



สัญญาเลขที่ RDG5120072

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “ ผลไม้ไทยต้านออกซิเดชันในโรคเบาหวานและ
โรคหลอดเลือดหัวใจ: การปกป้องไม่ให้เกิดออกซิเดชันต่อลิโปโปรตีน
โปรตีนและการสลายไฟบรินในหลอดทดลอง ”

เสนอต่อ

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ฝ่ายเกษตร (ฝ่าย 2)

โดย

ผศ.ดร.รุ่งสิริ ไซติปฏิเวชกุล

วันที่ 28 มกราคม พ.ศ. 2553

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “ ผลไม้ไทยต้านออกซิเดชันในโรคเบาหวานและ
โรคหลอดเลือดหัวใจ: การปกป้องไม่ให้เกิดออกซิเดชันต่อลิโปโปรตีน
โปรตีนและการสลายไฟบรินในหลอดทดลอง”

ผศ.ดร.รุ่งสริ โขติปฏิเวชกุล

แขนงวิชาเคมีคลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์

คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

	หน้า
สารบัญรูป	3
สารบัญตาราง	6
abstract	7
บทคัดย่อ	8
บทนำ	9
วัตถุประสงค์	12
วิธีการทดลอง	13
ผลการทดลอง	21
วิจารณ์ผลการทดลอง	50
สรุปผลการทดลอง	57
ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต	58
เอกสารอ้างอิง	59
output จากโครงการที่ได้รับทุนจากสกว.	62
ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้และกิจกรรมที่ดำเนินมา และผลที่ได้รับตลอดโครงการ	63
ภาคผนวก	64

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานของการตรวจวัด malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาไลโปโปรตีนออกซิเดชัน	22
รูปที่ 2 กราฟมาตรฐานของการตรวจวัดปริมาณโปรตีน	22
รูปที่ 3 ผลของ glutathione ในการยับยั้งปฏิกิริยาไลโปโปรตีนออกซิเดชัน ในรูปของ TBARS formation (MDA) ซึ่งแสดงค่าเป็น % เทียบกับ control คือไลโปโปรตีนที่ถูกออกซิไดซ์ใน สภาวะที่ไม่มี glutathione	24
รูปที่ 4 แสดงผลการยับยั้ง Lipoprotein oxidation โดยสารสกัดมังคุด ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในรูปของ TBARS คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับ Oxidized Lipoprotein	29
รูปที่ 5 แสดงผลการยับยั้ง Lipoprotein oxidation โดยสารสกัดมะม่วงเขียวเสวยดิบ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในรูปของ TBARS คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับ Oxidized Lipoprotein	29
รูปที่ 6 แสดงผลการยับยั้ง Lipoprotein oxidation โดยสารสกัดมะม่วงน้ำดอกไม้สุก ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในรูปของ TBARS คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับ Oxidized Lipoprotein	30
รูปที่ 7 แสดงผลการยับยั้ง Lipoprotein oxidation โดยสารสกัดส้มโอที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในรูปของ TBARS คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับ Oxidized Lipoprotein	30
รูปที่ 8 แสดงผลการยับยั้ง Lipoprotein oxidation โดยสารสกัดมะละกอดิบ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในรูปของ TBARS คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับ Oxidized Lipoprotein	31
รูปที่ 9 แสดงผลการยับยั้ง Lipoprotein oxidation โดยสารสกัดมะละกอสุก ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในรูปของ TBARS คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับ Oxidized Lipoprotein	31
รูปที่ 10 แสดงผลการยับยั้ง Lipoprotein oxidation โดยสารสกัดกล้วยน้ำว้า ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในรูปของ TBARS คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับ Oxidized Lipoprotein	32

รูปที่ 11 แสดงผลการยับยั้ง Lipoprotein oxidation โดยสารสกัดฝรั่ง ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในรูปของ TBARS คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับ Oxidized Lipoprotein	32
รูปที่ 12 ผลของ glutathione ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในพลาสมาของผู้ป่วย เบาหวาน ในรูปของ TBARS formation (MDA) ซึ่งแสดงค่าเป็น % เทียบกับ control คือพลาสมาที่ถูกออกซิไดซ์ในสภาวะที่ไม่มี glutathione	33
รูปที่ 13 ผลของสารสกัดมะม่วงดิบ ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ในพลาสมา ของผู้ป่วยเบาหวาน ในรูปของ TBARS formation (MDA) ซึ่งแสดงค่าเป็น % เทียบกับ control คือพลาสมาที่ ถูกออกซิไดซ์ในสภาวะที่ไม่มีสารสกัดมะม่วงดิบ	34
รูปที่ 14 ผลของสารสกัดส้มโอในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในพลาสมาของผู้ป่วย เบาหวาน ในรูปของ TBARS formation (MDA) ซึ่งแสดงค่าเป็น % เทียบกับ control คือพลาสมาที่ถูกออกซิไดซ์ในสภาวะที่ไม่มีสารสกัดส้มโอ	34
รูปที่ 15 ผลของสารสกัดมะละกอดิบในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในพลาสมา ของผู้ป่วยเบาหวาน ในรูปของ TBARS formation (MDA) ซึ่งแสดงค่าเป็น % เทียบกับ control คือพลาสมาที่ถูก ออกซิไดซ์ในสภาวะที่ไม่มีสารสกัดมะละกอดิบ	35
รูปที่ 16 ผลของสารสกัดฝรั่งในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในพลาสมาของผู้ป่วย เบาหวาน ในรูปของ TBARS formation (MDA) ซึ่งแสดงค่าเป็น % เทียบกับ control คือพลาสมาที่ถูกออกซิไดซ์ในสภาวะที่ไม่มีสารสกัดฝรั่ง	35
รูปที่ 17 ผลของ glutathione ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในพลาสมาของคนที่มี สุขภาพดี ในรูปของ TBARS formation (MDA) ซึ่งแสดงค่าเป็น % เทียบกับ control คือพลาสมา ที่ถูกออกซิไดซ์ในสภาวะที่ไม่มี glutathione	36
รูปที่ 18 ผลของสารสกัดมะม่วงดิบ ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ในพลาสมา ของคนที่มีสุขภาพดี ในรูปของ TBARS formation (MDA) ซึ่งแสดงค่าเป็น % เทียบกับ control คือพลาสมาที่ ถูกออกซิไดซ์ในสภาวะที่ไม่มีสารสกัดมะม่วงดิบ	37
รูปที่ 19 ผลของสารสกัดส้มโอในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในพลาสมาของคน ที่มีสุขภาพดี ในรูปของ TBARS formation (MDA) ซึ่งแสดงค่าเป็น % เทียบกับ control คือพลาสมาที่ถูก ออกซิไดซ์ในสภาวะที่ไม่มีสารสกัดส้มโอ	37

รูปที่ 20 ผลของสารสกัดมะละกอดิบในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในพลาสมาของคนที่สุขภาพดี ในรูปของ TBARS formation (MDA) ซึ่งแสดงค่าเป็น % เทียบกับ control คือพลาสมาที่ถูก ออกซิไดซ์ในสภาวะที่ไม่มีสารสกัดมะละกอดิบ	38
รูปที่ 21 ผลของสารสกัดฝรั่งในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในพลาสมาของคนที่สุขภาพดี ในรูปของ TBARS formation (MDA) ซึ่งแสดงค่าเป็น % เทียบกับ control คือพลาสมา ที่ถูกออกซิไดซ์ ในสภาวะที่ไม่มีสารสกัดฝรั่ง	38
รูปที่ 22 ผลของการเกิดปฏิกิริยาโปรตีนออกซิเดชันระหว่าง BSA กับ $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ ที่ระยะเวลา 20, 30, 45 และ 60 นาที [U=untreated BSA, GSH = glutathione]	42
รูปที่ 23 ภาพของสารสกัดผลไม้ชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 5-400 $\mu\text{g/ml}$ ในการต้านออกซิเดชันต่อโปรตีน BSA ที่ถูกออกซิไดซ์ด้วย $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$, U = untreated (BSA), T = treated (BSA + $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$), GSH = Glutathione	43
รูปที่ 24 การก่อตัวของไฟบริน (a) และ (b) แสดงผลการสลายไฟบริน(fibrinolytic activity) แสดงดังส่วนสีที่ปรากฏ โดยสารมาตรฐาน thrombin และสารสกัดผลไม้ต่างๆ ที่ความเข้มข้น 40 mg/ml	46

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงผลการยับยั้ง Lipoprotein oxidation โดย glutathione (GSH) ที่ความเข้มข้นต่างๆ	25
ตารางที่ 2 แสดงผลการยับยั้ง Lipoprotein oxidation โดยสารสกัดมังคุด, มะม่วงเขียวเสวยดิบ, มะม่วงน้ำดอกไม้สุก และส้มโอ ที่ความเข้มข้นต่างๆ	26
ตารางที่ 3 แสดงผลการยับยั้ง Lipoprotein oxidation โดย สารสกัดมะละกอดิบ, มะละกอสุก, กล้วยน้ำว้า และฝรั่ง ที่ความเข้มข้นต่างๆ	27
ตารางที่ 4 แสดงค่า IC ₅₀ ของสารสกัดผลไม้ชนิดต่างๆ	28
ตารางที่ 5 แสดง % การยับยั้ง plasma oxidation จากพลาสมาของคนสุขภาพดีและผู้ป่วยเบาหวาน โดยสารสกัดผลไม้ที่ความเข้มข้นต่างๆ	39
ตารางที่ 6 (ต่อ) แสดง % การยับยั้ง plasma oxidation จากพลาสมาของคนสุขภาพดีและผู้ป่วยเบาหวาน โดยสารสกัดผลไม้ที่ความเข้มข้นต่างๆ	40
ตารางที่ 7 ปริมาณ carbonyl content และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 370 nm ของสารละลายโปรตีน BSA ที่ผสมกับน้ำตาลกลูโคส 100 mM ในสภาวะที่มีและไม่มีสารสกัดผลไม้ เป็นเวลา 4 และ 8 สัปดาห์	44
ตารางที่ 8 ปริมาณ carbonyl content และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 370 nm ของ สารละลายโปรตีน BSA ที่ผสมกับน้ำตาลกลูโคส 500 mM ในสภาวะที่มีและไม่มีสารสกัดผลไม้ เป็นเวลา 4 และ 8 สัปดาห์	45
ตารางที่ 9 แสดงผลการสลายไฟบรินโดย plasmin และสารสกัดมะละกอสุก	47

Abstract

Project Code: RDG5120072

Project Title: Antioxidative effects of Thai fruits in diabetes mellitus and cardiovascular diseases: Protection against lipoprotein, protein oxidation and their fibrinolytic activities

Investigator: Assist. Prof. Dr. ROONGSIRI CHOTPADIWETKUL

E-mail Address: c_roongsiri@hotmail.com

Project Period: 12 months (August 1st, 2008 –July 31st, 2009)

This study aimed to investigate the antioxidative effect upon lipoprotein oxidation, plasma oxidation, protein oxidation and fibrinolytic activities of Thai fruits including mangosteen, raw mango (Kheosawoei), ripe mango (Nahmdawgmai), pomelo, raw papaya, ripe papaya, banana (Nahmwah) and guava. Water extracts of Thai fruits were lyophilized. The concentrations used in this study were 5-400 µg/ml along with the standard antioxidants; glutathione and vitamin C. Lipoprotein and plasma oxidation was analyzed in terms of the reduction of malondialdehyde (MDA) formation by TBARS assay. Inhibition of protein oxidation by Thai fruit extracts was assessed by the recovered band intensity on SDS-PAGE as compared to the $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ treated-BSA. Protection of high-glucose induced protein BSA oxidation was analysed by the level of protein carbonyl content. In order to assess the fibrinolytic activity, the *in vitro* modified fibrin plate assay was employed using plasmin as a standard. All Thai fruits significantly attenuated lipoprotein and plasma oxidation ($p < 0.05$). The IC_{50} of Thai fruit extracts in lipoprotein oxidation was as follows; guava (59.7 µg/ml) < raw papaya (85.0 µg/ml) < banana (Nahmwah) (144.9 µg/ml) ~ ripe papaya (146.9.0 µg/ml) ~ ripe mango (Nahmdawgmai) (148.5.0 µg/ml) < pomelo (231.6 µg/ml) < mangosteen (236.5 µg/ml) < raw mango (Kheosawoei) (522.7 µg/ml). Thus, Guava exhibited strongest antioxidant activity in protection against lipoprotein oxidation. Moreover, guava also inhibited plasma peroxidation from healthy subjects and diabetes patients more than other Thai fruit extracts ($74.9 \pm 4.52\%$, $66.1 \pm 1.63\%$, respectively). Mangosteen clearly protected $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ – induced protein oxidation, followed by riped mango and pomelo, respectively. Unfortunately, the results of *in vitro* protein glycation as assessed by protein carbonyl content were inconclusive. According to the fibrinolytic activities, ripe papaya, at 2 mg, produced clear zone equivalent to plasmin at less than 2 µg. In summary, Thai fruits attenuate lipoprotein oxidation, plasma peroxidation, protein oxidation and possess fibrinolytic activity. This has to be pursued *in vivo* for their effects in protection and treatment of diabetes mellitus and cardiovascular disease.

Key words: Thai fruits, lipoprotein oxidation, plasma oxidation, protein oxidation, MDA

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: RDG5120072

ชื่อโครงการ: ผลไม้ไทยต้านออกซิเดชันในโรคเบาหวานและโรคหลอดเลือดหัวใจ:
การปกป้องไม่ให้เกิดออกซิเดชันต่อลิโปโปรตีน โปรตีนและการสลายไฟบรินในหลอดทดลอง

ชื่อนักวิจัย: นางรุ่งสิริ โชติปฏิเวชกุล

E-mail Address: c_roongsiri@hotmail.com

ระยะเวลาโครงการ: 12 เดือน (1 สิงหาคม พ.ศ. 2551 – 31 กรกฎาคม พ.ศ. 2552)

การศึกษาครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในการยับยั้งออกซิเดชันของลิโปโปรตีน พลาสมาและโปรตีน รวมถึงฤทธิ์การสลายไฟบรินของผลไม้ไทย ได้แก่ มังคุด, มะม่วง, เชื้อเห็ดเหวยดิบ, มะม่วงน้ำดอกไม้สุก, ส้มโอ, มะละกอดิบ, มะละกอสุก, กล้วยน้ำว้า และฝรั่ง สกัดผลไม้ด้วยน้ำกลั่นและนำไปสกัดแห้ง ความเข้มข้นที่ทดสอบคือ 5-400 $\mu\text{g/ml}$ โดยมี glutathione และวิตามินซีเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน วิเคราะห์ฤทธิ์ในการยับยั้งออกซิเดชันของลิโปโปรตีนและพลาสมาจากปริมาณ MDA ด้วยวิธี TBARS วัดฤทธิ์การยับยั้งโปรตีน BSA ที่ถูกออกซิไดซ์ด้วย Cu^{2+} และ H_2O_2 ในรูปของความเข้มข้นของแถบโปรตีนบนเจลด้วยวิธี SDS-PAGE วัดฤทธิ์การยับยั้งโปรตีนออกซิเดชันจากการชักนำด้วยกลูโคสความเข้มข้นสูงด้วยการวัด protein carbonyl content สำหรับการทดสอบฤทธิ์การสลายไฟบรินทำโดยวิธี *in vitro* modified fibrin plate ผลการทดลองพบว่าสารสกัดผลไม้ไทยทั้ง 8 ชนิด มีฤทธิ์ลดการเกิดออกซิเดชันของลิโปโปรตีนและพลาสมาได้อย่างมีนัยสำคัญ ค่า IC_{50} ของการยับยั้งลิโปโปรตีนออกซิเดชันเรียงตามลำดับดังนี้คือ ฝรั่ง (59.7 $\mu\text{g/ml}$) < มะละกอดิบ (85.0 $\mu\text{g/ml}$) < กล้วยน้ำว้า (144.9 $\mu\text{g/ml}$) ~ มะละกอสุก (146.9 $\mu\text{g/ml}$) ~ มะม่วงน้ำดอกไม้สุก (148.5 $\mu\text{g/ml}$) < ส้มโอ (231.6 $\mu\text{g/ml}$) < มังคุด (236.5 $\mu\text{g/ml}$) < มะม่วงเห็ดเหวยดิบ (522.7 $\mu\text{g/ml}$) ดังนั้นฝรั่งจึงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในการป้องกันลิโปโปรตีนออกซิเดชันสูงที่สุด นอกจากนั้นฝรั่งยังยับยั้งพลาสมาออกซิเดชันจากคนที่มีสุขภาพดี และจากผู้ป่วยเบาหวานได้ดีที่สุดด้วย (74.9 $\pm$ 4.52%, 66.1 $\pm$ 1.63% ตามลำดับ) ส่วนฤทธิ์ในการต้านโปรตีนออกซิเดชันจาก Cu^{2+} และ H_2O_2 พบว่าสารสกัดมังคุด ยับยั้งได้ดีที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดมะม่วงน้ำดอกไม้สุกและสารสกัดส้มโอ อย่างไรก็ตาม ผลการยับยั้ง การเกิด glycation ในหลอดทดลองจากการวัดปริมาณ protein carbonyl ยังสรุปผลไม่ได้แน่ชัด สำหรับผลการสลายไฟบรินพบว่า สารสกัดมะละกอสุก ที่ความเข้มข้น 2 mg สามารถทำให้เกิดส่วนไลเทียกับ plasmin คิดเป็นความเข้มข้น < 2 μg จากผลการทดลองทั้งหมด แสดงให้เห็นว่าผลไม้ไทยสามารถลดการเกิดออกซิเดชันของลิโปโปรตีนและพลาสมา ต้านโปรตีนออกซิเดชัน รวมทั้งมีฤทธิ์สลายไฟบริน ซึ่งจะต้องศึกษาในร่างกาย (*in vivo*) ต่อไป เพื่อจะนำไปประยุกต์ใช้ในการนำไปป้องกันและรักษาโรคเบาหวาน และโรคหลอดเลือดหัวใจได้

คำหลัก: ผลไม้ไทย, ลิโปโปรตีนออกซิเดชัน, พลาสมาออกซิเดชัน, โปรตีนออกซิเดชัน

I. บทนำ

ทางที่ดีที่สุดในการรักษาสุขภาพให้แข็งแรงทำได้ไม่ยากด้วยการรับประทานอาหารให้ครบสมดุล “You are what you eat” นั้น เป็นจริงตลอดกาล ผลไม้และผักสดเป็นแหล่งของ micronutrients กลุ่มวิตามิน เกลือแร่ที่ยั่งยืน (sustainable) และซื้อหามารับประทานได้ (affordable) ที่สำคัญคือ ผลไม้เมืองร้อน (tropical fruits) จัดเป็นแหล่งของ ‘balanced diverse diet’ อันอุดมสมบูรณ์ (อ้างอิงจากรายงานของ UN ปี 2004) การบริโภคผลไม้และผักสดมากพอ จะช่วยลดอุบัติการณ์ของโรคความเสื่อมสภาพต่างๆ เมื่อเราย่างก้าวเข้าสู่วัยชรา ได้แก่ โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจตีบตัน การอักเสบ โรคไขข้ออักเสบ ภูมิคุ้มกันต่ำ โรคทางสมอง อัลไซเมอร์ พาร์กินสัน และโรคต้อ เป็นต้น (1,15)

ร่างกายของเรานั้นต้องเผชิญกับสารอนุมูลอิสระอย่างต่อเนื่องและหลีกเลี่ยงไม่ได้ ทั้งที่สร้างขึ้นเองจากภาวะออกซิเดชันภายในตัวและจากสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น อาหาร สารเคมี ยา หรือแสง UV อันเป็นสาเหตุให้เกิดความเสียหายต่อโครงสร้างของสารชีวโมเลกุลต่างๆ เช่น ไขมัน โปรตีนและกรดนิวคลีอิก ทำให้ไม่สามารถทำงานได้เป็นปกติ อันเป็นจุดเริ่มต้นของการเกิดพยาธิสภาพของโรคที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพของร่างกายดังกล่าวข้างต้น (13)

