



สารต้านอนุมูลอิสระจากเซรัมน้ำยางพารา

Antioxidant from *Hevea brasiliensis* Latex Serum

วนิชฐี สร้อยสุวรรณ

Wanidtee Soysuwan

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Biochemistry

Prince of Songkla University

2552

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ สารต้านอนุมูลอิสระจากเซรัมน้ำยางพารา
ผู้เขียน นางสาวนิษฐิ์ สร้อยสุวรรณ
สาขาวิชา ชีวเคมี

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.รพีพรรณ วิทิตสุวรรณกุล) (รองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุทาร์พันธุ์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.รพีพรรณ วิทิตสุวรรณกุล)

.....กรรมการ
(ดร.รพีพร โสคติพันธุ์)

.....กรรมการ
(ดร.ปิยาภรณ์ ภายิตกุล)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับเป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	สารต้านอนุมูลอิสระจากเซรั่มน้ำยางพารา
ผู้เขียน	นางสาววนิชฐิ์ สร้อยสุวรรณ
สาขาวิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2552

บทคัดย่อ

การศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระในน้ำยางพารา (*Hevea brasiliensis*) ทำโดยใช้ส่วนของเซรั่ม (F-serum) ซึ่งเป็นสารละลายสีเหลืองใส ที่สกัดได้จากก้อนยางหลังการใช้กรดเหนี่ยวนำให้ยางจับตัวเป็นก้อน โดยนำ F-serum ส่วนหนึ่งไปทำให้เป็นผงแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย (spray dryer) โดยตรง และอีกส่วนหนึ่งไปกรองแบบอัลตราผ่านเมมเบรนที่มี molecular weight cut-off (MWCO) ขนาด 10 kD และ 1 kD ตามลำดับ ก่อนทำการรวบรวมส่วน 1 kD-Retentate และ 1 kD-Permeate ที่ได้จากการกรองไปทำให้เป็นผงแห้ง นำผงแห้งที่ได้ไปละลายน้ำ DI แล้วทำการวิเคราะห์หาค่าความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ในรูปของ IC_{50} ซึ่งพบว่า F-serum มีสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด และให้ค่า IC_{50} ต่ำสุด คือเท่ากับ 2.70 mg/ml รองลงมาคือ 1 kD-Permeate (6.90 mg/ml) และ 1 kD-Retentate (7.10 mg/ml) ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบผล IC_{50} จึงทำการเลือกส่วนของสารละลายของ F-serum และ 1 kD-Permeate ไปใช้ในการแยกสารต้านอนุมูลอิสระที่ประกอบด้วยหมู่ไซโธล (thiols) โดยเฉพาะสารเออร์โกไทโอนิน (ergothioneine, ERT) ต่อโดยอาศัยวิธี gel filtration ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-15 และ Biogel P-2 ตามลำดับ หลังจากนั้นทำการรวบรวมกลุ่ม fraction ที่ให้ค่า IC_{50} ต่ำ ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค TLC และ HPLC ตามลำดับ เพื่อให้ได้สารต้านอนุมูลอิสระไซโธลที่บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น ซึ่งจะเห็นว่า IC_{50} ของสารต้านอนุมูลอิสระไซโธล หลังการทำบริสุทธิ์จาก F-serum (1.6 mg/ml) และ 1 kD-Permeate (1.4 mg/ml) มีค่าลดลงพอประมาณ เมื่อเทียบกับค่า IC_{50} ก่อนการทำบริสุทธิ์ จากผลการวิเคราะห์สาร ERT ที่มีอยู่ใน F-serum และ 1 kD-Permeate พบว่ามีประมาณ 1.5 μ g และ 1.18 μ g ต่อกรัมผงแห้งตามลำดับ

นอกเหนือจากสารต้านอนุมูลอิสระไซโธล และ ERT ผลการวิเคราะห์ TLC ด้วย ninhydrin และสารละลาย DPPH ยังชี้ให้เห็นว่าใน 1 kD-Permeate ยังมีกรดอะมิโนหลายชนิดที่สามารถดักจับอนุมูลอิสระ DPPH เช่น histidine, cystein, glutamic acid และ glutamine รวมทั้งยัง

พบกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติดังกล่าวหลายชนิด เช่น histidine, glutamine และ tyrosine ในส่วนใสที่ได้จากการตกตะกอน 1 kD-Retentate ด้วยอะซิโตนช่วงความเข้มข้น 80-95% นอกจากนั้นเมื่อนำผง 1 kD-Permeate ไปวิเคราะห์กรดอะมิโนในเชิงปริมาณและคุณภาพ ด้วยวิธี Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) พบว่าประกอบไปด้วยกรดอะมิโนถึง 19 ชนิด รวมทั้งชนิดที่มี side chain ประกอบด้วยหมู่ aliphatic (เช่น alanine 8.04 mg/g); alkaline amino (เช่น arginine 1.94 mg/g); hydroxyl (เช่น tyrosine 0.43 mg/g) และ thiol (เช่น cysteine 1.24 mg/g) ซึ่งก็พบว่ามีศักยภาพในการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH[•] ได้ดี

Thesis Title Antioxidants from *Hevea brasiliensis* Latex Serum
Author Miss Wanidtee Soysuwan
Major Program Biochemistry
Academic Year 2009

ABSTRACT

The study of *Hevea* latex antioxidants was performed on yellowish-serum (F-serum) obtained by squeezing rubber coagulum derived from acidified fresh latex. The F-serum was subjected to spray drying either directly or after prior fractionation by ultrafiltration. The F-serum was sequentially filtered through membranes with 10 kD and 1 kD molecular weight cut-off, respectively. The resulting 1 kD-Retentate and 1 kD-Permeate fractions were separately collected and spray dried. The dry powders were dissolved in distilled water and analyzed for antioxidant activity by evaluating the DPPH radical scavenging activity. The F-serum was shown to possess highest antioxidant activity with lowest IC₅₀ value of 2.70 mg/ml. This is followed by 1 kD-Permeate (IC₅₀ : 6.90 mg/ml) and 1 kD-Retentate (IC₅₀ : 7.10 mg/ml) fractions, respectively. The F-serum and 1 kD-Permeate solutions were chosen for further purification of thiol-containing antioxidants including ergothioneine (ERT) by gel filtration through Sephadex G-15 and Biogel P-2 columns, respectively. The fractions with low IC₅₀ were pooled and further purified by using TLC and HPLC, respectively. The IC₅₀ values of the partially purified thiol-containing antioxidant compounds from F-serum (1.6 mg/ml) and 1 kD-Permeate fraction (1.4 mg/ml) were significantly lower than those found in the original crude fractions. The ERT contents were estimated to be 1.5 µg and 1.18 µg per gram of F-serum and 1 kD-Permeate dry powders, respectively.

The presence of amino acids with antioxidant activities, besides those thiol-containing compounds and ERT, were also revealed from the TLC color staining reactions using ninhydrin and DPPH solutions. Several putative amino acids (giving positive ninhydrin reactions) of the 1 kD-Permeate fraction, including histidine, cysteine, glutamic acid and glutamine, were shown to possess antioxidant activities (giving positive reactions with DPPH solutions). Similarly, amino acids with antioxidant activities, including histidine, glutamine and tyrosine,

were also revealed in the 1 kD-Retentate supernatant fraction obtained after 80-95% acetone fractionation. Moreover, by using a liquid chromatography and tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) approach for simultaneous qualitative and quantitative analysis of the 1 kD-Permeate, 19 amino acids were identified. This include those with side chains consisting of aliphatic (i.e., alanine: 8.04mg/g), alkaline amino (i.e., arginine: 1.94 mg/g), hydroxyl (i.e., tyrosine : 0.43 mg/g) and thiol groups (i.e., cysteine :1.24 mg/g).

สารบัญ

สารบัญ	หน้า
รายการตาราง	
รายการภาพประกอบ	
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	
บทที่	
1. บทนำ	
บทนำตั้งเรื่อง	1
บทตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	27
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	
วัสดุและอุปกรณ์	28
วิธีการทดลอง	31
3. ผลการทดลอง	41
4. วิเคราะห์ผลการทดลอง	66
5. สรุป	73
เอกสารอ้างอิง	74
ประวัติผู้เขียน	82

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตัวอย่างอนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง	4
2	สถานะของอาการหรือโรคที่เกิดขึ้นเนื่องมาจาก ROS และ RNS	12
3	ปริมาณ ERT ที่พบในเนื้อเยื่อต่าง ๆ จากสัตว์ 4 ชนิด	22
4	ความเข้มข้นของ ERT ที่พบในเลือดสัตว์ชนิดต่าง ๆ	23
5	การจำแนกปริมาณกรดอะมิโนอิสระกลุ่มที่เป็นกรด กลาง ค่าง ในเซรัมของ น้ำยางที่ได้จากส่วนไซโตพลาสซึมและลูทอยด์	24
6	ชนิดของสารอินทรีย์ที่พบในเซรัมของน้ำยาง	25
7	ค่า IC_{50} ของสารตัวอย่างแต่ละชนิด	42
8	ปริมาณไซออลในสารตัวอย่างแต่ละชนิด	48
9	ค่า IC_{50} ของผง F-serum จากขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Biogel P-2	52
10	แสดงชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่พบในผง 1 kD-Permeate	65

รายการภาพประกอบ

รูปที่		หน้า
1	วงจรการเกิดอนุมูลไฮดรอกซิลที่นำไปสู่ความผิดปกติของระบบการทำงานของไมโทคอนเดรีย	7
2	กลไกการเกิดอนุมูลอิสระจากการกระตุ้นระบบประสาทด้วยกรดอะมิโน	9
3	กลไกการเกิด oxidative stress จากการสลายสารโคพามีน	10
4	กลไกการเกิดความเสียหายและการบาดเจ็บของเซลล์จากอนุมูลอิสระ	11
5	สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในร่างกาย	16
6	การทำงานของวิตามินอีในการยับยั้งลูกโซ่ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน	18
7	ตัวอย่างโครงสร้างทางเคมีของสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์	19
8	โครงสร้างของ ERT	21
9	กลไกการสังเคราะห์ ERT จากจุลชีพ	22
10	ขั้นตอนการเตรียมสารตัวอย่างจากน้ำยางพารา	31
11	โครงสร้างของ DPPH [•] และ DPPH	33
12	แผนภูมิวิธีการเตรียมและศึกษาสารตัวอย่างแห้งที่เตรียมได้จากน้ำยางพารา	39
13	แผนภูมิแสดงการเตรียมสารตัวอย่างเซรัมชนิดต่างๆ	41
14	ความสามารถดักจับอนุมูล DPPH [•] ของสารมาตรฐาน ERT, BHT และ ของเซรัมแบบผงแห้งแต่ละชนิด	43
15	ความสามารถดักจับอนุมูล DPPH [•] ของ F-serum ตกอะซิโตนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	44
16	ความสามารถดักจับอนุมูล DPPH [•] ของ 1 kD-Retentate ตกอะซิโตนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	45
17	แผนภูมิแท่งเปรียบเทียบค่า IC ₅₀ ของสารตัวอย่างผงแห้งแต่ละชนิด	46
18	กราฟมาตรฐานของ ERT ที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณสารไฮดรอลินสารสกัด	47
19	แถบโปรตีน SDS-PAGE ที่ได้จากการตกตะกอนอะซิโตนของผง F-serum	49
20	แถบโปรตีน SDS-PAGE ที่ได้จากการตกตะกอนอะซิโตนของผง 1 kD-Retentate	49
21	กราฟแสดงการแยกกลุ่มสารไฮดรอลของผง F-serum ที่ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-15	50
22	กราฟแสดงการแยกกลุ่มสารไฮดรอลของผง F-serum ที่ผ่านคอลัมน์ Biogel P-2	50

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
23	กราฟการวิเคราะห์หาค่า IC_{50} ของผง F-serum ที่ได้จากขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Biogel P-2	51
24	การวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC ของผง F-serum ที่ผ่านคอลัมน์ Biogel P-2 เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ERT	52
25	การวิเคราะห์ความสามารถดักจับอนุมูลอิสระด้วยวิธี TLC ของผง F-serum ที่ผ่านคอลัมน์ Biogel P-2 เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ERT	53
26	กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย ERT และพื้นที่ใต้พีค (ครั้งที่ 1)	54
27	โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน ERT จากการวิเคราะห์โดย HPLC (ครั้งที่ 1)	54
28	โครมาโทแกรมของสารไซออล หรือ ERT จากการทำบริสุทธิ์ผง F-serum วิเคราะห์โดย HPLC	55
29	โครมาโทแกรมของสารไซออล หรือ ERT หลังจากผสมสารมาตรฐาน ERT ในสารละลายที่ทำบริสุทธิ์จากผง F-serum วิเคราะห์โดย HPLC	55
30	กราฟการแยกกลุ่มสารไซออลของผง 1 kD-Permeate จากคอลัมน์ Sephadex G-15	56
31	กราฟความสามารถดักจับอนุมูล DPPH ของผง 1 kD-Permeate จากคอลัมน์ Sephadex G-15	57
32	กราฟการแยกกลุ่มสารไซออลของผง 1 kD-Permeate จากคอลัมน์ Biogel P-2	57
33	กราฟความสามารถดักจับอนุมูล DPPH ของผง 1 kD-Permeate จากคอลัมน์ Biogel P-2	58
34	การวิเคราะห์ด้วย TLC ของผง 1 kD-Permeate ที่แยกผ่านคอลัมน์ Biogel P-2 เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ERT	59
35	การวิเคราะห์ความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระด้วยวิธี TLC ของผง 1 kD-Permeate ที่แยกผ่านคอลัมน์ Biogel P-2 เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ERT	59
36	กราฟค่า IC_{50} ของผง 1 kD-Permeate ที่รวบรวมสารละลายจากคอลัมน์ Biogel P-2	60
37	กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย ERT และพื้นที่ใต้พีค (ครั้งที่ 2)	61
38	โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน ERT จากการวิเคราะห์โดย HPLC (ครั้งที่ 2)	61

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
39	โครมาโทแกรมของสารไซออล หรือ ERT จากการทำบริสุทธิ์ผง 1 kD-Permeate วิเคราะห์โดย HPLC	62
40	การวิเคราะห์ความสามารถในการดักจับอนุภาคลิโปรตีนด้วยวิธี TLC ของกรดอะมิโนมาตรฐาน และผง 1 kD-Permeate	63
41	การเปรียบเทียบแถบติดสี ninhydrin จากวิธี TLC ของกรดอะมิโนมาตรฐานและสารละลายส่วนใสหลังการตกตะกอนช่วง 80-95% ของ 1 kD-Retentate	64
42	การวิเคราะห์ความสามารถในการดักจับอนุภาคลิโปรตีนด้วยวิธี TLC ของกรดอะมิโนมาตรฐานและส่วนใสหลังตกตะกอนช่วง 80-95% ของ 1 kD-Retentate	64

บทที่ 1

บทนำ

บทนำตั้งเรื่อง

สิ่งมีชีวิตทุกชนิดไม่ว่าจะเป็นพืชหรือสัตว์ต่างก็มีระบบที่เรียกว่า antioxidant defense system เพื่อขจัดอนุมูลอิสระภายในร่างกาย ระบบกำจัดอนุมูลอิสระดังกล่าวเกิดจากการทำงานของสารต่าง ๆ ที่รวมเรียกว่า สารต้านอนุมูลอิสระ ตัวอย่างเช่น เอนไซม์ catalase, glutathione peroxidase และ superoxide dismutase หรือ สารประกอบ และโปรตีน บางอย่าง เช่น glutathione, urate, bilirubin, ubiquinol, albumin, ceruloplasmin และ transferrin เป็นต้น สารเหล่านี้มีหน้าที่คอยควบคุมอนุมูลอิสระต่าง ๆ ให้อยู่ในระดับพอเหมาะ (Ames *et al.*, 1993) แต่ถ้าเมื่อใดที่มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในปริมาณมากเกินไปที่ระบบป้องกันจะยับยั้งได้หมด จะทำให้เกิดสภาวะที่เรียกว่า oxidative stress ขึ้น ภายใต้อาการดังกล่าวอนุมูลอิสระส่วนที่ยังหลงเหลืออยู่อาจนำไปสู่ความผิดปกติหรือพยาธิสภาพหลายอย่าง ดังนั้นการได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอกในร่างกายจึงน่าจะเป็นหนทางหนึ่งที่จะช่วยเสริมการควบคุม และป้องกันอันตรายจากอนุมูลอิสระเหล่านี้ได้ เนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากการสังเคราะห์นั้นถึงแม้จะมีประสิทธิภาพสูงแต่มีข้อจำกัดของการใช้ และมีปัญหาด้านความปลอดภัยในการบริโภค จึงทำให้การเสาะแสวงหาสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้นในปัจจุบัน

ในอดีตได้มีการรายงานว่าในน้ำยางพาราประกอบไปด้วยสารตั้งต้น hercynine (histidine betaine) ที่ใช้ในการสร้างสาร ergothioneine (2-thiol-histidine betaine) รวมทั้งสาร ergothioneine (Tan and Audley, 1968) ซึ่งมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูงมาก (super antioxidant) โดยทั่วไปเราสามารถพบสารนี้ได้ทั้งในพืชและสัตว์รวมทั้งในเชื้อราและเห็ดนานาชนิด สาร ergothioneine สามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง ปัจจุบันบริษัท OXIS International ได้ประสบความสำเร็จในการพัฒนากระบวนการสังเคราะห์สาร ergothioneine และสามารถผลิตได้ในระดับอุตสาหกรรม (Yadan and

Xu, 1995) เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ในการรักษาโรคต่าง ๆ รวมทั้งนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านอาหารเสริม (nutraceutical) และด้านเวชสำอาง (cosmeceutical) ดังนั้นจึงน่าจะทำการศึกษาวิจัยสารที่มีประโยชน์รวมทั้งสาร ergothioneine ในน้ำยาง

สารอนุมูลอิสระมีหลายชนิด สามารถแบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ได้ 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive oxygen species, ROS) กลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive nitrogen species, RNS) และกลุ่มที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive chlorine species, RCS) ในระบบสิ่งมีชีวิตอนุมูลอิสระจะเกิดจากโมเลกุลออกซิเจน โมเลกุลนี้นับเป็นอนุมูลอิสระ เนื่องจากมีอิเล็กตรอนเดี่ยวจำนวน 2 อิเล็กตรอน โดยจะแยกกันอยู่ในออร์บิทัลของพันธะคู่ (¶) ที่มีระดับพลังงานสูง (¶* antibonding) สำหรับออกซิเจนที่มีความไวในการเกิดปฏิกิริยามากกว่าออกซิเจนทั่ว ๆ ไปในธรรมชาติก็คือ ซิงเกิ้ลออกซิเจน (singlet oxygen) ซึ่งเกิดจากการเพิ่มพลังงานให้แก่โมเลกุลของออกซิเจนที่อยู่ในสภาวะพื้น มีความสามารถในการเป็นตัวออกซิไดซ์สูงมาก เมื่อทำปฏิกิริยาจะก่อให้เกิดอนุมูลอิสระ (Rosen *et al.*, 1999)

เนื่องจากมีสารหลายชนิดในสิ่งมีชีวิตไม่จัดเป็นอนุมูลอิสระตามคำจำกัดความทางเคมี แต่สามารถทำให้เกิดอนุมูลอิสระ หรือเป็นสารที่เป็นผลผลิตเมื่ออนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับชีวโมเลกุล เช่น โปรดีน ลิพิด และ ดีเอ็นเอ เป็นต้น ซึ่งสารทั้งหลายนี้ส่วนใหญ่จะเป็นชนิดที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ ปัจจุบันจึงมีการกำหนดคำศัพท์ใหม่ที่ครอบคลุมได้ครบถ้วนกว่า คือ reactive oxygen species (ROS) หรือ reactive species (RS) ใช้เรียกรวมอนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง (Roberfrid *et al.*, 1995)

ในงานวิทยานิพนธ์นี้จะทำการศึกษาด้านอนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆ จากน้ำยางพารา รวมทั้งสาร ergothioneine เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ประเมินศักยภาพในการใช้น้ำยางเป็นแหล่งวัตถุดิบธรรมชาติสำหรับการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระในเชิงพาณิชย์ ทั้งนี้เพราะยางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยและน้ำยางมีในปริมาณมากมายไม่จำกัด จะได้เป็นการช่วยเพิ่มมูลค่าใหม่ให้กับน้ำยางพาราและเพิ่มรายได้ให้กับประเทศชาติ

บทตรวจเอกสาร

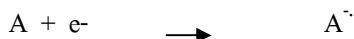
1. อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ คือ สารประกอบที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวอยู่ในออร์บิทัลวงนอกสุดที่มีระดับพลังงานสูง คำจำกัดความนี้หมายรวมถึง อะตอมของไฮโดรเจนและไอออนของโลหะทรานซิชันส่วนใหญ่ อนุมูลอิสระชนิดที่พบมากที่สุดในชีวิตมาจากโมเลกุลของออกซิเจนซึ่งจะไวต่อการเกิดเป็นอนุมูลอิสระสูงมาก เพราะแต่ละโมเลกุลประกอบด้วยอิเล็กตรอนเดี่ยวจำนวน 1 คู่ที่แยกกันอยู่ในแต่ละออร์บิทัลวงนอก อนุมูลอิสระมีทั้งที่อยู่ในสภาวะเป็นกลางทางไฟฟ้า และอนุมูลในสภาวะที่มีประจุไฟฟ้า โดยมีทั้งประจุบวกและประจุลบ สัญลักษณ์ทางเคมีของอนุมูลอิสระ คือ อิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลซึ่งแสดงด้วยจุดในตำแหน่งข้างบนของสัญลักษณ์ทางเคมี เช่น อนุมูล A[•] อนุมูล A⁻ และ อนุมูล A⁺ โดยเฉพาะอนุมูลที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะไวต่อการเกิดปฏิกิริยามากกว่าอนุมูลที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เนื่องจากอิเล็กตรอนเดี่ยวจะไม่เสถียรและพยายามจับคู่กับอิเล็กตรอนเดี่ยวอื่น ดังนั้นอนุมูลอิสระจึงมีคุณสมบัติเฉพาะ คือ มีความไวสูงในการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่น ๆ อย่างไรก็ตามยังคงมีอนุมูลอิสระบางชนิดที่มีความเสถียร ไม่วิธีในการเกิดปฏิกิริยาสามารถคงอยู่ในสภาพอนุมูลได้นาน อนุมูลที่มีความเสถียรมีจำนวนน้อยชนิดมาก ตัวอย่างของอนุมูลอิสระที่มีความสำคัญทางชีวภาพ ได้แก่ อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O₂⁻) อนุมูลไฮดรอกซิล (OH[•]) อนุมูลอัลคอกซี (RO[•]) อนุมูลเปอร์ไฮดรอกซิล (HO₂[•]) อนุมูลอิสระเหล่านี้จัดเป็นอนุมูลที่ไวในการเกิดปฏิกิริยาสูงมาก และในขณะที่อนุมูลไนตริกออกไซด์ (NO) อนุมูลวิตามินอี และอนุมูลวิตามินซี เป็นอนุมูลที่มีความไวรองลงมา การเกิดอนุมูลอิสระมีได้หลากหลายกลไกที่แตกต่างกัน ดังนี้ (Roberfriod *et al.*, 1995)

ก. การแตกพันธะโควาเลนต์แบบโฮโมไลซิส



ข. การเพิ่มอิเล็กตรอน 1 ตัวให้แก่อะตอมที่เป็นกลาง (ทางไฟฟ้า)



ค. การสูญเสียอิเล็กตรอน 1 ตัวจากอะตอมที่เป็นกลาง (ทางไฟฟ้า)



ชนิดของสารอนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง

อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้องในทางชีววิทยา สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive oxygen species, ROS) กลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive nitrogen species, RNS) และกลุ่มที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive chlorine species, RCS) สารบางชนิดสามารถจัดอยู่ได้ 2 กลุ่ม (ROS และ RNS) เช่น เปอร์ออกซีไนไตรท์

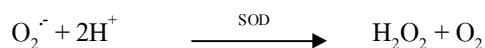
ตารางที่ 1 แสดงตัวอย่างอนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง (Akoh and Min, 1998)

อนุมูลอิสระ	สารที่เกี่ยวข้อง
Reactive oxygen species (ROS, RS)	
Superoxide, Peroxide anion $O_2^{\cdot -}$	H_2O_2 Ozone O_3
Hydroxyl, OH^{\cdot}	Hypobromous acid, HOBr
Hydroperoxyl, HO_2^{\cdot}	Hypochlorous acid, HOCl
Peroxyl, RO_2^{\cdot}	Singlet oxygen ($O_2^1\Delta_g$)
Alkoxy, RO^{\cdot}	Organic peroxides, ROOH
Carbonate, $CO_3^{\cdot -}$	Peroxynitrite, ONOO $^-$
Carbon dioxide, $CO_2^{\cdot -}$	Peroxynitrous acid, ONOOH
Reactive nitrogen species (RNS)	
Nitric oxide, NO^{\cdot}	Nitrous acid, HNO $_2$
Nitrogen dioxide, NO_2^{\cdot} $NO_2^{\cdot -}$	Nitrosyl cation, NO^+ Nitroxyl anion, NO^-
	Dinitrogen tetroxide, N_2O_4 Dinitrogen trioxide, N_2O_3
	Peroxynitrite, ONOO $^-$ Peroxynitrous acid, ONOOH
	Nitronium(nitryl) cation, NO_2^+
	Alkyl peroxynitrites, ROONO
Reactive chlorine species (RCS)	
Atomic chlorine, Cl	Hypochlorous acid, HOCl
	Nitryl(nitronium)chloride, NO_2Cl
	Chloramines Chlorine gas (Cl_2)
Other	
Thiyl radical (RS)	

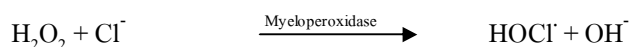
1.1 อนุมูลอิสระที่มีความไวต่อการทำปฏิกิริยาสูง

1.1.1 อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (O_2^-)

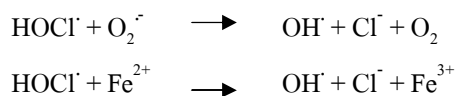
เป็นอนุมูลอิสระที่พบได้ภายในเซลล์ทั่วไป ส่วนใหญ่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการสังเคราะห์แสงจากโมเลกุลของออกซิเจนไปยังโมเลกุลของน้ำภายในไมโทคอนเดรีย (mitochondria) อนุมูลนี้จะไม่เข้าไปทำปฏิกิริยาทำลายเซลล์โดยตรงแต่เมื่อทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) โดยมี Fe^{2+} และ Cu^{2+} ช่วยเร่งปฏิกิริยา Fenton จะได้เป็นอนุมูลไฮดรอกซิล (OH) ซึ่งเป็นสารออกซิไดซ์ที่มีความว่องไวสูง นอกจากนี้สิ่งมีชีวิตยังสามารถสร้าง H_2O_2 จาก O_2^- ได้โดยตรงจากปฏิกิริยา dismutation ของเอนไซม์ superoxide dimutase (SOD) (Akoh and Min, 1998) ดังสมการ



ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ได้ ถึงแม้ไม่เป็นอนุมูลอิสระและจัดเป็นสารออกซิไดซ์ที่ไม่ทำปฏิกิริยาทำลายเซลล์ แต่เป็นสารตั้งต้นที่ทำให้เกิดอนุมูลไฮดรอกซิล และยังมีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างอนุมูลไฮโปคลอไรต์ ($HOCl$) ของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล (neutrophil) ที่ถูกกระตุ้นด้วยจุลชีพจากเอนไซม์ myeloperoxidase ที่เก็บอยู่ในถุงไลโซโซม (lysosome) (Davies, 1995; Sen, 1995) ดังสมการ



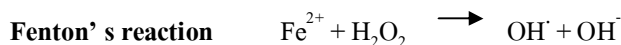
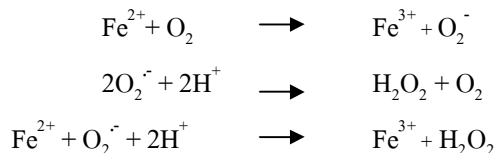
อนุมูลชนิดนี้สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ดีและสามารถสร้างอนุมูลไฮดรอกซิลได้เมื่อมีโลหะทรานซิชันอยู่ด้วย ดังสมการ



1.1.2 อนุมูลไฮดรอกซิล (OH)

จัดเป็นสารออกซิไดซ์แรงสูงที่มีความว่องไวสูงสุดสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารต่าง ๆ ที่อยู่รอบข้างในทันทีที่ถูกสร้างขึ้น ดังนั้นอนุมูลนี้จึงเป็นอันตรายต่อสารชีวโมเลกุลในสิ่งมีชีวิตมากกว่าอนุมูลชนิดอื่น ๆ (Halliwell, 1999) อนุมูลไฮดรอกซิลสร้างขึ้นจากไฮโดรเจน

เปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่มีโลหะทรานซิชันอยู่ในระบบโดยเหล็ก (Fe^{2+}) จะทำลายพันธะที่ยึดเหนี่ยวระหว่างออกซิเจนของสารเปอร์ออกไซด์ได้เป็นอนุมูลไฮดรอกซิล (OH^\cdot) และไฮดรอกไซด์ไอออน (hydroxide ion, OH^-) ในปฏิกิริยา Fenton ดังสมการ



1.1.3 อนุมูลไนตริกออกไซด์ (NO^\cdot)

เป็นอนุมูลอิสระขนาดเล็กที่เป็นพิษกับเซลล์ปอด สามารถรวมตัวกับโลหะทรานซิชันหรือโปรตีนที่มีโลหะชนิดนี้เป็นองค์ประกอบ (metalloprotein) ได้ อนุมูลไนตริกออกไซด์สามารถเข้าจับกับฮีโมโกลบิน (hemoglobin) ได้เร็วกว่าโมเลกุลออกซิเจนจนอาจเกิดการขัดขวางกระบวนการขนส่งก๊าซออกซิเจน (Stamler *et al.*, 1992) นอกจากนี้ยังทำปฏิกิริยากับอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ได้อย่างรวดเร็วเกิดเป็นอนุมูล peroxynitrite (ONOO^\cdot) ที่มีความว่องไวสูง (Huie and Padmaja, 1993) ในสภาวะที่มีออกซิเจน NO^\cdot จะถูกออกซิไดซ์เป็น NO_2 ซึ่งเป็นสารมลพิษสามารถทำลายเซลล์ของถุงลม (alveoli) และผนังหลอดเลือด (vascular endothelium) ภายในปอดได้ (Stephens *et al.*, 1972; Foubert *et al.*, 1992)

1.2 อนุมูลอิสระในระบบของสิ่งมีชีวิต

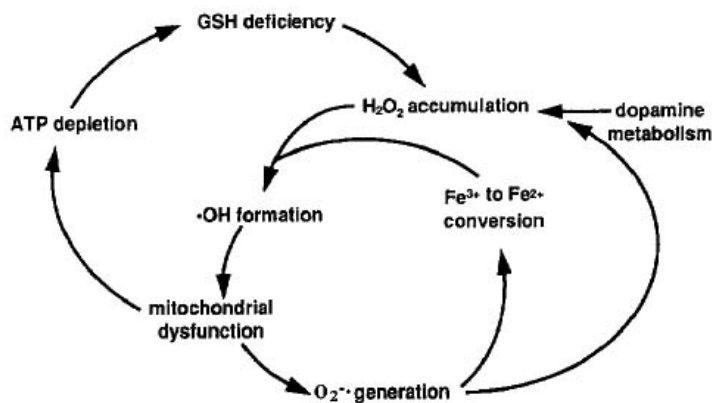
1.2.1 การเกิดอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระในระบบสิ่งมีชีวิตเป็นผลผลิตจากการเผาผลาญของเซลล์โดยการใช้ออกซิเจน อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O_2^-) และอนุมูลไฮดรอกซิล (OH^\cdot) เป็นอนุมูลที่พบในเซลล์มากกว่าอนุมูลอื่น ๆ ส่วนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และเปอร์ออกซีไนไตรท์ (ONOO^\cdot) แม้ไม่เป็นอนุมูลอิสระแต่จัดเป็นสารเกี่ยวข้องที่ความไวสูง (reactive species, RS) มีบทบาทในปฏิกิริยารีดอกซ์ที่เกิดขึ้นในเซลล์เป็นอย่างมาก อนุมูลอิสระเกิดได้จากหลายสาเหตุดังนี้

