เพอร์ออกซิเดสและสารต้านอนุมูลอิสระ

สมบัติ คงวิทยา

[1]กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กรุงเทพ 10400
Email: sombat_k2@hotmail.com

รับบทความ: 26 กุมภาพันธ์ 2554 ยอมรับตีพิมพ์: 31 พฤษภาคม 2554

บทคัดย่อ

เพอร์ออกซิเดส (E.C.1.11.1.7) เป็นเอนไซม์ที่เร่งสลายสับเสตรตโดยใช้ปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน ด้วยไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ มีการนำมาใช้ประโยชน์หลายด้าน เช่น การบำบัดน้ำเสียที่มีสารประกอบฟีนอล การสังเคราะห์สารอะโรมาติก และการตรวจสอบสารต้านอนุมูลอิสระ เพอร์ออกซิเดสพบได้ทั้งในจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย และ พืช ได้แก่ หัววาซาบิ กระหล่ำปลี และตำลึง จากปฏิกิริยาของเพอร์ออกซิเดส สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบสารต้านอนุมูลอิสระได้ ซึ่งเป็นความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสับสเตรตที่มีความไวของปฏิกิริยาสูง และผลิตภัณฑ์ที่ได้มีสีสามารถทำการติดตามด้วยเทคนิดสเปคโทรสโกปีได้

คำสำคัญ เพอร์ออกซิเดส สารต้านอนุมูลอิสระ อนุมูลอิสระ

Peroxidase and Antioxidant

Sombat kongwithtaya

Department of Science service, Ministry of Science and Technology, Bangkok 10330
E-mail: sombat_k2@hotmail.com

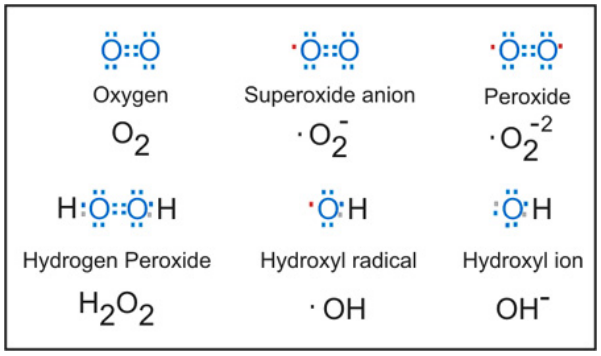
Abstract

Peroxidases (EC number 1.11.1.7) are enzymes that typically catalyze substrate by using oxidoreduction reacted with hydrogen peroxide. Applications of peroxidase can be used for treatment of industrial waste waters containing phenolic compounds, aromatic synthesis and determination of antioxidant content. These enzymes were found in bacteria and plants, horseradish root, cabbage and ivy gourd, respectively. The high sensitive reaction of peroxidase were selected and developed to determine antioxidant. The reaction product gave color therefore can detect by spectroscopic technique.

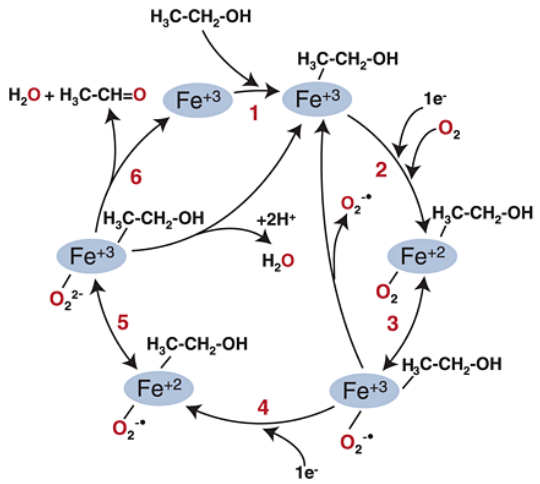
Keywords: Peroxidase, Antioxidant, free radical

