



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการระดับซัลฟาเมทอกซีเมลาโทนินในปัสสาวะหลังรับประทานผลไม้ไทย
(Level of 6-sulfatoxymelatonin in urine after consumption of Thai fruits)

โดย รศ.ดร.หุจรี ประทีปะวณิช จอห์นส และคณะ

31 กรกฎาคม 2553

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการระดับซัลฟาเมทอกซีเมลาโทนินในปัสสาวะหลังรับประทานผลไม้ไทย
(Level of 6-sulfatoxymelatonin in urine after consumption of Thai fruits)

คณะผู้วิจัย

สังกัด

- | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1. รศ.ดร.นุจรี ประทีปะวณิช จอห์นส | คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น |
| 2. ผศ.ดร.สุพัตรา ปรศุพัฒนา | คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น |
| 3. ดร. เจฟฟรีย์ รอย จอห์นส | คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น |

ชุดโครงการ “สมุนไพรเพื่อคุณภาพชีวิต”

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Executive summary

ความสำคัญและความเป็นมา

เมลาโทนินเป็นสารที่พบได้ในวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตทั้งในมนุษย์ สัตว์ และพืช เมลาโทนินในมนุษย์เป็นฮอร์โมนที่สร้างจากต่อมไพเนียล ซึ่งเป็นต่อมกลางสมอง มีหน้าที่ควบคุมวัฏจักรของร่างกาย (circadian rhythm) ควบคุมการทำงานของระบบต่อมไร้ท่อ ภูมิคุ้มกัน ระบบสืบพันธุ์ รวมถึงกลไกการเกิดมะเร็ง การศึกษาเมลาโทนินในพืชได้รับความสนใจมากขึ้นในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา โดยพบเมลาโทนินในพืชหลายชนิด และพบมากเป็นพิเศษในพืชสมุนไพรทางยา และพืชเพื่อสุขภาพต่างๆ เช่น ธัญพืช ผัก และผลไม้ ปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาในระดับเมลาโทนินในผลไม้ไทย แต่เชื่อว่าคุณค่าของผลไม้ไทยน่าจะสัมพันธ์กับระดับเมลาโทนินด้วยเช่นเดียวกัน และเป็นไปได้ว่าน่าจะพบเมลาโทนินในปริมาณที่สูงกว่ารายงานอื่นเนื่องจากเป็นผลไม้ในประเทศเขตร้อนที่มีแสงแดดตลอดทั้งปี

การศึกษาที่ผ่านมาทั้งในสัตว์ทดลองและในคนชี้ให้เห็นว่า การรับประทานพืชในปริมาณที่เหมาะสม สามารถเสริมปริมาณเมลาโทนินในร่างกาย และเพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของร่างกายได้ นอกจากนี้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและปริมาณเมลาโทนินของผักและผลไม้ในหลอดทดลองอาจแตกต่างจากระดับเมลาโทนินในกระแสเลือดหลังจากรับประทานผักและผลไม้เข้าไป เนื่องจากเมลาโทนินบางส่วนจะถูกทำลายในตับ ก่อนถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด นอกจากนี้ การรับประทานผักหรือผลไม้ ไม่เพียงแต่เป็นการเสริมเมลาโทนินจากภายนอกเท่านั้น แต่ยังอาจได้รับสารอื่น เช่น กรดอะมิโนทริปโทแฟน ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์เมลาโทนิน หรือสารสำคัญอื่นๆ เข้าไปด้วย จึงอาจมีผลต่อการเพิ่มของปริมาณเมลาโทนิน และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่จะพบในร่างกายได้

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรก ที่ศึกษาปริมาณเมลาโทนินและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในมนุษย์ หลังจากรับประทานผลไม้ไทย 6 ชนิด โดยเป็นการศึกษาในคนควบคู่ไปกับการศึกษาผลในหลอดทดลอง เพื่อให้ทราบปริมาณเมลาโทนินที่แท้จริงที่ร่างกายมนุษย์จะได้รับ หลังจากรับประทานผลไม้ที่มีเมลาโทนินเข้าไป ซึ่งงานวิจัยในครั้งนี้ เลือกศึกษาระดับเมลาโทนินในผลไม้ไทย 6 ชนิด โดยเลือกผลไม้ที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันหรือใกล้เคียงกันกับผลไม้ที่เคยมีรายงานระดับเมลาโทนินมาก่อน รวมไปถึงในผลไม้ที่มีทริปโทแฟนปริมาณสูง ดังนั้น ผลไม้ไทยที่จะศึกษาในการศึกษานี้ ได้แก่ หนามเม่า (ผลไม้ประจำถิ่น และเป็นผลไม้ประเภทเบอร์รี่ ปลูกมากในจังหวัดสกลนคร นครพนม) ส้ม มะละกอ สับปะรด มะม่วง และกล้วย

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อทราบระดับเมลาโทนินในผลไม้แต่ละชนิด
2. เพื่อทราบระดับ antioxidant capacity ของผลไม้แต่ละชนิด
3. เพื่อให้ได้ข้อมูลผลของการเพิ่มระดับเมลาโทนินหลังรับประทานผลไม้แต่ละชนิด
4. เพื่อทราบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันหลังรับประทานผลไม้ทั้ง 6 ชนิด

ระเบียบวิธีวิจัย

หลังจากสกัดผลไม้ตามวิธีการที่กำหนด ได้วิเคราะห์ปริมาณเมลาโทนินในสารสกัดผลไม้แต่ละชนิดด้วยวิธี HPLC fluorescent detector และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผลไม้โดยวิธี DPPH และ FRAP จากนั้น วัดปริมาณเมลาโทนินที่พบในร่างกาย โดยวัดปริมาณ 6-sulfatoxymelatonin (aMT6-s) ในปัสสาวะ ซึ่งเป็นเมตาโบไลต์หลักของเมลาโทนิน และวัดปริมาณ 8-isoprostane ซึ่งเป็นตัวชี้วัดของภาวะเครียดออกซิเดชันในร่างกาย โดยใช้การศึกษาทางคลินิกแบบ crossover ในอาสาสมัคร

สุขภาพดี 30 คน (ชาย 15 หญิง 15) และวัดผลในปัสสาวะหลังจากรับประทานผลไม้ที่ศึกษา กำหนดให้อาสาสมัครรับประทานผลไม้ครั้งละ 1 ชนิด จากนั้นเว้นไป 1 สัปดาห์ ก่อนที่จะเริ่มผลไม้ชนิดต่อไป จนกระทั่งครบทั้ง 6 ชนิด

ผลการวิจัย

ผลการศึกษาพบว่าหมากเม่าเป็นผลไม้ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงสุด และพบความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูงเกือบถึงจุดอิ่มตัว แม้ในความเข้มข้นที่ต่ำ ผลไม้ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันรองลงมาคือ มะม่วง มะละกอ ส้ม สับปะรด และกล้วย ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์ปริมาณเมลาโท닌พบว่า ส้ม มีปริมาณเมลาโท닌สูงสุด (472 ± 80 ng/g) รองลงมาคือ กล้วย (419 ± 71 ng/g) มะม่วง (251 ± 43 ng/g) สับปะรด (158 ± 27 ng/g) หมากเม่า (79 ± 13 ng/g) และมะละกอ (35 ± 6 ng/g) ตามลำดับ

ผลการศึกษาในอาสาสมัครสุขภาพดี พบว่า การรับประทานผลไม้ที่มีเมลาโท닌สูงเพิ่มระดับเมลาโท닌ในร่างกายได้ โดยผลไม้บางชนิดเพิ่มระดับ aMT6-s ในปัสสาวะ (เมตาโบไลต์หลักของเมลาโท닌) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเพิ่มมากที่สุดที่ สับปะรด (127%, $p = 0.004$) รองลงมา คือ กล้วย (103%, $p = 0.001$) และ ส้ม (20%, $p = 0.007$) ส่วนการรับประทานมะละกอ หมากเม่า และมะม่วงในปริมาณที่ศึกษา ยังไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับ aMT6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ ยังพบว่าระดับ 8-isoprostane ในปัสสาวะ (ตัวชี้วัดภาวะเครียดออกซิเดชัน) มีแนวโน้มลดลงหลังจากรับประทานผลไม้ แต่ยังไม่พบนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.07$) ส่วนหนึ่งอาจเนื่องมาจากยังมีกลุ่มตัวอย่างที่น้อย จึงควรศึกษาในกลุ่มตัวอย่างที่ใหญ่ขึ้นต่อไป

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

การรับประทานกล้วยหอม 2 ผล หรือน้ำสับปะรดที่ได้จากการคั้นน้ำสับปะรด 1 กิโลกรัมด้วยเครื่องแยกกาก (ประมาณ 1 แก้ว) หรือ น้ำส้มที่ได้จากการคั้นน้ำส้ม 1 กิโลกรัม (ประมาณ 1 แก้ว) สามารถเสริมปริมาณเมลาโท닌ในร่างกายให้สูงขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้ไม่ได้ศึกษาผลการรับประทานผลไม้ร่วมกับพืชชนิดอื่นที่มีรายงานเมลาโท닌ในปริมาณสูง และสูงกว่าผลไม้ เช่น ธัญพืชและผัก ดังนั้น หากรับประทานผลไม้ร่วมกับพืชดังกล่าว อาจรับประทานผลไม้ในปริมาณที่ลดลงได้ อีกทั้ง การศึกษานี้ศึกษาในอาสาสมัครสุขภาพดี จึงไม่ได้วิเคราะห์ผลด้านอื่น เช่น ระดับน้ำตาล หรือ โปแตสเซียม เป็นต้น ดังนั้น คนที่มีโรคประจำตัว เช่น เบาหวานหรือโรคไต ควรปรึกษาแพทย์ก่อน

Abstract

Melatonin, an endogenous neurohormone, is secreted primarily from the pineal gland. It is a natural antioxidant and controls circadian rhythm of the body. Reduction of melatonin levels has been associated with various chronic diseases and cancer. Melatonin is present in many plants, particularly medicinal plants, vegetables and fruit. No data are available on the level of melatonin in Thai fruits and levels in the body after fruit consumption.

This is the first study measuring melatonin and oxidative stress in humans after consumption of Thai fruits. The purpose of this study was to measure levels of melatonin of six Thai fruits: banana, pineapple, orange, papaya, makmao (Thai berry) and mango, based on their potentially high melatonin or tryptophan content (tryptophan is a precursor of melatonin synthesis). Following fruit extraction based on a protocol, HPLC with fluorescent detector was developed and used to analyze levels of melatonin in the fruit extracts. Antioxidant properties of the fruit extracts were evaluated using DPPH and FRAP methods. The study also examined urine 6-sulfatoxymelatonin (aMT6-s) concentrations, the major melatonin metabolite, and 8-isoprostane levels, a marker of oxidative stress in the body, in a clinical, crossover study with 30 healthy volunteers (15 male and 15 female) after consumption of the selected fruits. Volunteers consumed one fruit at the time, with one week wash-out period before starting the next fruit, until they completed all six fruits.

The results show that makmao contained the highest antioxidant activity and exhibited nearly saturated capacity even at low concentration. Other fruits showing high antioxidant activities are mango, papaya, orange, pineapple and banana, respectively. Analysis of melatonin in fruits show the highest level in orange (472 ± 80 ng/g), following by banana (419 ± 71 ng/g), mango (251 ± 43 ng/g), pineapple, (158 ± 27 ng/g) makmao (79 ± 13 ng/g) and papaya (35 ± 6 ng/g). In human study, there were significantly increased levels of urinary volume-adjusted aMT6-s concentrations after consumption of pineapple (127% increase, $p = 0.001$), banana (103% increase, $p = 0.004$), and orange (20% increase, $p = 0.007$). Consumption of papaya, makmao and mango did not significantly change aMT6 levels. There is a trend of lowered levels of 8-isoprostane in urine after fruit consumption, but there is no statistical significance ($p = 0.07$).

Thai fruits appeared to contain high antioxidant capacities as determined by DPPH and FRAP assay and contain melatonin at higher level than previously reported. In human study, eating fruits with high melatonin content produced significantly increased levels of melatonin urine metabolite. However, type of fruits producing higher melatonin level detected in humans does not appear to correlate with those reported of high antioxidant capacities in the laboratory. There is a trend of reduced oxidative stress in the body after fruit consumption but not significant due to limited sample size. Further study with larger sample size using melatonin markers in the blood is warranted. The effect of tryptophan content of the fruits needs investigation as a potential precursor or up-regulator of melatonin synthesis.

บทคัดย่อ

เมลานินเป็นฮอร์โมนในระบบประสาทที่ส่วนใหญ่หลั่งมาจากต่อมไพเนียล เป็นสารต้านออกซิเดชันที่มีในร่างกายตามธรรมชาติ และควบคุมระบบวัฏจักรประจำวันของร่างกาย การลดลงของระดับเมลานินในเลือดสัมพันธ์กับภาวะโรคเรื้อรังหลายชนิดรวมถึงโรคเมอเร็ง มีรายงานพบเมลานินในพืชหลายชนิด โดยเฉพาะพืชสมุนไพร ผัก และผลไม้ แต่ยังไม่พบการศึกษาในระดับเมลานินในผลไม้ไทย และระดับเมลานินในร่างกายหลังจากรับประทานผลไม้

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรก ที่ศึกษาปริมาณเมลานินและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในมนุษย์ หลังจากรับประทานผลไม้ไทย 6 ชนิด วัดคุณสมบัติของการศึกษาเพื่อวัดระดับเมลานินในผลไม้ไทย 6 ชนิด คือ กล้วย สับปะรด ส้ม มะละกอ หนามเม่า (ผลไม้ประเภทเบอร์รี่) และมะม่วง โดยเลือกจากผลไม้ที่เคยมีรายงานหรือเป็นประเภทเดียวกับที่เคยมีรายงานว่าเมลานินสูง หรือมีรายงานระดับกรดอะมิโนทริปโตแฟนที่สูง เนื่องจากทริปโตแฟนเป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์เมลานินในร่างกาย หลังจากสกัดผลไม้ตามวิธีการที่กำหนด ได้วิเคราะห์ปริมาณเมลานินในสารสกัดผลไม้แต่ละชนิดด้วยวิธี HPLC fluorescent detector และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผลไม้โดยวิธี DPPH และ FRAP จากนั้น วัดปริมาณเมลานินที่พบในร่างกาย โดยวัดปริมาณ 6-sulfatoxymelatonin (aMT6-s) ในปัสสาวะ ซึ่งเป็นเมตาโบไลต์หลักของเมลานิน และวัดปริมาณ 8-isoprostane ซึ่งเป็นตัวชี้วัดของภาวะเครียดออกซิเดชันในร่างกาย โดยใช้การศึกษาทางคลินิกแบบ crossover ในอาสาสมัครสุขภาพดี 30 คน (ชาย 15 หญิง 15) และวัดผลในปัสสาวะหลังจากรับประทานผลไม้ที่ศึกษา กำหนดให้อาสาสมัครรับประทานผลไม้ครั้งละ 1 ชนิด จากนั้นเว้นไป 1 สัปดาห์ ก่อนที่จะเริ่มผลไม้ชนิดต่อไป จนกระทั่งครบทั้ง 6 ชนิด

ผลการศึกษาพบว่าหนามเม่าเป็นผลไม้ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงสุด และพบความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูงเกือบถึงจุดอิ่มตัว แม้ในความเข้มข้นที่ต่ำ ผลไม้ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันรองลงมาคือ มะม่วง มะละกอ ส้ม สับปะรด และกล้วย ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์ปริมาณเมลานินพบว่า ส้ม มีปริมาณเมลานินสูงสุด (472 ± 80 ng/g) รองลงมาคือ กล้วย (419 ± 71 ng/g) มะม่วง (251 ± 43 ng/g) สับปะรด (158 ± 27 ng/g) หนามเม่า (79 ± 13 ng/g) และมะละกอ (35 ± 6 ng/g) ตามลำดับ ผลการศึกษาในอาสาสมัครสุขภาพดี พบว่า ผลไม้บางชนิดเพิ่มระดับ aMT6-s ในปัสสาวะ (เมตาโบไลต์หลักของเมลานิน) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเพิ่มมากที่สุดที่ สับปะรด (127%, $p = 0.004$) รองลงมาคือ กล้วย (103%, $p = 0.001$) และ ส้ม (20%, $p = 0.007$) ส่วนการรับประทานมะละกอ หนามเม่า และมะม่วงในปริมาณที่ศึกษา ยังไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับ aMT6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่าระดับ 8-isoprostane ในปัสสาวะ (ตัวชี้วัดภาวะเครียดออกซิเดชัน) มีแนวโน้มลดลงหลังจากรับประทานผลไม้ แต่ยังไม่พบนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.07$)

ผลไม้ไทยมีสารต้านออกซิเดชันตามวิธีวิเคราะห์ด้วย DPPH และ FRAP ในปริมาณสูง และยังพบเมลานินในผลไม้ทั้ง 6 ชนิด ในปริมาณที่สูงกว่าที่เคยมีรายงานมา การศึกษาในคนแสดงให้เห็นว่าการรับประทานผลไม้ที่มีเมลานินสูงสามารถเพิ่มระดับเมตาโบไลต์ของเมลานินได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตาม ชนิดของผลไม้ที่เพิ่มระดับเมลานินในร่างกายได้สูงนั้น ไม่สัมพันธ์กับชนิดที่มีรายงานฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงในห้องปฏิบัติการ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นแนวโน้มของการลดภาวะเครียดออกซิเดชันหลังจากรับประทานผลไม้ แต่ยังไม่พบนัยสำคัญทางสถิติเนื่องจากจำนวนตัวอย่างยังไม่เพียงพอ การศึกษาต่อไปควรศึกษาในอาสาสมัครจำนวนมากขึ้น รวมทั้งวัดปริมาณเมลานินในเลือดรวมด้วย นอกจากนี้ ควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับบทบาทของทริปโตแฟนในผลไม้ ที่อาจเป็นสารตั้งต้นหรือเพิ่มการผลิตเมลานินในร่างกาย

บทที่ 1 บทนำ

ความสำคัญและที่มา

ข้อมูลทางระบาดวิทยาการรับประทานผักและผลไม้ช่วยลดความเสี่ยงในการเป็นโรคหลายชนิด โดยเฉพาะโรคมะเร็ง โรคหัวใจ และหลอดเลือด ซึ่งหลักฐานทางวิทยาศาสตร์บ่งชี้ให้เห็นว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น วิตามินซี วิตามินอี เบตาแคโรทีน และฟลาโวนอยด์ เป็นต้น ในขณะที่เดียวกัน มีรายงานเชื่อว่าในผักและผลไม้ยังน่าจะมีสารอื่นๆ อีกที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพดังกล่าว

เมลาโท닌เป็นสารที่พบได้ในวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตทั้งในมนุษย์ สัตว์ และพืช เมลาโท닌ในมนุษย์เป็นฮอร์โมนที่สร้างจากต่อมไพเนียล ซึ่งเป็นต่อมกลางสมอง มีหน้าที่ควบคุมวัฏจักรของร่างกาย (circadian rhythm) ควบคุมการทำงานของระบบต่อมไร้ท่อ ภูมิคุ้มกัน ระบบสืบพันธุ์ รวมถึงกลไกการเกิดมะเร็ง (นุจรี 2549) และมีหลักฐานยืนยันฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านออกซิเดชันของเมลาโท닌 (Reiter, Tan 2002) โดยพบว่าในภาวะเครียดออกซิเดชัน ทั้งจากภาวะโรคและสิ่งแวดล้อมต่างๆ ระดับเมลาโท닌ในร่างกายจะลดลง จึงเชื่อว่าการเสริมเมลาโท닌 จะช่วยป้องกันโรคที่เกิดจากอนุมูลอิสระได้ (นุจรี 2549) ปัจจุบันในหลายประเทศ มีผลิตภัณฑ์เมลาโท닌จำหน่ายในรูปแบบอาหารเสริม เพื่อช่วยให้นอนหลับ บรรเทาอาการอ่อนเพลียจากการเดินทาง (jet lag) รวมถึงฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน อย่างไรก็ตามในประเทศไทย เมลาโท닌จัดเป็นยา และยังไม่มีกรจดทะเบียนยาเมลาโท닌ในประเทศ ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวจึงไม่สามารถหาซื้อได้ทั่วไปในประเทศไทย

การศึกษาเมลาโท닌ในพืชเพิ่งได้รับความสนใจในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา โดยพบเมลาโท닌ในพืชหลายชนิด และพบมากเป็นพิเศษในพืชสมุนไพรทางยา และพืชเพื่อสุขภาพต่างๆ Chen et al. (2003) วิเคราะห์ปริมาณเมลาโท닌ในพืชสมุนไพรของจีน จำนวน 108 ชนิด และพบเมลาโท닌ในทุกตัวอย่าง ซึ่งที่น่าสนใจ คือ สมุนไพรที่พบเมลาโท닌ในปริมาณที่สูง (> 2 mcg/g) เป็นสมุนไพรที่ใช้เพื่อสุขภาพในผู้สูงอายุ และรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับอนุมูลอิสระ

การรับประทานอาหารและไวน์เพื่อสุขภาพตามแบบเมดิเตอร์เรเนียนนั้น มีรายงานว่าพบเมลาโท닌ปริมาณสูงในน้ำมันมะกอกบริสุทธิ์ (De la Puerta et al. 2007) ผลเชอร์รี่ (Burkhardt et al. 2001) และไวน์องุ่น (Iriti, Faoro 2006) เช่นเดียวกับธัญพืชต่างๆ ที่ได้รับความนิยม เช่น อัลมอลด์ เมล็ดทานตะวัน โดยเฉพาะเมล็ดวอลนัต ซึ่งองค์การอาหารและยาสหรัฐอเมริกาแนะนำให้รับประทานวันละ 1.5 ออนซ์ เพื่อลดความเสี่ยงของโรคหัวใจและหลอดเลือดนั้น ก็พบเมลาโท닌ระดับสูง (Posmyk, Janas 2009) โดยเชื่อว่าเมลาโท닌ในเมล็ดพืชมีส่วนสำคัญในการป้องกันต้นอ่อนจากการทำลายของออกซิเดชันจากรังสีไอโอเลต อุณหภูมิ และสภาพแวดล้อมต่างๆ (Manchester et al. 2000)