1.2.1.1 ความผิดปกติของระบบการทำงานของไมโทคอนเดรีย

RS เกิดขึ้นได้จากการเผาผลาญภายในไมโทคอนเดรียโดยปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยกระบวนการเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาออกซิเดชัน และจากการเกิด

ออกซิเจนออกซิเดชันภายในไมโทคอนเดรีย ปฏิกริยาออกซิเดชันโดยเอนไซม์เกิดขึ้นในพลาสมา ไซโทพลาซึม นิวเคลียสมมเบรอน เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม และเปอร์ออกซิโซม อนุมูลซูปเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน (O_2^-) เป็นอนุมูลอิสระเริ่มต้นที่เป็นอันตรายและพบมากที่สุด ในเซลล์ อนุมูล O_2^- เกิดขึ้นจากการรั่วไหลของอิเล็กตรอนที่มีพลังงานสูงจากกระบวนการส่งผ่านอิเล็กตรอนในไมโทคอนเดรีย และจากเอนไซม์ทั้งชนิดที่อยู่ในไซโทซอลและเอนไซม์ที่อยู่ในเมมเบรอน เช่น แชนทีน ออกซิเดส ไซโตรโครมพี 450 และฟอสโฟไลเปสเอ-2 (PLA₂) อนุมูล O_2^- สามารถเปลี่ยนไปเป็นอนุมูลอิสระที่มีอันตรายที่สุด ได้แก่ อนุมูลไฮดรอกซิล (OH) และสารที่เกี่ยวข้องที่ไวต่อปฏิกิริยา คือ เปอร์ออกซิไนไตรท์ (ONOO) อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นระหว่างการเกิดกระบวนการเผาผลาญโดยปฏิกิริยาออกซิเดชันจะไปทำลายให้แก่มิโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอโดยเฉพาะ mtDNA อนุมูลอิสระจะทำให้ mtDNA ผิดปกติเสียหาย ความเสียหายจะเพิ่มขึ้นอย่างมากตามเวลาหรืออายุที่เพิ่มขึ้นแบบทวีคูณ mtDNA ที่ผิดปกติจะมีรหัสที่ผิดปกติทำให้โปรตีนที่สร้างขึ้นจากการถอดรหัสที่ผิดปกติบกพร่องไปด้วย หากโปรตีนที่บกพร่องนั้นมีบทบาทและหน้าที่ที่สำคัญจะก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ กรณีที่โปรตีนที่บกพร่องอยู่ในไมโทคอนเดรียจะทำให้กระบวนการส่งผ่านอิเล็กตรอนในไมโทคอนเดรียบกพร่องทำงานได้ลดลง มีผลทำให้เกิดอนุมูลอิสระ O_2^- เพิ่มมากมายเกินกว่าที่สารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติที่มีอยู่ในเซลล์จะจัดการขจัด (Zaccarato *et al.*, 1988) ทำให้สารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติในเซลล์ เช่น กลูตาไทโอน วิตามินเอ วิตามินซี และวิตามินอี มีปริมาณลดลงหรือหมดไป ภาวะออกซิเดชันในเซลล์ไม่สมดุลมีอนุมูลอิสระมากเกินไป ดังนั้นเซลล์ตกอยู่ในสภาวะบีบคั้นจากการถูกออกซิไดซ์ (oxidative stress) นอกจากนั้นอนุมูลไฮดรอกซิลที่เกิดจากอนุมูล O_2^- ยังทำให้ไมโทคอนเดรียเสียหายรุนแรงมากขึ้น (Tritschler *et al.*, 1994) ดังวงจรที่แสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 วงจรการเกิดอนุมูลไฮดรอกซิลที่นำไปสู่ความผิดปกติของระบบการทำงานของไมโทคอนเดรีย (Packer *et al.*, 1987)

วิจัยที่ก่อให้เกิดความเสียหายดังกล่าวนี้ นำไปสู่การเกิดโรคความเสื่อมของระบบประสาท รายงานจำนวนมากตรวจพบว่าไมโตคอนเดรียในเนื้อเยื่อของผู้ป่วยโรคความเสื่อมของระบบประสาทมีความเสียหายอย่างมาก ซึ่งการตรวจพบดังกล่าวสนับสนุนสมมติฐานที่ว่าอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดโรคความเสื่อมของระบบประสาท นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยโรคนี้มีภาวะบีบคั้นจากการถูกออกซิไดซ์อยู่ในระดับสูง โดยมีเหล็ก (Fe^{3+}) ในสภาพที่ไม่ได้จับโปรตีนในน้ำไขสันหลังเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นผลจากการเกิดอนุมูลไฮดรอกซิล (OH) เป็นอนุมูลที่มีความไวในการทำปฏิกิริยาสูง สามารถทำให้เซลล์บาดเจ็บและตายได้ (Schulz *et al.*, 1995)

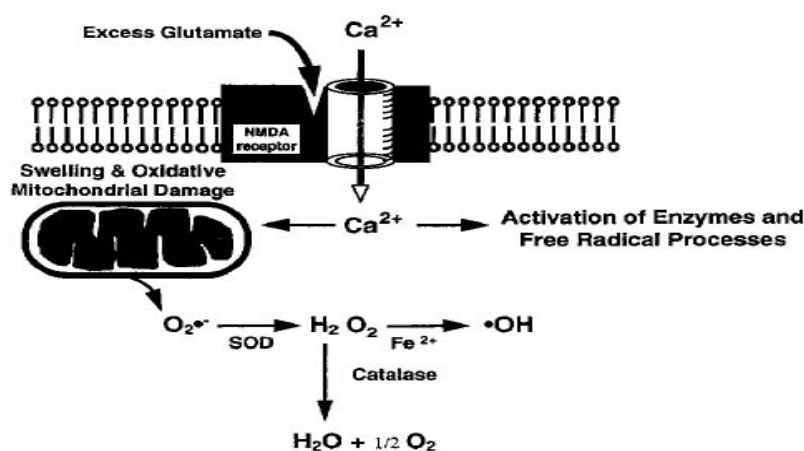
อนุมูลอิสระสามารถเกิดขึ้นพร้อมกันได้จากหลายกลไกและสามารถเสริมฤทธิ์กัน เช่น การเกิดอนุมูลอิสระจากกระบวนการกระตุ้นโดยกรดอะมิโนในเซลล์ประสาทและระบบการสื่อสารประสาท จากกระบวนการเมแทบอลิซึมของสารสื่อประสาท และจากความผิดปกติในการทำงานของไมโตคอนเดรีย ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้พร้อมกันและสามารถเสริมฤทธิ์กัน เช่น การเมแทบอลิซึมโดพามีนใน substantia nigra สามารถเกิดร่วมกับการเกิดภาวะบีบคั้นจากการถูกออกซิไดซ์ใน ไมโตคอนเดรีย ขณะที่กลไกการกระตุ้นให้เกิดพิษและความผิดปกติในการทำงานของไมโตคอนเดรียมีความเชื่อมโยงกับการเพิ่มขึ้นของแคลเซียมภายในเซลล์ ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการกระตุ้นให้เกิดพิษ นำไปสู่การเกิดอนุมูลอิสระในไมโตคอนเดรีย ทั้งหมดนี้เกิดเป็นวัฏจักรทำให้ ไมโตคอนเดรียเกิดความเสียหายรุนแรงขึ้น (Tritschler *et al.*, 1994)

1.2.1.2 กรดอะมิโนที่มีฤทธิ์กระตุ้นเซลล์ประสาทและระบบสื่อสารประสาท (Excitatory amino acid)

กรดกลูตามิก และ แอสปาร์ติกเป็นกรดอะมิโนที่มีฤทธิ์กระตุ้นเซลล์ประสาทและระบบสื่อสารประสาท เมื่อมีกรดอะมิโนเหล่านี้ในปริมาณที่มากผิดปกติ จะสามารถทำให้เกิดปรากฏการณ์ต่อเนื่องจนนำไปสู่ความเสียหายแก่เซลล์ประสาท และสามารถทำให้เซลล์ประสาทนั้นตายในที่สุด (Bondy and LeBel, 1993)

กรดกลูตามิกในปริมาณที่มากผิดปกติมีผลทำให้แคลเซียมภายในเซลล์เพิ่มขึ้น การเพิ่มขึ้นของแคลเซียมภายในเซลล์นำไปสู่การเกิดอนุมูลอิสระจากหลายทิศทาง เช่น จาก respiratory burst ของเม็ดเลือดขาว จากการปลดปล่อยกรด arachidonic พร้อมด้วยอนุมูล และจากการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์แซนทีนดีไฮโดรจีเนสไปเป็นแซนทีนออกซิเดส นอกจากนี้การผ่านเข้าของแคลเซียมจะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเทสทำให้ไนตริกออกไซด์ในเซลล์มีปริมาณเพิ่มขึ้น เมื่อแคลเซียมในเซลล์มีปริมาณมากจะเข้าสู่ไมโตคอนเดรียทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ดังแสดงในรูปที่ 2 กรดอะมิโนที่กระตุ้นระบบประสาทจะจับกับรีเซพเตอร์ N-methyl-D-aspartate (NMDA) ในบรรดารีเซพเตอร์ต่าง ๆ NMDA มีความไวสูงมากที่สุดต่อการกระตุ้นโดย

กรดอะมิโน ทำให้เกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันเพิ่มขึ้นสองเท่าที่สมองบริเวณ hippocampus (Haba *et al.*, 1990) การกระตุ้นรีเซพเตอร์ NMDA จะทำให้ไนตริกออกไซด์ในเซลล์เพิ่มขึ้น ซึ่งสารนี้จะเกิดปฏิกิริยารวดเร็วกับอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O_2^-) เกิดเป็นเปอร์ออกซิไนเตรท ($ONOO^-$) เปอร์ออกซิไนเตรทจัดเป็น RS ไปทำปฏิกิริยาต่อโดยให้หมู่นิโคตกับกรดอะมิโนไทโรซีน และเกิดอนุมูลไฮดรอกซิล ($OH\cdot$) ซึ่งจัดเป็นอนุมูลอิสระที่มีความสามารถในการทำลายสูงกว่าอนุมูลเริ่มแรกคือ ซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (Kiedrowski *et al.*, 1992)

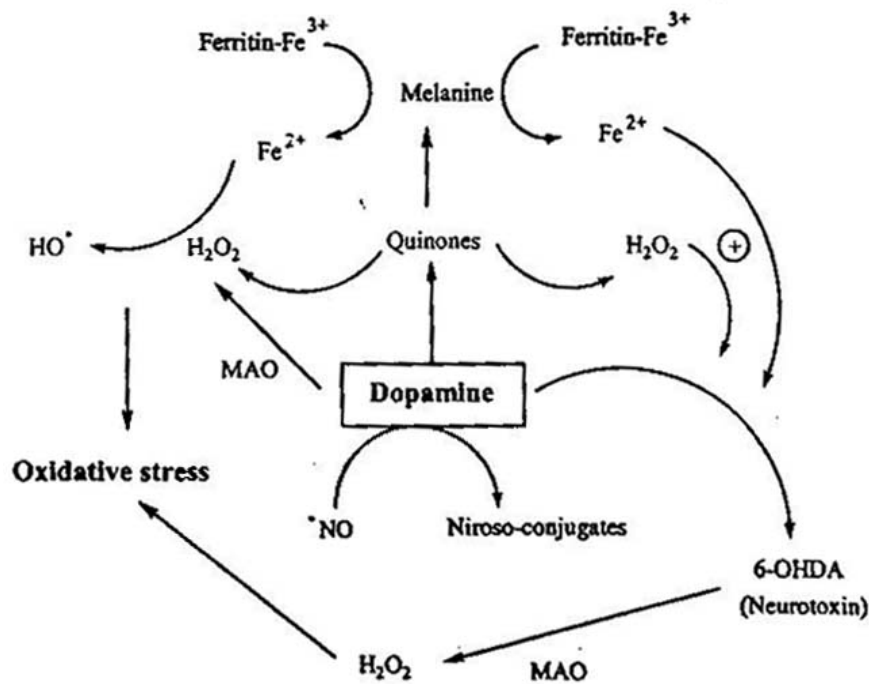


รูปที่ 2 กลไกการเกิดอนุมูลอิสระจากการกระตุ้นระบบประสาทด้วยกรดอะมิโนกลูตามิก (Packer *et al.*, 1987)

1.2.1.3 เมแทบอลิซึมของสารสื่อประสาท

เมแทบอลิซึมของโดพามีน และสารสื่อประสาทในสมองอื่น ๆ ทำให้ได้ผลผลิตที่เป็นอนุมูลอิสระ หรือสารที่เป็นอันตรายและเป็นพิษ โดพามีนส่วนใหญ่จะเก็บอยู่ในถุงเล็ก ๆ ในเซลล์ประสาทที่สร้างโดพามีน ซึ่งจะหลั่งออกมาจากถุงหรือเก็บกลับสู่ถุง ทำให้มีปริมาณโดพามีนที่เหมาะสมในไซโตพลาสซึมและบริเวณปลายประสาท ในภาวะของการเกิดโรค เช่น เนื้อเยื่อหรืออวัยวะขาดเลือด หรือภาวะที่มีระดับออกซิเจนต่ำจะพบว่าจะมีระดับของโดพามีนเพิ่มขึ้นทำให้สมองถูกทำลายได้ พิษของสารนี้เกิดจากโดพามีนถูกออกซิไดซ์ แล้วให้ผลผลิตได้แก่อนุมูลอิสระ สารประกอบควิโนนที่เป็นพิษ และสารเมลานิน (Blum *et al.*, 2001) เอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส (MAO) จะเปลี่ยนโดพามีนไปเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ แม้ว่าจะปราศจากเอนไซม์ MAO ก็สามารถเกิดได้เช่นกันจากการเกิดออกซิเดชันได้เป็นเมลานิน 6-ไฮดรอกซี

โดพามีน (6-HODA) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และอนุมูลอิสระ (Heikkila and Cohen, 1971) ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 กลไกการเกิด Oxidative stress จากการสลายสารโดพามีน

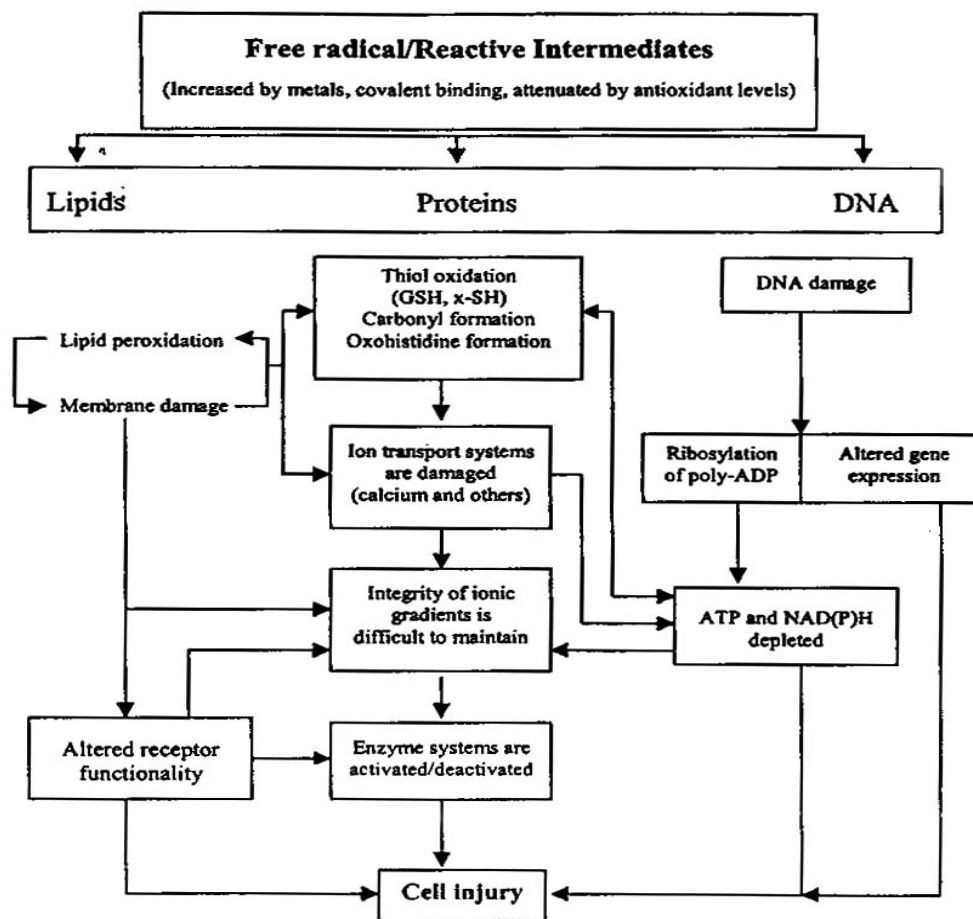
(Blum *et al.*, 2001)

1.2.1.4 ภาวะช็อกและการอักเสบ

อนุมูลอิสระมีบทบาทต่อกระบวนการในระบบภูมิคุ้มกันประกอบในเม็ดเลือดขาวจะจับกับเอนไซม์ NADPH oxidase ทำให้เกิดอนุมูลอิสระภายนอกเซลล์เพิ่มมากขึ้น ส่วนอนุมูลอิสระภายในเป็นผลต่อเนื่องมาจากการสร้างไซโตไคน์ในกระบวนการอักเสบ และการรั่วออก ในภาวะช็อกเซลล์นี้จะถูกกระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระ เช่น $O_2^{\cdot -}$ ซึ่งจะไปทำปฏิกิริยากับไนตริกออกไซด์ที่ส่วนใหญ่เกิดจากกิจกรรมของเซลล์กลืนกิน (macrophage) ได้เป็นสารพิษเปอร์ออกซิไนไตรท์ $ONOO^-$ ซึ่งสารนี้สามารถเกิดขึ้นได้ในภาวะช็อกเนื่องจากสาเหตุอื่นๆ อีกด้วย เช่น ภาวะช็อกจากพิษภายในเซลล์ และอาการช็อกเนื่องมาจากเสียเลือดมาก

1.2.2 อนุมูลอิสระกับการเกิดโรคต่าง ๆ

เป้าหมายแรกที่อนุมูลอิสระทำให้เกิดความเสียหายและเป็นสาเหตุของการเกิดโรค คือ ชีวโมเลกุลที่สำคัญในร่างกายที่ไวต่อการถูกออกซิไดซ์ ได้แก่ ลิพิดที่เป็นองค์ประกอบของเมมเบรน โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ รีเซพเตอร์ สารสื่อประสาท และดีเอ็นเอ ชีวโมเลกุลเหล่านี้มีอิเล็กตรอน หรืออะตอมไฮโดรเจนที่หลุดออกได้ง่าย ทำให้อนุมูลอิสระเข้าไปทำปฏิกิริยา โดยเข้าไปจับคู่กับอิเล็กตรอนของชีวโมเลกุล หรือดึงอิเล็กตรอน หรืออะตอมไฮโดรเจนออกจากชีวโมเลกุลนั้น ๆ กลไกการเกิดความเสียหายแบ่งตามชนิดของชีวโมเลกุลที่สำคัญในร่างกายได้เป็น 3 ชนิด คือ ลิพิด โปรตีน และดีเอ็นเอ ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 กลไกการเกิดความเสียหายและการบาดเจ็บของเซลล์จากอนุมูลอิสระ
(Kehre, 1993)

ความไม่สมดุลระหว่างปริมาณการเกิดและการทำลายอนุมูลอิสระอาจนำไปสู่ภาวะเครียด (stress) ที่เกิดจากการมีปริมาณอนุมูลอิสระที่มากเกินไป ภาวะดังกล่าวมีบทบาทในการ

เกิดโรคต่าง ๆ มากกว่า 100 โรค (ตามตารางที่ 2) เช่น ภาวะเส้นเลือดแดงหนาและมีความยืดหยุ่นน้อยลงเนื่องจากการสะสมของไขมันที่ผนังหลอดเลือด ทำให้หลอดเลือดตีบตันเกิดภาวะขาดเลือดชั่วคราวที่สมองและหัวใจ โรคซึ่งเกี่ยวกับการเสื่อมของประสาท โรคภูมิแพ้และโรคมะเร็ง นอกจากนี้การมีปริมาณอนุมูลอิสระที่ไม่สมดุลยังสัมพันธ์กับลักษณะโรคหรืออาการผิดปกติอื่น ๆ ดังนี้ โรคอัลไซเมอร์ โรคพาร์กินสัน อาการสมองและไขสันหลังอักเสบอันเนื่องมาจากโรคภูมิแพ้ โรคเนื้องอกเรื้อรัง Down's syndrome โรคตับอักเสบ โรคข้ออักเสบ การติดเชื้อเอชไอวี โรคแทรกซ้อนอันเนื่องมาจากเป็นโรคเบาหวาน โรคที่เกี่ยวข้องปอด เป็นต้น

ตารางที่ 2 ภาวะของอาการหรือโรคที่เกิดขึ้นเนื่องมาจาก ROS และ RNS (โองา วัชรคุปต์และคณะ, 2549)

Category	Example
Ischemia-reflow states	Stroke, myocardial infarction, organ transplantation, Dupuytren's contractor, cocaine-induced fetal damage
Brain / nervous system disorders	Vitamin E deficiency, exposure to neurotoxin, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's chorea, stroke, amyotrophic lateral sclerosis (ALS), Guam dementia, Down's syndrome, neuronal ceroid lipofuscinoses, muscular dystrophy, multiple sclerosis
Heart & cardiovascular system	Alcohol cardiomyopathy, keshan disease (selenium deficiency), atherosclerosis, cardiac iron overload
Iron overload	Idiopathic haemochromatosis, thalassaemia and other chronic anaemias treated with multiple blood transfusions, alcoholism, cardiopulmonary bypass, alcoholism
Radiation injury	Consequences of nuclear explosions, radiotherapy or exposure to hypoxic cell sensitizers
Aging	Disorders of premature aging, age-related diseases, e.g. cancer
Inflammatory/immune injury	Glomerulonephritis, vasculitis, autoimmune diseases, hepatitis, rheumatoid arthritis
Red blood cell	Lead poisoning, malaria, anemia, chemotherapy
Respiratory tract	Effect of cigarette smoke, emphysema, hyperoxia, bronchopulmonary

ตารางที่ 2 สถานะของอาการหรือโรคที่เกิดขึ้นเนื่องมาจาก ROS และ RNS (ต่อ)

Category	Example
Kidney	dysplasia, exposure to air pollutants (O ₃ , NO ₂ , SO ₂ , diesel exhaust) ARDS, asthma, cystic fibrosis Autoimmune nephritic syndrome, heavy metal nephrotoxicity (Pb, Cd, Hg), haemodialysis
Gastrointestinal tract	Betel nut-related oral cancer, liver injury, pancreatitis
Eye	Cataract, ocular haemorrhage, retinopathy of prematurity, photic retinopathy
Skin	UV radiation, thermal injury, porphyria, contact dermatitis, baldness

1.3 ภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress)

ภาวะเครียดออกซิเดชัน “oxidative stress” มีคำจำกัดความคือ ภาวะความไม่สมดุลระหว่างการเกิดอนุมูลอิสระและกระบวนการป้องกันโดยเอนไซม์และสารต้านออกซิเดชันในเซลล์หรือร่างกาย โดยการเกิดอนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้องที่เป็นผลผลิตของอนุมูลอิสระที่มีความไวในการเกิดปฏิกิริยาสูงกว่าที่กระบวนการป้องกันจะต้านทานไว้ได้ ทำให้เซลล์เนื้อเยื่อเมมเบรนถูกคุกคาม และบีบคั้นจากภาวะการถูกออกซิไดซ์

1.3.1 สาเหตุสำคัญของการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันเกิน เป็นผลมาจาก 2 สาเหตุ คือ

1.3.1.1 ความบกพร่องของกระบวนการป้องกันการเกิดออกซิเดชัน การมีสารต้านออกซิเดชันลดลงหรือเอนไซม์ทำหน้าที่ต้านออกซิเดชันมีปริมาณลดลง หรือทำงานผิดปกติ สาเหตุของการเกิดความบกพร่อง ได้แก่ การกลายพันธุ์ และการขาดสารอาหาร เช่น แร่ธาตุและสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ

1.3.1.2 มีการเกิดหรือผลิตอนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้องที่เป็นผลผลิตของอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น เช่น การที่ร่างกายได้รับออกซิเจนมากเกินไป หรือมีการกระตุ้นระบบที่สร้างอนุมูลอิสระ เช่น ภาวะที่มีการอักเสบเรื้อรัง

1.3.2 อันตรายจากการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน แบ่งเป็นระดับความรุนแรง ดังนี้

1.3.2.1 การปรับตัวของเซลล์ ซึ่งมีได้หลายกรณีตั้งแต่สามารถป้องกันและซ่อมแซมความเสียหายได้สมบูรณ์ หรือป้องกันได้ในระดับหนึ่งแต่ไม่สมบูรณ์ หรืออาจเกิดการป้องกันมากเกินไป เช่น เซลล์ปรับตัวทนต่อภาวะออกซิเดชันสูง ๆ ได้

1.3.2.2 การบาดเจ็บของเซลล์และเนื้อเยื่อ ชีวโมเลกุลเป้าหมายที่ไวต่อการถูกออกซิไดซ์โดยอนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง ซึ่งส่งผลกระทบต่อสูง ได้แก่ ลิพิด โปรตีน และดีเอ็นเอ

1.3.2.3 การตายของเซลล์และเนื้อเยื่อ ในสภาวะการเกิดออกซิเดชันหากเซลล์ไม่สามารถซ่อมแซมและมีชีวิตอยู่ได้ เซลล์จะตายในที่สุด โดยมีกลไกการตายทั้งแบบ apoptosis และ necrosis

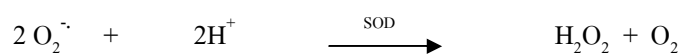
1.4 การควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุล

เซลล์ร่างกายจะเป็นอันตรายและเสียหายหากมีอนุมูลอิสระในปริมาณที่มากเกินไปดังนั้นเซลล์และร่างกายจึงมีกลไกเพื่อควบคุมไม่ให้สูงจนเกิดอันตราย กลไกที่สำคัญที่ทำหน้าที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุลมีกลไกหลัก 3 จำพวก ได้แก่

1.4.1 เอนไซม์

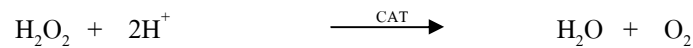
เป็นกลไกสำคัญขั้นแรกที่ทำหน้าที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุล เอนไซม์ที่สำคัญได้แก่

เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (SOD) ทำหน้าที่ขจัดอนุมูลอิสระเริ่มต้นที่เกิดขึ้นในร่างกาย คือ อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O_2^-) โดยการเปลี่ยนอนุมูล O_2^- ให้เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

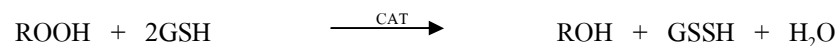


ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะถูกกำจัดต่อโดยเอนไซม์คาตาเลส และเอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส นอกจากนี้เอนไซม์ SOD ยังทำหน้าที่ปกป้องเอนไซม์ในกลุ่มดีไฮเดรต ได้แก่ เอนไซม์โคไฮดรอกซีดีไฮเดรต เอนไซม์อะโคไนเตส เอนไซม์ฟอสโฟกลูโคเนตดีไฮเดรต เอนไซม์ฟumarate-ase และเอนไซม์fumarate-ase บี ไม่ให้เอนไซม์เหล่านี้ถูกอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนทำลาย

เอนไซม์คาตาเลส (CAT) เป็นเอนไซม์ซึ่งมีฮีม คือ ferriprotoporphyrin เป็นองค์ประกอบ โครงสร้างเอนไซม์ประกอบด้วยหน่วยย่อยของโปรตีนฮีม 4 หน่วยย่อยที่เหมือนกัน ทำหน้าที่เปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปเป็นโมเลกุลของน้ำและออกซิเจน

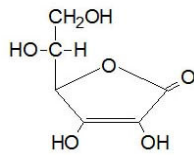


เอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส (GPX) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยารีดักชันของสารประกอบไฮโดรเปอร์ออกไซด์ ได้แก่ ลิพิดเปอร์ออกไซด์ (ROOH) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยมีกลูตาไทโอน (GSH) ร่วมในปฏิกิริยาด้วย เอนไซม์นี้จะป้องกันเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมไม่ให้ถูกทำลายหรือเสียหายจากภาวะที่ร่างกายมีอนุมูลอิสระมากเกินไป

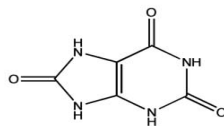


1.4.2 สารต้านอนุมูลอิสระ

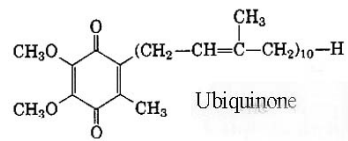
เป็นสารที่สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยตรงเพื่อกำจัดอนุมูลให้หมดไป หรือหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ไม่ให้ดำเนินต่อ สารขจัดอนุมูลที่มีอยู่ในธรรมชาติเช่น กรดยูริก บิลิรูบิน จะกำจัดอนุมูล ส่วนวิตามินซี วิตามินอี กลูตาไทโอน เบตาแคโรทีน และยูบิควิโนน จะหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระประเภทหลังมีบทบาทสำคัญในการทำให้ลิพิดเปอร์ออกซิเดชันสิ้นสุดลง นอกจากนี้ยังมีอยู่ในอาหาร เช่น ผัก ผลไม้ และสมุนไพรมีสารโพลีฟีนอลเป็นองค์ประกอบจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระในอุดมคติควรมีคุณสมบัติที่สำคัญดังนี้ คือ มีความเฉพาะเจาะจงสูงในการจับกับอนุมูลอิสระโดยตรงและกำจัดอนุมูลให้หมดสิ้นไป (quenching) สามารถทำปฏิกิริยากับคีเลตได้ เป็นสารต้านออกซิเดชันและไม่มีผลกระทบต่อการแสดงออกของยีน นอกจากนี้ยังมีเกณฑ์ที่สำคัญอื่น ๆ ที่ใช้บ่งชี้ถึงความ เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี ได้แก่ ความสามารถในการถูกดูดซึมหรือส่งผ่านเข้าสู่ทั้งภายในเซลล์ ภายนอกเซลล์ และที่เนื้อเยื่อต่าง ๆ โดยมีความเข้มข้นเพียงพอที่สามารถออกฤทธิ์ได้



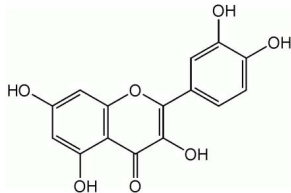
Ascorbic acid



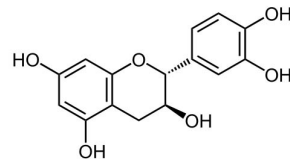
Uric acid



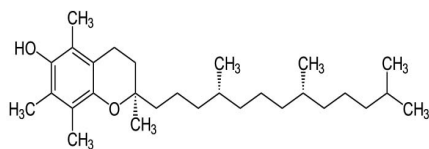
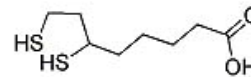
Ubiquinone



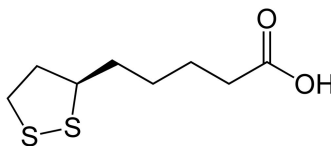
Catechin



Quercetin

 α -Tocopherol

Dihydrolipoate

 α -Lipoic acid

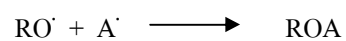
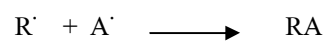
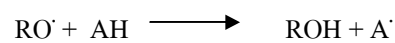
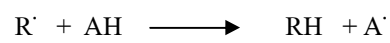
รูปที่ 5 สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในร่างกาย