อนุมูลอิสระ

ปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหายใจระดับเซลล์ของสิ่งมีชีวิต โดยมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนเพื่อสร้าง ATP (adenosine triphosphate) ซึ่งเป็นสารให้พลังงานสูง จากกระบวนการดังกล่าวมีการปล่อยอนุมูลของออกซิเจนที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเรียกว่า reactive oxygen species (ROS) ซึ่งเป็นกลุ่มสารที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ บางตัวจัดเป็นอนุมูลอิสระที่มีอิเล็กตรอนไม่ครบคู่ บางตัวไม่ใช่ แต่ทุกตัวมีความสามารถหรือมีความว่องไวมากในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ชนิดที่พบบ่อย เช่น superoxide radical ($O_2^{\bullet-}$) hydroxyl radical ($OH^{\bullet}$) และ peroxyl radical ($ROO^{\bullet}$) เป็นต้น (ภาพที่ 1)



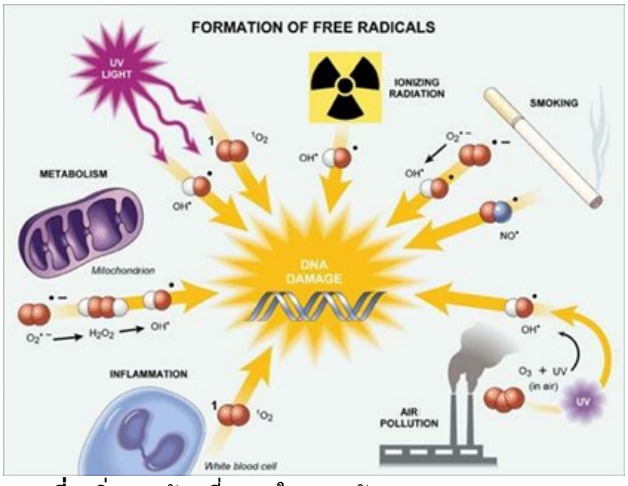
ภาพที่ 1 อนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆ(http://www.biotek.com/assets/ tech_resources/10592/fig1.jpg)



ภาพที่ 2 การสลายแอลกอฮอล์แล้วให้ superoxide radical ($O_2^{\bullet-}$) (http://www.niaaa.nih.gov/Resources/GraphicsGallery/Metabolism/Pages/reactive_oxygen.aspx)

อนุมูลอิสระเหล่านี้สามารถเกิดขึ้นเองภายในร่างกายในกระบวนการสร้างพลังงาน การเจริญเติบโตของเซลล์ ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และระบบส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ (signal transduction) นอกจากนี้อนุมูลอิสระยังเกิดขึ้นได้จากการได้รับสารพิษจากสิ่งแวดล้อม สารเคมี รังสี ยาบางชนิด หรือการสลายแอลกอฮอล์ (ภาพที่ 2)

อนุมูลอิสระเป็นโมเลกุลที่ไม่คงตัวจึงมีความไวสูงในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ ของร่างกาย ไม่ว่าจะเป็นไขมัน โคเลสเตอรอล กรดไขมันไม่อิ่มตัว โปรตีน และสารพันธุกรรมของร่างกาย จึงทำให้โครงสร้างบทบาทการทำงานของสารชีวโมเลกุลนี้มีความผิดปกติไป และ สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันต่อเนื่องจากสารชีวโมเลกุลหนึ่งไปยังสารชีวโมเลกุลอื่นจนเกิดอนุพันธ์ใหม่เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ได้ ทำให้เกิดการทำลายหรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของดีเอ็นเอ ทำให้มีการสร้างยีนที่ผิดปกติจนอาจกลายเป็นเซลล์มะเร็ง (ภาพที่ 3) (ไกรสิทธิ์ ตันติศิรินทร์ และคณะ, 2538; วาริน แสงกิตติโกมล, 2543; Halliwell and Gutteridge, 1989; Rimm et al., 1996; Steinmetz and Pottor, 1996; Lander, 1997; Lionis et al., 1998)