ผลไม้ที่เคยมีรายงานระดับเมลาโท닌 ได้แก่ เชอร์รี่ สตรอเบอร์รี่ ผลเบอร์รี่ต่างๆ สับปะรด และกล้วย และที่น่าสนใจ คือ พืชในแถบอียิปต์ และแถบภูเขาสูง พบรายงานระดับเมลาโท닌ที่สูงกว่า โดยเชื่อว่าเมลาโท닌ปริมาณสูงจำเป็นสำหรับการรอดชีวิตของพืชจากภาวะเครียดออกซิเดชันจากรังสีไอโอเลต และสภาพแวดล้อมที่รุนแรงได้ (Baghurst, Coghill 2006) ปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาในระดับ เมลาโท닌ในผลไม้ไทย แต่เชื่อว่าคุณค่าของผลไม้ไทยน่าจะสัมพันธ์กับระดับเมลาโท닌ด้วยเช่นเดียวกัน และเป็นไปได้ว่าน่าจะมีพบเมลาโท닌ในปริมาณที่สูงกว่ารายงานอื่น เนื่องจากเป็นผลไม้ในประเทศเขตร้อนที่มีแสงแดดตลอดทั้งปี

การพบเมลาโท닌ในพืชทำให้เชื่อว่าการรับประทานพืชที่มีเมลาโท닌 สามารถเสริมปริมาณเมลาโท닌ในกระแสเลือด และเพิ่มความสามารถของร่างกายในการต้านอนุมูลอิสระได้ สมมุติฐานดังกล่าวได้รับการยืนยันจากการศึกษาของ Reiter et al. (2005) ซึ่งพบว่าหนูที่กินเมล็ดวอลนัตมีระดับเมลา

โทนิโนในเลือดสูงกว่ากลุ่มควบคุมถึง 3 เท่า ส่วนการศึกษาในมนุษย์พบว่าการกินผักสัมพันธ์กับระดับ 6-sulfatoxymelatonin ในปัสสาวะ ซึ่งเป็นเมตาโบไลต์ของเมลาโทนิโน และเป็นตัวแทนของระดับเมลาโทนิโนในเลือด (Nagata et al. 2005) และอาสาสมัครที่รับประทานผักที่มีรายงานเมลาโทนิโนสูง วันละ 350 กรัม เป็นเวลา 65 วัน มีระดับ 6-sulfatoxymelatonin ในปัสสาวะสูงกว่ากลุ่มควบคุม (Oba et al. 2008)

นอกจากนี้ ยังมีการศึกษามากมายที่ทำการวัดปริมาณเมลาโทนิโนของผักและผลไม้ในหลอดทดลอง แต่ปริมาณที่ได้นั้น อาจแตกต่างจากการวัดระดับเมลาโทนิโนของผักและผลไม้ในกระแสเลือดหลังจากรับประทานเข้าไป เนื่องจากการรับประทานผักหรือผลไม้ นั้น ไม่เพียงแต่เป็นการเสริมเมลาโทนิโนจากภายนอกเท่านั้น แต่ยังอาจได้รับสารอื่น ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์เมลาโทนิโนเข้าไปร่วมด้วย เช่น กรดอะมิโน tryptophan (ปิยรัตน์, 2545) จึงอาจไปมีผลต่อการเพิ่มของระดับปริมาณเมลาโทนิโนได้ และยังพบว่า melatonin ถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้เพียงประมาณ 15 % (Rob L et al. 2000) อีกทั้งจากการทำการศึกษาในอาสาสมัครเพศชายสุขภาพดี 4 คน โดยให้รับประทานเมลาโทนิโนขนาด 500 mg แล้วทำการวัดระดับเมลาโทนิโนในกระแสเลือด พบว่าในแต่ละคนมีค่า bioavailability ที่แตกต่างกันอย่างมาก คือ 480-9200 ng/l (Di WL et al. 1997)

การศึกษานี้จึงออกแบบให้เป็นการศึกษาในคนควบคู่ไปกับการศึกษาผลในหลอดทดลอง เพื่อให้ทราบปริมาณเมลาโทนิโนที่แท้จริงที่ร่างกายมนุษย์จะได้รับ หลังจากการรับประทานผลไม้ที่มีเมลาโทนิโนเข้าไป ซึ่งงานวิจัยในครั้งนี้ เลือกศึกษาระดับเมลาโทนิโนในผลไม้ไทย 6 ชนิด โดยเลือกผลไม้ที่อยู่ในกลุ่มเดียวหรือใกล้เคียงกันกับผลไม้ที่เคยมีรายงานระดับเมลาโทนิโนมาก่อน รวมไปถึงในผลไม้ที่มี tryptophan ปริมาณสูง เนื่องจากต่อมไพเนียลสร้างเมลาโทนิโนจากกรดอะมิโน tryptophan (Hardeland, Pandi-Perumal 2005) จึงเชื่อว่าผลไม้ที่มี tryptophan น่าจะทำให้เพิ่มปริมาณการสังเคราะห์เมลาโทนิโนในร่างกายได้สูงด้วย ดังนั้น ผลไม้ไทยที่จะศึกษาในการศึกษานี้ ได้แก่ หนามเม่า (ผลไม้ประจำถิ่น และเป็นผลไม้ประเภทเบอร์รี่ ปลูกมากในจังหวัดสกลนคร นครพนม) ส้ม มะละกอ สับปะรด มะม่วง และกล้วย

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทราบระดับเมลาโทนิโนในผลไม้แต่ละชนิด
2. เพื่อทราบระดับ antioxidant capacity ของผลไม้แต่ละชนิด
3. เพื่อให้ได้ข้อมูลผลของการเพิ่มระดับเมลาโทนิโนหลังรับประทานผลไม้แต่ละชนิด
4. เพื่อทราบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันหลังรับประทานผลไม้ทั้ง 6 ชนิด

ประโยชน์ของการวิจัย

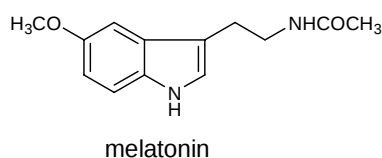
การศึกษานี้จะช่วยทำให้ทราบสารสำคัญในผลไม้ดังกล่าวที่มีผลต่อสุขภาพ และการศึกษาในอาสาสมัครนั้น จะช่วยให้ได้ข้อมูลที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพของผลไม้ดังกล่าวต่อสุขภาพของผู้บริโภค ทำให้ได้ ผลลัพธ์ที่เป็นรูปธรรม และนำไปประยุกต์ใช้ได้จริง

ทบทวนวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

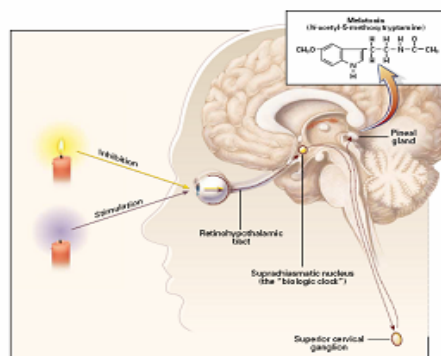
เมลาโทนิโน

เมลาโทนิโนเป็นสารที่สร้างและหลั่งจากต่อมไพเนียล มีโครงสร้างหลักที่ประกอบด้วยหมู่อินโดล (Indole core) (รูปที่ 1) ซึ่งจะถูกระตุ้นให้มีการหลั่งในเวลาการกลางคืน โดยจะเริ่มสร้างในเวลากลางคืน ตั้งแต่เวลา 21.00 – 22.00 น. และถึงระดับสูงสุด เมื่อเวลา 02.00 – 04.00 น. จากนั้นเมลาโทนิโนจะลดลงเรื่อยๆ และหยุดสร้างในเวลา 07.00 – 09.00 น. โดยมีกลไกในการกระตุ้น คือ เมื่อแสงลดลงจะมี

การส่งสัญญาณประสาทผ่านทางการมองเห็นจาก retinal ganglion cell ไปสู่ suprachiasmatic nucleus (SCN) ที่อยู่บริเวณไฮโปทาลามัส ผ่าน retionhypothalamic tract กระตุ้นให้มีการสร้างเมลาโท닌จากรดอะมิโนทริปโทแฟน (Brzezinski 1997, Claustrat et al. 2005, นุจรี 2549) ดังรูปที่ 2



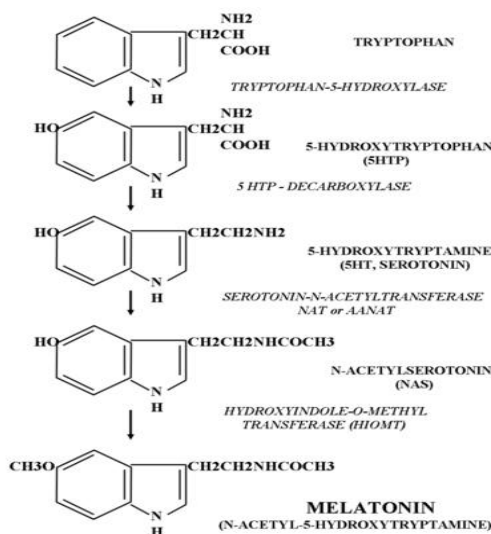
รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างของเมลาโท닌



รูปที่ 2 การสร้างเมลาโท닌

กระบวนการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนทริปโทแฟนเป็นสารเมลาโท닌 ต้องผ่านกระบวนการ 4 ขั้น คือ การเปลี่ยนกรดอะมิโนทริปโทแฟนเป็นสาร 5-hydroxytryptophan ด้วยเอนไซม์ tryptophan 5-monooxygenase (T5M) และถูกเปลี่ยนต่อด้วยด้วยเอนไซม์ Aromatic-l-amino acid decarboxylase (AADC) ได้สารซีโรโทนิน (Serotonin; 5-hydroxytryptamine) จากนั้นถูกเปลี่ยนต่อด้วยเอนไซม์ Arylalkylamine-N- acetyltransferase (AANAT) ได้สาร N-acetylserotonin ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่จะถูกเปลี่ยนเป็นเมลาโท닌โดยกระบวนการสุดท้ายถูกเปลี่ยนด้วยด้วยเอนไซม์ Hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT) (Altun A, Ugur-Altun B 2007) ดังรูปที่ 3

จากงานวิจัยของ Wetterberg L. และคณะ (1999) พบว่า เพศหญิงและเพศชายมีระดับเมลาโท닌ในกระแสเลือดที่แตกต่างกัน โดยในเพศหญิงจะมีระดับเมลาโท닌ในกระแสเลือดมากกว่าเพศชาย อีกทั้งยังพบว่าอายุยิ่งมากขึ้นระดับเมลาโท닌ในกระแสเลือดจะมีปริมาณลดลง



รูปที่ 3 แสดงการกระบวนการสังเคราะห์เมลาโท닌

ปัจจัยที่มีผลรบกวนต่อระดับเมลาโทนินในร่างกาย

นอกจากนี้ยังพบว่า การหลั่งเมลาโทนินในมนุษย์ สามารถถูกรบกวนได้ด้วยปัจจัยต่างๆ (Arendt J, 2002) ได้แก่ แสง การนอนดึก และการดื่มแอลกอฮอล์มีผลทำให้ระดับเมลาโทนินในร่างกายลดลง ส่วนการดื่มเครื่องดื่มที่มี Caffeine มีผลทำให้ระดับเมลาโทนินในร่างกายเพิ่มขึ้น และสำหรับการสูบบุหรี่ยังให้ผลที่ไม่แน่ชัด คือ เป็นไปได้ทั้งมีผลทำให้ระดับเมลาโทนินในร่างกายเพิ่มขึ้นและลดลง (ตารางที่ 1) แต่อย่างไรก็ตามปัจจัยทั้งหมดดังกล่าวก็มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับเมลาโทนินในร่างกาย

ตารางที่ 1 แสดงปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการหลั่งเมลาโทนิน

Factor	Effect(s) on melatonin	Comment
Light	Suppression	>30 lux white 460-480 nm most effective
Light	Phase-shift/ Synchronisation	Short wavelengths most effective
Sleep timing	Phase-shift	Partly secondary to light exposure
Smoking	Reported both increase and decrease	-
Alcohol	Decrease	Dose dependent
Caffeine	Increase	Delays clearance (exogenous)

เมลาโทนินในพืช

เมลาโทนินในพืชนั้นมีโครงสร้างสัมพันธ์กับ plant hormone (auxine, IAA หรือ indole-3-acetic acid) โดยพืชจะหลั่ง plant hormone ที่เรียกว่า auxin เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งทั้งเมลาโทนินและ plant hormone จัดเป็น indole derivatives โดยมีส่วนที่เป็น aromatic (indole part) part เหมือนกัน พบว่าเมลาโทนินในพืชนั้นให้ผลคล้ายกับ auxin ซึ่งน่าจะเกิดจากการจับกับ auxin receptor และมีฤทธิ์เป็น auxin agonist อาจเป็นไปได้ว่าเมลาโทนินถูก metabolise ได้เป็น IAA หรือ IAA agonist ในพืช และจากการศึกษาของ Reiter et al. กล่าวว่า สัตว์ที่กินพืชที่มี melatonin เข้าไป อาจเพิ่มระดับ indoleamine ในสัตว์ได้ เนื่องจากพบว่า หนูมีระดับเมลาโทนินในเลือดเพิ่มขึ้นในตอนเวลากลางวัน หลังจากที่ถูกฉีกรับเข้า (Kolar J., et al., 2005)

จากการศึกษาเมลาโทนินในพืช พบว่าเมื่อให้กินและกระต่ายกินพืชที่มีเมลาโทนินจะทำให้ระดับเมลาโทนินในกระแสเลือดสูงขึ้น นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยอีกมากมายที่ค้นพบว่าสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังจะได้รับเมลาโทนินเสริมจากพืชที่กินเข้าไป (Baghurst, Coghill 2006) โดยตัวอย่างพืชหรือสมุนไพรที่มีรายงานการศึกษาปริมาณเมลาโทนินแสดงในตารางที่ 2

รายงานที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่า พืชที่มีระดับเมลาโทนินมากที่สุด ได้แก่ กลุ่ม medicinal plants เช่นสมุนไพรจีนกว่า 64 ชนิด St. John's wort และ fever few เป็นต้น รองลงมาจะพบมากในพวก เมล็ดพืชหรือธัญพืช ส่วนในผลไม้จะพบได้น้อย และจากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าสาเหตุของการที่พืชบางชนิดมีปริมาณ เมลาโทนินนั้น เพื่อทำหน้าที่เป็นตัวปกป้อง germ cell ของพืช จากปัจจัยของสิ่งแวดล้อมต่างๆ เช่น แสงแดด, UV, ความแห้งแล้ง, อุณหภูมิที่สูงเกินไป และสารเคมีต่างๆ ดังนั้นจึงพบว่าพืชที่ขึ้นอยู่ในที่สูงจะมีเมลาโทนินมาก เนื่องจากพืชต้องการมีเมลาโทนินเพื่อให้มันสามารถมีชีวิตรอดในที่สูงได้

เนื่องจากบริเวณนั้นจะมี UV และ โอโซนอยู่มาก และโอโซนที่มากนี้จะทำให้พืชไม่เจริญเติบโตและยังทำให้ใบได้รับความเสียหายอีกด้วย (Baghurst, Coghill 2006)

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณเมลาโทนินในพืชหรือสมุนไพรชนิดต่างๆ

Plant	Melatonin ng/g plant tissue
Chantui	3771
St Johns Wort (leaves)	1920
Feverfew	1690
White mustard seed	189
Black mustard seed	123
Cherry (Montemorency)	15
Cherry (Balaton)	2
Banana	0.655
Pineapple	0.278

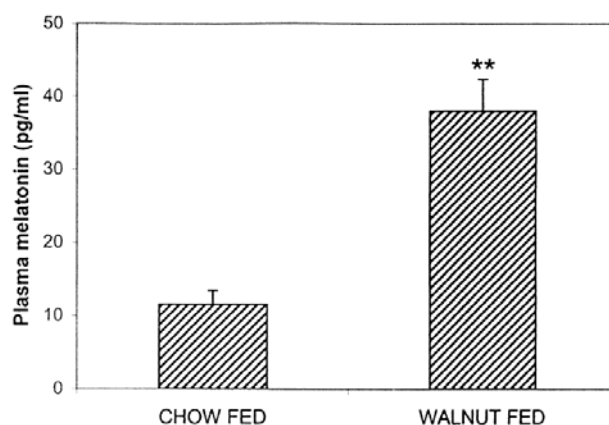
การศึกษาระดับเมลาโทนินหลังรับประทานผักและผลไม้ในคน

งานวิจัยของ Nagata และคณะ (2005) ซึ่งทำการศึกษาในอาสาสมัครชาวญี่ปุ่นเพศหญิงจำนวน 289 คน เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างการรับประทานผักและผลไม้กับระดับ 6-sulfatoxymelatonin (aMT6-s) ซึ่งเป็น metabolite ของเมลาโทนินในปัสสาวะ โดยสอบถามปริมาณการรับประทานผักและผลไม้ จากนั้นวัดระดับ 6-sulfatoxymelatonin (aMT6-s) ในปัสสาวะครั้งแรกที่ตื่นนอน โดยใช้วิธี radio immuno-assay (RIA) หลังจากวิเคราะห์โดยควบคุมอายุ พลังงานทั้งหมด body mass index การดื่มแอลกอฮอล์ ภาวะหมดประจำเดือน และระยะเวลาที่เก็บปัสสาวะ พบว่าปริมาณการรับประทานผักที่เพิ่มขึ้นสัมพันธ์โดยตรงกับระดับ 6-sulfatoxymelatonin ในปัสสาวะที่เพิ่มขึ้น (32.1 ng/mg creatinine ในผักปริมาณ <272 g และเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึง 37.2 ng/mg creatinine ในผักปริมาณ > 498 g; $p = 0.04$) การศึกษานี้ยังไม่พบแนวโน้มการเพิ่มระดับ 6-sulfatoxymelatonin ในปัสสาวะอย่างมีนัยสำคัญกับการรับประทานผลไม้ (31.9 ng/mg creatinine ในผลไม้ปริมาณ <69 g; 37.8 ng/mg creatinine ในผลไม้ปริมาณ > 157 g; $p = 0.11$) ทั้งนี้ เป็นที่น่าสังเกตว่า ปริมาณผลไม้ที่รับประทานมีปริมาณน้อยกว่าผักมาก ซึ่งอาจเป็นส่วนหนึ่งที่ยังไม่พบแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญในการศึกษานี้

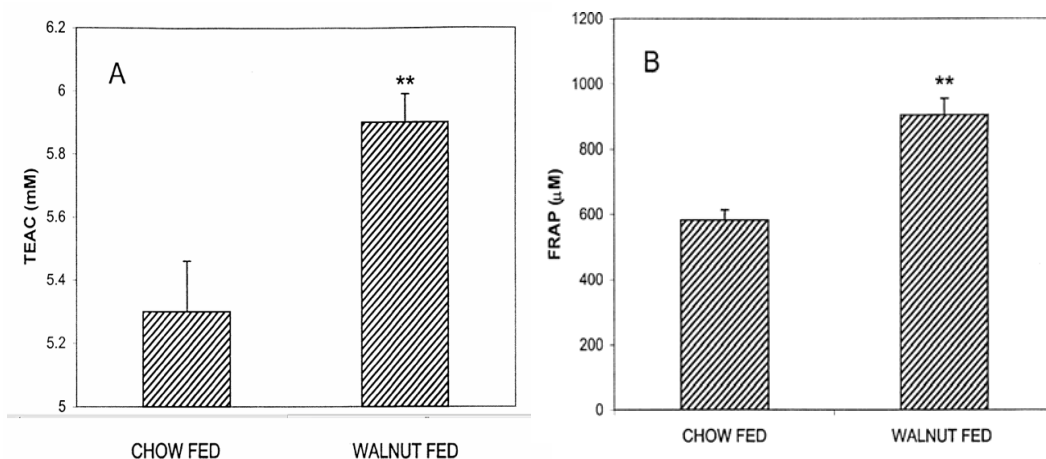
งานวิจัยของ Oba และคณะ (2008) ศึกษาผลของการบริโภคผักกับระดับ 6-sulfatoxymelatonin ในปัสสาวะในตอนเช้า โดยศึกษาในอาสาสมัครเพศหญิงชาวญี่ปุ่นสุขภาพดีที่มีอายุอยู่ในช่วง 24-55 ปี จำนวน 94 คน สุ่มกลุ่มตัวอย่างออกเป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มที่ได้รับประทานผักที่มีเมลาโทนินสูง 6 ชนิด ปริมาณ 350 กรัมต่อวัน และกลุ่มควบคุมซึ่งพยายามหลีกเลี่ยงการรับประทานผักทั้ง 6 ชนิดดังกล่าว ใช้เวลาในการศึกษาทั้งสิ้น 65 วัน โดยเก็บปัสสาวะหลัง ตื่นนอนของอาสาสมัครก่อนและหลังเสร็จสิ้นการทดลอง เพื่อตรวจหาปริมาณ 6-sulfatoxymelatonin ในปัสสาวะ การศึกษาพบว่าการเปลี่ยนแปลงระดับ 6-sulfatoxymelatonin ของทั้งสองกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p=0.03$) โดยหลังการทดลอง กลุ่มที่รับประทานผัก 350 กรัมต่อวัน เป็นเวลา 65 วัน มีระดับ 6-sulfatoxymelatonin ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (49.6 v.s. 48.1 ng/mg creatinine, $p = 0.39$) ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีระดับ 6-sulfatoxymelatonin ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (50.8 v.s. 55.5 ng/mg creatinine, $p = 0.03$)

การศึกษาาระดับเมลาโทนินและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันหลังรับประทานวอลนัตในหนู

Reiter et al. (2005) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับเมลาโทนิน และความสามารถในการเป็น Antioxidant ของเมลาโทนิน หลังจากการกินวอลนัต ในหนู Sprague-Dawley rat น้ำหนัก 150–175 กรัม จำนวน 20 ตัว (กลุ่มควบคุม 8 ตัว และกลุ่มที่กินวอลนัต 12 ตัว) ซึ่งวัดโดยวิธี Radioimmunoassay, Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) และ ferric-reducing ability of serum (FRAP) และรายงานออกมาเป็นค่าเฉลี่ย พบว่าระดับเมลาโทนินในเลือดของกลุ่มที่กินวอลนัต (38.0 ± 4.3 pg/mL) มีความเข้มข้นมากกว่ากลุ่มควบคุม (11.5 ± 1.9 pg/mL) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ดังแสดงในรูปที่ 4 นอกจากนี้ยังพบว่าค่า TEAC และ FRAP ในเลือด เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) เช่นกัน ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสามารถ ในการต้านออกซิเดชัน ดังแสดงในรูปที่ 5 ทั้งนี้ หนูได้รับวอลนัต ปริมาณ 3.0-3.5 g และพบปริมาณเมลาโทนินในวอลนัตดังกล่าวเท่ากับ 3.5 ± 1.0 ng/g



