบโตแบบเลื้อย ดอกมีสีขาวครีม เกิดที่ซอกใบ ขนาดทรงพุ่ม 50-100 ซม. ใช้ใบอบแห้งนำมาชงคล้ายชา เป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ ทำให้สดชื่น และแก้อาการ ท้องอืดเฟ้อ

3. ออริกาโน

ภาพ 7 ออริกาโน

ชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Origanum valgare* เป็นพืชยืนต้นเป็นไม้พุ่มขนาดเล็กสูง 30-50 ซม. ลำต้นและใบมีขนปกคลุม และการเจริญเติบโต เป็นแบบเลื้อยแตกกิ่งและสาขามาก ใบสีเขียวอมเทา ดอกเกิดเป็นช่อที่ปลายกิ่งสีขาว-ชมพูอ่อน ใช้ยอดอ่อนสดและแห้งเป็นเครื่องเทศ มีรสเผ็ดใช้ในการปรุงอาหารประเภทพิซซ่า สปาเก็ตตี้ ซอสมะเขือเทศ และอาหารประเภทชีสต่างๆ เหมาะกับอาหารประเภทเนื้อที่มีไขมันมาก และอาหารประเภทผัก ใช้ใบชงเหมือนชาเป็นยาแก้ไอ แก้ท้องอืดเฟ้อได้ดี สามารถปลูกได้ตลอดทั้งปี แต่ผลผลิตมีมากในช่วงเดือน เม.ย.- ก.ย.

4. ยูเอสเอมินท์

ภาพ 8 ยูเอสเอมิ้นท์

ชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Mentha peperita* เป็นพืชข้ามปีส่วนใหญ่จะเป็นพืชยืนต้นขนาดความสูง 30-80 ซม. ลักษณะใบมีตั้งแต่กลมจนถึงใบรูปหอก ขอบใบหยักใต้ใบมีขนปกคลุม ดอกเป็นช่อสีชมพู-ม่วงแดง นิยมใช้ใบชงเหมือนชาและใช้เป็นเครื่องเทศปรุงอาหารประเภทย่าง เช่น หมู และเนื้อแกะ นอกจากนี้ปรุงแต่งกลิ่นรสชาติของซอส และเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ ในน้ำมันหอมระเหยมีองค์ประกอบสำคัญได้แก่ Menthol Menthon และ Jasmon มีฤทธิ์เป็น Antiseptic ด้วย จึงนิยมนำไปผสมยาสีฟัน ยาอมบ้วนปาก และลูกอม ตลอดจนครีมทางภายนอก และใช้ประกอบอาหาร

5. มาโจแรม

ภาพ 9 มาโจแรม

ชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Oreganum Majorana* L. วงศ์ Labiatae / Lamiaceae เป็นพืชตระกูลเดียวกับโหระพาและกระเพราแต่มีขนาดเล็กกว่า ทรงพุ่มสูง 30 ซม. ลำต้นและใบมีขนปกคลุม ใบรูปไข่ขนาดเล็ก มีสีเขียวอมเทา กลีบดอกสีชมพูหรือขาว เมล็ดมีขนาดเล็กมากสีน้ำตาลเข้ม ส่วนใบทั้งสดหรือแห้งใช้แช่น้ำมันเป็นเครื่องเทศในสัตว์ปีกอบและในไส้กรอก หรือใช้เป็นส่วนผสมในอาหารจำพวกพิซซ่า สปาเก็ตตี้ (ผสมกับทาย์ม และออริกาโน) ใช้ทำชาดื่มรักษาอาการหวัด เจ็บคอ ช่วยให้หายใจสะดวก และการหมุนเวียนโลหิตดีขึ้น และแก้ท้องอืดเฟ้อ ส่วน ในน้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์กระตุ้นความอยากรับประทานอาหาร ขับน้ำลาย และช่วยระบบย่อยอาหาร คนไทยใช้โรยรับประทานกับพิซซ่า[74-79]

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

สารเคมี

1. Sodium chloride (NaCl) (Merck)
2. Potassium chloride (KCl) (Merck)
3. di-Sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) (Merck)
4. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) (Merck)
5. Potassium permaganate ($KMnO_4$) (Merck)
6. Myoglobin (Fluka)
7. Potassium ferriccyanide ($K_2Fe(CN)_6$) (Riedel-de Haen)
8. 30% Hydrogen peroxide (H_2O_2) (Merck)
9. ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) (Fluka)
10. Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchlorman-2-carboylic acid) (Fluka)
11. Ethanol absolute (Merck)
12. Sulfuric acid (conc. H_2SO_4) (J.T. Baker)
13. Hydrochloric acid (conc. HCl) (J.T. Baker)
14. Diethyl ether (Merck)
15. Dichloromethane (Merck)
16. Ethanol (Merck)
17. Methanol (Merck)
18. Acetone (Merck)
19. Acetic acid (Merck)

เครื่องมือ

1. UV/Vis Spectrophotometer (Shimadzu, UV-1201V)
2. Super speed refrigenerated centrifuge, RC28S (Sorval)
3. pH meter (Mettler Toledo 320)
4. Vacuum rotating evaporator (Buchi B-480)
5. Freeze –dryer (FTS Systems, Flexi-Dry™)
6. UV/VIS Scanning Spectrophotometer (Milton Roy, Spectronic Genesis 5)

การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิจัย

1. 5 mM Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4

เตรียมโดยละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 8.00 กรัม(g) โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) 0.20 กรัม โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 1.15 กรัม และ โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 0.20 กรัม ในน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มไล่อากาศ 800 มิลลิลิตร (ml) จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 ml และปรับความเป็นกรด-ด่างให้มีค่าเท่ากับ 7.4 ด้วย NaOH หรือ HCl ความเข้มข้น 1.0 โมลต่อลิตร (mol/l;M)

2. สารละลาย metmyoglobin

เตรียมจาก myoglobin ซึ่งประยุกต์วิธีการของ Miller et al.[80-82] โดยเตรียม myoglobin (จาก horse skeletal muscle) ความเข้มข้น 400 μM ใน 5 mM PBS buffer pH 7.4 ผสมด้วย 740 μM potassium hexacyanoferrate (III) ในปริมาตรที่เท่ากัน จากนั้นนำไป dialyse 2 ครั้ง ในสารละลาย PBS buffer pH 7.4 ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C ครั้งละ 12 ชั่วโมง แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของ metmyoglobin ตามวิธีของ Miller et al. ซึ่งจะได้ความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 90-95% ซึ่งสารละลาย metmyoglobin ดังกล่าวสามารถเก็บไว้ได้ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C

3. 5 mM ABTS stock solution

เตรียมโดยละลาย ABTS {2,2′- azino-bis (3 – ethylbenthiazoline – 6 - sulfonic acid)} ใน 5 mM PBS buffer pH 7.4 ให้ได้ความเข้มข้น 5 mM เพื่อใช้ในการเตรียม 500 μM ABTS สำหรับใช้ในการทดลองโดยเจือจางด้วย 5 mM PBS buffer pH 7.4

4. Hydrogen peroxide (H_2O_2)

เตรียมจาก 30% H_2O_2 เจือจางด้วยน้ำกลั่นต้มไล่อากาศเพื่อให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ วัดความเข้มข้นที่แน่นอนของ H_2O_2 โดยวิธีเปอร์แมงกาเนตไตเตรชัน (Permaganate titration) ซึ่งวิธีการดังกล่าวเตรียมโดยผสมน้ำกลั่นไล่อากาศปริมาตร 20 ml ด้วย 2.0 N H_2SO_4 ปริมาตร 20 ml และผสม H_2O_2 2.0 ml จากนั้นนำไปไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียม-เปอร์แมงกาเนต ($KMnO_4$) ความเข้มข้น 0.1 N จนกระทั่งถึงจุดยุติ (end point) ซึ่งสารละลายจะเปลี่ยนสีจากไม่มีสีเป็นสีชมพูอ่อน จากนั้นคำนวณหาความเข้มข้นของ H_2O_2 จากสมการที่ 1

$$[H_2O_2] = \frac{(10)(\%H_2O_2)D}{MW} \quad \text{----------} \quad \textbf{(1)}$$

% H_2O_2 หมายถึงความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่แสดงเป็นร้อยละ

D หมายถึงความหนาแน่นของ H_2O_2

MW หมายถึงมวลโมเลกุลของ H_2O_2

5. Trolox

เตรียมโดยละลาย Trolox (6-hydroxy –2,5,7,8-tetramethyl chroman-2 carboxylic acid) ใน 70% ethanol ให้ได้ความเข้มข้น 2.5 mM และเจือจางด้วย 70% ethanol ให้ได้ความ เข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, และ 2.5 mM เพื่อใช้ในการทำ Standard Curve

การดำเนินการวิจัย

1. การตรวจเอกสารงานที่เกี่ยวข้องเพื่อเตรียมปฏิบัติการในห้องปฏิบัติการ
2. การเก็บตัวอย่างพืชสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ที่ใช้ในการวิจัย

ตัวอย่างของพืชสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้เก็บจากมูลนิธิโครงการหลวงที่ศูนย์หนองหอย อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ โดยแบ่งการเก็บตัวอย่างออกเป็น 3 ครั้ง ดังนี้

ครั้งที่ 1 เก็บตัวอย่างวันที่ 25 กุมภาพันธ์ 2547

ครั้งที่ 2 เก็บตัวอย่างวันที่ 27 มีนาคม 2547

ครั้งที่ 3 เก็บตัวอย่างวันที่ 28 เมษายน 2547

* เก็บตัวอย่างที่เก็บไม่ครบ วันที่ 17 กันยายน 2547

3. การสกัดสารสกัดจากพืชสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด

3.1 ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารจากกวาวเครือดำ

ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารสกัดจากพืชสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด คือ Diethyl ether, Dichloromethane, Ethanol, Methanol, Acetone, Acetic acid และน้ำกลั่น (ซึ่งเรียงลำดับตามความมีขั้วของตัวทำละลาย)

3.2 นำพืชสมุนไพรแต่ละชนิดล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้งจนสะอาด ผึ่งให้แห้ง และนำไปชั่งให้ได้น้ำหนัก 100 g ปั่นบดด้วย Waring Blender ในตัวทำละลายตามข้อ 3.1 ในปริมาตร 400 ml แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นแยกเอาส่วนสกัดโดยกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1 และแยกส่วนสกัดออกจากตัวทำละลาย (Solvent) ด้วยเครื่อง Vacuum Evaporator (Buchi B-480) ที่อุณหภูมิ 40 ^{o}C และนำไปประเหยแห้งด้วย Freeze Vacuum Dryer (FTS system, Flexi-Dry) ที่อุณหภูมิ -50 ^{o}C บันทึกสีและน้ำหนักที่ได้และเก็บส่วนสกัดที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ –50 ^{o}C เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