1.4.2.1 กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ (Yanishlieva, 2001)

สารต้านอนุมูลอิสระมีกลไกการทำงานแบ่งได้เป็น 6 วิธีการ คือ

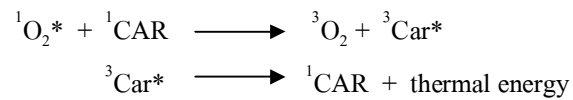
1.4.2.1.1 การดักจับอนุมูลอิสระ (Radical scavenging)

โดยการให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ ดังสมการ



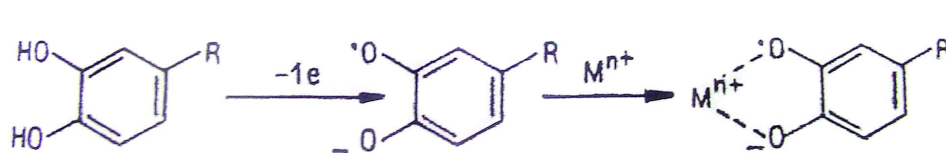
1.4.2.1.2 การยับยั้งการทำงานของ singlet oxygen (Singlet oxygen quenching)

สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoids) สามารถยับยั้งการทำงานของ singlet oxygen โดยการเปลี่ยน singlet oxygen ($^1\text{O}_2^*$) ให้อยู่ในรูป triplet oxygen ($^3\text{O}_2$) และปล่อยพลังงานที่ได้รับออกไปในรูปความร้อน โดยที่แคโรทีนอยด์ (Car) 1 โมเลกุล สามารถทำปฏิกิริยากับ singlet oxygen ได้ถึง 1,000 โมเลกุล (Sies and Sundquist, 1992)



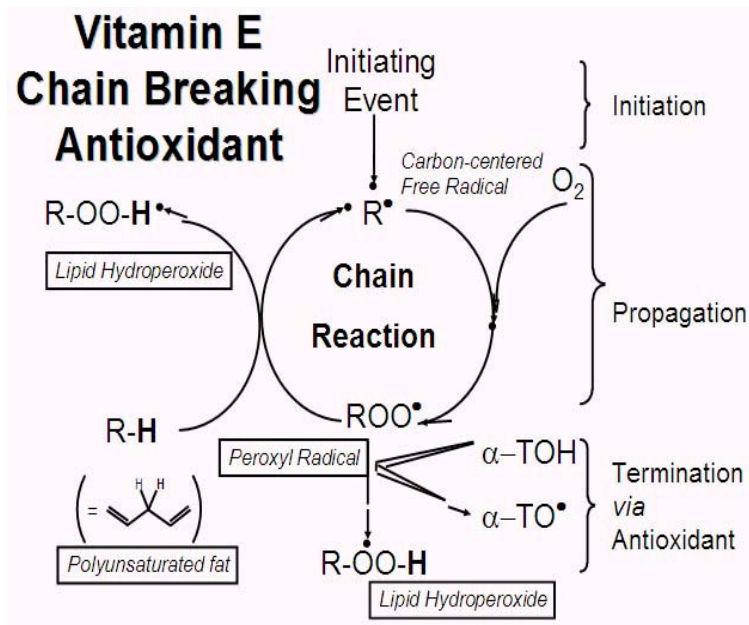
1.4.2.1.3 การจับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Metal chelation)

สารที่สามารถจับโลหะที่สำคัญจำพวก Fe^+ และ Cu^{2+} ได้แก่ flavonoids, phosphoric acid และ citric acid เป็นต้น โดยสารประกอบฟลาโวนอยด์มีกลไกการจับโลหะ ดังนี้



1.4.2.1.4 การหยุดลูกโซ่ปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Chain-breaking)

วิตามินอี (α -tocopherol; toc-OH) สามารถป้องกันเชื้อหุ้มเซลล์ถูกทำลายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (lipid autooxidation) โดยทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron-acceptor antioxidants) จากอนุมูล peroxy (ROO^*) (Burton and Traber, 1990) ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 การทำงานของวิตามินอีในการยับยั้งลูกโซ่ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน
(Burton and Traber, 1990)

1.4.2.1.5 การเสริมฤทธิ์ (Synergism) ซึ่งกันและกัน

สารชนิดนี้จะช่วยสนับสนุนให้สารต้านอนุมูลอิสระทำงานได้ดีขึ้น ตัวอย่างเช่น การทำงานร่วมกันระหว่าง α -tocopherol กับ ascorbic acid โดยที่ ascorbic acid ไม่สามารถทำงานในระบบ hydrophobic ได้เหมือนกับ α -tocopherol แต่จะให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูล α -tocopherol peroxy radical ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง α -tocopherol กับอนุมูล peroxy radical (ROO) เปลี่ยนรูปกลับไปเป็น α -tocopherol ที่สามารถทำงานได้ (Frankel *et al.*, 1998)

1.4.2.1.6 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาสร้างอนุมูลอิสระ

(Enzyme inhibition)

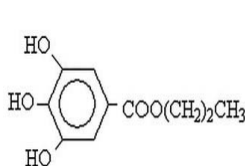
สารประกอบ phenolic บางชนิด เช่น flavonoids, phenolic acid และ gallates สามารถยับยั้ง lipoxigenase โดยสามารถเข้าจับกับไอออนของเหล็กซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ (cofactor) ยังผลต่อการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว (Puerta, 1999)

1.4.2.2 แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระ (Pokorny *et al.*, 2001)

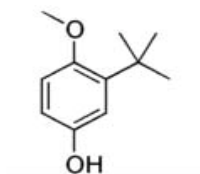
สารต้านอนุมูลอิสระแบ่งตามแหล่งที่มาได้ 2 ชนิด ได้แก่

1.4.2.2.1 สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์

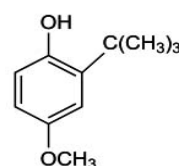
สารประกอบ phenolic สังเคราะห์ 5 ชนิด ได้แก่ propyl gallate, 2-butylate hydroxyanisole, 3-butylate hydroxyanisole, BHT (butylated hydroxytoluene) และ tertiary butylhydroquinone ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 7 เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันอันเป็นสาเหตุให้อาหารมีกลิ่นสี และรสชาติที่เปลี่ยนแปลง สารสังเคราะห์เหล่านี้มีประสิทธิภาพและความคงตัวสูงกว่าสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติทั่วไปแต่มีข้อจำกัดของการใช้เนื่องจากปัญหาด้านความปลอดภัยต่อการบริโภค (Yang *et al.*, 2000)



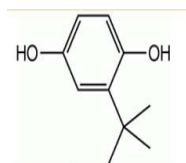
Propyl gallate



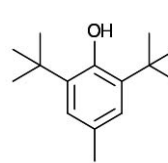
2-Butylate hydroxyanisole



3-Butylate hydroxyanisole



Tertiary butylhydroquinone



Butylated hydroxytoluene

รูปที่ 7 ตัวอย่างโครงสร้างทางเคมีของสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (Howell and Saeed, 1999)

1.4.2.2.2 สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (Natural antioxidant)

สารกลุ่มนี้ได้รับความสนใจและมีการพัฒนาขึ้นค่อนข้างกว้างขวางในปัจจุบันเนื่องจากแนวคิดเรื่องการกลับคืนสู่ธรรมชาติ ประกอบกับความเชื่อมั่นว่ามีความปลอดภัยต่อการบริโภค สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ พบได้ทั้งในจุลชีพ สัตว์ และพืชซึ่งมีทั้งที่เป็นวิตามินอย่างเช่น วิตามินซี วิตามินอี เบต้าแคโรทีน และสารที่ไม่ให้คุณค่าทางโภชนาการ ซึ่งมีโครงสร้างเป็นสารประกอบ phenolic โดยเฉพาะ polyphenols เช่น แชนโธน และฟลาโวนอยด์ ซึ่งประกอบไปด้วยหมู่ aromatic hydroxyl ตั้งแต่ 2 หมู่ขึ้นไป หมู่ฟังก์ชัน (functional group) เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการดักจับอนุมูลอิสระต่าง ๆ ไม่ให้ไปกระตุ้นหรือก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน

ได้ โดยการให้อนุมูล H⁺ แก่อนุมูลเหล่านั้น (Van Acker *et al.*, 2000) นอกจากนี้สารประกอบ polyphenols ที่มีโครงสร้างของ ortho-dihydroxyl phenol อยู่ในโมเลกุลยังสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูล OH[•] ในปฏิกิริยาที่มีอนุมูลโลหะทรานซิชัน คือ Fe²⁺ และ Cu²⁺ เป็นตัวเหนี่ยวนำโดยการเข้าจับกับโลหะดังกล่าวเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (complex) ได้อีกด้วย (Sanchez-Moreno *et al.*, 2000)

นอกจากนี้ยังพบว่ามีกรดอะมิโนบางกลุ่มมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ เช่น tryptophan, tyrosine, cysteine เป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่มีความเข้มข้นประมาณ 0.25-0.5 mM (Meucci *et al.*, 1997) ซึ่งกรดอะมิโนมีประโยชน์ในการสร้างโปรตีนต่าง ๆ ที่ใช้ในการเจริญเติบโตซ่อมแซมและบำรุงร่างกาย ช่วยให้ร่างกายสังเคราะห์สารอื่น ๆ ที่มีประโยชน์ เช่น ช่วยสังเคราะห์สารกลูตาไทโอน (glutathione) ที่ทำหน้าที่ช่วยป้องกันตับและร่างกายจากสารพิษที่ได้รับเข้าไป (www.geocities.com/nawo_chemicalsandbeauty) ช่วยสังเคราะห์สารเออร์โกไทโอนิน โดยใช้ histidine และ cysteine ซึ่งเป็นสารที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้อย่างดีเยี่ยม (Amir and Donald, 1962)

1.4.3 สารคีเลทโลหะ (Metal chelators)

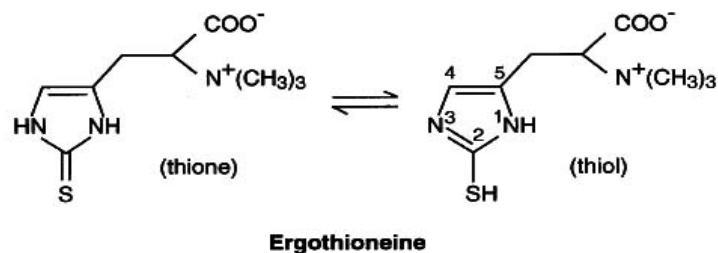
นอกจากเอนไซม์และสารต้านอนุมูลอิสระดังกล่าวข้างต้นแล้ว สารที่ทำหน้าที่คีเลทโลหะเป็นอีกกลไกหนึ่งในการทำหน้าที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุล ทั้งนี้เพราะโลหะทรานซิชัน เช่น ธาตุเหล็ก และทองแดง มีส่วนสำคัญในการเกิดอนุมูลอิสระ สารทำหน้าที่คีเลทโลหะในร่างกาย ส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่จับและแยกโลหะที่เกี่ยวข้องในขั้นตอนการเกิด OH[•] เข้ามารวมไว้ในโครงสร้างให้อยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อน โลหะจึงไม่สามารถทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระได้

1.5 เออร์โกไทโอนิน (Ergothioneine, ERT)

เออร์โกไทโอนิน (Ergothioneine, ERT) ถูกค้นพบเมื่อ ค.ศ. 1909 จากเชื้อราที่อยู่ ในเมล็ดข้าว พร้อมทั้งพบว่ามีปริมาณค่อนข้างสูง (10 mg%) ในเมล็ดเลือดแดงของสัตว์ (Tanert, 1909 and Maelville, 1958) ผลการศึกษาลักษณะและหน้าที่ของ ERT ในเมล็ดเลือดแดง พบว่า ERT มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันฮีโมโกลบิน (hemoglobin) ไม่ให้ถูกออกซิไดส์ จากขบวนการ oxidation (Touster, 1951) ปัจจุบัน ERT ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการต้าน oxidative stress เพื่อช่วยในการป้องกันการถูกทำลายของเซลล์ จากอนุมูลอิสระจำพวก hydroxyl radical, hypochlorite และ peroxynitrite (Hiroki and May, 1999) นอกจากนี้ผลการศึกษาด้านเภสัชวิทยา

พบว่า ERT สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ด้านการเกิดอนุมูลอิสระ ป้องกันอันตรายของผิวจากรังสีต่าง ๆ ยับยั้งฤทธิ์ของ singlet oxygen โดยจากผลการทดลองที่เปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระจำพวก cysteine, N-acetyl-cysteine, glutathione และ mercaptans พบว่า ERT สามารถยับยั้งได้ดีกว่าถึง 10 เท่า (Kawano *et al.*, 1983) นอกจากนี้ ERT มีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลแล้ว มันยังสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลกลุ่มที่มีไอออนของเหล็กเป็นตัวเหนี่ยวนำ (Akanmu, *et al.*, 1991) พร้อมทั้งยังสามารถเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับกลุ่มโลหะประจุไดวาเลนต์ ประเภท ทองแดง แคดเมียม และปรอท (Motohashi *et al.*, 1976) ERT จึงเป็นตัวกีดเตอร์ของกลุ่มโลหะประจุไดวาเลนต์ได้อย่างดีเยี่ยม นอกจากนี้ ERT ยังเป็นตัวควบคุมระดับพลังงานภายในเซลล์ แต่กลไกยังไม่ทราบแน่ชัดเท่ากับฤทธิ์ทางการต้านอนุมูลอิสระ (Tan and Audley, 1968) โดยสาร ERT จะพบได้ในพืชและสัตว์มีกระจายตามเนื้อเยื่อต่าง ๆ สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง จึงให้ผลเอื้อต่อการรักษาโรคต่าง ๆ มากมาย โดยได้มีการนำมาใช้ประโยชน์ด้านความงามและใช้เป็นอาหารเสริม

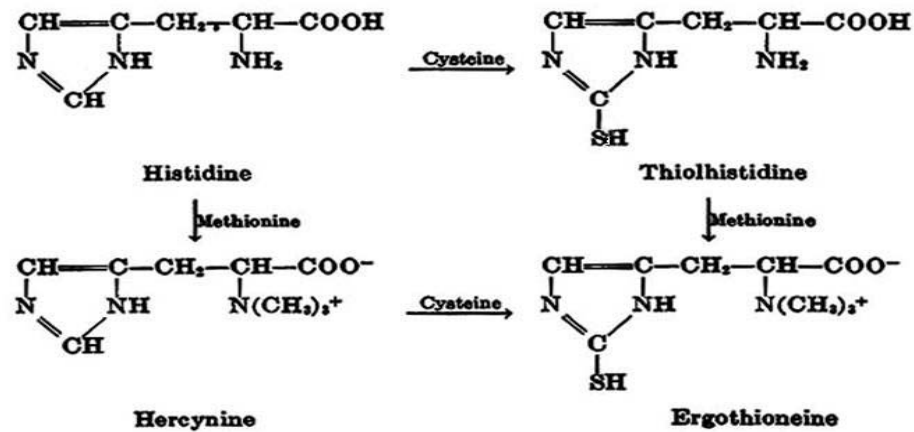
ลักษณะทางเคมีของ ERT เป็นกรดอะมิโนประกอบด้วย 2-thio-L-histidine เป็นสารที่มีในธรรมชาติเป็นแบบ 2-thio-imidazole amino acid มีความเป็น hydrophilic เมื่อละลายอยู่ในน้ำจะมี 2 รูปแบบที่เป็น tautomer กัน คือ แบบ 2-thio-imidazole และแบบ thione ดังรูปที่ 8 ซึ่งส่วนใหญ่จะพบในแบบ thione มากกว่า



รูปที่ 8 รูปโครงสร้างของ ERT (Klaus-Dieter *et al.*, 1996)

เมื่ออยู่ในสิ่งมีชีวิต สารนี้จะมีเสถียรภาพมาก เพราะ pH ของสิ่งมีชีวิตไม่เอื้อให้ ERT เกิด auto-oxidation (Hanlon, 1971) ขณะนี้ยังไม่มียาหลักฐานปรากฏแน่ชัดเกี่ยวกับการสังเคราะห์ ERT ในสัตว์และในพืช แต่พบว่าการสังเคราะห์โดยเชื้อราและแบคทีเรียที่อยู่ในดินแล้วพืชดูดขึ้นมาใช้ มนุษย์และสัตว์ที่กินพืชเหล่านี้ก็จะได้รับสารนี้ด้วย (Melville, 1958) ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้จะสังเคราะห์ ERT ได้จาก hercynine และ cysteine โดย cysteine เป็นแหล่งของ sulfur ที่จะนำไปใช้ในขั้นสุดท้ายของวิถี (Ishikawa *et al.*, 1974) ดังรูปที่ 9 และยังมีรายงานถึงปริมาณ ERT ใน

แหล่งวัตถุดิบอื่น ๆ อีกเช่น ในเห็ดพบในช่วง 0.4-2.0 mg/g น้ำหนักแห้ง (Dubost *et al.*, 2006) สำหรับในน้ำยางพารามีรายงานอยู่ในช่วงกว้างตั้งแต่ไม่มีเลย จนถึง 0.05 g ต่อน้ำยางสด 100 g (Archer *et al.*, 1969)



รูปที่ 9 กลไกการสังเคราะห์ ERT จากจูลซีฟ (Amir and Donald, 1962)

รายงานการพบสารนี้กระจายอยู่ทั่วไปในพืชและสัตว์ตามเนื้อเยื่อต่าง ๆ ดังตารางที่ 3 (Melville, 1950)

ตารางที่ 3 ปริมาณ ergothioneine ที่พบในเนื้อเยื่อต่าง ๆ จากสัตว์ 4 ชนิด (mg/น้ำหนักเนื้อเยื่อ สด 100 g)

Tissue	Rat	Rabbit	Dog	Cat
Liver	13.3	0.3	0.9	2.7
RBC	10.4	10	6.6	2.9
Kidney	4.3	0.3	1.6	3.1
Heart	1.5	2.7	8.9	0.0
Lungs	1.5	0.3	0.6	0.8
Spleen	1.1	1.0	1.1	-
Testes	0.0	0.1	0.0	0.0
Muscle	0.7	-	-	-
Intestine	0.6	-	-	-
Stomach	0.4	-	-	-
Plasma	0.0	-	-	-

จากตารางที่ 3 จะเห็นว่าในสัตว์ชนิดเดียวกัน ergothioneine กระจายอยู่ตามเนื้อเยื่อต่าง ๆ ไม่เท่ากัน โดยพบว่า ergothioneine จะอยู่ในอวัยวะที่มีระดับการเกิด oxidative stress สูง ซึ่งในเลือดของสัตว์เกือบทุกชนิดจะพบสารนี้โดยมีปริมาณผันแปรไปตามชนิดของสัตว์ดังตารางที่ 4 (OXIS International, Inc.)

ตารางที่ 4 แสดงความเข้มข้นของ ERT ที่พบในเลือดสัตว์ชนิดต่าง ๆ
(mg/เลือด100 ml)

Species	Ergothioneine
Man	1-4
Rat	1-6
Rabbit	1-10
Guinea Pig	1-4
Cat	0.5-2
Dog	3-6
Ox	0.5-2
Pig	3-27
Sheep	2-6
Fowl	2-10

จากตารางที่ 4 จะเห็นว่าในเลือดหมูมีปริมาณ ergothioneine สูง แต่การสกัดยังได้ yield ไม่เป็นที่น่าพอใจ (Melville, 1958) ดังนั้นจึงได้มีความพยายามสกัดสารนี้โดยใช้เชื้อราและแบคทีเรีย เป็นวัตถุดิบ แต่ yield ที่ได้มีค่าต่ำกว่าที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อสัตว์ นอกจากนั้นยังมีรายงานถึงปริมาณ ergothioneine ในแหล่งวัตถุดิบอื่น ๆ อีก เช่น ในเห็ดพบในช่วง 0.4-2.0 mg/g น้ำหนักแห้ง (Dubost *et al.*, 2006) เลือดหนู 2.0-5.2 mg/ 100 ml และในน้ำอสุจิของหมู 29-256 mg/100 ml (Tan and Audley, 1968) ส่วนในน้ำยางพารามีปริมาณ ergothioneine สูงสุดอยู่ในช่วง 12-17 mg /ยางสด 100 ml (Tan and Audley, 1968) และ yield ที่สกัดได้จะอยู่ในช่วง 0.0-5.0 mg/ยางสด 100 ml (Pakianathan *et al.*, 1992) จากการเปรียบเทียบ yield ในน้ำยางพาราที่สกัดได้มีปริมาณใกล้เคียงกับในเห็ดและในเลือดหนู ในงานวิทยานิพนธ์นี้ส่วนหนึ่ง จึงมุ่งที่จะหาวิธีสกัดสาร ergothioneine ในน้ำยางพาราเพราะสามารถหาได้ง่ายในท้องถิ่น และเป็นการสร้างมูลค่าใหม่ให้กับน้ำยางพาราจาก

ส่วนที่ไม่ใช่ยาง จากที่กล่าวมาข้างต้น ergothioneine เป็นสารที่มีประสิทธิภาพด้านฤทธิ์ของสารอนุมูลอิสระและมีประโยชน์ต่อการประยุกต์ใช้ด้านการแพทย์ ชะลอความแก่หรือเสริมความงาม และด้านอาหารเสริม ถ้าการสกัดสารนี้ในน้ำยางพาราประสบความสำเร็จก็น่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะใช้น้ำยางพาราเป็นวัตถุดิบในการผลิตสารมูลค่าสูง

2. ยางพารา

ยางพารา (*Hevea brasiliensis*) จัดเป็นพืชที่อยู่ในสกุล Euphorbiaceae โดยมีการสร้างน้ำยางบรรจุอยู่ภายในท่อน้ำยาง ในน้ำยางสดประกอบด้วย น้ำ 60%, อนุภาคแขวนลอยต่าง ๆ รวมทั้งอนุภาคยาง 37%, โปรตีน 0.34, น้ำตาลคิวบราคิทอล (quebrachitol) 1.45%, น้ำตาล 0.25%, ash 0.53% และสารประกอบอื่น ๆ อีก 0.34% ซึ่งได้แก่ arachidylalcohol, tocotrienol, hevein, L-inosit-2-methylether, indolylacetic acid, trigonelline, ergothioneine และ hercynine (List and Horhammer, 1969-1979) รวมทั้งกรดอะมิโนทั้งชนิดที่มีคุณสมบัติเป็นกลาง กรด และ ด่าง ซึ่งจากการศึกษากรดอะมิโนอิสระที่มีอยู่ในน้ำยางของ Birkhauser และ Basel (1974) พบว่ามีกรดอะมิโนที่เป็น กรด กลาง และด่าง กระจายอยู่ในเซรัมที่ได้มาจากส่วนไซโตพลาสซึม (cytoplasmic) และลูทอยด์ (Lutoidic) ในน้ำยาง ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การจำแนกปริมาณกรดอะมิโนอิสระกลุ่มที่เป็นกรด กลาง ด่าง ในเซรัมของน้ำยางที่ได้จากส่วนไซโตพลาสซึมและลูทอยด์ (Birkhauser and Basel, 1974)

Amino acid group	Free amino acid pool (%)	
	Serum C	Serum L
Acidic	56.9	22.9
Neutral	36.4	21.1
Basic	6.6	56.0

หมายเหตุ Serum C = เซรัมจากส่วนไซโตพลาสซึม; serum L = เซรัมจากส่วนลูทอยด์

นอกจากนี้มีรายงานการพบสารอินทรีย์อื่น ๆ ที่อยู่ในเซรัมของน้ำยางที่ได้มาจากสองส่วนนี้ ดังแสดงในตารางที่ 6 (Pakianathan *et al.*, 1992)

ตารางที่ 6 สารอินทรีย์ต่าง ๆ ที่พบในเซรุ่มน้ำยางที่ได้ จากส่วนไซโทพลาสซึมและลูทอยด์

เซรุ่มจากส่วนไซโทพลาสซึม		เซรุ่มจากส่วนลูทอยด์	
ชนิดสารอินทรีย์	ปริมาณ (g/100ml ยางสด)	ชนิดสารอินทรีย์	ปริมาณ (g/100ml ยางสด)
Proteins	0.46	Proteins	0.28
Total cyclitols	0.3-0.8	Total cyclitols	0.2-0.3
Sucrose	0.1-0.3	Sucrose	0.06-0.08
Glucose	0.01	Glucose	0.03
Glutathione	0.01	Phospholipids	0.04-0.05
Free amino acids	0.08	Glycolipids	} 0.02
Ascorbic acid	0.02	Pigments	
Other organic acids		Sterol esters	
Nitrogenous bases	0.04	Fatty acid esters	
Ribonucleic acids	} 0.02	Waxes	
Deoxyribonucleic acids		Triglycerides	0.02
Mononucleotides	0.02	Triglycerides	0.02
		Sterols	0.04
		Free fatty acids	} 0.05
		Tocotrienols (trace)	
		Phenolic compounds	0.01
		Diglycerides	} 0.01
		Mononucleotides	
		Alcohols	
		Trigoneline	0.007
		Ergothioneine	0-0.05

จากวัฏจักรความเครียดของต้นยางที่ถูกคุกคามโดยการกรีดทุกวัน ต้นยางจึงสร้างสารต่าง ๆ ขึ้นมาตอบสนองมากมาย โดยเฉพาะอนุภาคยางเพื่อใช้ในการอุดตันท่อน้ำยาง

(Wititsuwannakul *et al.*, 2008) และสารอื่น ๆ ที่เอื้อประโยชน์ต่อการสมานบาดแผลและสร้างเนื้อเยื่อใหม่ขึ้นมาทดแทนส่วนที่สูญเสียไป รวมทั้งการป้องกันตนเองจากเชื้อโรคต่าง ๆ ซึ่งสารเหล่านี้บางตัวมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Tan and Audley, 1968) เช่น ergothioneine (2-thiol-histidine betaine), ไธออล (thiols), กรดอะมิโนบางชนิด ด้วยเหตุนี้ นายแพทย์พาราจึงเป็นแหล่งวัตถุดิบที่มีมากมายและน่าสนใจสำหรับการศึกษารายละเอียดของสารต้านอนุมูลอิสระ เพื่อการประยุกต์ใช้ประโยชน์ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆ จากน้ำขางพารา
2. วิเคราะห์ปริมาณกลุ่มสารต้านอนุมูลอิสระ รวมทั้ง ergothioneine ที่มีอยู่ในน้ำขางพารา

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุและอุปกรณ์

- UV-visible Spectrophotometer ยี่ห้อ Beckman รุ่น DU6501
- UV-visible recording Spectrophotometer ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น UV-1200 series 160A
- Vortex GENIE-2, Vortex KIKA-WORKS
- Heat Block ยี่ห้อ Labnet รุ่น Accumet Block Labnet
- pH meter ยี่ห้อ Fisher Scientific รุ่น Accumet 15
- Micropipette Gilson ขนาด 1000, 200, 20 ไมโครลิตร
- Slab gel electrophoresis ยี่ห้อ ATTO
- HPLC-VWD (Agilent 1100)
- กระดาษอะลูมิเนียมฟอยล์, พาราฟิล์ม
- เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่ง OHAUS รุ่น Precision Plus
- เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง OHAUS รุ่น Analytical Plus
- เครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอน รุ่น Avanti J-14 ยี่ห้อ Beckman Coulter
- เครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอน รุ่น H-31 series ยี่ห้อ Kokusan
- เครื่องอัลตราฟิลเตรชั่น ยี่ห้อ Millipore
- Rotary evaporator รุ่น Rotavapor R-200 ยี่ห้อ Buchi
- Mini Spray dryer รุ่น B-290 ยี่ห้อ Buchi
- หลอด Centrifuge ขนาด 50 และ 250 มิลลิลิตร
- หลอด Eppendorf ขนาด 1.5, 2 มิลลิลิตร

สารเคมี

ชื่อสารเคมี	บริษัทที่ผลิต
<i>Analytical grade</i>	
Acetone	Lab Scan
Acrylamide	Fluka
Ammonium persulfate	Hopkin & Williams
Ammonium Solution	Lab Scan
Biogel P-2	Biorad
Bisacrylamide	Fluka
Butyl hydroxyl toluene (BHT)	Sigma
Coomassie brilliant blue R-250	Fluka
2,2'-Dipyridyl disulphide	Sigma
EDTA	Sigma
Ethanol	Merck
Formic acid	Univar
Glycerol	Carlo Erba
Glycine	Fluka
Hydrochloric acid	Merck
Methanol	Labscan
Propan-1-ol	Labscan
Sephadex G-15	Amersham science
Silicagel 60 GF ₂₅₄	Merck
Sodium carbonate	Merck
Triethylamine	Carlo Erba
<i>HPLC grade</i>	
Acetonitrile	Fisher scientific
<i>Standard</i>	
Ergothioneine	Sigma
DPPH radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical)	Sigma

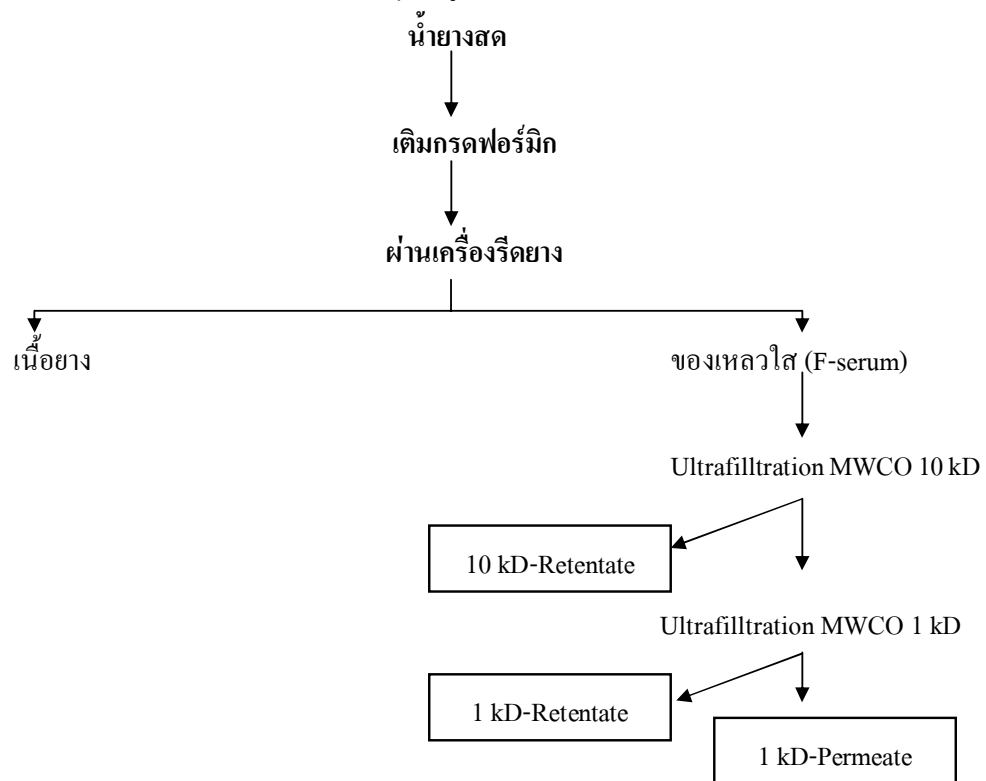
ชื่อสารเคมี	บริษัทที่ผลิต
DL-Alanine	Fluka
DL-Histidine	Sigma
<i>Standard</i>	
DL-Tryptophan	Merck
L-Arginine	Fluka
L-Cysteine	BDH Chemicalis Ltd.
L-Glutamic acid	Sigma
L-Glutamine	Sigma
L-Lysine	Sigma
L-Methionine	Sigma
L-Phenylalanine	Fluka
L-Proline	Sigma
L-Tyrosine	Sigma
Standard protein maker สำหรับ SDS PAGE	Amersham Science

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสารสกัดจากน้ำยางพารา

การเตรียมสารตัวอย่างจากน้ำยางสด ซึ่งได้จากต้นยางพารา (*Hevea brasiliensis*) พันธุ์ RRIM 600 โดยมีวิธีการดังนี้