รูปที่ 4 แสดงการเพิ่มของระดับเมลาโทนินในเลือดของหนู หลังจากกินวอลนัต



รูปที่ 5 แสดงการเพิ่มของระดับ TEAC และ FRAP ในเลือดของหนู หลังจากกินวอลนัต

กลไกของเมลาโทนินต่อภาวะเครียดออกซิเดชัน

1. ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยตรง (Radical scavenging activity) เมลาโทนินมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระได้หลายชนิด ที่สำคัญได้แก่ อนุมูลไฮดรอกซิล ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อนุมูลเปอร์ออกซิล และ ซิงเกิลทออกซิเจน

การกำจัดอนุมูลไฮดรอกซิล เมลาโท닌สามารถกำจัดอนุมูลไฮดรอกซิลที่เกิดจากกระบวนการโฟโตไลซิส (photolysis) ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยรังสีอัลตราไวโอเลตที่มีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และตรวจวัดการเกิดขึ้นของอนุมูลไฮดรอกซิลด้วยเทคนิค spin trapping EPR โดยใช้ spin trap 5,5-dimethylpyrroline-N-oxide (DMPO) พบว่าเมลาโท닌ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 1 ถึง 100 ไมโครโมลาร์สามารถลดการสร้าง DMPO-OH adduct โดยมีค่า IC_{50} ต่ำกว่าค่า IC_{50} ของกลูตาไธโอนและแมนนิทอลเท่ากับ 5 ถึง 10 เท่าตามลำดับ แสดงว่าเมลาโท닌มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลไฮดรอกซิลได้ดีกว่ากลูตาไธโอนและแมนนิทอล (Tan, et al., 1993) การศึกษาต่อมาโดยนักวิจัยกลุ่มเดียวกันและกลุ่มอื่นยังคงยืนยันความสามารถในการกำจัดอนุมูลไฮดรอกซิลของเมลาโท닌ไม่ว่าจะเป็นการศึกษาจากปฏิกิริยาเคมี การศึกษากับเซลล์หรือแม้แต่การศึกษาในร่างกายสัตว์ทดลองก็ให้ผลคล้ายคลึงกัน รายงานของ Reiter และคณะ (Reiter, R.J., et al., 2000) แสดงให้เห็นว่าการศึกษาฤทธิ์กำจัดอนุมูลไฮดรอกซิลโดยเทคนิคและวิธีการต่างๆ ให้ค่าคงที่อัตราเร็วในการทำปฏิกิริยาระหว่างเมลาโท닌กับอนุมูลไฮดรอกซิลต่างๆ ตามที่มีรายงานอยู่ระหว่างอยู่ระหว่าง 1.2×10^{10} ถึง $7.5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

การกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ Reiter และคณะ (Reiter, R.J., 2000) ได้แสดงถึงประสิทธิภาพของเมลาโท닌ในการลดปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในลักษณะสัมพันธ์กับความเข้มข้น นอกจากนี้ยังพบว่าเมลาโท닌กำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยการถูกเปลี่ยนเป็น N^1 -acetyl- N^2 -formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) จากการแตกหักของ indole ring ในโครงสร้างเมลาโท닌อันเนื่องมาจากการปฏิกิริยาออกซิเดชัน AFMK มีคุณสมบัติเป็นโมเลกุลที่กำจัด ROS ได้ดีเช่นกัน และในกรณีที่มีเอนไซม์คาทาเลสร่วมพบว่า AFMK ถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น N^1 -acetyl-5-methoxykynuramine (AMK) การเปลี่ยนแปลงทั้งสองขั้นตอนนี้ถือเป็นการส่งเสริมฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของเมลาโท닌ได้เป็นอย่างดี เนื่องจากสารทั้งสองตัวที่ได้มีคุณสมบัติสามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ทั้งคู่

การกำจัดอนุมูลเปอร์ออกซิล เมื่อเปรียบเทียบกับวิตามินอีแล้วถือว่ามีความดีกว่าวิตามินอีโดยเฉพาะอย่างยิ่งในการลดการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน (Escames, F., et al., 1997) อย่างไรก็ตามยังคงพบว่าเมลาโท닌สามารถช่วยป้องกันกระบวนการออกซิเดชันของไขมันในร่างกายได้ โดยอาจเกิดจากการกำจัดอนุมูลไฮดรอกซิลก่อนที่จะเข้าทำปฏิกิริยากับไขมันในช่วงต้นของปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชันมากกว่าที่จะกำจัดอนุมูลเปอร์ออกซิลในระหว่างปฏิกิริยา ส่วนการกำจัดอนุมูลเปอร์ออกซิลในร่างกายโดยตรงนั้นยังไม่มีรายงานยืนยัน

2. การทำงานในกลไกอื่นของเมลาโท닌ที่มีผลลดภาวะเครียดออกซิเดชัน เช่น การกระตุ้นการสร้าง กลูตาไธโอน (Urata, et al., 1999), การทำงานเสริมฤทธิ์สารต้านออกซิเดชันอื่น เช่น รายงานการศึกษาโดย Gitto และคณะ (Gitto, et al., 2001) แสดงให้เห็นจากการศึกษาในหลอดทดลองโดยการเหนี่ยวนำให้เกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน พบว่าเมลาโท닌เสริมฤทธิ์วิตามินอี วิตามินซีและกลูตาไธโอนในการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันต่อกรดไขมันไม่อิ่มตัว แม้ว่ารายงานดังกล่าวไม่ได้อธิบายกลไกการทำงานที่ชัดเจนของเมลาโท닌ในกรณีนี้แต่ได้ให้ข้อมูลถึงการเสริมฤทธิ์ของเมลาโท닌ที่มีต่อประสิทธิภาพสารต้านออกซิเดชันอื่นอย่างชัดเจน

ภาวะเครียดออกซิเดชัน กับ F_2 -isoprotanes

F_2 -isoprotanes เป็นสารประกอบที่คงตัว เกิดจากภาวะ lipid peroxidation ของ arachidonic acid และไม่ขึ้นกับเอนไซม์ cyclooxygenase ซึ่งพบระดับ F_2 -isoprostanes ในเนื้อเยื่อและสารชีวภาพของร่างกายในปริมาณที่วัดได้ โดยไม่ได้ขึ้นกับปริมาณไขมันในอาหาร แต่พบปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในสัตว์ที่มีภาวะการถูกทำลายจากอนุมูลอิสระ (Roberts and Morrow, 2000) ด้วยเหตุที่ระดับ F_2 -

isoprotanes สัมพันธ์กับภาวะต้านออกซิเดชัน F_2 -isoprotanes จึงเป็นตัวชี้วัดที่ดีของภาวะเครียดออกซิเดชัน โดยสารประกอบเหล่านี้จับกับ phospholipid ในร่างกาย แล้วถูกปลดปล่อยเข้าสู่กระแสเลือด ก่อนถูกขับออกทางปัสสาวะในรูป isoprostanes อิสระ (Morrow and Roberts, 1994) ค่า 8-isoprostane ($8\text{-epiPGF}_2\alpha$, $8\text{-isoPGF}_{2\alpha}$, $iPF_{2\alpha}\text{-III}$, $15\text{-F}_{2\alpha}\text{-IsoP}$) เป็นตัวชี้วัดที่เชื่อถือได้ และถือเป็นตัวชี้วัดมาตรฐานสำหรับตรวจสอบภาวะ lipid peroxidation (Moore and Roberts, 1998; Kadiiska et al., 2005).

รายงานที่ผ่านมา แสดงให้เห็นว่าสารต้านออกซิเดชันในธรรมชาติ เช่น polyphenols, flavonoids, anthocyaninins ในอาหาร สามารถลดภาวะเครียดออกซิเดชันในร่างกายได้ (Ross and Kasum, 2002) โดยการลดการเกิด lipid peroxidation ดังนั้น การวัดปริมาณ lipid peroxidation ซึ่งใช้เป็นตัวชี้วัดของภาวะเครียดออกซิเดชันนี้ จึงสามารถวัดได้จากปริมาณ 8-isoprostane ที่พบในปัสสาวะ

บทที่ 2 ระเบียบวิธีวิจัย

การวิจัยแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ

Phase I: วิเคราะห์ผลไม้มันในห้องปฏิบัติการ

Phase II: วิเคราะห์ตัวอย่างชีวภาพจากอาสาสมัครหลังรับประทานผลไม้

Phase I: วิเคราะห์ผลไม้มันในห้องปฏิบัติการ

เป็นการทดลองในห้องปฏิบัติการแบบ Quantitative Analysis โดยมีขั้นตอนดังนี้

การสกัดผลไม้

กระบวนการสกัดผลไม้ ได้ปรับมาจากวิธีการที่ใช้ในการศึกษาก่อนหน้านี้ ที่มีรายงานการสกัดเมลาโทนินจากสมุนไพรมะขาม และผลไม้ จากนั้นได้ทำการทดสอบวิธีการสกัดตัวอย่างผลไม้หลายครั้ง และปรับแก้ไขจนได้วิธีการที่เหมาะสม ดังต่อไปนี้

1. ชั่งผลไม้ปริมาณ 100 กรัม โดยไม่รวมเปลือกและเมล็ด จากนั้นปั่นโดยใช้เครื่องปั่นแยกกาก (Phillips Model HR1821) และวัดปริมาณน้ำผลไม้ที่ได้
2. สกัดน้ำผลไม้ทั้งหมดที่ได้ในเมทานอล สัดส่วน 1:2 (น้ำผลไม้:เมทานอล) ชั่งน้ำหนัก flask ที่ได้ผสมตัวอย่างให้เข้ากันด้วย rotary shaker (UMAC Model UM IS/20/R, USA) ที่ความเร็ว 200 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 คืน
3. กรองด้วยผ้ากรอง 1 รอบ จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman 1) สองรอบ และกระดาษกรองเบอร์ 42 (Whatman 42) สองรอบ ล้างผ้าและกระดาษกรองแต่ละครั้งด้วยเมทานอล 100% ประมาณ 1-2 มิลลิลิตร
4. ระเหยเมทานอลภายใต้ vacuum (Eyela Rotary Evaporator, Tokyo Rikikiai Co. Ltd. Japan) ที่อุณหภูมิ 45 °C จนกระทั่งเกือบแห้ง
5. ล้างขอบ flask ด้วยเมทานอล 100% ปริมาณน้อย แล้วระเหยต่อจนกระทั่งแห้ง และไม่มีการเปลี่ยนเมทานอล
6. เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำไปทำ freeze dry (Flexi-Dry MP, FTS Systems, NY, USA) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งตัวอย่างที่ได้แห้งสนิท
7. ชั่งน้ำหนัก flask ที่มีสารสกัดแห้งอีกครั้ง
8. ขูดสารสกัดที่ได้ และชั่งน้ำหนักของสารสกัดที่ได้ในภาชนะที่ชั่งน้ำหนักไว้ คำนวณ % recovery จาก rotary evaporator flask
9. เก็บสารสกัดที่ได้ภาชนะที่ปิดสนิท ป้องกันแสง ที่อุณหภูมิ 4 °C

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยสารละลาย DPPH (DPPH assay)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการทำปฏิกิริยาของสารทดสอบกับสารละลาย DPPH เป็นขั้นตอนหนึ่งของการวิเคราะห์โดยอาศัยหลักการการถ่ายเทอิเล็กตรอน (electron transfer) ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่วัดความสามารถสารต้านออกซิเดชันในการให้อิเล็กตรอน (reduction reaction) แก่สารออกซิแดนท์ ซึ่งนำไปสู่การเปลี่ยนสีเมื่อออกซิแดนท์นั้นๆ ได้รับอิเล็กตรอน (reduced) ซึ่งเทียบเท่าได้กับความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ (radical scavenging activity) ของสารนั้นๆ การ

เปลี่ยนแปลงในกระบวนการวิเคราะห์จึงนับมีความสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้นของสารต้านออกซิเดชัน (Huang, et al., 2005; Prior, et al., 2005) ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผลไม้ด้วยวิธีการดังกล่าว นับได้ว่าเป็นวิธีที่สะดวก ให้ผลการทดสอบในเวลาอันรวดเร็ว

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Ferric Reducing Antioxidant Potential (FRAP assay)

การแสดงผลฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารใด ๆ โดยวิธีการตรวจวัดความสามารถของสารทดสอบต่อปฏิกิริยาการถ่ายเทอิเล็กตรอน (electron-transfer reaction) ในรูปของค่า FRAP เป็นอีกหนึ่งตัวชี้วัดสำหรับสารสกัดจากธรรมชาติได้ ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการตรวจวิเคราะห์ค่า FRAP (FRAP value) ในการประเมินความสามารถในการแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลไม้

ผลไม้ทั้งหกชนิด (มะม่วง ส้ม สับปะรด มะละกอ หนามเม่า และกล้วย) ที่ผ่านการสกัดและทราบความเข้มข้นสารสกัดที่แน่นอนถูกนำมาทดสอบและเปรียบเทียบโดยการทำปฏิกิริยากับ FRAP reagent (TPTZ-FeCl₃) โดยใช้ ferrous sulfate ในการกำหนดกราฟมาตรฐาน

การวิเคราะห์หาระดับเมลานินในผลไม้ด้วยวิธี RP-C18 HPLC

การวิเคราะห์หาปริมาณเมลานินทำโดยวิธี reverse phase-HPLC (Spectrasystems, USA) ด้วยคอลัมน์ HiQSil RP-C18 column ขนาด 250 mm X 4.6 mm X 5 μ m ใช้ isocratic mobile phase ประกอบด้วย 40% acetonitrile/60% water 1mL/min ใช้ fluorescent detection วัดความยาวคลื่นที่ λ_{ex} =285nm, λ_{ex} =345nm ((SpectraSystems FL2000, Thermo Separation Products, USA),) ซึ่งต่อเข้ากับ an integrator (Clarity HPLC DataSystem, DataApex, Czech Republic). เมลานินมีค่า retention ที่เวลา 5.2 นาที ค่า standard curve เตรียมจากเมลานินมาตรฐาน 5 จุด ที่ ($r^2 > 0.9996$) การเตรียมตัวอย่างสารสกัด ทำจากสารสกัดผลไม้ปริมาณ 5 มิลลิกรัม ละลายในเมทานอล 1 มิลลิลิตร ผ่านเครื่อง sonicate เป็นเวลา 10 ชั่วโมงเพื่อละลายสารสกัด ตัวอย่าง centrifuge ที่ความเร็ว 4000 g เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นฉีดสารตัวอย่างที่ได้จำนวน 50 μ L เพื่อวิเคราะห์ปริมาณเมลานิน วิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ครั้ง

การวิเคราะห์หาระดับเมลานินในผลไม้ด้วยวิธี ELISA

การวิเคราะห์เมลานินในผลไม้โดยใช้ ELISA RE54041 test kits (IBL International, Hamburg, Germany) ซึ่งใช้หลักการการแย่งจับระหว่าง biotinylated and a non-biotinylated antigen กับ แอนติบอดีปริมาณต่าง ๆ โดยได้เตรียมตัวอย่างและวิเคราะห์ตามคู่มือที่กำหนดของบริษัท จากนั้นคำนวณโดยใช้ Cayman Analysis Software วิธีดังกล่าวมีโอกาสเกิด Cross reactivity กับสารอื่นๆ ได้น้อย โดยเป็น 5-methoxytryptamine 2.5%, N-acetylserotonin 1.2%, 5-methoxytryptophol 1.2%, serotonin <0.02% และสารอื่นๆ < 0.01%

Phase II: วิเคราะห์ตัวอย่างชีวภาพจากอาสาสมัครหลังรับประทานผลไม้

รูปแบบการวิจัย

เป็นการวิจัยทางคลินิกในอาสาสมัครสุขภาพดี ใช้รูปแบบการวิจัยแบบ open-label, cross-over design

ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษาวิเคราะห์ระดับความเข้มข้นของ aMT6s ในปัสสาวะ เพื่อเป็นตัวแทนของระดับเมลาโทนินในกระแสเลือด ทั้งนี้ aMT6s เป็นเมตาโบไลต์หลักของเมลาโทนินที่พบได้ในปัสสาวะ และมีความสัมพันธ์โดยตรงกับระดับเมลาโทนินในกระแสเลือด (Bojkowski and Arendt, 1990) ส่วนผลไม้ไทยที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้แก่ กล้วย สับปะรด ส้ม มะละกอ หนามเสือ และมะม่วง งานวิจัยนี้ได้รับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ก่อนเริ่มการศึกษา

คำนิยามในการวิจัย

- **น้ำผลไม้ไทย** หมายถึง น้ำที่คั้นหรือปั่นจากเนื้อผลไม้ไทย ชนิดละ 1 กิโลกรัม ไม่รวมเมล็ดหรือเปลือก ซึ่งใช้กับผลไม้ 4 ชนิด ได้แก่ สับปะรด ส้ม มะละกอ หนามเสือ (ส่วนผลไม้ชนิดอื่น 2 ชนิด คือ กล้วย และมะม่วง ใช้การรับประทานเนื้อผลไม้ แทนการคั้นน้ำผลไม้)
- **การรับประทานน้ำผลไม้ไทย** หมายถึง การรับประทานน้ำผลไม้ไทยสดๆ ชนิดละ 1 ชนิด
- **อาการไม่พึงประสงค์ที่ไม่รุนแรง** หมายถึง อาการไม่พึงประสงค์ที่เกิดขึ้นแล้วหายได้เองภายใน 24 ชั่วโมง โดยไม่ต้องใช้ยาหรือเข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาล

เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัคร

1. อายุ 18 - 25 ปี
2. Body Mass Index (BMI) 18.5 – 22.9 kg/m²
3. สุขภาพดี โดยไม่มีโรคประจำตัว และไม่ต้องใช้ยาประจำ
4. รับประทานผัก ผลไม้ และน้ำผักหรือน้ำผลไม้ รวมกันไม่เกิน 3 ส่วนต่อวัน ตามเกณฑ์คู่มือธงโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข
5. ไม่รับประทานวิตามิน เกลือแร่ หรืออาหารเสริมอื่นๆ
6. ไม่สูบบุหรี่ และไม่ดื่มแอลกอฮอล์ภายใน 1 สัปดาห์
7. ไม่แพ้ผลไม้ 6 ชนิดที่จะทำการศึกษา
8. เข้านอนภายในเวลาไม่เกิน 00.00 น. (เที่ยงคืน)
9. ให้ความร่วมมือในการสัมภาษณ์ และเก็บข้อมูล
10. สามารถเข้าร่วมในโครงการ และยินดียินยอมให้ใช้ข้อมูลในการศึกษา

ขนาดตัวอย่าง

การวิจัยนี้ใช้สถิติแบบ paired t-test จึงใช้สูตรการคำนวณ Sample size ดังนี้

$$N = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 (\sigma_d)^2}{(\delta)^2}$$

กำหนดค่า σ_d (ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) และ δ (mean different) โดยอ้างอิงจากการศึกษาของ Oba et al. 2008 ได้ค่าต่างๆ ดังนี้ $\alpha = 0.05$ (two tailed side), $\beta = 0.1$,
 $\sigma_d = 4.5$ ng/mg creatinine , $\delta = 4.5$ ng/mg creatinine

$$\begin{aligned} \text{จะได้ } N &= \frac{(1.96 + 1.28)^2 (4.5)^2}{(4.5)^2} \\ &= 10.50 \end{aligned}$$

ดังนั้น จึงควรมีจำนวนอาสาสมัครอย่างน้อยที่สุด 11 คน แต่เพื่อให้มั่นใจว่ามีข้อมูลเพียงพอในการวิเคราะห์ หากเกิดปัญหาอาสาสมัครถอนตัวหรือขาดการติดต่อ จึงกำหนดให้เป็นกลุ่มละ 15 คน และเพื่อควบคุมปัจจัยความแตกต่างในเรื่องเพศที่อาจมีผลต่อระดับเมลาโทนิน จึงกำหนดให้เป็นเพศชาย 15 คน และเพศหญิง 15 คน

เครื่องมือที่ใช้ (รายละเอียดในภาคผนวก)

1. แบบคำชี้แจงเพื่ออธิบายแก่อาสาสมัครผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ซึ่งประกอบด้วยรายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัยเพื่ออธิบายแก่อาสาสมัครก่อนที่จะยินยอมเข้าการศึกษา ดังนี้ ชื่อโครงการวิจัย ผู้ทำการวิจัย บทนำ วัตถุประสงค์ ขั้นตอนการปฏิบัติตัวหากอาสาสมัครเข้าร่วมการศึกษา ความเสี่ยงและ/หรือความไม่สบายที่อาจเกิดขึ้น ประโยชน์ที่อาสาสมัครจะได้รับ การรักษาความลับ และวิธีการติดต่อผู้วิจัย หรือแหล่งให้ข้อมูลกรณีที่มีข้อสงสัย
2. แบบยินยอมอาสาสมัคร ซึ่งมีการลงลายมือชื่อของอาสาสมัคร ผู้ให้ข้อมูล และพยาน รวมทั้งวันและเวลาที่ลงลายมือชื่อ เพื่อเป็นหลักฐานว่าอาสาสมัครยินดีเข้าการศึกษาเรียบร้อยแล้วก่อนที่จะมีการกระทำใดๆ กับอาสาสมัคร
3. แบบคัดกรองอาสาสมัคร ซึ่งประกอบด้วยเกณฑ์ในการคัดเลือกกลุ่มศึกษาเข้าร่วมโครงการ และเกณฑ์ในการคัดเลือกละออกจากโครงการ
4. แบบเก็บข้อมูลทั่วไปของอาสาสมัคร ซึ่งประกอบด้วยข้อมูลพื้นฐานทั่วไป คือ น้ำหนัก ส่วนสูง โรคประจำตัว ยาหรืออาหารเสริมที่รับประทาน ประวัติครอบครัว การดื่มเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ และเวลาในการเข้านอน
5. คอมพิวเตอร์เก็บข้อมูลและประมวลผล โดยใช้โปรแกรม Microsoft Office Access และ SPSS version 17

ขั้นตอนการวิจัย

อาสาสมัครที่ผ่านเกณฑ์การคัดเลือก และลงนามยินยอมเข้าร่วมการศึกษาแล้ว กรอกข้อมูลพื้นฐานและรายละเอียดการรับประทานผักและผลไม้ จากนั้นได้รับกำหนดการชี้แจงวันและเวลาการวิจัย โดยเดินทางมาที่คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เพื่อรับประทานอาหารมื้อเย็น พร้อมกับผลไม้ หรือน้ำผลไม้ ตามที่กำหนด สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นจำนวน 6 สัปดาห์ และได้รับอุปกรณ์และคำแนะนำสำหรับเก็บตัวอย่างปัสสาวะสะสมทั้งคืน โดยเก็บตัวอย่างสัปดาห์ละ 2 ครั้ง เพื่อใช้เป็นค่าพื้นฐาน