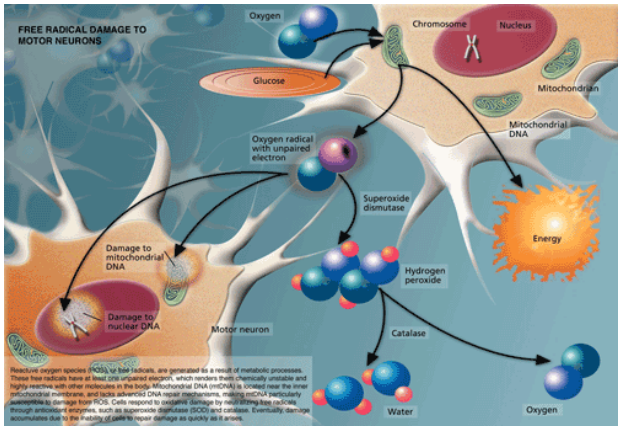


ภาพที่ 3 สิ่งแวดล้อมที่ส่งผลในการสร้าง superoxide radical ($O_2^{\bullet-}$) เป็นอันตรายต่อดีเอ็นเอ (http://www.smokersrx.com/why_skin_ages.html)

การควบคุมอนุมูลอิสระ

ภาวะปกติร่างกายจะมีกระบวนการควบคุมอนุมูลอิสระไม่ให้มากเกินไป โดยอาศัยสารต้านอนุมูลอิสระทั้งที่ร่างกายสร้างขึ้นเอง เช่น กลุ่มของเอนไซม์ ได้แก่ superoxide dis-

mutase, glutathione peroxidase และ catalase (ภาพที่ 4) รวมถึงกลุ่มของโปรตีนจับโลหะ (metal-binding protein) ได้แก่ ferritin, ceruloplasmin, transferrin และ uric acid (Halliwell and Gutteridge, 1989; Ames et al., 1993) หากกระบวนการเหล่านี้ต่ำลงหรือมีภาวะที่ทำให้อนุมูลอิสระสูงขึ้นมากในร่างกายจะทำให้สมดุลเสียไปเรียกว่า เกิดภาวะเครียดจากการออกซิเดชัน (oxidative stress) เกิดการทำลายสารชีวโมเลกุล ได้แก่ ไขมัน คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และกรดนิวคลีอิกที่เป็นสารพันธุกรรม เป็นอันตรายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆ จึงมีความจำเป็นต้องได้รับสารที่จะช่วยจัดการกับอนุมูลอิสระเพิ่มเติมจากภายนอกร่างกาย เช่น อาหารจำพวกผัก ผลไม้ และสมุนไพร ซึ่งมีสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด เช่น สารประกอบฟีนอลิก วิตามินซี วิตามินอี และเบต้าแคโรทีน เป็นต้น (วาริน แสงกิตติโกมล, 2546; Halliwell and Gutteridge, 1989; Middleton et al., 2000; Helmja et al., 2007)

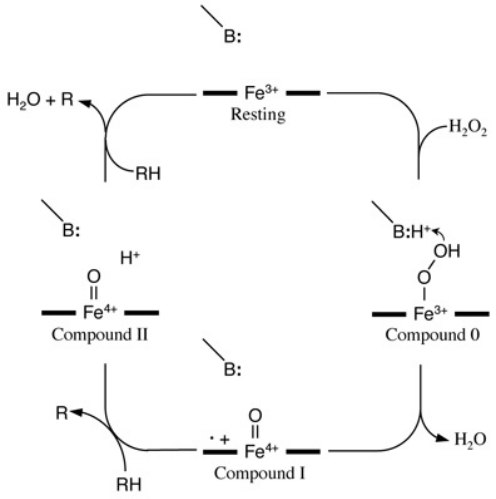


ภาพที่ 4 ผล superoxide radical ($O_2^{\bullet-}$) เป็นอันตรายต่อเซลล์ประสาทและมีการประสานงานของระบบต่างๆ เพื่อเปลี่ยนให้เป็นน้ำและออกซิเจน (http://www.humpath.com/spip.php?article878&id_document=24413#documents_portfolio)