นำน้ำยางสด 2.5 ลิตร มาเติมกรดฟอร์มิก (formic acid) 2% (ปริมาตร 250 ml) รอให้น้ำยางแข็งตัว จากนั้นนำก้อนยางที่แข็งตัวไปรีดผ่านเครื่องรีดยาง ทำการเก็บส่วนเซรัมใส มากรองผ่านเมมเบรนที่มี Molecular weight cut-off (MWCO) ขนาด 10 kD โดยการใช้เครื่องอัลตราฟิลเตรชัน (ultrafiltration) เพื่อกักเก็บสารที่มีโมเลกุลใหญ่กว่า 10 kD ในส่วน 10 kD-Retentate จากนั้นนำส่วนที่สามารถกรองผ่านเมมเบรน 10 kD ได้ (10 kD-Permeate) มากรองผ่านเมมเบรนที่มี MWCO ขนาด 1 kD ซึ่งจะได้ส่วนที่สามารถกรองผ่านเมมเบรนขนาด 1 kD (1 kD-Permeate) และส่วนที่ไม่สามารถกรองผ่านเมมเบรนขนาด 1 kD (1 kD-Retentate) แสดงดังภาพที่ 10 จากนั้นนำสารตัวอย่างทั้งหมด คือ F-serum, 1 kD-Retentate และ 1 kD-Permeate ที่อยู่ในรูปของเหลวไปทำให้เป็นผงแห้งด้วยวิธี spray Dry เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป



รูปที่ 10 แผนภาพแสดงขั้นตอนการเตรียมสารตัวอย่างจากน้ำยางพารา

2. การเตรียมสารตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH

2.1 การเตรียมสารละลายจากส่วนเซรั่มน้ำยางและที่ได้จากการกรองด้วยเครื่อง

Ultrafiltration

นำสารตัวอย่างผงแห้งที่ได้จากการทำแห้ง F-serum, 10 kD-Retentate, 1 kD-Retentate และ 1 kD-Permeate ผ่านเครื่อง spray dryer ไปซึ่งและละลายในน้ำ deionized (DI) ให้มีความเข้มข้นเป็น 20 mg/ml เก็บสารตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ

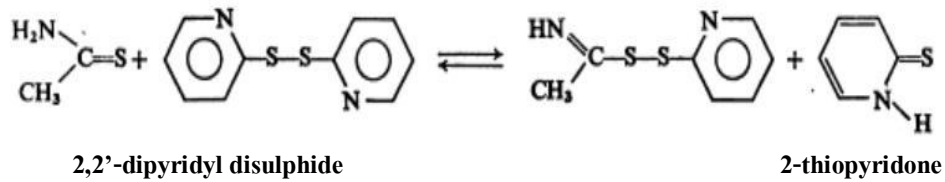
2.2 การแยกส่วนสารตัวอย่างโดยอาศัยการตกตะกอนด้วยอะซิโตน

นำผงแห้งของ F-serum และ 1 kD-Retentate อย่างละ 20 g ไปละลายด้วยน้ำ DI ปริมาตร 100 ml จากนั้นนำไปตกตะกอนด้วยอะซิโตนในช่วงความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% และ 80-95% โดยทำการคนสารตัวอย่างด้วยแท่งแม่เหล็กเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ แล้วนำไปผ่านเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนที่ได้ไปเป่าไล่อะซิโตนด้วยแก๊สไนโตรเจน แล้วนำไปทำแห้งด้วยการอบที่อุณหภูมิ 60 °ซ และวางทิ้งไว้ในโถดูดความชื้นแบบสุญญากาศ (desiccator) เป็นเวลา 1 วัน เตรียมสารละลายจากตะกอนแห้งของสารตัวอย่างแต่ละส่วน โดยให้มีความเข้มข้นเป็น 20 mg/ml เพื่อนำไปศึกษาลักษณะแถบโปรตีนที่ได้โดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสและศึกษาความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบไธออลต่อไป

นำส่วนสารละลายอะซิโตนช่วงความเข้มข้น 80-95% (supernatant) ที่ได้หลังการปั่นแยกตะกอนออกไปแล้ว ไประเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 60 °ซ ได้ความดัน 20 บาร์ จนสารละลายเกือบแห้งแล้วอบต่อที่อุณหภูมิ 60 °ซ วางทิ้งไว้ในโถดูดความชื้นแบบสุญญากาศ (desiccator) เป็นเวลา 1 วัน ซึ่งนำหนักตะกอนเพื่อนำไปทำสารละลายที่มีความเข้มข้นเป็น 20 mg/ml แล้วนำไปศึกษาความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระและศึกษาลักษณะแถบของสารด้วยวิธี TLC ต่อไป

3. การหาปริมาณสารประกอบไธออล (Thiols) รวมทั้งสารเออร์โกไทโอนิน (**B**-2-thiolglyoxaline-4(5)-propionbetaine หรือ ergothioneine, ERT)

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบไธออล โดยใช้สาร 2,2'-dipyridyl disulphide ซึ่งจะเข้าทำปฏิกิริยากับหมู่ไธออล (thiol) เกิดเป็นสารประกอบ 2-thiopyridone สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 343 nm (Jan *et al.*, 1974) ดังรูป

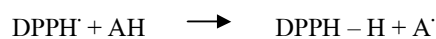


ในการทดลองนี้จะหาปริมาณสารประกอบไซออล (รวมทั้ง ERT) ของสารตัวอย่าง ตามวิธีของ Carlsson *et al.*, (1974) โดยเปิด 1.5 mM 2,2'-Dipyridyl disulphide ปริมาตร 500 μl เติม 1 M HCl ปริมาตร 120 μl และสารตัวอย่างปริมาตร 200 μl ตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 343 nm ด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ ERT โดยเจือจาง ERT ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 2.5-200 μM

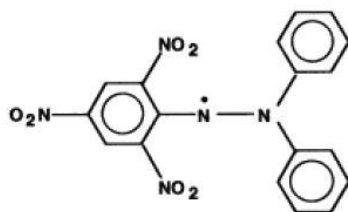
4. วิธีการทดสอบความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH[•]

สารประกอบ 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (Braca *et al.*, 2001)

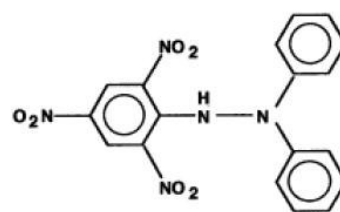
เป็นสารอนุมูลอิสระที่มีเสถียรภาพสูง ดูดกลืนแสงได้มากที่สุดที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตรและเมื่อรับอิเล็กตรอนหรืออนุมูลไฮโดรเจนโดยจากสารต้านอนุมูลอิสระหรือกลุ่มอนุมูลอิสระ เพื่อกลายเป็น diamagnetic molecule ที่มีเสถียรภาพสูงขึ้น (Soares *et al.*, 1997) ความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นดังกล่าวจะลดลง (Brand-Williams *et al.*, 1995) กลไกการทำปฏิกิริยามีขั้นตอนดังนี้



โดยที่ AH คือ สารต้านอนุมูลอิสระ และ R[•] คือ อนุมูลอิสระอื่น ๆ



1: Diphenylpicrylhydrazyl (free radical)



2: Diphenylpicrylhydrazine (nonradical)

รูปที่ 11 รูปโครงสร้างของ DPPH[•] และ DPPH

วิธีการนี้ใช้ตรวจสอบความสามารถของสารสกัดหรือสารต้านอนุมูลอิสระที่จะให้ไฮโดรเจนและ/หรืออิเล็กตรอนที่ลดการทำปฏิกิริยาของอนุมูล DPPH[•] ขั้นตอนการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระต่ออนุมูลอิสระคือเมื่อสารต้านอนุมูลอิสระเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูล DPPH[•] จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของสีคือ สีม่วงเข้มจะค่อย ๆ จางไปจนอาจเป็นสีเหลืองใสและค่าการดูดกลืนแสงจะมีค่าลดลง ซึ่งทำให้สามารถศึกษากิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ได้

วิธี DPPH[•] นี้เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการศึกษากิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากพืชธรรมชาติ (Blois, 1998)

ในการทดลองนี้จะวัดค่าความสามารถการต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างตามวิธีของ Yen และ Hen (1995) ดังนี้ ปิเปต 50 μM 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) ในสารละลายเอทานอล (Ethanol) 95% ปริมาตร 950 μl แล้วนำไปผสมกับสารละลายตัวอย่างปริมาตร 50 μl เขย่าผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm เปรียบเทียบกับตัวควบคุมซึ่งใส่น้ำ DI แทนสารสกัดแล้วนำค่าที่ได้คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การดักจับอนุมูล DPPH[•] จากความสัมพันธ์

$$\% \text{Scavenging} = \left[\frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right] \times 100$$

A_{control} = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุม

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของสารทดสอบ

การคำนวณ IC₅₀ และ % การยับยั้ง

การคำนวณหาค่าการยับยั้งที่ 50% ทำโดยเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การดักจับอนุมูล DPPH[•] กับความเข้มข้นของสารทดสอบ แล้วอ่านค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งได้ 50% จากกราฟดังกล่าว

5. การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส

(Polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

โพลีอะคริลาไมด์เจลที่ใช้ในการศึกษาเป็นเจลแผ่น (Slab gel) ขนาด 10x12 เซนติเมตร หน้า 1 มิลลิเมตร ประกอบด้วยเจล 2 แผ่น คือเจลส่วนบน (Stacking gel) มีความสูงประมาณ 3 เซนติเมตร และเจลส่วนล่าง (Separating gel) มีความสูง 7 เซนติเมตร

5.1 การเตรียมเจลโพลีอะคริลาไมด์เจล 12%

ทำตามวิธีของ Laemmli (1970) ซึ่งมีส่วนประกอบของเจลเป็นดังนี้

Composition	4% Stacking gel	12% Separating gel
	(μ l)	(μ l)
30% Acrylamide-0.8% bisacrylamide	400	2,400
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	750	-
1.5 M Tris-HCl, pH8.8	-	1,500
1% Ammonium persulphate	150	150
0.2% EDTA	20	-
10% SDS	30	60
Distilled water	1,645	1,880
TEMED	5	10
Total volume (μ l)	3,000	6,000

5.2 การเตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน

เตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน โดยผสมสารตัวอย่าง 3 ส่วนกับบัฟเฟอร์ 1 ส่วน ซึ่งประกอบด้วย 0.2 M Tris-HCl, pH 6.8, 8 mM EDTA, 40% กลีเซอรอล, 4% SDS, 0.4% โบรโมฟินอลบลู และ 1% เบต้า-เมอร์แคปโตเอทานอล (β -Mercaptoethanol) จากนั้นต้มในน้ำเดือด 10 นาที

5.3 การทำอิเล็กโทรฟอรีซิส

เตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจลเข้มข้น 12% ซึ่งมีส่วนประกอบตามตารางในข้อ 5.1 ซึ่งมีโพลีอะคริลาไมด์เจลเข้มข้น 4% เป็นเจลชั้นบน (Stacking gel) และโพลีอะคริลาไมด์เจลเข้มข้น 12% เป็นเจล ชั้นล่าง (separating gel) โดยใช้ 0.025 M tris-0.192 M glycine-0.1% SDS, pH 8.3 เป็นบัฟเฟอร์ในการทำอิเล็กโทรฟอรีซิส นำสารละลายตัวอย่างและสารละลายโปรตีน

มาตรฐานใส่ในแต่ละช่องเจล ปล่อยกระแสไฟฟงที่มีค่าเป็น 20 mA เข้าสู่เครื่องทำอิเล็กโตรฟอริซิส นานประมาณ 1.5 ชั่วโมง จนกระทั่งสีโบรโมเฟนอลบลูเคลื่อนที่ไปจนสุดขอบล่างของเจล จึงปิด กระแสไฟ นำเจลออกจากแผ่นกระจกแล้วนำไปย้อมด้วยสี coomassie blue

5.4 การย้อมสีโปรตีน

นำแผ่นเจลแช่ลงในสี Coomassie blue ซึ่งประกอบด้วย 0.2% cosmassie brilliant blue R-250, 50% methanol, และ 10% acetic acid โดยแช่เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างสี ส่วนเกินออกโดยใช้ destaining solution (20% methanol และ 10% acetic acid) จนเห็นแถบโปรตีน สีน้ำเงินชัดเจน

6. การทำบริสุทธิ์สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี gel filtration

ก่อนการทำ gel filtration ทำการสกัดสารจำพวกน้ำตาลแอลกอฮอล์ออกจากสาร ตัวอย่างด้วยเมธานอล ด้วยการละลายผง F-serum หรือ ผง 1 kD-Permeate ในเมธานอลในสัดส่วน 100 g/750 ml กวนผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 1-2 ชั่วโมง แล้วนำไปกรองเก็บส่วนตะกอนมาละลายด้วย เมธานอลซ้ำอีก 2-3 ครั้ง

จากนั้นนำส่วนตะกอนมาละลายด้วยน้ำ DI ในสัดส่วน 1 g/2 ml กวนผสมให้เข้า กันเป็นเวลา 30 นาที เติมเอธานอลสารละลายจะตกตะกอนเป็นสองส่วนวางทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง แยกเอา ส่วนใสไปประเหยใต้ความดัน 20 บาร์ ที่อุณหภูมิ 60 °ซ และนำไปอบต่อที่อุณหภูมิ 60 °ซ จนสาร สกัดแห้ง นำมาชั่งและละลายน้ำ DI ให้มีความเข้มข้นเป็น 1 g/ml เซนตริฟิวจ์ที่ 10,000 รอบ/นาที เพื่อกำจัดตะกอนส่วนที่ไม่ละลาย

6.1 การทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี Sephadex G-15

นำผง Sephadex G-15 มาแช่ให้พองตัวด้วยน้ำ DI ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เปลี่ยนน้ำล้างเจล 2-3 ครั้ง บรรจุลงคอลัมน์ขนาด 2.5x120 เซนติเมตร โดยมี ปริมาตรเจลเป็น 490.63 ml สูง 100 เซนติเมตร ปรับคอลัมน์ให้สมดุลด้วยน้ำ DI ปริมาตร 3 เท่าของ ปริมาตรเจลที่บรรจุ โดยใช้อัตราการไหล 30 ml/ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

นำสารละลายปริมาณ 5 ml มาผ่านคอลัมน์ Sephadex G-15 ชะด้วยน้ำ DI ด้วย อัตราการไหล 30 ml/ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง เก็บสารตัวอย่างหลอดละ 5 ml ติดตามการแยกของสาร โดยการวัดความสามารถในการดักจับอนุมูล DPPH และวัดปริมาณสารประกอบไธออล เขียน กราฟระหว่างความสามารถในการดักจับอนุมูล DPPH และค่าปริมาณสารประกอบไธออล กับ จำนวนหลอดทดลอง แล้วเลือกรวบรวมหลอดที่มีความสามารถในการดักจับอนุมูล DPPH และให้

ปริมาณสารประกอบไฮดรอลสูง ๆ มาทำให้เข้มข้นโดยระเหยได้ความดัน 20 บาร์ ที่อุณหภูมิ 60 °ซ และอบให้แห้งเพื่อเตรียมทำบริสุทธิ์ต่อด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี Biogel P-2

6.2 การทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี Biogel P-2

นำผง Biogel P-2 มาแช่ให้พองตัวในน้ำ DI ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16 ชั่วโมง เปลี่ยนน้ำเพื่อล้างเจล 2-3 ครั้ง บรรจุลงคอลัมน์ขนาด 1.5x100 เซนติเมตร โดยมีปริมาตรเจลเป็น 158 ml สูง 90 เซนติเมตร ปรับคอลัมน์ให้สมดุลด้วยน้ำ DI ปริมาตร 3 เท่าของปริมาตรเจลที่บรรจุ โดยใช้อัตราการไหล 20 ml/ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

นำสารที่อบแห้งแล้วซึ่งได้จากการรวบรวมหลอดที่ให้ค่าความสามารถในการดักจับอนุมูล DPPH และปริมาณสารประกอบไฮดรอลสูง ๆ จากขั้นตอนการทำคอลัมน์ Sephadex G-15 ของสารตัวอย่าง F-serum และ 1 kD-Permeate มาละลายให้มีความเข้มข้นของสารเป็น 2 g/ml เซนตริฟิวจ์ที่ 10,000 รอบ/นาที เพื่อกำจัดตะกอนส่วนที่ไม่ละลาย นำส่วนใสปริมาตร 3 ml ของแต่ละตัวอย่างมาผ่านคอลัมน์ Biogel P-2 ซะด้วยน้ำ DI ด้วยอัตราการไหล 20 ml/ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง เก็บสารตัวอย่างหลอดละ 5 ml รวบรวมหลอดที่ให้ค่าความสามารถในการดักจับอนุมูล DPPH และปริมาณสารประกอบไฮดรอลสูง ๆ เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC)

7. การเตรียมแผ่น TLC เพื่อวิเคราะห์สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ใช้หลอดคาพิลลารีจุ่มสารละลายมาหยดบนแผ่น TLC จากนั้นหย่อนแผ่น TLC aluminium sheets ซึ่งสั่งซื้อจากบริษัท Merck ชนิด silica gel 60 F₂₅₄ ขนาด 20x20 เซนติเมตรลงในภาชนะที่บรรจุไว้ด้วยสารละลายตัวทำละลายเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วย propan-1-ol : 0.2 N ammonia solution (3:1) ปิดฝาให้สนิท ติดตามผลโดยส่องดูด้วย UV lamp แล้วทำเปรียบเทียบแถบที่ได้กับสารมาตรฐาน ERT นำหลอดที่มีแถบหลักตรงกับสารมาตรฐาน ไปวิเคราะห์ต่อด้วยวิธี High performance liquid chromatography (HPLC)

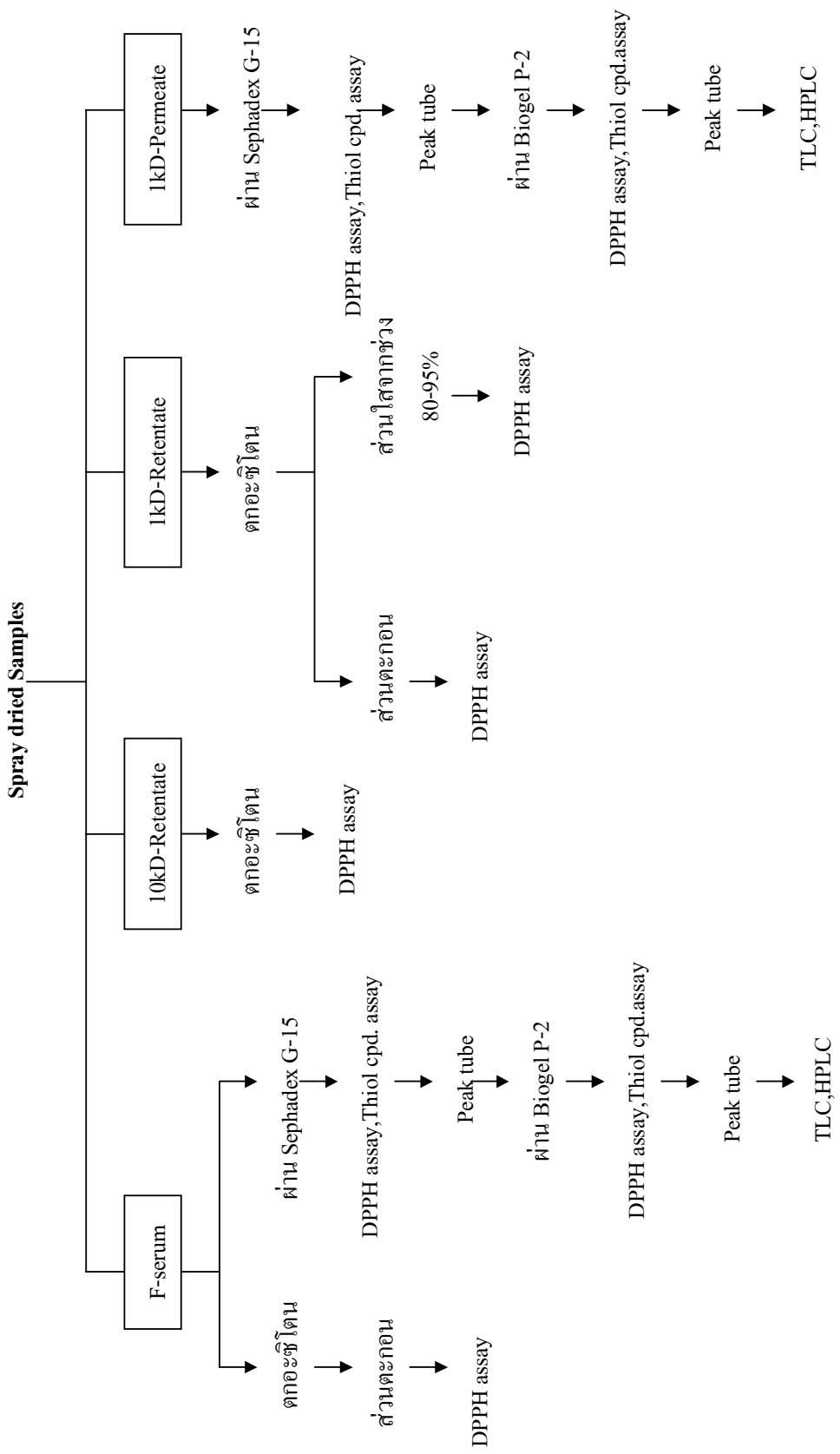
8. การวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารตัวอย่างด้วยวิธี High performance liquid chromatography (HPLC)

นำสารละลายในหลอดที่แยกได้จากการวิเคราะห์ด้วย TLC ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ERT แล้ว เห็นแถบหลักเหมือนกัน มาทำการวิเคราะห์ด้วย HPLC ตามวิธีของ

Dubost *et al.* (2006) โดยใช้คอลัมน์ C18 (ขนาด 250 mm x 4 mm) ใช้น้ำเคลื่อนที่ mobile phase ที่มี 3% acetonitrile , 0.1% triethylamine ใน 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.3 ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ทำการวัดความยาวคลื่นที่ 254 nm พร้อมเปรียบเทียบ RT ของสารที่แยกได้กับของสารมาตรฐาน ERT

9. การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนด้วยวิธี Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

นำผง 1 kD-Permeate 0.1 g ละลายด้วย 0.05 M HCl:Ethanol (1:1, v/v) ปริมาตร 0.5 ml แล้วนำไปปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์ด้วยวิธี LC-MS/MS ตามวิธีของ Thiele *et al.*, 2008 ทำการเปรียบเทียบกับกรดอะมิโนมาตรฐาน โดยใช้เครื่อง liquid chromatography-mass spectrometer ของบริษัท Agilent 1100 series เครื่อง mass spectrometer ใช้ mode ESI positive ส่วนวิธี liquid chromatography ใช้อุปกรณ์และระบบดังนี้ column ใช้ Phenomenex Luna SCX 100 A° 150 mm x 2.0 mm ฉีดสารตัวอย่างปริมาตร 20 µl ตัวเคลื่อนที่ ใช้ 30 mM ammonium acetate และ 5% acetic acid อัตราการไหล 0.2 ml/min ใช้น้ำเคลื่อนที่แบบ gradient เริ่มนาทีที่ 0-42 ใช้ 30 mM ammonium acetate : 5% acetic acid (12.5:87.5) หลังจากนั้นเปลี่ยนระบบเป็น 30 mM ammonium acetate เป็นเวลา 19 นาที แล้วเปลี่ยนกลับไปใช้ระบบแรกอีกเป็นเวลา 10 นาที



รูปที่ 12 แผนภูมิแสดงวิธีการเตรียมและศึกษาสารตัวอย่างที่เตรียมได้จากน้ำยาพารา

10. การวิเคราะห์สารตัวอย่างโดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีย้อม

10.1 การวิเคราะห์ด้วยปฏิกิริยา Ninhydrin สำหรับกลุ่มกรดอะมิโน

นำสารตัวอย่างและกรดอะมิโนมาตรฐานมาทดสอบปฏิกิริยากับ 2% ninhydrin ละลายในเอทานอล โดยหยดสารตัวอย่างบนแผ่น TLC วางในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 50 °ซ เป็นเวลา 10-15 นาที จากนั้นนำแผ่น TLC วางยึกลงในภาชนะที่บรรจุไว้ด้วยสารละลายตัวทำละลายเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วย propan-1-ol : น้ำกลั่น (7:3) (Sherma *et al.*, 1983) ปิดฝาให้สนิท รอจนสารละลายเคลื่อนที่ไปบนแผ่น TLC ห่างจากขอบบนประมาณ 1 เซนติเมตร นำออกมาจากภาชนะ วางในตู้ดูดควันให้ Solvent ระเหยจนแห้ง จากนั้นสเปรย์ด้วยสารละลาย 2% ninhydrin แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 °ซ เป็นเวลา 5 นาที (Yong and Singh, 1975) จุดสีที่เกิดขึ้น หากสารตัวอย่างเป็นกรดอะมิโน ก็ สามารถทำปฏิกิริยากับสารละลาย Ninhydrin ให้สารประกอบที่มีสีชมพู ม่วง หรือน้ำเงินเกิดขึ้น

10.2 การวิเคราะห์ด้วยปฏิกิริยา DPPH สำหรับสารต้านอนุมูลอิสระ

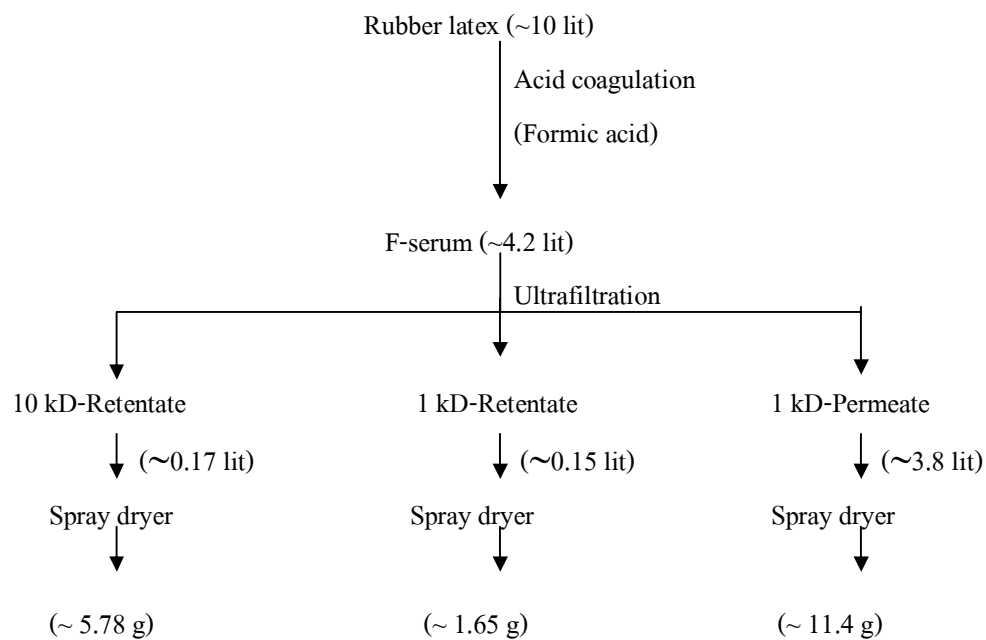
นำสารตัวอย่างและกรดอะมิโนมาตรฐานมาทดสอบปฏิกิริยากับ 0.1% 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ซึ่งละลายอยู่ในเมทานอล โดยประยุกต์วิธีการจาก Cuendet *et al.*, (2002) โดยหยดสารตัวอย่างบนแผ่น TLC วางในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 50 °ซ เป็นเวลา 10-15 นาที จากนั้นนำแผ่น TLC วางยึกลงในภาชนะที่บรรจุด้วยสารละลายตัวทำละลายเคลื่อนที่ซึ่งประกอบด้วย chloroform : methanol : น้ำกลั่น (63:7:3) ปิดฝาให้สนิท รอจนตัวทำละลายเคลื่อนที่เคลื่อนที่บนแผ่น TLC ห่างจากขอบบนประมาณ 1 เซนติเมตร นำออกมาจากภาชนะ วางในตู้ดูดควันให้ Solvent ระเหยจนแห้ง จากนั้นสเปรย์ด้วยสารละลาย DPPH อบที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 10 นาทีจุดสีที่เกิดขึ้น หากสารตัวอย่างมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ ก็ สามารถทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH ให้สารประกอบสีเหลืองบนพื้นหลังสีม่วง

บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. ผลการเตรียมสารตัวอย่างจากน้ำยางพารา

น้ำยางสดพันธุ์ RRIM 600 ปริมาตร 10 ลิตร เมื่อเหนียวนำไปจับตัวเป็นก้อนด้วยกรดฟอร์มิก แล้วเก็บส่วนเซรัมไซ (F-serum) ได้ประมาณ 4.2 ลิตร เมื่อนำมากรองผ่านเครื่องอัลตราฟิลเตรชัน โดยใช้เมมเบรนที่มี MWCO ขนาด 10 kD ตามด้วย 1 kD ได้สารละลายสีเหลืองใสหรือเซรัม 3 ส่วน คือ 10 kD-Retentate (~0.17 lit), 1 kD-Retentate (~0.15 lit) และ 1 kD-Permeate (~3.8 lit) และเมื่อนำเซรัมที่ได้ไปผ่านเครื่อง spray dryer จะได้สารตัวอย่างแห้งซึ่งมีลักษณะเป็นผงสีขาวไปจนถึงสีน้ำตาลเข้ม ในปริมาณ 5.78, 1.65 และ 11.4 g ตามลำดับ ดังแผนภูมิในรูปที่ 13



รูปที่ 13 แผนภูมิแสดงการเตรียมสารตัวอย่างเซรัมชนิดต่าง ๆ

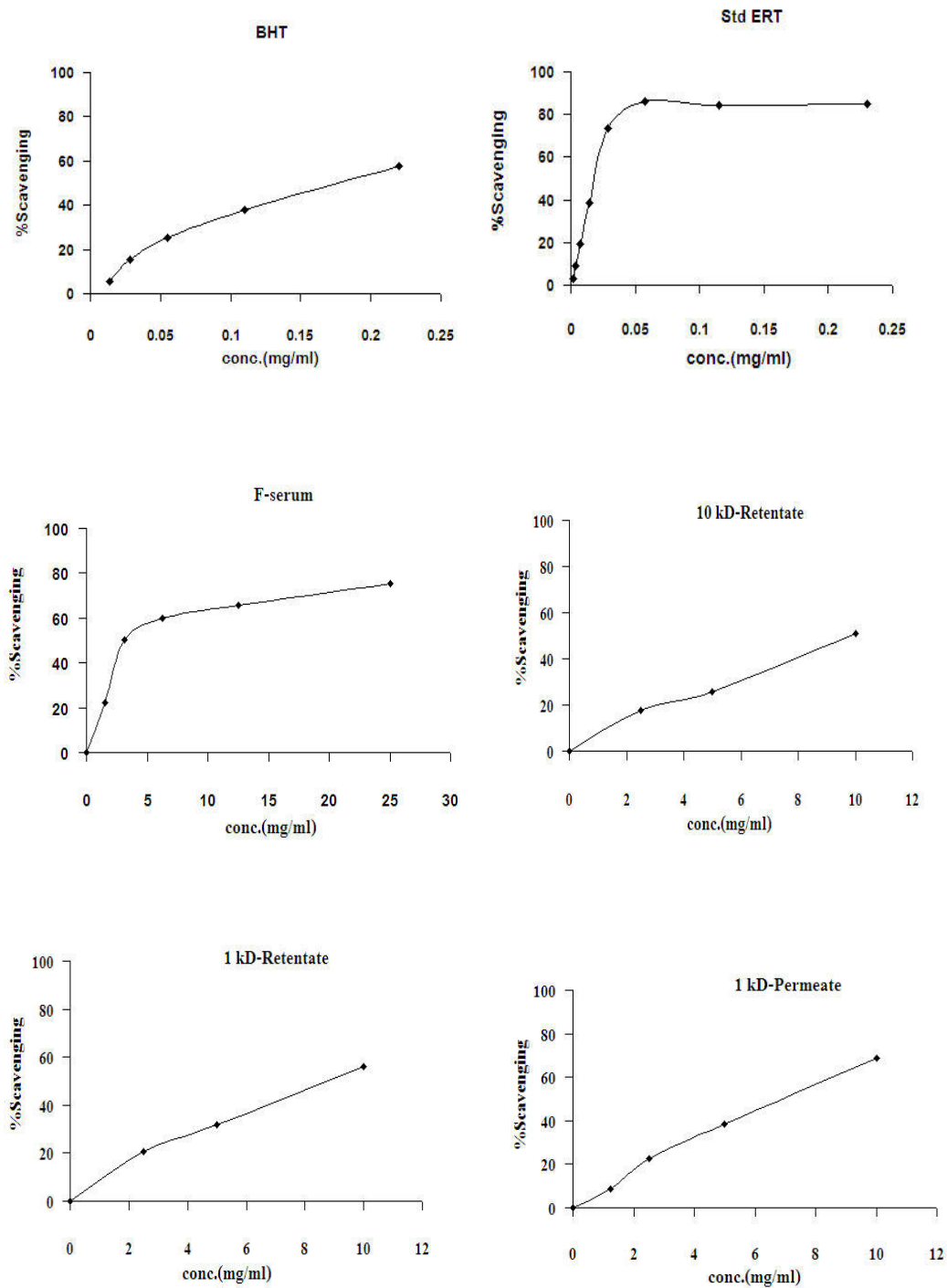
2. ผลการทดสอบความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ของสาร