เปรียบเทียบก่อนและหลังรับประทานผลไม้แต่ละชนิด (ตารางที่ 3) อาสาสมัครต้องจดบันทึกเวลาการนอนในแต่ละวัน และปริมาณผักผลไม้ที่รับประทานในแต่ละวัน ระหว่างที่เข้าร่วมการศึกษา

ในวันที่ศึกษา อาสาสมัครรับประทานอาหารเช้าที่จัดให้ และดื่มน้ำผลไม้หรือกินผลไม้ที่เตรียมในปริมาณที่กำหนด เพื่อควบคุมชนิดของอาหารที่รับประทานในคืนที่ศึกษา อาสาสมัครได้รับอาหารสำรองที่ทางทีมวิจัยจัดเตรียมไว้ให้ เพื่อรับประทานกรณีถ้าอาสาสมัครเกิดอาการหิวขึ้นมาในระหว่างคืนด้วย จากนั้น เก็บปัสสาวะสะสมทั้งคืนในอุปกรณ์ที่จัดให้ ซึ่งนับตั้งแต่เวลา 19.00 น. ถึง 7.00 น. นอกจากนี้ อาสาสมัครจะต้องควบคุมการรับประทานอาหารและผักผลไม้ ให้เป็นในสัดส่วนที่เหมือนกับก่อนเข้าร่วมการศึกษา

ปัสสาวะสะสมที่ได้นำไปใช้ตรวจหาปริมาณ 6-sulfatoxymelatonin ซึ่งเป็นเมตาโบไลต์หลักและเป็นตัวแทนของเมลาโทนินในกระแสเลือด โดยใช้วิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) โดย วิเคราะห์จากปัสสาวะสะสมทั้งคืนของวันก่อนและหลังรับประทานผลไม้ทั้ง 6 ชนิด อันได้แก่ กัลยาสับปะรด ส้ม มะละกอ หนามเม่า และมะม่วง

ตารางที่ 3 สรุปขั้นตอนการวิจัยและการปฏิบัติตัวของอาสาสมัครในแต่ละสัปดาห์

	อาทิตย์	จันทร์	อังคาร	พุธ	พฤหัสบดี	ศุกร์	เสาร์
เก็บปัสสาวะสะสมทั้งคืน						✓	✓
ทานอาหารมื้อเย็นและผลไม้							✓
เก็บน้ำลายที่ 0 20 60 90 120 และ 240 นาที หลังทานผลไม้							✓
บันทึกการทานผักและผลไม้	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
ส่งบันทึกการทานผักและผลไม้							✓

การเตรียมผลไม้สำหรับการศึกษา

ผลไม้ที่ใช้ในการศึกษามีการตรวจสอบสารพิษตกค้าง และผ่านกระบวนการล้างตามคำแนะนำของโครงการผักปลอดสารพิษ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ก่อนนำมาเตรียมให้อาสาสมัคร ทั้งนี้ หนามเม่าและส้มใช้วิธีการคั้นน้ำ จากผลไม้ปริมาณอย่างละ 1 กิโลกรัม ส่วนสับปะรด และมะละกอ ใช้การปั่นด้วยเครื่องแยกกาก จากเนื้อผลไม้ที่ปอกเปลือกแล้วปริมาณอย่างละ 1 กิโลกรัม ส่วนกล้วยและมะม่วงให้รับประทานเป็นเนื้อผลไม้ เนื่องจากน้ำผลไม้ที่ปั่นได้จากผลไม้นี้ดังกล่าวไม่นำรับประทานสำหรับอาสาสมัคร โดยปรับปริมาณที่รับประทานให้เหมาะสม ไม่มากเกินไป โดยเป็นผลกล้วย 2 ผล และมะม่วงจำนวนครึ่งกิโลกรัม (ตารางที่ 4) ทั้งนี้ อาสาสมัครจะต้องดื่มน้ำผลไม้ ภายในเวลา 5 นาที หลังจากปั่นหรือคั้นเสร็จแล้ว การเตรียมน้ำผลไม้ดังกล่าวจะดำเนินการโดยเจ้าหน้าที่ที่ผ่านการอบรมเรื่องการดูแลความสะอาดมาแล้ว

ตารางที่ 4 การเตรียมผลไม้ที่ศึกษาแต่ละชนิด

ผลไม้	ขั้นตอนการเตรียม
1. กล้วย	รับประทานเนื้อกล้วยหอม จำนวน 2 ผล
2. สับปะรด	ป็นแยกกากจากเนื้อสับปะรดพันธุ์ จำนวน 1 กิโลกรัม
3. ส้ม	คั้นจากส้มสายน้ำผึ้ง จำนวน 1 กิโลกรัม
4. มะละกอ	ป็นแยกกากจากเนื้อมะละกอพันธุ์แขกดำ จำนวน 1 กิโลกรัม
5. หมากเม่า	คั้นจากหมากเม่า จำนวน 1 กิโลกรัม
6. มะม่วง	รับประทานเนื้อมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ จำนวน ½ กิโลกรัม

ควบคุมการรับประทานผักและผลไม้ของอาสาสมัคร

ในขั้นตอนการคัดเลือกอาสาสมัคร จะมีการประเมินการรับประทานผักและผลไม้ โดยใช้เกณฑ์คู่มือธงโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข ซึ่งกำหนดว่าวัยรุ่นชาย-หญิงอายุ 14 – 25 ปี ต้องการผักและผลไม้รวมกัน 9 ส่วน ต่อวัน โดยคัดเลือกเฉพาะอาสาสมัครที่รับประทานผักและผลไม้ไม่น้อยกว่า 3 ส่วนต่อวัน โดยจะประเมินจากพฤติกรรมการรับประทานผักและผลไม้ในช่วง 1 สัปดาห์ รวมทั้งความสม่ำเสมอของการรับประทานในลักษณะดังกล่าวในระยะเวลา 1 เดือนที่ผ่านมา และในระหว่างการศึกษา อาสาสมัครต้องควบคุมการรับประทานอาหาร และผักผลไม้ ให้เป็นในสัดส่วนที่เหมือนกับก่อนเข้าร่วมการศึกษา

นอกจากนี้ ในระหว่างการศึกษา อาสาสมัครได้รับสมุดจดบันทึก เพื่อใช้จดบันทึกสัดส่วนของการรับประทานผักและผลไม้ในแต่ละวัน ระหว่างที่เข้าร่วมการศึกษา และส่งบันทึกให้กับนักวิจัยสัปดาห์ละครั้ง โดยสัดส่วน ตามเกณฑ์คู่มือธงโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข ดังนี้

- ผัก 1 ทัพพี เท่ากับ 1 ส่วน
- ผลไม้ 1 ส่วน เท่ากับ กล้วยน้ำว้า 1 ผล หรือ กล้วยหอม 1/2 ผล หรือ ส้มเขียวหวาน 1 ผลใหญ่ หรือเงาะ 4 ผล หรือฝรั่ง 1/2 ผลกลาง ถ้าเป็นผลไม้ใหญ่ เช่น มะละกอ สับปะรด 6-8 คำ
- น้ำผักและน้ำผลไม้ 1 แก้วเท่ากับ 1 ส่วน

การเก็บปัสสาวะ

อาสาสมัครเก็บปัสสาวะสะสมตลอดทั้งคืน โดยเก็บปัสสาวะทั้งหมดที่มีการปัสสาวะ นับตั้งแต่เวลา 19.00 น. ถึง 7.00 น. ทั้งนี้ ผู้วิจัยเตรียมภาชนะปากกว้างที่ป้องกันแสงได้ให้ เพื่อความสะดวกในการเก็บปัสสาวะ และป้องกันการหกหายของปัสสาวะ โดยเฉพาะในอาสาสมัครเพศหญิง อาสาสมัครเก็บปัสสาวะทั้งหมดไว้ที่อุณหภูมิห้องในอุปกรณ์ที่เตรียมไว้ แล้วนำมาส่งให้ผู้ช่วยวิจัยในเช้าวันถัดไป หลังจากเก็บปัสสาวะ ผู้วิจัยวัดและจดบันทึกปริมาณปัสสาวะทั้งหมดที่ได้ แล้วเก็บตัวอย่างปัสสาวะจำนวน 15 มิลลิลิตร ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

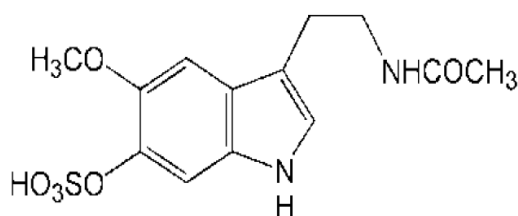
วิธีการตรวจวิเคราะห์

➤ ระดับ 6-sulfatoxymelatonin ในปัสสาวะหลังรับประทานผลไม้

ระดับ 6-sulfatoxymelatonin เป็นเมตาโบไลต์หลักของเมลาโทนิน ถูกขับออกทางปัสสาวะ (รูปที่ 6) และมีข้อมูลแสดงให้เห็นว่ามีความสัมพันธ์กับระดับเมลาโทนินในกระแสเลือด (Bojkowski and Arendt, 1990) รวมทั้งเป็นตัวชี้วัดที่ใช้ในการศึกษาระดับเมลาโทนินหลังการรับประทานผักที่เคยมีรายงานมาแล้ว

(Nagata et al., 2005; Oba et al., 2008) การทดสอบระดับ 6-sulfatoxymelatonin ในการศึกษาใช้วิธีเดียวกับการศึกษาของ Plaimée et al., (2008) ซึ่งทดสอบจากปัสสาวะสะสมทั้งคืน

การวิเคราะห์ใช้ Melatonin Sulfate ELISA Kit (40-371-25006, Genway Biotech Inc, California USA) โดยมีรายงาน cross-reactivity กับ Melatonin Sulfate 100%, Melatonin 0.002%, 6-OH-Melatonin 0.001%, N-Acetyl-L-OHTryptamine 0.0005%, N-Acetyl-L-Tryptophane < 0.0001%, 5-Methoxy-Tryptamine < 0.0001%, Tryptamine < 0.0001% และ 5-HIAA < 0.0001% ส่วน cross-reactivity สารอื่นๆ มีรายงาน < 0.0001% โดย cross-reactivity เหล่านี้ไม่มีผลรบกวนความถูกต้องของการวิเคราะห์ปริมาณ 6-sulfatoxymelatonin ในตัวอย่าง นอกจากนี้ มี Intra-Assay precision 5.2 – 12.2 CV(%) สำหรับค่าในช่วง 5.8 – 204 ng/mL และ Inter-Assay precision 5.1 – 14.9 CV(%) สำหรับค่าในช่วง 12.4 – 220 ng/mL ค่าเฉลี่ย recovery เท่ากับ 105.8% อยู่ในช่วง 91 – 122% และสามารถวัดปริมาณ Melatonin Sulphate ได้ต่ำถึง 1.0 ng/ml



รูปที่ 6 แสดงโครงสร้าง 6-sulfatoxymelatonin (Xiaochao Ma, et al. 2004)

วิธีการเตรียมและวิเคราะห์ตัวอย่างเป็นไปตามคู่มือที่กำหนด โดยสารมาตรฐานจำนวน 8 ความเข้มข้น (0–420 pg/ml of 6-SMT) ถูกวิเคราะห์ความเข้มข้นละ 2 ตัวอย่าง เพื่อใช้สร้างกราฟมาตรฐาน น้ำที่ใช้ล้างและเจือจางตัวอย่างและสารมาตรฐานใช้ Organic free ultrapure water (Elga DV25 Purewater OptionQ system) โดย Elisa เพลสที่เตรียมแล้วนำไปอ่านค่าด้วยเครื่อง Anthos ELISA reader (Labtec Instruments, Sabzburg, Austria) ที่การดูดกลืนแสง 450 nm ร่วมกับโปรแกรม ADAP 1.6 software

ตัวอย่างปัสสาวะเตรียมโดยการ centrifuged ปัสสาวะ เพื่อกำจัดตะกอนที่อาจตกค้างในปัสสาวะ จากนั้นเจือจาง 50 เท่า ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่เตรียมไว้ โดยใช้ calibrated Mettler-Toledo micropipettes เพื่อให้มั่นใจว่าได้ค่าอยู่ในช่วง 20-80% B/B₀ range ของกราฟมาตรฐาน เติมสารละลายตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐานปริมาณ 50 uL ลงในหลุมตัวอย่างของ Elisa เพลสที่เตรียมไว้ สารละลายตัวอย่างบางตัวถูกสุ่มให้วิเคราะห์ 2 ตัวอย่าง เพื่อวิเคราะห์ความแม่นยำของ Elisa เพลสดังกล่าว จากนั้นอ่านผลที่ได้ตามกราฟมาตรฐานที่กำหนด ค่าที่น่าเชื่อถือที่สุดต้องอยู่ในช่วง 20-80% B/B₀ range ของกราฟมาตรฐาน และทำการเปรียบเทียบ 20, 50 and 80% %B/B₀ กับใบรับรองคุณภาพของบริษัท เพื่อยืนยันความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์อีกครั้ง

การคำนวณความเข้มข้น ใช้ Masterplex ELISA platereader software (Hitachi MaraiBio Group San Francisco, USA) ค่า r square ของกราฟมาตรฐานที่ได้อยู่ในช่วง 0.9992 – 0.99986 ความเข้มข้นที่ได้มีหน่วยเป็น pg/mL จากนั้นคูณด้วยจำนวนปัสสาวะสะสมทั้งคืนของอาสาสมัคร หรือ หาค่า urine creatinine levels (mg/dL) ของอาสาสมัคร ซึ่งวิเคราะห์โดยห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลศรีนครินทร์ ค่า intra- and interassay variations ของการวิเคราะห์ เท่ากับ 6 และ 10% ตามลำดับ

➤ ระดับเมลาโทนินในน้ำลายหลังรับประทานผลไม้

ระดับเมลาโทนินในน้ำลายจะพบประมาณ 1/3 ของระดับเมลาโทนินในกระแสเลือด (Gooneratne et al., 2003) จึงใช้เป็นตัวชี้วัดระดับเมลาโทนินที่เข้าสู่กระแสเลือดได้ มีการศึกษาเปรียบเทียบระดับเมลาโทนินในน้ำลายและในเลือด หลังรับประทานเมลาโทนิน 2 มิลลิกรัม โดยพบระดับสูงสุด (peak) ในน้ำลายที่เวลา 60 นาที หลังรับประทานเมลาโทนิน ดังนั้น หากทราบระดับเมลาโทนินสูงสุดหลังรับประทานผลไม้ จะช่วยให้สามารถคำนวณปริมาณผลไม้ที่จะใช้ในการเสริมอาหารหรือเพื่อฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่นๆ ได้ต่อไป

การวิเคราะห์เมลาโทนินในน้ำลายใช้ Non-extraction Sulfate ELISA RE54041 test kits (IBL International, Hamburg, Germany) ซึ่งมีหลักการวิเคราะห์คล้ายกับการวิเคราะห์ 6-sulfatoxymelatonin ในปัสสาวะ แต่ใช้ตัวอย่างน้ำลาย 100 μ L โดยไม่ต้องเจือจาง และใช้ 100 μ L ของสารละลายตัวอย่างและควบคุม ชุดทดสอบนี้เป็นชุดทดสอบใหม่ ยังมีข้อมูลการใช้น้อย และยังไม่มียางานความเที่ยงตรงตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

ชุดทดสอบมียางาน cross-reactivity กับ 5-methoxytryptamine 2.5%, N-acetylserotonin 1.2%, 5-methoxytryptophol 1.2%, and serotonin <0.02% และ รายงาน cross-reactivity กับสารอื่นๆ น้อยกว่า 0.01% นอกจากนี้ มีค่า Analytical Sensitivity (Limit of Detection) 0.3 pg/mL น้ำลาย สำหรับ mean signal (Zero-Standard) - 2SD และ Functional Sensitivity เท่ากับ 1.0 pg/mL saliva ที่ความเข้มข้นเฉลี่ย < 20% CV การทดสอบเปรียบเทียบระหว่าง ELISA Saliva IBL = 0.72 x ELISA - 0.4 N=71 ; R=0.99 กับ IBL RIA as Saliva ELISA = 1.02 x RIA - 0.8 N=82 ; R=0.95.

➤ ระดับ 8-isoprostane ในปัสสาวะหลังรับประทานผลไม้

ระดับ 8-isoprostane เป็นผลลัพธ์ของกระบวนการ lipid peroxidation การทดสอบใช้ชุดตรวจวิเคราะห์ ACE Competitive Enzyme Immunoassay 516315 test kit (Cayman Chemical, Inc, MI USA) การวิเคราะห์ใช้สารละลายตัวอย่างจำนวน 8 ความเข้มข้น (0–500 pg/ml of 8-isoprostane) วิเคราะห์ความเข้มข้นละสอง ตัวอย่าง เพื่อใช้สร้างกราฟมาตรฐาน น้ำที่ใช้ล้างและเจือจางตัวอย่างและสารมาตรฐานใช้ Ultrapure water (Cayman Chemical, Inc, MI USA) โดย Elisa เฟลสที่เตรียมแล้วนำไปอ่านค่าด้วยเครื่อง Anthos ELISA reader (Labtec Instruments, Sabzburg, Austria) ที่การดูดกลืนแสง 450 nm ร่วมกับโปรแกรม ADAP 1.6 software ซึ่งมีหลักการวิเคราะห์คล้ายกับการวิเคราะห์ 6-sulfatoxymelatonin ในปัสสาวะ

การเตรียมตัวอย่างและแปลผลทำเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ 6-sulfatoxymelatonin ชุดวิเคราะห์นี้มีรายงาน Cross-reactivities ของ EIA แอนติบอดี กับ 8-iso-PGF_{2a} ต่ำ โดยรายงาน cross-reactivities > 0.1% สำหรับ 8-iso Prostaglandin F_{3 α} 20.6%, 2,3-dinor-8-iso Prostaglandin F_{2 α} 4.00%, 8-iso Prostaglandin E₂ 1.84%, 2,3-dinor-8-iso Prostaglandin F_{1 α} 1.70%, 8-iso Prostaglandin E₁ 1.56%, Prostaglandin F_{1 α} 0.71%, Prostaglandin F_{3 α} 0.66%, Prostaglandin E₁ 0.39%, Prostaglandin D₂ 0.16%, 6-keto Prostaglandin F_{1 α} 0.14%, Prostaglandin F_{2 α} 0.14% ทั้งนี้ แม้ว่ามียางาน cross-reactivity กับ 8-iso Prostaglandin F_{3 α} (20.6%) สูง แต่สารนี้ไม่พบในปัสสาวะของมนุษย์ Proudfoot et al., 1999) อีกทั้ง cross-reactivity เหล่านี้ไม่มีผลรบกวนความถูกต้องของการวิเคราะห์ปริมาณ 8-isoprostane ในตัวอย่าง ชุดวิเคราะห์สามารถวัดปริมาณ 8-isoprostane ได้ต่ำถึง 2.7 pg/ml (80% B/B₀).

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลพื้นฐานของอาสาสมัครแสดงเชิงพรรณนา การวิเคราะห์ทางสถิติใช้หลัก non-parametric analysis โดยความแตกต่างทางสถิติของข้อมูลพื้นฐานระหว่างเพศหญิงและเพศชายวิเคราะห์โดยใช้ Mann-whitney U test ส่วนระดับ 6-sulfatoxymelatonin และ 8-isoprostane ในปัสสาวะอาสาสมัครแสดงในรูป median $\pm$ Interquartile range (75%-25%) วิเคราะห์โดยสถิติ Wilcoxon sign rank test โดยความแตกต่างของระดับ 6-sulfatoxymelatonin เปรียบเทียบก่อนและหลังการรับประทานผลไม้แต่ละชนิด ส่วนความแตกต่างของระดับ 8-isoprostane เปรียบเทียบก่อนเริ่มการศึกษาและหลังการศึกษา นั่นคือ หลังการรับประทานผลไม้ทั้ง 6 ชนิด ทั้งนี้ กำหนดให้ $p < 0.05$ เป็นค่าที่ระดับที่มีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 3 ผลการวิจัย

Phase I: ผลการวิเคราะห์ผลไม้ในห้องปฏิบัติการ

ผลการสกัดผลไม้

ผลไม้แต่ละชนิดทำการสกัดอย่างละ 3 ตัวอย่าง สารสกัดที่ได้มีลักษณะ semi-crystalline, yellowish whiskers และค่อนข้างเหนียว ยกเว้น หนามเสือซึ่งมีสีม่วงอมชมพู ผลการสกัดผลไม้แต่ละชนิดแสดงในตารางที่ 5 ปริมาตรของน้ำผลไม้ที่ได้อยู่ในช่วง 53 to 67% volume/wt of wet fruit แสดงให้เห็นว่าผลไม้เหล่านี้ประกอบไปด้วยน้ำเป็นส่วนใหญ่ สารสกัดแห้งที่ได้อยู่ในช่วง 5-7% of the weight of the wet fruit ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการสกัดทั้ง 3 ครั้งมีค่าต่ำ แสดงให้เห็นว่ามีค่า reproducibility ที่ดี

ตารางที่ 5 ผลการสกัดผลไม้แต่ละชนิด

Fruit	Orange	pineapple	banana	mango	papaya	makmao
Weight wet fruit (g)	100	100	100	100	100	100
Volume juice extracted (mL)	63.7 ± 6.0	65.7 ± 0.6	67.0 ± 4.4	54.7 ± 2.3	62.0 ± 5.2	53.0 ± 2.7
Average weight dry extract (g)	5.0 ± 0.2	5.8 ± 0.9	8.9 ± 0.6	7.5 ± 0.8	5.0 ± 0.3	3.3 ± 0.4
% extract recovered from wet fruit	5.0 ± 0.2	5.8 ± 0.9	8.9 ± 0.6	7.5 ± 0.8	5.0 ± 0.3	3.3 ± 0.4
% extract recovered from rotary evaporator	99.47 ± 0.46	98.63 ± 1.15	99.44 ± 0.08	99.30 ± 0.13	99.55 ± 0.15	99.74 ± 0.15