จาก World health report ปี 2002 รายงานว่า การรับประทานผลไม้ไม่เพียงพอทำให้เกิดโรคหัวใจ 31 % โรคมะเร็งกระเพาะอาหารและลำไส้ 19% และ stroke 11% ทั่วโลก (World Health Report 2002) ส่วนการรับประทานผลไม้เพิ่มมากขึ้น ช่วยลดอุบัติการณ์ของโรคมะเร็ง ~ 5-12% (WHO International Agency for Research on Cancer [IARC] 2003) และในบรรดา dietary factors ทั้งหมดที่มีอิทธิพลต่อการป้องกันโรคมะเร็ง นับว่ามีหลักฐานการวิจัยเกี่ยวกับคุณประโยชน์ของการบริโภคผลไม้และผักสดมากที่สุด องค์การอนามัยโลกแนะนำให้ ควรรับประทานผลไม้และผักสดให้ได้วันละประมาณ 5-10 กำมือ นอกจากนั้น หากรับประทานผลไม้ปริมาณมากๆ ก็ไม่ได้มีผลข้างเคียงหรือเป็นพิษแต่อย่างใด (19)

ผลไม้ในเขตเมืองร้อน นอกจากขึ้นชื่อเรื่องรสชาติแล้ว ยังมีสรรพคุณเป็นยามาช้านาน เช่น ต้มน้ำสัปปะรด ช่วยบรรเทาอาการเจ็บคอและเมือกคื่น (20) กล้วยช่วยป้องกันมะเร็งลำไส้ และมะเร็งเต้านม (11,40) ฝรั่งต้านการเป็นโรคเบาหวาน (27) เป็นต้น ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่า

เราสามารถนำผลไม้ต่าง ๆ มาใช้รักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพของร่างกายได้ งานวิจัยเพื่อหาสารต้านอนุมูลอิสระในผลไม้ที่สามารถยับยั้ง หรือชะลอกระบวนการออกซิเดชันของสารชีวโมเลกุลเหล่านี้ จึงมีความสำคัญมากต่อการนำไปใช้ป้องกันโรคต่างๆได้ จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลไม้ไทยโดยวิธี DPPH radical scavenging assay พบว่าเปลือกองุ่น หม่อน (mulberry) มะม่วง มะเฟือง ฝรั่ง รวมถึง ลิ้นจี่ จัดอยู่ในกลุ่มที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง (IC_{50} 1.10-9.60 mg/ml) ส่วนกลุ่มที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระปานกลาง ได้แก่ มังคุด ส้ม ส้มโอ องุ่น และมะละกอ (IC_{50} 11.18-32.8 mg/ml) สำหรับน้ำส้ม ชมพู และขนุน จัดอยู่ในกลุ่มที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำ (IC_{50} 50.62-110.46 mg/ml) (28) จากการศึกษาผลไม้เมืองร้อนที่วางขายในตลาดสิงคโปร์โดยอีกวิธีหนึ่งคือ ABTS^{•+} decolorization assay พบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลไม้ต่างๆ เรียงลำดับจากมากไปหาน้อย ดังนี้คือ ฝรั่ง (จากไทย) > มังคุด (จากมาเลเซีย) > มะม่วง (จากฟิลิปปินส์) จัดอยู่ในกลุ่มที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง สำหรับส้มโอ (จากมาเลเซีย) > เงาะ (จากมาเลเซีย) > กล้วย (จากฟิลิปปินส์) จัดอยู่ในกลุ่มที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระปานกลาง (20) ฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระที่อยู่ในผลไม้สดนอกเหนือ จากวิตามินซี (ascorbic acid) วิตามินอี (tocopherol) แคโรทีนอยด์ ที่รู้จักกันดี ยังมาจากพวก soluble fibers และสารต้าน อนุมูลอิสระอื่นๆ เช่นพวก polyphenol กลุ่ม flavonoids เช่น ferulic acid, catechins (22) ซึ่งมีสัดส่วนและปริมาณแตกต่างกันไปในผลไม้แต่ละชนิด ดูเหมือนคำพูดที่ว่า “an apple a day keeps the doctor away” จะเป็นจริงขึ้นมาแล้ว เนื่องจากมีหลักฐานงานวิจัยสนับสนุนที่มีน้ำหนักน่าเชื่อถือจำนวนไม่น้อย (24,30) หากผลไม้ไทยบ้านเรา มีผลงานวิจัยมารองรับ อีกไม่นาน เราคงมีสโลแกนโปรโมตผลไม้ไทยบ้าง เช่น “A mangosteen a day keeps the doctor away” หรือ “A mango a day keeps the doctor away” จากเว็บไซต์ ของ net news publisher วันที่ 15 พฤศจิกายน พ.ศ. 2550 ได้นำเสนอข่าวถึงการนำ เข้าผลไม้สดของไทยสู่ประเทศสหรัฐอเมริกาเป็นครั้งแรก ได้แก่ มังคุด เงาะ ลำไย ลิ้นจี่ มะม่วงและสับปะรด เนื่องจากที่ผ่านมา สหรัฐฯ นำเข้าแต่ผลไม้ไทยกระป๋องและน้ำผลไม้เท่านั้น เป็นที่คาดว่า จะมีการนำเข้าผลไม้ไทยอื่นๆตามฤดูกาลเพิ่มขึ้นอีก

(<http://www.netnewspublisher.com/six-fresh-fruits-from-thailand-enter-the-united-states-for-the-first-time/>) การศึกษานี้

เป็นการประเมินศักยภาพของผลไม้ไทยในการนำมาใช้ป้องกันโรค หลอดเลือดหัวใจตีบตัน โรคเบาหวานและภาวะแทรกซ้อนที่ตา โรคความจำเสื่อม โดยอาศัยฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นสาเหตุพื้นฐานของโรคดังกล่าว ทำโดยการวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้ง Lipoprotein oxidation ฤทธิ์ Fibrinolytic activities ฤทธิ์ป้องกันการเกิด plasma peroxidation ฤทธิ์การยับยั้งออกซิเดชันของโปรตีนจากการชักนำด้วยกลูโคสความเข้มข้นสูง และฤทธิ์ป้องกันการเกิดออกซิเดชันของโปรตีนด้วย $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ โดยวิธี SDS-PAGE ข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการส่งเสริมสุขภาพและป้องกันโรค ด้วยการหันมาบริโภคผลไม้ของไทยที่ปลูกในบ้านเรา ช่วยเสริมสร้างเศรษฐกิจ การจ้างงาน ธุรกิจการส่งออก และชีวิตความเป็นอยู่โดยรวม

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อตรวจวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้ง Lipoprotein oxidation ในผลไม้ไทย
2. เพื่อตรวจวัดฤทธิ์ป้องกันการเกิด plasma peroxidation ในผลไม้ไทย
3. เพื่อตรวจหาฤทธิ์ป้องกันการเกิดออกซิเดชันของโปรตีนด้วย $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ โดยวิธี SDS-PAGE ในผลไม้ไทย
4. เพื่อตรวจวัดฤทธิ์การยับยั้งออกซิเดชันของโปรตีนจากการชักนำด้วยกลูโคส ความเข้มข้นสูงในผลไม้ไทย
5. เพื่อตรวจวัดฤทธิ์ Fibrinolytic activities ในผลไม้ไทย

วิธีการทดลอง

ผลไม้ที่นำมาทดสอบ

1. มังคุด (Mangosteen) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Garcinia mangostana* L. เป็นพันธุ์พื้นเมือง
ซึ่งเป็นพันธุ์เดียวที่ปลูกในเมืองไทย มาจากภาคใต้
ส่วนที่นำมาทดสอบคือ ผล
2. มะม่วง (Mango) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Mangifera indica* Linn.
พันธุ์ที่ทดสอบคือ พันธุ์เขียวเสวย (ดิบ), พันธุ์น้ำดอกไม้ (สุก)
ส่วนที่นำมาทดสอบคือ ผล
3. ส้มโอ (Pomelo) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Citrus maxima* (Burm.f.) Merr.
พันธุ์ที่ทดสอบคือ พันธุ์ทองดี ส่วนที่นำมาทดสอบคือผล
4. มะละกอ (Papaya) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Carica papaya* L.
พันธุ์ที่ทดสอบคือ พันธุ์แขกดำ ส่วนที่นำมาทดสอบคือ ผล
- 5.กล้วยน้ำว้า (Banana) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Musa sapientum* L.
ส่วนที่นำมาทดสอบคือ ผล
6. ฝรั่ง (Guava) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Psidium guajava* L.
ส่วนที่นำมาทดสอบคือ ผล

การเตรียมตัวอย่างสารสกัดจากผลไม้ไทย

เนื้อผลไม้ 100 กรัม กับน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำไปปั่นให้ละเอียด คนโดยใช้ magnetic stirrer ที่ 4°C ขำมคั้น กรองเอากากผลไม้โดยใช้ผ้าขาวบาง 2 ครั้ง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman® NO. 1 นำไปเข้าเครื่องระเหยแห้ง (Lyophilizer) เก็บสารสกัดที่ -20°C ในภาชนะทึบแสง

การเตรียมสารสกัดผลไม้ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

หลังจากได้สารสกัดผลไม้ในรูปผงแห้ง เตรียม stock สารสกัดโดยนำสารสกัดมาชั่งในอัตราส่วน 5 mg ในน้ำกลั่น 1 ml (ความเข้มข้นสุดท้าย 5 mg/ml) เจือจางในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 5, 50, 100, 200, 400 µg/ml การทดลองแต่ละครั้ง ทำ triplicates ไม่น้อยกว่า 2-independent experiments

การตรวจวิเคราะห์ว่าผลไม้ไทยชนิดใดมีฤทธิ์ในการยับยั้ง Lipoprotein oxidation(31)

ผลไม้ที่นำมาทดสอบ ได้แก่ 1) มังคุด 2) มะม่วงเขียวเสวย (ดิบ) 3) มะม่วงน้ำดอกไม้ (สุก)

4) ส้มโอ 5) มะละกอ (ดิบ) 6) มะละกอ (สุก) 7) แก้วน้ำว้า 8) ฝรั่ง

ตัวอย่างพลาสมา เก็บในรูป pooled plasma จากพลาสมาที่เหลือใช้จากการตรวจทางห้องปฏิบัติการของผู้ที่มีสุขภาพดี และต้องผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะเทคนิคการแพทย์ มช.

วิธีการ ตกตะกอน apo B-containing lipoprotein (LDL & VLDL) จากพลาสมา 500 µl ด้วยสารละลาย 0.2 mM dextran sulphate, 0.5 M $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ตามวิธีของ Bachorik และ Albers ((Bachorik and Albers 1986) หลังจากปั่นที่ 3000 x g, 20°C, 10 นาที ดูด supernatant ทิ้งไป แล้วเติม 6% BSA 1 ml และ 0.2 mM dextran sulphate, 0.5 M $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 50 µl เขย่าโดยการ vortex สั้นๆ และปั่นซ้ำ เพื่อกำจัด HDL และโปรตีนในซีรัมที่อาจตกค้างอยู่ ดูด supernatant ทิ้งไป ส่วนตะกอน (LDL&VLDL) ให้ละลายใน 4% NaCl 2.5 µl นำส่วนตะกอนที่มี non-HDL cholesterol อยู่ ~ 100 µg มาผสมกับ 4% NaCl ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 500 µl (เจือจาง ~1:5) เติมสารสกัดผลไม้ อุ่นที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที ทำควบคู่กับหลอดควบคุมที่ไม่ได้เติมสารสกัดผลไม้ จากนั้นออกซิไดซ์ด้วย $CuSO_4$ และ H_2O_2 ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 250 µM และ 0.198 mM ตามลำดับ อุ่นที่ 37°C, 3 ชั่วโมง โดยเขย่าตลอดเวลา วัด TBARS โดยการเติมสารละลาย TBARS ต้มที่ 100 °C 15 นาที

แช่หลอดให้เย็นลงใน ice bath แล้วเติม butanol 2.5 ml vortex และปั่นที่ 3000 rpm 15 นาที
ดูดเอาส่วนใส สีชมพูไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 532 nm ตามวิธี Modified's Smith method

การตรวจสอบหาปริมาณ MDA โดยวิธี Modified's Smith method (33)

หลักการ

MDA จะทำปฏิกิริยากับ Thiobarbituric acid (TBA) ในสภาวะที่เป็นกรดและมีความร้อน เกิด MDA-TBA₂ complex เกิดขึ้นซึ่งมีสีชมพูอมส้ม วัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ 532 nm.

วิธีการทดลอง

1. เตรียมหลอดทดลองขนาด 16 x 100 mm. เติมน้ำต่าง ๆ ดังตารางต่อไปนี้

สารเคมี	ปริมาตร
Sample (μl)	100
NSS (μl)	450
TBA reagent (μl)	200
TCA reagent (μl)	100

2. ผสมให้เข้ากัน แล้วต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที

3. ครบเวลาแล้วยกออก เติม Butanol 2.5 มิลลิตร ผสมให้เข้ากัน

4. ปั่นด้วยความเร็ว 3,000 rpm. เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

5. นำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 nm. โดยใช้ Butanol ปรับ 0

การทำ Standard Tetraethoxypropane (TEP)

นำ Working TEP 100 μmol/L มาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง เพื่อให้มีความเข้มข้นดังต่อไปนี้

ความเข้มข้น μM	TEP 100 μM (μl.)	น้ำกลั่น(μl.)
10	10	90
20	20	80
30	30	70
40	40	60
50	50	50
60	60	40
70	70	30
80	80	20

การตรวจวิเคราะห์ Protein โดยวิธี BCA Protein Assay Kit (PIERCE)

วิธีการทดลอง

1. Standard, Unknown 25 μ l ลงใน microplate
2. เติม BCA reagent 200 μ l mix plate โดยใช้ plate shaker นาน 30 วินาที
3. ปิดฝา plate และ อุณหภูมิ 37°C 30 นาที
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 nm โดยใช้ plate reader

การทำกราฟมาตรฐานของ BSA

นำ Stock BSA ความเข้มข้น 2,000 μ g/ml มาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ตามอัตราส่วนดังต่อไปนี้

Vial	น้ำกลั่น (μ l)	Stock BSA(μ l)	ความเข้มข้น (μ g/ml)
A	0	60	2,000
B	25	75	1,500
C	65	65	1,000
D	35	35 μ l of Vial B dilution	750
E	65	65 μ l of Vial C dilution	500
F	65	65 μ l of Vial E dilution	250
G	65	65 μ l of Vial F dilution	125
H	80	20 μ l of Vial G dilution	25
I	80	0	0 = Blank

นำ Standard ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ไปวิเคราะห์หาค่าโปรตีน ดังวิธีที่กล่าวมาข้างต้น จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน

การตรวจวิเคราะห์ว่าผลไม้ไทยชนิดใด ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง **plasma peroxidation**

ในคนที่มีสุขภาพดีและในผู้ป่วยโรคเบาหวาน (6,26)

ผลไม้ที่นำมาทดสอบ เลือกผลไม้ที่มีรสหวานน้อย ได้แก่ 1) มะม่วงเขียวเสวย (ดิบ) 2) ส้มโอ 3) มะละกอ (ดิบ) 4) ฝรั่ง

ตัวอย่างพลาสมา เก็บในรูปแบบ pooled plasma จากพลาสมาที่เหลือใช้จากการตรวจทางห้องปฏิบัติการของผู้ป่วยโรคเบาหวาน (n=5) และผู้ที่มีสุขภาพดี (n=5) โดยต้องผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์และคณะเทคนิคการแพทย์ มช.

วิธีการ นำ pooled plasma 1 ส่วน ผสมกับ PBS (pH 7.4) 4 ส่วน จากนั้นนำพลาสมาที่เจือจางแล้วมา 2 ml เติมสารสกัดจากผลไม้ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 5, 50, 100, 200 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ ในปริมาตร 250 μl ลงในแต่ละหลอด โดยหลอดควบคุมคือ หลอดที่ไม่ใส่สารสกัดผลไม้ แต่เติมน้ำกลั่นลงไปแทน จากนั้นเติม CuSO_4 ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 250 μM โดยปริมาตรรวมเท่ากับ 500 μl อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ในที่มืด เขย่าตลอดเวลา ตรวจวัด plasma peroxidation โดยวิธีมาตรฐาน TBARS (Phelps and Harris 1993) ในสภาวะที่มีและไม่มีสารสกัดผลไม้เปรียบเทียบกัน คำนวณปริมาณ MDA จากค่า extinction coefficient $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

การตรวจหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในผลไม้ไทยที่สามารถป้องกันการเกิดออกซิเดชันของโปรตีน

ผลไม้ที่นำมาทดสอบ ได้แก่ 1) มังคุด 2) มะม่วงเขียวเสวย (ดิบ) 3) มะม่วงน้ำดอกไม้ (สุก) 4) ส้มโอ 5) มะละกอ (ดิบ) 6) มะละกอ (สุก) 7) กล้วยน้ำว้า 8) ฝรั่ง

วิธีการ ละลายโปรตีนอัลบูมิน (BSA) ใน 150 mM phosphate buffer (pH 7.3) ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 1 mg/ml ชักนำให้เกิดการทำลายโปรตีนโดยอนุมูลอิสระที่เกิดจาก ปฏิกิริยาของ 0.05 mM Cu^{2+} และ 0.625 mM H_2O_2 ภายใต้สภาวะที่มีและไม่มีสารสกัดจากผลไม้ ที่ 37°C

เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไป run ใน 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis ย้อมด้วย 0.15% Coomassie brilliant blue 30 นาที และ destain ให้พื้นหลังใส การประเมินผลการยับยั้งโปรตีนออกซิเดชัน ทำโดยการวัดความเข้มของแถบโปรตีนโดยโปรแกรม Scion Image Beta 4.02 for Windows TM ดาวน์โหลดจากเว็บไซต์ <http://www.scioncorp.com> ในการทดลองนี้ใช้ glutathione เป็นสารมาตรฐาน

การตรวจวิเคราะห์ว่าผลไม้ไทยชนิดใด มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดโปรตีนคาร์บอนิล

ผลไม้ที่นำมาทดสอบ เลือกผลไม้ที่มีรสหวานน้อย ได้แก่ 1) มะม่วงเขียวเสวย (ดิบ) 2) ส้มโอ 3) มะละกอ (ดิบ) 4) ฝรั่ง

วิธีการ ผสมสารละลาย 2% BSA ใน PBS เติมสารละลายกลูโคสให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5, 50, 100, 500 mM ในปริมาตร 3 ml ในสภาวะที่มีและไม่มีสารสกัดผลไม้ โดยเติม penicillin G-streptomycin 10 µl/ml เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย นำไปอุ่นที่ 37 °C เป็นเวลา 4-8 สัปดาห์ วัดความขุ่นของสารละลาย โดยดูจากค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นที่ความยาวคลื่น 370 nm รวมทั้งสังเกตความขุ่นโดยการวางทาบบนตัวอักษร เปรียบเทียบกับหลอดที่มีแต่สารละลายกลูโคสเพียงอย่างเดียว และหลอดที่มีวิตามินซี

หมายเหตุ เนื่องจากการทดสอบความขุ่นโดยการวางทาบบนตัวอักษร สังเกตไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงใดๆ ถึงแม้จะทำซ้ำแล้ว จึงได้ทำการทดสอบเพิ่มเติมโดยการทำ protein carbonyl content (Levine, *et al* 2000) ดังนี้

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณ Protein carbonyl content

นำตัวอย่างทดสอบปริมาตร 1 ml มาเติม 10 mM DNPH ใน 2 M HCl ปริมาตร 1 ml ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer จากนั้น incubate ไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาทีพอดี เติม 10% cold TCA ลงไป ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer จากนั้นนำไปปั่นที่ 3500

rpm นาน 20 นาที เมื่อครบเวลา เทน้ำส่วนบนทิ้งให้เหลือตะกอนของโปรตีนไว้ (ระวังในการเทน้ำส่วนบนออก อย่าให้ตะกอนโปรตีนฟุ้งกระจาย เพราะจะมีผลต่อปริมาณที่ทดสอบ) จากนั้นล้างตะกอนโปรตีนด้วย ethanol:ethyl acetate (1:1 v/v) 2 ml จำนวน 3 ครั้ง แล้วจึงเติม 6 M guanidine hydrochloride (pH 2.3) ลงไป 1 ml ผสมให้เข้ากันด้วย เครื่อง vortex mixer จากนั้น incubate 37° C นานเป็นเวลา 10 นาที ขั้นตอนสุดท้ายปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 3500 rpm เป็นเวลา 2 นาที ตูดเอาน้ำใสส่วนบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นที่ 370 nm บันทึกค่า absorbance เพื่อนำไปคำนวณหาค่า protein carbonyl content โดยใช้ค่า molar extinction coefficient ของ DNPH รายงานค่าออกมาในหน่วย nmol/mg protein โดยใช้สูตรการคำนวณ ดังนี้

$$\text{Protein carbonyl content (nmol/mg protein)} = \frac{\text{OD}_{370} \times 10^6 \times \text{sample volume (ml)}}{\epsilon \times \text{total volume (ml)} \times \text{mg protein}}$$