ตัวอย่างเซรั่มส่วนต่าง ๆ

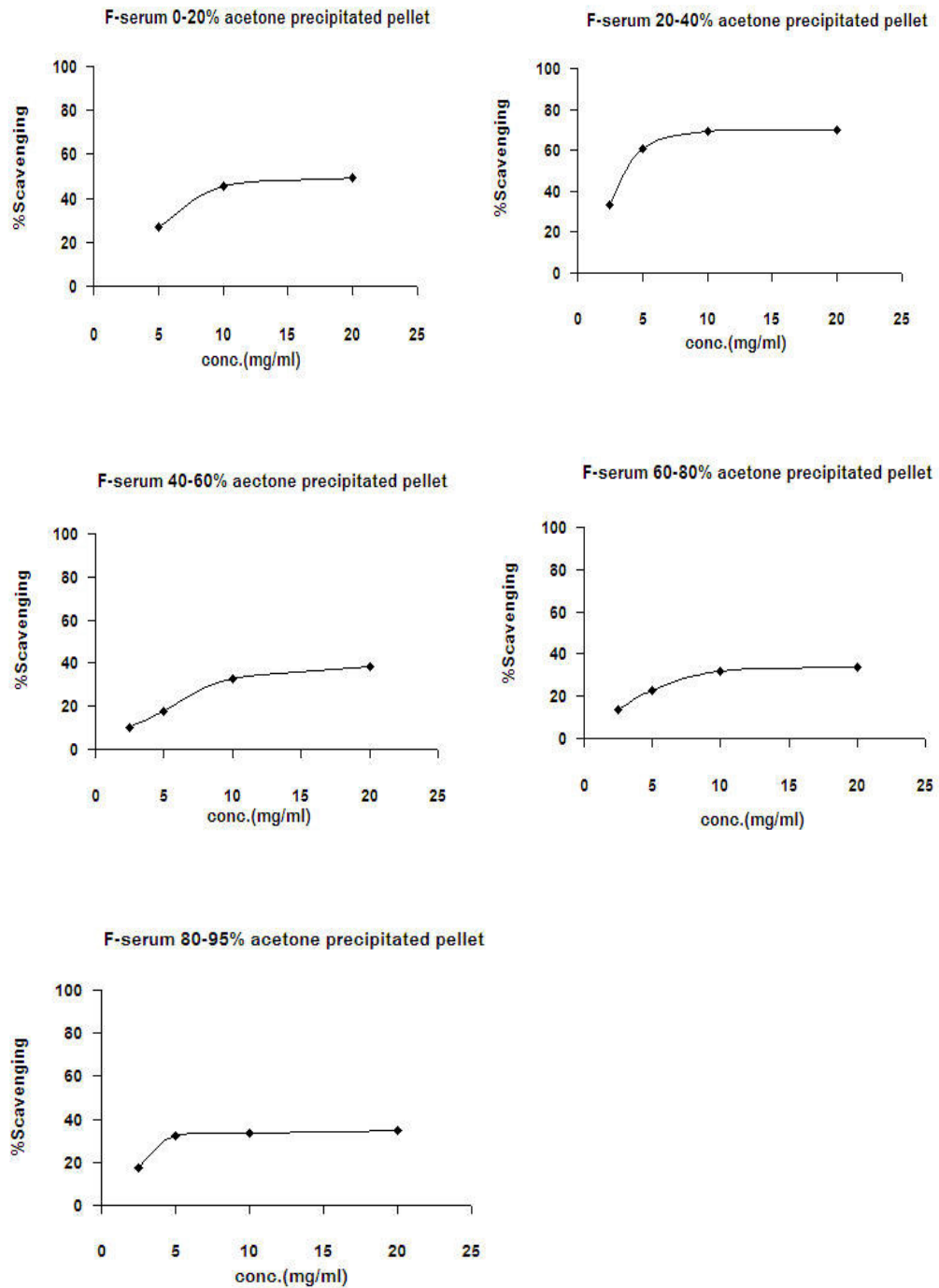
ในการทดสอบหาค่าความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ ได้นำสารตัวอย่างจากทุกส่วนที่เตรียมได้มาทดสอบ เพื่อดูผลเบื้องต้นแล้วนำไปใช้ในการพิจารณาว่าควรจะนำสารสกัดส่วนใดไปทำบริสุทธิ์ต่อ จากผลการทดลองทั้งหมดปรากฏว่าสารละลายจากสารสกัดในรูปผงแห้งส่วนใหญ่ ซึ่งได้แก่ ผง F-serum, 10 kD-Retentate, 1 kD-Retentate, 1 kD-Permeate สามารถดักจับอนุมูล DPPH ได้ดี มีค่า IC_{50} ไม่เกิน 9.00 mg/ml (ตารางที่ 7, รูปที่ 14) ในขณะที่ตะกอนที่ละลายได้จากวิธีการตกอะซิโตนในช่วงต่าง ๆ ของผง F-serum และ 1 kD-Retentate ส่วนใหญ่ให้ค่า IC_{50} สูงเกินกว่า 20 mg/ml ยกเว้น F-serum ที่ตกอะซิโตนช่วง 20-40% ให้ค่า IC_{50} 3.70 mg/ml (ตารางที่ 7 รูปที่ 15-16) สำหรับสารสกัดที่แสดงฤทธิ์ด้านอนุมูล DPPH ได้ดีที่สุดได้แก่สารสกัดจากผงแห้ง F-serum โดยมีค่า IC_{50} ต่ำที่สุดคือ 2.70 mg/ml แต่ยังไม่ดีเท่ากับสารบริสุทธิ์มาตรฐาน BHT และ ERT ซึ่งให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.175 mg/ml และ 0.019 mg/ml ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลอง IC_{50} จะเห็นสารสกัดผง F-serum และ 1 kD-Permeate ให้ผลดีกว่าสารสกัดตัวอย่างส่วนอื่น ๆ (รูปที่ 17)

ตารางที่ 7 แสดงค่า IC_{50} ของสารสกัดแต่ละชนิด

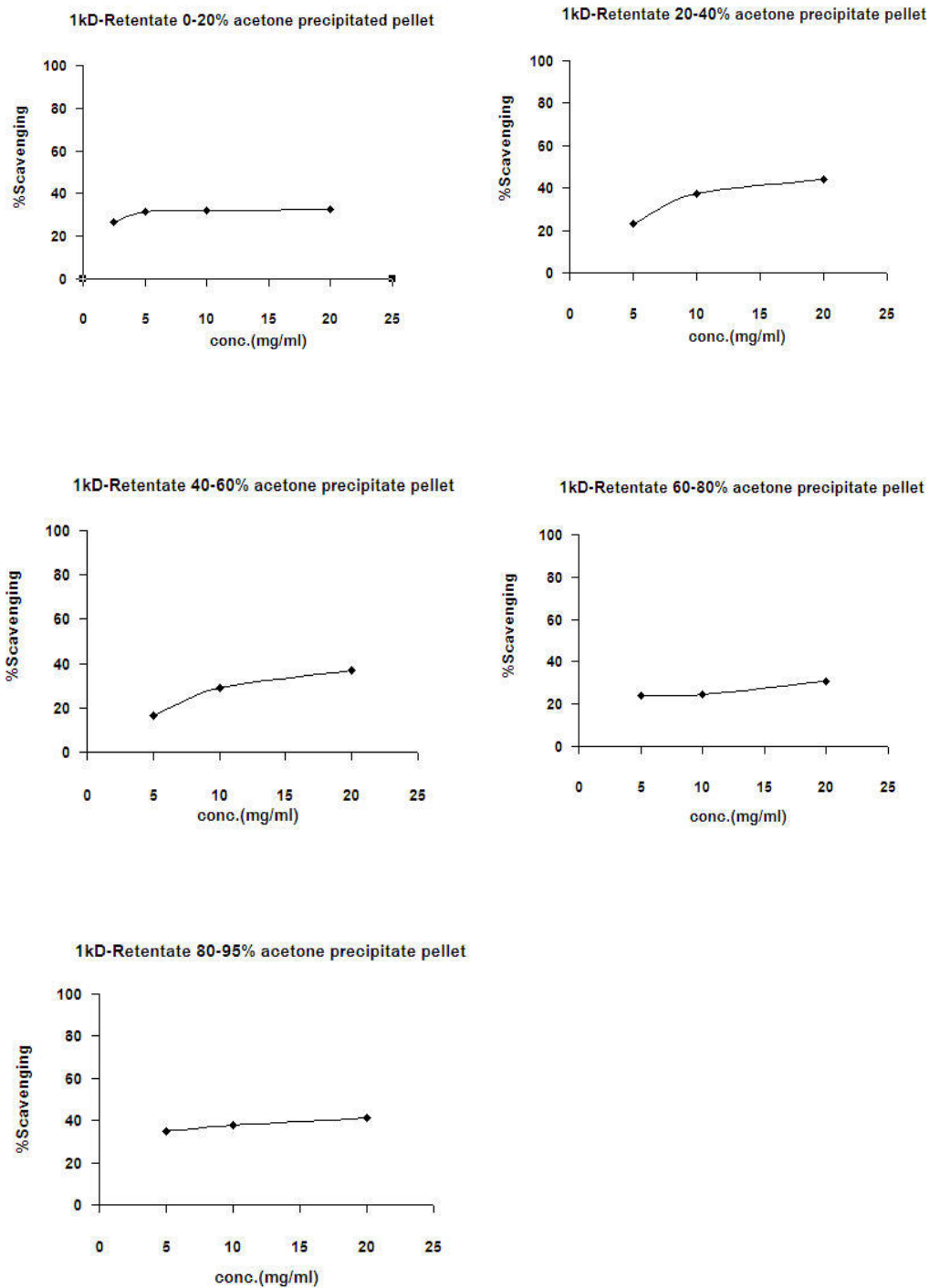
สารสกัด	IC_{50} (mg/ml)
F-serum	2.70
10 kD-Retentate	8.70
1 kD-Retentate	7.10
1 kD-Permeate	6.90
F-serum acetone pellets (0-20%, 40-60%, 60-0%, 80-95%)	>20
F-serum acetone pellet - 20-40%	3.70
1 kD-Retentate acetone pellets (0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, 80-95%)	>20



รูปที่ 14 ความสามารถดักจับอนุมูล DPPH ของสารมาตรฐาน ERT, BHT และ ของสารตัวอย่าง เซรัมแบบผงแห้งแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ

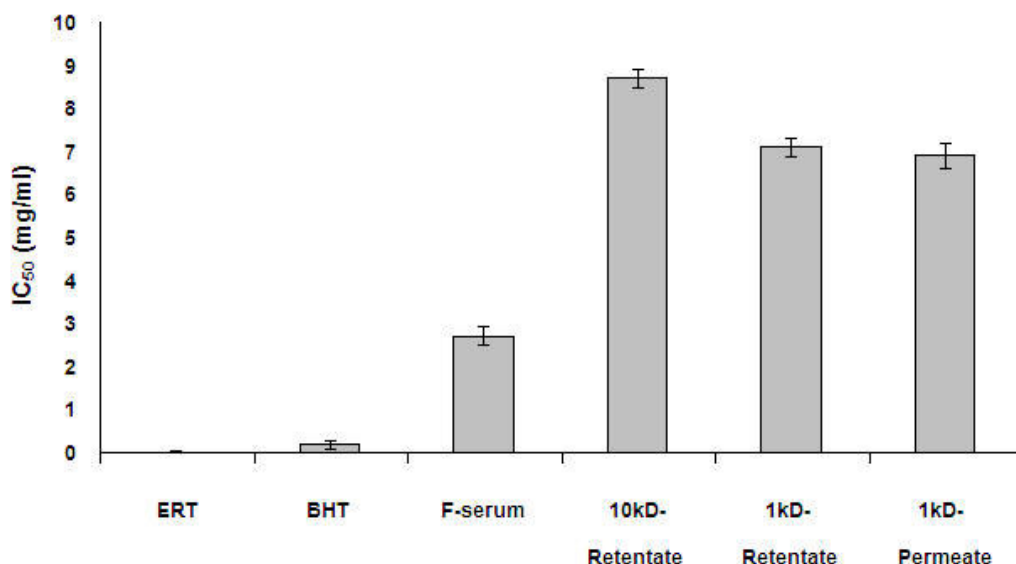


รูปที่ 15 ความสามารถดักจับอนุมูล DPPH ของ F-serum ตกตะกอนที่ความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 16 ความสามารถดักจับอนุมูล DPPH ของ 1kD-Retentate ตกตะกอนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

จากข้อมูลในตารางที่ 7 เมื่อนำค่า IC_{50} ของสารสกัดแต่ละชนิดมาเปรียบเทียบกับสารควบคุมในรูปแบบกราฟแท่ง จะทำให้เห็นค่าการเปรียบเทียบที่ชัดเจนขึ้น (รูปที่ 17)



รูปที่ 17 แผนภูมิแท่งเปรียบเทียบค่า IC_{50} ของสารตัวอย่างแต่ละชนิด

(หมายเหตุ ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ($\bar{x} \pm S.D.$) จากการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง)

3. ผลการหาปริมาณสารประกอบไฮออล รวมทั้ง ERT ในสารสกัดน้ำยางพารา

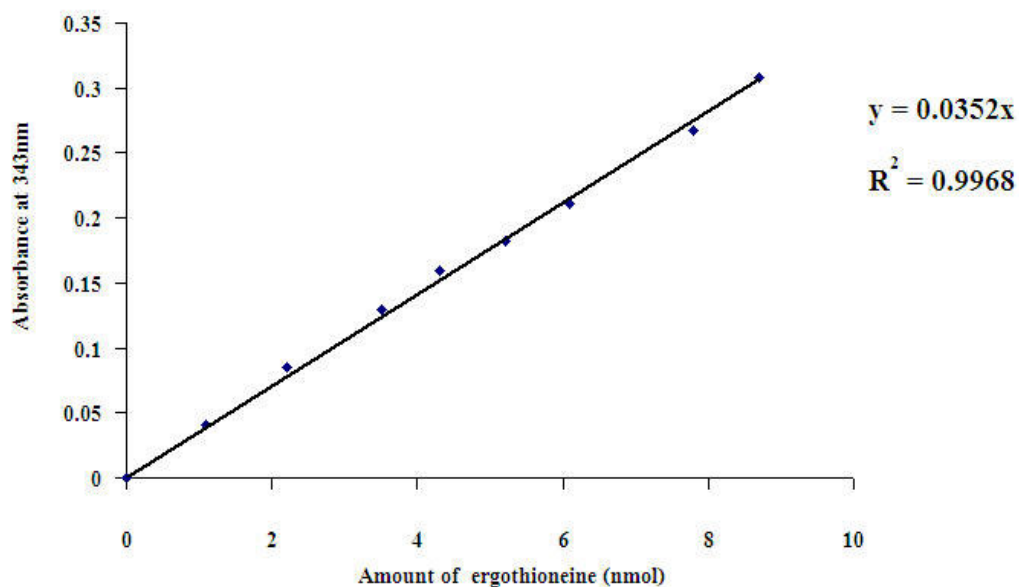
สารตัวอย่างจากน้ำยางพาราในส่วนต่าง ๆ จากการเตรียมทั้ง 3 วิธี คือ ส่วนผงแห้ง F-serum, 10 kD-Retentate, 1 kD-Retentate และ 1 kD-Permeate นำมาละลายด้วยน้ำ DI ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 20 mg/ml วัดปริมาณสารประกอบไฮออล ได้ในช่วง 2-4, 0.07-0.30, 0.18-0.83, 1.4-2 mg/g dry weight ตามลำดับ (ตารางที่ 8)

เมื่อนำส่วนผงแห้ง F-serum และ 1 kD-Retentate มาตกตะกอนด้วยอะซิโตนช่วงต่าง ๆ แล้วนำตะกอนทั้งหมดไปทำแห้ง จากนั้นละลายด้วยน้ำ DI ให้มีความเข้มข้น 20 mg/ml แล้วทำการวัดปริมาณสารประกอบไฮออล (ตารางที่ 8) ได้ค่าอยู่ในช่วงระหว่าง 0.12-0.53 และ 0.18-0.37 mg/g dry weight ตามลำดับ

นอกจากนั้นส่วน supernatant หลังจากการตกตะกอนด้วย acetone ช่วง 80-95% ของ 1 kD-Retentate ซึ่งเป็นสารละลายใสสีขาอ่อนจนถึงเข้ม ขึ้นอยู่กับสีของผง 1 kD-Retentate ที่

นำมาสกัดตอนแรก เมื่อนำไประเหยส่วน acetone และน้ำออก จนสารส่วนที่เหลือเกือบแห้งแล้ว นำไปอบต่อที่อุณหภูมิ 60 °ซ วางทิ้งไว้ในโถดูดความชื้นแบบสุญญากาศ เป็นเวลา 1 วัน จากนั้น ละลายตะกอนด้วยน้ำ DI ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 20 mg/ml สามารถวัดปริมาณสารประกอบไธออล ได้เท่ากับ 0.37 mg/g dry weight (ตารางที่ 8)

จากผลการทดลองนี้พบว่าสารสกัดส่วนผงแห้ง ส่วนใหญ่ให้ปริมาณสารประกอบไธออลสูงกว่าสารสกัดส่วนที่ตกตะกอนและส่วน supernatant หลังจากการตกตะกอนด้วย acetone ช่วง 80-95% โดยผง F-serum ให้ค่าปริมาณสารประกอบไธออลมากที่สุด ปริมาณสารที่ได้นั้น มาจากการเทียบเท่าปริมาณ ERT โดยใช้วิธีนำ ERT ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (2.5-200 μ M) มาร่วมวิเคราะห์ในกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 18)

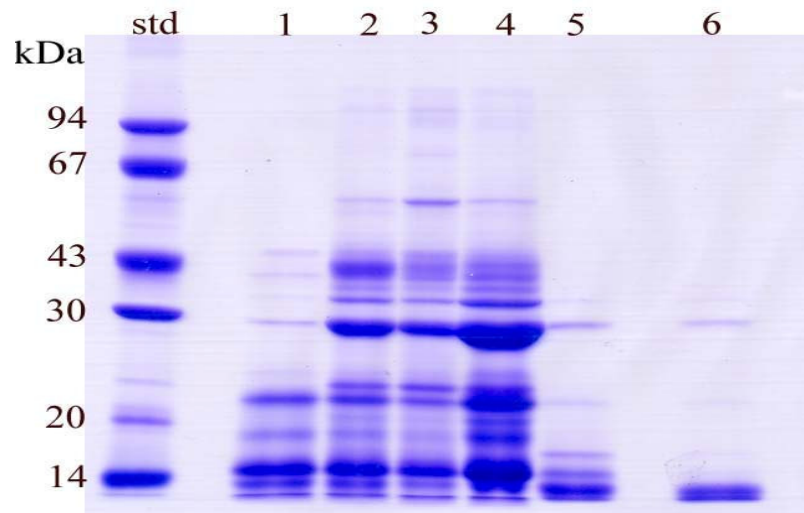


รูปที่ 18 กราฟมาตรฐานของ ERT ที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณสารไธออลในสารสกัด

ตารางที่ 8 ปริมาณสารไซโอลในสารสกัดแต่ละชนิด

สารตัวอย่าง	น้ำหนักตะกอนแห้ง(g)	ปริมาณสารไซโอล (mg/g dry weight)
ส่วน spray dried	-	
F-serum	-	2.00-4.00
10 kD-Retentate	-	0.07-0.30
1 kD-Retentate	-	0.18-0.83
1 kD-Permeate	-	1.40-2.00
F-serum ส่วน acetone precipitate *		
0-20% Acetone precipitated pellet	0.1153	0.28
20-40% Acetone precipitated pellet	0.4612	0.12
40-60% Acetone precipitated pellet	5.7282	0.32
60-80% Acetone precipitated pellet	1.7833	0.23
80-95% Acetone precipitated pellet	1.2256	0.53
1 kD-Retentate ส่วน acetone precipitate **		
0-20% Acetone precipitated pellet	0.0961	0.37
20-40% Acetone precipitated pellet	0.4243	0.18
40-60% Acetone precipitated pellet	6.7872	0.32
60-80% Acetone precipitated pellet	1.8756	0.23
80-95% Acetone precipitated pellet	1.3216	0.28
Supernatant obtained after 80-95% Acetone precipitation of 1 kD-Retentate	1.3885	0.37

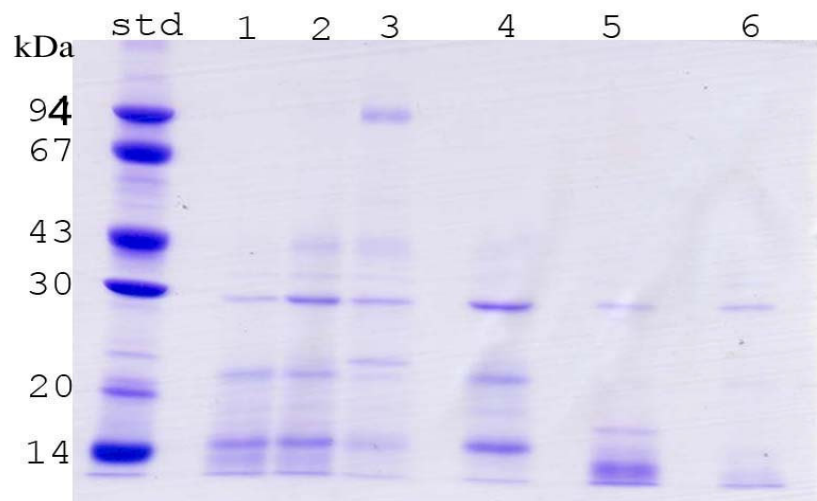
*, ** ผลแสดงลักษณะโปรตีนบน SDS-PAGE ดังรูปที่ 19, 20



รูปที่ 19 แลบบรตีน SDS-PAGE ที่ได้จากการตกตะกอนอะซิโตนผง F-serum

ช่องที่1 ผง F-serum ก่อนตกอะซิโตน

ช่องที่ 2-6 F-serum หลังตกอะซิโตนช่วง 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, 80-95%



รูปที่ 20 แลบบรตีน SDS-PAGE ที่ได้จากการตกตะกอนอะซิโตนผง 1 kD-Retentate

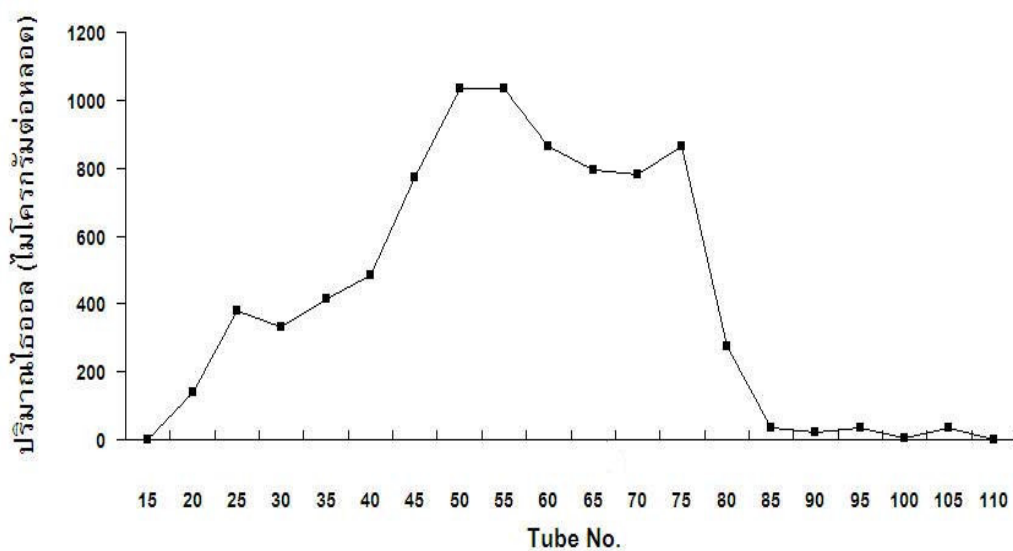
ช่องที่1 ผง 1 kD-Retentate ก่อนตกอะซิโตน

ช่องที่ 2-6 1 kD-Retentate หลังตกอะซิโตนช่วง 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, 80-95%

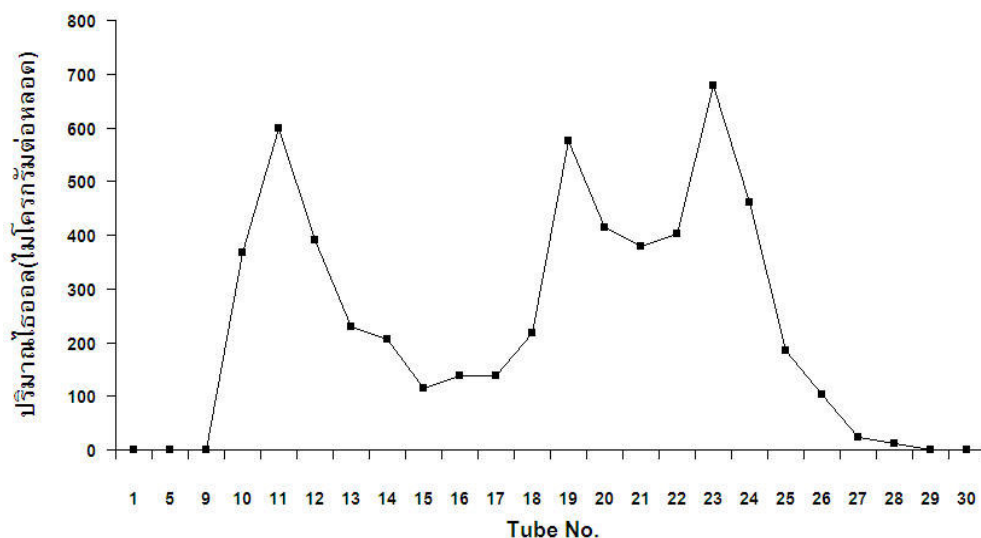
4. การทำบริสุทธิ์และวิเคราะห์ปริมาณสาร ERT

4.1 การทำบริสุทธิ์สาร ERT จากผงแห้ง F-serum

เนื่องจากส่วนของสารสกัดจาก F-serum รูปของผงแห้ง พบว่ามีสารไธออลอยู่ในช่วง 2-4 mg/g dry weight (ตารางที่ 8) และให้ค่า IC_{50} ต่ำที่สุดคือ 2.70 mg/ml (ตารางที่ 7) จึงนำสารที่ได้ส่วนนี้ไปแยกผ่านคอลัมน์ที่บรรจุด้วยเจล Sephadex G-15 ซึ่งสามารถแยกสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ (หลอดที่ 15-49) ออกไปได้บางส่วน (รูปที่ 21) แล้วรวบรวมหลอดที่ 50 ถึงหลอดที่ 70 ทำแห้งโดยอบที่อุณหภูมิ 60 °ซ พบว่ามีปริมาณสารไธออลประมาณ 2.04 mg/g dry weight ไปทำการแยกต่อด้วยคอลัมน์ Biogel P-2 สามารถแยกกลุ่มสารไธออลได้เป็นสามพีค (รูปที่ 22)

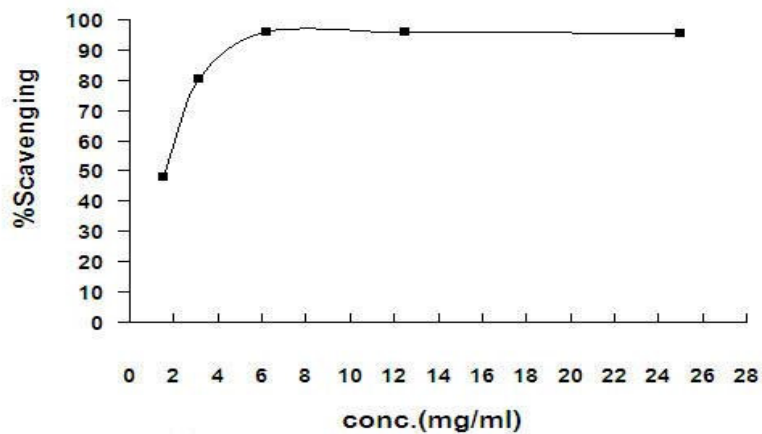


รูปที่ 21 การแยกกลุ่มสารไธออลของผง F-serum ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-15



รูปที่ 22 การแยกกลุ่มสารคอเลสเตอรอลของผง F-serum ที่รวบรวมได้จากคอลัมน์ Sephadex G-15 ผ่านคอลัมน์ Biogel P-2

จากนั้นรวบรวมหลอดต่าง ๆ บริเวณพีคที่ให้ปริมาณสารคอเลสเตอรอลสูง ๆ (รูปที่ 22) ซึ่งได้แก่ หลอดที่ 10-13, หลอดที่ 18-21 และหลอดที่ 22-24 ทำให้แห้งโดยอบที่อุณหภูมิ 60 °ซ วางทิ้งไว้ในโถดูดความชื้นแบบสุญญากาศเป็นเวลา 1 วัน แล้วละลายให้มีความเข้มข้นเป็น 25 mg/ml ทุก ๆ ตัวอย่างก่อนทำการวิเคราะห์หาค่า IC_{50} ในการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH (ตารางที่ 9) ผลที่ได้พบว่าสารที่รวบรวมจากพีคที่ 1 (หลอดที่ 10-13) และพีค 2 (หลอดที่ 18-21) มีค่า IC_{50} สูงกว่า 25 mg/ml ส่วนที่รวบรวมจากพีคที่ 3 (หลอดที่ 22-24) มีค่า IC_{50} ประมาณ 1.60 mg/ml (รูปที่ 23)

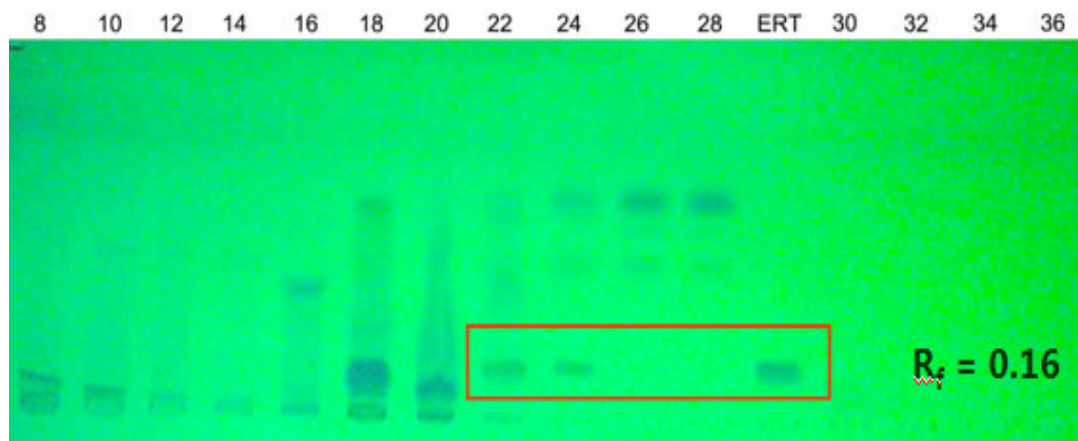


รูปที่ 23 กราฟการวิเคราะห์หาค่า IC_{50} ของสารผสมที่รวบรวมจากพีคที่ 3 (หลอดที่ 22- 24)