Note: ± is 1 standard deviation, N=3

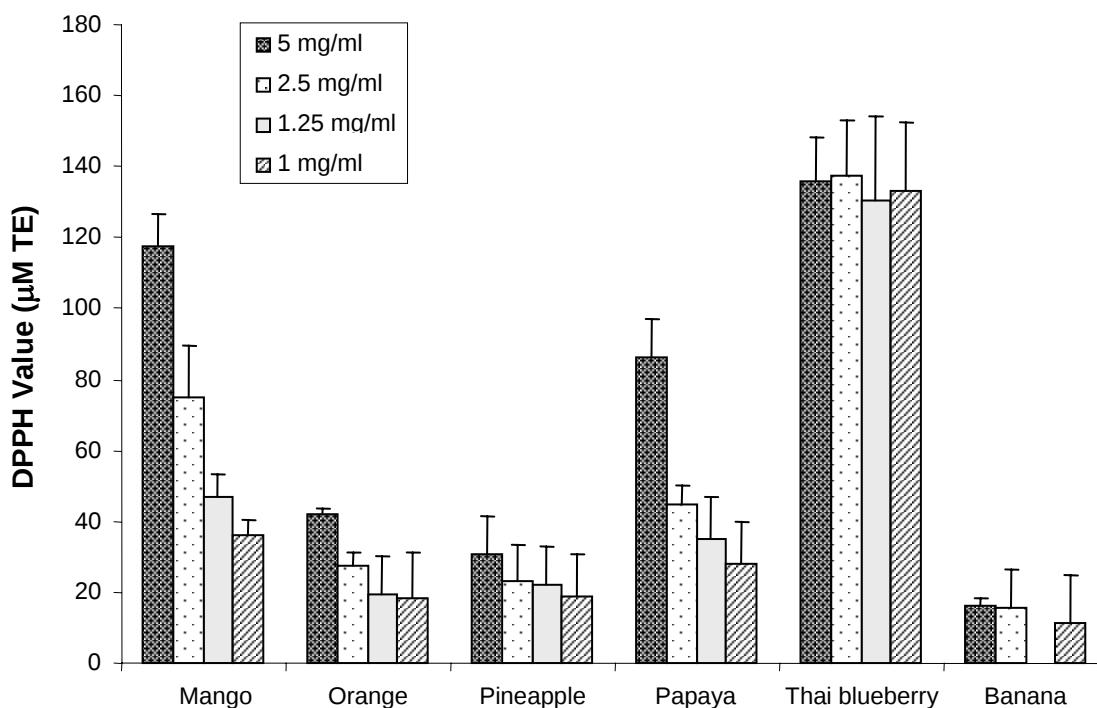
ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยสารละลาย DPPH (DPPH assay)

ผลจากการศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของผลไม้ทั้งหกชนิด ได้แก่ มะม่วง ส้ม สับปะรด มะละกอ หนามเสือ และกล้วย ที่ผ่านการสกัดและทราบความเข้มข้นแน่นอน พบว่าผลไม้ทั้งหกชนิดมีการแสดงออกถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน โดยหนามเสือเป็นผลไม้ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการทดสอบด้วยวิธี DPPH สูงสุด โดยการแสดงค่าในรูปของ Trolox Equivalent (TE) เพื่อแสดงถึงปริมาณสมมูลกับ trolox ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานและกล้วยเป็นพืชที่ให้ฤทธิ์ดังกล่าวต่ำสุด (รูปที่ 7)

เมื่อทำการทดสอบในขนาดต่างๆ กัน ตั้งแต่ความเข้มข้นที่ 1 – 5 mg/ml พบว่าหนามเสือให้ค่า TE ที่ไม่แตกต่างกันในช่วงความเข้มข้นที่ทำการทดสอบ (130.33 – 137.38 μ M TE) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของหนามเสือมีค่าใกล้เคียงกันให้แสดงฤทธิ์สูงสุดตั้งแต่ความเข้มข้นต่ำคือ 1 mg/ml ในขณะที่สารสกัดผลไม้ชนิดอื่นแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในรูป TE ที่สัมพันธ์กับความเข้มข้นที่ปรากฏในสารละลายทดสอบ โดยพบว่ามะม่วงเป็นผลไม้ที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระรองจากหนามเสือ ที่ความ

เข้มข้นทดสอบสูงสุดคือ 5 mg/ml สารสกัดมะม่วงแสดงค่า TE เท่ากับ 117.37 $\mu\text{M TE}$ และที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 2.5, 1.25 และ 1 mg/ml แสดงค่า TE เท่ากับ 75.14, 46.96 และ 35.97 $\mu\text{M TE}$ ตามลำดับ

สารสกัดผลไม้ที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในลำดับลดหลั่นถัดไปได้แก่ มะละกอ ส้ม และสับปะรด ตามลำดับ โดยมะละกามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า ส้มและสับปะรดเล็กน้อย ในขณะที่ส้มและสับปะรดมีฤทธิ์ใกล้เคียงกัน (รูปที่ 7)



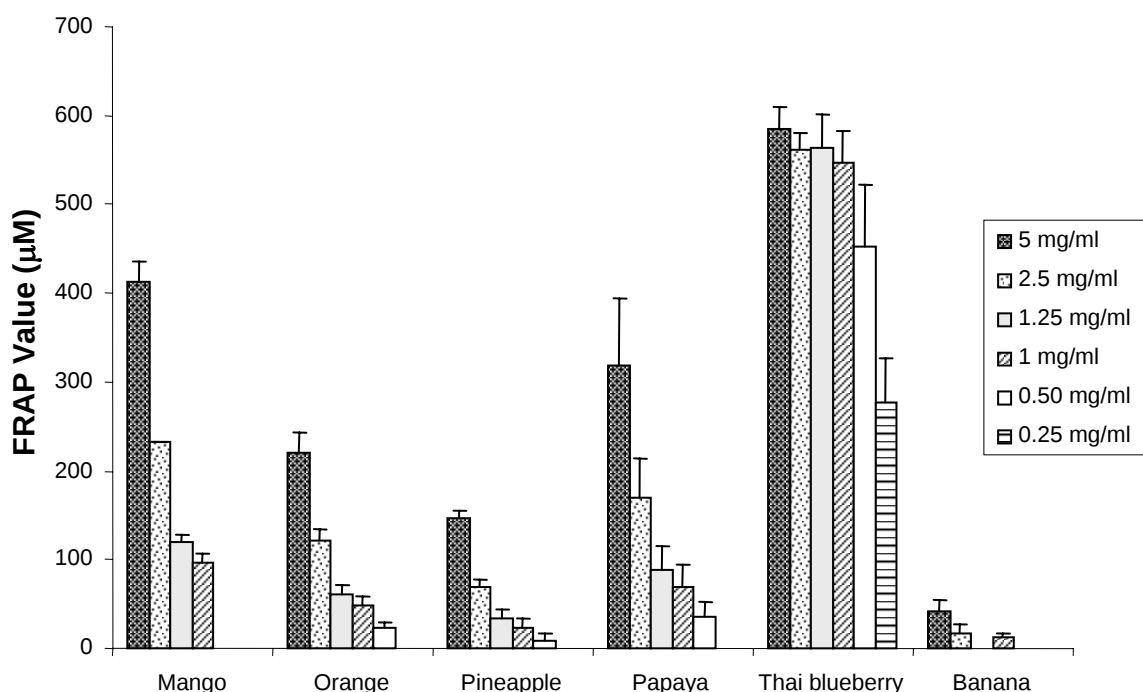
รูปที่ 7: ค่า DPPH values ($\mu\text{M TE}$) แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผลไม้ชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นต่างกัน (1 – 5 mg/ml) (mean $\pm$ SD; pooled samples from four experiments)

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Ferric Reducing Antioxidant Potential (FRAP assay)

ผลการศึกษาในรูปที่ 8 แสดงความแตกต่างอย่างชัดเจนของระดับความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของผลไม้ทั้งหกชนิด โดยพบว่าหมากเป็นผลไม้ที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด มีการเปลี่ยนแปลงของฤทธิ์ดังกล่าวที่สัมพันธ์กับความเข้มข้นอย่างชัดเจน แสดงให้เห็นถึงขนาดหรือความเข้มข้นที่มีผลต่อการแสดงฤทธิ์ (Concentration-response activity) โดยจากความเข้มข้นที่ 2.5, 1.25, 1, 0.5 และ 0.25 mg/ml ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีค่าเท่ากับ 96.20%, 96.61%, 93.47%, 77.37% และ 47.36% เมื่อเทียบกับความเข้มข้นที่ 5 mg/ml ตามลำดับ ซึ่งนับว่าเป็นฤทธิ์ที่สูงแม้เมื่อมีความเข้มข้นค่อนข้างต่ำ

สารสกัดผลไม้ที่ทำการทดสอบชนิดอื่นๆ ก็มีการแสดงออกในรูปความสัมพันธ์ของความเข้มข้นและฤทธิ์อย่างชัดเจน แต่มีค่า FRAP values โดยรวมที่ต่ำกว่าหมาก และมีการเรียงลำดับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในรูปของค่า FRAP values เรียงจากมากไปน้อย ได้แก่ มะม่วง มะละกอ ส้ม สับปะรด และ

กล้วยตามลำดับ ซึ่งกล้วยเป็นผลไม้ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ต่ำมากเมื่อเทียบกับผลไม้ชนิดอื่นที่ทำการทดสอบในการศึกษาครั้งนี้

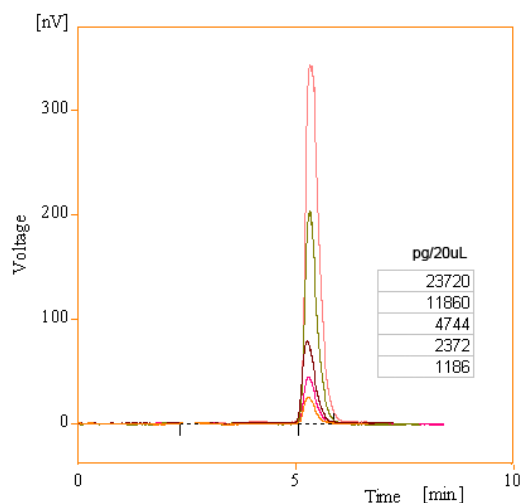


รูปที่ 8 ค่า FRAP values (μM) แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผลไม้ชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นต่างกัน (0.25 – 5 mg/ml) (mean $\pm$ SD; pooled samples from three experiments)

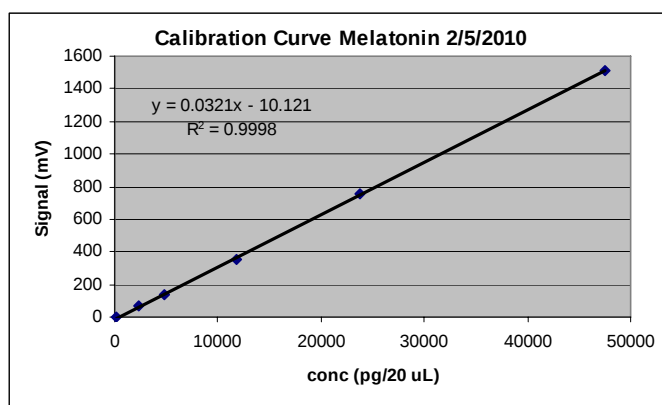
ผลการวิเคราะห์เมลานโทนินในผลไม้ด้วย HPLC

การศึกษานี้ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์เมลานโทนินด้วย HPLC fluorescent detector ซึ่งพบว่าเป็นวิธีที่มีความแม่นยำดี ($r^2 > 0.9998$) และ reproducibility ดี (%CV < 5%) ดังแสดงในรูปที่ 9, 10 และ ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์ในเบื้องต้นพบเมลานโทนินปริมาณมากในตัวอย่างผลไม้ที่ศึกษา แต่ภายหลังพบว่าผลการทดลองดังกล่าวไม่สามารถทำซ้ำได้ โดยหลังจากการทดสอบซ้ำอีก 2 ครั้ง ทั้งวิธีละลายสารสกัดด้วยเมทานอล และน้ำก็ไม่พบปริมาณเมลานโทนินดังกล่าว จากการตรวจสอบปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง คาดว่าเป็นผลจากการปนเปื้อนในระหว่างการเตรียมสารสกัดก่อนวิเคราะห์

หลังการทดลองซ้ำ จึงสรุปได้ว่าวิธีวิเคราะห์ที่ใช้ในการศึกษานี้ ยังไม่พบเมลานโทนินในตัวอย่างที่ศึกษา ทั้งนี้ วิธีวิเคราะห์ด้วย HPLC ที่ใช้สามารถวัดเมลานโทนินได้ด้วยความเข้มข้นได้ต่ำถึง 100 pg ในคอลัมน์ นั่นคือ 100pg/20 μL หรือ 400 ng/g plant tissue แต่อาจจะยังไม่ต่ำพอสำหรับวัดปริมาณเมลานโทนินในผลไม้ เนื่องจาก รายงานการศึกษานี้พบเมลานโทนินในผลไม้ในระดับต่ำ คือ อยู่ในช่วง 0.6 – 15 ng/g plant tissue นั้นหมายความว่า ผลไม้ที่ศึกษาอาจมีระดับเมลานโทนินต่ำกว่าความสามารถของเครื่อง HPLC ตามวิธีที่ใช้นี้จะวัดได้ ดังนั้น ในการศึกษาต่อไป อาจพิจารณาใช้ ELISA kit หรือ พัฒนาวิธี HPLC โดยใช้ EC detector ซึ่งมีความไวสูงกว่า fluorescent detector ที่ใช้ในการศึกษานี้



รูปที่ 9 ลักษณะของ HPLC spectrum ที่ได้จากการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน



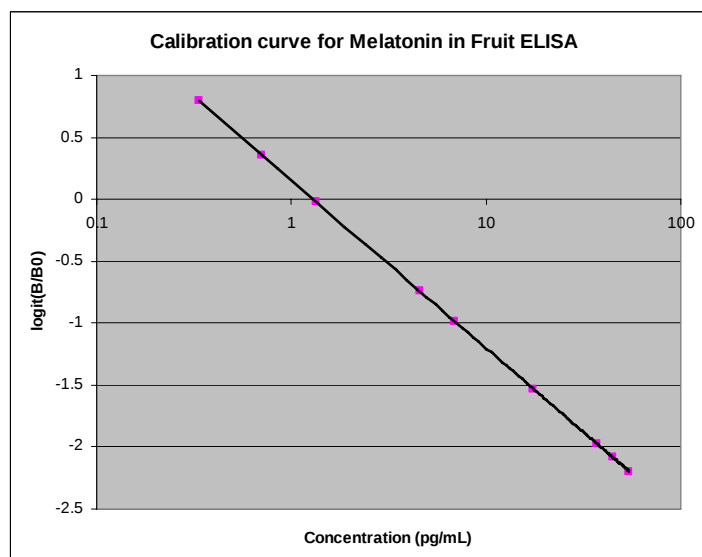
รูปที่ 10 กราฟมาตรฐานของตัวอย่างเมลาโทนินที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

ตารางที่ 6 ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานด้วยเครื่อง HPLC

Retention time /		Conc pg/20uL	Peak Area / mN.s	Peak Height / mV	File
mins					
13.513		47440	1515.034	33.178	469
13.547		23720	754.637	18.366	468
13.533		11860	357.821	9.104	470
13.553		4744	133.731	2.535	471
13.573		2372	73.153	1.92	472
13.543		118.6	2.57	0.127	474
Correlation			0.99988	0.99740	
Slope			0.0323	0.00071	
Intercept			14.0116	0.26107	
Std Dev.	0.022293				
%RDS	0.164646				
Area:height	0.99751				
Noise level	0.010 mV				

ผลการวิเคราะห์เมลานินในผลไม้ด้วย ELISA

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณเมลานินโดย HPLC เบื้องต้น จึงได้เจือจางสารสกัดผลไม้ 100 เท่า เพื่อให้สามารถได้ค่าอยู่ในช่วงการวัดของ ELISA และได้ผลตามที่แสดงในตารางข้างล่าง ซึ่งพบว่า ส้มมีปริมาณเมลานินสูงสุด (472 ± 80 ng/g) รองลงมาคือ กล้วย (419 ± 71 ng/g) มะม่วง (251 ± 43 ng/g) สับปะรด (158 ± 27 ng/g) หนามเม่า (79 ± 13 ng/g) และมะละกอ (35 ± 6 ng/g) ตามลำดับ



Fruit	Concentration ng/g extract	Concentration ng/g wet fruit
Banana	5029 ± 855	419 ± 71
Papaya	745 ± 123	35 ± 6
Mango	3365 ± 572	251 ± 43
Makmao	2118 ± 360	79 ± 13
Orange	9796 ± 1665	472 ± 80
Pineapple	2339 ± 398	158 ± 27

Phase II: ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างชีวภาพจากอาสาสมัครหลังรับประทานผลไม้

การศึกษามีอาสาสมัครสุขภาพดีทั้งหมด 30 คน โดยแบ่งเป็นชาย 15 คน และหญิง 15 คน อายุเฉลี่ย 21 ปี ค่าเฉลี่ยดัชนีมวลกาย (body mass index) 20.5 ข้อมูลพื้นฐานของผู้เข้าร่วมการศึกษา (ตารางที่ 7) ทั้งนี้ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างข้อมูลเพศชายและเพศหญิง

งานวิจัยนี้มีบางส่วนที่ไม่เป็นไปตามโครงงานวิจัย ได้แก่ ชนิดของผลไม้ที่ทดลองได้เปลี่ยนจากมังคุดเป็นมะม่วงแทน เนื่องจากในช่วงที่ทำการทดลองผู้วิจัยไม่สามารถหามังคุดได้ เพราะขณะนั้นไม่ใช่ช่วงที่มังคุดออกผล ดังนั้นจึงได้เปลี่ยนจากมังคุดไปเป็นมะม่วง โดยทำการคัดเลือกจากผลไม้ที่คาดว่าที่มีระดับเมลานินสูงตามลำดับถัดลงมาจากผลไม้ทั้งหมดชนิดที่เลือกไปก่อนหน้านี้แล้ว

ตารางที่ 7 แสดงข้อมูลพื้นฐาน (Baseline characteristics) ของอาสาสมัครผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย

Baseline characteristics	อาสาสมัครที่ รับประทาน ผลไม้ (n=30)
เพศ (ชาย/หญิง) (n)	15/15
อายุ, ปี (mean±SD)	21.77±1.63
ความสูง, เซนติเมตร (mean±SD)	166.83±11.08
น้ำหนัก, กิโลกรัม (mean±SD)	55.63±10.77
ดัชนีมวลกาย, กิโลกรัม/เมตร ² (mean±SD)	20.5±1.78
ไม่มีโรคประจำตัว (n)	30
ไม่มีปัญหาเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร (n)	30
ไม่มีประวัติแพ้อาหาร หรือผลไม้* (n)	30
รับประทานผัก ผลไม้ และน้ำผักหรือน้ำผลไม้ รวมกันไม่เกิน 3 ส่วน ต่อวัน** (n)	30
ไม่รับประทานยา ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร สมุนไพร วิตามิน และเกลือแร่ (n)	30
ไม่สูบบุหรี่ (ในกรณีที่เคยสูบบุหรี่ จะต้องเลิกมาแล้วอย่างน้อย 6 เดือน) (n)	30
ไม่บริโภคเครื่องดื่มที่มีส่วนผสมของแอลกอฮอล์อย่างน้อย 1 สัปดาห์ก่อนเข้าร่วมงานวิจัย (n)	30
เข้านอนก่อนเวลาเที่ยงคืน (n)	30

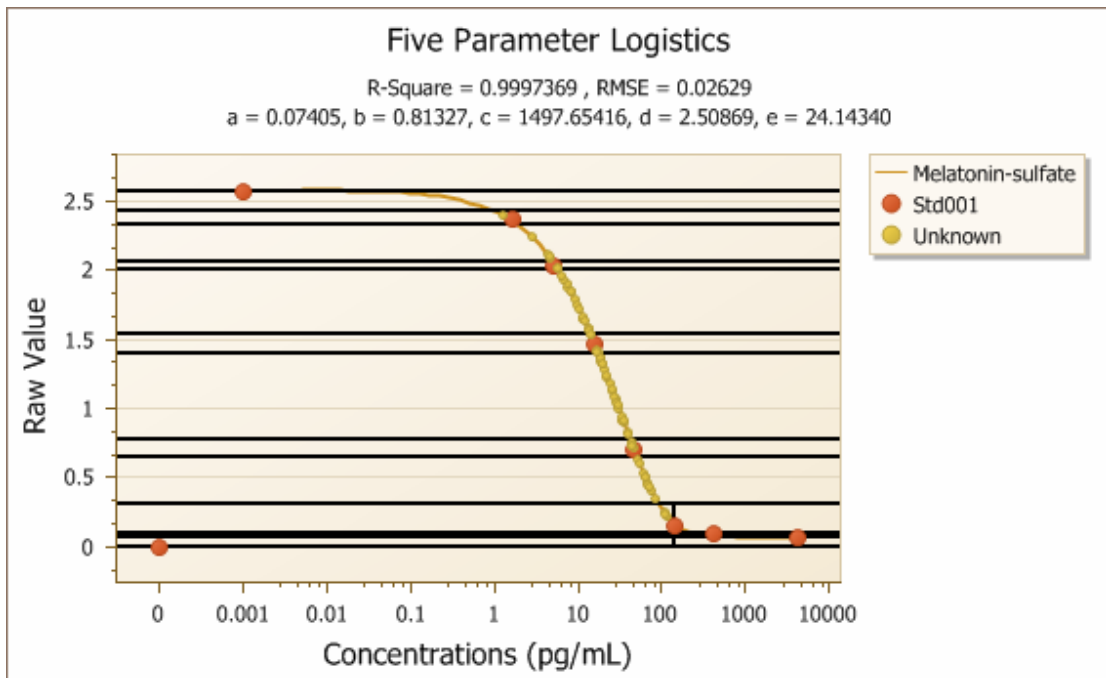
* โดยเฉพาะ ส้ม หนามเม่า กล้วย มะละกอ มะม่วง และสับปะรด

** ตามเกณฑ์คู่มือธงโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข

นอกจากนี้ยังมีการปรับเปลี่ยนรูปแบบผลไม้ที่ให้อาสาสมัครรับประทาน คือเปลี่ยนการรับประทานรูปแบบน้ำผลไม้เป็นรับประทานเนื้อผลไม้แทน ได้แก่ กล้วยและมะม่วง เนื่องจากเมื่อเตรียมกล้วยให้อยู่ในรูปแบบน้ำผลไม้แล้ว น้ำกล้วยจะเปลี่ยนสีเร็วมาก ซึ่งการเปลี่ยนสีนี้เป็นตัวบ่งบอกถึงการถูกออกซิไดซ์ ทำให้สูญเสียสารต้านอนุมูลอิสระไป ดังนั้นจึงให้อาสาสมัครรับประทานแบบเนื้อผลไม้แทน ส่วนสาเหตุที่ให้อาสาสมัครรับประทานมะม่วงในรูปแบบเนื้อผลไม้ นั้น เนื่องจากน้ำมะม่วงมีรสชาติที่ไม่ดี และเพื่อให้สะดวกต่อการรับประทานของอาสาสมัครจึงเปลี่ยนให้รับประทานเนื้อมะม่วงแทน และต้องปรับลดปริมาณมะม่วงที่รับประทานไม่ให้มากเกินไปสำหรับอาสาสมัคร จึงปรับเป็น ½ กิโลกรัมแทน