4. การทำกราฟมาตรฐาน (Standard Curve) ของ Trolox

เตรียมส่วนผสมสารละลายของ 500 μM ABTS ปริมาตร 900 μl 5 mM PBS buffer ปริมาตร 1,500 μl 100 μM metmyoglobin ปริมาตร 100 μl ในหลอดทดลอง 5 หลอด และเติมสารละลายมาตรฐาน Trolox (Standard Solution) ปริมาตร 25 μl ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 mM ตามลำดับ จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาด้วย 108 μM H_2O_2 ปริมาตร 500 μl แล้ว

นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV/VIS Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 734 nm ทุก ๆ 1 นาที เป็นเวลา 45 นาที โดยเปรียบเทียบกับหลอดทดลองที่ไม่มี Trolox (blank) เขียนกราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันของ Trolox นำค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ลดลงคำนวณหา %Inhibition ของ Trolox ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน จากนั้นเขียนกราฟ %Inhibition ของ Trolox ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 mM ที่เวลา 20 นาที เป็นกราฟมาตรฐาน (Standard Curve) ของ Trolox

5. การตรวจหาฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากพืชสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด

ละลายส่วนสกัดจากพืชสมุนไพรแต่ละชนิดใน 70% ethanol ให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการวัดค่าการดูดกลืนแสงก่อนนำมาตรวจหาฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระ โดยเตรียมสารละลายผสม 500 μM ABTS ปริมาตร 900 μl 5 mM PBS buffer ปริมาตร 1,500 μl 100 μM metmyoglobin ปริมาตร 100 μl และเติมสารสกัดกวาวเครือดำปริมาตร 25 μl และเขย่าสารละลายให้เข้ากัน จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาด้วย 108 μM H_2O_2 ปริมาตร 500 μl ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที (เท่ากับเวลาของกราฟมาตรฐาน Trolox)แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV/VIS Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 734 nm เพื่อคำนวณหา % Inhibition ของสารสกัดจากกวาวเครือดำที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เปรียบเทียบกับหลอดทดลองที่ไม่มีส่วนของสารสกัด (blank) จากนั้นนำค่า %Inhibition ของสารสกัดจากกวาวเครือดำไปคำนวณหาฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ซึ่งจะแสดงโดยค่า TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) มีหน่วยเป็น μmole Trolox / 1 mg สารสกัด

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. สีและน้ำหนักของสารสกัดจาก ลาเวนเดอร์ ยูเอสเอมินท์ เลมอนบาล์ม ออริกาโน และมาโจแรม

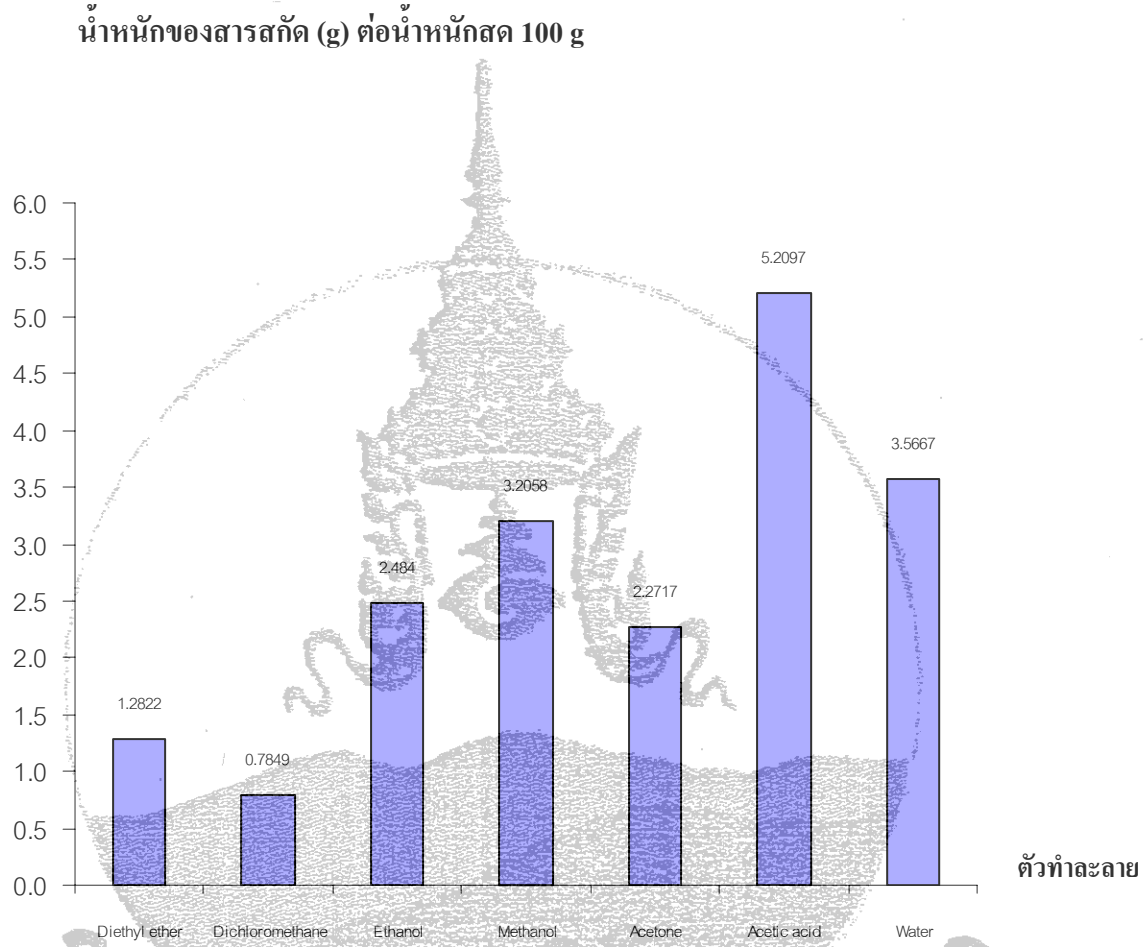
1.1 อิทธิพลของตัวทำละลายต่อน้ำหนักของสารสกัดจากพืชทั้ง 5 ชนิด

จากการศึกษาพบว่าสารสกัดของพืชสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด นั้นมีสีน้ำตาลจนถึงสีดำ โดยการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ตัวทำละลายทั้งหมด 7 ชนิด คือ Diethyl ether, Dichloromethane, Ethanol, Methanol, Acetone, Acetic acid และน้ำกลั่น ซึ่งพบน้ำหนักของสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายทั้ง 7 ชนิด แสดงดังตารางที่ 3 และกราฟที่ 1 แสดงให้เห็นว่าตัวทำละลายต่างชนิดกันมีผลต่อน้ำหนักของสารสกัดจากลาเวนเดอร์ ยูเอสเอมินท์ เลมอนบาล์ม ออริกาโน และมาโจแรม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดย Acetic acid เป็นตัวทำละลายที่สามารถสกัดพืชทั้ง 5 ชนิด ให้มีน้ำหนักสารสกัดมากที่สุด รองลงมาคือ น้ำกลั่น, Methanol, Ethanol และ Acetone ส่วน Diethyl ether และ Dichloromethane เป็นตัวทำละลายที่สามารถสกัดพืชสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ให้มีน้ำหนักสารสกัดได้น้อยที่สุด

ตาราง 3 แสดงผลของตัวทำละลายต่อน้ำหนักของสารสกัดจากลาเวนเดอร์ ยูเอสเอมินท์ เลมอนบาล์ม ออริกาโน และมาโจแรม

ตัวทำละลาย	สภาพความมีขั้ว	น้ำหนักของสารสกัด (g) ต่อน้ำหนักสด 100 g ± SD
1. Diethyl ether	2.1	1.2822 ± 0.4249^{e}
2. Dichloromethane	3.1	0.7849 ± 0.3405^{e}
3. Ethanol	4.3	2.4840 ± 0.7550^{cd}
4. Methanol	5.1	3.2058 ± 1.2120^{bc}
5. Acetone	5.1	2.2717 ± 0.9200^{d}
6. Acetic acid	6.0	5.2097 ± 2.4084^{a}
7. Water	10.2	3.5667 ± 1.9308^{b}

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรภาษาอังกฤษในสดมภ์ที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p \leq 0.05$



กราฟ 1 แสดงผลของตัวทำละลายต่อน้ำหนักของสารสกัดจากพืชทั้ง 5 ชนิด

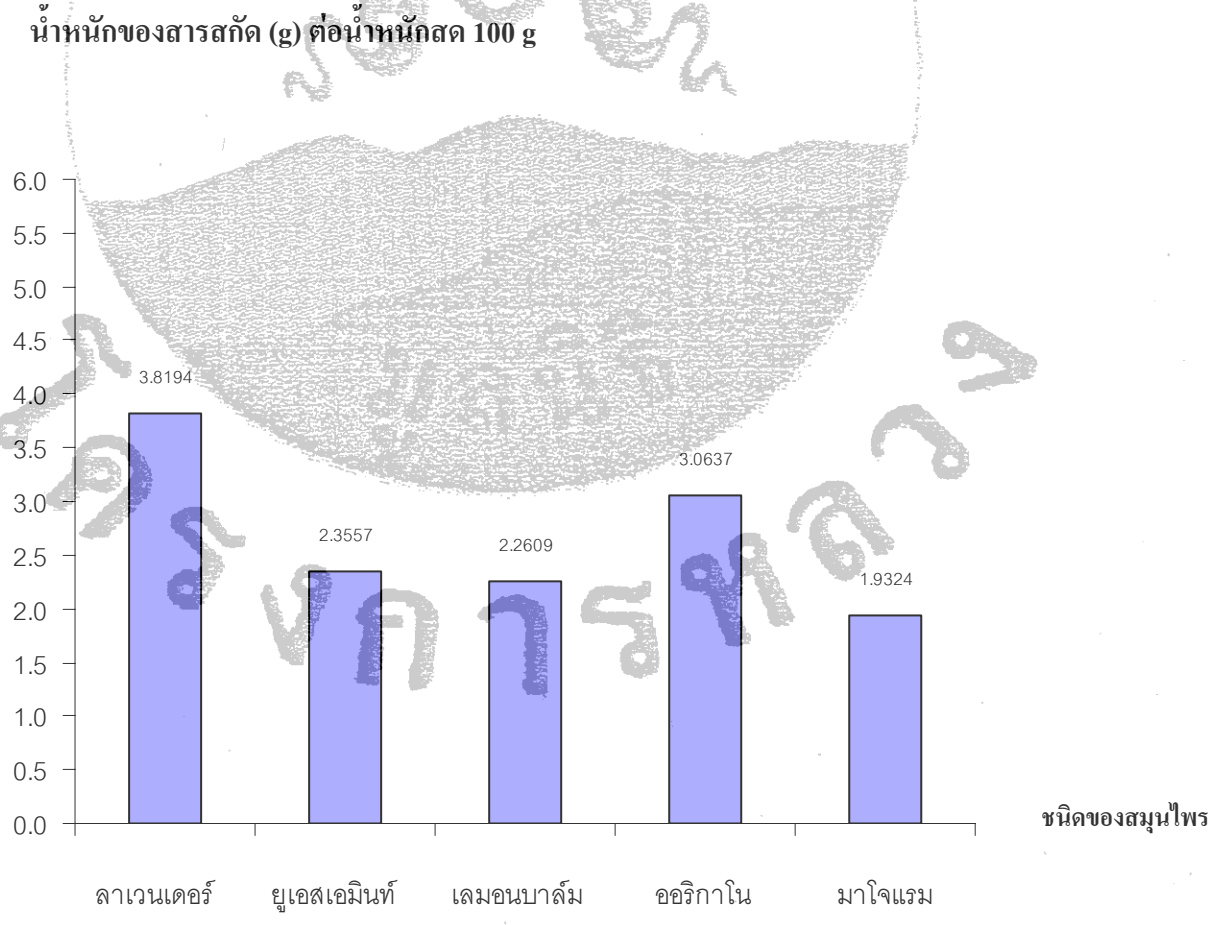
1.2 อิทธิพลของชนิดพืชสมุนไพรต่อน้ำหนักของสารสกัด

จากการศึกษาพืชสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ ลาเวนเดอร์ ยูเอสเอมินท์ เลมอนบาล์ม ออริกาโน และมาโจแรม พบน้ำหนักของสารสกัดแสดงดังตารางที่ 4 และกราฟที่ 2 แสดงให้เห็นว่าพืชต่างชนิดกันมีผลต่อน้ำหนักของสารสกัด โดยมีผลทำให้น้ำหนักของสารสกัดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยลาเวนเดอร์เป็นพืชที่สามารถสกัดได้น้ำหนักสารสกัดมากที่สุด รองลงมา คือ ออริกาโน และยูเอสเอมินท์ ส่วนเลมอนบาล์ม และมาโจแรม น้ำหนักสารสกัดได้น้อยที่สุด

ตาราง 4 แสดงผลของชนิดพืชสมุนไพรต่อน้ำหนักของสารสกัด

ชนิดของสมุนไพร	น้ำหนักของสารสกัด (g) ต่อน้ำหนักสด 100 g ± SD
1. ลาเวนเดอร์	3.8194 ± 2.2864[a]
2. ยูเอสเอมินท์	2.3557 ± 1.6683[bc]
3. เลมอนบาล์ม	2.2609 ± 1.2834[c]
4. ออริกาโน	3.0637 ± 2.4183[b]
5. มาโจแรม	1.9324 ± 0.9494[c]

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรภาษาอังกฤษในสดมภ์ที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p \leq 0.05$



กราฟ 2 แสดงผลของชนิดพืชสมุนไพรต่อน้ำหนักของสารสกัด

1.3 อิทธิพลร่วมของตัวทำละลายกับชนิดของสมุนไพรต่อน้ำหนักของสารสกัด

จากการศึกษาพบว่าลาเวนเดอร์ที่ใช้ Acetic acid ในการสกัดจะทำให้มีน้ำหนักของสารสกัดสูงที่สุด รองลงมาคือ ออริกาโนที่สกัดด้วย Acetic acid ซึ่งลาเวนเดอร์ที่สกัดด้วยน้ำกลั่น มีน้ำหนักของสารสกัดมากเป็นลำดับที่สาม ส่วนออริกาโนและมาโจแรมที่สกัดด้วย Dichloromethane นั้นมีน้ำหนักของสารสกัดต่ำที่สุด แสดงดังตารางที่ 5 และยังพบว่าอิทธิพลร่วมของตัวทำละลายกับชนิดสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด นั้นทำให้น้ำหนักของสารสกัดนั้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$)

ตาราง 5 แสดงอิทธิพลร่วมของตัวทำละลายกับชนิดของสมุนไพรต่อน้ำหนักของสารสกัด

อิทธิพลร่วม		**น้ำหนักของสารสกัด (g) ต่อน้ำหนักสด**
ชนิดของสมุนไพร	**ตัวทำละลาย**	**100 g ± SD**
1. ลาเวนเดอร์	Diethyl ether	1.6083 ± 0.1322^{fghi}
	Dichloromethane	0.9153 ± 0.5391^{hi}
	Ethanol	$3.4034 \pm 0.3906^{cdefg}$
	Methanol	4.3297 ± 0.3923^{bcde}
	Acetone	$3.3710 \pm 0.1098^{cdefg}$
	Acetic acid	7.7157 ± 0.9765^{a}
	Water	5.3920 ± 1.4716^{bc}
2. ยูเอสเอมิ้นท์	Diethyl ether	1.3416 ± 0.1080^{fghi}
	Dichloromethane	1.0500 ± 0.2071^{ghi}
	Ethanol	$2.0180 \pm 0.2114^{efghi}$
	Methanol	$2.9916 \pm 0.5529^{defghi}$
	Acetone	1.4288 ± 0.2356^{fghi}
	Acetic acid	4.5135 ± 0.6473^{bcd}
	Water	$3.1463 \pm 0.8513^{cdefgh}$

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรภาษาอังกฤษในสดมภ์ที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p \leq 0.05$

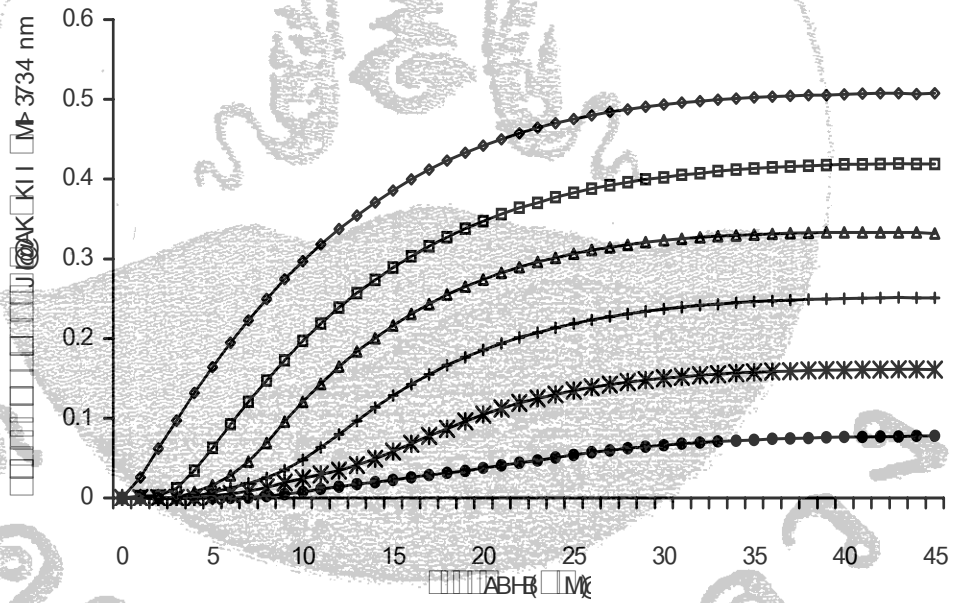
ตาราง 5 แสดงอิทธิพลร่วมของตัวทำละลายกับส่วนของกวาวเครือต่อน้ำหนักของสารสกัด (ต่อ)

อิทธิพลร่วม		น้ำหนักของสารสกัดจากกวาวเครือดำ (g) ± SD
ชนิดของสมุนไพร	ตัวทำละลาย	
3. เลมอนปาล์ม	Diethyl ether	1.0317 ± 0.4761^{ghi}
	Dichloromethane	0.7418 ± 0.1177^{hi}
	Ethanol	$2.2213 \pm 0.6409^{defghi}$
	Methanol	$2.8664 \pm 0.3743^{defghi}$
	Acetone	1.9153 ± 0.5827^{fghi}
	Acetic acid	4.3434 ± 1.1609^{bcde}
	Water	$2.7068 \pm 0.8538^{defghi}$
4. ออริกาโน	Diethyl ether	0.9995 ± 0.4631^{ghi}
	Dichloromethane	0.6243 ± 0.1277^{i}
	Ethanol	$2.7306 \pm 0.8739^{defghi}$
	Methanol	$3.7462 \pm 1.6649^{bcdef}$
	Acetone	$2.8684 \pm 0.9594^{defghi}$
	Acetic acid	5.8979 ± 3.6616^{ab}
	Water	4.5793 ± 2.1289^{bcd}
5. มาโจแรม	Diethyl ether	1.4298 ± 0.1569^{fghi}
	Dichloromethane	0.5932 ± 0.0165^{i}
	Ethanol	$2.0466 \pm 0.0091^{efghi}$
	Methanol	$2.0949 \pm 0.0458^{efghi}$
	Acetone	1.7749 ± 0.1068^{fghi}
	Acetic acid	3.5781 ± 1.2424^{cdef}
	Water	$2.0093 \pm 0.0786^{efghi}$

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรภาษาอังกฤษในสดมภ์ที่แตกต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p \leq 0.05$

2. **กราฟมาตรฐาน** (Standard Curve) **ของ** Trolox

จากการศึกษาผลการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ ABTS โดยสารละลายมาตรฐาน Trolox (Standard Solution) ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 mM ในปฏิกิริยาที่มี 500 μM ABTS ปริมาตร 900 μl 5 mM PBS buffer ปริมาตร 1,500 μl 100 μM metmyoglobin ปริมาตร 100 μl และ 108 μM H_2O_2 ปริมาตร 500 μl พบว่าค่าการดูดกลืนแสงลดลงเมื่อใส่ Trolox และจะลดลงมากยิ่งขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Trolox (กราฟที่ 3)