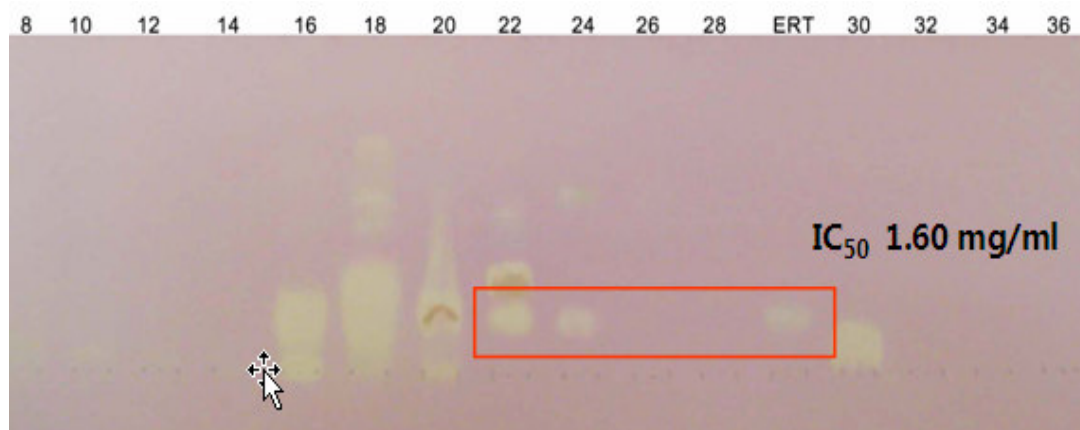
ตารางที่ 9 แสดงค่า IC_{50} ของผง F-serum จากขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Biogel P-2

หลอด	IC_{50} (mg/ml)
10-13	สูงกว่า 25
18-21	สูงกว่า 25
22-24	1.60

นำสารละลายจากหลอดต่าง ๆ ในแต่ละฟลักไปวิเคราะห์ต่อด้วยวิธี TLC แล้วย้อมด้วยสารละลาย ninhydrin โดยสุ่มเว้นไปที่ละ 2 หลอด ทำเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ERT พบว่าหลอดที่ 22, 24 มีแถบหลักที่ตรงกับสารมาตรฐานมีค่า $R_f = 0.16$ (รูปที่ 24) และเมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระด้วยการเกิดปฏิกิริยาสีเชื่อมกับสารละลาย DPPH ก็ปรากฏผลเป็นแถบสีเหลืองบนพื้นม่วง ในหลอดที่ 16-24 และมีส่วนของแถบที่ตรงกับสารมาตรฐาน ERT (รูปที่ 24) และยังพบว่ามีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดี (รูปที่ 25) แสดงว่าสารละลายในหลอดดังกล่าวน่าจะมี ERT

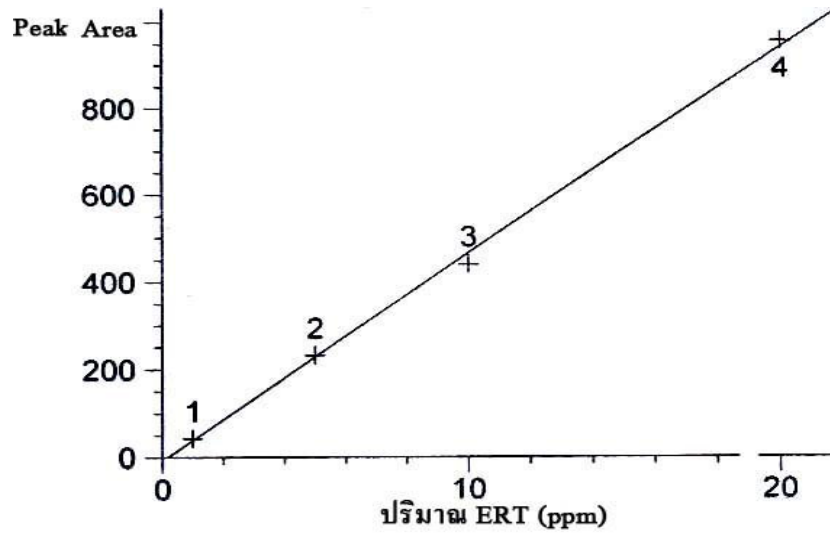


รูปที่ 24 การวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC ของผง F-serum จากฟลักที่ผ่านคอลัมน์ Biogel P-2 เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ERT ติดตามผลภายใต้แสง UV (ตัวเลขบนรูปแสดงลำดับของหลอด)

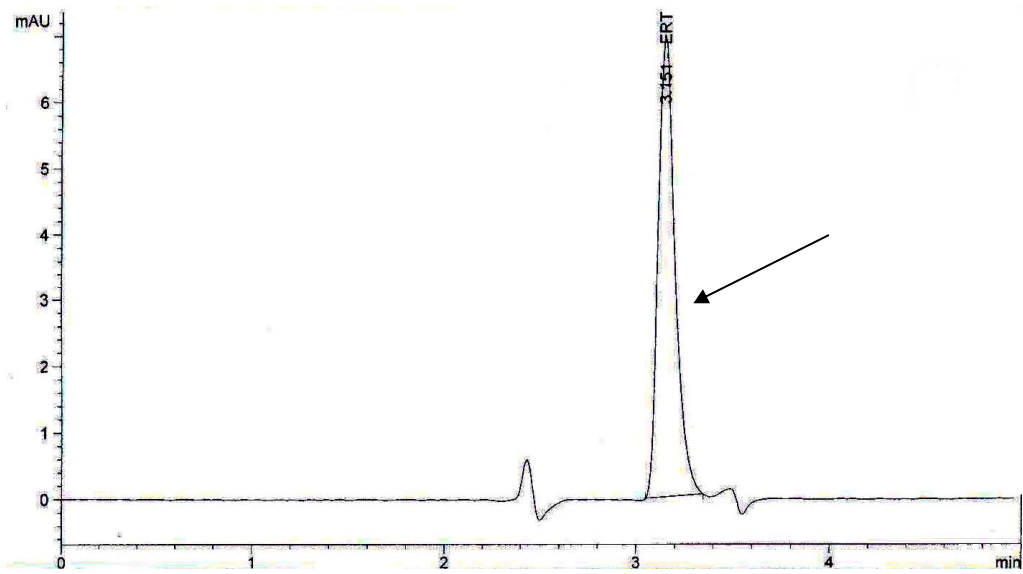


รูปที่ 25 การวิเคราะห์ความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระด้วยวิธี TLC ของผง F-serum จากพืชที่ผ่านคอลัมน์ Biogel P-2 และสารมาตรฐาน ERT ติดตามผล โดยการย้อมด้วยสารละลาย DPPH (ตัวเลขบนรูปแสดงลำดับของหลอด)

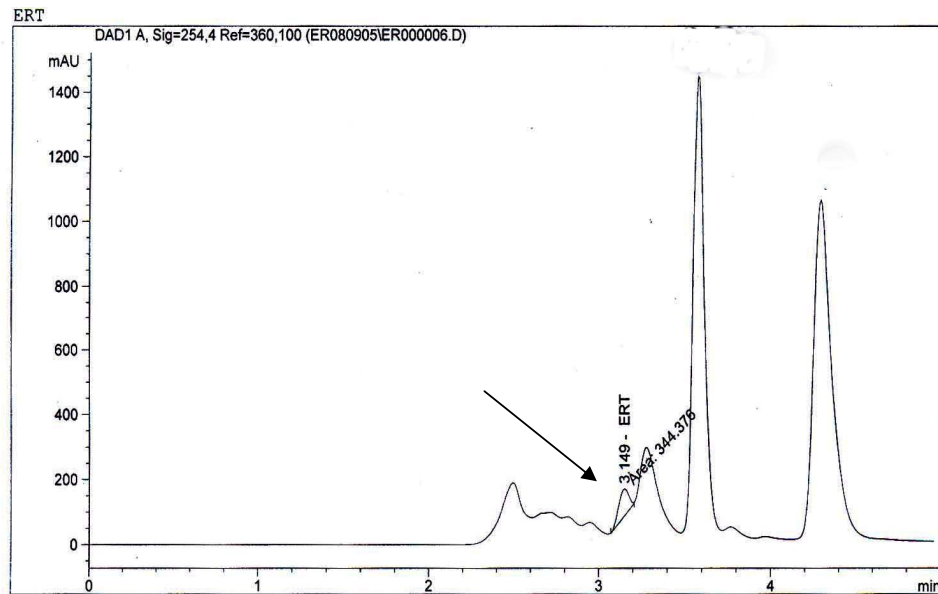
จากผลการวิเคราะห์ด้วย TLC พืชที่ 3 (หลอด 22-24) มีแถบหลักที่ตรงกับสารมาตรฐาน ERT และมีค่า IC_{50} ต่ำ พร้อมกับมีปริมาณสารไฮออกซิลสูง จึงได้นำพืชนี้ไปวิเคราะห์ต่อกับ HPLC โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ERT กับพื้นที่ใต้พีค ดังแสดงในรูปที่ 26 จากกรวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC นั้นพีคที่แสดง ERT จะมีค่ารีเทนชันไทม์ (retention time, T_R) ประมาณ 3.14-3.15 นาที ทราบได้จากการฉีดสารที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จะได้พีคที่มีพื้นที่เพิ่มขึ้นเช่นกัน โดยที่พีคอื่น ๆ มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย แสดงตัวอย่างดังรูปที่ 27 ซึ่งเป็น โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้น $10 \mu\text{g/ml}$ และเมื่อฉีดสารตัวอย่างวิเคราะห์ปรากฏว่าสารตัวอย่างดังกล่าวให้พีคที่มี retention time (เท่ากับ 3.149) ที่ตรงกับของสารมาตรฐาน ERT (รูปที่ 28) เมื่อทำการคำนวณหาปริมาณด้วยการเปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน ERT ค่าที่ได้จากการคำนวณหาปริมาณสาร ERT ในผงเซรัมแห้งมีค่าประมาณ $1.50 \mu\text{g/g}$ เพื่อเป็นการยืนยันผล จึงได้นำสารมาตรฐาน ERT ไปผสมกับสารละลายตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ ปรากฏว่าเห็นพีคที่มี retention time ตรงกับสารมาตรฐาน ERT สูงขึ้น (รูปที่ 29)



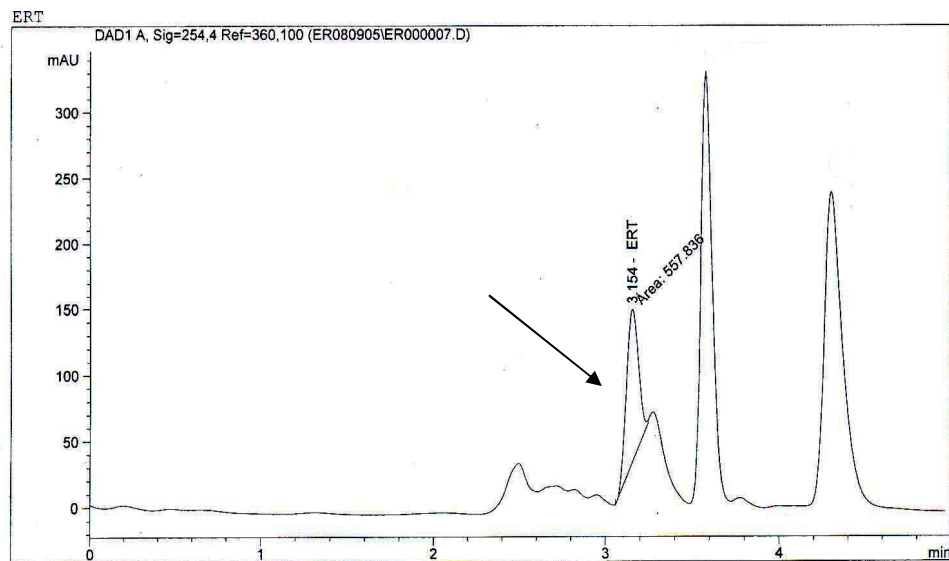
รูปที่ 26 กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ERT และพื้นที่ใต้พีค (ครั้งที่ 1)



รูปที่ 27 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน ERT จากการวิเคราะห์โดย HPLC (ครั้งที่ 1)



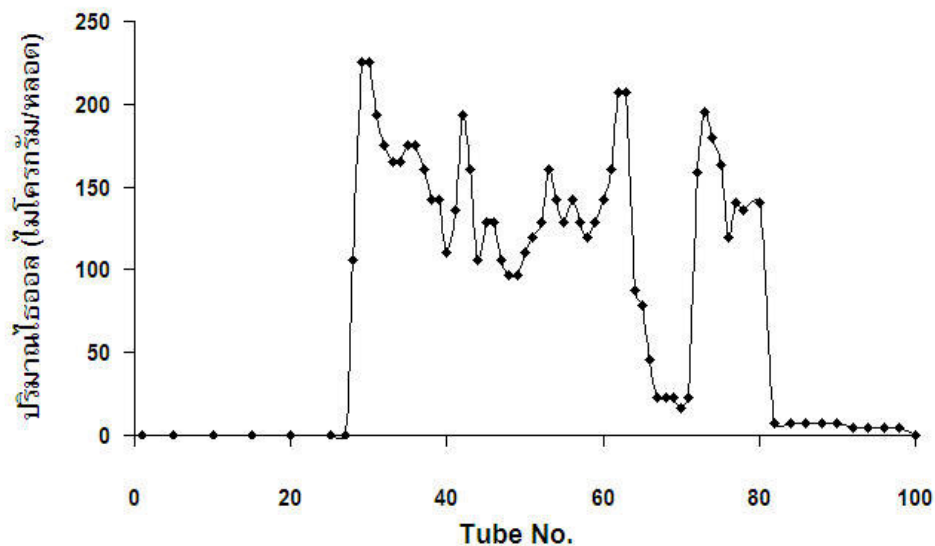
รูปที่ 28 โครมาโทแกรมของสารไซออล (ERT) ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ผง F-serum
วิเคราะห์โดย HPLC



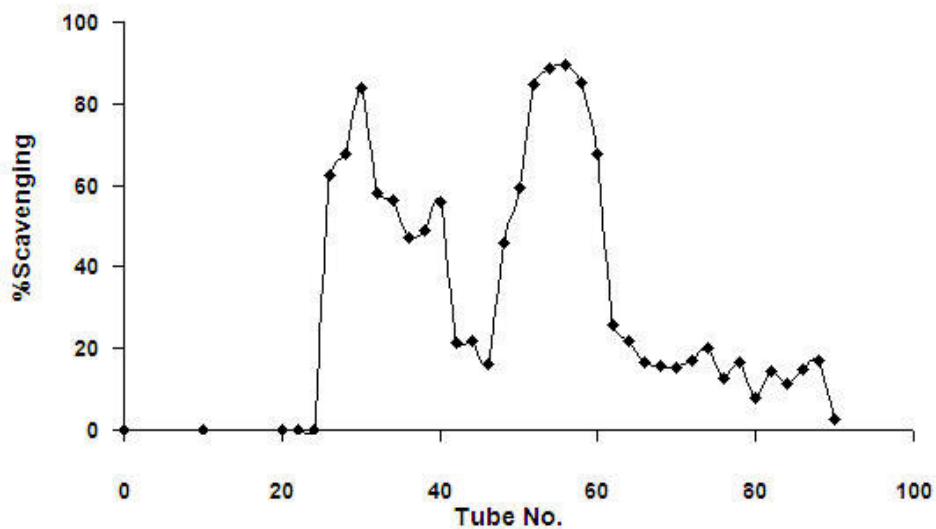
รูปที่ 29 โครมาโทแกรมของสารไซออล (ERT) หลังจากได้ผสมสารมาตรฐาน ERT ลงไป
ในสารละลายที่รวบรวมได้จากการทำบริสุทธิ์ผง F-serum ที่วิเคราะห์โดย HPLC

4.2 การทำบริสุทธิ์ ERT จากผงแห้งของ 1 kD-Permeate

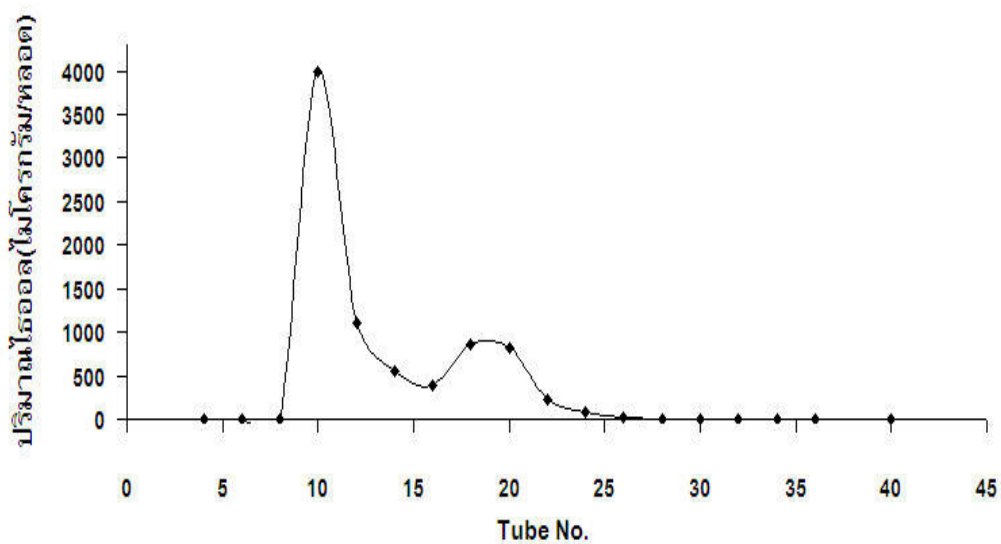
ผลการทดลองที่วิเคราะห์โดยวิธี HPLC ของการทำบริสุทธิ์สาร ERT จากผงแห้ง F-serum จะเห็นได้จากพีครูปที่ 28 ว่ายังคงมีสารอื่นปนอยู่ ผู้วิจัยจึงนำส่วนผง 1 kD-Permeate ซึ่งมีความบริสุทธิ์และมีโปรตีนอื่นปนเปื้อนน้อยกว่าผง F-serum เพราะได้กรองผ่าน membrane ที่มี MWCO ขนาด 1 kD แล้ว สารที่อยู่ในส่วนนี้จะมี MW เล็กกว่า 1 kD ซึ่ง ERT มี MW ประมาณ 229.3 คาลตัน และปริมาณสารไฮออกซินในส่วนนี้มีค่ารองจากผง F-serum (ตารางที่ 8) จึงนำผง 1 kD-Permeate มาสกัดและทำการทดลองเช่นเดียวกับวิธีที่ใช้กับผง F-serum เมื่อนำสารแยกผ่านคอลัมน์ Sephadex G-15 สามารถแยกสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ (หลอดที่ 20-49) ออกไปได้บางส่วน (รูปที่ 30) นำสารละลายในแต่ละหลอดไปวัดค่าความสามารถดักจับอนุมูล DPPH ได้ดังรูปที่ 31 เลือกรวบรวมหลอดที่ให้ปริมาณไฮออกซินและค่าความสามารถดักจับอนุมูล DPPH สูง ๆ (หลอดที่ 50 ถึงหลอดที่ 60) ทำแห้งโดยอบที่อุณหภูมิ 60 °ซ พบว่ามีปริมาณสารไฮออกซินประมาณ 1.80 mg/g dry weight ไปทำการแยกต่อด้วยคอลัมน์ Biogel P-2 สามารถแยกสารได้เป็นสองพีค (รูปที่ 32) แล้วนำสารละลายในขั้นตอนนี้แต่ละหลอดไปวัดค่าความสามารถดักจับอนุมูล DPPH ได้ผลดังรูปที่ 33



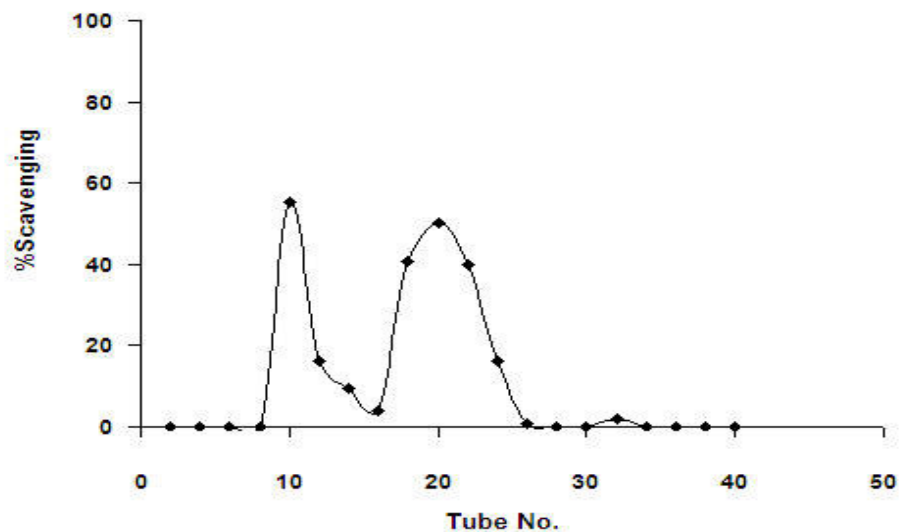
รูปที่ 30 การแยกกลุ่มสารไฮออกซินจากผง 1 kD-Permeate ด้วยคอลัมน์
Sephadex G-15



รูปที่ 31 ความสามารถดักจับอนุมูล DPPH ของผง 1 kD-Permeate ที่แยกผ่านคอลัมน์ Sephadex G-15

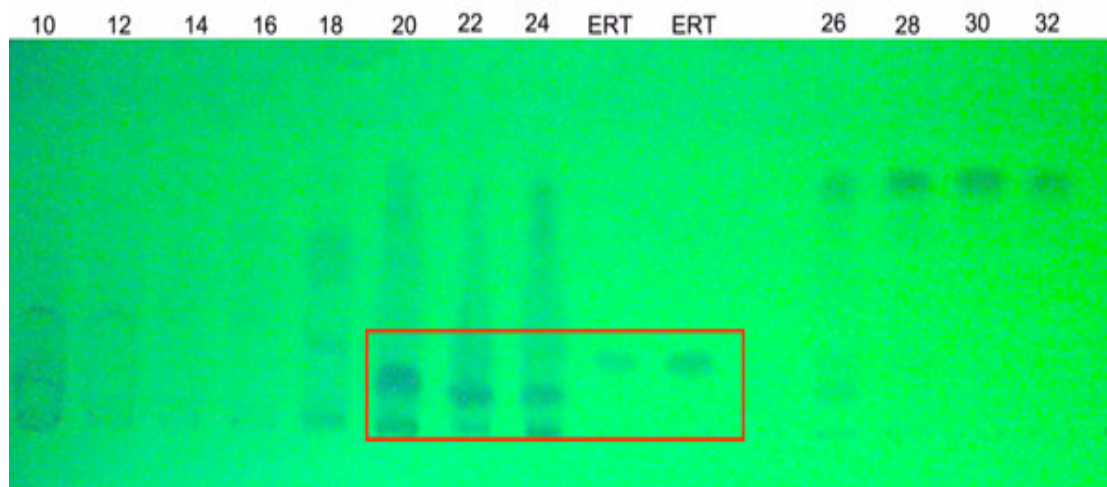


รูปที่ 32 การแยกกลุ่มสารไรเอสอลของผง 1 kD-Permeate ที่รวบรวมได้จากคอลัมน์ Sephadex G-15 ผ่านคอลัมน์ Biogel P-2

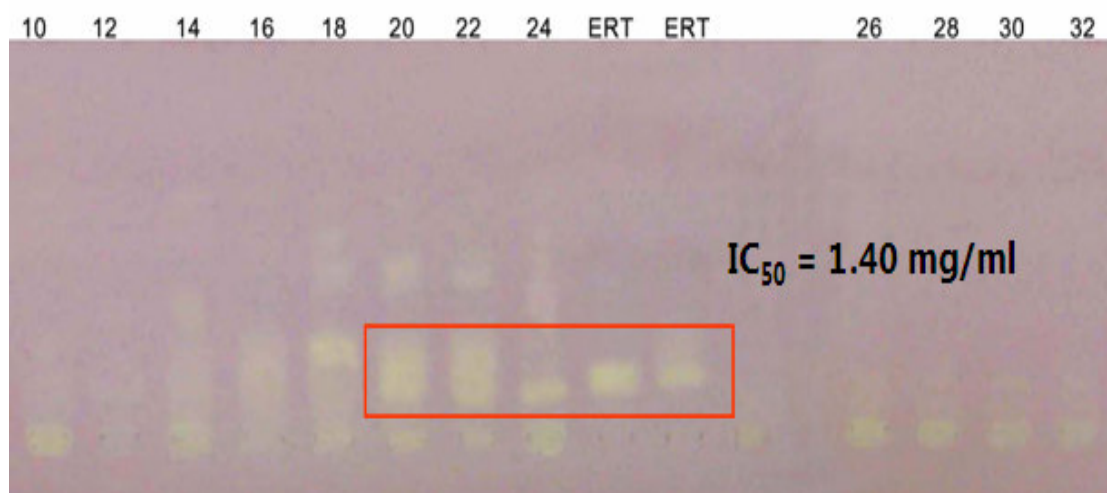


รูปที่ 33 ความสามารถดักจับอนุมูล DPPH ของผง 1 kD- Permeate หลังการแยกผ่านคอลัมน์ Biogel P-2

เมื่อเปรียบเทียบผลที่ได้จากคอลัมน์ Biogel P-2 จะเห็นว่ามียี่สิบสองพีคที่มีปริมาณไฮดรอลสูง โดยพีคแรกมีปริมาณสารไฮดรอลสูงกว่าพีคที่สอง แต่ให้ค่าความสามารถดักจับอนุมูล DPPH ใกล้เคียงกัน จึงนำสารละลายแต่ละหลอดมาวิเคราะห์ด้วย TLC แล้วเชื่อมด้วยสารละลาย ninhydrin โดยส้อมเว้นที่ละ 2 หลอด ทำเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ERT พบว่าหลอดที่ 20-24 มีแถบหลักที่ใกล้เคียงกับสารมาตรฐานมากกว่าหลอดที่ 10-18 (รูปที่ 34) และเมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระด้วยการเกิดปฏิกิริยาสีเชื่อมกับสารละลาย DPPH ก็ปรากฏผลเป็นแถบสีเหลืองบนพื้นม่วงในหลอดที่ 14-24 และมีส่วนของแถบที่ตรงกับสารมาตรฐาน ERT (รูปที่ 35) คือในช่วงหลอดที่ 20-24 และให้แถบสีเหลืองเข้มกว่าหลอดอื่น ๆ

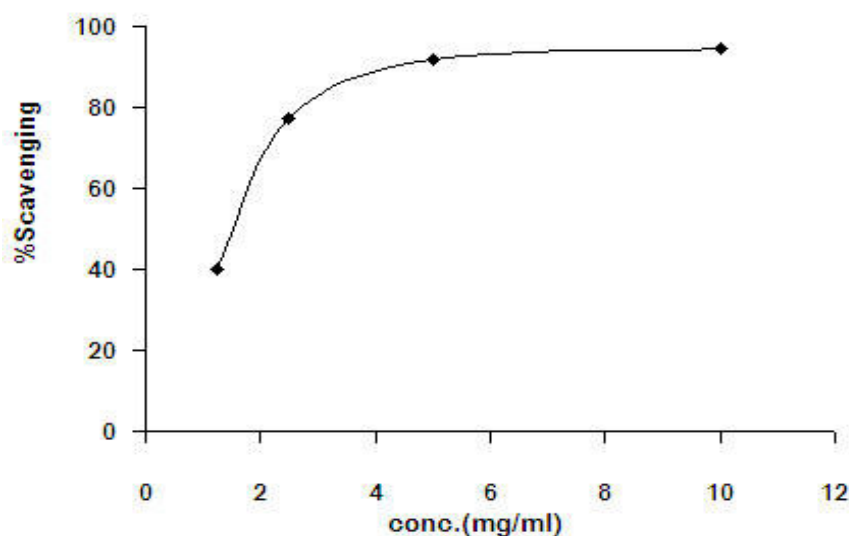


รูปที่ 34 การวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC ของผง 1 kD-Permeate จากพืชที่ผ่านคอลัมน์ Biogel P-2 เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ERT ติดตามผลภายใต้แสง UV (ตัวเลขบนรูปแสดงลำดับของหลอด)

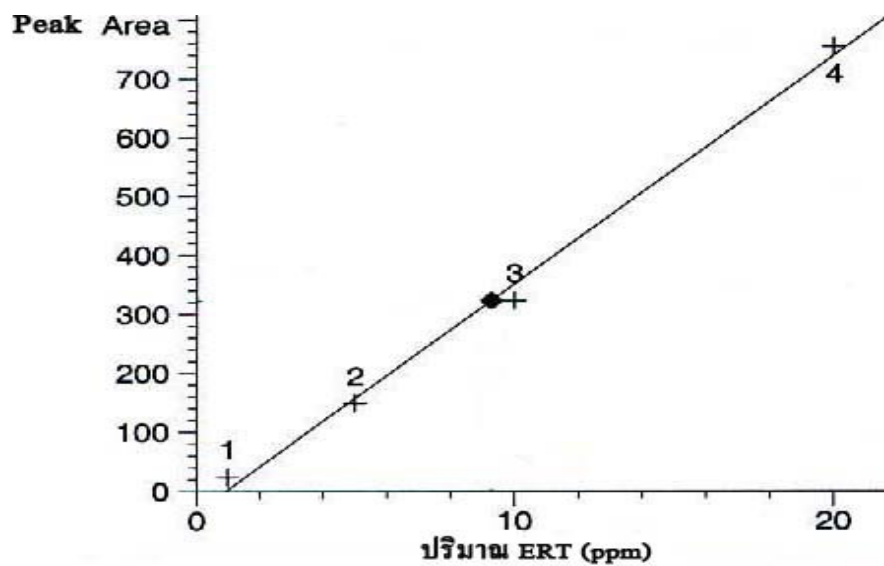


รูปที่ 35 การวิเคราะห์ความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระด้วยวิธี TLC ของผง 1 kD-Permeate จากพืชที่ผ่านคอลัมน์ Biogel P-2 และสารมาตรฐาน ERT ติดตามผลโดยการย้อมด้วยสารละลาย DPPH (ตัวเลขบนรูปแสดงลำดับหมายเลขหลอด)