ระดับ 6-sulfatoxymelatonin หลังรับประทานผลไม้

ผลการวิเคราะห์พบ Linearity ของกราฟมาตรฐานอยู่ในเกณฑ์ที่ดีในช่วง 2-100 pg/mL โดยเกือบทุกตัวอย่างที่วัดได้ค่าอยู่ในช่วงดังกล่าว ค่า 20%, 50% and 80% %B/B0 และ สารควบคุม 1 (ความเข้มข้นต่ำ) สารควบคุม 2 (ความเข้มข้นสูง) ในแต่ละเพลสอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ตามคู่มือชุดทดสอบที่กำหนด (รูปที่ 11)



รูปที่ 11 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์เมลาโทนินด้วยชุดตรวจ ELISA kit และกราฟแนวนอนแสดง SD ของการวัด 2 ครั้ง

ผลไม้แต่ละชนิดมีผลต่อระดับ aMT6-s ในปัสสาวะที่แตกต่างกัน เปรียบเทียบระหว่างวันที่รับประทานผลไม้ กับวันก่อนรับประทานผลไม้ โดยพบว่า สับปะรดเพิ่มระดับ aMT6-s มากที่สุด (median 13,259 ng หรือเพิ่มขึ้น 127% จาก baseline, $p = 0.001$) รองลงมา คือ กล้วย (median 6,282 ng หรือเพิ่มขึ้น 103% จาก baseline, $p = 0.004$) และ ส้ม (median 2,127 ng หรือ เพิ่มขึ้น 20% จาก baseline, $p = 0.007$) ในขณะที่วันที่รับประทานมะละกอ หนามเม่า และมะม่วง พบการเปลี่ยนแปลงของระดับ aMT6 อยู่ในช่วง 3% to 27% แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 8, รูปที่ 13-18)

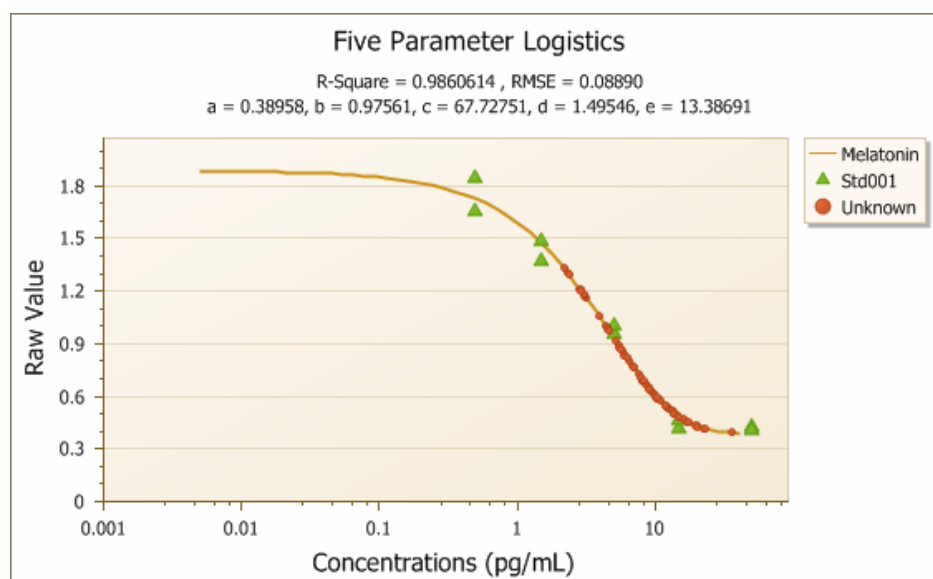
ตารางที่ 8 แสดงปริมาณ 6-sulfatoxymelatonin (ng) หลังจากปรับตามปริมาตรปัสสาวะ

Type of fruits	N	Median (ng)	Interquartile Range	Median difference (%)	p-value
Baseline C1	28	6,107	11,853	103% Increase	0.004
Banana	28	14,107	16,130		
Baseline C2	28	10,396	7,517	127% Increase	0.001
Pineapple	28	23,099	16,704		
Baseline C3	29	10,761	8,178	20% Increase	0.007
Orange	29	15,894	10,038		
Baseline C4	29	13,273	18,949	5% Increase	0.256
Papaya	29	18,806	37,863		
Baseline C5	27	13,273	10,719	3% decrease	0.96
Makmao	27	10,417	16,501		
Baseline C6	26	13,656	15,368	7% decrease	0.07
Mango	26	10,335	7,773		

* Wilcoxon Sign Rank test

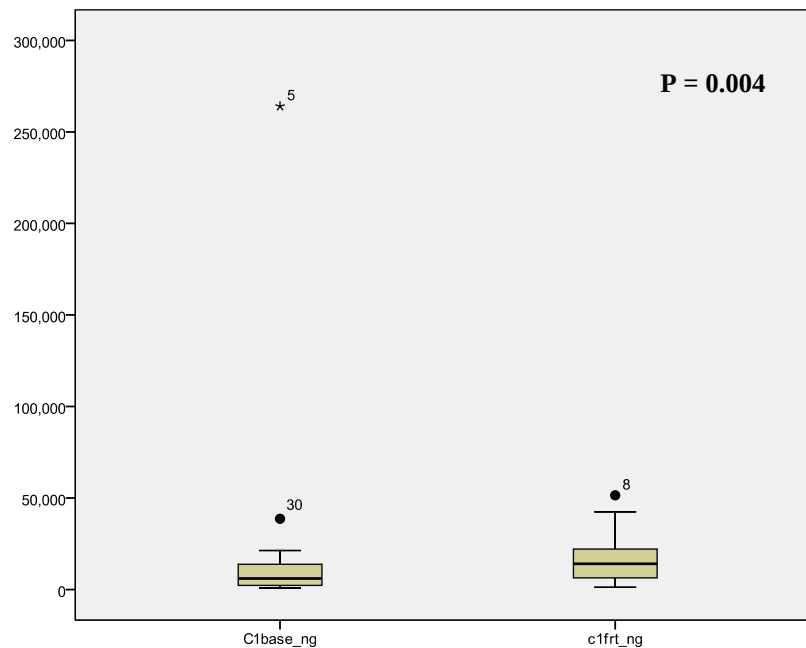
ระดับเมลานินในน้ำลายหลังรับประทานผลไม้

การวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำลายได้วิเคราะห์ที่เวลา 0, 20, 60, 90, 120 and 240 ในอาสาสมัครบางราย และสุ่มวิเคราะห์ที่บางเวลาในอาสาสมัครที่เหลือ เนื่องจากมีจำนวน Elisa kits จำกัด ผลการศึกษาพบเมลานินอยู่ในช่วง 0-36.3 pg/ml ซึ่งเป็นระดับปกติที่พบในร่างกาย และไม่พบความแตกต่างของเมลานินที่เวลาแตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม พบว่า กราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบนี้ ไม่ผ่านเกณฑ์ตามคู่มือชุดตรวจสอบที่กำหนด (รูปที่ 12) ดังนั้น ผลที่ได้จึงยังไม่สามารถสรุปผลได้อย่างแน่ชัด



รูปที่ 12 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์เมลานินด้วยชุดตรวจ IBL Direct-Saliva Elisa Kit.

ระดับ 6-sulfatoxymelatonin (ng)

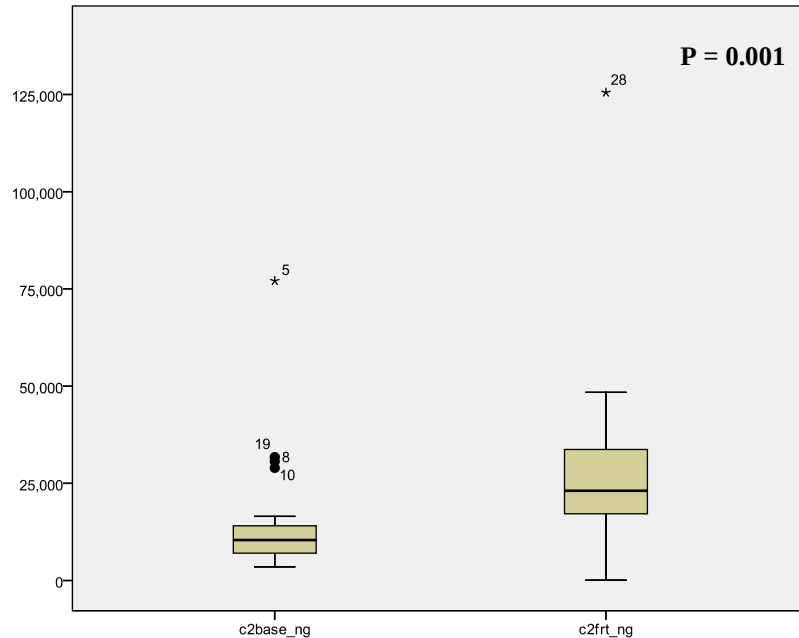


รูปที่ 13 ระดับ 6-sulfatoxymelatonin ก่อนและหลังรับประทานกล้วย

C1base_ng: ก่อนรับประทานกล้วย, C1frt_ng: หลังรับประทานกล้วย

• แสดง outlier, * แสดง extreme case, ตัวเลขแสดง ID ของอาสาสมัคร

ระดับ 6-sulfatoxymelatonin (ng)

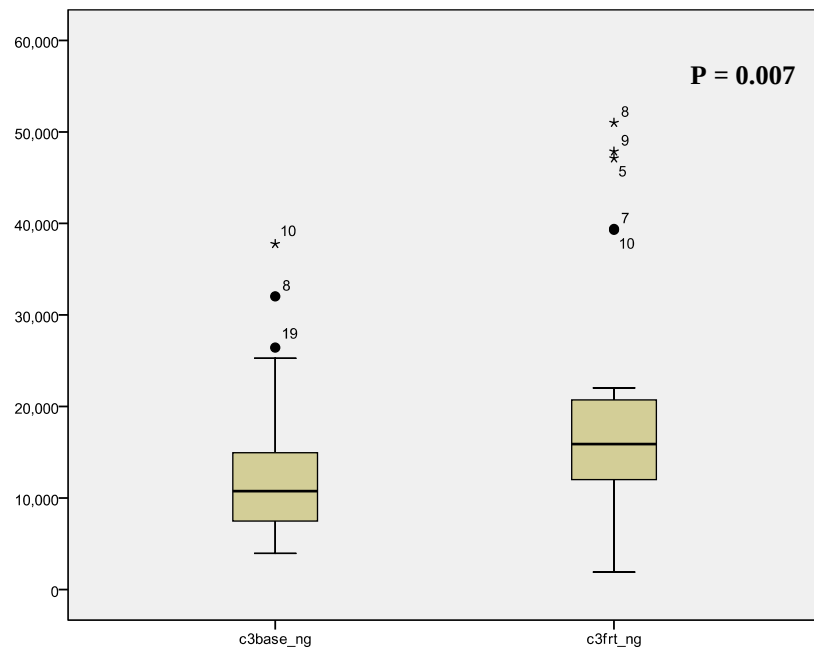


รูปที่ 14 ระดับ 6-sulfatoxymelatonin ก่อนและหลังรับประทานสับปะรด

C2base_ng: ก่อนรับประทานสับปะรด, C2frt_ng: หลังรับประทานสับปะรด

• แสดง outlier, * แสดง extreme case, ตัวเลขแสดง ID ของอาสาสมัคร

ระดับ 6-sulfatoxymelatonin (ng)

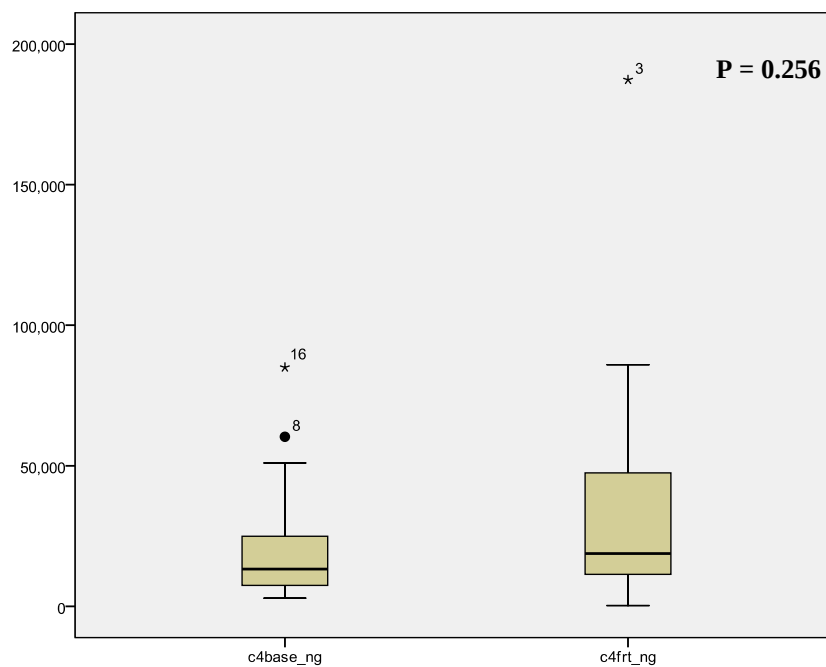


รูปที่ 15 ระดับ 6-sulfatoxymelatonin ก่อนและหลังรับประทานส้ม

C3base_ng: ก่อนรับประทานส้ม, C3frt_ng: หลังรับประทานส้ม

• แสดง outlier, * แสดง extreme case, ตัวเลขแสดง ID ของอาสาสมัคร

ระดับ 6-sulfatoxymelatonin (ng)

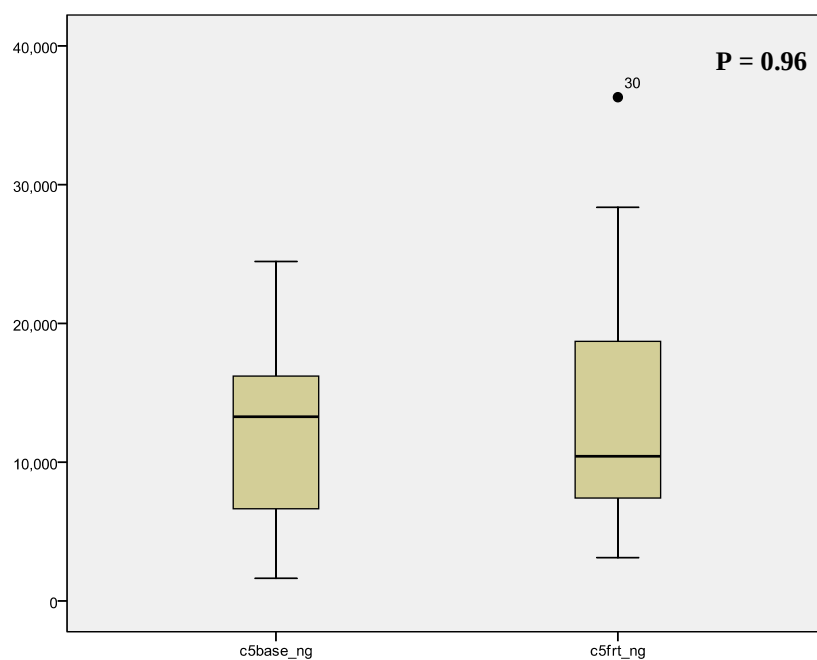


รูปที่ 16 ระดับ 6-sulfatoxymelatonin ก่อนและหลังรับประทานมะละกอ

C4base_ng: ก่อนรับประทานมะละกอ, C4frt_ng: หลังรับประทานมะละกอ

• แสดง outlier, * แสดง extreme case, ตัวเลขแสดง ID ของอาสาสมัคร

ระดับ 6-sulfatoxymelatonin (ng)

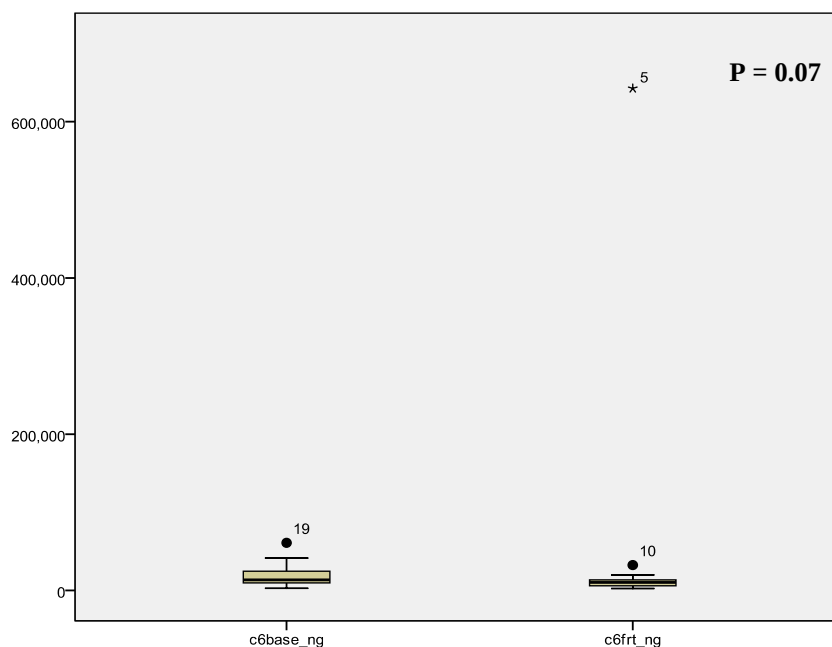


รูปที่ 17 ระดับ 6-sulfatoxymelatonin ก่อนและหลังรับประทานหมากเฒ่า

C5base_ng: ก่อนรับประทานหมากเฒ่า, C5frt_ng: หลังรับประทานหมากเฒ่า

- แสดง outlier, * แสดง extreme case, ตัวเลขแสดง ID ของอาสาสมัคร

ระดับ 6-sulfatoxymelatonin (ng)



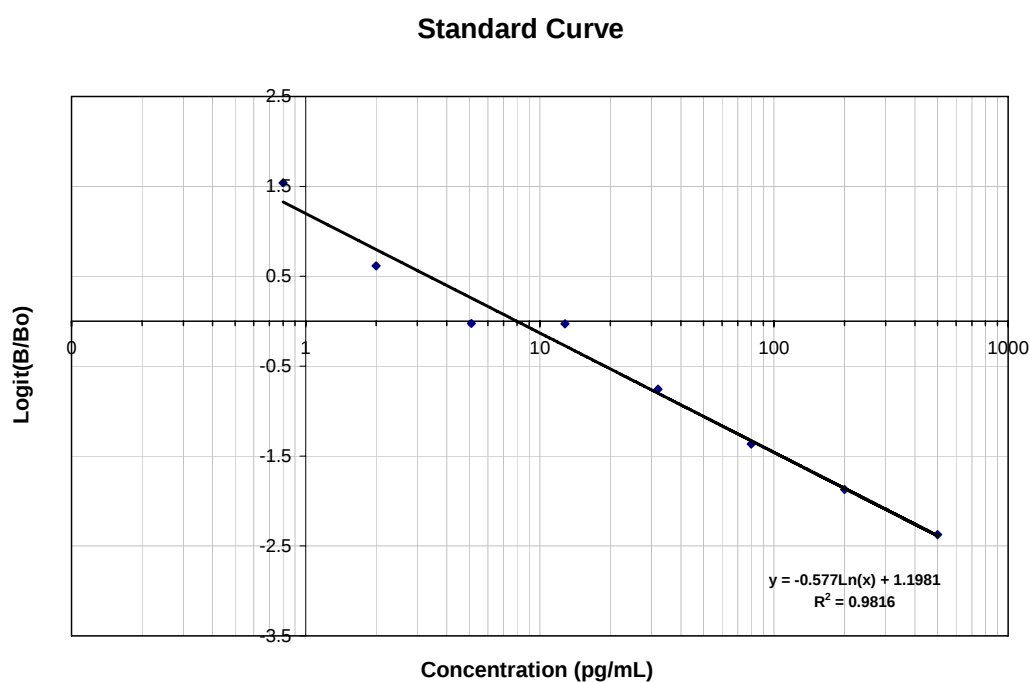
รูปที่ 18 ระดับ 6-sulfatoxymelatonin ก่อนและหลังรับประทานมะม่วง

C6base_ng: ก่อนรับประทานมะม่วง, C6frt_ng: หลังรับประทานมะม่วง

- แสดง outlier, * แสดง extreme case, ตัวเลขแสดง ID ของอาสาสมัคร

ระดับ 8-isoprostane หลังรับประทานผลไม้

ค่า %B/B0 20%, 50% and 80% อยู่ในช่วง 88.17, 7.89 และ 0.72 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานตามคู่มือที่กำหนดซึ่งเท่ากับ 101, 19.5 และ 2.1 ตามลำดับ โดย non-specific binding (NSB) = 0.0065 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้สำหรับชุดทดสอบ ตัวอย่างมีการวิเคราะห์อย่างละ 4 ตัวอย่าง ให้ค่าเฉลี่ย 21.36 pg/mL อยู่ในช่วง 17.2 -25.0 pg/mL, SD=3.42 pg/mL, RDS=16.0% และ a Standard Error=2.42 ดังนั้น ชุดทดสอบมีความแม่นยำ และถูกต้องตามมาตรฐานที่กำหนดโดยบริษัท (รูปที่ 19)



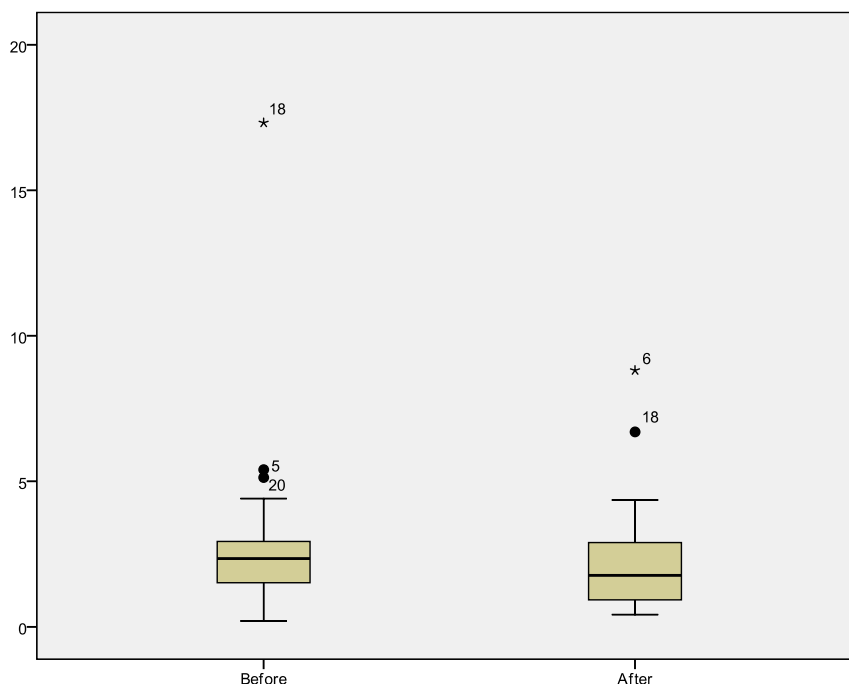
รูปที่ 19 กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ 8-isoprostane ด้วยชุดตรวจ ELISA kit