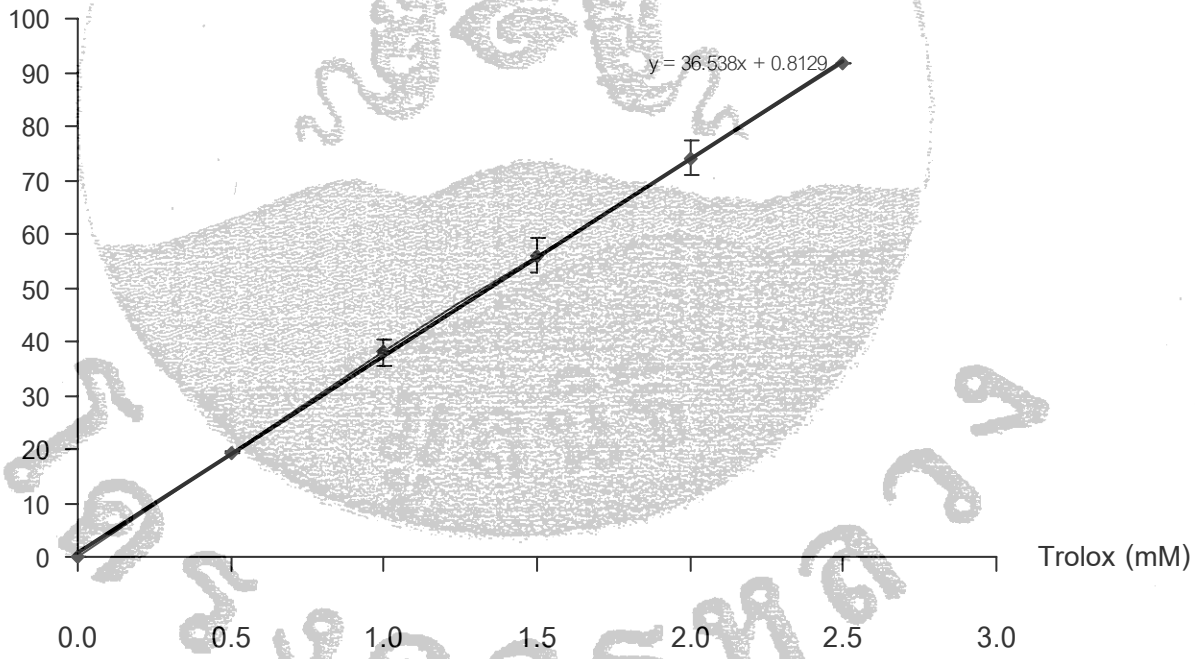
กราฟ 3 การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ของ Trolox ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในปฏิกิริยาของ 500 μM ABTS, 100 μM metmyoglobin, 5 mM PBS buffer, และ 108 μM H_2O_2; -◊- 0.0 mM, -□- 0.5 mM, -Δ- 1.0 mM, -+- 1.5 mM, -∗- 2.0 mM และ -•- 2.5 mM, (mean, n = 11)

และเมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้คำนวณหาค่าการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ (% inhibition) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของ Trolox ที่เวลา 20 นาที ดังสมการที่ 2 พบว่าค่าการยับยั้ง (% inhibition) จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ Trolox เพิ่มมากขึ้น

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(OD_{(blank)} - OD_{(Trolox)})}{OD_{(blank)}} \times 100 \quad \text{----------} \quad (2)$$

$OD_{(blank)}$ = ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อไม่มี Trolox

$OD_{(Trolox)}$ = ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อมี Trolox



กราฟ 4 การยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ ABTS (the percent inhibition) ของ Trolox ในปฏิกิริยาของ 500 μM ABTS, 100 μM metmyoglobin, 5 mM PBS buffer และ 108 μM H_2O_2 ที่เวลา 20 นาที, (mean ± SD, n=11)

3. การตรวจหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากลาเวนเดอร์ ยูเอสเอมินท์ เลมอนบาล์ม ออริกาโน และมาโจแรม

จากการตรวจหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจาก ลาเวนเดอร์ ออริกาโน ยูเอสเอมินท์ เลมอนบาล์ม และมาโจแรม ในตัวทำละลายทั้ง 7 ชนิด ที่เวลา 20 นาที (เท่ากับเวลาของกราฟมาตรฐาน) พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากพืชสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ที่ความยาวคลื่น 734 nm ลดลงเปรียบเทียบกับหลอดทดลองที่ไม่มีส่วนของสารสกัดจากพืชสมุนไพร (blank) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากพืชสมุนไพรทั้ง 5 ชนิดโดยคำนวณจากค่าการยับยั้ง(60-70% Inhibition) ของสารสกัด 1 มิลลิกรัม เปรียบเทียบกับค่าการยับยั้งของสารมาตรฐาน Trolox 1 มิลลิกรัม ซึ่งแสดงค่าเป็น TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) ดังสมการ

$$\text{TEAC of sample} = \frac{S}{Y \times T}$$

S = % Inhibition ของสารสกัดจากกวาวเครือดำ

T = น้ำหนักสารสกัดจากกวาวเครือดำ (มิลลิกรัม)

Y = % Inhibition ของ Trolox 1 มิลลิกรัม

3.1 อิทธิพลของตัวทำละลายต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากลาเวนเดอร์ ยูเอสเอมินท์ เลมอนบาล์ม ออริกาโน และมาโจแรม

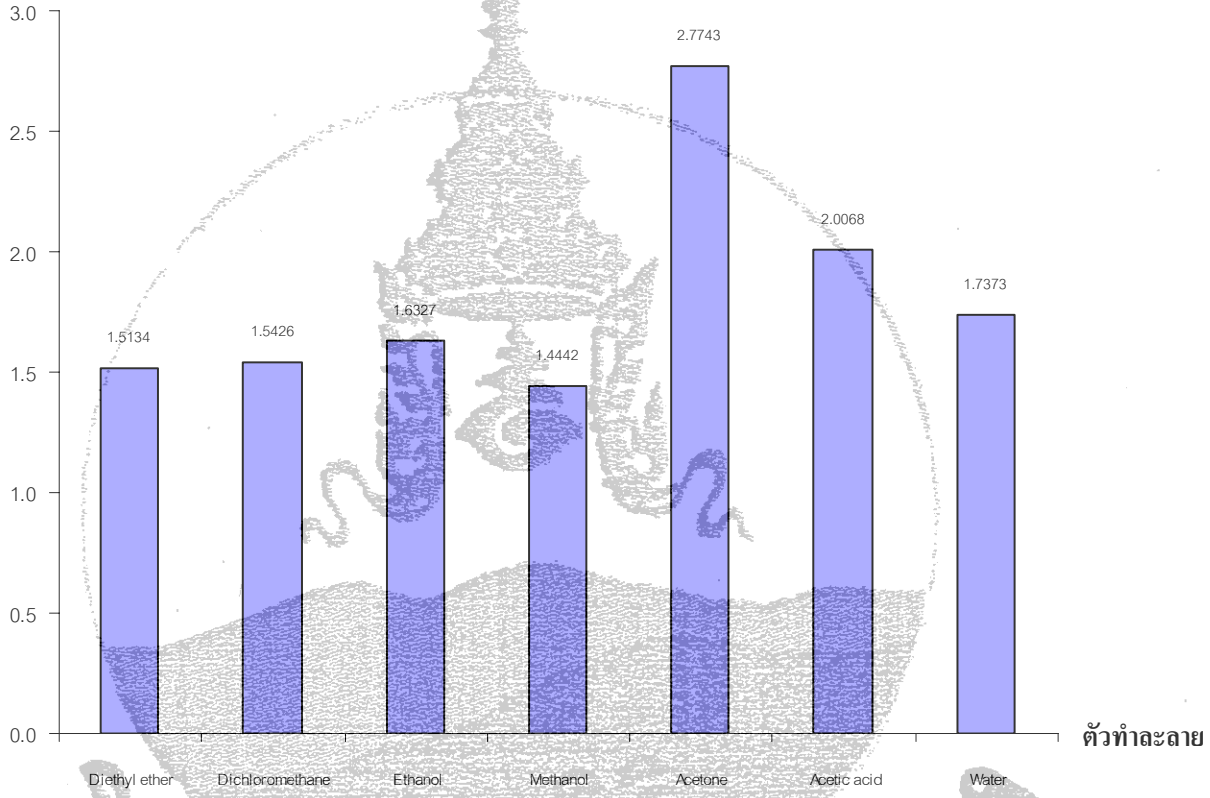
จากการศึกษาอิทธิพลของตัวทำละลายทั้ง 7 ชนิด ต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากพืชสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด พบว่า Acetone เป็นตัวทำละลายที่สามารถสกัดพืชสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้สูงที่สุด ส่วน Methanol, Diethyl ether และ Dichloromethane เป็นตัวทำละลายที่สกัดพืชสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้น้อยที่สุด แสดงดังตารางที่ 6 แต่ทั้งนี้พบว่าตัวทำละลายทั้ง 7 ชนิด นั้นไม่มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากลาเวนเดอร์ ยูเอสเอมินท์ เลมอนบาล์ม ออริกาโน และมาโจแรม โดยพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวทำละลาย 7 ชนิดนั้นไม่มีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ตาราง 6 แสดงผลของตัวทำละลายต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากลาเวนเดอร์ ยูเอสเอมินท์ เลมอนบาล์ม ออริกาโน และมาโจแรม

ตัวทำละลาย	สภาพความมีขั้ว	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากพืชสมุนไพร (TEAC) ± SD
1. Diethyl ether	2.1	1.5134 ± 1.0838^{b}
2. Dichloromethane	3.1	1.5426 ± 1.0873^{b}
3. Ethanol	4.3	1.6327 ± 1.4060^{ab}
4. Methanol	5.1	1.4442 ± 0.9290^{b}
5. Acetone	5.1	2.7743 ± 2.4731^{a}
6. Acetic acid	6.0	2.0068 ± 1.5220^{ab}
7. Water	10.2	1.7373 ± 1.8573^{ab}

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรภาษาอังกฤษในสดมภ์ที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p \leq 0.05$

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากพืชสมุนไพร 5 ชนิด (TEAC)



กราฟ 5 แสดงผลของตัวทำละลายต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากพืชสมุนไพร 5 ชนิด

3.2 อิทธิพลของชนิดของพืชสมุนไพรต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