หมายเหตุ ค่า $\epsilon = 22,000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$

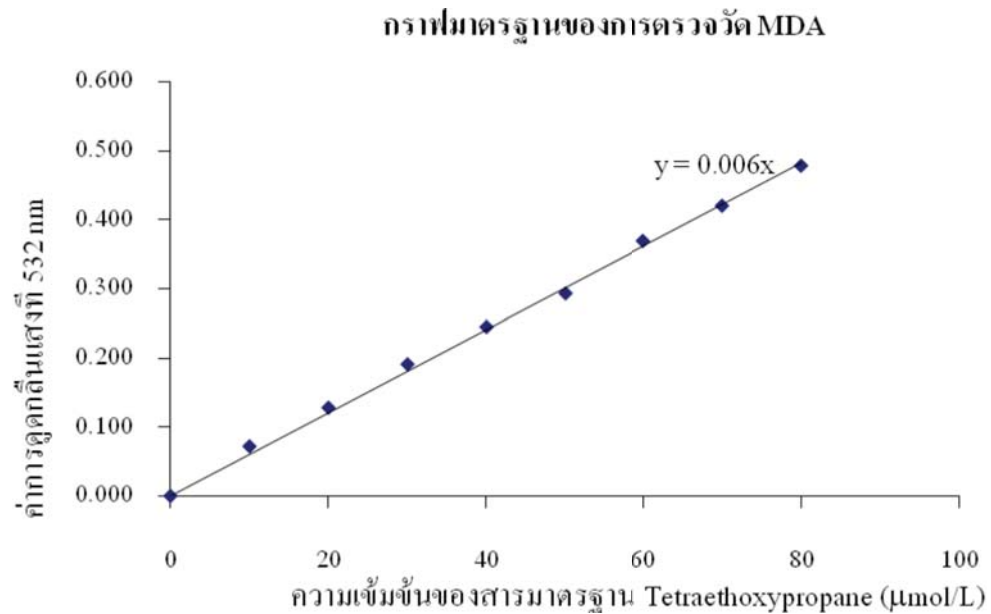
การตรวจวิเคราะห์ว่า ผลไม้ไทยชนิดใดที่มีฤทธิ์ **Fibrinolytic activities** ด้วยวิธี
***in vitro* modified fibrin plate assay** ของ **Astrup** และ **Mullertz (3)**

ผลไม้ที่นำมาทดสอบ ได้แก่ 1) มังคุด 2) มะม่วงเขียวเสวย (ดิบ) 3) มะม่วงน้ำดอกไม้ (สุก)
4) ส้มโอ 5) มะละกอ (ดิบ) 6) มะละกอ (สุก) 7) กัลยัญจ 8) ฝรั่ง

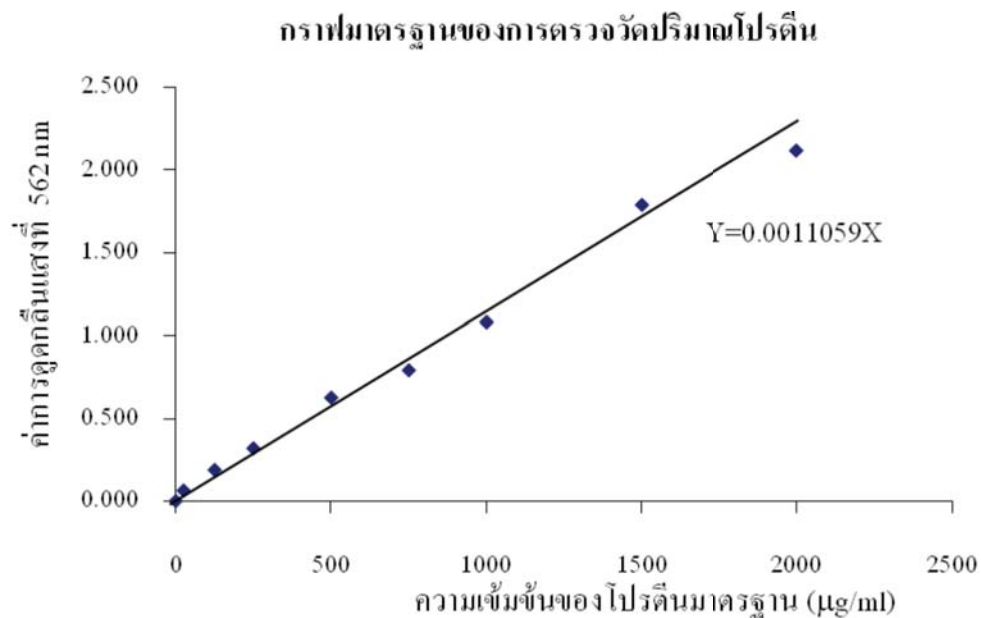
วิธีการ ใช้ plasmin เป็นสารมาตรฐาน ทำโดยปเปตสารละลาย fibrinogen (0.6% human fibrinogen in 20 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0) 10 ml ลงในจานอาหารผสมเข้ากันกับสารละลาย thrombin (100 NIH U/ml ใน 20 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, 0.1 M NaCl) 0.1 มล. ทิ้งไว้ให้เกิดการสร้าง fibrin layer เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นหยด sample ที่เป็นสารสกัดผลไม้ความเข้มข้น 40 mg/ml ลงไป 50 μ l อุ่นที่ 37 °C 8 ชม. วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของแถบใส (cleared zone) Fibrinolytic activity แสดงในรูปของพื้นที่ ของแถบใส (cleared zone) ที่เกิดขึ้น

ผลการทดลอง

การวัดฤทธิ์ของผลไม้ไทยในการยับยั้ง Lipoprotein oxidation ไม่ได้ใช้การปั่นแยก Lipoprotein โดยวิธี ultracentrifugation แต่ทำโดยการเตรียม Lipoprotein จากพลาสมา ด้วยวิธีการตกตะกอนแทน ซึ่งจะได้ apo B-containing lipoprotein ที่ประกอบด้วย LDL และ VLDL ผสมกันอยู่ จากนั้นได้ทดลองออกซิไดซ์ Lipoprotein ดังกล่าวด้วย CuCl_2 แต่ให้ผลการออกซิไดซ์น้อยมาก ค่าการดูดกลืนแสงต่ำเกินไป (ไม่ได้แสดงผล) จึงได้ทดลองเปลี่ยนมาออกซิไดซ์ด้วย CuSO_4 ร่วมกับ H_2O_2 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ ความเข้มข้นสุดท้ายของ CuSO_4 และ H_2O_2 เท่ากับ 250 μM และ 0.198 mM ตามลำดับ โดยค่าการดูดกลืนแสงเมื่อวัดปริมาณของสารผลิตภัณฑ์คือ malondialdehyde (MDA) ที่เกิดขึ้นโดยปฏิกิริยา TBARS ซึ่งเป็นผลพวงของปฏิกิริยาลิโปโปรตีนออกซิเดชัน สามารถเทียบจากกราฟมาตรฐานที่ใช้ Tetraethoxypropane (TEP) เป็นสารมาตรฐาน ดังรูปที่ 1 ค่าของ MDA จะรายงานในหน่วย nmol/mg protein ซึ่งปริมาณโปรตีนต่อพลาสมา ตัวอย่างที่เป็น pooled plasma ปริมาตร 500 μl ที่วัดโดยเทียบกราฟมาตรฐานจากวิธี Bicinchoninic acid ดังรูปที่ 2 ได้ค่าอยู่ระหว่าง 6.2-10.2 $\mu\text{g/ml}$



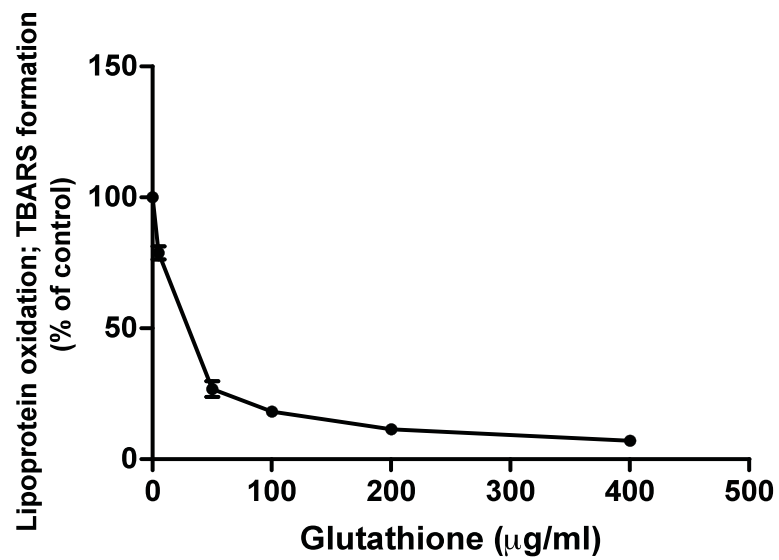
รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานของการตรวจวัด Malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลิโปโปรตีนออกซิเดชัน โดยใช้ Tetraethoxypropane (TEP) ที่เป็นสารตั้งต้น (precursor) ของ MDA เป็นสารมาตรฐาน



รูปที่ 2 กราฟมาตรฐานของการตรวจวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bicinchoninic acid (BCA) Protein Assay

ผลของสารสกัดผลไม้ในการยับยั้งปฏิกิริยาลิโปโปรตีนออกซิเดชัน แสดงในรูปของ MDA ที่ลดลง เมื่อเทียบกับลิโปโปรตีนที่ถูกออกซิไดซ์ในสภาวะที่ไม่มีสารสกัด ความเข้มข้นของสารสกัด ที่ใช้คือ 5, 50, 100, 200, 400 mg/ml โดยใช้ glutathione (GSH) เป็นแอนติออกซิแดนท์ มาตรฐานที่ความเข้มข้นเดียวกัน glutathione แสดงผลการยับยั้งปฏิกิริยาลิโปโปรตีน ออกซิเดชันแบบขึ้นกับความเข้มข้น (concentration-dependent manner) ดังรูปที่ 3 ส่วนฤทธิ์ ของสารสกัดผลไม้ต่างๆ ได้แก่ มังคุด มะม่วงดิบ มะม่วงสุก ส้มโอ มะละกอดิบ มะละกอสุก กล้วยน้ำว้า และฝรั่งในการยับยั้งปฏิกิริยาลิโปโปรตีนออกซิเดชัน แสดงดังรูปที่ 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ตามลำดับ ส่วน % การยับยั้งปฏิกิริยาลิโปโปรตีน ออกซิเดชันโดยสารสกัดผลไม้ แสดงดังตารางที่ 1 สารสกัดผลไม้ทุกชนิดและทุกความเข้มข้น (5, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$) สามารถยับยั้งปฏิกิริยาลิโปโปรตีนออกซิเดชันได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$, Mann Whitney U test, SPSS V.14)

จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดผลไม้ทุกชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งลิโปโปรตีนออกซิเดชัน โดยมีค่า IC_{50} ที่คำนวณโดยใช้โปรแกรม ED50 plus V 1.0 เรียงตามลำดับจากน้อยไปหามาก ดังนี้คือ ฝรั่ง < มะละกอดิบ < กล้วยน้ำว้า ~ มะละกอสุก ~ มะม่วงน้ำดอกไม้สุก < ส้มโอ < มังคุด < มะม่วงเขียวเสวยดิบ ดังตารางที่ 3 แสดงว่า ฝรั่งมีฤทธิ์การยับยั้งลิโปโปรตีน ออกซิเดชันที่ดีที่สุด ส่วนมะม่วงเขียวเสวยดิบมีฤทธิ์การยับยั้งลิโปโปรตีนออกซิเดชันน้อยที่สุด



รูปที่ 3 ผลของ glutathione ในการยับยั้งปฏิกิริยาลิโปโปรตีนออกซิเดชัน ในรูปของ TBARS formation (MDA) ซึ่งแสดงค่าเป็น % เทียบกับ control คือลิโปโปรตีนที่ถูกออกซิไดซ์ใน สภาวะที่ไม่มี glutathione

ตารางที่ 1 แสดงผลการยับยั้ง Lipoprotein oxidation โดย glutathione (GSH) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารสกัด	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	TBARS formation (MDA) (nmolMDA/mg protein)	% inhibition of lipoprotein oxidation	% of oxidized lipoprotein
Lipoprotein	-	0.12	-	-
Ox-lipoprotein	-	12.06	-	-
GSH	5	10.3 $\pm$ 0.87	21.2 $\pm$ 2.45	78.8 $\pm$ 2.45
	50	3.5 $\pm$ 0.21	73.2 $\pm$ 3.01	26.8 $\pm$ 3.01
	100	2.4 $\pm$ 0.37	81.8 $\pm$ 1.04	18.2 $\pm$ 1.04
	200	1.5 $\pm$ 0.33	88.6 $\pm$ 1.88	11.4 $\pm$ 1.88
	400	0.9 $\pm$ 0.11	92.9 $\pm$ 0.46	7.1 $\pm$ 0.46

ตารางที่ 2 แสดงผลการยับยั้ง Lipoprotein oxidation โดยสารสกัดมังคุด, มะม่วงเขียวเสวยดิบ, มะม่วงน้ำดอกไม้สุก และส้มโอ ที่ความเข้มข้นต่างๆ

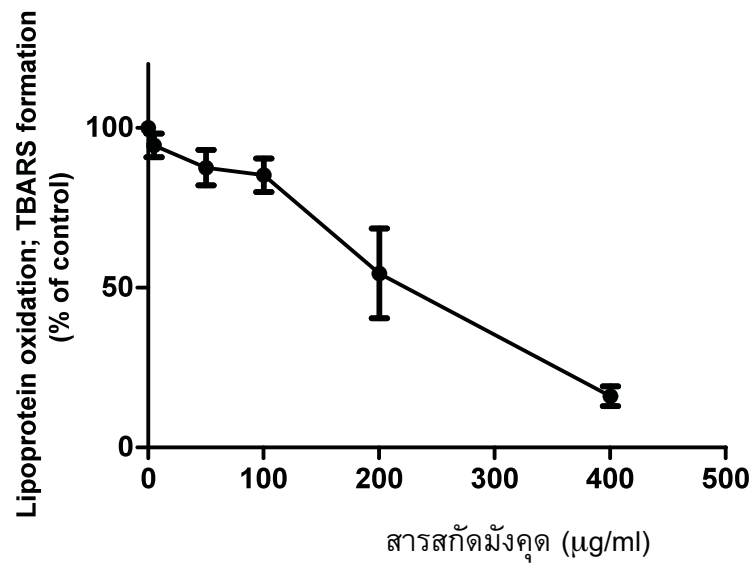
สารสกัด	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	TBARS formation (MDA) (nmolMDA/mg protein)	% inhibition of lipoprotein oxidation	% of oxidized lipoprotein
มังคุด	5	12.4 $\pm$ 1.1	5.4 $\pm$ 3.73	94.6 $\pm$ 3.73
	50	11.5 $\pm$ 1.34	12.4 $\pm$ 5.56	87.6 $\pm$ 5.56
	100	11.1 $\pm$ 1.29	14.8 $\pm$ 5.29	85.2 $\pm$ 5.29
	200	7.1 $\pm$ 2.21	45.5 $\pm$ 14.02	54.5 $\pm$ 14.02
	400	2.1 $\pm$ 0.52	83.9 $\pm$ 3.09	16.1 $\pm$ 3.09
มะม่วง (ดิบ)	5	10.6 $\pm$ 0.52	18.9 $\pm$ 8.32	81.1 $\pm$ 8.32
	50	10.0 $\pm$ 0.23	23.2 $\pm$ 5.89	76.8 $\pm$ 5.89
	100	9.6 $\pm$ 0.32	26.0 $\pm$ 6.44	74.0 $\pm$ 6.44
	200	9.1 $\pm$ 0.31	30.2 $\pm$ 6.11	69.8 $\pm$ 6.11
	400	8.0 $\pm$ 0.43	38.4 $\pm$ 6.58	61.6 $\pm$ 6.58
มะม่วง (สุก)	5	11.8 $\pm$ 0.79	9.8 $\pm$ 1.21	90.2 $\pm$ 1.21
	50	9.6 $\pm$ 0.56	26.6 $\pm$ 0.32	73.4 $\pm$ 0.32
	100	3.3 $\pm$ 0.13	74.6 $\pm$ 0.37	25.4 $\pm$ 0.37
	200	2.7 $\pm$ 0.19	79.6 $\pm$ 0.38	20.4 $\pm$ 0.38
	400	2.3 $\pm$ 0.04	82.3 $\pm$ 0.63	17.7 $\pm$ 0.63
ส้มโอ	5	11.2 $\pm$ 0.98	13.7 $\pm$ 12.09	86.3 $\pm$ 12.09
	50	7.4 $\pm$ 0.42	43.5 $\pm$ 6.25	56.5 $\pm$ 6.25
	100	6.9 $\pm$ 0.41	51.7 $\pm$ 0.95	48.3 $\pm$ 0.95
	200	6.4 $\pm$ 0.44	55.5 $\pm$ 1.07	44.5 $\pm$ 1.07
	400	6.1 $\pm$ 0.48	57.4 $\pm$ 1.83	42.6 $\pm$ 1.83

ตารางที่ 3 แสดงผลการยับยั้ง Lipoprotein oxidation โดย สารสกัดมะละกอดิบ, มะละกอสุก, กลวยน้ำว้า และฝรั่ง ที่ความเข้มข้นต่างๆ

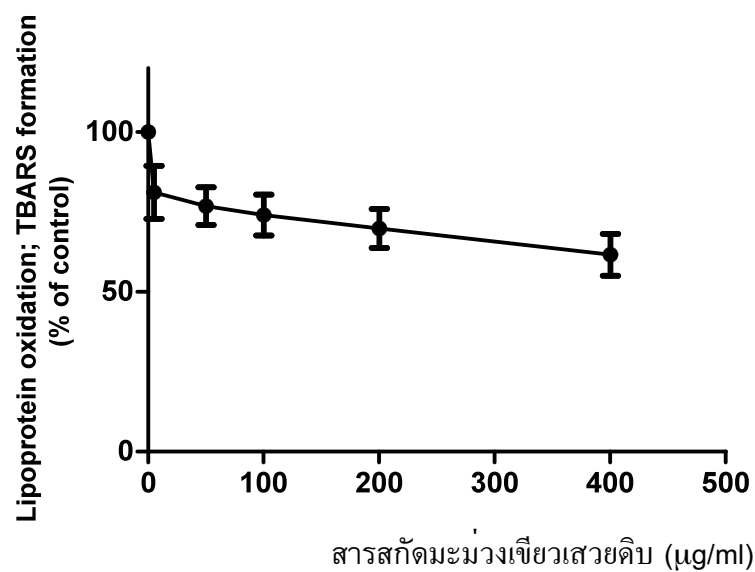
สารสกัด	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	TBARS formation (MDA) (nmolMDA/mg protein)	% inhibition of lipoprotein oxidation	% of oxidized lipoprotein
มะละกอ (ดิบ)	5	9.3 $\pm$ 0.77	28.3 $\pm$ 9.76	71.7 $\pm$ 9.76
	50	4.0 $\pm$ 0.45	69.2 $\pm$ 5.07	30.8 $\pm$ 5.07
	100	2.9 $\pm$ 0.38	77.7 $\pm$ 4.09	22.3 $\pm$ 4.09
	200	2.6 $\pm$ 0.48	80.2 $\pm$ 4.77	19.8 $\pm$ 4.77
	400	2.4 $\pm$ 0.31	81.4 $\pm$ 3.39	18.6 $\pm$ 3.39
มะละกอ (สุก)	5	9.8 $\pm$ 0.23	25.1 $\pm$ 5.78	74.9 $\pm$ 5.78
	50	5.4 $\pm$ 0.20	58.7 $\pm$ 3.76	41.3 $\pm$ 3.76
	100	4.9 $\pm$ 0.31	62.8 $\pm$ 4.4	37.2 $\pm$ 4.4
	200	4.3 $\pm$ 0.29	66.3 $\pm$ 4.09	33.7 $\pm$ 4.09
	400	3.8 $\pm$ 0.19	70.6 $\pm$ 3.09	29.4 $\pm$ 3.09
กลวยน้ำว้า	5	10.7 $\pm$ 0.38	17.5 $\pm$ 7.28	82.5 $\pm$ 7.28
	50	9.9 $\pm$ 0.43	24.3 $\pm$ 7.34	75.7 $\pm$ 7.34
	100	4.0 $\pm$ 0.35	69.2 $\pm$ 4.30	30.8 $\pm$ 4.30
	200	2.3 $\pm$ 0.16	82.3 $\pm$ 2.17	17.7 $\pm$ 2.17
	400	2.1 $\pm$ 0.15	83.6 $\pm$ 1.99	16.4 $\pm$ 1.99
ฝรั่ง	5	10.6 $\pm$ 1.36	18.7 $\pm$ 6.07	81.3 $\pm$ 6.07
	50	3.2 $\pm$ 0.15	75.8 $\pm$ 0.14	24.2 $\pm$ 0.14
	100	1.1 $\pm$ 0.02	92.6 $\pm$ 0.61	8.40 $\pm$ 0.61
	200	0.6 $\pm$ 0.01	95.5 $\pm$ 0.36	4.5 $\pm$ 0.36
	400	0.5 $\pm$ 0.05	95.9 $\pm$ 0.61	4.1 $\pm$ 0.61