ระดับ 8-isoprostane มีแนวโน้มสูงขึ้นหลังจากศึกษา โดยเปลี่ยนแปลงจากค่ามัธยฐาน 2.34 ng ก่อนเริ่มการศึกษา เป็น 1.77 หลังการศึกษา หรือหลังจากรับประทานผลไม้ที่ศึกษาสัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 6 สัปดาห์ แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 9, รูปที่ 20)

ตารางที่ 9 ระดับ 8-isoprostane ก่อนและหลังการศึกษา

	N	Median (ng)	Interquartile Range	Median difference (ng)	P value
Before	21	2.34	1.86	-0.73	0.07
After	21	1.77	2.09		

ระดับ 8-isoprostane (ng)



รูปที่ 20 ระดับ 8-isoprostane ก่อนและหลังการศึกษา

Before: ก่อนการศึกษา, after: หลังการศึกษา

• แสดง outlier, * แสดง extreme case, ตัวเลขแสดง ID ของอาสาสมัคร

รายงานอาการไม่พึงประสงค์หลังรับประทานผลไม้

น้ำผลไม้ที่ได้จากการคั้นหรือปั่นแยกการในการศึกษานี้ มีปริมาตรประมาณ 200 – 400 ml อาสาสมัครส่วนใหญ่รับประทานได้โดยไม่มีอาการข้างเคียงใดๆ ในขณะที่ อาสาสมัครบางรายมีอาการไม่พึงประสงค์หลังจากรับประทานผลไม้บางชนิด ทั้งนี้ เป็นอาการไม่พึงประสงค์ที่ไม่รุนแรง นั่นคือ หายได้เองภายใน 24 ชั่วโมง โดยไม่ต้องใช้ยาหรือเข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาล ส่วนใหญ่พบในผลไม้ที่มีรสเปรี้ยว ได้แก่ ส้ม และ ฝรั่ง ดังแสดงไว้ในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงอาการไม่พึงประสงค์เกิดขึ้นหลังจากรับประทานผลไม้

Adverse Events	Banana	Pineapple	Orange	Papaya	Makmao	Mango
Dyspepsia (n)	1	0	8	0	0	2
Nausea (n)	0	0	1	0	3	1
Vomiting (n)	0	0	0	0	2	0
Diarrhea (n)	0	0	0	0	2	0
Total (n)	1	0	9	0	7	3

บทที่ 4 สรุปและวิจารณ์

การศึกษารั้วนี้เป็นการศึกษาแรก ที่ศึกษาปริมาณเมลาโทนินและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในมนุษย์ หลังจากรับประทานผลไม้ไทยทั้ง 6 ชนิด โดยพบว่าหมากเมาเป็นผลไม้ที่มีเมลาโทนินสูงที่สุด รองลงมา คือ มะม่วง มะละกอ ส้ม สับปะรด และกล้วย ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์ปริมาณเมลาโทนินพบว่า ส้มมีปริมาณเมลาโทนินสูงสุด (472 ± 80 ng/g) รองลงมาคือ กล้วย (419 ± 71 ng/g) มะม่วง (251 ± 43 ng/g) สับปะรด (158 ± 27 ng/g) หมากเมาเป็น (79 ± 13 ng/g) และมะละกอ (35 ± 6 ng/g) ตามลำดับ ผลการศึกษาในอาสาสมัครสุขภาพดี พบว่า การรับประทานผลไม้ที่มีเมลาโทนินสูงเพิ่มระดับเมลาโทนินในร่างกายได้ โดยผลไม้บางชนิดเพิ่มระดับ aMT6-s ในปัสสาวะ (เมตาโบไลต์หลักของเมลาโทนิน) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเพิ่มมากที่สุดที่ สับปะรด (127%, $p = 0.004$) รองลงมา คือ กล้วย (103%, $p = 0.001$) และ ส้ม (20%, $p = 0.007$) ส่วนการรับประทานมะละกอ หมากเมาเป็น และมะม่วงในปริมาณที่ศึกษา ยังไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับ aMT6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ ยังพบว่าระดับ 8-isoprostane ในปัสสาวะ (ตัวชี้วัดภาวะเครียดออกซิเดชัน) ลดต่ำลงหลังจากรับประทานผลไม้ แต่ยังไม่พบนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.07$) ส่วนหนึ่งอาจเนื่องมาจากยังมีกลุ่มตัวอย่างที่น้อย จึงควรศึกษาในกลุ่มตัวอย่างที่ใหญ่ขึ้นต่อไป

การศึกษานี้ได้พัฒนาวิธีการวัดเมลาโทนินด้วย HPLC ซึ่งเป็นวิธีการใหม่ และเป็นประโยชน์สำหรับการวิเคราะห์หาเมลาโทนินในพืชสมุนไพรอื่น ๆ ต่อไป แต่เนื่องจากเมลาโทนินในผลไม้มีระดับต่ำกว่า detection limit ทำให้ไม่ทราบผลที่แท้จริงจากการศึกษา จึงได้วิเคราะห์ด้วย ELISA เพิ่มเติม ซึ่งข้อมูลที่ได้พบว่าผลไม้ไทยที่ศึกษาทุกชนิดมีระดับเมลาโทนินสูงการผลไม้ที่เคยมีรายงานมาก่อน ซึ่งแม้จะเป็นไปตามที่คาดการณ์ไว้เนื่องจากประเทศไทยมีแสงแดดตลอดปี พืชจึงน่าจะสร้างเมลาโทนินเพื่อป้องกันอนุมูลอิสระจากรังสี UV มากกว่าพืชในเขตหนาว แต่สิ่งที่น่าสนใจ คือ กล้วยในประเทศไทยมีเมลาโทนินสูงกว่าที่เคยมีรายงานมากกว่า 600 เท่า และสูงกว่าหมากเมาเป็นและพืชตระกูลเบอร์รี่ของต่างประเทศด้วย ซึ่งข้อมูลระดับเมลาโทนินในผลไม้สอดคล้องกับระดับเมตาโบไลต์เมลาโทนินที่พบในคน คือ กล้วย และ ส้ม เพิ่มระดับ 6-sulfatoxymelatonin ได้อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนที่ยังไม่พบนัยสำคัญในผลไม้ชนิดอื่น ที่แม้พบเมลาโทนินในผลไม้มาก ส่วนหนึ่งอาจเนื่องมาจากกลุ่มตัวอย่างอาสาสมัครยังน้อย นอกจากนี้ อาจเนื่องจากผลไม้ดังกล่าวมีการดูดซึมเมลาโทนินในร่างกายได้น้อยกว่า กล้วย สับปะรด และส้ม ทำให้พบผลการเพิ่มระดับ 6-sulfatoxymelatonin อย่างมีนัยสำคัญในผลไม้เพียง 3 ชนิดดังกล่าว ทั้งนี้ การศึกษาต่อไปในกลุ่มตัวอย่างที่ใหญ่ขึ้น จึงจะตอบคำถามนี้ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งโดยเทคนิค DPPH assay และ FRAP assay พบว่าผลไม้ที่ทำการสกัดและทดสอบในการศึกษารั้วนี้มีฤทธิ์แตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยการศึกษาทั้งสองวิธีให้ผลเหมือนกันที่แสดงผลยับยั้งฤทธิ์ดังกล่าว ที่เป็นกลไกการถ่ายทอดอิเล็กตรอนของสารสำคัญในสารสกัดที่ได้ที่เหมือนกัน ทั้งนี้การที่ผลไม้แต่ละชนิดแสดงฤทธิ์ที่แตกต่างกัน อาจเนื่องด้วยการมีสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ไม่เหมือนกัน หรือมีปริมาณที่ไม่เท่ากัน เป็นที่น่าสังเกตว่าหมากเมาให้ค่า TE ที่ไม่แตกต่างกันในช่วงความเข้มข้นที่ทำการทดสอบ ($130.33 - 137.38 \mu\text{M TE}$) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของหมากเามีค่าอิมิตคือ แสดงฤทธิ์สูงสุดตั้งแต่ความเข้มข้นต่ำคือ 1 mg/ml ในขณะที่สารสกัดผลไม้ชนิดอื่นแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในรูป TE ที่สัมพันธ์กับความเข้มข้นที่ปรากฏในสารละลายทดสอบ

การศึกษานี้ใช้การวิเคราะห์ระดับ aMT6s ในปัสสาวะ ซึ่งเป็นตัวแทนที่ดีของระดับเมลาโทนินในกระแสเลือด เนื่องจากที่ผ่านมาพบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระหว่างระดับเมลาโทนินใน

กระแสเลือด กับระดับ aMT6s จากปัสสาวะที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และเนื่องจากเมลาโทนินหลั่งมากในตอนกลางคืน (ประมาณ 100 pg/ml) ในตอนกลางวันจะมีปริมาณน้อย (ประมาณ 10 pg/ml) การเก็บตัวอย่างปัสสาวะกลางคืน 12 ชั่วโมง จึงเป็นตัวแทนของระดับเมลาโทนินที่แท้จริง การเก็บตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมงจะได้ค่าที่เบี่ยงเบนได้ โดยเฉพาะในคนบางกลุ่มที่มีระดับ circadian เปลี่ยนแปลง (เช่น ปรับเวลานอน) อาจเห็นระดับเมลาโทนินต่ำกลางคืน แต่ไปเพิ่มขึ้นในเวลากลางวันได้ เป็นต้น

การศึกษานี้จึงใช้การเก็บตัวอย่างปัสสาวะที่สมบูรณ์และวัดปริมาณปัสสาวะทั้งหมด เพื่อนำมาคำนวณปริมาณเมตาโบไลต์เมลาโทนินสะสมทั้งคืนในปัสสาวะ เนื่องจากเป็นวิธีที่ได้ค่าที่ถูกต้องมากที่สุด เหตุที่บางการศึกษารายงานค่าระดับยาหรือสารต่างๆในปัสสาวะเป็น ng/mg creatinine นั้น เนื่องจากในการศึกษาที่เก็บตัวอย่างปัสสาวะครั้งเดียว (spot sample) และไม่ทราบความเข้มข้นหรือปริมาณของปัสสาวะนั้น การคำนวณปริมาณยาในปัสสาวะจำเป็นต้องคิดเทียบกับความเข้มข้นหรือปริมาณปัสสาวะโดยใช้ค่าครีเอตินิน หรือ specific gravity เป็นตัวแทน โดยข้อมูลที่ผ่านมาระบุว่าในอาสาสมัครปกตินั้นความสัมพันธ์ระหว่าง urine creatinine และ ปริมาณปัสสาวะนั้นอยู่ระหว่าง 0.77 – 0.91 (Rubin, 1971) ดังนั้น การคำนวณปริมาณปัสสาวะโดยคิดจาก urine creatinine จึงเป็นการประมาณค่าอย่างหยาบ และใช้ในกรณีที่ไม่สามารถเก็บปริมาณปัสสาวะทั้งหมดได้ อย่างไรก็ตาม Grade et al. (2004) พบว่าการคำนวณโดยเทียบกับ urine creatinine ได้ค่าที่เบี่ยงเบน (19-35%) มากกว่าการคำนวณจากปริมาณปัสสาวะทั้งหมด (< 10%) ซึ่งการศึกษาดังกล่าวได้คำนวณโดยคาดการณ์ว่าปริมาณปัสสาวะที่แจ้งอาจผิดพลาดได้ร้อยละ 4 แล้ว

การศึกษานี้เลือก 8-isoprostane เป็นตัวแทนของการเกิด lipid peroxidation ส่วนหนึ่งเนื่องจากต้องการหาวิธีการที่ non-invasive สำหรับอาสาสมัคร ซึ่งการศึกษานี้เป็นการศึกษานำร่อง การเจาะเลือดอาสาสมัครหลายครั้งนอกจากไม่สะดวกกับอาสาสมัครแล้ว ยังอาจมีคำถามความเหมาะสมในด้านจริยธรรม นอกจากนี้ isoprostane เป็นผลิตภัณฑ์ (byproduct) ที่เกิดจากกระบวนการ lipid peroxidation หากเป็นการวัดจากตัวอย่างซีรัมหรือพลาสมาซึ่งมีไขมันรวมอยู่ แม้จะเป็นการเก็บตัวอย่างในตู้แช่แข็งถึง -80 องศาเซลเซียส กระบวนการ lipid peroxidation ยังคงเกิดขึ้นได้อย่างช้าๆ ดังนั้นหากไม่ได้เป็นการตรวจวัดระดับ isoprostane ทันทีทันใดหลังการเจาะเลือดและปั่นแยกซีรัมหรือพลาสมา ระดับ isoprostane ในตัวอย่างยังคงเพิ่มขึ้นได้ ทำให้ค่าที่วัดได้สูงเกินความเป็นจริง ในขณะที่ตัวอย่างปัสสาวะไม่มีไขมันปน การเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ในตัวอย่างปัสสาวะจึงไม่เกิดขึ้น ค่าที่วัดได้จึงมีความแม่นยำมากกว่า (Morrow et al., 1990) อีกทั้งค่าที่ได้จากการวัดระดับ isoprostane ในซีรัมหรือพลาสมาสามารถให้ข้อมูลได้เฉพาะจุดเวลาใดเวลาหนึ่ง (single point of time) เท่านั้น ในขณะที่การวัดในปัสสาวะเป็นการแสดงระดับที่เกิดขึ้นในช่วงเวลา (integrated index of isoprostane production over time) ทั้งนี้สภาพความเป็นไปของการเกิด oxidative stress ในร่างกายอาจมีการเปลี่ยนแปลงกวัดแกว่ง (fluctuation) ได้ภายในช่วงเวลาหนึ่งๆ การวัดระดับที่เปลี่ยนแปลงในร่างกายภายใต้ช่วงเวลาโดยการวัดจากตัวอย่างปัสสาวะ จึงให้ค่าความแม่นยำในการบ่งบอกภาวะ oxidative stress ได้มากกว่า (Roberts et al., 1996) อย่างไรก็ตามก็มีข้อจำกัดที่กระบวนการดังกล่าวใช้เวลา จึงวัดผลวันต่อวันไม่ได้ จึงต้องวัดในภาพรวมของการรับประทานผลไม้ทั้งหมดแทน ทั้งนี้ข้อมูลที่ได้นี้เบื้องต้นพิสูจน์ให้เห็นว่าการรับประทานผลไม้ไม่มีแนวโน้มเพิ่มระดับเมลาโทนินได้ ซึ่งการศึกษาต่อไปสามารถยืนยันผลได้โดยการวัดผลในเลือดด้วย marker ตัวอื่นหรือวัดระดับ 8-isoprostane ในปัสสาวะหลังจากการรับประทานผลไม้ชนิดใดชนิดหนึ่งเป็นระยะเวลาหนึ่ง เช่น 2 สัปดาห์ เป็นต้น

ผลการศึกษาดังกล่าวเป็นไปตามข้อสันนิฐานเบื้องต้น และนำมาสู่การออกแบบการศึกษาในครั้งนี้ ให้มีการศึกษาในหลอดทดลองและการศึกษาในอาสาสมัคร ซึ่งผลการศึกษาได้ชี้ให้เห็นแล้วว่า ข้อมูลปริมาณเมลาโท닌ในพืชที่รายงานในหลอดทดลอง รวมถึงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันหรือต้านอนุมูลอิสระที่พบในหลอดทดลองนั้น อาจไม่ได้เป็นตัวแทนของปริมาณเมลาโท닌 หรือความสามารถในการต้านออกซิเดชันหรือต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจริงในร่างกายหลังจากรับประทานผลไม้ต่างๆ ดังนั้น การศึกษาสารสำคัญและสารต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง จึงควรมีการศึกษาในมนุษย์ควบคู่ไปด้วย เพื่อยืนยันผลที่แน่ชัดยิ่งขึ้น

การศึกษานี้ข้อจำกัดดังต่อไปนี้ 1) จำนวนตัวอย่างน้อย แม้ว่าการศึกษาได้วางแผนเผื่อในเรื่องจำนวนตัวอย่างแล้ว แต่เนื่องจากการศึกษาใช้ระยะเวลานาน และการเก็บปัสสาวะสะสมทั้งหมด อาจจะยังไม่สะดวกสำหรับอาสาสมัครบางราย ทำให้ไม่สามารถเก็บข้อมูลอาสาสมัครได้ครบตามจำนวนที่กำหนดในแต่ละสัปดาห์ จึงไม่สามารถใช้เป็นตัวแทนที่ดีในการนำมาอ้างอิงเป็นปัสสาวะสะสมทั้งคืน ปัสสาวะของอาสาสมัครบางรายจึงไม่สามารถนำมาวิเคราะห์ได้ ดังนั้นจำนวนอาสาสมัครทั้งหมดในแต่ละสัปดาห์ที่นำมาวิเคราะห์จึงไม่ครบตามขนาดตัวอย่างที่กำหนดไว้ ทำให้มีผลต่ออำนาจการทดสอบทางสถิติ

2) ปริมาณและลักษณะการรับประทานผลไม้ที่ให้แต่ละชนิดไม่เหมือนกัน คือ กล้วยให้อาสาสมัครรับประทาน 2 ผล ส่วนมะม่วงให้รับประทานครึ่งกิโลกรัม เนื่องจากผลไม้ทั้งสองชนิดนี้อาสาสมัครรับประทานในรูปแบบเนื้อผลไม้ ทำให้อาสาสมัครไม่สามารถรับประทานน้ำคั้นหรือปั่นจากเนื้อผลไม้หนึ่งกิโลกรัมเหมือนผลไม้ชนิดอื่นๆได้ การพิจารณาผลการศึกษาจึงต้องคำนึงถึงปริมาณที่แตกต่างกันด้วย ทั้งนี้ ลักษณะการให้รับประทานที่แตกต่างกัน ระหว่างน้ำผลไม้และเนื้อผลไม้ อาจมีผลต่อการดูดซึมเมลาโท닌และสารสำคัญอื่นๆ เข้าสู่ร่างกายที่แตกต่างกันได้ ทั้งนี้ ในการออกแบบการศึกษาผู้วิจัยต้องการให้ข้อมูลที่ได้อาจสอดคล้องกับการรับประทานผลไม้จริงในชีวิตประจำวัน เพื่อให้ นำผลไปเผยแพร่และอธิบายได้ จึงพิจารณาว่าในผลไม้ที่ไม่สามารถคั้นน้ำได้ เนื่องจากทำได้ยาก สีส้มไม่สวย ไม่น่ารับประทาน หรืออาสาสมัครไม่ชอบดื่มแบบเป็นน้ำปั่นแล้ว ถึงแม้ได้ผลการศึกษาดี ก็จะไม่สามารถนำไปสู่การใช้ที่แท้จริงได้ ดังนั้น การนำไปใช้ให้พิจารณาวิธีการรับประทานผลไม้แต่ละชนิดด้วย นอกเหนือจากการเปรียบเทียบชนิดของผลไม้เพียงอย่างเดียว

3) ปัจจัยที่อาจส่งผลกระทบต่อระดับเมลาโท닌ในร่างกาย เนื่องจากระดับ aMT6s ที่รายงานในการศึกษานี้ เป็นผลรวมของ aMT6s ที่ร่างกายสังเคราะห์จากต่อมไพเนียลในเวลากลางคืน (endogenous melatonin) กับ aMT6s ที่ร่างกายได้รับจากภายนอก (exogenous melatonin) ซึ่งในที่นี้คือผลไม้ที่ศึกษา สำหรับการศึกษานี้ปัจจัยที่อาจส่งผลกระทบต่อระดับเมลาโท닌ภายในร่างกาย (endogenous melatonin) ได้แก่ ความแตกต่างของเวลาเข้านอนของอาสาสมัครในวันก่อนและหลังรับประทานผลไม้แต่ละชนิด และความเครียดของอาสาสมัครในระหว่างทำการศึกษา โดยเวลาเข้านอนและความเครียดมีผลต่อการหลั่งเมลาโท닌 เนื่องจากการนอนดึก ร่างกายสัมผัสกับแสงไฟ จะทำให้ร่างกายหลั่งเมลาโท닌ได้น้อยลง และมีผลทำให้ aMT6s ต่ำลงไปด้วย ซึ่งการศึกษาต่อไปอาจศึกษาเพิ่มเติมถึงผลกระทบของภาวะดังกล่าวต่อระดับเมลาโท닌ในร่างกาย

นอกจากนี้ อาจมีผลกระทบจากปัจจัยภายนอก (exogenous melatonin) เนื่องจากประเภทอาหารที่อาสาสมัครรับประทานในวันก่อนทดลองและวันทดลองนั้นอาจแตกต่างกันได้ การศึกษานี้ได้ควบคุมอาหารที่รับประทานในวันทดลอง แต่ไม่ได้ควบคุมอาหารในวันก่อนทดลอง ทั้งนี้ ได้แก้ปัญหาโดยมีการบันทึกสัดส่วนการรับประทานอาหาร ในแต่ละวันนั้นให้มีปริมาณใกล้เคียงกัน และไม่เกิน 3 ส่วนตามเกณฑ์คู่มือธงโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข อีกทั้ง การตรวจสอบบันทึกดังกล่าวก็ไม่พบ

ความแตกต่างที่ชัดเจน อย่างไรก็ตาม ประเภทของอาหารที่ต่างกัน ก็ยังอาจมีผลต่อระดับ aMT6s ที่ต่างกันได้