เอนไซมเพอร์ออกซิเดส

เพอร์ออกซิเดส (Peroxidases) (E.C.1.11.1.7) เป็นเอนไซม์ที่เร่งสลายสับเสตรตโดยใช้ปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน ด้วยไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (ภาพที่ 5) เอนไซม์เพอร์ออกซิเดสนำมาใช้ประโยชน์หลายด้าน ได้แก่ การบำบัดน้ำเสียที่มีสารประกอบฟีนอล และ การสังเคราะห์สารอะโรมาติก (Agostini et al., 1997; Hammerschmidt et al., 1982)

ROOR' + electron donor (2 e^-) + $2H^+$ ⟶ ROH + R'OH



ภาพที่ 5 แสดงปฏิกิริยาของเพอร์ออกซิเดส (http://www.riken.go.jp/biometal/8_reactions.files/pages/peroxidase.htm)

แหล่งที่พบเพอร์ออกซิเดสมีทั่วไปในจุลินทรีย์ สัตว์ และพืช (Kim and Yoo, 1996; Yamada et al., 1987; Welinder, 1992; Dunford, 1999; Zamocky, 2004; Habetha and Bosch, 2005; Cavalier-Smith, 2004) มีรายงานพบเพอร์ออกซิเดสใน Horseradish root tubers และเซลล์ขนรากของแครอท โดยเฉพาะใน Horseradish root tubers มีการนำไปผลิตเพอร์ออกซิเดสในระดับอุตสาหกรรม (Welinder, 1992; Dunford, 1999; Saitou et al., 1991) นอกจากนี้ยังมีรายงานในพืชชนิดอื่นๆ ที่สามารถผลิตเพอร์ออกซิเดสได้ เช่น ในตำลึง (Kongwitthaya et al., 2010) และกระหล่ำปลี (ชะอรทิพย์ และคณะ, 2553) ทั้งนี้เพื่อจะนำเพอร์ออกซิเดสที่ได้ไปใช้การพัฒนาตรวจสอบสารแอนติออกซิแดนต์ (Alpeeva et al., 2005; Gaspar, 2000)

สารต้านอนุมูลอิสระ

สารประกอบฟีนอลิกจัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้รับจากภายนอก พบได้มากตามธรรมชาติและพบได้ในอาหารและเครื่องดื่มที่ได้จากพืชเช่น ผัก ผลไม้ สมุนไพร ธัญพืชต่างๆ ไวน์ เบียร์ ชา กาแฟ เป็นต้น สารประกอบฟีนอลมีมากกว่า 8,000 ชนิด ได้แก่ flavonoids, flavones, gallic acid, ellagic acid, ligin, tannin, anthocyanins,

carotenoids และอนุพันธ์ของ cinnamic acid แสดงดังภาพที่ 6 (Cowan, 1999; Helmja et al., 2007) สารในกลุ่มนี้เป็นสารที่ให้สีสันแก่พืช ผัก ผลไม้เช่น สาร carotenoids ให้สีส้ม เหลืองในแครอท ฟักทอง มะละกอ สาร anthocyanins พบในผลเชอร์รี่ทำให้มีสีแดง ผลองุ่น ดอกอัญชันมีสีม่วง ซึ่งมีประโยชน์ใช้ล่อแมลง นก หรือผึ้งเข้ามาผสมเกสร สารต้านอนุมูลอิสระพวกนี้ทำให้พืชมีภูมิคุ้มกันจากการติดเชื้อต่างๆ และสามารถทนต่อปฏิกิริยา photooxidation ในการสร้างอาหารได้ แม้ว่าปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกในธรรมชาติจะมีปริมาณที่แตกต่างกันออกไปในพืชต่างชนิดกัน หรือแม้แต่ในพืชชนิดเดียวกัน ซึ่งมาจากสถานที่ผลิตที่แตกต่างกัน แต่พบว่าโดยเฉลี่ยที่คนได้รับต่อวันจะอยู่ในช่วงตั้งแต่ 20 mg – 1 g ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงกว่าปริมาณวิตามินอีที่ได้รับต่อวัน (วาริน แสงกิตติโกมล, 2543, 2546; ศรีจันทร์ พรจิราศิลป์, 2546; โอภา วัชระคุปต์, 2549)

การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ

การตรวจวิเคราะห์ความสามารถรวมในการต้านอนุมูลอิสระสามารถตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP และ TEAC ซึ่งทั้ง 2 วิธีเป็นกลไกในการส่งผ่านอิเล็กตรอนไปรีดิวซ์สารอื่น โดยวิธี FRAP เป็นการวัดความสามารถรวมในการรีดิวซ์สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก Fe^{3+}-TPTZ (ferric tri-pyridyl tri-azine) ส่วนวิธี TEAC เป็นการวัดความสามารถในการขจัดอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ ที่มีสีเขียวปนน้ำเงิน (โอภา วัชระคุปต์, 2549) นอกจากนี้ยังมีการวิเคราะห์ที่ใช้เครื่องมือที่มีสมรรถนะสูง เช่น High Performance Lipuiq Chromatography (HPLC) หรือแม้แต่ใช้วิธีที่มีความจำเพาะสูงระหว่าเอนไซม์กับสับสเตรต (Steinberg, 1991; Ascherio et al., 1992; Block et al., 1992; Ames et al., 1993; Gillman et al., 1995)

ประโยชน์ของสารต้านอนุมูลอิสระ

จากการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าผักใบเขียว ผลไม้และสมุนไพรมีสารประกอบฟีนอลเป็นองค์ประกอบและมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ถ้ารับประทานอาหารประเภทผักใบเขียว ผลไม้และสมุนไพรเป็นประจำทำให้ร่างกายสามารถป้องกันโรคที่มีสาเหตุจากการทำลายของอนุมูลอิสระ เช่น โรคไขมันในเลือดสูง โรคหัวใจ โรคหลอดเลือดหัวใจตีบ เบาหวาน โรคมะเร็ง โรคไต รวมทั้งความแก่ชราได้

บทสรุป

เพอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่มีการใช้ในอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวาง ทั้งในการวินิจฉัยทางการแพทย์ การใช้ประโยชน์ทางด้านอาหาร เครื่องดื่ม เภสัชกรรม ใช้ในการกำจัดสารพิษและสารก่อมะเร็งบางชนิด รวมทั้งการบำบัดน้ำเสียที่มีสารประกอบพวกฟีนอลหรืออนุพันธ์ของฟีนอลซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งจากโรงงานพลาสติก และ เรซิน โรงงานสิ่งทอ โรงงานผลิตเยื่อกระดาษ เป็นต้น ทำให้น้ำเสียที่ผ่านกระบวนการบำบัดด้วยเอนไซม์มีความปลอดภัยต่อชุมชนหรือสิ่งแวดล้อม (Aberti and Klibanob, 1981; Flock et al., 1999; Weng et al., 1991; Wu et al., 1999) ด้วยเหตุดังกล่าวเป็นผลให้ปริมาณความต้องการเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสเพิ่มสูงขึ้น อย่างไรก็ตามเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสที่มีจำหน่ายในปัจจุบันมีราคาแพงเนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่นำเข้าจากต่างประเทศซึ่งผลิตจากพืช Horseradish ดังนั้นการวิจัยเกี่ยวกับเพอร์ออกซิเดสเพื่อหาแหล่งผลิตยังคงมีอย่างต่อเนื่อง (Kongwithtaya et al., 2010; ชะอรทิพย์ และคณะ, 2553)

เอกสารอ้างอิง

ไกรสิทธิ์ ตันติศิรินทร์ ประภาศรี ภูวเสถียร และริญ เจริญศิริ. (2538). **โภชนาการและส่งเสริมสุขภาพ.** กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล.