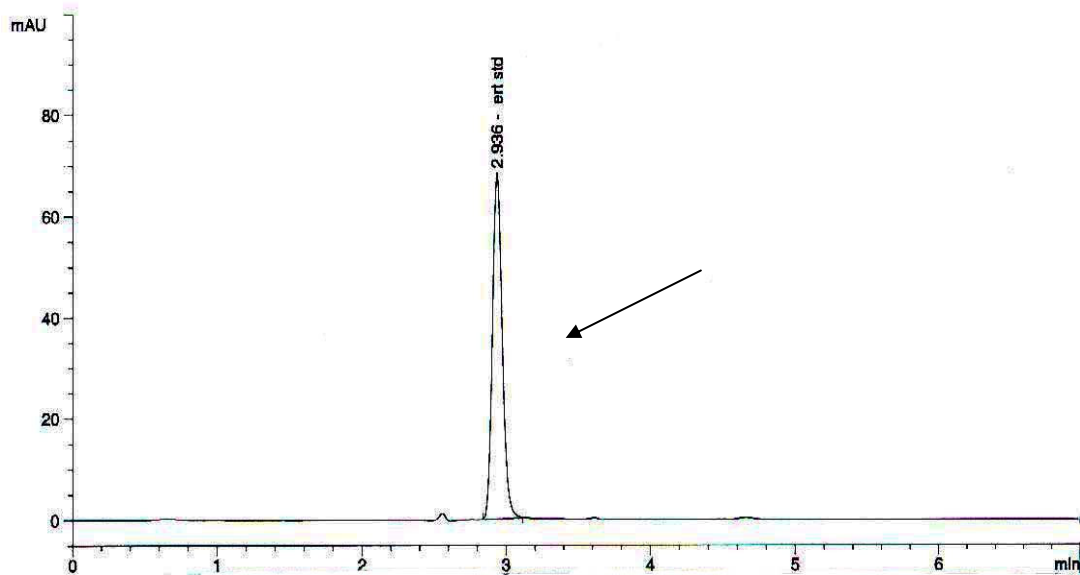
จากผลการวิเคราะห์ TLC จึงรวบรวมหลอด 20-24 (พีคที่ 2) ซึ่งเป็นบริเวณพีคที่ให้ปริมาณสารไฮออกซูลสูง และเป็นหลอดที่มีแถบหลักตรงกับสารมาตรฐาน ERT ทำให้แห้งโดยอบที่อุณหภูมิ 60 °ซ วางทิ้งไว้ในโถดูดความชื้นแบบสุญญากาศเป็นเวลา 1 วัน แล้วละลายให้มีความเข้มข้นเป็น 25 mg/ml นำไปหาค่า IC_{50} ในการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ได้เท่ากับ 1.40 mg/ml (รูปที่ 36) และวิเคราะห์ต่อด้วย HPLC โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ERT กับพื้นที่ใต้พีค (รูปที่ 37) สารละลาย ERT มาตรฐานจะมีค่ารีเทนชันไทม์ (retention time, TR) ประมาณ 2.93-3.09 นาที แสดงตัวอย่างดังรูปที่ 38 ซึ่งเป็นโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ และเมื่อฉีดสารตัวอย่างวิเคราะห์ปรากฏว่าสารตัวอย่างดังกล่าวให้พีคที่มี retention time (เท่ากับ 3.02) ที่ตรงกับของสารมาตรฐาน ERT (รูปที่ 39) เมื่อทำการคำนวณหาปริมาณด้วยการเปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน ERT ค่าที่ได้จากการคำนวณหาปริมาณสาร ERT ในผง 1 kD-Permeate อยู่ที่ประมาณ 1.18 $\mu\text{g/g}$ ซึ่งยังคงมีปริมาณค่อนข้างน้อยเช่นเดียวกับที่พบในผง F-serum



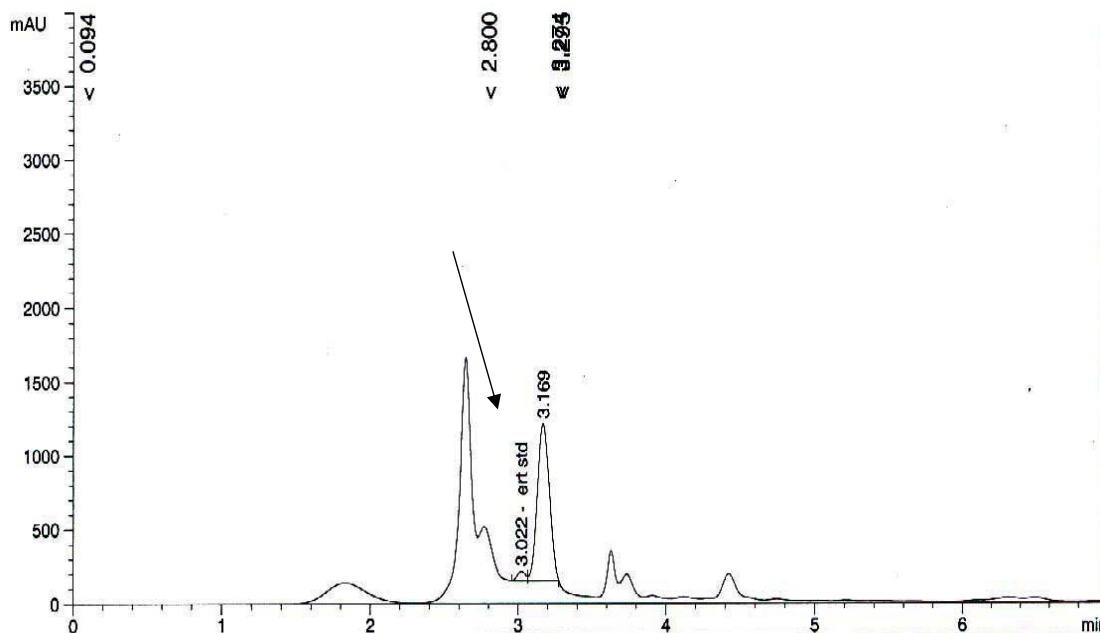
รูปที่ 36 ผลการวิเคราะห์หาค่า IC_{50} ของสารละลายที่รวบรวมจากพีคที่ 2 (หลอดที่ 20- 24)



รูปที่ 37 กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ERT และพื้นที่ใต้พีค (ครั้งที่ 2)



รูปที่ 38 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน ERT จากการวิเคราะห์โดย HPLC (ครั้งที่ 2)

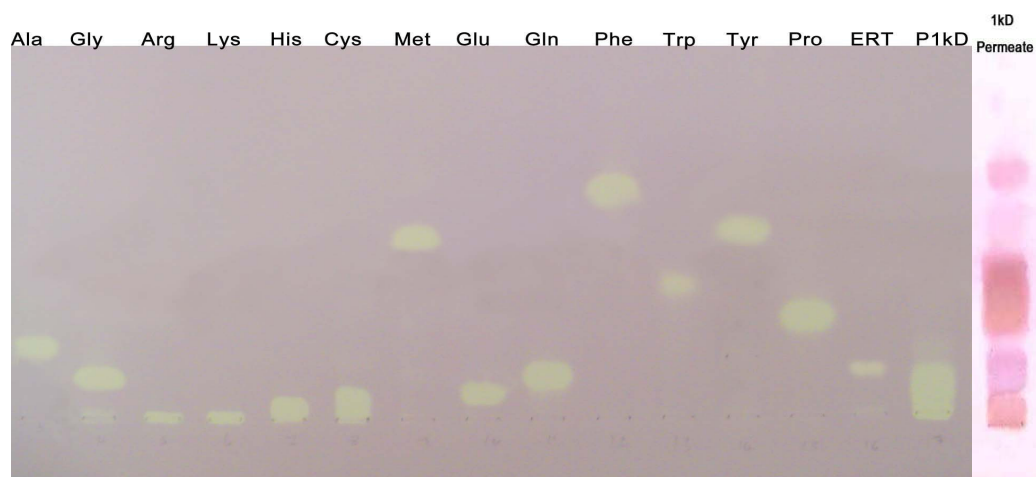


รูปที่ 39 โครมาโทแกรมของสารไรซอล (ERT) ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ผง 1 kD-Permeate วิเคราะห์ด้วย HPLC

5. การศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระจำพวกกรดอะมิโน

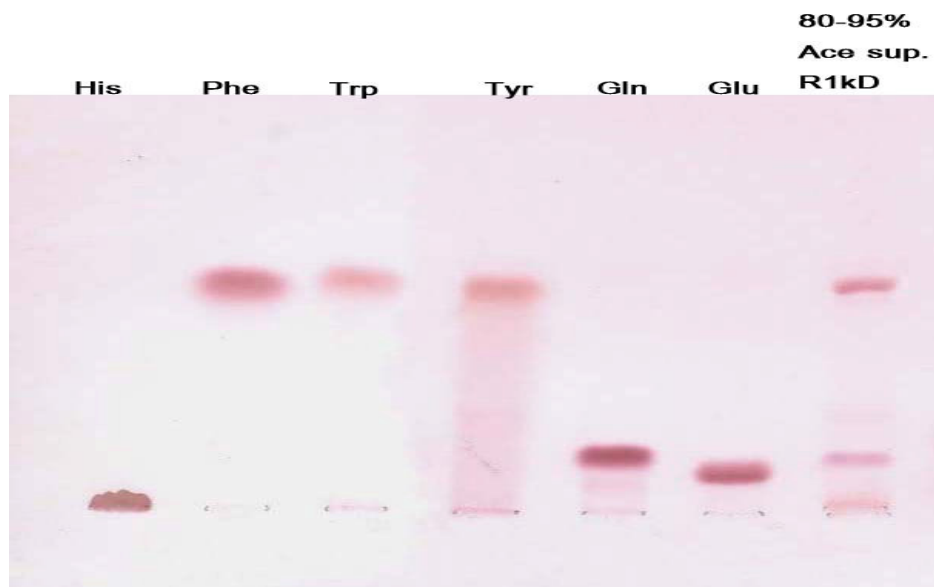
เคยมีรายงานว่ากรดอะมิโนหลายชนิด เช่น cysteine, tryptophan, tyrosine, methionine, phenylalanine, histidine, proline สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ ซึ่ง cysteine มีฤทธิ์ต้านที่ดีที่สุดรองลงมาคือ tryptophan, tyrosine ตามลำดับ (Sharp *et al.*, 2004) และโดยทั่วไปกรดอะมิโนจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีในสภาพ pH เป็นด่างสูง (Marcuse, 1960) จากผลการศึกษาในหัวข้อที่ 4 (รูปที่ 24, 34 และรูปที่ 25, 35) ทำให้ทราบว่าสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากน้ำยางพารามีทั้งสารกลุ่มไรซอล เช่น ERT และสารกลุ่มกรดอะมิโนอื่น ๆ หลายชนิด ซึ่งข้อมูได้ด้วย Ninhydrin และสารละลาย DPPH จึงนำผง 1 kD-Permeate ซึ่งเป็นสารตัวอย่างที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี จากผลการทดลองหัวข้อที่ 3 และกรดอะมิโนมาตรฐานชนิดที่มี side chain ประกอบด้วยหมู่ aliphatic คือ alanine, glycine; หมู่ alkaline amino คือ arginine, lysine, histidine; หมู่ thiol คือ cysteine, methionine; หมู่ acidic amino คือ glutamic acid; หมู่ aromatic คือ phenylalanine, tryptophan, tyrosine และ หมู่ cyclic amino คือ proline มาวิเคราะห์ด้วยปฏิกิริยา DPPH พบว่ากรดอะมิโนทุกชนิด และ สารละลายผง 1 kD-Permeate

เกิดปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH ให้สารประกอบสีเหลือง แสดงว่ากรดอะมิโนที่นำมาทดสอบทั้งหมดมีความสามารถในการดักจับอนุมูล DPPH[•] ได้ ซึ่งแถบสารประกอบสีเหลืองที่เกิดขึ้นบนแผ่น TLC ของผง 1 kD-Permeate มีตำแหน่งการเคลื่อนที่ที่น่าจะสอดคล้องกับกรดอะมิโน glycine, arginine, lysine, histidine, cysteine, glutamic acid, glutamine และ ERT ที่ย้อมติดสี ninhydrin และพบว่าสารละลายผง 1 kD-Permeate มีบริเวณแถบสีที่ย้อมติด ninhydrin มากกว่าที่ย้อมด้วยสารละลาย DPPH (รูปที่ 40)

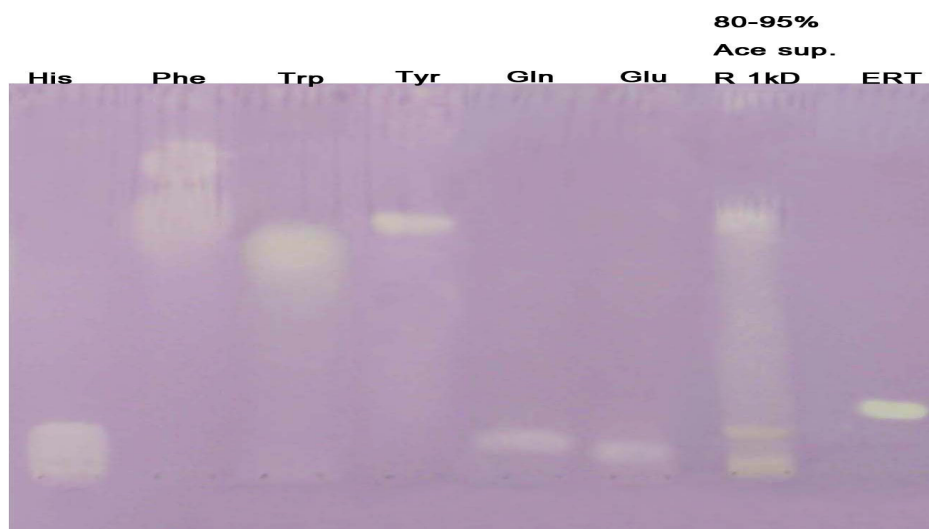


รูปที่ 40 การวิเคราะห์ความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระด้วยวิธี TLC ของกรดอะมิโนมาตรฐาน และ ผง 1 kD-Permeate ติดตามผลโดยใช้สารละลาย DPPH[•] เปรียบเทียบกับผง 1 kD-Permeate ที่ย้อมด้วยสี ninhydrin (แถวขวาสุด)

สำหรับผงแห้งที่เตรียมได้จากส่วนใสหลังการนำผง 1 kD-Retentate ไปตกตะกอนในช่วง 80-95% เมื่อนำไปวิเคราะห์โดยใช้วิธี TLC พบแถบหลัก 3 แถบให้ผลบวกกับปฏิกิริยา ninhydrin โดยทั้ง 3 แถบให้สีเมื่อย้อมด้วยสารละลาย DPPH[•] เช่นกัน และเมื่อเปรียบเทียบกับ R_f ของกรดอะมิโนมาตรฐาน น่าจะประกอบด้วยกรดอะมิโน histidine, glutamine, tyrosine (รูปที่ 41,42)



รูปที่ 41 การเปรียบเทียบแถบติดสี ninhydrin จากวิธี TLC ของกรดอะมิโนมาตรฐานและสารละลายส่วนใสหลังการตกตะกอนช่วง 80-95% ของ 1 kD-Retentate



รูปที่ 42 การวิเคราะห์ความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระด้วยวิธี TLC ของกรดอะมิโนมาตรฐาน และส่วนใสหลังการตกตะกอนช่วง 80-95% ของ 1 kD-Retentate ติดตามผลโดยใช้สารละลาย DPPH

เนื่องจากการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นกรดอะมิโนด้วยวิธี TLC แล้ว ย้อมสีด้วยปฏิกิริยา Ninhydrin และ DPPH สามารถให้ผลในเชิงคุณภาพว่ามีกรดอะมิโนหลายชนิด ใน 1 kD-Permeate ที่ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ จากการนำสารสกัด 1 kD-Permeate ไป วิเคราะห์ต่อด้วยวิธี LC-MS/MS ทำให้เราสามารถได้ค่าการวิเคราะห์ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณถึง ส่วนประกอบของกรดอะมิโนในส่วน 1 kD-Permeate ดังนี้ (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 แสดงชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่พบในผง 1 kD-Permeate

ชนิด Amino acid	ปริมาณ Amino acid (mg/g)
Arginine	1.94
Alanine	8.04
Aspartic acid	28.93
Cysteine	1.24
Cystine	1.51
Glutamine	0.50
Glutamic acid	35.05
Glycine	2.12
Histidine	0.04
Isoleucine	1.48
Lysine	0.42
Leucine	0.19
Proline	4.44
Phenylalanine	0.11
Serine	2.97
Tyrosine	0.43
Tryptophan	0.06
Threonine	6.78
Valine	0.79

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเตรียมสารสกัดจากน้ำยางพารา

สารตัวอย่างเซรัม (F-serum) ที่ได้จากน้ำยางพาราโดยการนำไปกรองผ่านเครื่องอัลตราฟิลเตรชัน (ultrafiltration) ซึ่งจะแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันออกจากกัน สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะถูกกักอยู่บนแผ่นอัลตราฟิลเตอร์เมมเบรน (ultrafilter membrane) โดยสารที่มีขนาดใหญ่กว่ารูพรุนของฟิลเตอร์ (filter) จะถูกกักอยู่ในฟิลเตอร์ ทำให้มีความเข้มข้นมากขึ้น ขณะที่สารซึ่งมีโมเลกุลเล็กและน้ำจะผ่านรูพรุนของเมมเบรนออกมาได้ ([Http://www.sithiphorm.com/newweb](http://www.sithiphorm.com/newweb)) การทดลองนี้ทำการกรองสารผ่านเมมเบรนขนาด 10 kD และ 1 kD ซึ่งสารจะถูกแยกออกเป็น 3 ส่วน คือ 10 kD-Retentate สารที่อยู่ในชั้นนี้จะมีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่า 10 kD, 1 kD-Retentate สารมีขนาดโมเลกุลช่วงตั้งแต่ 1 kD แต่ต่ำกว่า 10 kD และ 1 kD-Permeate สารมีขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 1 kD ในการคัดแยกสารโดยวิธีนี้สารตัวอย่างมีค่าความเป็นกรดต่างคงที่ และเกิดการสูญเสียสภาพของสารตัวอย่างน้อยกว่าการแยกสารชีวเคมีด้วยวิธีอื่น เนื่องจากการคัดแยกสารทางกายภาพ สารตัวอย่างที่ได้จากการคัดแยกด้วยเครื่องอัลตราฟิลเตรชันในแต่ละส่วนจะถูกแปรรูปจากสารละลายไปเป็นผงแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย (spray dryer) กระบวนการนี้ ต้องใช้อากาศที่มีความร้อนสูงไปปะทะกับอนุภาคฝอยของสารละลายที่พ่นเข้ามาเพื่อให้อนุภาคแห้ง ([Http://en.wikipedia.org/wiki/spray-drying](http://en.wikipedia.org/wiki/spray-drying)) ทำให้โปรตีนหรือสารประกอบที่อยู่ในเซรัมซึ่งไม่สามารถทนความร้อนได้สลายตัวไปบางส่วน โดยการอบแห้งแบบพ่นฝอย จะเป็นวิธีที่ช่วยแปรรูปสารตัวอย่างเหลวให้อยู่ในสภาพผงแห้งที่สามารถเก็บรักษาไว้ได้นาน จากการทดลองปริมาณสารตัวอย่างต่อกรัมที่ได้จากการผ่านเครื่อง spray dryer จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลายโดย 10 kD-Retentate 1 มิลลิลิตร จะได้สารตัวอย่างประมาณ 34 มิลลิกรัม 1 kD-Retentate 1 มิลลิลิตร จะได้สารตัวอย่างประมาณ 11 มิลลิกรัม และ 1 kD-Permeate 1 มิลลิลิตร จะได้สารตัวอย่างประมาณ 3 มิลลิกรัม เมื่อศึกษาประสิทธิภาพการแยกสารตามขนาดโดยทำอเล็กโทรฟอริซิส (รูปที่ 19, 20) พบว่าเมมเบรน 10 kD และ 1 kD มีประสิทธิภาพในการแยกขนาดของสารออกเป็นลำดับส่วน จึงทำให้สามารถกำจัดโปรตีนบางส่วนที่ไม่ต้องการได้หลังการกรองผ่านเครื่องอัลตราฟิลเตรชัน ซึ่งประสิทธิภาพของเมมเบรนในการแยกสารขึ้นกับปัจจัยที่เกี่ยวข้องที่มีผลต่อ ขนาดรู (Pore size) และ

ความพรุน (Porosity) ของเมมเบรน เช่น เสถียรภาพต่อสารเคมีและความร้อน เป็นต้น (จันทร์ทองสุนทรภา, 2547)

2. ผลการทดสอบความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ของสารตัวอย่าง

การทดสอบความสามารถดักจับอนุมูล DPPH ในสารละลาย เป็นวิธีที่นิยมใช้กันทั่วไปสำหรับตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดในเบื้องต้น (Zhu et al., 2002) ซึ่งอาศัยหลักการคือ เมื่ออนุมูล DPPH ในสารละลายสีม่วงเข้มได้รับอิเล็กตรอนหรือ H จากสารทดสอบจะกลายเป็นสารประกอบ DPPH ที่เสถียรขึ้นและไม่มีสีม่วงเข้มเหมือนกับ DPPH ทำให้ตรวจวัดความสามารถดักจับอนุมูล DPPH ของสารสกัดได้จากค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ลดลงดังกล่าว (Brand-Williams et al. 1995) ในการทดสอบสารสกัดตัวอย่างทั้ง 4 ชนิด คือ F-serum, 10 kD-Retentate, 1 kD-Retentate, 1 kD-Permeate ปรากฏว่าให้ค่า IC_{50} ต่างกัน โดย F-serum ให้ค่าต่ำสุด และ 1 kD-Permeate ให้ค่าต่ำรองลงมา ทั้งนี้ น่าจะเป็นเพราะใน F-serum ประกอบไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระทุกขนาด รวมทั้งกลุ่มเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งจะไม่พบกลุ่มเอนไซม์เหล่านี้ในส่วนของ 1 kD-Permeate ในขณะที่ ส่วน F-serum ที่ตกตะกอนช่วงความเข้มข้น acetone 0-20%, 40-60%, 60-80%, 80-95% และส่วน 1 kD-Retentate ที่ตกตะกอนช่วงความเข้มข้น 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, 80-95% ให้ค่า IC_{50} สูงกว่า 20 mg/ml ทำให้ทราบว่าสารสกัดโปรตีนชนิดเหล่านี้ มีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ได้ไม่ดัดนัก ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะกลุ่มเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ไม่สามารถทำงานได้เต็มที่ เพราะ cofactor จำพวกธาตุต้านอนุมูลอิสระ (Cu, Mn, Zn) ที่จำเป็นสำหรับการทำงานของกลุ่มเอนไซม์ดังกล่าวถูกแยกส่วนออกจากการกรอง มีแต่ตะกอน F-serum ที่ตกในช่วงความเข้มข้น acetone 20-40% ที่ให้ค่า IC_{50} ก่อนข้างต่ำคือ 3.7 mg/ml ซึ่งโปรตีนส่วนนี้อาจจะเป็นกลุ่มโปรตีนต้านอนุมูลอิสระจำพวก Metallothioneine ซึ่งเคยมีรายงานการสกัดน้ำผักและผลไม้ที่ผ่านการทำให้เป็นผงแห้งแล้วนำไปตกตะกอนอะซิโตนพบกลุ่มโปรตีนที่มีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ (Gene et al., 2004) สำหรับสารสกัดที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH ได้ดีที่สุด ได้แก่ F-serum โดยมีค่า IC_{50} ต่ำที่สุดคือ 2.7 mg/ml ซึ่งจัดเป็นฤทธิ์ที่ค่อนข้างดี เมื่อเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ คือ BHT ซึ่งให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.03 mg/ml

นอกจากนั้นผลที่ได้แสดงว่า F-serum ซึ่งมีสภาพธรรมชาติที่สุดที่พบได้ในน้ำยาง มีประสิทธิภาพสูงสุด (ที่มีค่า IC_{50} ประมาณ 2.7 mg/ml) ในการต้านอนุมูลอิสระ และสูงกว่า 1 kD-Permeate (6.9 mg/ml) ประมาณ 2.5 เท่า ทั้งนี้ เพราะ 1 kD-Permeate ปราศจากสารโมเลกุลใหญ่

ประเภท แอนติออกซิเจนที่เอนไซม์ เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส และคาตาเลส ที่พบว่ามียอยู่ใน F-serum (Wosilait and Nason, 1954; Viljoen *et al.*, 1983; Lind *et al.*, 1982)

3. ผลการหาปริมาณไรออล รวมทั้ง ERT ในสารสกัดน้ำยางพารา

การหาปริมาณไรออลรวมทั้ง ERT จะหาจากสารสกัดจากน้ำยางพาราในทุก ๆ ส่วนด้วยการเตรียมสารสกัดโดยวิธีการต่าง ๆ เพื่อหาวิธีการเตรียมสาร ERT โดยหลักการในการวัดมีกลไก คือ สาร 2,2'-Dipyridyl disulphide จะเข้าทำปฏิกิริยากับหมู่ไรออลเกิดสารประกอบ 2-thiopyridone สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 343 nm (Jan *et al.*, 1974) วิธีการนี้จึงไม่จำเพาะต่อการวัดสาร ERT เพราะสามารถทำปฏิกิริยากับสารที่มีหมู่ไรออลชนิดอื่น ๆ ได้ด้วย

ในขั้นแรกของการทดลองจะหาจากสารสกัดของน้ำยางพาราที่กรองผ่านเมมเบรนขนาดต่าง ๆ แล้วทำให้เป็นผงแห้งด้วยการ spray dry พบว่าสารสกัดผงแห้ง F-serum มีปริมาณไรออลมากที่สุด คือ อยู่ในช่วง 2-4 mg/ml ซึ่งสารสกัดส่วนนี้ยังไม่ผ่านการกรองด้วยเมมเบรนทำให้สารสกัดยังคงเป็นสารสกัดแบบหยาบที่รวมสารต่าง ๆ ไว้มากมาย แต่เมื่อวัดปริมาณไรออลในผงแห้ง 10 kD-Retentate และ 1 kD-Retentate พบปริมาณค่อนข้างน้อยไม่เกิน 1 mg/g dry weight เพราะสารส่วนนี้ผ่านการกรองด้วยเมมเบรน ขนาด 10 kD และ 1 kD ซึ่งสารที่ถูกกักอยู่ในชั้นนี้จะมีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่า 10 kD และช่วงตั้งแต่ 1 kD แต่ต่ำกว่า 10 kD โดยสารกลุ่มไรออลมีขนาดต่ำกว่า 1 kD ไม่น่าจะพบอยู่ในสารสกัดส่วนดังกล่าว เหตุที่ตรวจพบปริมาณน้อยในชั้นนี้อาจเป็นเพราะขั้นตอนการล้างเมมเบรนไม่ทั่วถึง จึงทำให้มีสารไปติดตามรูพรุนของเมมเบรน และปัจจัยในการแยกสารที่ส่งผลต่อเมมเบรนดังกล่าวมาแล้ว ส่วนในผงแห้ง 1 kD-Permeate ซึ่งเป็นสารตัวอย่างที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ มีสีน้ำตาลละลายน้ำได้ดี แต่แทบจะไม่สามารถละลายในตัวทำละลายอื่น ๆ ได้เช่น methanol และ ethanol พบปริมาณอยู่ในช่วง 1.4-2 mg/g dry weight มีมาก รองจากผงแห้ง F-serum เพราะสารสกัดในชั้นนี้จะมีสารที่มีขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 1 kD ซึ่งรวมทั้งสารกลุ่มไรออลสามารถผ่านขนาดรูของเมมเบรนมาอยู่ในชั้นนี้ แต่ปริมาณยังน้อยกว่าในผงแห้ง F-serum เพราะ F-serum ยังประกอบไปด้วยสารขนาดใหญ่ที่ประกอบด้วยหมู่ไรออลด้วย เช่น เอนไซม์ทรานกลูตามิเนส และอาจเนื่องจากการที่สารบางส่วนติดค้างอยู่ที่เมมเบรนหรือมีการสูญเสียไปในกระบวนการคัดแยกสาร

นอกจากนี้ได้ทดลองใช้วิธีเตรียมสารโดยการตกอะซิโตนซึ่งวิธีการนี้สามารถใช้ตกตะกอนเอนไซม์หรือโปรตีนได้เป็นกลุ่ม โดยอาศัยหลักการที่อะซิโตนจะไปลดค่ากิจกรรมความสามารถในการทำละลายของน้ำโดยมีผลต่อค่าคงที่ไดอิเล็กตริก (dielectric constant) ของ

สารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายลดลง ทำให้ความสามารถในการเป็นตัวทำละลายของน้ำลดลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอะซิโตนมากขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงจุดที่แรงกระทำระหว่างโมเลกุลของโปรตีน ในส่วนของพลังงานไฟฟ้าสถิตย์บน โมเลกุลโปรตีนมีแรงกระทำที่สูงกว่าแรงกระทำระหว่างโปรตีนกับน้ำ เกิดการรวมตัวกันของโมเลกุลโปรตีนจึงตกตะกอนลงมาได้ ([Http://www.agro.cmu.ac.th/e-book/protein](http://www.agro.cmu.ac.th/e-book/protein)) โดยได้เลือกสารสกัดผงแห้ง F-serum และ 1 kD-Retentate เพราะวัดปริมาณ ไรโอลเบื้องต้นมีปริมาณอยู่ในกลุ่มมากที่สุด และสารสกัดส่วนนี้ยังเป็นสารสกัดแบบหยาบการตกอะซิโตนอาจช่วยทำให้สารส่วนนี้บริสุทธิ์ขึ้น และอาจแยกกลุ่มสาร ไรโอลที่ต้องการออกมาเพื่อทำบริสุทธิ์ต่อไป ผลการทดลองที่ได้พบว่าเมื่อนำตะกอนที่ได้จากการตกอะซิโตนช่วงตั้งแต่ 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% และ 80-95% ของสารสกัดผงแห้งทั้งสองส่วน ทำอิเล็กโตรโฟรีซิส เห็นแถบโปรตีนที่ปรากฏโปรตีนขนาดต่าง ๆ ช่วง 14-94 kD (รูปที่ 19 และ 20) และเมื่อวัดปริมาณ ไรโอลในตะกอนทุกช่วงความเข้มข้นของอะซิโตนพบว่า มีสาร ไรโอลสูงสุดอยู่ที่ 0.53 mg/g dry weight จึงอาจเป็นไปได้ว่าสารกลุ่ม ไรโอลส่วนหนึ่งเป็นกลุ่มโปรตีน

4. การทำบริสุทธิ์และหาปริมาณสาร ERT

4.1 การทำบริสุทธิ์ ERT จากผงแห้งของ F-serum

การทดลองนี้เลือกทำบริสุทธิ์สาร ERT จากผงแห้ง F-serum เพราะจากการทดลองวัดปริมาณ ไรโอล (ตารางที่ 8) พบว่าสารในส่วนนี้ให้ปริมาณมากที่สุด จึงน่าจะเหมาะที่จะเป็นสารตั้งต้น โดยจะแยกผ่านคอลัมน์ที่บรรจุด้วยเจล Sephadex G-15 ซึ่งสามารถแยกสารที่มีโมเลกุลขนาดตั้งแต่ 0-1500 ดาลตัน ทำให้แยกโปรตีนขนาดใหญ่กว่า 1500 ดาลตัน ออกไปได้ (รูปที่ 21) จากการรวบรวมหลอดที่มีสาร ไรโอลสูง พบว่ามีปริมาณ ไรโอลประมาณ 2.04 mg/g dry weight เมื่อแยกด้วยคอลัมน์ Biogel P-2 สามารถแยกสารได้เป็นสามฟิสิกส์ที่ให้ปริมาณ ไรโอลใกล้เคียงกัน (รูปที่ 22) จึงนำสารละลายจากหลอดต่าง ๆ ในแต่ละฟิสิกส์ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ERT พบหลอดสารละลายมีแถบหลักตรงกับสารมาตรฐาน หากค่า Rf เท่ากับ 0.16 เนื่องจากการเคลื่อนที่ของสารอินทรีย์บนแผ่น TLC จะแปรผันโดยตรงกับสภาพขั้วของตัวเคลื่อนที่ ขณะที่ตัวเคลื่อนที่เคลื่อนที่ผ่านไปบนตัวอยู่กับที่ ตัวเคลื่อนที่จะดึงเอาสารอินทรีย์ที่ถูกดูดซับเคลื่อนที่ไปด้วย สารอินทรีย์ใดที่มีสภาพขั้วใกล้เคียงกับตัวเคลื่อนที่จะเคลื่อนที่ไปได้ไกลกว่า (แม้น อมรสิทธิ์ และอมร เพชรสม, 2535) แสดงว่าสารละลายในหลอดทดลองมีความสามารถในการละลายใกล้เคียงกับสารมาตรฐานเพราะเคลื่อนที่ไปได้เท่า ๆ กัน และเมื่อทดสอบความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระด้วยการเกิดปฏิกิริยาสีเชื่อมกับสารละลาย DPPH ก็ปรากฏผลเป็นแถบสี