ตารางที่ 4 แสดงค่า IC_{50} ของสารสกัดผลไม้ชนิดต่างๆ ในการยับยั้ง Lipoprotein oxidation

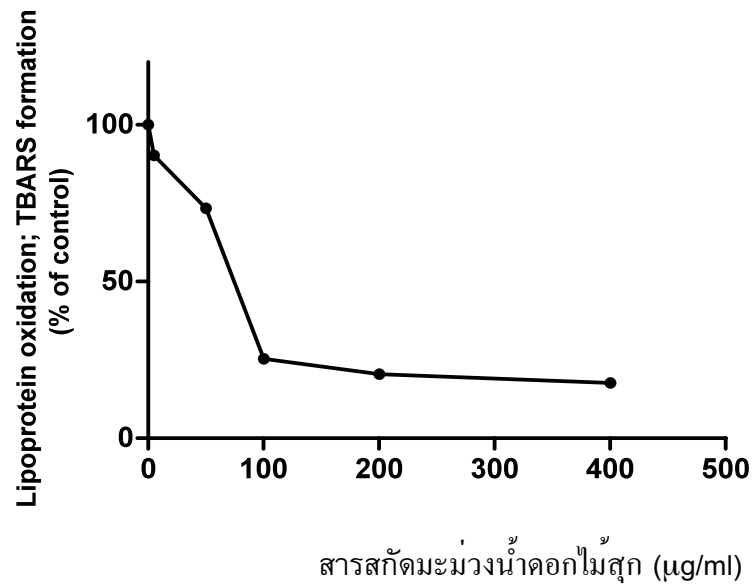
สารสกัดผลไม้	ค่า IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
มังคุด	236.5
มะม่วงเขียวเสวยดิบ	522.7
มะม่วงน้ำดอกไม้สุก	148.5
ส้มโอ	231.6
มะละกอดิบ	85.0
มะละกอสุก	146.9
กล้วย	144.9
ฝรั่ง	59.7



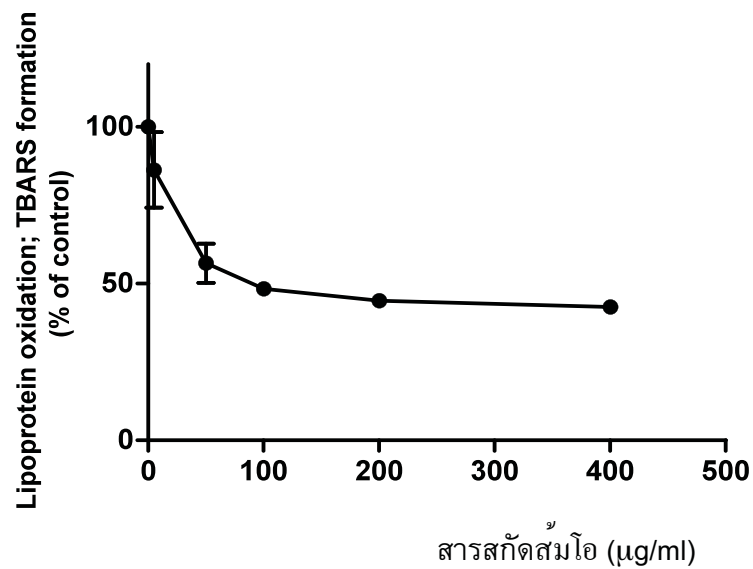
รูปที่ 4 แสดงผลการยับยั้ง Lipoprotein oxidation โดยสารสกัดมังคุดที่ความเข้มข้นต่างๆ ในรูปของ TBARS คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับ Oxidized Lipoprotein



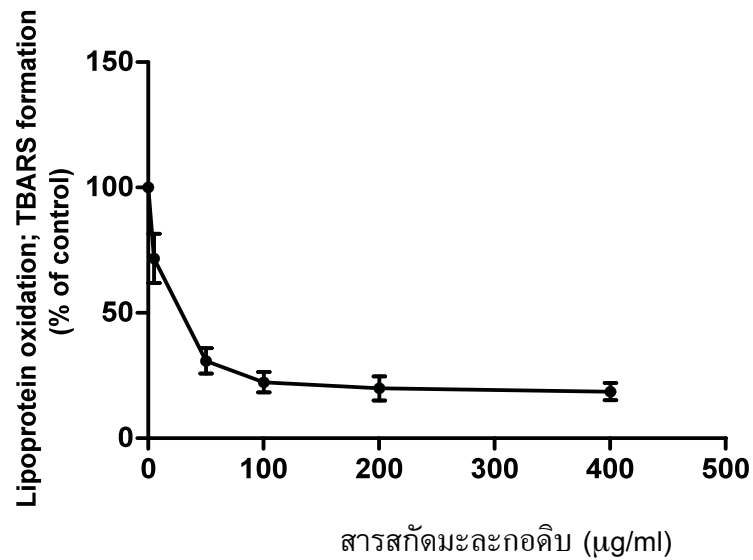
รูปที่ 5 แสดงผลการยับยั้ง Lipoprotein oxidation โดยสารสกัดมะม่วงเขียวเสวยดิบที่ความเข้มข้นต่างๆ ในรูปของ TBARS คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับ Oxidized Lipoprotein



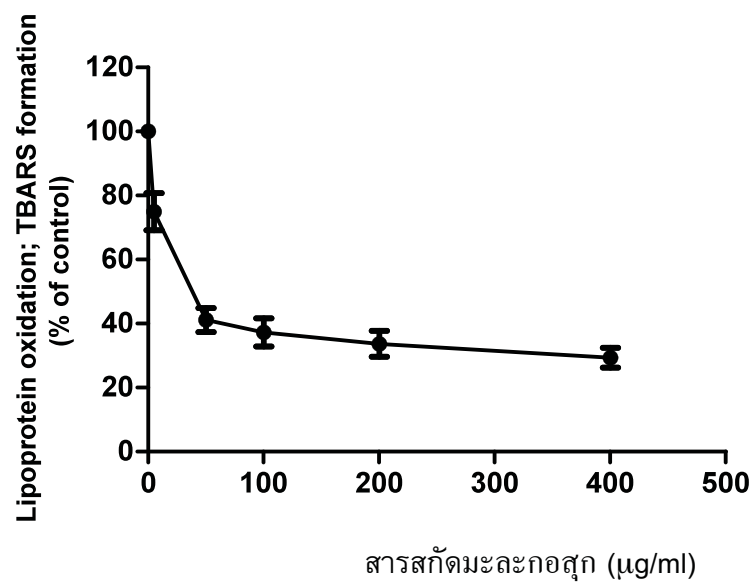
รูปที่ 6 แสดงผลการยับยั้ง Lipoprotein oxidation โดยสารสกัดมะม่วงน้ำดอกไม้สุก ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในรูปของ TBARS คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับ Oxidized Lipoprotein



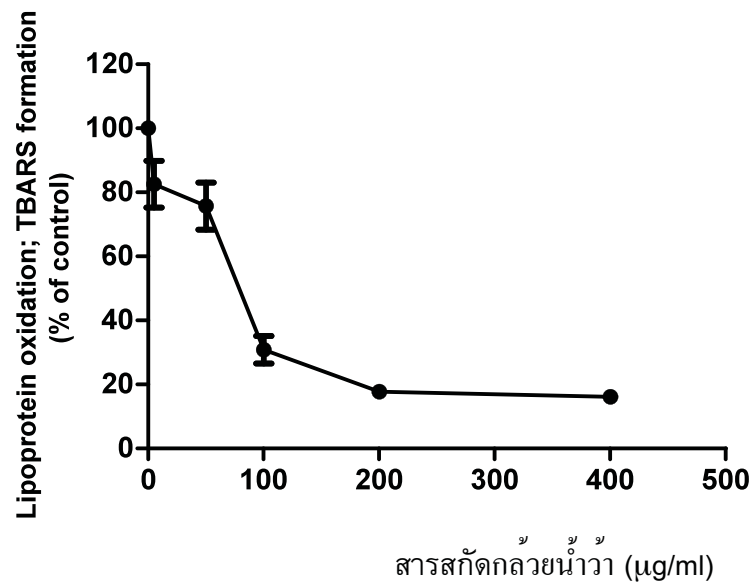
รูปที่ 7 แสดงผลการยับยั้ง Lipoprotein oxidation โดยสารสกัดส้มโอที่ความเข้มข้นต่างๆ ในรูปของ TBARS คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับ Oxidized Lipoprotein



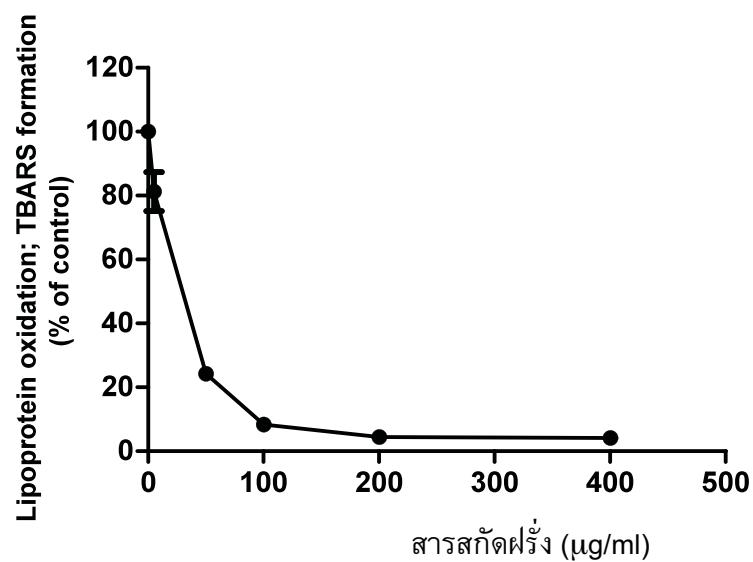
รูปที่ 8 แสดงผลการยับยั้ง Lipoprotein oxidation โดยสารสกัดมะละกอดิบ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในรูปของ TBARS คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับ Oxidized Lipoprotein



รูปที่ 9 แสดงผลการยับยั้ง Lipoprotein oxidation โดยสารสกัดมะละกอดิบ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในรูปของ TBARS คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับ Oxidized Lipoprotein

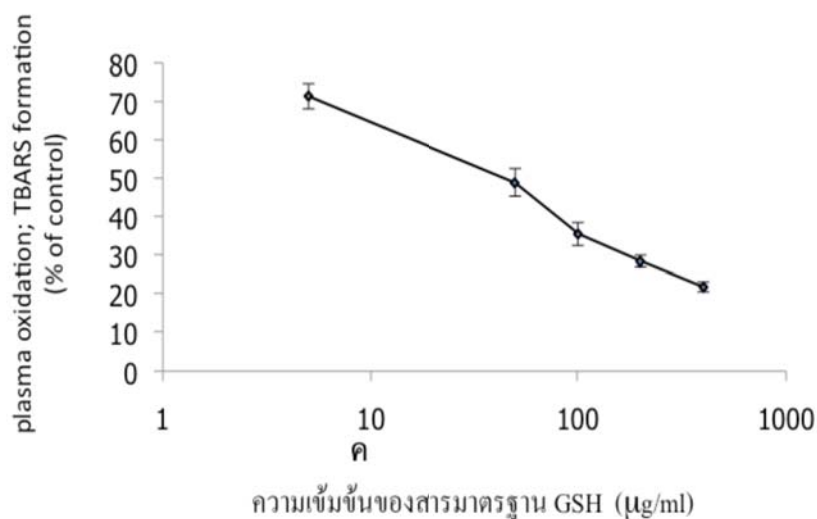


รูปที่ 10 แสดงผลการยับยั้ง Lipoprotein oxidation โดยสารสกัดกลวยน้ำว้า ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในรูปของ TBARS คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับ Oxidized Lipoprotein

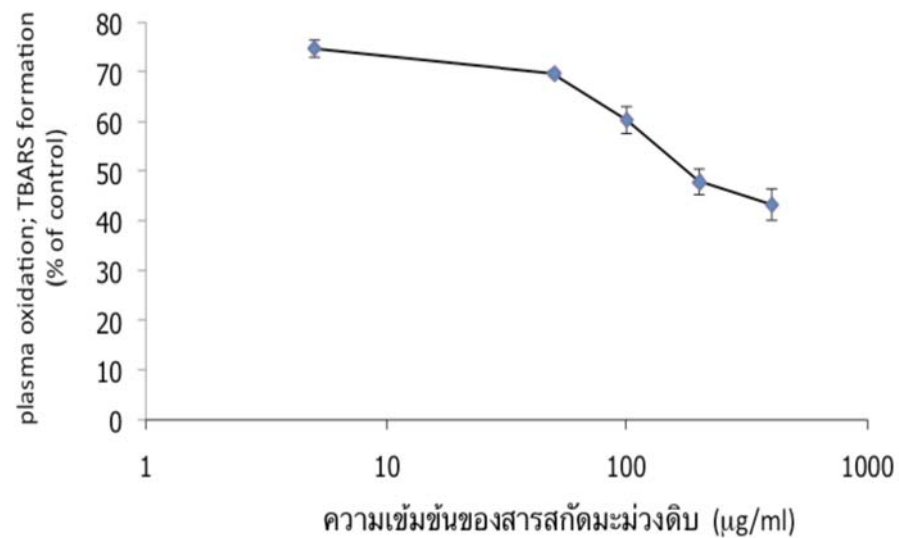


รูปที่ 11 แสดงผลการยับยั้ง Lipoprotein oxidation โดยสารสกัดฝรังที่ความเข้มข้น ต่างๆ ในรูปของ TBARS คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับ Oxidized Lipoprotein

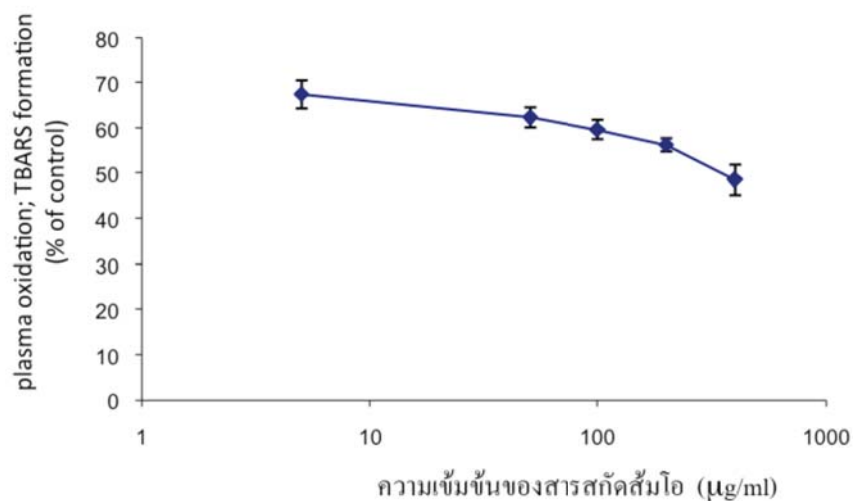
สำหรับฤทธิ์ของสารสกัดผลไม้ต่างๆ ได้แก่ มังคุด มะม่วงดิบ มะม่วงสุก ส้มโอ มะละกอดิบ มะละกอสุก กล้วยน้ำว้า และฝรั่งในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในพลาสมา ทำโดยการเก็บ pooled plasma จากคนสุขภาพดีและจากผู้ป่วยเบาหวาน แล้วนำมาทดสอบเปรียบเทียบกัน จะเห็นว่า ระดับ MDA ในพลาสมาของผู้ป่วยเบาหวานสูงกว่าในคนที่มีสุขภาพดี ทั้งในสภาวะที่ไม่ถูกออกซิไดซ์และถูกออกซิไดซ์ด้วย CuSO_4 ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 250 μM (ตารางที่ 5) ส่วนฤทธิ์การยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในพลาสมาของผู้ป่วยเบาหวาน แสดงดังรูปที่ 12, 13, 14, 15, 16 ตามลำดับ ฤทธิ์การยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในพลาสมาของคนที่มีสุขภาพดี แสดงดังรูปที่ 17, 18, 19, 20, 21 ตามลำดับ สำหรับ % การยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในพลาสมาโดยสารสกัดผลไม้ชนิดต่างๆ แสดงดังตารางที่ 5 จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดผลไม้ทุกชนิดและทุกความเข้มข้น (5, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$) สามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในหลอดทดลองที่มีพลาสมาของคนที่มีสุขภาพดี และในผู้ป่วยเบาหวาน ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$, Mann Whitney U test, SPSS V.14)



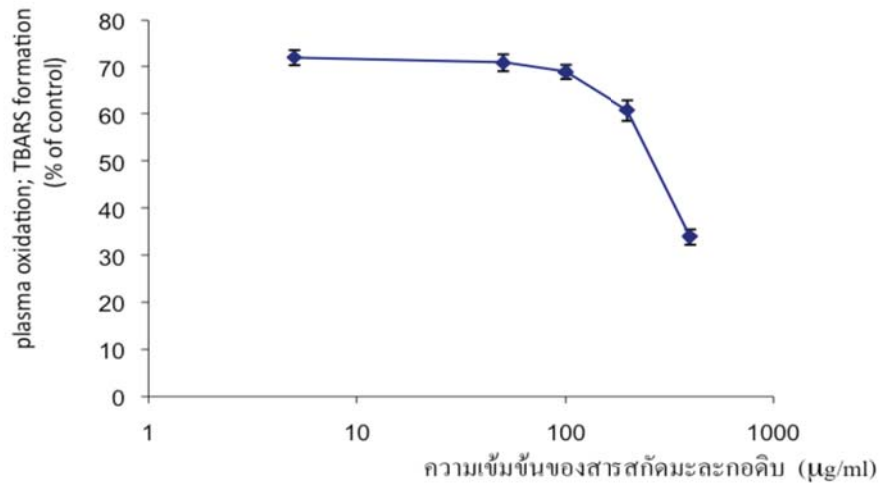
รูปที่ 12 ผลของ glutathione ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในพลาสมาของผู้ป่วยเบาหวาน ในรูปของ TBARS formation (MDA) ซึ่งแสดงค่าเป็น % เทียบกับ control คือพลาสมาที่ถูกออกซิไดซ์ในสภาวะที่ไม่มี glutathione



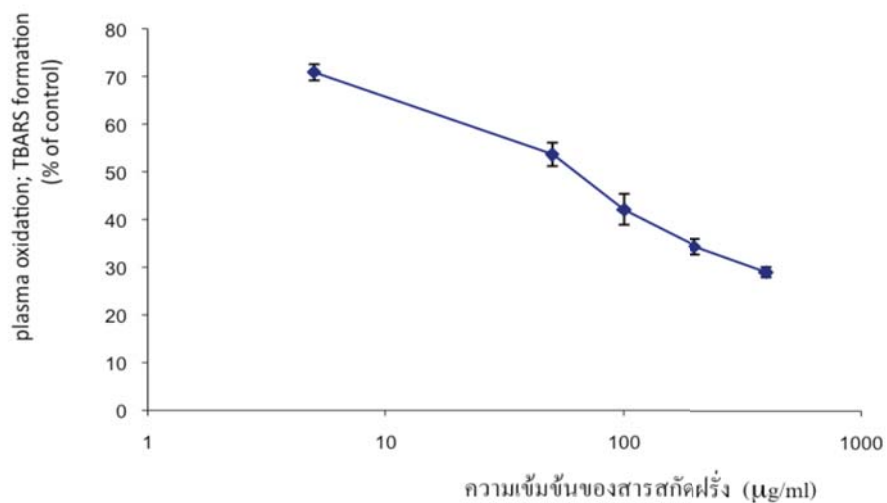
รูปที่ 13 ผลของสารสกัดมะม่วงดิบ ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ในพลาสมาของผู้ป่วยเบาหวาน ในรูปของ TBARS formation (MDA) ซึ่งแสดงค่าเป็น % เทียบกับ control คือพลาสมาที่ถูกออกซิไดซ์ในสภาวะที่ไม่มีสารสกัดมะม่วงดิบ