ชะอรทิพย์ แย้มด้วง สมบัติ คงวิทยา สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ และสุรศักดิ์ ละลอกน้ำ. (2553). การศึกษาสมบัติของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสบริสุทธ์บางส่วนจากกะหล่ำปลี. **วารสารหน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้** 1(1): 27-34.

วาริน แสงกิตติโกมล. (2543). **ปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระในผัก ผลไม้และสมุนไพร. วารสารสหเวชศาสตร์** 1: 11-18.

วาริน แสงกิตติโกมล. (2546). การเปรียบเทียบปริมาณสารโพลีฟีโนลิกส์และปริมาณรวมการต้านสารอนุมูลอิสระในผักและสมุนไพร. **วารสารสหเวชศาสตร์** 3: 91-99.

ศรีจันทร์ พรจิราศิลป์. (2546). **ความก้าวหน้าทางเภสัชวิทยา.** กรุงเทพมหานคร: นิวไทยการพิมพ์.

โอภา วัชระคุปต์ ปรีชา บุญจูง จันทนา บุณยะรัตน์ และมาลีรักษ์ อัตต์สินทอง. (2549). **สารต้านอนุมูลอิสระ.** กรุงเทพฯ: พี.เอส.พริ้นท์.

Aberti, N. B., And Klibanov, A. M. (1981). Enzymatic removal of dissolved aromatics from industrial aqueous effluent. **Biotechnol. Bioeng.** 11: 373-390.

Agostini, E., Medina, M. J., Silvia, R., Forchetti, M. D., and Tigier, H. (1997). Properties of anionic peroxiase isoenzymes from turnip (*Brassica napus* L.) roots. **J. Agric. Food Chem.** 45, 596 – 598.

Alpeeva, I. S., Niculescu-Nister, M., Leon, J. C., Csoregi, E., and Sakharov, I.Y. (2005). Palm tree peroxidase-based biosensor with unique characteristics for hydrogen peroxide monitoring. **Biosens. Bioelect.** 21: 742-748.

Ames, B. M., Shinena, M. K., and Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants and the degenerative disease of aging. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 90: 7915-22.

Ascherio, A., Rimm, E. B., Glovannucci, E. L., Colditz, G. A., Rosner, B., Willett, W. C., Sacks and Stampfer, M.J. (1992). A prospective study of nutritional factors and hypertension among US men. **Circulation** 86:1475-84.

Block, G., Patterson, B., and Subar, A. (1992). Fruits vegetables and cancer preventive: a review of the epidemiological evidence. **Nutrition and Cancer** 18: 1-29.

Cavalier-Smith, T. (2004). Only six kingdoms of life. **Proc. Biol. Sci**. 271: 1251-1262.

Cowan, M. M. (1999). Plant products as Antimicrobial agents. **Clin. Microbial.** 12: 564-582.

Dunford, H.B. (1999). Heme peroxidase nomenclature. **Plant Peroxidase Newsl.** 13: 65-71.

Flock, C., Bassi, A., and Gijzen, M. (1999). Removal of aqueous phenol and 2-chlorophenol with purified soybean peroxidase and raw soybean hulls. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 74: 303-309.

Gaspar, S., Popescu, I. C., Gazaryan, I. G., Bautista, G., Ardila, G., Sakharov, I. Y., Mattiasson, B., and Csoregi, E. (2000). Biosensor based on novel plant peroxidases: a comparative study. **Electrochem. Acta.** 46: 255-264.

Gillman, M. W., Cupples, L. A., Gagnon, D., Posner, B. M., Ellison, R. C., Castelli, W. P., and Wolf, P. A. (1995). Protective effect of fruits and vegetables on development of stroke in men. **JAMA** 273: 113-117.