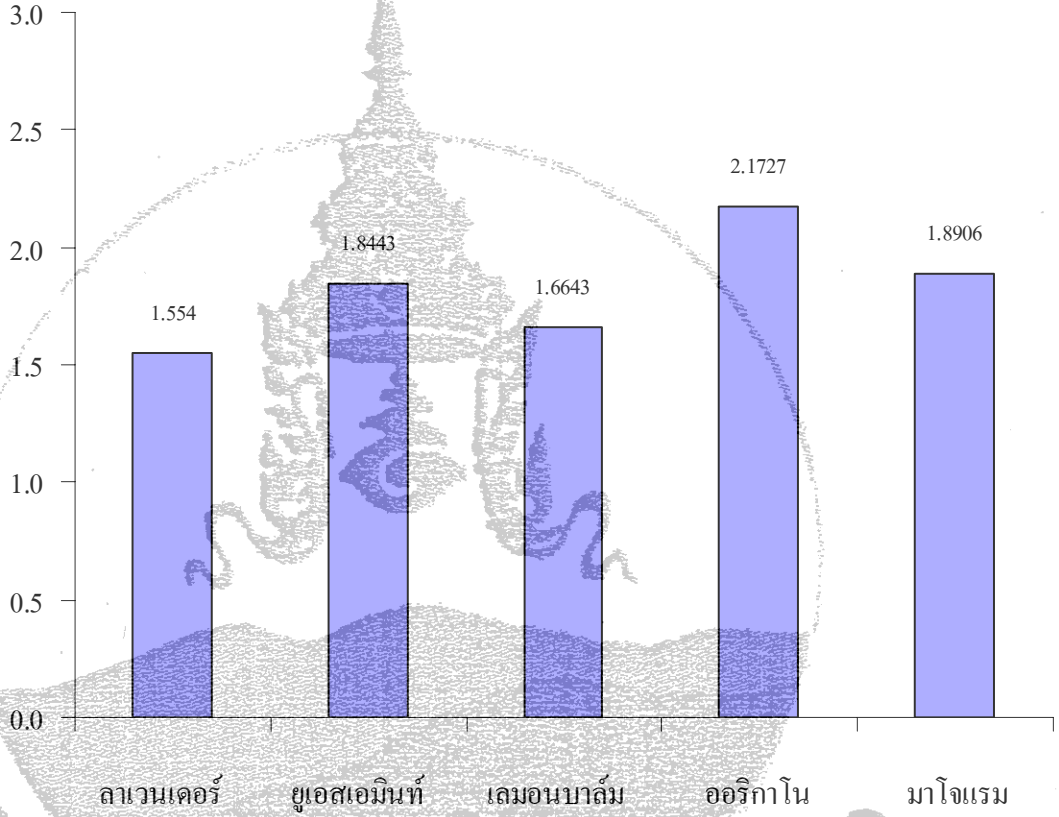
จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพืชสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ ลาเวนเดอร์ ยูเอสเอมินท์ เลมอนบาล์ม ออริกาโน และมาโจแรม พบว่าออริกาโนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด รองลงมา คือ มาโจแรม และลาเวนเดอร์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด แสดงดังตารางที่ 7 และกราฟที่ 6 โดยการศึกษาครั้งนี้พบว่าแม้พืชสมุนไพรจะต่างชนิดกันแต่ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่มีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ตาราง 7 แสดงผลของชนิดพืชสมุนไพรต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ชนิดของสมุนไพร	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัด (TEAC) ± SD
1. ลาเวนเดอร์	1.5554 ±1.6275
2. ยูเอสเอมินท์	1.8443±1.1067
3. เลมอนบาล์ม	1.6643±1.1816
4. ออริกาโน	2.1727±2.4859
5. มาโจแรม	1.8906±1.4404

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรภาษาอังกฤษในสดมภ์ที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\leq0.05$

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากพืชสมุนไพร 5 ชนิด (TEAC)



กราฟ 6 แสดงผลของชนิดพืชสมุนไพรต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.3 อิทธิพลร่วมของตัวทำละลายกับชนิดของสมุนไพรต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

จากการศึกษาพบว่าออริกาโนที่ใช้ Acetone ในการสกัดจะทำให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด รองลงมาคือ ลาเวนเดอร์ที่สกัดด้วยน้ำกลั่น แสดงดังตาราง ซึ่งจากการศึกษาพบว่าตัวทำละลายต่างชนิดกันและชนิดของสมุนไพรที่แตกต่างกันมีผลทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนั้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และยังพบว่า

- ลาเวนเดอร์ที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและออริกาโนที่สกัดด้วย Acetone มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

- ลาเวนเดอร์ที่สกัดด้วย Diethyl ether, Dichloromethane และ Ethanol ยูเอสเอมิ้นท์และเลมอนบาล์มที่สกัดด้วย Ethanol และน้ำกลั่น ออริกาโนที่สกัดด้วย Diethyl ether, Methanol, และน้ำ

กลั่น มาโจแรมที่สกัดด้วย Dichloromethane สารสกัดที่กล่าวมาข้างต้นนั้นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

- ส่วนมาโจแรมที่สกัดด้วย Ethanol นั้นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายและสมุนไพรทุกชนิดที่ได้ทำการวิจัยในครั้งนี้

- แต่จะเห็นว่า ลาเวนเดอร์ที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและออริกาโนที่สกัดด้วย Acetone นั้นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$) กับลาเวนเดอร์ที่สกัดด้วย Diethyl ether, Dichloromethane และ Ethanol ยูเอสเอมิ้นท์และเลมอนบาล์มที่สกัดด้วย Ethanol และน้ำกลั่น ออริกาโนที่สกัดด้วย Diethyl ether, Methanol, และน้ำกลั่น มาโจแรมที่สกัดด้วย Dichloromethane

ตาราง 8 แสดงอิทธิพลร่วมของตัวทำละลายกับชนิดของสมุนไพรต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

อิทธิพลร่วม		**ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัด (TEAC) ± SD**
ชนิดของสมุนไพร	**ตัวทำละลาย**	
1. ลาเวนเดอร์	Diethyl ether	0.4755 ± 0.3259^{c}
	Dichloromethane	0.7436 ± 0.0100^{c}
	Ethanol	0.9104 ± 0.8587^{c}
	Methanol	1.2636 ± 1.1225^{bc}
	Acetone	1.4832 ± 0.3946^{bc}
	Acetic acid	1.5487 ± 0.8380^{bc}
	Water	4.1919 ± 2.9338^{ab}
2. ยูเอสเอมิ้นท์	Diethyl ether	2.7774 ± 1.4937^{bc}
	Dichloromethane	2.0626 ± 0.6491^{bc}
	Ethanol	1.1713 ± 0.1792^{c}
	Methanol	1.6659 ± 0.2584^{bc}
	Acetone	2.6169 ± 1.1218^{bc}
	Acetic acid	1.4738 ± 1.2343^{bc}
	Water	1.1425 ± 1.6655^{c}

ตาราง 8 แสดงอิทธิพลร่วมของตัวทำละลายกับส่วนของกวาวเครือต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ(ต่อ)

อิทธิพลร่วม		น้ำหนักของสารสกัดจากกวาวเครือดำ (g)
ชนิดของสมุนไพร	ตัวทำละลาย	± SD
3. เลมอนปาล์ม	Diethyl ether	1.6957±0.2020[bc]
	Dichloromethane	2.6791±0.7058[bc]
	Ethanol	1.0832±0.4649[c]
	Methanol	1.3260±1.4477[bc]
	Acetone	2.3008±1.8087[bc]
	Acetic acid	1.7212±1.9459[bc]
	Water	0.8437±0.4544[c]
4. ออริกาโน	Diethyl ether	0.8804±0.5377[c]
	Dichloromethane	-
	Ethanol	1.6137±1.1229[bc]
	Methanol	1.1526±0.8838[c]
	Acetone	5.5520±4.5558[a]
	Acetic acid	2.6502±2.4019[bc]
	Water	1.1874±0.4545[c]
5. มาโจแรม	Diethyl ether	1.7380±0.9038[bc]
	Dichloromethane	0.4187±0.3391[c]
	Ethanol	3.3848±2.3306[abc]
	Methanol	1.8127±1.1673[bc]
	Acetone	1.9188±1.3515[bc]
	Acetic acid	2.6399±1.5327[bc]
	Water	1.3211±0.9337[bc]

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรภาษาอังกฤษในสดมภ์ที่แตกต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p \leq 0.05$

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์

ปัจจุบันพบว่าพืชผัก ผลไม้และสมุนไพรของประเทศไทยหลายชนิดที่มีสารต้านออกซิเดชัน เช่น ใบตำลึง ใบชะพลู ผักบุ้ง ผักโขม พบสารเบต้าแคโรทีน มะเขือเทศ แตงโม มะละกอสุก พบสารไลโคปีน ฝรั่ง ยอดมะขาม มะขามป้อม ส้ม มะนาว พบวิตามินซี ผลแก่ของสมอไทย ฟ้าทะลายโจร เมล็ดสะตอ ทับทิมทั้งส่วนของเปลือกและใบ ใบฝรั่ง หัวปลี พบสารประกอบจำพวกแทนนิน (Tannin)[7,8] และจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าพืชสมุนไพรหลายชนิดสามารถนำมาใช้ในการบำรุงและรักษาสุขภาพ และใช้รักษาอาการของโรคต่าง ๆ ทดแทนยาได้ ทำให้ประเทศไทยลดการสั่งซื้อยาจากต่างประเทศ ซึ่งมูลนิธิโครงการหลวงได้ทำการปลูกพืชสมุนไพรมากมายหลายชนิด เช่น คาโมมาย ดอกแก้วเมืองจีน ชิโซ๊ะ เชอร์วิล ไชว์ส ซอร์เรล ซัมเมอร์ซาวอรี่ โสมตังกุย ทาย์ม ทาร์รากอน เบย์ ผักชีลาว มาโจแรม โรสแมรี่ ลาเวนเดอร์ เลมอนบาล์ม โหระพาฝรั่ง เสจ ออริกาโน อิตาเลี่ยนพาร์สเลย์ มินท์ และซัมเมอร์ทาย์ม เป็นต้น พืชสมุนไพรดังกล่าวเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาฤทธิ์และสมบัติทางชีวเคมีของสารต่อต้านอนุมูลอิสระทั้งสิ้น ทั้งนี้เพื่อให้ประชาชนชาวไทยได้เห็นคุณค่าของสมุนไพรและให้ความสนใจอาหารเสริมจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ตลอดจนเป็นแนวทางในการการอนุรักษ์ การขยายพันธุ์และการศึกษาค้นคว้าทั้งทางการแพทย์ และเภสัชกรรม

จากการศึกษาพบว่าสีที่ได้จากสารสกัดของลาเวนเดอร์ ยูเอสเอมินท์ เลมอนบาล์ม ออริกาโน และมาโจแรม นั้น มีสีน้ำตาลจนถึงสีดำ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ตัวทำละลาย 7 ชนิด คือ Diethyl ether, Dichloromethane, Ethanol, Methanol, Acetone, Acetic acid และน้ำกลั่น ซึ่งจากการศึกษาพบว่า Acetic acid เป็นตัวทำละลายที่ดีเหมาะสมในการสกัดพืชสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด เพื่อให้ได้น้ำหนักสารสกัดมากที่สุด รองลงมาคือ น้ำกลั่น, Methanol, Ethanol และ Acetone ส่วน Diethyl ether และ Dichloromethane เป็นตัวทำละลายที่ไม่เหมาะสมในการสกัด

ส่วนการศึกษาถึงชนิดพืชสมุนไพรต่อน้ำหนักของสารสกัด พบว่าพืชต่างชนิดกันมีผลทำให้น้ำหนักของสารสกัดแตกต่างกัน โดยลาเวนเดอร์เป็นพืชที่สามารถสกัดได้น้ำหนักสารสกัดมากที่สุด รองลงมา คือ ออริกาโน และยูเอสเอมินท์ ส่วนเลมอนบาล์มและมาโจแรมนั้นมีน้ำหนักสารสกัดน้อยที่สุด