ข้อเสนอแนะที่ได้จากการศึกษา

การศึกษานี้ย้ำให้เห็นความสำคัญของการศึกษาผลในมนุษย์ ควบคู่ไปกับการทดลองในห้องปฏิบัติการ ปริมาณเมลาโทนิનรวมถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่พบมากในหลอดทดลอง ไม่ใช่ตัวแทนของสิ่งที่พบในร่างกาย การรับประทานกล้วยหอม 2 ผล หรือน้ำสัปรดที่ได้จากการคั้นน้ำสัปรด 1 กิโลกรัมด้วยเครื่องแยกกาก (ประมาณ 1 แก้ว) หรือน้ำส้มที่ได้จากการคั้นน้ำส้ม 1 กิโลกรัม (ประมาณ 1 แก้ว) สามารถเสริมปริมาณเมลาโทนินในร่างกายให้สูงขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้ไม่ได้ศึกษาผลการรับประทานผลไม้ร่วมกับพืชชนิดอื่นที่มีรายงานเมลาโทนินในปริมาณสูง และสูงกว่าผลไม้ เช่น ธัญพืชและผัก ดังนั้น หากรับประทานผลไม้ร่วมกับพืชดังกล่าว อาจรับประทานผลไม้ในปริมาณที่ลดลงได้ อีกทั้ง การศึกษานี้ศึกษาในอาสาสมัครสุขภาพดี จึงไม่ได้วิเคราะห์ผลด้านอื่น เช่น ระดับน้ำตาล หรือ โปแตสเซียม เป็นต้น ดังนั้น คนที่มีโรคประจำตัว เช่น เบาหวานหรือโรคไต ควรปรึกษาแพทย์ก่อน

ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาต่อไป

การศึกษานี้เป็นการศึกษานำร่องให้กับการศึกษาเมลาโทนินหรือการศึกษาอื่นๆ ในลักษณะการประยุกต์ใช้ข้อมูลที่คล้ายกันนี้ ซึ่งการศึกษาต่อไปยังควรใช้รูปแบบที่ครอบคลุมทั้งการศึกษาในหลอดทดลองและการศึกษาในอาสาสมัคร เพื่อให้ได้ข้อมูลที่เป็นตัวแทนของสิ่งที่พบได้จริงในมนุษย์ อย่างไรก็ตาม ควรปรับรายละเอียดการออกแบบการวิจัย โดยควรควบคุมทั้งประเภทและปริมาณอาหารที่อาสาสมัครรับประทานทั้งในวันก่อนทดลองและวันที่ทดลองให้เหมือนกัน ทั้งนี้ ยังต้องมีการบันทึกเวลานอนและอาหารที่รับประทานในระหว่างการศึกษา อย่างไรก็ตาม หากปรับระยะเวลาการศึกษาให้สั้นลง จะทำให้ควบคุมปัจจัยในเรื่องการนอนหลับ หรือภาวะความเครียด ที่อาจแตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลาได้ดียิ่งขึ้น

นอกจากนี้ แม้ว่า aMT6s จะเป็นตัวแทนที่ดี และวัดได้ง่ายในปัสสาวะ แต่ก็ยังไม่ใช้ระดับเมลาโทนินจริงที่เพิ่มขึ้นในเลือดหลังรับประทานผลไม้ ดังนั้นหากวัดระดับเมลาโทนินในกระแสเลือดได้ จะเป็นข้อมูลแท้จริงที่แสดงผลของพืชที่ศึกษาต่อระดับเมลาโทนินในร่างกาย และหากศึกษา profile ตลอดคืนจะช่วยหาทราบระดับเมลาโทนินสูงสุด (peak) ได้ ทำให้สามารถเปรียบเทียบกับระดับเมลาโทนินที่พบทั่วไปในคนปกติ ในคนที่ป่วยโรคต่างๆ หรือระดับที่มีการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่างๆ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการคำนวณปริมาณพืช สมุนไพร หรือผลไม้ ที่ควรให้เพื่อเสริมอาหาร หรือเพื่อฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่นๆ ต่อไป

การวัดปริมาณเมลาโทนินในพืชที่มีแนวโน้มพบเมลาโทนินปริมาณไม่มาก เช่น ผลไม้ ควรวิเคราะห์โดยวิธี ELISA kits ส่วน วิธี HPLC ยังสามารถใช้ได้กับการทดสอบตัวอย่างที่มีปริมาณเมลาโทนินสูง เช่น พืชสมุนไพร หรือ ธัญพืช เป็นต้น นอกจากนี้ หากต้องการศึกษาผลการศึกษาเสริมเมลาโทนินเพื่อฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ควรศึกษาในพืชสมุนไพรหรือธัญพืชจะเหมาะสมกว่า

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และกลุ่มวิจัยเมลาโทนิน ผู้วิจัยขอขอบคุณนางทับทิม โอริอัค นางสาวปรียาภรณ์ พลายมี นางสาวปัญจะพาณ โกลากุล นางสาวประภัสสร เชื้อขาวจร และนางสาวณัฐกฤตา รุ่งนามประสิทธิ์ ที่ช่วยประสานงานในการวิจัยทางคลินิก และอาสาสมัครทุกคนที่ให้ความร่วมมือในการศึกษาอย่างดียิ่ง

เอกสารอ้างอิง

- นุจรี ประทีปวิช การใช้เมลาโทนินในผู้ป่วยมะเร็ง วารสารคลินิก 2549; 22: 181-187.
- ปิยรัตน์ โกวิททรงพงศ์ (2545) ต่อมไพเนียลและเมลาโทนิน. กรุงเทพฯ : กรุงเทพฯ, 214-215.
- Altun A, Ugur-Altun B. Melatonin: therapeutic and clinical utilization. Int J Clin Pract 2007; 61: 835-845.
- Arendt J. Neuroendocrinology, hypothalamus, and pituitary. Ashleny grossman (eds.) The pineal gland and pineal tumours. Chapter 15, 2002
- Baghurst R, Coghill R. A study of melatonin in plant tissues and its dietary and health implications. In bioelectromagnetics. Ayrapetyan SN, Markov MS (eds.) Springer, Netherlands 2006, 405-412.
- Barr DB, Wilder LC, Caudill SP, Gonzalez AJ, Needham LL, Pirkle JL. Urinary creatinine concentrations in the U.S. population: implications for urinary biologic monitoring measurements. Environ Health Perspect 2005; 113: 192-200.
- Bioxoytech urinary 8-epi-prostaglandin F_{2α} enzyme immunoassay for urinary isoprostane, Catalog Number 21048, 2009, OxisResearch, Portland, OR, USA.
- Bitelog. (2007). Narrow food (calculate tryptophan) retrieved from <http://www.bitelog.com/narrow-food-search.htm> [2009 May 25]
- Bojkowski CJ, Arendt J. Factors influencing urinary 6-sulphatoxymelatonin, a major melatonin metabolite, in normal human subjects. J Clin Endocrinol 1990; 33: 435-444.
- Brzezinski A. Melatonin in humans. N Engl J Med 1997; 336: 186-195.
- Burkhardt S, Tan DX, Manchester LC, Hardeland R, Reiter R. Detection and quantification of the antioxidant melatonin in montmorency and balaton tart cherries (*Prunus cerasus*). J Agric Food Chem 2001; 49: 4898-4902.
- Chen G, Huo Y, Tan DX, Liang Z, Zhang W, Zhang Y. Melatonin in Chinese medicinal herbs. Life Sci 2003; 73: 19-26.
- Claustrat B, Brun J, Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. Sleep Med Rev 2005 Feb; 9: 11-24.
- Davies SS, Zackert W, Luo Y, Cunningham CC, Frisard M, Roberts LJ. Quantification of dinor, dihydro metabolites of F2-isoprostanes in urine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Anal Biochem 2006; 348: 185-191.
- De la Puerta C, Carrascosa—Salmoral MP, Garcia-Luna PP, Lardone PJ, Herrera JL, Fernandez-Montesinos R, et al. Melatonin is a phytochemical in olive oil. Food Chem 2007; 104: 609-612.

- DeMuro RL, Nafziger AN, Blask DE, Menhinick AM, Bertino JS. The absolute bioavailability of oral melatonin. *J Clin Pharmacol* 2000; 40: 781-784.
- Di WL, Kadva A, Johnston A, Silman R. Variable bioavailability of oral melatonin. *N Engl J Med* 1997; 336: 1028-1029.
- Garde A H, Hansen A M, Kristiansen J, Knudsen L E. Comparison of Uncertainties Related to Standardization of Urine Samples with Volume and Creatinine Concentration. *Ann. Occup. Hyg.* 2004;48:171–179.
- Gooneratne NS, Metlay JP, Guo W, Pack FM, Kapoor S, Pack AI. The validity and feasibility of saliva melatonin assessment in the elderly. *J Pineal Res* 2003; 34: 88-94.
- Hardeland R, Pandi-Perumal SR. Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug. *Nutr Metab* 2005, 2: 22.
- Helmersson J, Basu S. F₂-isoprostane excretion rate and diurnal variation in human urine. *Prostaglandins leukot essent fatty acids* 1999; 61: 203-205.
- Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assay. *J Agric Food Chem.* 2005; 53: 1841-1856.
- Iriti M, Faoro F. Grape phytochemicals: a bouquet of old and new nutraceuticals for human health. *Medical Hypotheses* 2006; 67: 833-838.
- Kadiiska MB, Gladen BC, Baird DD, et al., Biomarkers of oxidative stress study II: are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl₄ poisoning? *Free Radic Biol Med* 2005; 38: 698-710.
- Kolar J, Machackova I. Mini review; Melatonin in higher plants: occurrence and possible functions. *J Pineal Res* 2005; 39: 333–341.
- Liang Y, Wei P, Duke RW, Reaven PD, Harman SM, Cutler RG, et al., Quantification of 8-iso-prostaglandin-F (2alpha) and 2,3-dinor-8-iso-prostaglandin-F (2alpha) in human urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Free Radic Biol Med* 2003; 34: 409-418.
- Ma X, Idle JR, Krausz KW, Gonzalez FJ. Metabolism of melatonin by human cytochromes P450, 2004.
- Manchester LC, Tan D, Reiter R, Park W, Monis K, Qi W. High levels of melatonin in the seeds of edible plants possible function in germ tissue protection. *Life Sci* 2000; 67: 3023-3029.
- Moore K, Roberts LJ II. Measurement of lipid peroxidation. *Free Radic Res* 1998; 28: 659-671.
- Morrow JD, Roberts LJ. Mass spectrometry of prostanoids: F₂-isoprostanes produced by non-cyclooxygenase free radical-catalyzed mechanism. *Meth Enzymol* 1994: 233: 163.
- Morrow JD, Roberts LJ. Mass spectrometric quantification of F₂-isoprostanes in biological fluids and tissues as measure of oxidant stress. *Meth Enzymol* 1999; 300: 3-12.
- Nagata C, Nagao Y, Shibuya C, Kashiki Y, Shimizu H. Association of vegetable intake with urinary 6-sulfatoxymelatonin level. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 1333-1335.
- Oba S, Nakamura K, Sahashi Y, Hattori A, Nagata C. Consumption of vegetables alters morning urinary 6-sulfatoxymelatonin concentration. *J Pineal Res* 2008; 45: 17-23.

- Plaimee P, Mititraporn R, Nangjumnong W, Johns J, Pratheepawanit N. Association between nurses working nightshift and melatonin levels, sleep quality and alertness. Proceedings of the asia-africa network symposium of JSPS: infection-immunity and cancer. Thailand 2008.
- Posmyk MM, Janas KM. Melatonin in plants. *Acta Physiol Plant* 2009; 31: 1-11.
- Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 4290-4302.
- Proudfoot J, Barden A, Mori TA, Burke V, Croft KD, Beilin LJ, Puddey IB. Measurement of urinary F(2)-isoprostanes as markers of in vivo lipid peroxidation—a comparison of enzyme immunoassay with gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Biochem*. 1999; 272: 209–215.
- Reiter RJ, Manchester LC, Tan DX. Melatonin in walnuts: influence on levels of melatonin and total antioxidant capacity of blood. *Nutrition*. 2005; 21: 920-924.
- Reiter RJ, Tan DX. Melatonin: an antioxidant in edible plants. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 957: 341-344.
- Roberts LJ, Morrow JD. Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 505-513.
- Rubin R T. Urine Creatinine Excretion: Variability and Volume Dependency During Sleep Deprivation. *Psychosomatic Medicine*. 1971;33:539-544.
- Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr* 2002; 22: 19–34.
- Wetterberg L, Bratlid T , Göran E, Knorring , Yuwiler A. A multinational study of the relationships between nighttime urinary melatonin production, age, gender, body size, and latitude, 1999.
- Yan W, Byrd GD, Ogden MW. Quantitation of isoprostane isomers in human urine from smokers and nonsmokers by LC–MS/MS. *J Lipid Res* 2007; 48: 1607–1617.
- Zhang B, Saku K. Control of matrix effects in the analysis of urinary F2-isoprostanes using novel multidimensional solid-phase extraction and LC–MS/MS. *J Lipid Res* 2007; 48: 733–744.

ภาคผนวก

ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ กิจกรรมที่ดำเนินการมา และผลที่ได้รับ
ตลอดโครงการ

วัตถุประสงค์	กิจกรรมในข้อเสนอโครงการ	ผลสำเร็จ (%)
1. เพื่อทราบระดับเมลาโท닌ในผลไม้แต่ละชนิด	1. ได้วิธีสกัดผลไม้ และสกัดผลไม้แต่ละชนิด	100%
	2. ได้วิธีวิเคราะห์เมลาโท닌ในผลไม้	100%
	3. ทราบระดับเมลาโท닌ในผลไม้ชนิดต่างๆ	100%
2. เพื่อทราบระดับ antioxidant capacity ของผลไม้แต่ละชนิด	4. ได้วิธีวิเคราะห์ antioxidant capacity ในผลไม้ โดยวิธี DPPH และ FRAP	100%
	5. ทราบ antioxidant capacity ในผลไม้ชนิดต่างๆ	100%
3. เพื่อให้ได้ข้อมูลผลของการเพิ่มระดับเมลาโท닌หลังรับประทานผลไม้แต่ละชนิด	6. ได้รับพิจารณาอนุมัติการวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรม	100%
4. เพื่อทราบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันหลังรับประทานผลไม้ทั้ง 6 ชนิด	7. ได้แบบเก็บข้อมูล คำชี้แจงอาสาสมัคร และ SOP สำหรับการทำงานวิจัยทางคลินิก	100%
	8. ได้กระบวนการในการคัดเลือกอาสาสมัคร	100%
	9. ได้ดำเนินการวิจัยทางคลินิก	100%
	10. ทราบผลการเพิ่มระดับเมลาโท닌หลังรับประทานผลไม้แต่ละชนิด	100%
	11. เพื่อทราบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันหลังรับประทานผลไม้	100%

แบบสรุปโครงการวิจัย

สัญญาเลขที่ RDG5220045 ชื่อโครงการ ระดับซัลฟาเมทอกซีเมลาโทนินในปัสสาวะหลังรับประทาน
ผลไม้ไทย (Level of 6-sulfatoxymelatonin in urine after consumption of Thai fruits)

หัวหน้าโครงการ รศ.ดร.นุจรี ประทีปะวณิช จอห์นส

หน่วยงาน คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

โทรศัพท์ 043-202378

โทรสาร 043-202379

อีเมล pnutja@kku.ac.th

ความสำคัญและความเป็นมา

เมลาโทนินเป็นสารที่พบได้ในวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตทั้งในมนุษย์ สัตว์ และพืช เมลาโทนินในมนุษย์เป็นฮอร์โมนที่สร้างจากต่อมไพเนียล ซึ่งเป็นต่อมกลางสมอง มีหน้าที่ควบคุมวัฏจักรของร่างกาย (circadian rhythm) ควบคุมการทำงานของระบบต่อมไร้ท่อ ภูมิคุ้มกัน ระบบสืบพันธุ์ รวมถึงกลไกการเกิดมะเร็ง การศึกษาเมลาโทนินในพืชได้รับความสนใจมากขึ้นในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา โดยพบเมลาโทนินในพืชหลายชนิด และพบมากเป็นพิเศษในพืชสมุนไพรทางยา และพืชเพื่อสุขภาพต่างๆ เช่น กล้วย พืช ผัก และผลไม้ ปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาในระดับเมลาโทนินในผลไม้ไทย แต่เชื่อว่าคุณค่าของผลไม้ไทยน่าจะสัมพันธ์กับระดับเมลาโทนินด้วยเช่นเดียวกัน และเป็นไปได้ว่าน่าจะพบเมลาโทนินในปริมาณที่สูงกว่ารายงานอื่นเนื่องจากเป็นผลไม้ในประเทศเขตร้อนที่มีแสงแดดตลอดทั้งปี

การศึกษาที่ผ่านมาทั้งในสัตว์ทดลองและในคนชี้ให้เห็นว่า การรับประทานพืชในปริมาณที่เหมาะสม สามารถเสริมปริมาณเมลาโทนินในร่างกาย และเพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของร่างกายได้ นอกจากนี้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและปริมาณเมลาโทนินของผักและผลไม้ในหลอดทดลองอาจแตกต่างจากระดับเมลาโทนินในกระแสเลือดหลังจากรับประทานผักและผลไม้เข้าไป เนื่องจากเมลาโทนินบางส่วนจะถูกทำลายในตับ ก่อนถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด นอกจากนี้ การรับประทานผักหรือผลไม้ ไม่เพียงแต่เป็นการเสริมเมลาโทนินจากภายนอกเท่านั้น แต่ยังอาจได้รับสารอื่น เช่น กรดอะมิโน ทรีโทแพน ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์เมลาโทนิน หรือสารสำคัญอื่นๆเข้าไปด้วย จึงอาจมีผลต่อการเพิ่มของปริมาณเมลาโทนิน และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่จะพบในร่างกายได้

การศึกษานี้จึงออกแบบให้เป็นการศึกษาในคนควบคู่ไปกับการศึกษาผลในหลอดทดลอง เพื่อให้ทราบปริมาณเมลาโทนินที่แท้จริงที่ร่างกายมนุษย์จะได้รับ หลังจากการรับประทานผลไม้ที่มีเมลาโทนินเข้าไป ซึ่งงานวิจัยในครั้งนี้ เลือกศึกษาระดับเมลาโทนินในผลไม้ไทย 6 ชนิด โดยเลือกผลไม้ที่อยู่ในกลุ่มเดียวหรือใกล้เคียงกันกับผลไม้ที่เคยมีรายงานระดับเมลาโทนินมาก่อน รวมไปถึงผลไม้ที่มีทรีโทแพนปริมาณสูง ดังนั้น ผลไม้ไทยที่จะศึกษาในการศึกษานี้ ได้แก่ หนามเม่า (ผลไม้ประจำถิ่น และเป็นผลไม้ประเภทเบอร์รี่ ปลูกมากในจังหวัดสกลนคร นครพนม) ส้ม มะละกอ สับปะรด มะม่วง และกล้วย

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อทราบระดับเมลาโทนินในผลไม้แต่ละชนิด
2. เพื่อทราบระดับ antioxidant capacity ของผลไม้แต่ละชนิด
3. เพื่อให้ได้ข้อมูลผลของการเพิ่มระดับเมลาโทนินหลังรับประทานผลไม้แต่ละชนิด
4. เพื่อทราบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันหลังรับประทานผลไม้ทั้ง 6 ชนิด

ผลการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรก ที่ศึกษาปริมาณเมลาโทนินและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในมนุษย์ หลังจากรับประทานผลไม้ไทย 6 ชนิด โดยพบว่าหมากเมาเป็นผลไม้ที่มีเมลาโทนินสูงที่สุด รองลงมา คือ มะม่วง มะละกอ ส้ม สับปะรด และกล้วย ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์ปริมาณเมลาโทนินพบว่า ส้มมีปริมาณเมลาโทนินสูงสุด (472 ± 80 ng/g) รองลงมาคือ กล้วย (419 ± 71 ng/g) มะม่วง (251 ± 43 ng/g) สับปะรด (158 ± 27 ng/g) หมากเมา (79 ± 13 ng/g) และมะละกอ (35 ± 6 ng/g) ตามลำดับ ผลการศึกษาในอาสาสมัครสุขภาพดี พบว่า การรับประทานผลไม้ที่มีเมลาโทนินสูงเพิ่มระดับเมลาโทนินในร่างกายได้ โดยผลไม้บางชนิดเพิ่มระดับ aMT6-s ในปัสสาวะ (เมตาโบไลต์หลักของเมลาโทนิน) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเพิ่มมากที่สุด ใน สับปะรด (127%, $p = 0.004$) รองลงมา คือ กล้วย (103%, $p = 0.001$) และ ส้ม (20%, $p = 0.007$) ส่วนการรับประทานมะละกอ หมากเมา และมะม่วงในปริมาณที่ศึกษา ยังไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับ aMT6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ ยังพบว่าระดับ 8-isoprostane ในปัสสาวะ (ตัวชี้วัดภาวะเครียดออกซิเดชัน) ลดต่ำลงหลังจากรับประทานผลไม้ แต่ยังไม่พบนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.07$) ส่วนหนึ่งอาจเนื่องมาจากยังมีกลุ่มตัวอย่างที่น้อย จึงควรศึกษาในกลุ่มตัวอย่างที่ใหญ่ขึ้นต่อไป

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

การรับประทานกล้วยหอม 2 ผล หรือน้ำสับปะรดที่ได้จากการคั้นน้ำสับปะรด 1 กิโลกรัมด้วยเครื่องแยกกาก (ประมาณ 1 แก้ว) หรือ น้ำส้มที่ได้จากการคั้นน้ำส้ม 1 กิโลกรัม (ประมาณ 1 แก้ว) สามารถเสริมปริมาณเมลาโทนินในร่างกายให้สูงขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้ไม่ได้ศึกษาผลการรับประทานผลไม้ร่วมกับพืชชนิดอื่นที่มีรายงานเมลาโทนินในปริมาณสูง และสูงกว่าผลไม้ เช่น ธัญพืชและผัก ดังนั้น หากรับประทานผลไม้ร่วมกับพืชดังกล่าว อาจรับประทานผลไม้ในปริมาณที่ลดลงได้ อีกทั้ง การศึกษานี้ศึกษาในอาสาสมัครสุขภาพดี จึงไม่ได้วิเคราะห์ผลด้านอื่น เช่น ระดับน้ำตาล หรือ โปแตสเซียม เป็นต้น ดังนั้น คนที่มีโรคประจำตัว เช่น เบาหวานหรือโรคไต ควรปรึกษาแพทย์ก่อน

หน่วยงานที่นำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ และใช้ประโยชน์ด้านไหน

ข้อมูลที่ได้ช่วยให้ทราบผลของการรับประทานผลไม้เพื่อเสริมสุขภาพ ซึ่งจะเป็นประโยชน์กับทุกหน่วยงาน และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้กับทุกคน

การประชาสัมพันธ์

1. สิ่งพิมพ์ทั่วไป -
2. สิ่งพิมพ์ทางวิชาการ

Johns NP, Porasuphatana S, Johns JR. Increased melatonin levels after Thai fruit consumption. International conference: Thai fruits-functional fruits – THAIFEX world of food Asia 2010. 1-2 July Bangkok, Thailand. 50-51.