เหลืองบนพื้นม่วง (รูปที่ 25) แสดงว่าสารละลายในหลอดดังกล่าวมีความสามารถในการดักจับอนุมูล DPPH[•] ได้ จึงรวบรวมหลอดจากพิกเหล่านั้น และได้พิกที่มีค่า IC_{50} ต่ำสุดประมาณ 1.60 mg/ml (ตารางที่ 9) ไปวิเคราะห์ต่อด้วย HPLC โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ERT กับพื้นที่ใต้พิก ซึ่งช่วงความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่ให้กราฟเป็นเส้นตรงจะอยู่ในช่วง 2.5-200 μ M ผลการทดลองพบสารมาตรฐาน ERT มีค่ารีเทนชันไทม์ (retention time, T_R) ประมาณ 3.14-3.15 นาที ในขณะที่สารตัวอย่างดังกล่าวให้พิกที่มี retention time เท่ากับ 3.149 อยู่ในช่วงที่ตรงกับสารมาตรฐาน (รูปที่ 28) แต่ยังคงมีพิกของสารอื่น ๆ ปรากฏให้เห็นด้วย สารที่ได้จึงยังคงเป็นสารกึ่งบริสุทธิ์ด้วยเหตุนี้ค่า IC_{50} ที่ได้มีค่าสูงเมื่อเปรียบเทียบกับค่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน ERT ที่มีค่าเท่ากับ 0.019 mg/ml เมื่อคำนวณหาปริมาณสาร ERT ในผงเซรัมแห้งมีค่าประมาณ 1.50 μ g/g ยืนยันผลด้วยการนำสารมาตรฐาน ERT ไปผสมกับสารละลายตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ ปรากฏว่าเห็นพิกที่มี retention time ตรงกับสารมาตรฐาน ERT สูงขึ้น (รูปที่ 29) ผลการทดลองที่ได้จึงน่าจะยืนยันได้ว่า ในน้ำยามีสารไฮออกซิเดอริค ERT อยู่ด้วย แม้จะมีปริมาณค่อนข้างน้อยมากแต่ก็อยู่ในช่วงที่เคยมีรายงานไว้ช่วง 0.0-5.0 mg/ยางสด 100 ml (Pakianathan *et al.*, 1992)

4.2 การทำบริสุทธิ์ ERT จากผงแห้งของ 1kD-Permeate

เมื่อเลือกทำบริสุทธิ์สาร ERT จากผงแห้ง F-serum ยังคงได้สาร ERT กึ่งบริสุทธิ์ จึงเลือกผง 1 kD-Permeate มาทำบริสุทธิ์อีกครั้ง เพราะสารส่วนนี้มีความบริสุทธิ์มากกว่า และมีปริมาณไฮออกซิเดอริคเป็นอันดับสองรองจากผง F-serum เนื่องจากได้ผ่านการกรองด้วยเมมเบรนขนาด 1 kD มีสารขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 1 kD และแยกสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่า 1 kD ออกไปได้เป็นส่วนใหญ่ แล้วย่นมาแยกต่อโดยผ่านคอลัมน์ Sephadex G-15 ในรูปที่ 30 เมื่อติดตามการแยกของสารโดยการวัดปริมาณไฮออกซิเดอริค พบว่ามีสารกลุ่มนี้อยู่ในช่วงกว้างไม่สามารถเลือกได้ว่า จะรวบรวมช่วงใดไปทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Biogel P-2 ต่อ จึงติดตามผลการแยกต่อด้วยการวัดความสามารถในการดักจับอนุมูล DPPH[•] (รูปที่ 31) ทำให้ทราบว่าควรจะต้องรวบรวมช่วงหลอดใดไปทำแห้ง เมื่อนำสารละลายที่รวบรวมได้ไปผ่าน Column Biogel P-2 แยกสารได้สองพิกดังรูปที่ 32 พิกแรกมีปริมาณไฮออกซิเดอริคสูงกว่าพิกที่สอง แต่เมื่อวัดค่าความสามารถในการดักจับอนุมูล DPPH[•] ค่าที่ได้ไม่แตกต่างกัน จึงนำสารละลายแต่ละหลอดวิเคราะห์ต่อด้วย TLC ทำเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ERT พบแถบหลักของสารละลายในหลอดที่ 20-24 ตรงกับมาตรฐาน ERT ในขณะที่หลอดอื่น ๆ ไม่ปรากฏว่าตรงกัน และเมื่อทดสอบความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระด้วยการเกิดปฏิกิริยาสีเชื่อมกับสารละลาย DPPH[•] ก็ปรากฏผลเป็นแถบสีเหลือง ในหลอดที่ 14-24 ซึ่งในช่วง

หลอดที่ 20-24 พบแถบเป็นสีเหลืองเข้มมีตำแหน่งใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน (รูปที่ 35) จึงคาดว่า ถ้านำสารละลายในหลอดดังกล่าวไปวิเคราะห์ต่ออาจพบสาร ERT ส่วนสารละลายในฟีกแรกอาจ เป็นสารไซออลชนิดอื่น ๆ จากการรวบรวมหลอดดังกล่าวไปทำแห้ง หาค่า IC_{50} ในการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ได้เท่ากับ 1.40 mg/ml ต่ำกว่าผง F-serum เพียงเล็กน้อย วิเคราะห์ต่อด้วย HPLC สารละลาย ERT มาตรฐานจะมีค่ารีเทนชันไทม์ (retention time, T_R) ประมาณ 2.93-3.09 นาที (รูปที่ 38) ค่ารีเทนชันไทม์เมื่อเปรียบเทียบกับของผง F-serum ต่างกัน 0.06-0.21 นาที เนื่องจากทำการ วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ต่างเครื่องกัน ค่าที่ได้จึงคลาดเคลื่อน เมื่อพิจารณาฟีกของสารในรูปที่ 39 ยังคงมีฟีกของสารอื่น ๆ ปรากฏให้เห็นอีกเช่นกัน สารที่ได้จึงยังคงเป็นสารกึ่งบริสุทธิ์ เมื่อ คำนวณหาปริมาณด้วยการเปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้ฟีกของสารมาตรฐาน ERT ค่าที่ได้จากการ คำนวณหาปริมาณสาร ERT กึ่งบริสุทธิ์ จากผง 1 kD-Permeate มีค่า 1.18 $\mu\text{g/g}$ ได้ปริมาณ yield น้อยกว่าการเตรียมจากผง F-serum ประมาณ 0.32 $\mu\text{g/g}$ แต่ IC_{50} ของ ERT กึ่งบริสุทธิ์ที่เตรียมได้ จากผง F-serum มีค่าสูงกว่าประมาณ 0.2 mg/ml ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าการทำบริสุทธิ์สาร ERT จาก ผง 1 kD-Permeate น่าจะได้สารที่มีความบริสุทธิ์มากกว่า

5. การศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระจำพวกกรดอะมิโน

กรดอะมิโนหลายชนิดมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น tryptophan, tyrosine, cysteine, สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่ความเข้มข้นประมาณ 0.25-0.5 mM (Meucci *et al.*, 1997) นอกจากนี้กรดอะมิโนที่มีโครงสร้างเป็นแบบวงแหวนรวมทั้ง histidine ก็สามารถใช้ฤทธิ์ต้าน อนุมูลอิสระได้เช่นกัน โดยทั้งกรดอะมิโน histidine และ cysteine เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ สารต้านอนุมูลอิสระ ERT (Amir and Donald, 1962) ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะวิเคราะห์สารกลุ่ม กรดอะมิโน ที่มีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระด้วย จึงเลือกศึกษาในผง 1 kD-Permeate ซึ่ง มีความบริสุทธิ์และมีค่า IC_{50} ต่ำกว่าสารสกัดส่วนอื่น ๆ จากผลการวิเคราะห์ด้วย TLC พบว่ามี กรดอะมิโนหลายชนิดในผง 1 kD-Permeate ที่ให้ผลบวกกับปฏิกิริยา Ninhydrin และ DPPH และ น่าจะเป็นกลุ่มกรดอะมิโน glycine, histidine, cystein, glutamic acid, glutamine และ ERT แต่ บริเวณแถบหลักที่เชื่อมติดสี ninhydrin พบว่ามีบริเวณกว้างขวางกว่าการเชื่อมด้วยสารละลาย DPPH แสดงว่าองค์ประกอบในสารละลาย 1 kD-Permeate มีความสามารถในการละลายใกล้เคียงกับ กรดอะมิโนมาตรฐาน และเกินกว่าที่จะให้ผลบวกกับการเชื่อมด้วย DPPH จึงนำผง 1 kD-Permeate ไปวิเคราะห์หาปริมาณและชนิดกรดอะมิโนด้วยวิธี LC-MS/MS จะเห็นว่าในเซรัมนี้ยังมีกลุ่ม กรดอะมิโนถึง 19 ชนิด (ตารางที่ 10) รวมทั้งชนิดที่มี side chain ประกอบด้วยหมู่ aliphatic (เช่น

alanine 8.04 mg/g), alkaline amino (เช่น arginine 1.94 mg/g), hydroxyl (เช่น tyrosine 0.43 mg/g) และ thiol (เช่น cysteine 1.24 mg/g) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนกลุ่มที่มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี เป็นต้น (Marcuse, 1960) นอกจากนี้ยังพบว่ามีการตกตามิก และแอสปาร์ติก สูงมาก ทั้งนี้อาจเป็นเพราะส่วนหนึ่งของกรดกลูตามิกจำเป็นสำหรับการสร้างสารจำพวกพอลิเอามีนที่จะต้องใช้เป็นสับสเตรทของเอนไซม์พอลิเอามีนออกซิเดส ในการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เพื่อใช้ในปฏิกิริยาการเชื่อมโยงสารลิกนิน ในกระบวนการสमानขนาดผลของต้นยาง (Morgan and Drew, 1997) หรือ ถูกใช้เป็นสารตั้งต้นในการสร้างสาร GABA (γ -Aminobutyric acid) ซึ่งต้องใช้ในการกระตุ้นกระบวนการสังเคราะห์ แอพทีลีนที่ต้องสร้างขึ้นมาตอบสนองต่อการเกิดบาดแผล ส่วนแอสปาร์ติก สามารถเป็นสารตั้งต้นสำหรับสร้างกลูตามีน เป็นต้น (Arumugam *et al.*, 1997)

สำหรับผงแห้งที่เตรียมได้จากส่วนใสหลังการนำผง 1 kD-Retentate ไปตกตะกอนด้วยอะซิโตนในช่วงความเข้มข้น 80-95% สารส่วนนี้ก็คาดว่าจะมีความบริสุทธิ์ในระดับหนึ่ง เพราะได้ผ่านกระบวนการแยกสารและโปรตีนบางส่วนออกไป อีกทั้งยังมาจากส่วนใสหลังการตกอะซิโตนในช่วง 80-95% ของ 1 kD-Retentate ซึ่งได้ผ่านการกรองด้วยเมมเบรนขนาด 1 kD แล้ว และสามารถวัดค่า IC_{50} ได้เท่ากับ 3.7 mg/ml ซึ่งเป็นค่าที่ได้ต่ำกว่าผงแห้ง 1 kD-Retentate ก่อนการตกตะกอน และเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC ปรากฏว่าให้ผลบวกกับปฏิกิริยาการย้อมสีของนินไฮดริน น่าจะเป็นไปได้ว่าสารส่วนนี้มีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย และเมื่อย้อมสีด้วยสารละลาย DPPH[•] ก็ให้ผลเป็นบวกเช่นกันแสดงว่ามีความสามารถในการดักจับอนุมูล DPPH[•] ได้ เมื่อพิจารณาตำแหน่งการเคลื่อนที่ของสารบนแผ่น TLC พบว่าตรงกับกรดอะมิโน histidine, glutamine, tyrosine (รูปที่ 41,42) ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีศักยภาพเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระจากน้ำยางพาราสามารถสรุปผลการทดลองได้ ดังนี้

1. F-serum จากน้ำยางพาราสามารถถูกแยกส่วน ตามลำดับขนาดโมเลกุลโดยการกรองผ่านเครื่องอัลตราฟิลเตรชัน ได้สารตัวอย่าง 3 ส่วน คือ 10 kD-Retentate, 1 kD-Retentate และ 1 kD-Permeate
2. สารสกัดในรูปผงแห้งที่ได้จากการ spray dry เหมาะที่จะใช้เป็นตัวกุกบตั้งต้นในการเตรียมสารต้านอนุมูลอิสระ ทั้งสารไรซอลชนิด ergothioneine (ERT) และ กรดอะมิโน
3. ปริมาณสารไรซอลกับค่าความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ในสารตัวอย่างผงแห้งที่ได้จากการ spray dry พบว่ามีความสัมพันธ์กัน โดย F-serum ซึ่งมีปริมาณสารไรซอลสูงที่สุด (ช่วง 2-4 mg/g dry weight) ให้ค่า IC_{50} ต่ำที่สุด คือ 2.7 mg/ml ส่วนสารผงตัวอย่างที่มีปริมาณไรซอลรองลงมาคือ 1 kD-Permeate, 1 kD-Retentate และ 10 kD-Retentate ตามลำดับ
4. การทำบริสุทธิ์สาร ERT จากผง F-serum และผง 1 kD-Permeate ด้วยวิธีเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี และวิเคราะห์ปริมาณโดยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงหรือ HPLC ได้สาร ERT ที่บริสุทธิ์ประมาณ 1.50 และ 1.18 $\mu\text{g} / \text{g dry weight}$ โดยมีค่า IC_{50} ของความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 1.60 mg/ml และ 1.40 mg/ml ตามลำดับ
5. สารสกัดผง 1 kD-Permeate ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนที่มีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ 19 ชนิด รวมทั้งชนิดที่มี side chain ประกอบด้วยหมู่ aliphatic (เช่น alanine 8.04 mg/g), alkaline amino (เช่น arginine 1.94 mg/g), hydroxyl (เช่น tyrosine 0.43 mg/g) และ thiol (เช่น cysteine 1.24 mg/g)
6. สารสกัดผง 1 kD-Retentate น่าจะมีกรดอะมิโนซึ่งทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระจำพวก histidine, glutamine, tyrosine เป็นส่วนประกอบอยู่ในส่วนใสที่ได้หลังการนำ สารสกัดผงดังกล่าวไปตกตะกอนด้วยอะซิโตน (ช่วง 80-95%)

รายการเอกสารอ้างอิง

- ชั้นทอง สุนทรภา. 2547. เทคโนโลยีการแยกด้วยเมมเบรน. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 141 หน้า.
- แม้น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม. 2535. Principles and Techniques of Instrumental Analysis. โรงพิมพ์ชวนพิมพ์.
- โอภา วัชรคุปต์, ปรีชา บุญจง, จันทนา บุญยะรัตน์ และ มาลีรักษ์ อัดต์สินทอง. 2549. สารต้านอนุมูลอิสระ. พี.เอส.พรินท์: นนทบุรี.
- Akanmu, D., Cecchini, R., Aruoma, O.I., and Holliwell, B. 1991. The antioxidant action of ergothioneine. *Arch. Biochem. Biophys.* 288(1):10-16.
- Akoh, C.C. and Min, B.D. 1998. Antioxidants in food lipids. 423-448. New York.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K. and Hagen, T. M. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 7915-7922.
- Askari, A. and Donald, B. 1962. The reaction sequence in ergothioneine biosynthesis: hercynine as an intermediate. *J. Biol. Chem.* 237: 1615- 1618.
- Archer, B.L., Audley, B.G., Mc Sweeney, G.P., and Tan Chee Hong. 1969. Studies on the composition of latex serum and bottom parction particles. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya.* 21:506-569.
- Arumugam, K., Pariana, T., Chinnappa, C.C. and David, M. 1997. γ -Aminobutyric acid stimulates ethylene biosynthesis in sunflower. *Plant Physiol.* 115: 129-135.
- Birkhauser, V. and Basel. 1974. Free amino acids of Hevea brasiliensis latex. *Separatum Experien.* 30: 894-895.
- Blois, M.S.1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.* 181: 1199-1200.
- Blum, D., Torch, S., Lambeng, N. 2001. Molecular pathway involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 65: 135-172.
- Bondy, S. C., LeBel, C. P. 1993. The relationship between exitotoxicity and oxidative stress in the central nervous system. *Free Radic. Biol. Med.* 14: 633-642.

- Braca, A., Nunziatina, De Tommasi, Lorenzo, De Bari, Cosimo, Pizza, Mateo, Politi & Ivano, Morelli. 2001. Antioxidant principles from *Bauhinia terapoensis*. *J. Natural Products*. 64: 276-287.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. 1995. Use of a free method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol*. 20: 25-30.
- Burton, G. W. and Traber, M. G. 1990. Vitamin E antioxidant activity biokinetics and bioavailability. *Annu. Rev. Nutr.* 10: 357-382.
- Calis, Ihsan, Hasan Kirmizibekmez, Deniz Tasdemir , Otto Sticher. 2002. Sugar esters from *Globularia orientalis*. *Z. Naturforsch.* 57: 591-593.
- Carlsson, J., Kierstan, M. P. J. and Brocklehurst, K. 1974. A convenient spectrophotometric assay for the determination of L-ergothioneine in blood. *Biochem. J.* 139: 237.
- Cuendet, M., Hostettman, K., Potterat, O. and Dyatmiko, W. 1997. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helv. Chim. Acta.* 80: 1144-1152.
- Davies, K.J. 1995. Oxidative stress the paradox of aerobic life. *Biochem. Soc. Sym.* 61: 1-31.
- Dubost, N.J., Beelman, R.B., Peterson, D., and Royse, D.J. 2006. Identification and quantification of ergothioneine in cultivated mushrooms by liquid chromatography-mass spectroscopy. *J. Med Mushr.* 8:215-222.
- Espelie, K.e. and Franceschi, V.R. 1986. Immunocytochemical localization and time course of appearance of an anionic peroxidase associated with suberization in wounding-healing potato tuber tissue. *Plant Physiol.* 81: 487.
- Foubert, L., Fleming, B., Latimer, R., Tomas, M., Oduro, A., Borland, C. and Higenbottam, T. 1992. Safety guidelines for use of nitric oxide. *Lancet.* 339: 1615-1616.
- Frankel, E. N., Bosanek, C. A., Meyer, A. S., Siliman, K. and Kirk, L. L. 1998. Commercial grape juices inhibit the *in vitro* oxidation of human low-density lipoproteins. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 46: 834-838.
- Fresenius, W., Huber, J.F.K., Pungor, G.A., Rechnitz, G.A., Simon, W. and West, Th.S. 1989. Spectral data for structure determination of organic compounds. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo Hong Kong.

- Gene, E., Mark, H., Robert, D. and Kathleen, D. 2004. Pre-extraction Preparation (Fresh, Frozen, Freeze-Dried, or Acetone Powdered) and Long-Term Storage of Fruit and Vegetable Tissues: Effects on Antioxidant Enzyme Activity. *J. Agric. Food Chem.* 52: 2167-2173.
- Gulizar, A. 2004. Antioxidant effect of sulfur-containing amino acids. *Yonsei Med J.* 45(5): 776-778.
- Haba, K., Ogawa, K., Mizukawa, K., Mori, A. 1990. Time course of changes in lipid peroxidation in pre and postsynaptic cholinergic indices NMDA receptor binding and neuronal death in the gerbil hippocampus following transient ischemia. *Brain Res.* 40: 116-122.
- Halliwell, B., Aeschbach, R., Loliger, J., Arouma, O.I. 1995. The characterization of antioxidant. *J. Food Chem. Toxic.* 33: 601-617.
- Halliwell, B. 1999. Antioxidant defense mechanism: from the beginning to the end. (of the beginning). *Free Rad. Res.* 31: 261-272.
- Hanlon, D.P. 1971. Interaction of L-ergothioneine with metal ions and metalloenzymes. *J. Me. Chem.* 14:1084-1087.
- Heikkila, R.E., Cohen, G., 1971. Inhibition of biogenic amine uptake by hydrogen peroxide: mechanism for toxic effects of 6-hydroxydopamine. *Science.* 172: 1257-1258.
- Hiroki Misuyama and Jame M. May. 1999. Uptake and antioxidant effects of ergothioneine in human erythrocytes. *Clinic. Sci.* 97:407-411.
- [Http://books.google.co.th/books.id](http://books.google.co.th/books.id)
- [Http://en.wikipedia.org/wiki/thiol](http://en.wikipedia.org/wiki/thiol)
- [Http://en.wikipedia.org/wiki/spray-drying](http://en.wikipedia.org/wiki/spray-drying)
- [Http://www.agro.cmu.ac.th/e-book/protein](http://www.agro.cmu.ac.th/e-book/protein)
- [Http://www.chemicalbook.com](http://www.chemicalbook.com)
- [Http:// www.geocities.com/nawo_chemicaisandbeauty](http://www.geocities.com/nawo_chemicaisandbeauty)
- [Http://www.sithiphorn.com/newweb](http://www.sithiphorn.com/newweb)
- Huie, R.E. and Padmaja, S. 1993. The reaction of NO with superoxide. *Free Radic. Res. Commun.* 18: 195-199.
- Ishikawa, Y. 1974. Participation of an intermediate sulfoxide in the enzymatic thiolation of the imidazole ring of mercynine to form L-ergothioneine. *J. Biol. Chem.* 249:4420-4427.

- Jacob, J.L., Pre'vot, J.C., Roussel, D., Lacrotte, R., Serres, E., d'Auzac, J., Eschbach, J.M. and Omont, H. 1989. Yield limiting factors, latex physiological parameters, latex diagnosis and clonal typology. In *Physiology of rubber tree latex* (eds. J. d'Auzac, J.L. Jacob and H. Chrestin) pp. 345-382. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc.
- Jan, C., Marek, P.J. and Keith, B. 1974. Reaction of L-Ergothioneine and some aminothiones with 2,2'- and 4,4'-dipyridyl disulphides and of L-Ergothioneine with iodoacetamide. *Biochem. J.* 139: 221-235.
- Kawano, H., Cho, K., Haruna, Y., Kawai Y., Mayumi, Y., and Hama, T. 1983. Effect of L-ergothioneine on the hepatic drug metabolizing enzyme system and on experimental hepatic injury in rats. *Chem. Pharm. Bull.* 31: 1676-1681.
- Keher, J. 1993. Free radicals as mediators of tissue and disease. *Crit Rev Toxicol.* 23: 21-48.
- Kekwick, R.G.O. 1989. The formation of isoprenoids in *Hevea* latex. In *Physiology of rubber tree latex* (eds. J. d'Auzac, J.L. Jacob and H. Chrestin) pp. 145-164. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc.
- Kekwick, R. 1993. in: *Latex Protein Allergy: The Present Position* (European Rubber Journal), Amsterdam. 118-123.
- Kiedrowski, L., Costa, E., Wroblewski, J. T. 1992. Glutamate receptor agonists stimulate nitric oxide synthase in primary cultures of cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* 58: 335-341.
- Klaus-Dieter, A., Rene, V., Jean-Luc, B., Raymond, H. and Edward J. 1996. One-electron oxidation of ergothioneine and analogues investigated by pulse radiolysis: redox reaction involving ergothioneine and vitamin C. *Biochem. J.* 315: 625-629.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structure protein during assembly of head of bacteriophage-T. *Nature.* 227: 680-685.
- Lagraimini, L.M. and Rothstein, S. 1987. Tissue specificity of tobacco peroxidase isozymes and their induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. *Plant. Physiol.* 84: 438-442.
- Lind, C., Hochstein, P. and Ernster, L. 1982. DT-diaphorase as a quinone-reductase: a cellular control device against semiquinone and superoxide radical formation. *Arch. Biochem. Biophys.* 216: 175.

- List, P.H. and Horhammer, L. 1969-1979. Hager's handbuch der pharmazeutischen praxis. Springer-Verlag, Berlin. 2-6.
- Lynen, F. 1969. Biochemical problems of rubber synthesis. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya.* 21(4): 389-406.
- Marcuse, R. Antioxidant effect of amino-acid. 1960. *Nature.* 186: 886-887.
- Melville D.B., Donald, B. 1950. A method for the determination of ergothioneine in blood. *J. Biol. Chem.* 275-285.
- Melville, D.B. 1958. L-ergothioneine. *Vitam. and Horm.* 17: 155-204.
- Meucci, E. and Mele, M.C. 1997. Amino acid and plasma antioxidant capacity. Short Communication. *Amino Acids.* 12: 373-377.
- Morgan, P.W. and Dew, M.C. 1997. Ethylene and plant responses to stress. *Physiol.Plant.* 100:620-630.
- Morris, M., Philadelphia, P.A. and Lakin, B. 1995. Rubber Division, American Chemical Society Educational Symposium on Natural Rubber. *Latex: Educational Symposium.* 36.
- Motohashi, N., Mori, I., and Sugiura, Y. 1976. Complexing of copper ion by ergothioneine. *Chem. Pharm. Bull.* 24(10):2364-2368.
- OXIS International, Inc. Compound Monograph. L-Ergothioneine. http://www.oxis.com/ergo/l-ergothioneine_monograph.pdf.
- Packer, L., Tritschler, HJ. and Wessel, K. 1987. Neuroprotection by the metabolic antioxidant α -lipoic acid degeneration. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 34: 169-181.
- Pakianathan, S.W., Tata S.J. and Chon, L.F. 1992. Certain aspects of physiology and biochemistry of latex production. In: Sethurj, M.R., Mathew, N.M., (Eds.). *Developments in Crop Science, Natural Rubber: Biology, Cultivation and Technology*, vol.23. Elsevier, The Netherlands, pp. 298-323.
- Palosuo, T. 1996. Identifying and quantifying natural rubber protein allergens. *Proc. International conference on "Latex Protein Allergy: managing the issue"*, in Amsterdam, 11.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N. and Gordon, M. 2001. Antioxidant in food: practical applications. 380 pp. New York: CRC Press.
- Puerta, T. 1999. Inhibition of leukocytes lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochem. Pharm. J.* 57 (4): 445-449.

- Roberfrid M., Calderon PB. 1995. Definitions, properties and reactions of radicals. In: Roberfrid M., Calderon PB, editors. Free radicals and oxidation phenomena in biological systems. New York University of Catholique de louvain Brussels. 11-142.
- Ros, B.A., Pedreno, M.A., Munoz, R. and Subater, F. 1988. Luprine peroxidase: Isolation and characterization of cell wall-bound isoperoxidase activity. *Physiol Plant*. 71(4): 448-454.
- Rosen, G.M., Britigan, B.E., Halpern, H.J. and Pou, S. 1999. The oxygen paradox. In: Rosen, G.M., Britigan, B.E., Halpern, H.J., Pou, S. Free radical: biology and detection by spin trapping. Oxford: Oxford University press. p. 11-49.
- Sanchez-Moreno, C., Jimenez-Escoria, A. and Saura-Calixto, J. 2000. Study of low-density lipoprotein oxidizability indexes to measure the antioxidant activity of dietary polyphenols. *Nutr. Res*. 20 (7): 941-953.
- Schulz, J.B., Henshaw, D.W. and Siwek, D. 1995. Involvement of free radicals in excitotoxicity in vivo. *J. Neurochem*. 64: 2239-2247.
- Sen, C.K. 1995. Oxygen toxicity and antioxidant: state of art. *Indian J. Physio. Pharmacol*. 39: 177-196.
- Sharp, J.S., Becker, J.M. and Hattich, R.L. 2004. Analysis of protein solvent accessible surfaces by photochemical oxidation and mass spectrometry. *Anal. Biochem*. 76 (3): 672-683.
- Sherma, J., Sleckman, B.P. and Armstrong, D.W. 1983. Chromatography of amino acid on reversed phase thin layer plates. *J. Liq. Chromatogr*. 6: 95-108.
- Sies, H., Stahl, W. and Sundquist, A. 1992. Antioxidant functions of vitamins, vitamin E and C, beta-carotene and other carotenoids. *Ann. NY Acad. Sci*. 368: 7-19.
- Skinllerter, D.W. and Kekwick, R.G.O. 1968. Some characteristics of pyrophosphomevalonate decarboxylase from *Hevea brasiliensis latex*. *Biochem J*. 108: 11.
- Soares, J.K., Dins, T.C.P., Cunha, A.P. and Ameida, L.M. 1997. Antioxidant activity of some extracts of *Thymus zygis*. *Free Radic Res*. 26: 469-478.
- Stephens, R.J., Freeman, G. and Evans, M.J. 1972. Early response of lung to low levels of nitrogen light and electron microscopy. *Arch. Environ. Health*. 24: 160-179.
- Tan, C.H. and Audley, B.G. 1968. The uptake of ergothioneine from the soil into the latex of *Hevea brasiliensis*. *Phytochem*. 7:1999-2000.

- Tanret, C. 1909. Sur une base nouvelle retiree du seigle ergot, L-ergothioneine *Compt. Ren. Acad.Sci.* 149:222-224.
- Thiele, B., Fullner, K., Stein, N., Oldiges, M., Kuhn, A.J. and Hofmann, D. 2008. Analysis of amino acids without derivatization in barley extracts by LC-MS-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 391: 2663-2672..
- Touster, O.J. 1951. The L-ergothioneine content of human erythrocytes, the effect of age, race, malignancy and pregnancy. *J. Biol. Chem.* 188:371.
- Tritschler, H.J., Packer, L., Medori, R. 1994. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegeneration. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 34: 169-181.
- Truscott, W. 1992. in: International Latex Conference: Sensitivity to Latex in Medical Devices (US Food and Drug Administration, CDRH), Baltimore, MD.
- Truscott, W. 1995. in: Fink, J.N. (Ed.), Immunology and Allergy Clinics of North America, Saunders, Philadelphia, PA. pp. 89-121.
- Van Acker, F. A. A., Schouten, O., Haenen, G. R. M. M., van der Vijgh, w. J. F. and Best, A. 2000. Flavonoids can replace α -tocopherol as an antioxidant. *FEBS Lett.* 473: 145-148.
- Varner, J.E. and Lin, L-SH. 1989. Plant cell wall Architecture. *Cell.* 56(2): 231-239.
- Viljoen, C.D., Cloete, F., Botes, D.P. and Kruger, H. 1983. Isolation and characterization of NAD(P)H-dehydrogenases from seed of the castor bean. *Phytochem.* 22: 365.
- Wititsuwankul, R., Pasitkul, P., Kanokwiroon, K. and Wititsuwannakul, D. 2008. A role for a *Hevea* latex lectin-like protein in mediating rubber particle aggregation and latex coagulation. *Phytochem.* 69: 339-347.
- Wosilait, W.D. and Nason, A. 1954. Pyridine nucleotide quinone-reductase. I. purification and properties of the enzyme from pea-seeds. *J. Biol. Chem.* 206: 255.
- Yamasaki, E., Inagaki, M., Kurita, O., Inoue, T. 2007. Antioxidant activity of Japanese peppers (*Zanthoxylum piperitum* DC.) fruit. *J. Food Chem.* 100: 171-177.
- Yang, J-H., Mau, J-L., Ko, P-T. and Huang, L-C. 2000. Antioxidant properties of fermented soybean broth. *J. Food Chem.* 71: 249-254.
- Yanishlieva, N.V. 2001. Inhibiting oxidation. In: J. Pokorny, N. Yanishlieva and M. Gordon (eds.), Antioxidants in food: practical applications. 22-57. New York: CRC press.

- Yen, G.C., Chen, H.Y. 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food. Chem.* 43:27-37.
- Yong, W.M. and Singh, M.M. 1975. Thin-layer chromatographic resolution of free amino acid in clonal lattices of natural rubber. Proceedings of the International Rubber Conference, Kuala Lumpur.
- Zaccarato, F., Cavallini, L., Deana, R., Alexandre, R. 1988. Pathways of hydrogen-peroxide generation in guinea-pig cerebral cortex mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154: 727-734.
- Zhu, Q.Y., Hackman, R.M., Ensunsa, J.L. 2002. Antioxidative activities of oolong tea. *J. Agric. Food Chem.* 50: 6929-6934.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาววนิชฐิ์ สร้อยสุวรรณ

รหัสประจำตัวนักศึกษา 4910220074

วุฒิการศึกษา

วุฒิ

ชื่อสถาบัน

ปีที่สำเร็จการศึกษา

วิทยาศาสตรบัณฑิต

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2546

(วิทยาศาสตรทั่วไป สาขาวิชา

เคมี-ชีววิทยา)

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Soysuwan, W. and Wititsuwannakul, R. 2009. Ergothioneine antioxidant from *Hevea brasiliensis* latex. Graduate Research Conference. 4th. Burapha University. 13 Mar 2009.