นอกจากนี้ยังศึกษาถึงตัวทำละลายกับชนิดของสมุนไพรต่อน้ำหนักของสารสกัด ซึ่งจากการศึกษาพบว่าตัวทำละลายกับชนิดของสมุนไพรนั้นไม่มีผลต่อน้ำหนักของสารสกัด โดยลาเวนเดอร์ที่ใช้ Acetic acid ในการสกัดจะทำให้มีน้ำหนักของสารสกัดสูงที่สุด รองลงมาคือ

ออริกาโนที่สกัดด้วย Acetic acid ซึ่งลาเวนเดอร์ที่สกัดด้วยน้ำกลั่น มีน้ำหนักของสารสกัดมากเป็นลำดับที่สาม ส่วนออริกาโนและมาโจแรมที่สกัดด้วย Dichloromethane นั้นมีน้ำหนักของสารสกัดต่ำที่สุด

การตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้เทคนิค ABTS อาศัยหลักการทำงานของปฏิกิริยา Peroxidase โดยการทำงานของ Metmyoglobin ในการย่อย Hydrogen peroxide ให้กลายเป็นโมเลกุลของน้ำและ Active oxygen ($O^{\bullet}$) ซึ่ง Active oxygen จะออกซิไดซ์ ABTS ให้เป็น ABTS radical ($ABTS^{\bullet+}$) ที่ให้สารสีเขียวปนน้ำเงิน โดยค่าการดูดกลืนแสงของ ABTS radical สูงที่สุดอยู่ที่ความยาวคลื่น 734 nm จากการตรวจหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากลาเวนเดอร์ ยูเอสเอมินท์ เลมอนบาล์ม ออริกาโน และมาโจแรม เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน Trolox (TEAC) โดยพบว่าตัวทำละลายทั้ง 7 ชนิด นั้นไม่มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากลาเวนเดอร์ ยูเอสเอมินท์ เลมอนบาล์ม ออริกาโน และมาโจแรม ซึ่ง Acetone เป็นตัวทำละลายที่สามารถสกัดพืชสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้สูงที่สุด ส่วน Methanol, Diethyl ether และ Dichloromethane เป็นตัวทำละลายที่สกัดพืชสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้น้อยที่สุด และจากการศึกษาพบว่าพืชสมุนไพรแม้จะต่างชนิดกันแต่ก็ไม่มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยพบว่าออริกาโนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด รองลงมา คือ มาโจแรม และลาเวนเดอร์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด ทั้งนี้ยังพบว่าตัวทำละลายต่างชนิดกันและชนิดของสมุนไพรที่แตกต่างกันมีผลทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน โดยออริกาโนที่ใช้ Acetone ในการสกัดจะทำให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด รองลงมาคือ ลาเวนเดอร์ที่สกัดด้วยน้ำ

แต่จะเห็นว่าลาเวนเดอร์ที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและออริกาโนที่สกัดด้วย Acetone นั้นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกับลาเวนเดอร์ที่สกัดด้วย Diethyl ether, Dichloromethane และ Ethanol ยูเอสเอมิ้นท์และเลมอนบาล์มที่สกัดด้วย Ethanol และน้ำกลั่น ออริกาโนที่สกัดด้วย Diethyl ether, Methanol, และน้ำกลั่น มาโจแรมที่สกัดด้วย Dichloromethane

จากผลการศึกษาดังกล่าวสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการสกัดแยกสารจากลาเวนเดอร์ ยูเอสเอมินท์ เลมอนบาล์ม ออริกาโน และมาโจแรม เพื่อให้ได้สารประกอบที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการนำพืชสมุนไพรดังกล่าวไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อเสริมบำรุงและรักษาสุขภาพ และควรที่จะได้มีการศึกษาถึงการออกฤทธิ์ ชนิด และองค์ประกอบของสารต้านอนุมูลอิสระลาเวนเดอร์ ยูเอสเอมินท์ เลมอนบาล์ม ออริกาโน และมาโจแรมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณศาสตราจารย์ ดร.ไมตรี สุทธจิตต์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ได้ให้คำปรึกษาแก่ผู้วิจัยและการดำเนินการวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการสาขาวิชาเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยนเรศวรวิทยาเขตสารสนเทศพะเยา ที่ได้ช่วยเหลือในห้องปฏิบัติการ และขอขอบคุณมูลนิธิโครงการหลวงที่ได้ให้การสนับสนุนงบประมาณการวิจัย ประจำปี 2547

คณะผู้ทำการวิจัย

โครงการหลวง

เอกสารอ้างอิง(1)

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. “สมุนไพรนานาชาติ ตอนที่ 2”. โครงการวิจัยปลูกและรวบรวมพันธุ์พืชสมุนไพร เภสัช-มหิดล, กรุงเทพฯ , 2544.

ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม. “บทนำสู่เทคโนโลยีเภสัชกรรม”. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก. 2541.

มูลนิธิโครงการหลวง. “พืชสมุนไพรเมืองหนาว”. งานพัฒนาและส่งเสริมสมุนไพร มูลนิธิโครงการหลวง, เชียงใหม่. 2542.

สำนักพิมพ์ซีเอ็ด. “สมุนไพรเพื่อสุขภาพ”. กรุงเทพฯ , ซีเอ็ดยูเคชั่น. 2546.

Ahmad, M. M., Al-Hakim, S. & Shehata, Y., J. Am. Oil Chem. Soc. Vol. 60 : 1983. p. 837.

Ames, B. N. “Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases” Science. Vol. 221 : 1983. p. 1256-1264.

Ames, B. N.; Shigenaga, M. K.; Hagen, T. M. “Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging” Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. ; Vol. 90 : 1993. p. 7915-7922.

Arno MB., Cano A., Hernandez-Ruiz J., et al. “Inhibition by L-ascobic acid and other antioxidants of the 2,2′- azino-bis (3 – ethylbenthiazoline – 6 - sulfonic acid) oxidation catalyzed by peroxidase : A new approach for determing total antioxidant status of food” Anal. Biochem. Vol. 236 : 1996. p. 255-261.

Babior BM. “Oxygen-dependent microbioal killing by phagocytes” N Engl J Med. Vol. 298 : 1978. p. 659-668.

Boik J. Cancer and Natural medicine. USA : Oregon Medical press, 1996. p. 148-160.

Britton, G. “Structure and properties of carotenoids in relation to function” FASEB J. Vol. 9 : 1995. p. 1551-1558.

Burton GW, Cheeseman KH, Doba T, Ingold KU, Slater TF. “Vitamin E as an antioxidant in vitro and in vivo. In: Biology of Vitamin E” Ciba Foundation Symposium 101. London : Pitman Press, 1983. p. 4-18.

Burton GW, Joyce A, Ingold KU. 'Is vitamin E the only lipid-soluble chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes?" Arch Biochem Biophys. Vol. 221 : 1983. p. 281-290.

Burton GW, Ingold KU. "Vitamin E: application of the principles of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function" Acc Chem Res. Vol. 19 : 1986. p. 194-201.

Burton GW, Wronska U, Stone L, Foster DO, Ingold KU. "Biokinetics of dietary RRR-α-tocopherol in the male guinea pig at three dietary levels of vitamin C and two levels of vitamin E. Evidence that vitamin C does not "spare" vitamin E in vivo" Lipids. Vol. 25 : 1990. p. 199-210.

Cheeseman KH, Albano E, Tomasi A, Slater TF. "Biochemical studies on the metabolic activation of haloalkanes" Environ Health Perspect. Vol. 64 : 1985. p. 85-101.

Cheeseman KH, Halliwell B, Aruoma OI. "Lipid peroxidation in biological systems" DNA and free radicals. London : Eills Horwood, 1993.

Cillard, J & Cillard, P., J. Am. Oil Chem. Soc. 63(9) : 1986. p. 1165.

Cotgreave I, Moldeus P, orrenius S. "Host biochemical defense mechanisms against prooxidants" Annu Rev Pharmacol Toxico. Vol. 28 ; 1988. p.189-212.

Cort, W.M., J. Am. Oil Chem Soc. Vol. 51 : 1974. p. 321.

Cuvelier ME, Richard H and Berset C. "Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols : structure-activity relationship" Biosci Biotech Biochem. Vol. 56 : 1992. p. 324-325.

Diaz, M. N.; Frei, B.; Vita, J. A.; Keaney, J. F. "Antioxidants and atherosclerotic heart disease" N. Engl. J. Med. Vol. 337 : 1997. p. 408-4163.

Dziezak, J. D. Food Technol. 40(9) : 1986. p. 94.

Dziedzic, S. Z. & Hudson, B. J. F., J. Am. Oil Chem. Soc. 61(6) : 1984. p. 1042.

Editorial. "Free, hormonal changes, alcohol, food constituents and degenerative diseases" European Journal of Cancer Prevention. Vol. 5 : 1996. p. 307-312.

Esterbauer H, Zollner H, Schaur RJ. "Hydroxyalkenals: cytotoxic products of lipid peroxidation" ISI Atlas Sci. Vol. 1 : 1988. p. 311-317.

Esterbauer H, Schaur RJ Zollner H. "Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes" Free Radical Biol Med. Vol. 11 : 1991. p. 81-128.

Esterbauer H, Cheeseman KH. "Lipid peroxidation: Pathological Implications" Chem Phys Lipids. Vol.45 : 1987. p. 103-370.

Esterbauer H, Zollner H, Schaur RJ. "Aldehydes formed by lipid peroxidation: mechanisms of formation, occurrence and detecmination. In : Vigo-pelfrey C, ed. Membrane Lipid Oxidation" Boca : Raton : CRC.1990. p.239-283.

Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW, Degan P, Ames BN. "Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxyl-2'-guanosine in rat organ DNA and urine" Proc Natl Acad Sci. Vol. 87 : 1990. p. 4533-4537.

Farag, R. S., Osman, S.A., Hallabo, S. A. S. & Nasar, A. A., J. Am. Oil Chem. Soc. Vol. 55 : 1987. p. 703.

Gey, K. F. "The antioxidant hypothesis of cardiovascular disease: epidemiology and mechanisms" Biochem. Soc. Trans. Vol. 18 : 1990. p. 1041-1045.

Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C.; Cross, C. E. "Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?" J. Lab. Clin. Med. 119(6) : 1992. p. 598-619.

Halliwell B, Gutteridge JMC. "Oxygen tixicity, oxygen radicals, transition metals and disease" Biochem J. 1984. p. 219: 1-14.

Halliwell B. "How to charaterise a biological antioxidant" Free radic Res Commun. Vol. 9 : 1990. p. 1-32.

Halliwell, B and Gutteridge, J. Free radicals in antioxidants in biology and medicine. 2 nd. UK : Clarendon Press, 1995. p. 236.

Harbone JB and Baxter H, editors. "Phytochemical dictionary: A handbook of bioactive compounds from plants". Bristol : Tayor and frances, Inc., 1991.

Harman, D. "Role of antioxidant nutrients in aging: overview" Age. Vol. 18: 1995. p. 51-62.