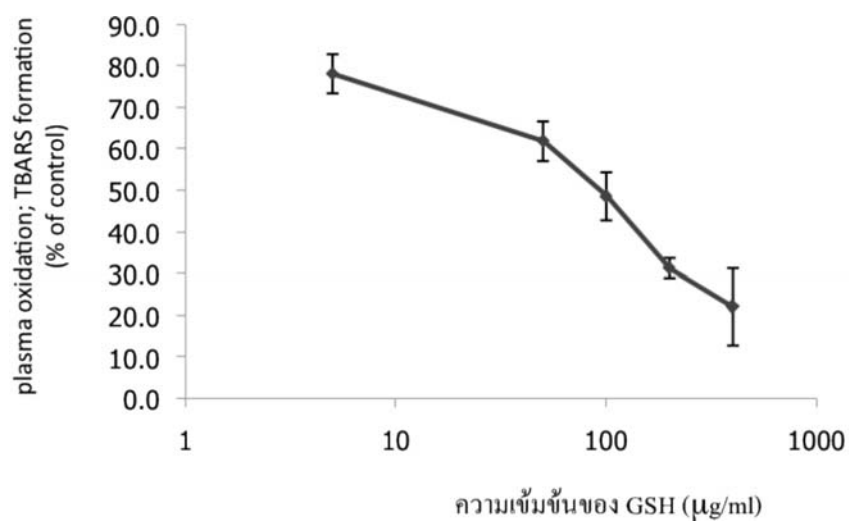
รูปที่ 14 ผลของสารสกัดส้มโอในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในพลาสมาของผู้ป่วยเบาหวาน ในรูปของ TBARS formation (MDA) ซึ่งแสดงค่าเป็น % เทียบกับ control คือพลาสมาที่ถูกออกซิไดซ์ในสภาวะที่ไม่มีสารสกัดส้มโอ



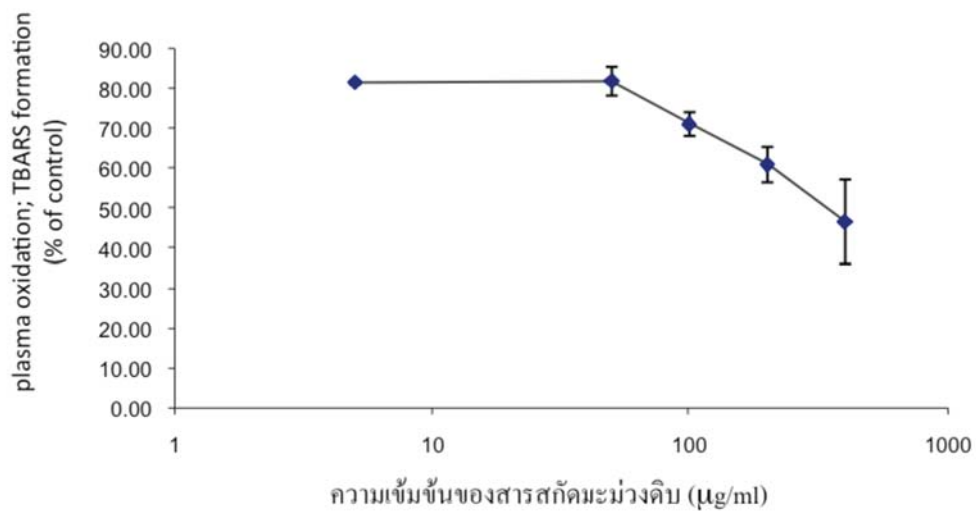
รูปที่ 15 ผลของสารสกัดมะละกอดิบในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในพลาสมาของผู้ป่วยเบาหวาน ในรูปของ TBARS formation (MDA) ซึ่งแสดงค่าเป็น % เทียบกับ control คือพลาสมาที่ถูก ออกซิไดซ์ในสภาวะที่ไม่มีสารสกัดมะละกอดิบ



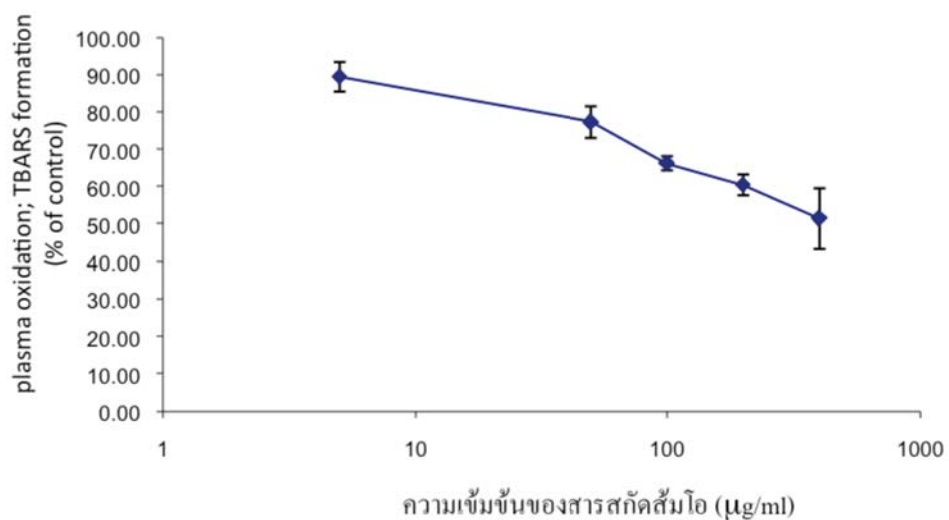
รูปที่ 16 ผลของสารสกัดฝรั่งในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในพลาสมาของผู้ป่วยเบาหวาน ในรูปของ TBARS formation (MDA) ซึ่งแสดงค่าเป็น % เทียบกับ control คือพลาสมาที่ถูกออกซิไดซ์ในสภาวะที่ไม่มีสารสกัดฝรั่ง



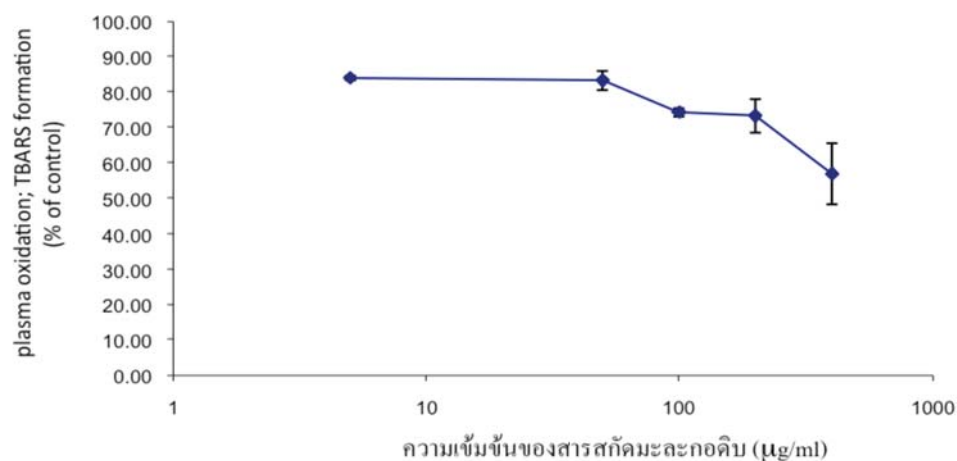
รูปที่ 17 ผลของ glutathione ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในพลาสมาของคนที่มีความผิดปกติ ในรูปของ TBARS formation (MDA) ซึ่งแสดงค่าเป็น % เทียบกับ control คือพลาสมาที่ถูกออกซิไดซ์ในสถานะที่ไม่มี glutathione



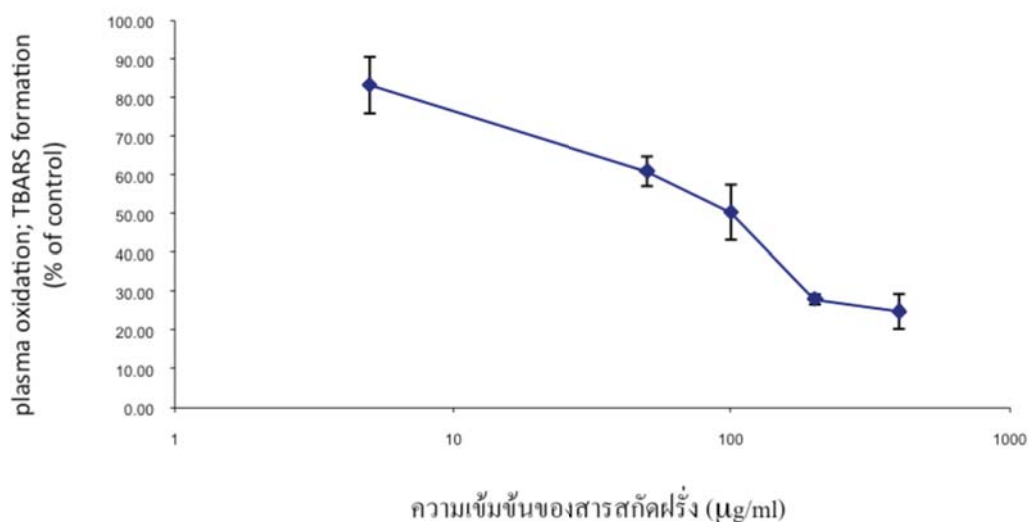
รูปที่ 18 ผลของสารสกัดมะม่วงดิบในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในพลาสมาของคนที่สุขภาพดี ในรูปของ TBARS formation (MDA) ซึ่งแสดงค่าเป็น % เทียบกับ control คือพลาสมาที่ถูกออกซิไดซ์ในสภาวะที่ไม่มีสารสกัดมะม่วงดิบ



รูปที่ 19 ผลของสารสกัดส้มโอในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในพลาสมาของคนที่สุขภาพดี ในรูปของ TBARS formation (MDA) ซึ่งแสดงค่าเป็น % เทียบกับ control คือพลาสมาที่ถูกออกซิไดซ์ในสภาวะที่ไม่มีสารสกัดส้มโอ



รูปที่ 20 ผลของสารสกัดมะละกอดิบในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในพลาสมาของคนที่สุขภาพดี ในรูปของ TBARS formation (MDA) ซึ่งแสดงค่าเป็น % เทียบกับ control คือพลาสมาที่ถูก ออกซิไดซ์ในสภาวะที่ไม่มีสารสกัดมะละกอดิบ



รูปที่ 21 ผลของสารสกัดฝรังในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในพลาสมาของคนที่สุขภาพดี ในรูปของ TBARS formation (MDA) ซึ่งแสดงค่าเป็น % เทียบกับ control คือพลาสมา ที่ถูกออกซิไดซ์ ในสภาวะที่ไม่มีสารสกัดฝรัง

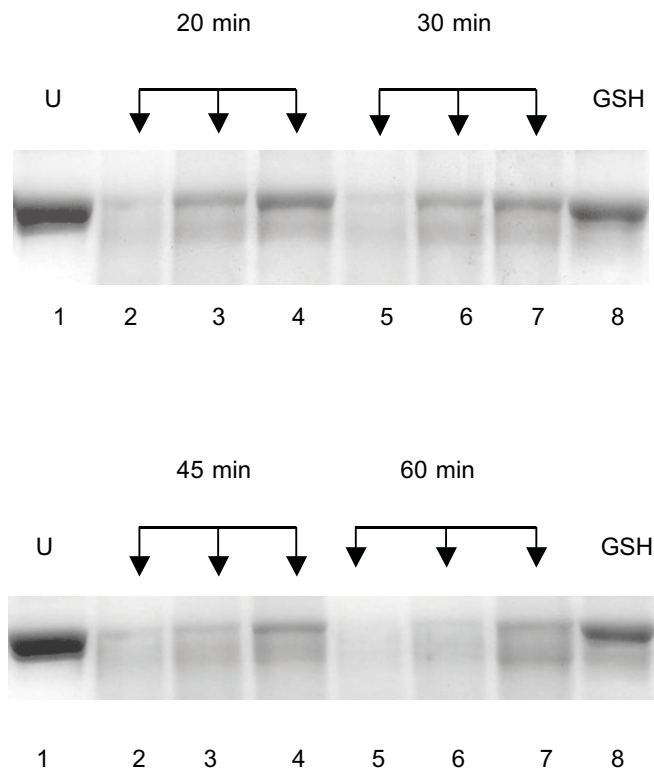
ตารางที่ 5 แสดง % การยับยั้ง plasma oxidation โดยสารสกัดผลไม้ที่ความเข้มข้นต่างๆ
เมื่อนำพลาสมาของคนสุขภาพดีและพลาสมาของผู้ป่วยเบาหวานมาออกซิไดซ์ด้วย 250 μM CuSO_4

		พลาสมาจากคนสุขภาพดี		พลาสมาจากผู้ป่วยเบาหวาน	
		TBARS formation (MDA); $\mu\text{mol/L}$	%inhibition of plasma oxidation	TBARS formation (MDA); $\mu\text{mol/L}$	%inhibition of plasma oxidation
plasma (untreated)		1.3 $\pm$ 0.36		2.4 $\pm$ 0.28	
Plasma Oxidation		29.5 $\pm$ 1.14		34.4 $\pm$ 1.49	
Glutathione	5 $\mu\text{g/ml}$	23.0 $\pm$ 0.45	21.9 $\pm$ 4.71	24.6 $\pm$ 1.12	29.6 $\pm$ 3.27
	50 $\mu\text{g/ml}$	18.3 $\pm$ 0.92	38.2 $\pm$ 4.77	16.9 $\pm$ 1.24	51.1 $\pm$ 3.59
	100 $\mu\text{g/ml}$	14.3 $\pm$ 0.41	52.4 $\pm$ 5.78	12.3 $\pm$ 1.02	65.4 $\pm$ 2.97
	200 $\mu\text{g/ml}$	9.3 $\pm$ 0.36	68.7 $\pm$ 2.39	9.8 $\pm$ 0.52	72.5 $\pm$ 1.53
	400 $\mu\text{g/ml}$	6.5 $\pm$ 0.59	77.9 $\pm$ 9.27	7.5 $\pm$ 0.43	79.1 $\pm$ 1.27
สารสกัดมะม่วงดิบ	5 $\mu\text{g/ml}$	24.0 $\pm$ 0.69	19.5 $\pm$ 0.42	25.7 $\pm$ 0.59	25.3 $\pm$ 1.74
	50 $\mu\text{g/ml}$	24.1 $\pm$ 0.28	19.2 $\pm$ 3.59	24.0 $\pm$ 0.19	31.3 $\pm$ 0.56
	100 $\mu\text{g/ml}$	21.0 $\pm$ 0.55	28.9 $\pm$ 2.98	20.8 $\pm$ 0.93	40.6 $\pm$ 2.72
	200 $\mu\text{g/ml}$	18.0 $\pm$ 0.51	39.2 $\pm$ 4.45	16.5 $\pm$ 0.89	53.1 $\pm$ 2.59
	400 $\mu\text{g/ml}$	13.8 $\pm$ 0.55	53.4 $\pm$ 10.5	14.9 $\pm$ 1.09	57.6 $\pm$ 3.17
สารสกัดส้มโอ	5 $\mu\text{g/ml}$	26.4 $\pm$ 1.39	10.5 $\pm$ 3.96	23.2 $\pm$ 1.06	33.6 $\pm$ 3.09
	50 $\mu\text{g/ml}$	22.8 $\pm$ 1.12	22.6 $\pm$ 4.23	21.5 $\pm$ 0.76	37.7 $\pm$ 2.21
	100 $\mu\text{g/ml}$	19.6 $\pm$ 0.58	33.6 $\pm$ 1.88	20.5 $\pm$ 0.73	40.3 $\pm$ 2.14
	200 $\mu\text{g/ml}$	17.9 $\pm$ 0.49	39.4 $\pm$ 2.79	19.4 $\pm$ 0.49	43.7 $\pm$ 1.44
	400 $\mu\text{g/ml}$	15.2 $\pm$ 0.69	48.5 $\pm$ 8.12	16.7 $\pm$ 1.16	51.5 $\pm$ 3.38

ตารางที่ 6 (ต่อ) แสดง % การยับยั้ง plasma oxidation โดยสารสกัดผลไม้ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อนำพลาสมาของคนสุขภาพดีและพลาสมาของผู้ป่วยเบาหวานมาออกซิไดซ์ด้วย 250 μM CuSO_4

		พลาสมาจากคนสุขภาพดี		พลาสมาจากผู้ป่วยเบาหวาน	
		TBARS formation (MDA); $\mu\text{mol/L}$	%inhibition of plasma oxidation	TBARS formation (MDA); $\mu\text{mol/L}$	%inhibition of plasma oxidation
สารสกัดมะละกอดิบ	5 $\mu\text{g/ml}$	24.8 $\pm$ 1.24	16.9 $\pm$ 0.61	24.8 $\pm$ 0.55	32.6 $\pm$ 3.09
	50 $\mu\text{g/ml}$	24.6 $\pm$ 0.61	16.7 $\pm$ 2.7	24.4 $\pm$ 0.61	37.7 $\pm$ 2.21
	100 $\mu\text{g/ml}$	21.9 $\pm$ 0.75	25.7 $\pm$ 1.17	23.8 $\pm$ 0.51	40.3 $\pm$ 2.14
	200 $\mu\text{g/ml}$	21.6 $\pm$ 1.01	26.7 $\pm$ 4.74	20.9 $\pm$ 0.75	43.7 $\pm$ 1.44
	400 $\mu\text{g/ml}$	16.8 $\pm$ 0.68	43.1 $\pm$ 8.65	11.7 $\pm$ 0.56	51.4 $\pm$ 3.38
สารสกัดฝรั่ง	5 $\mu\text{g/ml}$	24.6 $\pm$ 0.49	17.5 $\pm$ 7.31	24.4 $\pm$ 0.58	27.1 $\pm$ 1.60
	50 $\mu\text{g/ml}$	18.0 $\pm$ 0.76	38.8 $\pm$ 3.83	18.5 $\pm$ 0.84	29.1 $\pm$ 1.79
	100 $\mu\text{g/ml}$	14.9 $\pm$ 0.64	49.4 $\pm$ 7.13	14.5 $\pm$ 1.11	30.9 $\pm$ 1.50
	200 $\mu\text{g/ml}$	8.3 $\pm$ 0.49	71.8 $\pm$ 1.27	11.8 $\pm$ 0.56	39.2 $\pm$ 2.18
	400 $\mu\text{g/ml}$	7.4 $\pm$ 0.69	74.9 $\pm$ 4.52	10.0 $\pm$ 0.36	66.1 $\pm$ 1.63

การตรวจหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในผลไม้ไทย ในการป้องกันการเกิดออกซิเดชันของโปรตีน BSA โดย Cu^{2+} และ H_2O_2 ทำโดยเริ่มต้นทดสอบหาความเข้มข้นของ Cu^{2+} และ H_2O_2 และเวลาที่เหมาะสมในการออกซิไดซ์โปรตีน BSA จากผลการทดลอง เมื่อให้ความเข้มข้นของ Cu^{2+} คงที่ (0.05 mM) แล้วเพิ่มความเข้มข้นของ H_2O_2 จาก 0.625, เป็น 3.125 และ 1.25 mM H_2O_2 ตามลำดับ ที่ระยะเวลาต่างๆ คือ 20, 30, 45, และ 60 นาที พบว่า แทบความเข้มของโปรตีน BSA ลดลงตามความเข้มข้นของ Cu^{2+} และ H_2O_2 ที่เพิ่มขึ้น รวมทั้งระยะเวลาที่นานขึ้น ก็ยังทำให้แทบความเข้มของโปรตีนจางลงตามลำดับ ดังรูปที่ 22 ในการทดลองนี้เลือกใช้สภาวะการออกซิไดซ์ที่ 0.05 mM Cu^{2+} และ 0.625 mM H_2O_2 เป็นเวลา 30 นาที glutathione (GSH) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ก็สามารถป้องกันการเกิดโปรตีนออกซิเดชันได้ โดยสังเกตจากแทบความเข้มของโปรตีน BSA ที่กลับมาเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีน BSA ในสภาวะที่ถูกออกซิไดซ์ (treated, T) เมื่อทำการทดสอบกับสารสกัดผลไม้ไทยชนิดต่างๆ พบว่า สารสกัดจากมังคุดมีฤทธิ์ในการต้านโปรตีนออกซิเดชันได้ดีที่สุด รองลงมาคือสารสกัดมะม่วงน้ำดอกไม้สุกและสารสกัดส้มโอ ส่วนสารสกัดมะม่วงเขียวเสวยดิบ มะละกอดิบ มะละกอสุก กล้วยน้ำว้าสุก และฝรั่ง มีฤทธิ์ต้านโปรตีนออกซิเดชันได้เช่นเดียวกัน แต่ไม่มากนัก (รูปที่ 23)