Habetha, M., and Bosch, T.C. (2005). Symbiotic Hydra express a plant-like peroxidase gene during oogenesis. **J. Exp. Biol.** 208 (Pt 11): 2157-2165.

Halliwel, B., and Gutteridge, J. M. C. (1989). Free radicals in biology and medicine. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press.

Hammerschmidt, R., Nuckles, E.M., and Kuc, J. (1982). Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiol. Plant Pathol.** 20: 73-82.

Helmja, K., Vaher, M., Gorbatsova, J., and Kaljurand, M. (2007). Characterization of bioactive compounds contained in vegetables of the Solanaceae family by capillary electrophoresis. **Proc. Estonian. Acad. Sci. Chem.** 56: 172-186.

Kim, Y. H., and Yoo, J. J. (1996). Peroxidase production from carrot hairy root cell culture. **Enzyme Microb. Technol.** 18: 531-535.

Kongvithtaya, S., Laloknam, S., and Chairote, G. (2010). **Characterization of ammonium precipitatant peroxidase from Ivy gourd.** Pure and Applied Chemistry International Conference 2010, Ubol Ratchathani University, Ubol Ratchathani.

Lander, H. M. (1997). An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. **FASEB J.** 11: 118-124.

Lionis, C., Faresjo, A., Skoula, M., Kapsoke-falou, M., and Faresjo, T. (1998). Antioxidant effects of herbs in Crete. **The lancet** 352: 1987-1988.

Middleton, E., Jr., Kanaswami C., Theoharides , T.C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. **Pharmacol. Rev.** 52: 673-839.

Rimm, E. B., Ascherio, A., Giovannucci, E., Spiegelman, D., Stampfer, M.J. and Willett, W.C. (1996). Vegetable, fruit and cereal fiber intake and risk of coronary heart disease among men. **JAMA** 275: 447-51.

Saitou, T., Kamada, H., and Harada, H. (1991). Isoperoxidase in hairy roots and regenerated plants of horse radish (*Armoracia lapathifolia*). **Plant Sci.** 75: 195-201.

Steinberg, D. (1991). Antioxidants and atherosclerosis: A current assessment. **Circulation** 84: 1420-1425.

Steinmetz, K. A., and Pottor, J. D. (1996). Vegetable, fruit and cancer prevention: A review. **J. Am. Diet. Assoc.** 96: 1027-1039.

Welinder, K. G. (1992). Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. **Curr. Opin. Struct. Biol.** 2: 388-393.

Weng, Z., X. M. Handrick and G. Maesmans. (1991). immobilized peroxidase: A potential bioindicator for Evaluation of Thermal Process. **J. Food Sci.** 56: 567-750.

Wu, Y., Taylor, K. E. Biswas, N., and Bewtra, J. K. (1999). Kinetic model aided reactor design for peroxidase-catalysed eemoval of phenol in the presence of polyethylene glycol. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 74: 519-526.

Yamada, Y., Kobayashi, S., Watanabe, K. Q., and Hayashi, U. (1987). Production of horse radish peroxidase by plant cell culture. **J. Chem. Tech. Biotechnol.** 38: 31-39.

Zamocky, M. (2004). Phylogenetic relationships in class I of the superfamily of bacterial, fungal, and plant peroxidases. **Eur. J. Biochem.** 271: 3297-3309.

แหล่งสืบค้นจากินเทอร์เน็ต

http://www.niaaa.nih.gov/Resources/GraphicsGallery/Metabolism/Pages/reactive_oxygen.aspx สืบค้นเมื่อวันที่ 20 ธันวาคม 2553

http://www.biotek.com/assets/tech_resources/10592/fig1.jpg) สืบค้นเมื่อวันที่ 20 ธันวาคม 2553

http://www.smokersrx.com/why_skin_ages.html สืบค้นเมื่อวันที่ 20 ธันวาคม 2553

http://www.riken.go.jp/biometal/8_reactions.files/pages/peroxidase.htm สืบค้นเมื่อวันที่ 20 ธันวาคม 2553