Jacob RA. and Burri BJ. "Oxidative damage and defense" Am. J. Clin. Nutr. Vol. 63 : 1996. p. 985S-990S.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. "FAO Food and Nutrition paper " Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rome. Vol. 4 : 1978. p. 179.

Kasai H, Nishimura S. "Formation of 8-hydroxyguanosine in DNA by oxygen radicals and its biological significance. In: Sies H ed. Oxidative Stress" Oxidants and Antioxidants. London : Academic press, 1991. p. 99-116.

Kilham C. "OPC: The miracle of antioxidant." New Canaan Connecticut : Kates Publishing Inc., 1997.

Klaui, H., in vitamin C, ed G.G. Birch & K. J. Parker. Applied Science Publishers. london,1974.p. 16.

Krinsky, N.I. "Mechanism of action of biological antioxidants" Proc. Soc. Exp. Biol.med. Vol. 200 : 1992. p. 248-254.

Labuza, T., CRC Crit. Rev. Food Technol. Vol. 2 : 1971. p. 355.Lang J, Esterbauer H. "Oxidised LDL and atherosclerosis In : Membrane Lipid Oxidation" Boca Raton : CRC. 1991. p. 265-282.

Leibovitz BE. "Polyphenols and bioflavonoids the medicines of tomarrow, Pts 1 and 2." Townsend letters for doctors. April-May : 1994.

Marcuse, R. Rev. Fr. Corps Gras. Vol. 7 : 1973. p. 391.

Marx G, Chevion M. "Site-specific modification of albumin by free radicals. Reaction with copper (II) and ascorbate" Biochem J. Vol. 236 : 1986. p. 397-400.

Miller, N. J.; Rice-Evans, C. "Spectrophotometric determination of antioxidant activity" Redox Rep. 2(3) : 1996. p. 161-171.

Neville A. Punchard and Franf J. Kelly. Free radicals a practical approch. New York : Oxford University Press Inc., 1996. p. 1-8.

Niki, E. "Antioxidants in relation to lipid peroxidation" Chem. Phys. Lipids. 44 : 1987. p. 227-253.

Packer JE, Slater TF, Willsion RL. 'Direct observation of a free radical interraction between vitamin E and vitamin C" Nature. Vol. 278 : 1979. p. 737-738.

Parthasarathy S, Young SG, Witzum JL, Pittman RC, Steinberg D. "Probucol inhibits oxidative modification of low density lipoprotein" J Clin Inverst. Vol. 77 : 1986. p. 641-644.

Poli G, Albano E, Dianzani Mu. "The role of lipid peroxidation in liver damage" Chem Phys lipids. Vol.45 : 1987. p.117-142.Porter NA. "Autoxidant of polyunsaturated fatty acids: initiation, propagation and product distribution (basic chemistry). In : Vigo-pelfrey C, ed. Membrane Lipid Oxidation" Boca : Raton : CRC. 1990. p. 33-62.

Reichard P, Ehrenberg A. "Ribonucleotide reductase: a radical enzyme" Science. Vol. 221 : 1983. p. 514-519.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG and et al. "The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids" Free Rad Res. Vol. 22 : 1994. p. 375-383.

Riisom, T., sims, R. J. & Fioriti, J. A., J. Am. Oil Chem. Soc. Vol. 57 : 1980. p. 354.

Romay C., Pascual C., and Lissi EA. "The reaction between ABTS radical cation and antioxidant and its use to evaluate the antioxidant status of serum samples" Braz. J. Med. Biol. Res. 29(2) : 1996. p. 175-183.

Ross D. "Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents; Mechanisms of free radical-induced tocixcity and glutathione-dependent protection" Pharmacol. Vol. 37 : 1988. p. 231-243.

Ross D, Moldeus PR. "Antioxidant defense systems and oxidative stress In: Vigo-Pelfrey C, ed. Membrane Lipid Oxidation" Boca Raton : CRC. Vol. 2 : 1991. p. 151-170.

Saran M, Michel C, Bors W. "Reactiona of NO with O_2^-. Implications for the action of endothelium-derived relaxing factor" Free radic. Res. Commun. 1989. p. 1705-1715.

Sharma OP. "Antioxidant activity of curcumin and related compounds" Biochemical Pharmacology. Vol. 25 : 1976. p. 1811-1812.

Sherwin, E.R.,J.Am. "Oil". Chem. Soc. Vol. 53 : 1976. p. 430.

Sie H and Stahl W. "Vitamins E and C, β-carotene, and other carotenoids as antioxidants" Am J Clin Nutr. Vol. 62 : 1995. p. 1315S-1321S.

Slater TF. "Necrogenic action of carbon tetrachloride in the rat: a speculative mechanism based on activation" Nature. Vol. 209 : 1966. p. 36-40.

Simpson JA, Narita S, Gieseg S, Gebicki JK, Dean RT. "Long-lived reactive species of free-radical-damage proteins" Biochem J. Vol. 282 : 1992. p. 621-624.

Smith, M. A.; Perry, G.; Richey, P. L.; Sayre, L. M.; Anderson, V. E.; Beal, M. F.; Kowal, N. "Oxidative damage in Alzheimer's" Nature. Vol. 382 : 1996. p. 120-121.

Spector A and Hailsel H. "A spects of the biochemistry of cataract" The ocular Lens. New York : Marcel Dekker, 1985. p. 405-438.

Sreejayan and Rao MNA. "Curcuminoids as potent inhibitors of lipid peroxidation" J. Pharmacol. Vol. 46 : 1994. p. 1013-1016.

Stadtman ER, Oliver CN. "Metal-catalyzed oxidation of proteins" Physiological consequences. J. Bio. Chem. Vol. 266 : 1991. p. 2005-2008.

Stadtman ER. "Metal-ion catalyzed oxidation of proteins. Biochemical mechanism and Physiological consequences" Free radic. Bio. Med. Vol. 9 : 1990. p. 315-325.

Stocker R, Bowry VW, Frei B. "Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than dose α-tocopherol" Proc Natl Acad Sci. Vol. 88 : 1991. p. 1646-1650.

Stocker R, Frei B,. "Endogenous antioxidant defences in human blood plasma. In: Sies H ed" Oxidants and Antioxidants. London : Academic Press, 1991. p. 213-242.

Stubbe J. "Ribonucleotide reductase: amazing and confusing" J Biol Chem. Vol. 265 : 1990. p. 5329-5332.

Taylor, T. J. & Richardson, T. Adv.Appl. Microbiol. Vol. 25 : 1979. p. 7.

Tsuchihashi, H., Kgoshi, M., Iwatsuku, M. and Niki, E. "Action of β-carotenoid as an antioxidant against lipid peroxidation" Arch. Biochem. Biophys. Vol. 323 : 1995. p. 137-147.

Wendel A. "Glutathione peroxidase. In: Jakoby WB, Bend JR, Caldwell J ed" Enzymatic Basis of Detoxication. New York : Academic Press, 1980. p. 333-348.

Willet, W. C. "Diet and health-what should we eat?" Science. Vol. 264 : 1994. p. 532-537.

เอกสารอ้างอิง(2)

1. Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C.; Cross, C. E. "Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?" J. Lab. Clin. Med. 119(6) : 1992. p. 598-619.
2. Ames, B. N.; Shigenaga, M. K.; Hagen, T. M. "Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging" Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. : Vol. 90 : 1993. p. 7915-7922.
3. Willet, W. C. "Diet and health-what should we eat?" Science. Vol. 264 : 1994. p. 532-537.
4. Harman, D. "Role of antioxidant nutrients in aging: overview" Age. Vol. 18: 1995. p. 51-62.
5. Ames, B. N. "Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases" Science. Vol. 221 : 1983. p. 1256-1264.
6. Gey, K. F. "The antioxidant hypothesis of cardiovascular disease: epidemiology and mechanisms" Biochem. Soc. Trans. Vol. 18 : 1990. p. 1041-1045.
7. Smith, M. A.; Perry, G.; Richey, P. L.; Sayre, L. M.; Anderson, V. E.; Beal, M. F.; Kowal, N. "Oxidative damage in Alzheimer's" Nature. Vol. 382 : 1996. p. 120-121.
8. Diaz, M. N.; Frei, B.; Vita, J. A.; Keaney, J. F. "Antioxidants and atherosclerotic heart disease" N. Engl. J. Med. Vol. 337 : 1997. p. 408-4163.
9. Saran M, Michel C, Bors W. "Reactiona of NO with O_2^-. Implications for the action of endothelium-derived relaxing factor" Free radic. Res. Commun. 1989. p. 1705-1715
10. Stubbe J. "Ribonucleotide reductase: amazing and confusing" J Biol Chem. Vol. 265 : 1990. p. 5329-5332.
11. Reichard P, Ehrenberg A. "Ribonucleotide reductase: a radical enzyme" Science. Vol. 221 : 1983. p. 514-519.
12. Babior BM. "Oxygen-dependent microbioal killing by phagocytes" N Engl J Med. Vol. 298 : 1978. p. 659-668.
13. Slater TF. "Necrogenic action of carbon tetrachloride in the rat: a speculative mechanism based on activation" Nature. Vol. 209 : 1966. p. 36-40.

14. Cheeseman KH, Albano E, Tomasi A, Slater TF. "Biochemical studies on the metabolic activation of haloalkanes" Environ Health Perspect. Vol. 64 : 1985. p. 85-101.

15. Ross D. "Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents; Mechanisms of free radical-induced tocixcity and glutathione-dependent protection" Pharmacol. Vol. 37 : 1988. p. 231-243.

16. Ross D, Moldeus PR. "Antioxidant defense systems and oxidative stress In: Vigo-Pelfrey C, ed. Membrane Lipid Oxidation" Boca Raton : CRC. Vol. 2 : 1991. p. 151-170.

17. Cheeseman KH, Halliwell B, Aruoma OI. "Lipid peroxidation in biological systems" DNA and free radicals. London : Eills Horwood, 1993.

18. Porter NA. "Autoxidant of polyunsaturated fatty acids: initiation, propagation and product distribution (basic chemistry). In : Vigo-pelfrey C, ed. Membrane Lipid Oxidation" Boca : Raton : CRC. 1990. p. 33-62.

19. Esterbauer H, Zollner H, Schaur RJ. "Aldehydes formed by lipid peroxidation: mechanisms of formation, occurrence and detecmination. In : Vigo-pelfrey C, ed. Membrane Lipid Oxidation" Boca : Raton : CRC.1990. p.239-283.

20. Esterbauer H, Zollner H, Schaur RJ. "Hydroxyalkenals: cytotoxic products of lipid peroxidation" ISI Atlas Sci. Vol. 1 : 1988. p. 311-317.

21. Esterbauer H, Schaur RJ Zollner H. "Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes" Free Radical Biol Med. Vol. 11 : 1991. p. 81-128.