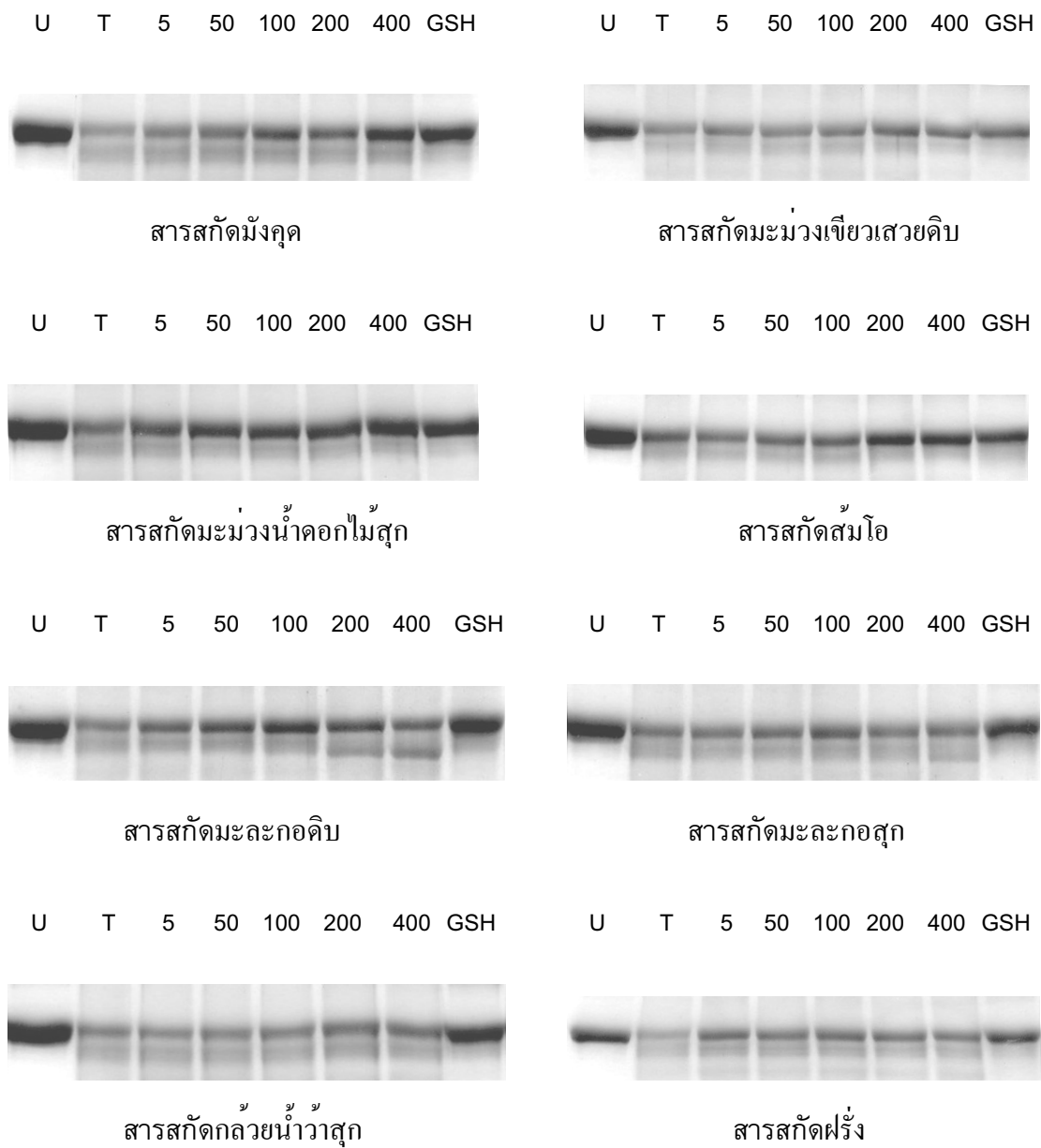


รูปที่ 22 ผลของการเกิดปฏิกิริยาโปรตีนออกซิเดชันระหว่าง BSA กับ $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ ที่ระยะเวลา 20, 30, 45 และ 60 นาที [U=untreated BSA, GSH = glutathione]

Lane 2, 5 = $0.05 \text{ mM Cu}^{2+} / 1.25 \text{ mM H}_2\text{O}_2$

Lane 3, 6 = $0.05 \text{ mM Cu}^{2+} / 0.625 \text{ mM H}_2\text{O}_2$

Lane 4, 7 = $0.05 \text{ mM Cu}^{2+} / 0.3125 \text{ mM H}_2\text{O}_2$



รูปที่ 23ฤทธิ์ของสารสกัดผลไม้ชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 5-400 $\mu\text{g/ml}$ ในการต้านออกซิเดชันต่อโปรตีน BSA ที่ถูกออกซิไดซ์ด้วย $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$, U = untreated (BSA), T = treated (BSA + $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$), GSH = Glutathione

ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ Protein carbonyl content

การทดลองนี้ได้จำลองสถานการณ์ที่เกิดขึ้นในร่างกาย ในภาวะที่โปรตีนสัมผัสกับน้ำตาลกลูโคสเป็นระยะเวลานาน โดยคาดว่ากลูโคสจะเป็นตัวชักนำให้เกิดออกซิเดชันต่อโปรตีนเช่นเดียวกับพยาธิสภาพที่พบในผู้ป่วยเบาหวาน วัดปริมาณ carbonyl content ของสารละลายโปรตีนที่ผสมกับน้ำตาลกลูโคสในสภาวะที่มีและไม่มีสารสกัดผลไม้ ที่ความยาวคลื่น 370 nm ผลแสดงดังตารางที่ 7, 8

ตารางที่ 7 ปริมาณ carbonyl content และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 370 nm ของสารละลายโปรตีน BSA ที่ผสมกับน้ำตาลกลูโคส 100 mM ในสภาวะที่มีและไม่มีสารสกัดผลไม้เป็นเวลา 4 และ 8 สัปดาห์

	Protein carbonyl content (mM/mg protein)		
	day 0	Week 4	week 8
BSA	4.01 ± 0.167	5.67 ± 0.251	6.35 ± 1.463
BSA + glu (100 mM)	3.10 ± 0.209	7.29 ± 1.379	11.9 ± 0.042
1) BSA + glu (100 mM) + มะม่วงเขียวเสวย (ดิบ)			
5 µg / mL		8.14 ± 3.886	12.8 ± 4.513
100 µg / mL		10.22 ± 1.54	14.4 ± 5.014
400 µg / mL		11.05 ± 0.669	13.3 ± 2.465
2) BSA + glu (100 mM) + ส้มโอ			
5 µg / mL		10.19 ± 4.555	14.4 ± 9.695
100 µg / mL		8.95 ± 0.460	12.5 ± 1.546
400 µg / mL		10.31 ± 1.463	10.9 ± 1.671
3) BSA + glu (100 mM) + มะละกอ (ดิบ)			
5 µg / mL		11.32 ± 4.054	14.8 ± 6.519
100 µg / mL		7.77 ± 1.128	10.9 ± 2.674
400 µg / mL		7.51 ± 3.845	14.8 ± 9.277
4) BSA + glu (100 mM) + ฝรั่ง			
5 µg / mL		14.6 ± 10.99	16.6 ± 10.448
100 µg / mL		9.01 ± 0.543	10.3 ± 0.295
400 µg / mL		10.46 ± 0.418	12.3 ± 1.629
BSA + glu + vit C	4.37 ± 0.001	25.53 ± 1.003	23.6 ± 1.003
BSA + glu + GSH	4.31 ± 0.001	10.73 ± 0.878	11.2 ± 0.209

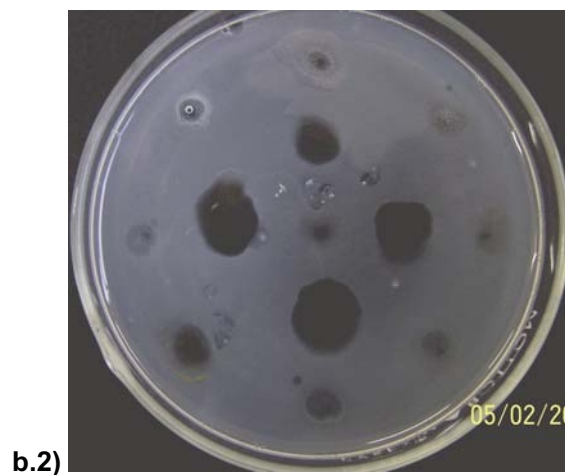
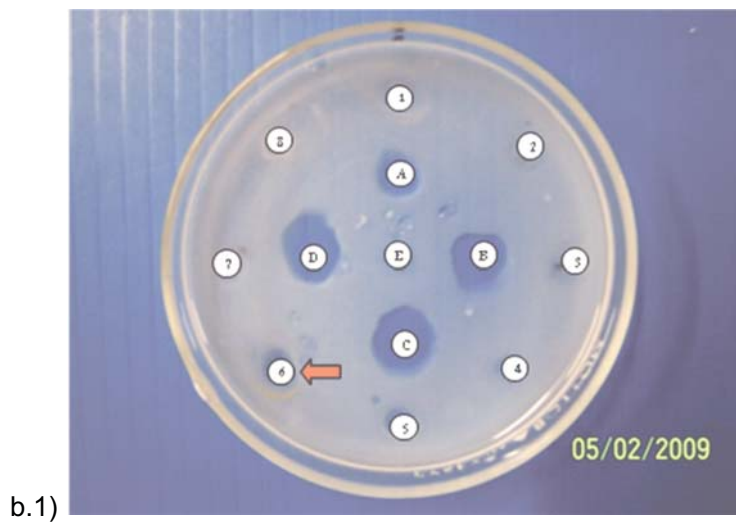
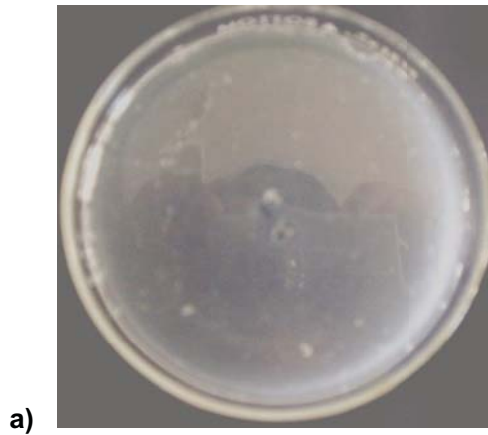
ตารางที่ 8 ปริมาณ carbonyl content และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 370 nm ของสารละลายโปรตีน BSA ที่ผสมกับน้ำตาลกลูโคส 500 mM ในสภาวะที่มีและไม่มีสารสกัดผลไม้เป็นเวลา 4 และ 8 สัปดาห์

	Protein carbonyl content (mM/mg protein)		
	Day 0	Week 4	Week 8
BSA	4.02 ± 0.167	5.67 ± 0.251	6.35 ± 1.463
BSA + glu (500 mM)	4.25 ± 0.167	12.4 ± 1.254	33.3 ± 0.710
1) BSA + glu (500 mM) + มะม่วงเขียวเสวย (ดิบ)			
5 µg / mL		12.32 ± 0.293	32.5 ± 7.104
100 µg / mL		13.85 ± 0.376	30.7 ± 1.713
400 µg / mL		13.95 ± 0.752	25.9 ± 0.752
2) BSA + glu (500 mM) + ส้มโอ			
5 µg / mL		13.74 ± 5.892	23.8 ± 19.85
100 µg / mL		12.97 ± 0.209	29.7 ± 10.239
400 µg / mL		12.59 ± 0.627	20.7 ± 2.382
3) BSA + glu (500 mM) + มะละกอ (ดิบ)			
5 µg / mL		11.47 ± 0.836	24.6 ± 1.546
100 µg / mL		13.03 ± 2.716	20.2 ± 0.251
400 µg / mL		11.6 ± 0.919	19.1 ± 2.925
4) BSA + glu (500 mM) + ฝรั่ง			
5 µg / mL		10.58 ± 0.501	18.1 ± 1.295
100 µg / mL		19.1 ± 2.048	28.4 ± 0.543
400 µg / mL		15.3 ± 0.46	27.8 ± 12.37
BSA + glu + vit C	4.55 ± 0.001	28.33 ± 1.881	37.6 ± 5.391
BSA + glu + GSH	3.90 ± 0.083	17.73 ± 4.597	33.01 ± 8.358

จากผลการทดลองพบว่า เมื่อบ่มโปรตีน BSA กับน้ำตาลกลูโคส 100 mM ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ ปริมาณ protein carbonyl content มีระดับเพิ่มขึ้น (7.29 ± 1.379 VS 11.9 ± 0.042 mM/mg protein) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเป็น 500 mM ปริมาณ protein carbonyl content ของ BSA ยิ่งเพิ่มขึ้นตามลำดับ ที่ระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ (12.4 ± 1.254 VS 33.3 ± 0.710 mM/mg protein) เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีน BSA ในสภาวะที่มีและไม่มีน้ำตาลกลูโคสในวันแรก (day 0) อย่างไรก็ตาม ในสภาวะที่มีสารสกัดผลไม้เมื่อบ่มโปรตีน BSA กับน้ำตาล กลูโคส 100 mM ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ กลับไม่พบฤทธิ์การยับยั้งการเกิดโปรตีน carbonyl แต่อย่างใด ทั้งค่าของ protein carbonyl content ยังแปรปรวนมากทีเดียว เมื่อบ่มโปรตีน BSA กับน้ำตาลกลูโคส 500 mM ในสภาวะที่มีสารสกัดผลไม้ชนิดต่างๆ พบว่า สารสกัดมะละกอดิบกับสารสกัดมะม่วงเขียวเสวยดิบ ที่แสดงฤทธิ์การยับยั้งการเกิดโปรตีน carbonyl ที่เวลา 8 สัปดาห์ ตามความเข้มข้น ส่วนสารสกัดส้มโอ ค่าไม่เป็นไปตามความเข้มข้นของสารสกัด ในการทดลองนี้ได้ใช้สาร antioxidant มาตรฐานคือ Glutathione (GSH) และวิตามินซี (ascorbic acid) มาทดสอบควบคู่ไปด้วย แต่ผลการทดลองพบว่า Glutathione (GSH) ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเกิดโปรตีน carbonyl ส่วนวิตามินซี (ascorbic acid) กลับทำให้เกิดโปรตีน carbonyl มากยิ่งขึ้น ดังตารางที่ 7, 8

ผลการตรวจวัด **Fibrinolytic activities** ของผลไม้ไทย ด้วยวิธี *in vitro* modified **fibrin plate assay**

เมื่อนำสารละลาย human fibrinogen ผสมกับสารละลาย thrombin จะเกิดการก่อตัวเป็นไฟบริน (fibrin layer) ดังรูปที่ 24 (a) จากนั้นหยด plasmin ซึ่งเป็นสารมาตรฐานลงไปเป็นปริมาณต่างๆ คือ 2, 5, 10, และ 15 μg อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 8 ชม. จะได้ส่วนใส (clear zone) ดังรูปที่ 24 (b) วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของแถบใส (cleared zone) นำมาหาค่าเฉลี่ยเพื่อคำนวณพื้นที่ส่วนใส สร้างเป็นกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ส่วนใสกับปริมาณของ plasmin ดังแสดงในรูปที่ 25 สำหรับ sample ที่เป็นสารสกัดผลไม้ก็หยดลงไปในเพลทเดียวกัน โดยหยดน้ำกลั่นเป็น negative control ค่า Fibrinolytic activity คัดจากพื้นที่ ของแถบใส (cleared zone) ที่เกิดขึ้น เทียบกับ plasmin จากผลการทดลองพบว่า เมื่อหยดสารสกัดผลไม้ชนิดต่างๆ ทั้ง 8 ชนิด ได้แก่ สารสกัดมังคุด, สารสกัดมะม่วงดิบ, สารสกัดมะม่วงสุก, สารสกัดส้มโอ, สารสกัดมะละกอดิบ, สารสกัดมะละกอสุก, สารสกัดกล้วยน้ำว้าสุก และสารสกัดฝรั่ง ในปริมาณ 2 mg มีเพียงสารสกัดมะละกอสุกเท่านั้นที่ปรากฏแถบใส (รูปที่ 24) สำหรับฤทธิ์การสลายไฟบรินของสารสกัดมะละกอสุก คำนวณเทียบกับ plasmin แสดงดังตารางที่ 9

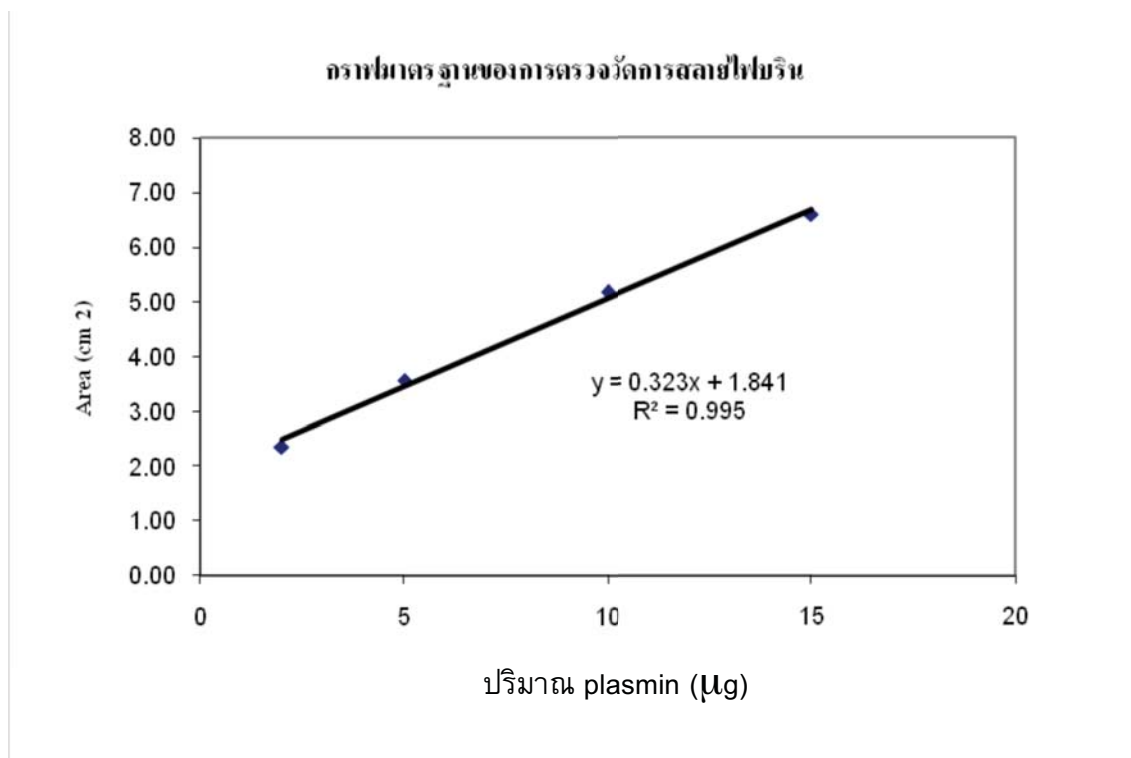


*ภาพ b.1 กับ b.2 เป็นภาพเดียวกัน

รูปที่ 24 การก่อตัวของไฟบริน (a) และ (b) แสดงผลการสลายไฟบริน (fibrinolytic activity) แสดงด้วย ส่วนใสที่ปรากฏ โดยสารมาตรฐาน thrombin และสารสกัดผลไม้ต่างๆ ปริมาณ 2 mg

A = plasmin 2 μ g, B = plasmin 5 μ g, C = plasmin 10 μ g, D = plasmin 15 μ g, E = น้ำกลั่น (negative control),

1 = สารสกัดมังคุด, 2 = สารสกัดมะม่วงดิบ, 3 = สารสกัดมะม่วงสุก, 4 = สารสกัดส้มโอ, 5 = สารสกัดมะละกอดิบ, 6 = สารสกัดมะละกอสุก, 7 = สารสกัดกล้วยน้ำว้าสุก, 8 = สารสกัดฝรั่ง



รูปที่ 25 แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ผลการสลายไฟบรินโดยวิธี *in vitro* modified fibrin plate ที่ใช้ plasmin เป็นสารมาตรฐาน

ตารางที่ 9 แสดงผลการสลายไฟบรินโดย plasmin และสารสกัดมะละกอสุก

สารสกัด	ปริมาณ	พื้นที่ (cm ²)	fibrinolytic activity
Plasmin	2 µg	2.36	-
	5 µg	3.58	-
	10 µg	5.18	-
	15 µg	6.61	-
สารสกัดมะละกอสุก	2 mg	1.69	< 2 µg

วิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษานี้ เป็นการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผลไม้ทั้งหมด 8 ชนิด ได้แก่ มังคุด, มะม่วงเขียวเสวยดิบ, มะม่วงน้ำดอกไม้สุก, ส้มโอ, มะละกอดิบ, มะละกอสุก, กัลยนาว่า และฝรั่ง ในการป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจและเบาหวาน โดยใช้โมเดลในหลอดทดลอง (*in vitro* study) ศึกษาในด้านต่างๆ ดังนี้คือ 1) ฤทธิ์การยับยั้ง Lipoprotein oxidation และ plasma peroxidation โดยการตรวจวัด malondialdehyde (MDA) ด้วยวิธี Thiobarbituric acid reactive substance assay (TBARS) 2) ฤทธิ์ป้องกันการเกิดออกซิเดชันของโปรตีน BSA ที่ชักนำด้วย $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ โดยใช้วิธี SDS-PAGE 3) ฤทธิ์การยับยั้งออกซิเดชันของโปรตีน BSA จากการชักนำด้วยกลูโคสความเข้มข้นสูง (*in vitro* protein glycation) โดยการตรวจวัด protein carbonyl content 4) ฤทธิ์ Fibrinolytic activities โดยวิธี modified fibrin plate assay

สารสกัดจากผลไม้ไทยทั้ง 8 ชนิด เป็น aqueous extracts เตรียมโดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวสกัด ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระส่วนใหญ่ที่พบได้แก่ polyphenols, flavonoids, anthocyanins, tannins และวิตามินที่ละลายในน้ำ ได้แก่ วิตามินซี เป็นต้น ผลที่ได้จากการทดลองต่างๆ ในการต้านออกซิเดชันต่อลิโปโปรตีน พลาสมา และ โปรตีน BSA จะเป็นผลของการทำงานร่วมกันระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิดแบบ cocktails เนื่องจากสารสกัดที่ใช้นั้นเป็นสารสกัดหยาบ (crude extracts) ไม่ได้ผ่านขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์ โดยทั่วไปขั้นตอนการเตรียมสารสกัด อาจใช้ตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ ที่นิยมใช้กัน ได้แก่ methanol หรือ ethanol ก็ได้ ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมและสภาพธรรมชาติของ สิ่งที่ต้องการศึกษา ตัวอย่างเช่น การสกัดด้วย 80% ethanol จะได้สารต้านอนุมูลอิสระทั้งที่มีขั้วและไม่มีขั้วรวมกัน หากทดสอบแล้วให้ผลที่น่าสนใจ จึงค่อยผ่านขั้นตอนแยกบริสุทธิ์บางส่วนเพื่อระบุสารสำคัญ (active ingredients) ในภายหลัง แต่การศึกษานี้ เลือกใช้น้ำกลั่นเป็น Water/Aqueous extracts เนื่องจากต้องการให้เหมือนกับการรับประทานน้ำคั้นผลไม้สด สารที่ออกฤทธิ์จึงอยู่ในกลุ่มที่ละลายน้ำได้ดี อย่างไรก็ตาม ผลที่ได้จากการทำในหลอดทดลอง (*in vitro* study) เป็นเพียง

การทดสอบคัดกรองเบื้องต้น เพื่อนำไปศึกษาในเชิงลึกต่อไป และไม่อาจจะอุปมาว่า ผลที่ได้จะใกล้เคียงกับการทดลองในร่างกาย เพราะมีปัจจัยอื่นๆอีกมากที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของสารสกัด ไม่ว่าจะเป็นการดูดซึม การเปลี่ยนรูปโดยกระบวนการเมตาบอลิซึมในร่างกาย ตัวอย่างเช่น สารประเภท flavonoids ที่พบมากในผลไม้ อาจจะถูกดูดซึมระหว่างการย่อยหรือหลังจากการ hydrolysis ซึ่งจะมีการ form ในรูปอนุพันธ์ ของ flavonoids เช่น sulphate, glucoronide ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้ จะทำให้มีผลต่อ bioavailability และการออกฤทธิ์ (16)

โมเลกุลของ LDL ที่ถูกดัดแปลงไปโดยกระบวนการออกซิเดชัน มีส่วนเกี่ยวข้องกับ การดำเนินไปของโรคแห่งความเสื่อมทั้งหลายได้แก่ ภาวะหลอดเลือดหัวใจตีบแข็ง โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคชรา (17,18) วิธีมาตรฐานที่ใช้ในการเตรียม LDL จากพลาสมาคือ วิธีปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง (ultracentrifugation) อย่างไรก็ตาม การทดลองนี้ ได้ใช้วิธีเลือก ตกตะกอน (selective precipitation) แทน ซึ่งเป็นวิธีทั่วไปที่นิยมเลือกใช้ในห้องปฏิบัติการ เพื่อวัดปริมาณโคเลสเตอรอลที่ประกอบอยู่ในโมเลกุลของไลโปโปรตีนชนิดต่างๆ เนื่องจากไม่ ต้องอาศัยเครื่องมือราคาแพง สิ่งสำคัญคือต้องแน่ใจว่าตะกอนที่ได้นั้นไม่ปนเปื้อนด้วย non-LDL serum proteins เนื่องจากผลแสดงอยู่ในรูปที่คิดต่อ LDL protein content ซึ่งความ แปรปรวนจากสาเหตุนี้หลีกเลี่ยงได้โดยการล้างตะกอน LDL ให้สะอาด การเติม Triton X-100 ก็ช่วยละลายตะกอนได้ดี (19) ปฏิกริยาลิปิดออกซิเดชันภายใต้การชักนำ ของ Cu^{2+} ประกอบ ด้วย 3 ขั้นตอนคือ 1) latency 2) propagation และ 3) decomposition ซึ่งระยะเวลาการเกิด dienes, TBARS และ lipid hydroperoxide อยู่ในช่วง latency, propagation และ early stages ของ decomposition phase (20, 21) วิธีการเลือกตกตะกอนนี้ ใช้หลักการเกิดปฏิกิริยากับ glycosaminoglycans (GAGs) ทั้ง lipid composition และ content ของ sialic acid สามารถปรับเปลี่ยน (modulate) การเกิด ปฏิกิริยากับ GAGs ในที่นี้หมายถึง particles เช่น small dense LDL สามารถเกิดปฏิกิริยากับ GAGs ด้วยความชอบจับสูง (high affinity) นอกจากนั้น วิธีการตกตะกอนยังช่วยเพิ่ม susceptibility ต่อออกซิเดชันโดย Cu^{2+} เนื่องจาก Cu^{2+} แทรกซึมเข้าสู่ LDL particle ได้ง่ายขึ้นหลังจากตกตะกอน (22, 23)

ในการทดลองช่วงแรก ใช้ CuCl_2 ในการออกซิไดซ์ไลโปโปรตีน พบว่าให้ค่าการดูดกลืนแสงของ MDA ต่ำ จึงได้ทดลองใช้ CuSO_4 ร่วมกับ H_2O_2 แทน ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Arshad และคณะ ที่พบว่าการใช้ CuSO_4 กับ H_2O_2 ร่วมกัน ให้ผลการออกซิไดซ์ไลโปโปรตีนดีกว่าการใช้ CuSO_4 หรือ H_2O_2 เพียงอย่างเดียวอย่างหนึ่ง (24)

จากการทดลองดังกล่าว พบว่า Basal Lipoprotein oxidation มีค่าเฉลี่ย 0.12 nmol MDA/mg protein ซึ่งมีค่าต่ำ เมื่อนำมาออกซิไดซ์ภายใต้สภาวะที่ใช้คือ Cu^{2+} 250 μM และ H_2O_2 0.193 mM ที่ 37°C, 3 ชั่วโมง สามารถเร่งการออกซิไดซ์ไลโปโปรตีนได้เฉลี่ยเป็น 12.06 nmol MDA/mg protein คิดเป็น ~ 100.5 เท่าจากเดิม (basal level) สภาวะเช่นนี้จัดว่ารุนแรง ไม่ค่อยพบในร่างกาย แต่การใช้ Cu^{2+} และ H_2O_2 เป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดออกซิเดชัน เป็นโมเดล ที่ได้รับความนิยมนำมาทดสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของสารสกัดต่างๆ และสามารถคำนวณออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งออกซิเดชันและหาค่า IC_{50} ได้ เมื่อนำไลโปโปรตีนมาออกซิไดซ์ ในสภาวะที่มีสารสกัดจากผลไม้ไทยอยู่ด้วย พบว่า สารสกัดจากผลไม้ไทย ทั้ง 8 ชนิด มีฤทธิ์ลดการเกิด lipoprotein oxidation แบบขึ้นกับความเข้มข้น (concentration-dependent manners) โดยมีค่า IC_{50} เรียงตามลำดับดังนี้คือ ฝรั่ง (59.7 $\mu\text{g/ml}$) < มะละกอดิบ (85.0 $\mu\text{g/ml}$) < กล้วยน้ำว้า (144.9 $\mu\text{g/ml}$) $\sim$ มะละกอสุก (146.9.0 $\mu\text{g/ml}$) $\sim$ มะม่วงน้ำดอกไม้สุก (148.5.0 $\mu\text{g/ml}$) < ส้มโอ (231.6 $\mu\text{g/ml}$) < มังคุด (236.5 $\mu\text{g/ml}$) < มะม่วงเขียวเสวยดิบ (522.7 $\mu\text{g/ml}$) ดังนั้น ฝรั่งจึงมีฤทธิ์ในการยับยั้งไลโปโปรตีนออกซิเดชันสูงที่สุด สาเหตุที่ฝรั่ง สามารถยับยั้งการออกซิเดชันได้ดีที่สุด อาจเนื่องมาจากการที่ฝรั่งมีวิตามินซีสูง โดยฝรั่งน้ำหนัก 100 กรัมจะมีปริมาณวิตามินซีอยู่ถึง 230 มิลลิกรัม อย่างไรก็ตาม วิตามินซีในปริมาณที่สูงมากเกินไป ก็พร้อมเป็นสารก่ออนุมูลอิสระได้ ที่เรียกว่า “Pro-oxidant” (25)

งานวิจัยของ Salleh และคณะ ในปี 2002 พบว่า สารสกัดจากมะละกอที่ความเข้มข้น 12.5 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้งการเกิด oxidation ของ LDL ได้ 20% โดยการทดสอบหา MDA ด้วยวิธี TBARS (26) สำหรับในการทดลองครั้งนี้ สารสกัดจากมะละกอดิบ และมะละกอสุก สามารถยับยั้งการเกิด oxidation ของ LDL ได้ $28.3 \pm 9.76 \%$ และ $25.1 \pm 5.78 \%$ ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 5 $\mu\text{g/ml}$ นอกจากนั้น ยังมีรายงานถึงสาร β -carotene, lycopene, วิตามิน อี

(α - tocopherol) ที่มีในผลไม้ไทย โดย R. Charoensiri และ คณะพบว่า มังคุดมีวิตามินอี ส่วนมะม่วงเขียวเสวย, ฝรั่ง และกล้วยน้ำว้า มี β -carotene และ วิตามินอี สำหรับมะม่วง น้ำดอกไม้และส้มโอมี β -carotene, lycopene และวิตามินอี ส่วนมะละกอมมี β -carotene และ lycopene (38)

อาจกล่าวได้ว่า Glutathione (GSH) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญและมีประสิทธิภาพมากที่สุดในเซลล์ มีคุณสมบัติ reducing power รวมถึงยังสามารถรีไซเคิลสารต้านอนุมูลอิสระอื่นๆให้กลับมาทำหน้าที่ใหม่ได้ การทำงานของวิตามินซีและวิตามินอีจึงขึ้นอยู่กับปริมาณของ GSH (39) จากการทดลองจะเห็นว่า glutathione ที่นำมาใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน แสดงฤทธิ์การยับยั้งลิโปโปรตีนออกซิเดชันได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเป็นแบบขึ้นกับความเข้มข้น กล่าวคือ ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ ยับยั้งลิโปโปรตีนออกซิเดชันได้ถึง 73.2 % เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 400 $\mu\text{g/ml}$ ยับยั้งลิโปโปรตีนออกซิเดชันได้ถึง 92.9 %

ต่อไปคือการทดสอบ Whole plasma susceptibility ต่อ peroxidation โดยมี $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ เป็นตัวเร่ง การยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในสภาวะที่มีสารสกัดผลไม้ โดยดูจากผลการทำปฏิกิริยากับ thiobarbituric acid (thiobarbituric acid reactive substances-TBARS) ถึงแม้จะถูกจัดว่าเป็นวิธีที่ไม่จำเพาะเจาะจง แต่ขั้นตอนการดำเนินงานง่ายและสามารถทำได้หลายตัวอย่างทดสอบพร้อมกันทีเดียว จากการทดลองเปรียบเทียบในพลาสมาของคนที่สุขภาพดี กับพลาสมาของผู้ป่วยเบาหวาน พบว่า ระดับ basal MDA ในผู้ป่วยเบาหวานสูงกว่าในคนที่สุขภาพดี (2.4 ± 0.28 S 1.3 ± 0.36 $\mu\text{mol/L}$) ซึ่งน่าจะบ่งชี้ถึงการมี oxidative stress ที่มากกว่า สำหรับผลไม้ที่ลด plasma peroxidation ได้ดีที่สุดคือ ฝรั่ง ดังตารางที่ 6 ส่วนสารสกัดผลไม้ชนิดอื่น ยับยั้งการเกิด plasma peroxidation ได้น้อยกว่า และต้องใช้ความเข้มข้นที่ 400 $\mu\text{g/ml}$ จึงจะให้ผลการยับยั้งที่ประมาณ 50% จึงไม่อาจคำนวณ ค่า IC_{50} ได้ เนื่องจากจะให้ค่าคลาดเคลื่อนไป เพราะกราฟไม่เป็นแบบ dose response curve สาเหตุที่เปอร์เซ็นต์การยับยั้งพลาสมาออกซิเดชันของสารสกัดผลไม้ ต่ำกว่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งลิโปโปรตีนออกซิเดชัน อาจเนื่องมาจากการที่สารสกัดผลไม้แทรกซึมไปยับยั้งในโมเลกุลของลิโปโปรตีนที่ได้จากแยกบริสุทธิ์บางส่วนจากการตกตะกอนได้ดีกว่าส่วนที่ล่องลอยอยู่ในพลาสมา

การทดลองถัดไปคือ การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดผลไม้ในการต้านโปรตีนเสียสภาพ จากกระบวนการออกซิเดชัน (oxidative protein damage) ด้วยวิธี SDS-PAGE สารอนุมูลอิสระที่สำคัญคือ Hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$) เป็นตัวก่อให้เกิดความเสียหายต่อสารชีวโมเลกุลต่างๆ ในเซลล์ (27) โดยกลไกที่มีธาตุโลหะหนักเป็นตัวเร่งให้เกิดการสร้าง Hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$) จากการสลายของ superoxide และ hydrogen peroxide (28) การใช้ $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ เป็นการจำลองจากสิ่งที่เกิดขึ้นในร่างกาย เพื่อผลิต Hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$) ออกมาทำลายโปรตีนในที่นี้คือ BSA โดยจะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในเชิงโครงสร้างใหญ่ (gross structural modification) โปรตีนแตกเป็นชิ้นส่วนเอง (spontaneous protein fragmentation) และเกิดการเชื่อมสายระหว่างโปรตีนไปมา (cross-linking) หรือไวต่อการย่อยสลายมากขึ้น (more susceptible to proteolysis) (29, 30) Hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$) ทำให้โปรตีนเสียหายที่ตำแหน่งเฉพาะ โดยไปออกซิไดซ์วงแหวน imidazole ของกรดอะมิโน histidine ทำให้โปรตีนไม่สามารถทำงานได้หรืออาจสลายตัวไป (degradation) (31) สังเกตว่า แถบโปรตีนที่ปรากฏลดลงในสภาวะที่ถูกออกซิไดซ์ (treated) คงอยู่ในตำแหน่งเดิม ไม่ปรากฏว่ามีแถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลสูงขึ้น แสดงว่าสภาวะการชักนำให้เกิดออกซิเดชัน ไม่ทำให้เกิดการ cross-link ที่นำไปสู่ protein aggregation แต่ทำให้เกิด protein degradation แทน นอกจากนั้นปฏิกิริยาการออกซิเดชันยังเป็นปฏิกิริยาแบบต่อเนื่อง เนื่องจากแถบโปรตีนยิ่งจางลงเมื่อปล่อยให้เวลานานขึ้น Protein degradation เริ่มต้นจากการถูกทำลายโดย Hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$) ตามด้วยการเกิด alkyl, alkoxyl และ alkylperoxyl radical intermediates แล้วลงเอยที่การตัดพันธะเปปไทด์ (29) สำหรับผลการยับยั้งโปรตีนออกซิเดชันที่ดีที่สุดคือ สารสกัดจากมังคุด รองลงมาคือสารสกัดมะม่วงน้ำดอกไม้สุกและ สารสกัดส้มโอ โดยกลไกน่าจะเป็นการจับกับสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นโดยตรง (direct scavengers) ส่วนกลไกการออกฤทธิ์ในเซลล์ของสารจำพวก polyphenols ที่พบมากในผลไม้ พบว่าผ่านทาง receptors หรือเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการนำส่งสัญญาณในเซลล์ (signal transduction) ซึ่งส่งผลเปลี่ยนแปลง redox status และ ปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้อง (32, 33)

จากผลการศึกษาฤทธิ์ต้านโปรตีนออกซิเดชันที่ถูกชักนำด้วยกลูโคสความเข้มข้นสูง (*in vitro* Glycation of BSA) ด้วยวิธีวัด protein carbonyl content ได้ใช้ BSA เป็นโมเดล cell-free solution เสมือนอัลบูมินที่เป็นโปรตีนส่วนใหญ่ในพลาสมาแล้วสัมผัสกับน้ำตาลกลูโคสเป็นระยะเวลานานต่อเนื่องเช่นในผู้ป่วยเบาหวาน ผลการทดลองพบว่า กลูโคสความเข้มข้นสูงชักนำให้เกิดโปรตีนออกซิเดชัน โดยดูจากปริมาณโปรตีน carbonyl content ที่เพิ่มขึ้นตามลำดับเมื่อโปรตีน BSA บ่มกับน้ำตาลกลูโคสเป็นเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ จากการศึกษาที่ผ่านมาก่อนหน้านี้ในหลอดทดลอง พบว่าจะมีการสร้าง superoxide radicals ออกมาจากกลูโคสที่ความเข้มข้นสูงโดยกระบวนการออกซิเดชันด้วยตัวมันเอง (auto-oxidation) (34) ส่วน Marker สำหรับโปรตีนออกซิเดชันที่มีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย คือ protein carbonyl group เกิดจากออกซิเดชันของ side chain ของกรดอะมิโน lysine, proline, arginine และ threonine (35, 36) กลูโคสในกระแสเลือด ของผู้ป่วยเบาหวานที่ควบคุมระดับน้ำตาลไม่ดี อาจสูงถึง 50 mM หรือ 1000 mg% (ค่าอ้างอิงในคนที่มีสุขภาพดี 70-110 mg%) การทดลองนี้ใช้ 2 ความเข้มข้นคือ 100, 500 mM ที่ต้องใช้ความเข้มข้นสูงขนาดนี้ เนื่องจากในสภาวะจริงของการเกิดพยาธิสภาพในผู้ป่วยเบาหวานต้องใช้ระยะเวลาที่ยาวนานนับปี ในการที่จะเกิดภาวะแทรกซ้อนต่างๆ จาก advanced glycation end products ของกระบวนการออกซิเดชัน (37) อย่างไรก็ตาม สารสกัดผลไม้ทั้ง 8 ชนิดไม่ได้แสดงผลการยับยั้งโปรตีนออกซิเดชันที่ถูกชักนำด้วยกลูโคสความเข้มข้นสูง (100 mM) ที่เวลา 4 และ 8 สัปดาห์ แต่มีเพียงสารสกัดมะละกอดิบที่แสดงฤทธิ์การยับยั้งการเกิดโปรตีน carbonyl ในเวลา 8 สัปดาห์ ที่กลูโคสความเข้มข้น 500 mM สำหรับวิตามินซีที่ใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ทำควบคู่ไปกับสารสกัดผลไม้แทนที่จะยับยั้งการเกิด protein carbonyl แต่กลับพบว่า ยิ่งทำให้ค่า protein carbonyl content สูงขึ้น ผลดังกล่าวสอดคล้องกับงานของ Jain AK และคณะ ปี 2002 ที่พบว่า วิตามินซีรบกวนการตรวจวัด protein carbonyl content โดยทำให้ค่าสูงกว่าความเป็นจริง (14)