22. Esterbauer H, Cheeseman KH. "Lipid peroxidation: Pathological Implications" Chem Phys Lipids. Vol.45 : 1987. p. 103-370.

23. Poli G, Albano E, Dianzani Mu. "The role of lipid peroxidation in liver damage" Chem Phys lipids. Vol.45 : 1987. p.117-142.

24. Lang J, Esterbauer H. "Oxidised LDL and atherosclerosis In : Membrane Lipid Oxidation" Boca Raton : CRC. 1991. p. 265-282.

25. Marx G, Chevion M. "Site-specific modification of albumin by free radicals. Reaction with copper (II) and ascorbate" Biochem J. Vol. 236 : 1986. p. 397-400.

26. Stadtman ER, Oliver CN. "Metal-catalyzed oxidation of proteins" Physiological consequences. J. Bio. Chem. Vol. 266 : 1991. p. 2005-2008.

27. Simpson JA, Narita S, Gieseg S, Gebicki JK, Dean RT. "Long-lived reactive species of free-radical-damage proteins" Biochem J. Vol. 282 : 1992. p. 621-624.

28. Stadtman ER. "Metal-ion catalyzed oxidation of proteins. Biochemical mechanism and Physiological consequences" Free radic. Bio. Med. Vol. 9 : 1990. p. 315-325.

29. Spector A and Hailsel H. "A spects of the biochemistry of cataract" The ocular Lens. New York : Marcel Dekker, 1985. p. 405-438.

30. Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW, Degan P, Ames BN. "Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxyl-2'-guanosine in rat organ DNA and urine" Proc Natl Acad Sci. Vol. 87 : 1990. p. 4533-4537.

31. Kasai H, Nishimura S. "Formation of 8-hydroxyguanosine in DNA by oxygen radicals and its biological significance. In: Sies H ed. Oxidative Stress" Oxidants and Antioxidants. London : Academic press, 1991. p. 99-116.

32. Cotgreave I, Moldeus P, orrenius S. "Host biochemical defense mechanisms against prooxidants" Annu Rev Pharmacol Toxico. Vol. 28 ; 1988. p.189-212.

33. Halliwell B, Gutteridge JMC. "Oxygen tixicity, oxygen radicals, transition metals and disease" Biochem J. 1984. p. 219: 1-14.

34. Wendel A. "Glutathione peroxidase. In: Jakoby WB, Bend JR, Caldwell J ed" Enzymatic Basis of Detoxication. New York : Academic Press, 1980. p. 333-348.

35. Burton GW, Cheeseman KH, Doba T, Ingold KU, Slater TF. "Vitamin E as an antioxidant in vitro and in vivo. In: Biology of Vitamin E" Ciba Foundation Symposium 101. London : Pitman Press, 1983. p. 4-18.

36. Burton GW, Joyce A, Ingold KU. 'Is vitamin E the only lipid-soluble chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes?" Arch Biochem Biophys. Vol. 221 : 1983. p. 281-290.

37. Burton GW, Ingold KU. "Vitamin E: application of the principles of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function" Acc Chem Res. Vol. 19 : 1986. p. 194-201.

38. Stocker R, Bowry VW, Frei B. "Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than dose α-tocopherol" Proc Natl Acad Sci. Vol. 88 : 1991. p. 1646-1650.

39. Stocker R, Frei B,. "Endogenous antioxidant defences in human blood plasma. In: Sies H ed" Oxidants and Antioxidants. London : Academic Press, 1991. p. 213-242.

40. Packer JE, Slater TF, Willsion RL. 'Direct observation of a free radical interraction between vitamin E and vitamin C" Nature. Vol. 278 : 1979. p. 737-738.

41. Burton GW, Wronska U, Stone L, Foster DO, Ingold KU. "Biokinetics of dietary RRR-α-tocopherol in the male guinea pig at three dietary levels of vitamin C and two levels of vitamin E. Evidence that vitamin C does not "spare" vitamin E in vivo" Lipids. Vol. 25 : 1990. p. 199-210.

42. Halliwell B. "How to charaterise a biological antioxidant" Free radic Res Commun. Vol. 9 : 1990. p. 1-32.

43. Parthasarathy S, Young SG, Witzum JL, Pittman RC, Steinberg D. "Probucol inhibits oxidative modification of low density lipoprotein" J Clin Inverst. Vol. 77 : 1986. p. 641-644.

44. Neville A. Punchard and Franf J. Kelly. Free radicals a practical approch. New York : Oxford University Press Inc., 1996. p. 1-8.

45. Britton, G. "Structure and properties of carotenoids in relation to function" FASEB J. Vol. 9 : 1995. p. 1551-1558.

46. Tsuchihashi, H., Kgoshi, M., Iwatsuku, M. and Niki, E. "Action of β-carotenoid as an antioxidant against lipid peroxidation" Arch. Biochem. Biophys. Vol. 323 : 1995. p. 137-147.

47. Halliwell, B and Gutteridge, J. Free radicals in antioxidants in biology and medicine. 2 nd. UK : Clarendon Press, 1995. p. 236.

48. Krinsky, N.I. "Mechanism of action of biological antioxidants" Proc. Soc. Exp. Biol.med. Vol. 200 : 1992. p. 248-254.

49. Niki, E. "Antioxidants in relation to lipid peroxidation" Chem. Phys. Lipids. 44 : 1987. p. 227-253.

50. Sherwin, E.R.,J.Am. "Oil". Chem. Soc. Vol. 53 : 1976. p. 430.

51. Labuza, T., CRC Crit. Rev. Food Technol. Vol. 2 : 1971. p. 355.

52. Cort, W.M., J. Am. Oil Chem Soc. Vol. 51 : 1974. p. 321.

53. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. "FAO Food and Nutrition paper " Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rome. Vol. 4 : 1978. p. 179.

54. Klaui, H., in vitamin C, ed G. G. Birch & K. J. Parker. Applied Science Publishers. london, 1974. p. 16.

55. Taylor, T. J. & Richardson, T. Adv.Appl. Microbiol. Vol. 25 : 1979. p. 7.

56. Dziezak, J. D. Food Technol. 40(9) : 1986. p. 94.

57. Cillard, J & Cillard, P., J. Am. Oil Chem. Soc. 63(9) : 1986. p. 1165.

58. Ahmad, M. M., Al-Hakim, S. & Shehata, Y., J. Am. Oil Chem. Soc. Vol. 60 : 1983. p. 837.

59. Marcuse, R. Rev. Fr. Corps Gras. Vol. 7 : 1973. p. 391.

60. Riisom, T., sims, R. J. & Fioriti, J. A., J. Am. Oil Chem. Soc. Vol. 57 : 1980. p. 354.

61. Farag, R. S., Osman, S.A., Hallabo, S. A. S. & Nasar, A. A., J. Am. Oil Chem. Soc. Vol. 55 : 1987. p. 703.

62. Dziedzic, S. Z. & Hudson, B. J. F., J. Am. Oil Chem. Soc. 61(6) : 1984. p. 1042.

63. Editorial. "Free, hormonal changes, alcohol, food constituents and degenerative diseases" European Journal of Cancer Prevention. Vol. 5 : 1996. p. 307-312.

64. Jacob RA. and Burri BJ. "Oxidative damage and defense" Am. J. Clin. Nutr. Vol. 63 : 1996. p. 985S-990S.

65. Sie H and Stahl W. "Vitamins E and C, β-carotene, and other carotenoids as antioxidants" Am J Clin Nutr. Vol. 62 : 1995. p. 1315S-1321S.

66. Boik J. Cancer and Natural medicine. USA : Oregon Medical press, 1996. p. 148-160.

67. Harbone JB and Baxter H, editors. Phytochemical dictionary: A handbook of bioactive compounds from plants. Bristol : Tayor and frances, Inc., 1991.

68. Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG and et al. "The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids" Free Rad Res. Vol. 22 : 1994. p. 375-383.

69. Leibovitz BE. "Polyphenols and bioflavonoids the medicines of tomarrow, Pts 1 and 2." Townsend letters for doctors. April-May : 1994.

70. Sreejayan and Rao MNA. "Curcuminoids as potent inhibitors of lipid peroxidation"J.Pharmacol. Vol. 46 : 1994. p. 1013-1016.

71. Sharma OP. "Antioxidant activity of curcumin and related compounds" Biochemical Pharmacology. Vol. 25 : 1976. p. 1811-1812.

72. Cuvelier ME, Richard H and Berset C. "Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols : structure-activity relationship" Biosci Biotech Biochem. Vol. 56 : 1992. .p. 324-325.

73. Kilham C. "OPC: The miracle of antioxidant." New Canaan Connecticut : Kates Publishing Inc., 1997.

74. มูลนิธิโครงการหลวง. "พืชสมุนไพรเมืองหนาว". งานพัฒนาและส่งเสริมสมุนไพร มูลนิธิโครงการหลวง, เชียงใหม่. 2542.

75. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. "สมุนไพรนานาชาติ ตอนที่ 2". โครงการวิจัยปลูกและรวบรวมพันธุ์พืชสมุนไพร เภสัช-มหิดล, กรุงเทพฯ , 2544.

76. สำนักพิมพ์ซีเอ็ด. “สมุนไพรเพื่อสุขภาพ”. กรุงเทพฯ , ซีเอ็ดยูเคชั่น. 2546.

79. ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม. “บทนำสู่เทคโนโลยีเภสัชกรรม”. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก. 2541.

80. Miller, N. J.; Rice-Evans, C. “Spectrophotometric determination of antioxidant activity” Redox Rep. 2(3) : 1996. p. 161-171.

81. Arno MB., Cano A., Hernandez-Ruiz J., et al. “Inhibition by L-ascobic acid and other antioxidants of the 2,2′- azino-bis (3 – ethylbenthiazoline – 6 - sulfonic acid) oxidation catalyzed by peroxidase : A new approach for determing total antioxidant status of food” Anal. Biochem. Vol. 236 : 1996. p. 255-261.

82. Romay C., Pascual C., and Lissi EA. “The reaction between ABTS radical cation and antioxidant and its use to evaluate the antioxidant status of serum samples” Braz. J. Med. Biol. Res. 29(2) : 1996. p. 175-183.

รายงานการใช้งบประมาณ

1. งบประมาณประจำปี พ.ศ. 2547 ที่ได้รับการสนับสนุนจากมูลนิธิโครงการหลวง **เป็นเงินทั้งสิ้น 150,000 บาท**
2. การใช้งบประมาณ แบ่งออกได้ดังนี้

2.1 หมวดค่าใช้สอย วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี	เป็นเงิน	145,000	บาท
2.2 หมวดค่าสาธารณูปโภค	เป็นเงิน	5,000	บาท
	รวมใช้งบประมาณทั้งสิ้น	**150,000**	**บาท**
3. ยอดเงินคงเหลือ	เป็นเงิน	0.00	บาท

โครงการหลวง