ในการทดสอบ Fibrinolytic activity ด้วยวิธี modified fibrin plate assay สารสกัดจากมะละกอสุก 40 mg/ml ในปริมาตรที่หยดลงไป 50 μ l คิดเป็นปริมาณ 2 mg สามารถ

ทำให้เกิดส่วนใสมากที่สุด คิดเป็นพื้นที่เท่ากับ 1.69 CM^2 แต่ไม่อยู่ในช่วง กราฟมาตรฐาน จึงรายงานเพียงว่า fibrinolytic activity เทียบได้กับ plasmin ที่ความเข้มข้น $< 2 \text{ } \mu\text{g}$

การศึกษาทางระบาดวิทยา แสดงให้เห็นว่า การรับประทานผักและผลไม้เป็นประจำ มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของ activity ใน fibrinolytic system และช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดก้อนลิ่มเลือดและโรคหลอดเลือดหัวใจ สารสกัดมะละกอสูกมีศักยภาพในการนำไปศึกษาการสลายก้อนลิ่มเลือดต่อในร่างกาย (*in vivo*)

จากการศึกษาในครั้งนี้ ช่วยสนับสนุนการรับประทานผลไม้ไทยที่มีรสชาดอร่อย มีอยู่ทุกฤดูกาล และยังมีคุณค่าในการป้องกันการเกิดออกซิเดชันต่อลิโปโปรตีน พลาสมาและโปรตีน ซึ่งเป็นพื้นฐานในการก่อให้เกิดโรคแห่งความเสื่อมต่างๆ โดยเฉพาะโรคเบาหวาน และโรคหลอดเลือดหัวใจ รวมทั้งช่วยสลายไฟบรินด้วย

สรุปผลการทดลอง

ผลไม้ไทยทั้ง 8 ชนิด ได้แก่ มังคุด, มะม่วงเขียวเสวย (ดิบ), มะม่วงน้ำดอกไม้ (สุก), ส้มโอ, มะละกอ (ดิบ), มะละกอ (สุก), แก้วน้ำว้า และฝรั่ง สามารถลดการเกิดออกซิเดชันของลิโปโปรตีนและพลาสมาได้ โดยฝรั่งสามารถลดการเกิดออกซิเดชันของลิโปโปรตีนและพลาสมาได้มากที่สุด สารสกัดมังคุด มะม่วงสุกและส้มโอ ต้านโปรตีนออกซิเดชันได้ดี ส่วนสารสกัดมะละกอสุกมีฤทธิ์สลายไฟบริน

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

ควรมีการศึกษาในร่างกาย (*in vivo study*) เพื่อนำผลไปใช้ได้จริง ทั้งในด้านการป้องกัน และรักษาโรคต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Ames B.N., Shigenaga M.K. and Hagen T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(17):7915-7922, 1993.
2. Arshad M.A., Bhadra S., Cohen R.M. and Subbiah M.T. Plasma lipoprotein peroxidation potential: a test to evaluate individual susceptibility to peroxidation. *Clin Chem* 37(10 Pt 1):1756-1758, 1991.
3. Astrup T. and Mullertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch Biochem Biophys* 40(2):346-351, 1952.
4. Bachorik P.S. and Albers J.J. Precipitation methods for quantification of lipoproteins. *Methods Enzymol* 129:78-100, 1986.
5. Beal M.F. Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic Biol Med* 32(9):797-803, 2002.
6. Buege J.A. and Aust S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52:302-310, 1978.
7. Coudray C. and Favier A. Determination of salicylate hydroxylation products as an in vivo oxidative stress marker. *Free Radic Biol Med* 29(11):1064-1070, 2000.
8. Coudray C., Talla M., Martin S., Fatome M. and Favier A. High-performance liquid chromatography-electrochemical determination of salicylate hydroxylation products as an in vivo marker of oxidative stress. *Anal Biochem* 227(1):101-111, 1995.
9. Coussons P.J., Jacoby J., McKay A., Kelly S.M., Price N.C. and Hunt J.V. Glucose modification of human serum albumin: a structural study. *Free Radic Biol Med* 22(7):1217-1227, 1997.
10. Davies K.J. Protein oxidation and proteolytic degradation. General aspects and relationship to cataract formation. *Adv Exp Med Biol* 264:503-511, 1990.
11. Deneo-Pellegrini H., De Stefani E. and Ronco A. Vegetables, fruits, and risk of colorectal cancer: a case-control study from Uruguay. *Nutr Cancer* 25(3):297-304, 1996.
12. Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H. and Jurgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 13(4):341-390, 1992.
13. Ferreira A.L. and Matsubara L.S. [Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress]. *Rev Assoc Med Bras* 43(1):61-68, 1997.
14. Forman H.J., Torres M. and Fukuto J. Redox signaling. *Mol Cell Biochem* 234-235(1-2):49-62, 2002.

15. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr* 16:33-50, 1996.
16. Halliwell B., Rafter J. and Jenner A. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? *Am J Clin Nutr* 81(1 Suppl):268S-276S, 2005.
17. Hunt J.V., Dean R.T. and Wolff S.P. Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autooxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *Biochem J* 256(1):205-212, 1988.
18. Jain A.K., Lim G., Langford M. and Jain S.K. Effect of high-glucose levels on protein oxidation in cultured lens cells, and in crystalline and albumin solution and its inhibition by vitamin B6 and N-acetylcysteine: its possible relevance to cataract formation in diabetes. *Free Radic Biol Med* 33(12):1615-1621, 2002.
19. Johnson I.T. and Fenwick G.R. Dietary anticarcinogens and antimutagens: chemical and biological aspects. The royal society of chemistry.
20. Leong L.P. and Shui G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food chemistry* 76:69-75, 2002.
21. Lloyd R.V., Hanna P.M. and Mason R.P. The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction. *Free Radic Biol Med* 22(5):885-888, 1997.
22. Long L.H., Kwee D.C. and Halliwell B. The antioxidant activities of seasonings used in Asian cooking. Powerful antioxidant activity of dark soy sauce revealed using the ABTS assay. *Free Radic Res* 32(2):181-186, 2000.
23. Lyons T.J. Oxidized low density lipoproteins: a role in the pathogenesis of atherosclerosis in diabetes? *Diabet Med* 8(5):411-419, 1991.
24. Maffei F., Tarozzi A., Carbone F., Marchesi A., Hrelia S., Angeloni C., Forti G.C. and Hrelia P. Relevance of apple consumption for protection against oxidative damage induced by hydrogen peroxide in human lymphocytes. *Br J Nutr* 97(5):921-927, 2007.
25. Miller H.E., Rigelhof F., Marquart L., Prakash A. and Kanter M. Antioxidant content of whole grain breakfast cereals, fruits and vegetables. *J Am Coll Nutr* 19(3 Suppl):312S-319S, 2000.
26. Neiva T.J., Benedetti A.L., Tanaka S.M., Santos J.I. and D'Amico E.A. Determination of serum aluminum, platelet aggregation and lipid peroxidation in hemodialyzed patients. *Braz J Med Biol Res* 35(3):345-350, 2002.
27. Oh W.K., Lee C.H., Lee M.S., Bae E.Y., Sohn C.B., Oh H., Kim B.Y. and Ahn J.S. Antidiabetic effects of extracts from *Psidium guajava*. *J Ethnopharmacol* 96(3):411-415, 2005.

28. P. Surinut S.K., R. Surakarnkul. RADICAL SCAVENGING ACTIVITY IN FRUIT EXTRACTS. In: E. Brovelli S.C., D. Farias, T. Hongratanaworakit, M. Botero Omary, S. Vejabhikul, L.E. Craker, Z.E. Gardner (Ed), III WOCMAP Congress on Medicinal and Aromatic Plants - Volume 5: Quality, Efficacy, Safety, Processing and Trade in Medicinal and Aromatic Plants, 2005.
29. Paolini M., Pozzetti L., Pedulli G.F., Marchesi E. and Cantelli-Forti G. The nature of prooxidant activity of vitamin C. *Life Sci* 64(23):PL 273-278, 1999.
30. Pearson D.A., Tan C.H., German J.B., Davis P.A. and Gershwin M.E. Apple juice inhibits human low density lipoprotein oxidation. *Life Sci* 64(21):1913-1920, 1999.
31. Phelps S. and Harris W.S. Garlic supplementation and lipoprotein oxidation susceptibility. *Lipids* 28(5):475-477, 1993.
32. Salleh M.N., Runnie I., Roach P.D., Mohamed S. and Abeywardena M.Y. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation and up-regulation of low-density lipoprotein receptor in HepG2 cells by tropical plant extracts. *J Agric Food Chem* 50(13):3693-3697, 2002.
33. Santos M.T., Valles J., Aznar J. and Vilches J. Determination of plasma malondialdehyde-like material and its clinical application in stroke patients. *J Clin Pathol* 33(10):973-976, 1980.
34. Scoccia A.E., Molinuevo M.S., McCarthy A.D. and Cortizo A.M. A simple method to assess the oxidative susceptibility of low density lipoproteins. *BMC Clin Pathol* 1(1):1, 2001.
35. Stadtman E.R. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu Rev Biochem* 62:797-821, 1993.
36. Stadtman E.R. Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci* 928:22-38, 2001.
37. Stadtman E.R. and Berlett B.S. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem Res Toxicol* 10(5):485-494, 1997.
38. Steinberg D., Parthasarathy S., Carew T.E., Khoo J.C. and Witztum J.L. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 320(14):915-924, 1989.
39. Stohs S.J. and Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* 18(2):321-336, 1995.
40. Zhang C.X., Ho S.C., Chen Y.M., Fu J.H., Cheng S.Z. and Lin F.Y. Greater vegetable and fruit intake is associated with a lower risk of breast cancer among Chinese women. *Int J Cancer* 125(1):181-188, 2009.

41. <http://www.y2khealthanddetox.com/gshcomplex2.html#food>

เอกสารแนบหมายเลข 3

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

เสนอผลงานแบบโปสเตอร์ ในงานวันวิชาการ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ครั้งที่ 5

“ วิถีวิจัย: ทรรศนะที่ 5 สู่ความเป็นเลิศ ” ระหว่างวันที่ 26 – 27 พฤศจิกายน พ.ศ. 2552

ณ หอประชุมมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (เอกสารแนบ)

ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้และกิจกรรมที่ดำเนินการ
และผลที่ได้รับตลอดโครงการ

วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่วางแผนไว้	กิจกรรมที่ดำเนินการ	ผลที่ได้รับ
1. เพื่อตรวจวัดฤทธิ์ทางชีวภาพด้านต่างๆของผลไม้ไทยตามข้อ 1.3.1-1.3.5	1.1 การเตรียมสารสกัดจากผลไม้ไทย 1.2 การเก็บตัวอย่างเลือดจากคนที่มีสุขภาพดีและ ผู้ป่วยโรคเบาหวาน 1.3 ประเมินศักยภาพของผลไม้ไทยในการนำไปใช้ในโรคต่างๆ ได้แก่ โรคหลอดเลือดหัวใจ, โรคเบาหวาน, โรคความจำเสื่อม 1.4 รวบรวมผลและวิเคราะห์ทางสถิติ พร้อมจัดทำรายงานวิจัยและเผยแพร่	1.1.1 เตรียมสารสกัดหยาบ (crude extract) จากผลไม้ไทย 1.2.1 ขอรับรองจริยธรรมการวิจัย 1.2.2. เก็บตัวอย่างเลือดจากคนที่มีสุขภาพดีและผู้ป่วยโรคเบาหวาน 1.3.1 เพื่อตรวจวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้ง Lipoprotein oxidation ในผลไม้ไทย 1.3.2 เพื่อตรวจวัดฤทธิ์ Fibrinolytic activities ในผลไม้ไทย 1.3.3 เพื่อตรวจวัดฤทธิ์ป้องกันการเกิด plasma peroxidation ในผลไม้ไทย 1.3.4 เพื่อตรวจวัดฤทธิ์การยับยั้งออกซิเดชันของโปรตีนจากการชักนำด้วยกลูโคสความเข้มข้นสูงในผลไม้ไทย 1.3.5 เพื่อตรวจหาฤทธิ์ป้องกันการเกิดออกซิเดชันของโปรตีนด้วย $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ โดยวิธี SDS-PAGE ในผลไม้ไทย 1.4 รวบรวมผลและ วิเคราะห์ทางสถิติ พร้อมจัดทำรายงานวิจัยและเผยแพร่	-ได้สารสกัดหยาบจากผลไม้ไทยในรูปผงแห้ง - ได้ใบรับรองจริย- ธรรมการวิจัย -ได้ข้อมูลฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆของสารสกัดจากผลไม้ที่สมบูรณ์ เพื่อนำไปวิเคราะห์และเผยแพร่ - เผยแพร่งานวิจัยทางโปสเตอร์

ภาคผนวก

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้เป็น Analytical Reagent grade (AR grade) ส่วนใหญ่มาจากบริษัท Sigma- Aldrich chemicals[®] ที่เหลือมาจากบริษัทอื่นตามที่ระบุไว้ในขั้นตอนการเตรียมสารละลาย

การเตรียมสารละลาย

1. TCA (Trichloroacetic acid) reagent 100 % (W/V)
ชั่ง TCA 100 g ละลายใน 0.6 M HCl 100 ml
(เตรียม 0.6 M HCl โดยดูดกรด HCl เข้มข้น มา 25 ml เติมน้ำกลั่นในครบ 100 ml)
2. TBA (Thiobarbituric acid) reagent
ชั่ง TBA 17.298 g ละลายใน 0.26 M 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (Tris) 1,000 ml (เตรียม 0.26 M โดยชั่ง Tris มา 31.496 g เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 ml)
3. 0.85% NaCl
ชั่ง NaCl 0.85 g ละลายด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 ml
4. Stock TEP; Tetraethoxy propane 10 mmol/L
TEP (Sigma-Aldrich[®]) 20.8 μ l เติม HCl เข้มข้น 5-8 หยด เขย่าให้เข้ากัน
แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 ml
5. Working TEP 100 μ mol/L
เจือจาง Stock TEP ด้วยน้ำกลั่น โดยใช้ Stock TEP 1 ส่วน : น้ำกลั่น 99 ส่วน
6. Butanol (Merck[®])
7. 0.2 mM dextran sulphate, 0.5M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
ชั่ง dextran sulphate 5 g และ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5.075 g ละลายด้วยน้ำกลั่นจนครบ 50 ml
8. 6% Bovine serum albumin (BSA)
ชั่ง BSA 12 g ละลายด้วยน้ำกลั่นจนครบ 200 ml
9. 4% NaCl
ชั่ง NaCl 8 g ละลายด้วยน้ำกลั่นจนครบ 200 ml

10. 5 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
ชั่ง $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.125 g ละลายด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 ml
11. 1.39 mM H_2O_2
น้ำ 30% H_2O_2 (1.39 M) มาเจือจางเป็น 1000 เท่า จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1.39 mM
12. stock 1M potassium phosphate buffer (pH 7.0)
ผสม 1M KH_2PO_4 39 ml (เตรียม 1M KH_2PO_4 โดยชั่ง KH_2PO_4 6.8045 g ละลายด้วยน้ำกลั่นจนครบ 50ml) กับ 1M K_2HPO_4 61 ml (เตรียม 1M K_2HPO_4 โดยชั่ง K_2HPO_4 17.42 g ละลายด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 ml)
13. 20 mM potassium phosphate buffer
ดูด stock 1M potassium phosphate buffer (pH 7.0) มา 40 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 2,000 ml
14. 0.6% human fibrinogen ใน 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)
ชั่ง human fibrinogen (Fluka analytical[®]) 0.06 g ละลายด้วย 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) 10 ml
15. 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) 0.1 M NaCl
ผสม 1M potassium phosphate buffer 1ml, 1M NaCl 5 ml
(เตรียม 1M NaCl โดยชั่ง NaCl 29.25 g ละลายด้วยน้ำกลั่นจนครบ 500 ml) และน้ำกลั่น 44 ml
16. Thrombin 100 NIH U/ml ใน 20 mM potassium buffer (pH 7.0), 0.1 M NaCl
ละลาย thrombin จาก human plasma (Sigma-Aldrich[®]) 195 U/ml ด้วย 20 mM potassium buffer , pH 7.0. 0.1 M NaCl 1.95 ml
17. plasmin
ละลาย Plasmin จาก human plasma (Sigma-Aldrich[®]) 1 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ml

18. Stacking gel buffer (0.5 M Tris HCl/SDS (pH 6.8), ปริมาตร 500 ml)

Tris	30.275	g
SDS	2.000	g
น้ำกลั่น	400	ml

ปรับ pH ให้ได้ 6.8 ด้วย 6N HCl หรือ saturated NaOH แล้วปรับปริมาตร ให้ครบ 500 ml ด้วยน้ำกลั่น

19. Running gel buffer (1.5 M Tris HCl/SDS (pH 8.8), ปริมาตร 500 ml)

Tris	90.825	g
SDS	2.000	g
น้ำกลั่น	400	ml

ปรับ pH ให้ได้ 8.8 ด้วย 6N HCl หรือ saturated NaOH แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 500 ml ด้วยน้ำกลั่น

20. Electrophoresis buffer (Tank buffer)

Tris	3.020	g
SDS	1.000	g
Glycine	14.400	g
น้ำกลั่น	1,000	ml

ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

21. 0.1% SDS (Overlaying buffer)

SDS	0.100	g
น้ำกลั่น	100	ml

ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

22. 10% Ammoniumpersulfate (APS) (Initiator)

Ammoniumpersulfate	0.010	g
น้ำกลั่น	1.0	ml

เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4° C

23. Protein staining solution

Commassies Brilliant Blue	0.125	g
Absolute Methanol	200	ml

ใช้แท่งแก้วช่วยคนเพื่อให้สีละลายเข้ากันดีกับ methanol

Glacial acetic acid	35	ml
เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร	500	ml

กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 6 เดือน

24. Destain solution I

Absolute Methanol	250	ml
Glacial acetic acid	37.50	ml
เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร	500	ml

เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

25. Destain solution II

Absolute Methanol	25	ml
Glacial acetic acid	37.50	ml
เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร	500	ml

เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

26. 1 mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA)

BSA	0.010	g
Phosphate buffer	10	ml

แบ่งเป็น aliquots เก็บไว้ที่ -20° C

27. Sorrensen's phosphate buffer (150 mM Phosphate buffer)

Solution A

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	11.876	g
dH_2O	1,000	ml

Solution B

KH_2PO_4	9.080	g
dH_2O	1,000	ml

1 M Sorrensen's phosphate buffer (pH 7.3) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

Solution A	7.770	ml
Solution B	2.230	ml

150 mM Sorrensen's phosphate buffer ปริมาตร 10 ml

1 M Sorrensen's phosphate buffer	1.50	ml
น้ำกลั่น	10	ml

เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

28. Glutathione (GSH)

เตรียม stock 16 mM Glutathione ปริมาตร 10 ml ได้โดยผสม

Glutathione	0.098	g
0.15 M PBS	10	ml
เก็บไว้ที่ 4° C		

29. 5 M D-Glucose

D-Glucose	45	g
dH ₂ O	100	ml
เก็บไว้ที่ 4° C		

32. 2 mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA)

BSA	0.02	g
PBS	10	ml
เก็บไว้ที่ 4° C		

33. 2 M HCl

16 N HCl	50	ml
dH ₂ O	250	ml
เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง		

34. 10 mM 2,4 Dinitrophenylhydrazine (DNPH)

DNPH	0.594	กรัม
2 M HCL	300	มิลลิลิตร
เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง		

35. 10% Trichloroacetic acid (TCA)

TCA	50.000	g
dH ₂ O	500	ml
เก็บไว้ที่ 4° C		

36. Ethanol : Ethyl acetate อัตราส่วน 1:1 (v/v)

Ethanol	500	ml
Ethyl acetate	500	ml
ผสมให้เข้ากัน ใส่ขวดแก้วปิดฝาให้สนิท เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง		

37. 6 M Guanidine hydrochloride pH 2.3
- | | | |
|-------------------------|--------|----|
| Guanidine hydrochloride | 45.850 | g |
| dH ₂ O | 80 | ml |
- ปรับ pH ด้วยกรดเข้มข้น HCl เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง
38. 300 mM Sodium azide
- | | | |
|-------------------|-------|----|
| Sodium azide | 0.975 | g |
| dH ₂ O | 50 | ml |
- ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง