



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “ฤทธิ์สารสกัดเนื้อสัมผัสต่อการยับยั้งการย่อย
คาร์โบไฮเดรตและไขมัน และการต้านไกลเคชั่น”

สัญญาเลขที่ RDG540029

โดย รองศาสตราจารย์ ดร.สิริชัย อติศักดิ์วัฒนาและคณะ

มิถุนายน 2555

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “ฤทธิ์สารสกัดเนื้อส้มโอต่อการยับยั้งการย่อย
คาร์โบไฮเดรตและไขมัน และการต้านไกลโคเจน

คณะผู้วิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริชัย อติศักดิ์วัฒนา

อ.ดร.สถาพร งามอุโฆษ

อ.ดร.กิตติมา แมคิเนน

ภาควิชาโภชนาการและการกำหนดอาหาร

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชุดโครงการ “สมุนไพรเพื่อคุณภาพชีวิต”

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary)

โรคเบาหวานและโรคไขมันในเลือดเป็นภาวะความผิดปกติของระบบเมแทบอลิซึมของร่างกาย ปัจจุบันประชากรทั่วไปมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคดังกล่าวเป็นอย่างมาก เนื่องจากอาหารและสภาพการใช้ชีวิต ในสังคมปัจจุบัน การชะลอการย่อยการดูดซึมคาร์โบไฮเดรต และการชะลอการย่อยและดูดซึมไขมัน เป็นกลไก อย่างหนึ่งช่วยให้ระดับน้ำตาลกลูโคสและไขมันในเลือดเพิ่มขึ้นช้าลง ช่วยลดความเสี่ยงการเกิดโรค โรคเบาหวานและโรคไขมันในเลือด นอกจากนี้การยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาไกลเคชั่นในร่างกาย ช่วยป้องกันการ เกิดโรคแทรกซ้อน ทางหลอดเลือดและหัวใจ ไต ในผู้ป่วยเบาหวานได้ ผลไม้ไทยนั้นอุดมไปด้วยคุณค่าอาหาร และโภชนาการ สัมโอเป็นผลไม้เศรษฐกิจชนิดหนึ่งซึ่งมีหลากหลายสายพันธุ์ เช่น ทองดี ขาวน้ำผึ้ง ขาวพวง ขาวใหญ่ ขาวแป้น ขาวหอม ขาวแตงกวา และท่าข่อย สัมโอนั้นมีสารพฤกษเคมีที่สำคัญหลายชนิด ชนิดที่พบ มากได้แก่ พวกฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ซึ่งมีคุณสมบัติต่อร่างกาย และมีฤทธิ์ด้านการอักเสบ ต้าน มะเร็ง และต้านอนุมูลอิสระ แต่ทว่าในสัมโอนั้นยังไม่มีการศึกษาถึงสารพฤกษเคมีที่พบในสัมโอต่อการชะลอ การย่อยการดูดซึมคาร์โบไฮเดรต และการชะลอการย่อยและดูดซึมไขมัน รวมถึงการต้านไกลเคชั่น จุดประสงค์ ในการวิจัยในครั้งนี้ เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสัมโอต่อการชะลอการย่อยคาร์โบไฮเดรต โดยผ่านการยับยั้ง การทำงานของเอนไซม์อัลฟาไกลูโคซิเดสและเอนไซม์อัลฟาอะไมเลส และศึกษาฤทธิ์การชะลอการย่อยและดูด ซึมไขมัน ได้แก่ การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปส คอเลสเทอรอลเอสเทอเรส การยับยั้งการเกิดไมเซลล์ และประสิทธิภาพของสารสกัดสัมโอในการจับกับกรดน้ำดี งานวิจัยยังมุ่งเน้นในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสัม โอต่อการต้านการเกิดไกลเคชั่น และวัดปริมาณผลิตภัณฑ์ของการเกิดปฏิกิริยาไกลเคชั่นในหลอดทดลอง งานวิจัยในครั้งนี้ได้นำสัมโอที่นิยมปลูกเป็นผลไม้เศรษฐกิจในประเทศไทยได้แก่ พันธุ์ขาวน้ำผึ้ง ขาวแตงกวา ทับทิมสยาม ทองดี ขาวใหญ่ และท่าข่อย นำมาสกัดได้เพื่อสารสกัดที่มีสารจำพวกฟลาโวนอยด์เป็น องค์ประกอบหลักโดยใช้หลักการโครมาโตกราฟี จากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์อัลฟา-กลูโคซิเดส และอัลฟา-อะไมเลสพบว่า สารสกัดจากเนื้อสัมโอมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าวในระดับปาน กลาง และมีฤทธิ์ในการชะลอการย่อยและดูดซึมไขมัน โดยผ่านการการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปส คอเลสเทอรอลเอสเทอเรสจากตับอ่อน การยับยั้งการเกิดไมเซลล์ และมีฤทธิ์การจับกับกรดน้ำดี ประการสำคัญ พบว่าสารสกัดจากเนื้อสัมโอช่วยยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาไกลเคชั่นของโปรตีนอัลบูมิน โดยการบ่งชี้ของปริมาณ advanced glycation end products ที่ลดลง รวมถึงลดการปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของโปรตีน ทำให้โปรตีนไม่ เสียสภาพการทำงาน นับว่าเป็นองค์ความรู้ใหม่ที่เกิดขึ้นและนำไปสู่การพัฒนาการสกัดสารสำคัญในกลุ่มฟลาโ วนอยด์ เพื่อประโยชน์ในวงการอุตสาหกรรมอาหารและทางการแพทย์ต่อไป นอกจากนี้ข้อมูลจากงานวิจัย เหล่านี้มีความสำคัญอย่างมากโดยเฉพาะในวงการแพทย์สาธารณสุข นักวิจัย นักโภชนาการและนักกำหนด อาหาร เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาวิจัยทางด้านอาหารและโภชนาการ และเพื่อเป็นข้อแนะนำในการ บริโภคผลไม้ให้เหมาะสมกับความต้องการของร่างกายแก่ประชาชนทั่วไปซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการป้องกันโรคไม่ ติดต่อเรื้อรัง เช่น เบาหวานและไขมันในเลือดสูงในอนาคต

บทคัดย่อ

ส้มโอเป็นผลไม้ท้องถิ่นในตระกูล citrus ของภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และเป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย ส้มโอ ชื่อวิทยาศาสตร์ *Citrus grandis* L. มีสารพฤกษเคมีในกลุ่มฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบซึ่งมีประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์ อย่างไรก็ตามการศึกษาถึงฤทธิ์ที่เกี่ยวกับการต้านเบาหวาน ด้านภาวะไขมันในเลือดสูงและด้านปฏิกิริยาไกลเคชั่นยังไม่มีการศึกษาามาก่อน จุดมุ่งหมายของงานวิจัยนี้เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบฟลาโวนอยด์จากสารสกัดเนื้อส้มโอ 6 สายพันธุ์ ได้แก่ ขาวใหญ่ ทองดี ขาวแตงกวา ขาวน้ำผึ้ง ทำห่อยและทับทิมสยาม และศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-กลูโคซิเดสและอัลฟา-อะไมเลสจากตับอ่อน นอกจากนี้งานวิจัยยังได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเนื้อส้มโอต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสและคอเลสเตอรอลเอสเทอเรสจากตับอ่อน การยับยั้งการเกิดไมเซลล์ของคอเลสเตอรอลและการรวมตัวกับกรดน้ำดี และศึกษาถึงฤทธิ์การต้านไกลเคชั่นโดยใช้โปรตีนอัลบูมินจากวัวและน้ำตาลฟรุกโตสในการทดลองจากผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากเนื้อส้มโอยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-กลูโคซิเดสและอัลฟา-อะไมเลสจากตับอ่อนได้เล็กน้อย และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เอนไซม์ไลเปสและคอเลสเตอรอลเอสเทอเรสจากตับอ่อนได้ปานกลาง สารสกัดจากเนื้อส้มโอเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรยับยั้งการเกิดไมเซลล์คอเลสเตอรอลได้ประมาณ 4-15% ขณะที่กรดน้ำดีชนิด taurocholic acid taurodeoxycholic acid และ glycodeoxycholic acid ถูกสารสกัดจากเนื้อส้มโอที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรรวมตัวได้ประมาณ 2-20%, 10-20%, 5-18% ตามลำดับ ผลการทดลองยังระบุว่าสารสกัดจากเนื้อส้มโอยับยั้งการเกิดผลิตภัณฑ์ advanced glycation end products (AGEs) และสามารถลดปริมาณฟรุกโตซามีน ปริมาณ N^ε-(carboxymethyl) lysine หรือ CML และโครงสร้าง amyloid cross β สารสกัดจากเนื้อส้มโอยังช่วยป้องกันการเกิดโปรตีนออกซิเดชั่นของหมู่ thiol และลดปริมาณการเกิดหมู่ carbonyl ในโปรตีน จากการศึกษาครั้งนี้ได้รับความรู้ใหม่จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ฤทธิ์ต้านเบาหวาน ภาวะไขมันในเลือดสูง และด้านการเกิดปฏิกิริยาไกลเคชั่น ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์ส่งเสริมสุขภาพเพื่อป้องกันโรคเบาหวาน ไขมันเลือดสูงและภาวะแทรกซ้อนต่างๆ

Abstract

Pomelo is a native citrus fruit of Southeast Asia and a cash crop to Thailand. Pomelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) contains of many flavonoids that have shown the beneficial effects on human health. However, studies related to antihyperglycemic, antihyperlipidemic, and antiglycation properties of pomelo flavonoids are limited. The objective of this study was to quantify of flavonoids in the pulp of six pomelo cultivars (Kao Yai, Thong Dee, Kao Tanggwa, Kao Nam Pueng, Tar Koi and Tubtim Siam) and to determine the α -glucosidase and pancreatic α -amylase inhibitory activities of pomelo extracts. Moreover, the study was to investigate the effect of pomelo extracts on the inhibition of pancreatic lipase and pancreatic cholesterol esterase activities as well as the inhibition of cholesterol micelle formation, and bile acid binding. Finally, the present study sought to characterize the protein glycation inhibitory activity of pomelo extracts in a bovine serum albumin (BSA)/fructose system. The results demonstrated that the pomelo extracts slightly inhibited α -glucosidase and pancreatic α -amylase. In addition, the pomelo extracts have shown moderate pancreatic lipase and cholesterol esterase inhibitory activities. The pomelo extracts (5 mg/ml) inhibited cholesterol micellization with values 4-15%. Moreover, taurocholic acid, taurodeoxycholic acid, and glycodeoxycholic acid was markedly bound by all pomelo extracts (2 mg/ml) that exhibited binding capacity around 2-20%, 10-20%, and 5-18%, respectively. The results demonstrated that pomelo extracts significantly inhibited the formation of advanced glycation end products (AGEs). Furthermore, they reduced the level of fructosamine, the formation of N^ε-(carboxymethyl) lysine (CML), and the level of amyloid cross β -structure. The pomelo extracts also prevented oxidative protein damages, including effects on protein carbonyl formation and thiol oxidation of BSA. The findings could provide a new insight into the naturally occurring antihyperglycemic, antihyperlipidemic, and antiglycation properties of pomelo extracts for development as a nutraceutical food in order to prevent diabetes, hyperlipidemia and its complications.

บทนำ

โรคเบาหวานเป็นภาวะความผิดปกติของระบบเมแทบอลิซึม ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และโปรตีน โดยมีลักษณะสำคัญคือ ระดับน้ำตาลในเลือดสูงและร่างกายไม่สามารถควบคุมให้อยู่ในระดับปกติได้ ทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนต่ออวัยวะต่างๆ โดยเฉพาะ ตา ไต หัวใจ และหลอดเลือด โรคเบาหวานแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่ เบาหวานชนิดที่ 1 (Type 1) เกิดจาก β -cell ของตับอ่อนถูกทำลายทำให้ไม่สามารถหลั่งอินซูลินออกมาได้ และเบาหวานชนิดที่ 2 (Type 2) เกิดจากการหลั่งและการทำงานของอินซูลินผิดปกติ องค์การอนามัยโลกคาดว่า จำนวนผู้ป่วยโรคเบาหวานจะเพิ่มขึ้น 35% จากจำนวนผู้ป่วยทั่วโลก 150 ล้านคนในปี ค.ศ.1995 และเพิ่มขึ้นเป็น 300 ล้านคนในปี ค.ศ. 2025 สำหรับรายงานในประเทศไทย เมื่อปี ค.ศ.1985 พบว่ามีจำนวนผู้ป่วยเบาหวานประมาณ 33.3 คนจากประชากรทุก 100,000 คน และเพิ่มเป็น 135 คนจากประชากรทุก 100,000 คนในปี ค.ศ.1996 จากรายงานดังกล่าวจะเห็นได้ว่าจำนวนผู้ป่วยเบาหวานมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆทุกปี โรคเบาหวานนั้นเป็นโรคเรื้อรังที่ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ ดังนั้นสิ่งสำคัญในการดูแลผู้ป่วยโรคเบาหวานคือ ทำให้ผู้ป่วยสามารถควบคุมระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดให้อยู่ในเกณฑ์ปกติ ป้องกันภาวะแทรกซ้อนที่อาจเกิดขึ้น จะทำให้ผู้ป่วยเบาหวานมีคุณภาพชีวิตที่ดี และมีอายุยืนยาว (King et al., 1998; Chiasson et al., 2006)

ปัจจุบันประชากรทั่วไปมีความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะดื้อต่ออินซูลินและเป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 มากขึ้น สาเหตุเนื่องจากวิถีชีวิตและการบริโภคอาหารที่เปลี่ยนแปลงไป (Leiter et al., 2005) ประชากรมีการบริโภคอาหารประเภทที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบปริมาณมากขึ้น การมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงเป็นระยะเวลานานเป็นตัวการสำคัญที่เหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระ reactive oxygen species (ROS) เช่น hydroxyl radical, superoxide และ lipid peroxide เป็นต้น ทำลายเซลล์และการส่งสัญญาณในระดับเซลล์ของอวัยวะต่างๆ ทั้งร่างกาย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง อนุมูลอิสระสามารถทำให้เกิดความผิดปกติต่อการส่งสัญญาณการออกฤทธิ์ของตัวรับฮอร์โมนอินซูลินที่อยู่ในเซลล์ กล้ามเนื้อและไขมัน เหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน และ ROS ยังทำลาย β -cell ในตับอ่อน ส่งผลให้การสังเคราะห์ฮอร์โมนอินซูลินลดลง จนกระทั่งเป็นโรคเบาหวานในที่สุด (D'Autreaux et al., 2007; Eriksson et al., 2007) น้ำตาลฟรุกโตสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ซึ่งดูดซึมที่ลำไส้เล็กได้อย่างรวดเร็ว การรับประทานอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสสูงเป็นองค์ประกอบเป็นระยะเวลายาวนาน เป็นปัจจัยหนึ่งที่ก่อให้เกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ได้เช่นกัน (Miller et al., 2008) น้ำตาลฟรุกโตสสามารถทำลายกลไกการส่งสัญญาณของตัวรับฮอร์โมนอินซูลิน โดยลดการสังเคราะห์ปริมาณ mRNA ของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณในการทำงานของตัวรับฮอร์โมนอินซูลิน มีผลให้การสังเคราะห์โปรตีนเหล่านั้นลดลง ซึ่ง glucose transporter 4 (GLUT4) เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกดังกล่าวโดยเป็นตัวพากลูโคสกลับเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อหรือไขมัน มีปริมาณลดลงเช่นกัน ระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดไม่สามารถเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อลาย ไขมันได้ จึงเป็นผลให้เกิดโรคเบาหวานในที่สุด (Miller et al., 2008; Liu et al., 2007)

โรคไขมันในเลือดสูง (hyperlipidemia) คือ ภาวะที่มีระดับไขมันไตรกลีเซอไรด์ หรือคอเลสเตอรอล ชนิดที่ให้โทษสูงและมีคอเลสเตอรอลชนิดให้คุณในเลือดต่ำ ความผิดปกตินี้จะนำไปสู่การเกิดหลอดเลือดแดง แข็งตีบแคบโดยเฉพาะหลอดเลือดที่ไปเลี้ยงหัวใจและสมอง มีโอกาสเสี่ยงต่อการเป็นโรคหัวใจขาดเลือด สมอง ขาดเลือด และการมีภาวะไขมันในเลือดสูงเป็นระยะเวลานานอาจเหนี่ยวนำให้เกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบ เมแทบอลิซึม (Le et al., 2007) ปัจจุบันประชากรทั่วโลกมีโอกาและความเสี่ยงสูงที่ป่วยเป็นโรคไขมันใน เลือดสูง เนื่องจากวิถีชีวิตและการบริโภคอาหารที่เปลี่ยนแปลงไป มีการบริโภคอาหารประเภทที่มีไขมันและ น้ำตาลสูงยิ่งขึ้น การมีภาวะไขมันในเลือดสูงนั้นเป็นปัจจัยหนึ่งในการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะดื้อต่ออินซูลินและ ป่วยเป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ได้

การเกิดภาวะระดับน้ำตาลกลูโคสสูงภายหลังรับประทานอาหารเป็นสิ่งที่ต้องคำนึงถึงเช่นกันซึ่งเป็น สาเหตุสำคัญของการเกิดโรคแทรกซ้อนต่างๆ ผลกระทบดังกล่าวถือได้ว่าเป็นผลเสียต่อสุขภาพที่จะก่อให้เกิด การรวมตัวของน้ำตาลในเลือดกับโปรตีน ไขมันและกรดนิวคลีอิก ซึ่งจะเกิดผลิตภัณฑ์ที่เรียกว่า advanced glycation end products (AGEs) ซึ่งสารชนิดนี้ที่มีอัตราการเกิดที่ช้าในร่างกายแต่เมื่อเกิดขึ้นแล้วจะมีความ เสถียรและกำจัดออกจากร่างกายยาก และจะค่อยๆ สะสมตามเนื้อเยื่อต่างๆ อย่างไรก็ตามปฏิกิริยาดังกล่าวจะ เกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วในผู้ป่วยโรคเบาหวานเนื่องด้วยมีสารตั้งต้นที่เป็นน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลฟรุกโตส สูงขึ้นนั่นเอง AGEs เป็นโมเลกุลที่เกิดจากปฏิกิริยาที่ไม่อาศัยการทำงานของเอนไซม์ เป็นปฏิกิริยาขั้นตอนแรก ซึ่งเกิดจากน้ำตาลที่รีดิวซ์ได้รวมตัวกับกลุ่มของอะมิโนอิสระในโปรตีน ไขมัน และกรดนิวคลีอิก ผลิตภัณฑ์ที่ได้ จากปฏิกิริยานี้เรียกว่า Schiff base ซึ่งไม่เสถียรและเกิดการเรียงตัวใหม่ภายในโมเลกุลซึ่งเรียกว่า Amadori ตัวอย่างที่โดยทั่วไปจะรู้จักกันดี เช่น ฟรุกโตซามีน (fructosamine) และฮีโมโกลบิน เอวันซี (hemoglobin A_{1c} หรือ HbA_{1c}) นอกจากนี้อนุมูลอิสระและโลหะหนักในร่างกาย เช่น ธาตุทองแดง หรือ ธาตุเหล็ก สามารถ เข้าร่วมทำปฏิกิริยาในขั้นตอนต่างๆของกระบวนการดังกล่าวและทำให้เกิด AGEs ได้เช่นกัน เมื่อ AGEs เกิดขึ้นจะยึดจับกับโปรตีนด้วยพันธะโคเวเลนต์ซึ่งมีผลกระทบโดยตรงต่อโครงสร้างของเซลล์ทั้งภายในเซลล์ ระหว่างเซลล์ หรือภายในผนังของเซลล์ นำไปสู่การทำงานที่ผิดปกติ นอกจากนี้ AGEs อาจจะจับกับ receptor ของมันที่อยู่บนผิวเซลล์นำไปสู่การเคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์ และเกิดการสลาย หรือส่งสัญญาณให้เกิดอาจเหนี่ยวนำ ให้เกิดการอักเสบ เกิดอนุมูลอิสระทำลายเซลล์ได้ พบว่า AGEs เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนพยาธิสภาพ ของพันธุกรรมที่สำคัญในการเกิดโรคแทรกซ้อนของผู้ป่วยเบาหวาน ตัวอย่างเช่น AGEs ถูกพบในหลอดเลือดใน เลนส์ตาของผู้ป่วยเบาหวานซึ่งระดับของ AGEs สอดคล้องที่พบในซีรัม เป็นต้นเหตุที่ทำให้เกิดภาวะ retinopathy ดังนั้นการลดระดับของการเกิด AGEs สามารถป้องกันการดำเนินของภาวะแทรกซ้อนในผู้ป่วย เบาหวานได้ (Ahmed, 2005) นอกจากนี้ยังพบว่าอนุมูลอิสระเกี่ยวข้องกับการเกิด AGEs เช่นกัน ดังนั้นการ หยุดอนุมูลอิสระโดยสารที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเป็นแนวทางหนึ่งในการหยุดการเกิด AGEs ได้ (Wu et al., 2011)

ในวงการแพทย์ปัจจุบันได้แนะนำวิธีดูแลและรักษาโรคเบาหวานและโรคไขมันในเลือดสูง เพื่อลด ภาวะแทรกซ้อนที่จะตามมา โดยมุ่งเน้นให้ผู้ป่วยควบคุมอาหาร และเลือกชนิดของอาหารที่รับประทานควบคู่ กับการออกกำลังกายรวมถึงมีการใช้ยาแผนปัจจุบันร่วมด้วย แต่เนื่องจากโรคเบาหวานและไขมันในเลือดสูง

เป็นโรคเรื้อรังที่ ยากต่อการดูแลและรักษา (Rosak et al., 2002) ในแต่ละประเทศต้องเสียค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษาผู้ป่วยดังกล่าวในมูลค่าที่สูง ดังนั้นแนวทางในการควบคุมการเกิดโรคเบาหวานและโรคไขมันในเลือดสูงที่ดีที่สุดนั้น คือ การมุ่งเน้นไปยังการป้องกันการเกิดโรคดังกล่าว กลวิธีในการป้องกันการเกิดโรคที่ดีที่สุด คือ หลีกเลี่ยงการบริโภคอาหารที่ปริมาณน้ำตาลสูงและไขมันสูง (Curtis et al., 2005) ควรรับประทานอาหารที่มีผลไม้ที่มีสารพฤกษเคมีในปริมาณสูง เช่น ฟลาโวนอยด์ ซึ่งสารเหล่านี้สามารถช่วยชะลอการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่ร่างกายโดยผ่านการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-กลูโคซิเดส และอัลฟาอะไมเลส (Adisakwattana et al., 2009) การชะลอการย่อยอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรตจะช่วยชะลอการเพิ่มขึ้นของระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดหลังอาหารได้ นอกจากนี้กลุ่มฟลาโวนอยด์ในผลไม้ช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาไกลเคชั่นระหว่างน้ำตาลรีดิวซ์ได้ทั้งน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตสกับโปรตีนในร่างกาย (Dyer et al., 1993; McCance, 1993) ซึ่งกลไกทั้งสองที่กล่าวมานั้นมีส่วนช่วยลดอุบัติการณ์การเกิดโรคเบาหวานและโรคแทรกซ้อนด้านระบบหัวใจและหลอดเลือดที่จะเกิดตามมาในอนาคตได้ เช่น โรคความดันโลหิตสูง โรคเส้นเลือดสมองอุดตัน โรคหัวใจ โรคไต (Semenkovich, 2006) เช่นเดียวกันกับยับยั้งการย่อยและดูดซึมไขมัน เช่น ไตรกลีเซอไรด์และคอเลสเตอรอลก็เป็นวิธีทางหนึ่งจะช่วยลดการเกิดภาวะระดับไขมันในเลือดสูงขึ้นได้ โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อน (pancreatic lipase) และการจับตัวของคอเลสเตอรอลในรูปไมเซลล์ ซึ่งเป็นกลไกที่จะช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคเบาหวาน โรคหัวใจ และโรคไขมันในเลือดสูง

ผลไม้ไทยเป็นแหล่งที่สำคัญของวิตามินและแร่ธาตุ รวมทั้งสารอาหารอื่นๆ ที่จำเป็นต่อร่างกาย รวมถึงมีสารพฤกษเคมีเป็นองค์ประกอบซึ่งให้ประโยชน์ต่อสุขภาพของร่างกาย นอกจากนี้การรับประทานผลไม้เป็นประจำสามารถลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคไม่ติดต่อเรื้อรังต่างๆ ส้มโอ มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Citrus maxima* หรือ *Citrus grandis* เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางในตระกูลเดียวกับส้ม พบส้มโอหลากหลายสายพันธุ์ในประเทศไทย เช่น ขาวทองดี ขาวน้ำผึ้ง ขาวพวง ขาวใหญ่ ขาวแป้น ขาวหอม ขาวแตงกวา และท่าข่อย ซึ่งในส้มโอพบสารพฤกษเคมี เช่น ฟลาโวนอยด์ วิตามินซีเป็นองค์ประกอบหลัก และมีรายงานวิจัยที่กล่าวว่า ฟลาโวนอยด์ที่พบผลไม้ตระกูลเดียวกับส้ม มีคุณสมบัติในการต้านการอักเสบ ด้านมะเร็ง ด้านอนุมูลอิสระ และช่วยป้องกันการหลอดเลือดหัวใจ เป็นต้น คุณสมบัติดังกล่าวมีประโยชน์ต่อสุขภาพของร่างกาย แต่เนื่องจากปัจจุบันยังมีข้อมูลวิทยาศาสตร์ที่กล่าวถึงคุณสมบัติของฟลาโวนอยด์ในส้มโอต่อการชะลอการยับยั้งคาร์โบไฮเดรตและไขมัน รวมถึงการต้านการเกิดไกลเคชั่น ดังนั้นงานวิจัยนี้มุ่งเน้นในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากส้มโอในสายพันธุ์ต่างๆ ต่อการชะลอการย่อยคาร์โบไฮเดรตโดยศึกษาฤทธิ์ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-กลูโคซิเดส และอัลฟาอะไมเลส รวมถึงการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดส้มโอต่อการชะลอการย่อยและดูดซึมไขมัน โดยผ่านทาง การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อน การยับยั้งการเกิดไมเซลล์ การชะลอการย่อยเอนไซม์คอเลสเตอรอลเอสเทอเรส และการจับกับกรดน้ำดี นอกจากนี้การวิจัยมุ่งเน้นในการศึกษาการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาไกลเคชั่นของสารสกัดส้มโอ ข้อมูลจากการวิจัยเหล่านี้ยังมีความสำคัญอย่างมากโดยเฉพาะในวงการแพทย์สาธารณสุข นักวิจัย นักโภชนาการและนักกำหนดอาหาร เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาวิจัยทางด้านอาหารและโภชนาการ และเพื่อเป็นข้อแนะนำในการบริโภคผลไม้ให้เหมาะสมกับความ

ต้องการของร่างกายแก่ประชาชนทั่วไปซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการป้องกันโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง เช่น เบาหวานและไขมันในเลือดสูงในอนาคต

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเนื้อส้มโอสายพันธุ์ต่างๆต่อการชะลอการย่อยคาร์โบไฮเดรต
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเนื้อส้มโอสายพันธุ์ต่างๆต่อการชะลอการย่อยไขมัน
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเนื้อส้มโอสายพันธุ์ต่างๆต่อการต้านการเกิดไกลโคเจน

ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบฤทธิ์ทางของสารสกัดจากเนื้อส้มโอสายพันธุ์ต่างๆต่อการชะลอการดูดซึมคาร์โบไฮเดรตและไขมัน รวมถึงการต้านไกลโคเจนเพื่อใช้ในการช่วยการป้องกันการเกิดโรคเบาหวานและไขมันในเลือดสูง
2. ข้อมูลงานวิจัยที่นำไปสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากผลไม้ไทยในอนาคต และเกิดประโยชน์ทางการตลาดและเพิ่มมูลค่าสินค้าสำหรับการส่งออก

ระเบียบวิธีวิจัย

การเตรียมสารสกัดจากเนื้อส้มโอ

1. นำส้มโอแต่ละสายพันธุ์มาปอกเปลือก นำเมล็ดออก แกะเอาแต่เนื้อมาชั่งน้ำหนัก แล้วจดบันทึกน้ำหนักไว้ จากนั้นนำไปปั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน โดยสายพันธุ์ส้มโอที่ใช้มีดังนี้ (ดังรูปที่ 1)

- | | |
|---------------|-------------------------|
| 1. ขาวน้ำผึ้ง | จากจังหวัดนครปฐม |
| 2. ขาวแตงกวา | จากจังหวัดชัยนาท |
| 3. หับทิมสยาม | จากจังหวัดนครศรีธรรมราช |
| 4. ทองดี | จากจังหวัดนครปฐม |
| 5. ขาวใหญ่ | จากจังหวัดนครปฐม |
| 6. ท่าข่อย | จากจังหวัดพิจิตร |



รูปที่ 1 ส้มโอทั้ง 6 สายพันธุ์ที่ใช้ในการวิจัย



รูปที่ 2 เนื้อของส้มโอทั้ง 6 สายพันธุ์ที่ใช้ในการวิจัย

2. นำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และก่อนจะนำไปประเหยให้นำไปแช่ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส
3. นำส้มโอมาระเหยแห้งจนเป็นผงด้วยเครื่อง Freeze drier เมื่อเสร็จแล้วนำมาเติมสารละลายเมทานอล นำไปเก็บให้แห้งเป็น เวลา 2-3 วัน
4. กรองสารสกัดส้มโอด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนของเหลวกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และนำไปเข้าเครื่อง Evaporator เพื่อระเหยเมทานอลออกจนหมด จนได้เป้งผงส้มโอ
5. สกัดน้ำตาลออกจากผงส้มโอโดยวิธีแยกตามหลักการโครมาโตกราฟีโดยใช้ขั้นตอนการสกัดแยกทำตามเทคนิคของ Li et al., 2005
6. เตรียมสารละลาย acidified methanol โดยตวง HCl ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ละลายในเมทานอล ปริมาตร 999 มิลลิลิตร
7. เตรียมสารละลายส้มโอโดยนำผงส้มโอที่ระเหยเมทานอลออกแล้วมาละลายในน้ำกลั่น ให้ได้เป็นส้มโอ ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยชั่งส้มโอ 450 มิลลิกรัม แล้วเติมน้ำกลั่น 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจนส้มโอละลายหมด
8. เตรียมคอลัมน์ที่ใช้โดยใช้คอลัมน์ Sep-Pak C-18[®] มาต่อกับหลอดฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร
9. ชะคอลัมน์ด้วยเมทานอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เมื่อเมทานอลไหลผ่านคอลัมน์จนหมด ให้ชะคอลัมน์อีกครั้งด้วย 0.1% HCl ปริมาตร 10 มิลลิลิตร รอกระทั่ง 0.1% HCl ไหลผ่านคอลัมน์จนหมด

10. นำสารละลายส้มโอที่เตรียมไว้ มาทำการแยกน้ำตาล โดยปิเปตสารละลายส้มโอครั้งละ 400 ไมโครลิตร ใส่ลงในคอลัมน์ แล้วเติม 0.1% HCl ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ให้ไหลผ่านคอลัมน์เพื่อแยกน้ำตาลออกจากสารละลายส้มโอ รอกระทั่ง 0.1% HCl ไหลผ่านคอลัมน์จนหมด
11. นำคอลัมน์ไปทำให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจนจนคอลัมน์แห้ง
12. เติม acidified methanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อชะส้มโอที่อยู่ในคอลัมน์ แล้วนำสารละลายส่วนนี้ทั้งหมดใส่แบ่งใส่ centrifuge tube ให้มีปริมาตรเท่ากันๆ จากนั้นนำไปทำการระเหยเมทานอลออกโดยใช้เครื่อง evaporator และนำไปทำการทดลองต่อไป

การวิเคราะห์สารพฤษเคมีในสารสกัดเนื้อส้มโอด้วยวิธี HPLC

วิธีการวิเคราะห์ปรับปรุงจากเทคนิคของ Zhang et.al, 2010

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานทั้ง 5 ชนิดที่ใช้เพื่อการวิเคราะห์สารพฤษเคมีในสารเนื้อส้มโอ ได้แก่ naringin, hesperidin, neohesperidin, neohesperidin dihydrochalcone, naringenin และ hesperitin ในช่วงความเข้มข้น 1.95 ถึง 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
2. ทำการฉีดสารละลายดังกล่าวเข้าสู่ HPLC โดยใช้คอลัมน์ reversed-phase C-18 column (4.6 x 250mm, 5 μ m) มี mobile phase ชนิด A คือ deionized water/acetic acid (99:1) และ ชนิด B คือ acetone nitrile/acetic acid (99:1). ปรับเงื่อนไขของการแยกทางโครมาโตกราฟี โดยรายงานเป็น % mobile phase B และส่วนที่เหลือเป็น mobile phase A

เวลา	MP (B) %	เวลา	MP (B)%	เวลา	MP (B)%	เวลา	MP (B)%
0	5	17	22	38	53	60	85
5	8	22	25	40	55	83	8%
7	12	27	35	42	60	85	5
12	18	37	53	57	80		

ปรับแรงดันของ mobile phase ในอัตรา 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ UV-detector ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

3. เตรียมสารละลายจากเนื้อส้มโอในความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กรองสารละลายและนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC ตามเงื่อนไขข้อที่ 3

4. คำนวณความเข้มข้นของฟลาโวนอยด์แต่ละชนิดในหน่วย ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม สารสกัด

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการย่อยคาร์โบไฮเดรตของสารสกัดจากเนื้อส้มโอ

วิธีการทดสอบทำตามเทคนิคของ Adisakwattana et al., 2009

การยับยั้งเอนไซม์อัลฟาไกลโคซิเดส (มอลเตสและซูเครส)

1. เตรียมสารละลายเอนไซม์อัลฟา-กลูโคซิเดส (มอลเตสและซูเครส) จาก rat intestinal acetone powder โดยนำมาซึ่งจำนวน 100 มิลลิกรัม ละลายด้วย 0.9% โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ปริมาตร 3 มิลลิตร ในน้ำแข็ง อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที จากนั้นนำสารละลายของเอนไซม์ที่ได้ใส่ในหลอดทดลอง ขนาด 1.5 มิลลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 30 นาที ดูดสารละลายเฉพาะส่วนใสที่ไม่มีตะกอนใสในหลอดทดลอง ขนาด 1.5 มิลลิตร แล้วเก็บไว้ในตู้แช่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
2. เตรียมสารละลาย phosphate buffer pH 6.9 ความเข้มข้น 0.1 M
3. เตรียมสารละลายมอลโตสความเข้มข้น 86 mM และสารละลายซูโครสความเข้มข้น 1200 mM โดยเก็บในขวดพลาสติก แช่ไว้ในตู้แช่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
4. เตรียมสารละลายของสารสกัดจากส้มโอทั้งหมด 6 สายพันธุ์โดยละลายใน DMSO
5. เตรียมสารละลาย PGO enzyme โดยนำ PGO enzyme 1 แคปซูล ละลายในน้ำปริมาตร 100 มิลลิตร และซิงค์ O-dianisidine dihydrochloride 50 มิลลิกรัม ละลายในน้ำ 20 มิลลิตร ปิเปตมา 1.6 มิลลิตร นำไปผสมกับ PGO enzyme ที่เตรียมไว้ เก็บให้พ้นแสง และแช่ไว้ในตู้แช่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
6. ทำการทดลองโดยใช้สารสกัดจากส้มโอแต่ละสายพันธุ์เป็นตัวยับยั้ง โดยปิเปตสารลงในหลอดทดลอง ดังตาราง

การยับยั้งเอนไซม์มอลเตส

สารละลาย	ควบคุม (ไมโครลิตร)	ทดสอบ (ไมโครลิตร)
สารละลายมอลโตส	30	30
DMSO	10	-
ตัวยับยั้ง (สารสกัดจากส้มโอ)	-	10
สารละลายบัฟเฟอร์	50	50
เอนไซม์ α -glucosidase	10	10

การยับยั้งเอนไซม์ซูเครส

สารละลาย	ควบคุม (ไมโครลิตร)	ทดสอบ (ไมโครลิตร)
สารละลายซูโครส	10	10
DMSO	10	-
ตัวยับยั้ง (สารสกัดจากส้มโอ)	-	10
สารละลายบัฟเฟอร์	50	50
เอนไซม์ α -glucosidase	30	30

- ผสมให้เข้ากัน จากนั้นตั้งทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สำหรับเอนไซม์มอลเตส และ 60 นาที สำหรับเอนไซม์ซูเครส
- หยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- ปิเปตสารจากหลอดทดลองมา 10 ไมโครลิตร เติม PGO enzyme 1 มิลลิลิตร ลงไปแล้วผสมให้เข้ากัน
- นำไปตั้งทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
- นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 450 nm
- คำนวณหาค่า % Enzyme inhibition

$$\% \text{ Enzyme Inhibition} = \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสง control} - \text{ค่าการดูดกลืนแสง test}) \times 100}{\text{ค่าการดูดกลืนแสง control}}$$

โดยที่ ค่าการดูดกลืนแสง control คือ ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อไม่มีตัวยับยั้ง

ค่าการดูดกลืนแสง test คือ ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อมีตัวยับยั้ง (มีสารสกัดจากส้มโอ)

- ทำการทดลองซ้ำจากข้อ 6-12 ซ้ำจำนวน 3 ครั้ง (n=3)
- ทำการทดลองในลักษณะเช่นเดียวกันโดยเปลี่ยนเป็นยา acarbose

การยับยั้งเอนไซม์อัลฟา-อะไมเลส

- เตรียมสารละลาย Sodium phosphate buffer pH 6.9
- เตรียมสารละลายเอนไซม์อัลฟา-อะไมเลส ความเข้มข้น 3 ยูนิต/มิลลิลิตร โดยชั่งเอนไซม์อัลฟา-อะไมเลส จำนวน 3.80 มิลลิกรัม ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เตรียมได้จากข้อ 1 จนมีปริมาตรเป็น 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายของเอนไซม์ที่ได้ใส่ หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไป

เซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อวินาทีเป็นเวลา 4 นาที แยกสารละลายเฉพาะส่วนใส ไม่มีตะกอน เก็บในหลอดทดลอง ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วแช่ไว้ในตู้แช่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. เตรียมสารละลาย 40% Sodium potassium tartrate
4. เตรียมสารละลาย 1% DNS โดยชั่ง 3,5-dinitrosalicylic acid 1.0 กรัม, phenol 0.2 กรัม, Sodium sulfite 0.05 กรัม, sodium hydroxide 1 กรัม ละลายด้วยน้ำ deionized จนมีปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร
5. เตรียมสารละลายน้ำแบ่งความเข้มข้น 1% w/v
6. เตรียมสารละลายของสารสกัดจากส้มโอทั้งหมด 6 สายพันธุ์ โดยละลายใน DMSO
7. ทำการทดลองโดยใช้สารสกัดจากส้มโอเป็นตัวยับยั้ง ทำตามรายละเอียดดังต่อไปนี้

ปริมาตร (ไมโครลิตร)	Total enzyme activity (E)	Blank (EB)	Enzyme inhibitor (T)	Inhibitor blank (TB)
น้ำแบ่ง	75	75	75	75
สารสกัด	-	-	10	10
DMSO	10	10	-	-
สารละลายบัฟเฟอร์	90	90	90	90
เอนไซม์	75	-	75	-
ตั้งให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส				
DNS Solution	250	250	250	250
เอนไซม์	-	75	-	75
นำหลอดทดลองที่บรรจุสารละลายไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที				
40% Sodium potassium tartrate	250	250	250	250

นำสารละลายที่ได้ไปวัดการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 540 nm

8. ทำการคำนวณหาค่า % enzyme inhibition ของสารสกัดจากพืชจำนวน 6 ชนิด จากสูตร

$$\% \text{ Enzyme Inhibition} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง (E-EB)} - \text{ค่าการดูดกลืนแสง (T-TB)} \times 100}{\text{ค่าการดูดกลืนแสง (E-EB)}}$$

โดยที่

ค่าการดูดกลืนแสง (E)	คือ	ค่าการดูดกลืนแสงของ Total enzyme activity
ค่าการดูดกลืนแสง (EB)	คือ	ค่าการดูดกลืนแสงของ Blank
ค่าการดูดกลืนแสง (T)	คือ	ค่าการดูดกลืนแสงของ Enzyme inhibitor
ค่าการดูดกลืนแสง (TB)	คือ	ค่าการดูดกลืนแสงของ Inhibitor Blank

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการย่อยและดูดซึมไขมันของสารสกัดจากเนื้อส้มโอ

วิธีการทดสอบทำตามเทคนิคของ Ngamukote et al., 2011

การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอเลสเตอรอลเอสเทอเรส

1. เตรียมสารละลาย phosphate buffer pH 6.9 ความเข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
2. เตรียมสารละลาย Taurocholic acid 12 mM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร
3. เตรียมเอนไซม์ cholesterol esterase 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยชั่งเอนไซม์ 1 มิลลิกรัม ละลายในบัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร เจือจางเป็น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
4. เตรียม p-nitrophenylbutyrate (p-NPB) 20 mM ใน acetonitrile
5. เตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายบัฟเฟอร์
6. ทำการทดลองโดยใช้สารสกัดจากส้มโอแต่ละสายพันธุ์เป็นตัวยับยั้ง โดยปิเปตสารลงในหลอดทดลองดังตาราง

ปริมาตรสารเคมี (ไมโครลิตร)	E	T	EB	TB
สารละลาย Buffer	30	30	40	40
Taurocholic acid	50	50	50	50
สารสกัด	-	5	-	5
DMSO	5	-	5	-
p-NPB	5	5	5	5
เอนไซม์	10	10	-	-

7. คำนวณค่า % enzyme inhibition จากสูตร

$$\% \text{ Enzyme Inhibition} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง (E-EB)} - \text{ค่าการดูดกลืนแสง (T-TB)} \times 100}{\text{ค่าการดูดกลืนแสง (E-EB)}}$$

โดยที่

ค่าการดูดกลืนแสง (E)	คือ	ค่าการดูดกลืนแสงของ Total enzyme activity
ค่าการดูดกลืนแสง (EB)	คือ	ค่าการดูดกลืนแสงของ Blank
ค่าการดูดกลืนแสง (T)	คือ	ค่าการดูดกลืนแสงของ Enzyme inhibitor
ค่าการดูดกลืนแสง (TB)	คือ	ค่าการดูดกลืนแสงของ Inhibitor Blank

การยับยั้งการเกิด Micellization

วิธีการทดสอบทำตามเทคนิคของ Ngamukote et al., 2011

1. เตรียมสารละลายไมเซลล์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ประกอบด้วย 2 mM คอเลสเทอรอล 1mM Oleic acid และ 10 mM Phosphatidylcholine โดยใช้ Dichloromethane เป็นตัวทำละลาย
2. เตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบไปด้วย 15 mM NaH_2PO_4 , 15mM Na_2HPO_4 และ 132 mM NaCl
3. เตรียมสารละลายจากสารสกัดส้มโอที่ความเข้มข้นต่างๆละลายในบัฟเฟอร์
4. ชั่ง Taurocholic acid 53.768 มิลลิกรัม ละลายในบัฟเฟอร์ 10 มิลลิลิตร
5. ปิเปตต์สารละลายไมเซลล์ใส่ขวดแก้วขวดเล็กกันแบนขวดละ 500 ไมโครลิตร
6. นำไประเหยแห้งด้วยใช้ก๊าซไนโตรเจน
7. เมื่อแห้งแล้วให้เติมสารละลายบัฟเฟอร์ที่ผสม Taurocholic acid แล้ว หลอดละ 475 ไมโครลิตร
8. นำไป Sonicated ด้วยเครื่อง ultrasonic cleanser เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน
9. ใส่สารสกัดส้มโอที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 25 ไมโครลิตร แล้วนำสารที่ได้ไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
10. นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 16,000 rpm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
11. ปิเปตต์สารละลายชั้นบนออกมา 10 ไมโครลิตร แล้วใส่ color reagent 1มิลลิลิตร (ชุด Test Kit Cholesterol liquicolor) แล้วปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
12. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 nm
13. คำนวณหา % การยับยั้งการดูดซึมคอเลสเทอรอล จากสูตร

$$\% \text{ การยับยั้งการดูดซึม} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง(C)} - \text{ค่าการดูดกลืนแสง(T)} \times 100}{\text{ค่าการดูดกลืนแสง(C)}}$$

โดยที่ ค่าการดูดกลืนแสง control (C) คือ ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อไม่มีตัวยับยั้ง (มี DMSO)
ค่าการดูดกลืนแสง test (T) คือ ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อมีตัวยับยั้ง (มีสารสกัดจากส้มโอ)

วิธีการทดสอบความสามารถของสารสกัดในการจับกับกรดน้ำดี

วิธีการทดสอบทำตามเทคนิคของ Ngamukote et al., 2011

1. เตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เตรียมสารละลายสารสกัดส้มโอ ที่ความเข้มข้นต่างๆ
2. เตรียมกรดน้ำดี (Bile Acid) ได้แก่ Taurocholic Acid Glycodeoxycholic Acid Taurodeoxycholic Acid ในความเข้มข้น 2mM ใช้ PBS เป็นตัวทำละลาย
3. ปิเปตสารละลายสารสกัดส้มโอ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร สารละลาย Bile acid ปริมาตร 100 ไมโครลิตรและสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 800 ไมโครลิตรลง หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร
4. นำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที
5. กรองผ่าน filter ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2 μm แล้วจากนั้น นำมาทดสอบปริมาณของกรดน้ำดีที่ หลุดจากการจับกับสารสกัด โดยใช้ชุด Bio Quant [Total Bile Acid Assay Kit (Colorimetric)] และนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 540 nm
6. คำนวณหาค่าความเข้มข้นของ bile acid และ % การยับยั้งการดูดซึมจากสูตร

$$\text{Bile Acid (umole/L)} = \frac{\Delta \text{ค่าการดูดกลืนแสง Sample}}{\Delta \text{ค่าการดูดกลืนแสง Standard}} \times \text{Standard (35 umole/L)}$$

7. คำนวณหา %การจับกรดน้ำดี จากสูตร

$$\% \text{ การจับกับกรดน้ำดี} = \frac{\text{ความเข้มข้น bile acid (C)} - \text{ความเข้มข้น (T)} \times 100}{\text{ความเข้มข้น (C)}}$$

โดยที่ ความเข้มข้น bile acid (C) คือ ความเข้มข้น bile acid เมื่อไม่มีตัวยับยั้ง (มี DMSO)
ความเข้มข้น bile acid (T) คือ ความเข้มข้น bile acid เมื่อมีตัวยับยั้ง (มีสารสกัดจากส้มโอ)

การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อน

วิธีการทดสอบทำตามเทคนิคของ Sugiyama et al., 2007

1. เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ โดยใช้ 13 mM Tris-HCl 150 mM NaCl และ 1.3 mM CaCl_2 pH 8.0
2. เตรียมสารสกัดส้มโอที่ความเข้มข้นต่างๆ
3. ละลาย Porcine Pancreatic lipase ละลายในบัฟเฟอร์ ให้ได้ความเข้มข้น 50 ยูนิต/ลิตร
4. นำ 0.1 mM 4-Methylumbelliferyl oleate (4-MU) solution ละลายในบัฟเฟอร์ จากนั้น
ปิเปตสารละลายมา 2.21 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์จนครบ 25 มิลลิลิตร
5. ทำการทดลองโดยใช้สารสกัดจากส้มโอแต่ละสายพันธุ์เป็นตัวยับยั้ง โดยปิเปตสารลงในหลอดทดลอง
ดังตาราง

ปริมาตรที่ใช้ (ไมโครลิตร)	สารสกัด	เอนไซม์	สารละลาย 4-MUO	DMSO	สารละลาย บัฟเฟอร์
Control (E)	-	25	50	5	20
Control Blank (EB)	-	-	50	5	45
Sample (T)	5	25	50	-	20
Sample Blank (TB)	5	-	50	-	45

6. ตั้งทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
7. ปิเปต 0.1 M Sodium citrate (pH 4.2) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรเป็นตัวหยุดปฏิกิริยา
8. จากนั้นนำไปวัดปริมาณ 4-methylumbelliferone โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงจากฟลูออเรสเซนซ์
ที่อัตราส่วน 355 nm และ 460 nm
9. คำนวณหาค่า % Enzyme inhibition

$$\% \text{ Enzyme inhibition} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง (E-EB)} - \text{ค่าการดูดกลืนแสง (T-TB)} \times 100}{\text{ค่าการดูดกลืนแสง(E-EB)}}$$

ค่าการดูดกลืนแสง (E)	คือ	ค่าการดูดกลืนแสงของ Total enzyme activity
ค่าการดูดกลืนแสง (EB)	คือ	ค่าการดูดกลืนแสงของ Blank
ค่าการดูดกลืนแสง (T)	คือ	ค่าการดูดกลืนแสงของ Enzyme inhibitor
ค่าการดูดกลืนแสง (TB)	คือ	ค่าการดูดกลืนแสงของ Inhibitor Blank

การยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาไกลเคชั่น

วิธีการทดสอบทำตามเทคนิคของ Adisakwattana et al., 2012

1. นำสารละลายเนื้อสมอง 5 ความเข้มข้น ผสมกับ BSA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 500 mM น้ำตาลฟรุกโทสในสารละลาย phosphate buffered-saline pH 7.4 ที่มี 0.02% sodium azide ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
2. ตั้งปฏิกิริยาเป็นระยะเวลา 7, 14, 21, และ 28 วัน ทำการวัดการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนซ์โดยเครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น excitation wavelength = 355 nm และ emission wavelength = 460 nm
3. คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดไกลเคชั่น

การตรวจปริมาณ Fructosamine

วิธีการทดสอบทำตามเทคนิคของ Johnson et al., 1983

1. นำตัวอย่างที่ได้จากแต่ละอาทิตย์มาวิเคราะห์ amadori products ที่เกิดขึ้นทั้งหมด
2. นำสารตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย 100 ไมโครลิตรของสารละลาย NBT reagent (0.5 mM NBT ในสารละลายบัฟเฟอร์ sodium carbonate เข้มข้น 0.2 M pH 10.4) ลงในตัวอย่าง
3. ตั้งให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 530 nm ภายหลังทำปฏิกิริยา โดยวัดที่ 10 และ 15 นาที
4. วัดผลต่างของความยาวคลื่นที่เวลาทั้งสอง
5. คำนวณความเข้มข้นของ fructosamine โดยใช้สารละลาย 1-deoxy-1-morpholino-D-fructose (DMF)

การตรวจหาปริมาณโครงสร้าง β -amyloid

วิธีการทดสอบทำตามเทคนิคของ LeVine et al., 1999

1. นำสารตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร มาเติม 32 μ M thioflavin T ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใน 0.1 M PBS, pH 7.4
2. ตั้งปฏิกิริยาเป็นเวลา 60 นาที ทำการวัดการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนซ์โดยเครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น excitation ที่ 435 nm และ emission ที่ 485 nm

การตรวจปริมาณ Protein carbonyl

วิธีการทดสอบทำตามเทคนิคของ Ardestani et al., 2007

1. นำสารตัวอย่างในแต่ละสัปดาห์เติม 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับ 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH)
2. ตั้งปฏิกิริยาเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติม 2.5 M HCl ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และตามด้วย 20% (w/v) ของ trichloroacetic acid ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แช่วสารละลายในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที
3. นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
4. ทำการตกตะกอนซ้ำในข้อที่ 2 จากนั้นนำตะกอนที่ได้ขึ้นมาเติมล้างด้วย 2 ml ของ ethanol/ethyl acetate (1:1, v/v) 3 ครั้ง และละลายลงใน 0.25 มิลลิลิตร ของ guanidine hydrochloride (6 M) นำไปอ่านความยาวคลื่นที่ 370 nm คำนวณ Protein carbonyl โดยใช้ $\epsilon = 2.2 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ผลการแสดงเป็น nmol/mg protein

การตรวจปริมาณ Thiol groups

วิธีการทดสอบทำตามเทคนิคของ Ellman, 1959

1. นำสารละลายตัวอย่างในแต่ละสัปดาห์ปริมาตร 70 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับ 2.5 mM 5,5-dithiobisnitro benzoic acid (DTNB) ปริมาตร 130 ไมโครลิตร เป็นเวลา 15 นาที
2. วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 410 nm ปริมาณ free thiol ในตัวอย่างตรวจวัดโดยทำกราฟมาตรฐานเปรียบเทียบกับ L-cysteine

การวัดปริมาณ CML

นำสารละลายจากสัปดาห์สุดท้ายของการศึกษา มาตรวจ N^ε-(carboxymethyl)lysine หรือ CML ซึ่ง advanced glycation end products โดยใช้ชุดตรวจสอบใช้หลักการ ELISA ของ Oxiselect® คำนวณปริมาณ CML เจือจางสารละลายให้มีความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ที่ 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ประมาณ 10,000 เท่า จากนั้นนำสารละลายที่เจือจางแล้วปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเติมใน 96-well plate ซึ่งมีตัวยึดเกาะอยู่ อย่างน้อย 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS และเติม diluent 200 ไมโครลิตร และตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยา 2 ชั่วโมงที่ อุณหภูมิห้อง ล้างด้วยบัฟเฟอร์อีกสามครั้งและเติม antibody 100 ไมโครลิตร โดยตั้งทิ้งไว้ให้ทำปฏิกิริยา 1 ชั่วโมง และเติมด้วย 100 ไมโครลิตร ของ secondary antibody-HRP และ substrate solution 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 450 nm และคำนวณความเข้มข้นของ CML-BSA โดยใช้สารละลายมาตรฐานที่มากับชุดตรวจ

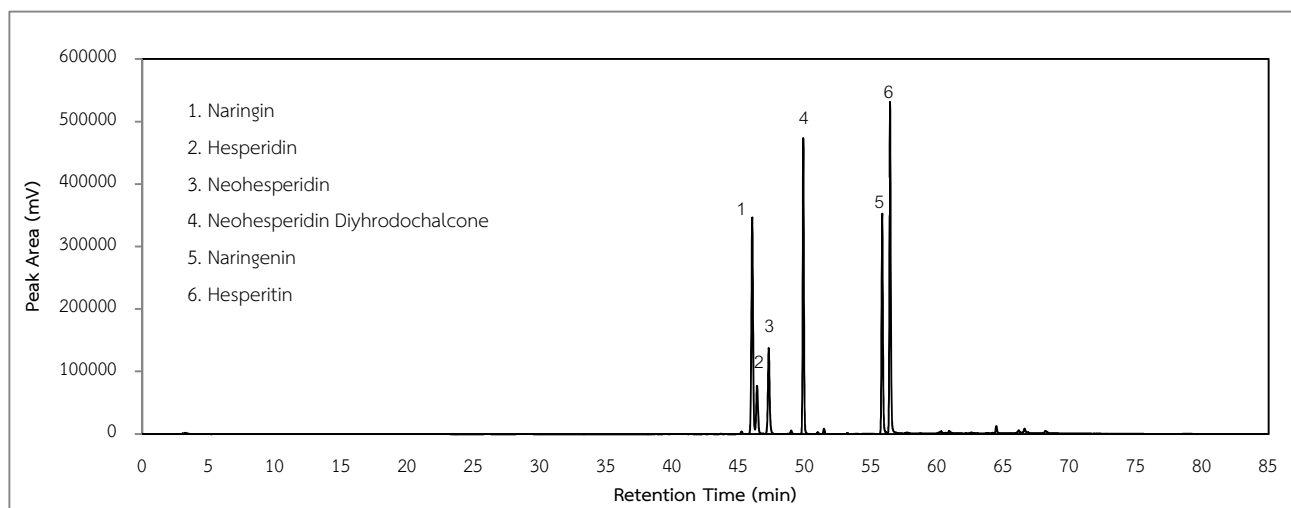
สถิติที่ใช้ในการวิจัย

คำนวณค่า IC_{50} จากการพลอตกราฟระหว่าง %การยับยั้งเอนไซม์ กับ ความเข้มข้นของสารสกัดการเปรียบเทียบความแตกต่างทางนัยสำคัญทางสถิติ ใช้ One Way ANOVA และใช้ post hoc Tukey's range test เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่ม ความเชื่อมั่นที่ $P < 0.05$

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การวิเคราะห์ปริมาณสารพฤกษเคมีในสารสกัดจากเนื้อส้มโอโดยใช้ HPLC

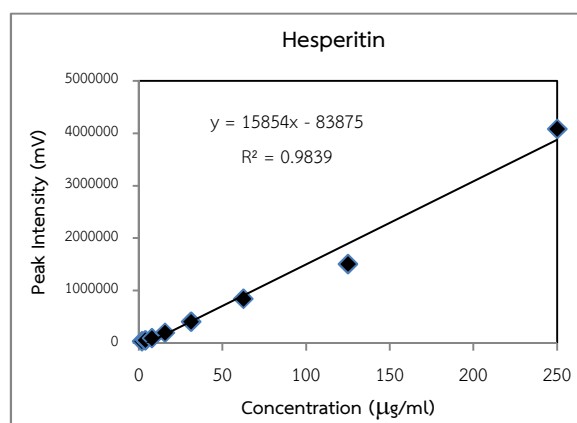
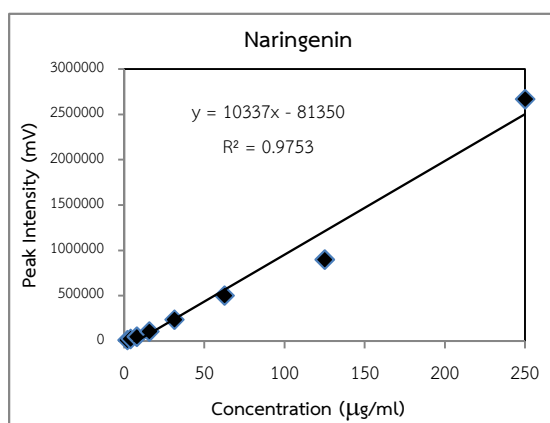
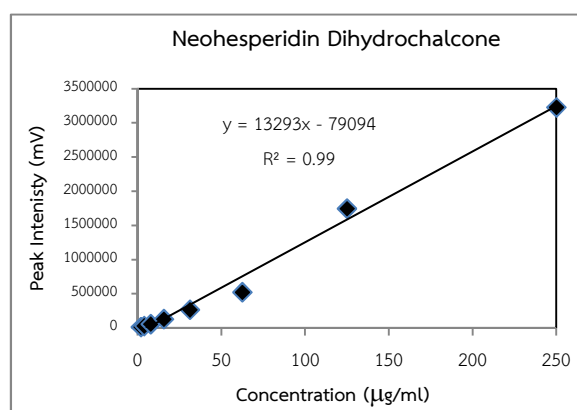
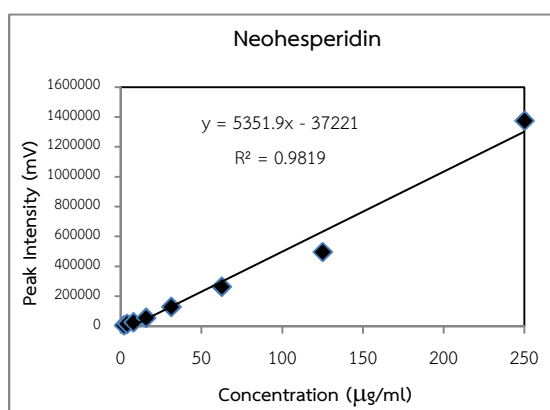
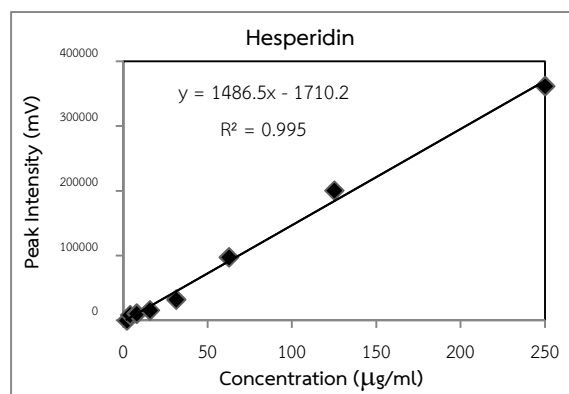
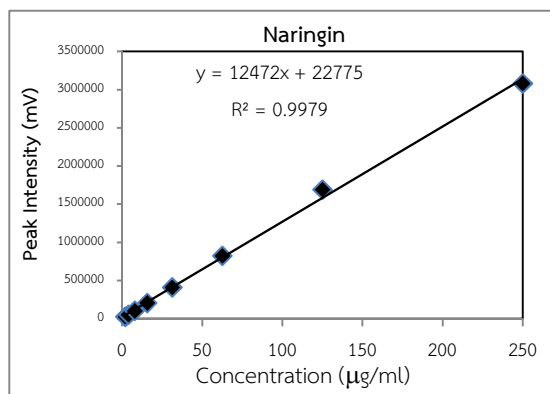
รูปที่ 3 แสดงโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานฟลาโวนอยด์ทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ naringin hesperidin neohesperidin neohesperidin dihydrochalcone naringenin และ hesperitin จากผลการทดลองพบว่าสารฟลาโวนอยด์ที่แยกออกมาจากคอลัมน์ชนิดแรกได้ คือ naringin และลำดับสุดท้ายคือ hesperitin



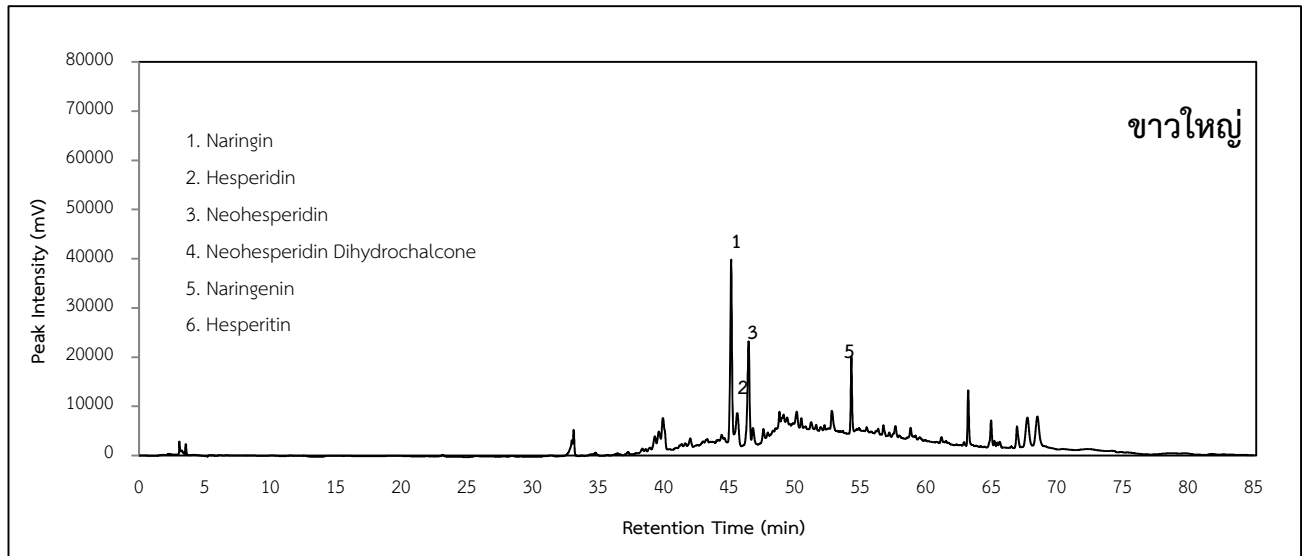
รูปที่ 3 โครมาโตแกรมของสารฟลาโวนอยด์ 6 ชนิดที่ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการวิเคราะห์สารสกัดจากเนื้อส้มโอพบสารพฤกษเคมีที่มีความหลากหลาย สามารถวิเคราะห์สารพฤกษเคมีในกลุ่มของฟลาโวนอยด์ได้ทั้งสิ้น 6 ชนิด ซึ่งแต่ละสายพันธุ์พบสารดังกล่าวในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 1 สายพันธุ์ขาวแตงกวามีปริมาณ naringin มากที่สุด สายพันธุ์ท่าข่อยมีปริมาณ neohesperidin มากที่สุด และสายพันธุ์ขาวน้ำผึ้งมีปริมาณ naringenin มากที่สุด

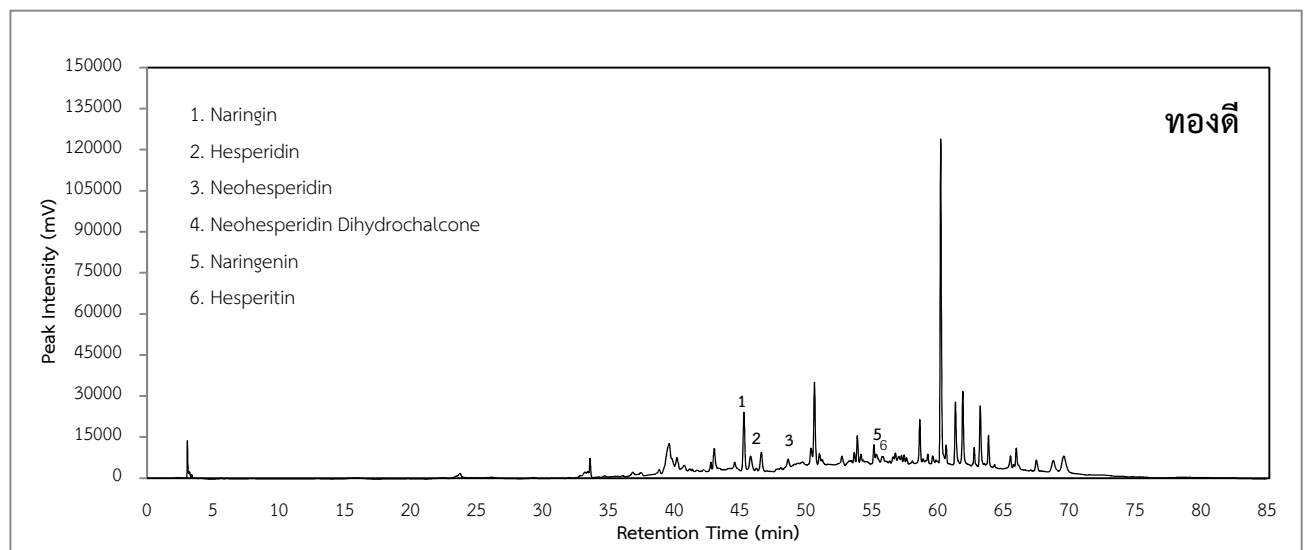
ส้มโอเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางในตระกูลเดียวกับส้ม ซึ่งพบสารพฤกษเคมีที่มีความหลากหลาย โดยเฉพาะสารพฤกษเคมีในกลุ่มของฟลาโวนอยด์ ที่ใช้เป็นสารละลายมาตรฐาน รายงานวิจัยพบว่า naringin และ naringenin มักเป็นสารพฤกษเคมีที่พบมากในเนื้อของส้มโอ (Kim et al., 2009; Zhang et al., 2011) จากงานวิจัยในครั้งนี้พบว่าการสกัดเนื้อส้มโอด้วยเมทานอลและใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟีในการแยกสารจำพวกกรดอินทรีย์และน้ำตาลทิ้งไป สามารถตรวจวัดสารพฤกษเคมีทั้ง naringin neohesperidin และ naringenin ได้เช่นกัน การใช้เทคนิคทาง HPLC สามารถนำไปประยุกต์เพื่อตรวจสอบเอกลักษณ์ของสารสกัดจากเนื้อส้มโอได้นั่นเอง



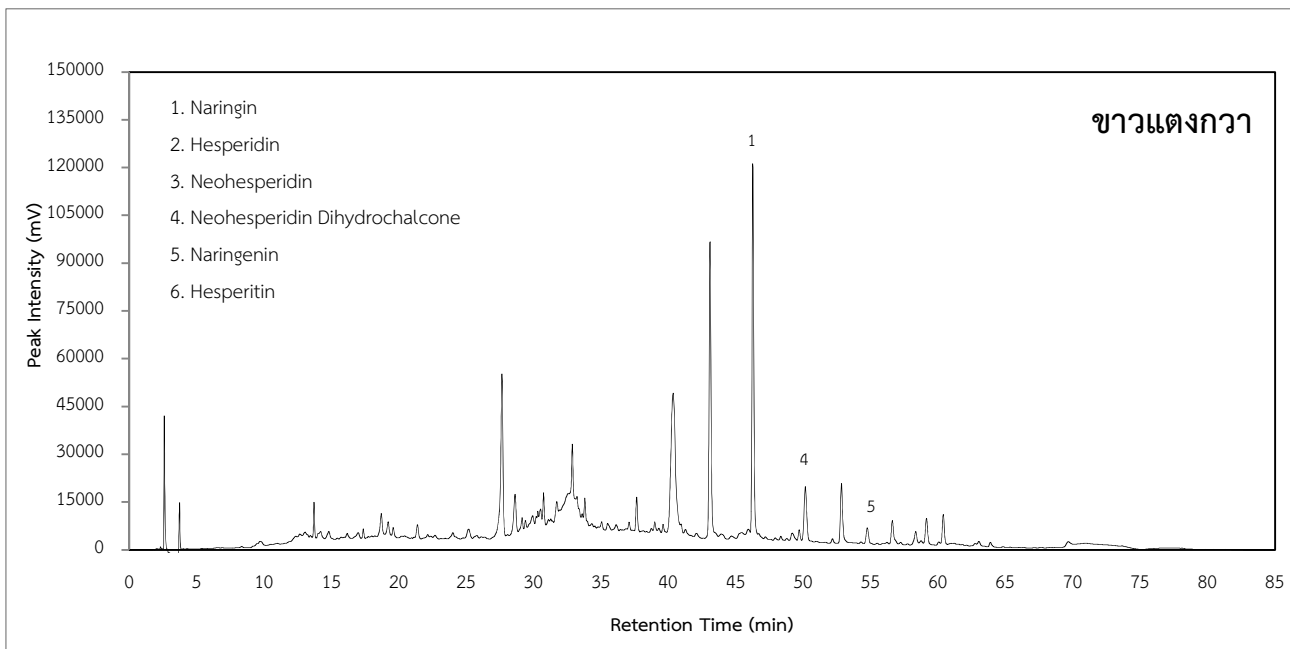
รูปที่ 4 กราฟมาตรฐานของฟลาโวนอยด์ 6 ชนิดที่ความเข้มข้น 1.95-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



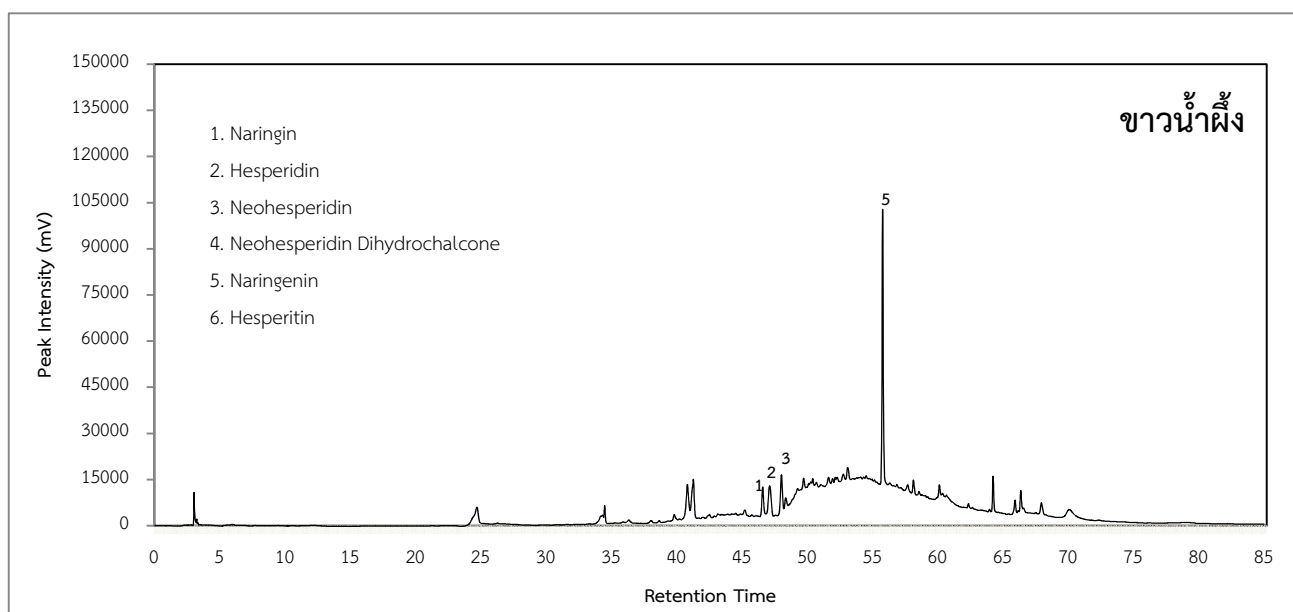
รูปที่ 5 โครมาโตแกรมของส้มโอสายพันธุ์ชาวใหญ่



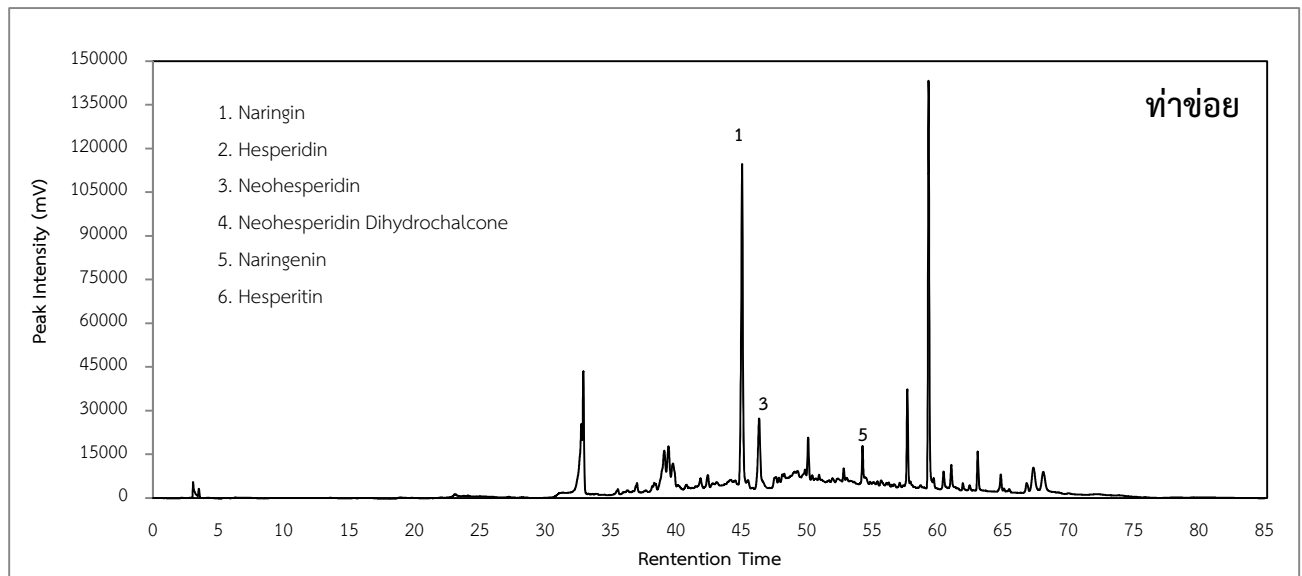
รูปที่ 6 โครมาโตแกรมของส้มโอสายพันธุ์ทองดี



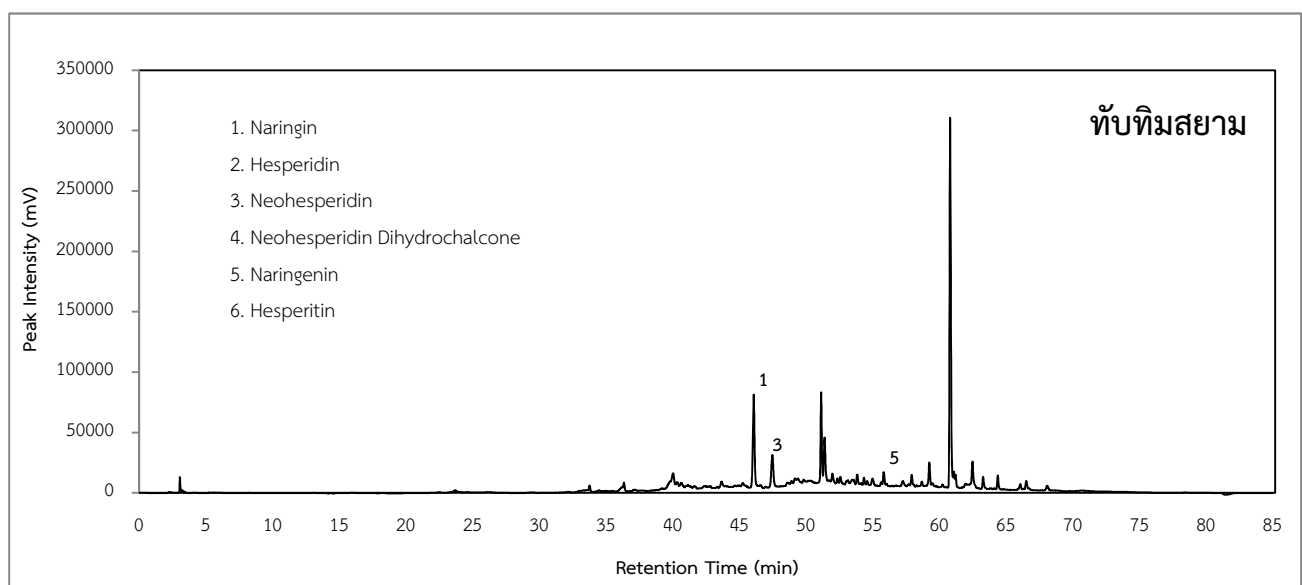
รูปที่ 7 โครมาโตแกรมของส้มโอสายพันธุ์ชาวแตงกวา



รูปที่ 8 โครมาโตแกรมของส้มโอสายพันธุ์ชาวน้ำผึ้ง



รูปที่ 9 โครมาโตแกรมของส้มโอสายพันธุ์ทำข่อย



รูปที่ 10 โครมาโตแกรมของส้มโอสายพันธุ์ทับทิมสยาม

ตารางที่ 1 ปริมาณสารพฤกษเคมีในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบในสารสกัดจากเนื้อส้มโอ

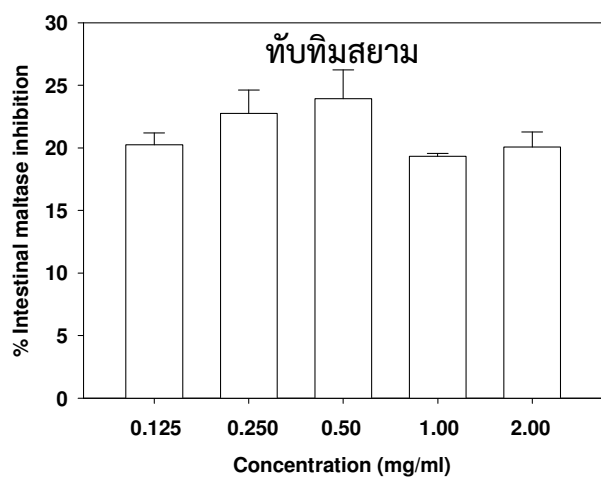
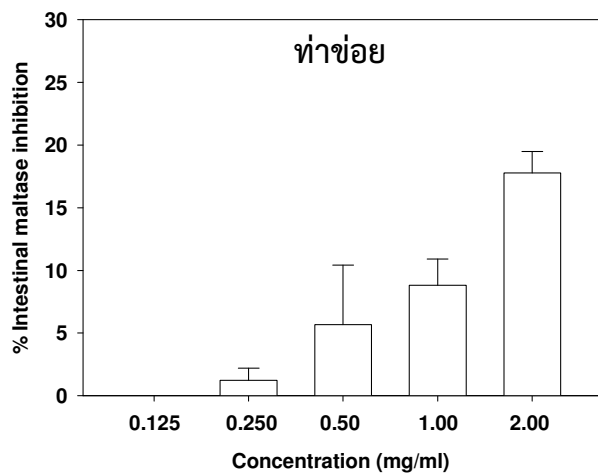
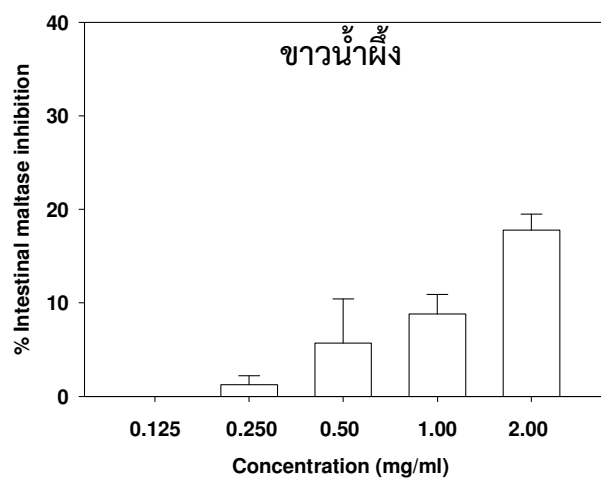
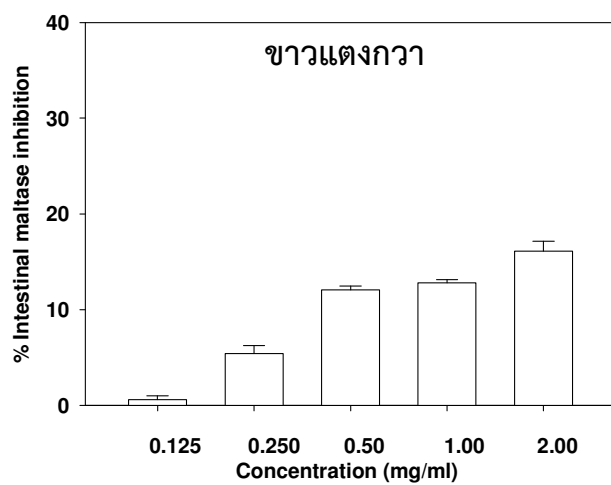
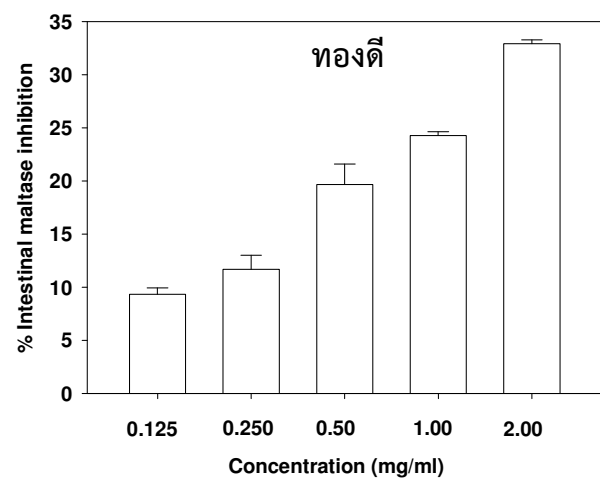
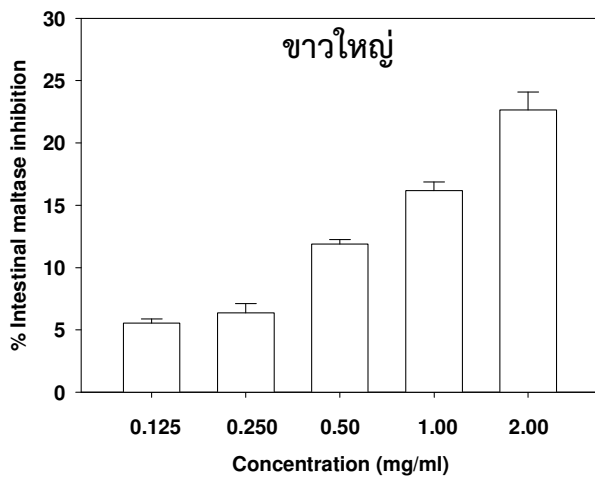
ปริมาณฟลาโวนอยด์ (ไมโครกรัม / มิลลิกรัมสารสกัด)						
ฟลาโวนอยด์	สายพันธุ์					
	ท่าช้อย	ขาวน้ำผึ้ง	ขาวแตงกวา	ทองดี	ทับทิมสยาม	ขาวใหญ่
Naringin	41.29 ± 0.43	2.34 ± 0.11	81.29 ± 0.39	8.13 ± 0.13	26.31 ± 0.44	11.90 ± 0.21
Hesperidin	ND	22.78 ± 0.33	ND	10.08 ± 0.12	ND	12.04 ± 0.12
Neohesperidin	36.79 ± 0.25	14.76 ± 0.15	ND	10.76 ± 0.03	29.92 ± 0.18	25.4 ± 0.12
Neohesperidin Dihydrochalcone	ND	ND	24.54 ± 0.66	ND	ND	ND
Naringenin	7.39 ± 0.15	29.52 ± 0.40	24.47 ± 0.98	10.89 ± 0.15	7.40 ± 0.04	9.20 ± 0.19
Hesperitin	ND	ND	4.79 ± 0.10	3.13 ± 0.01	ND	ND

รายงานผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean±SEM) จำนวนครั้งในการวิเคราะห์ เท่ากับ 3 ND = ไม่สามารถตรวจวัดได้

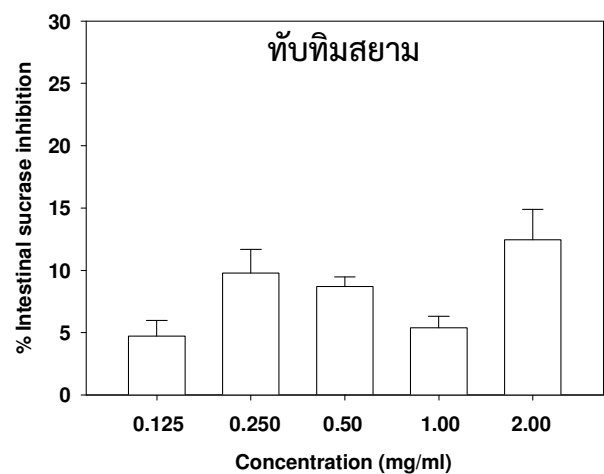
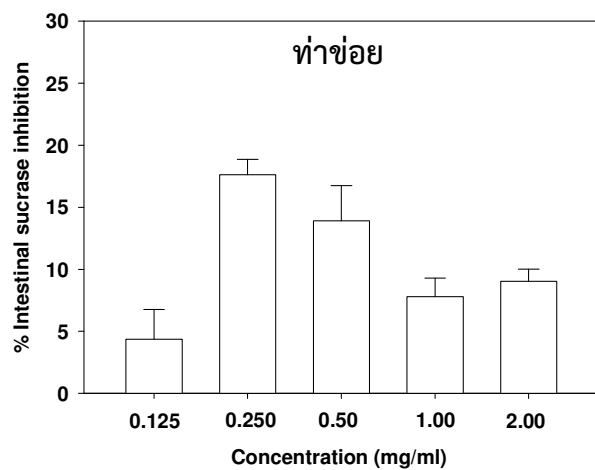
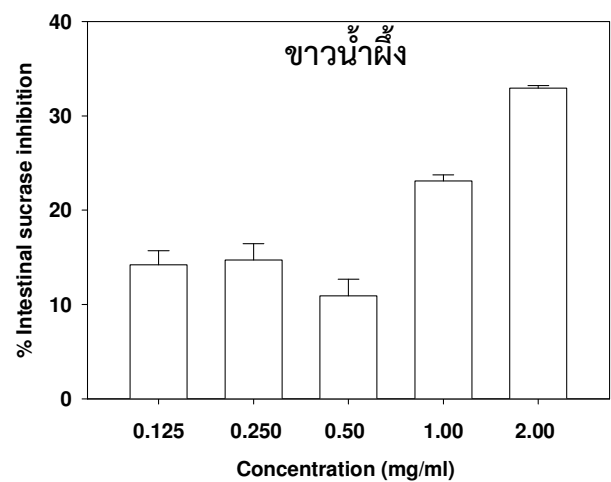
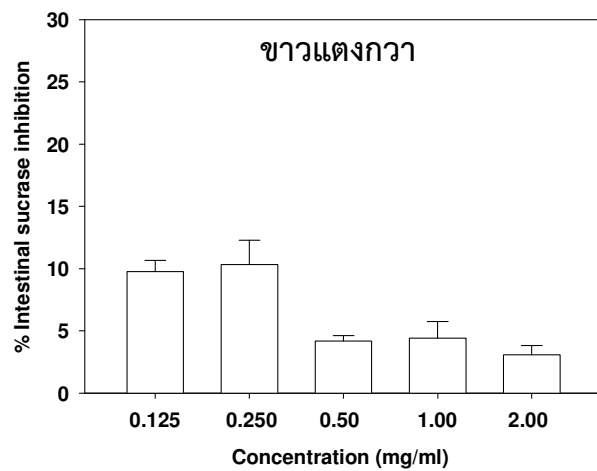
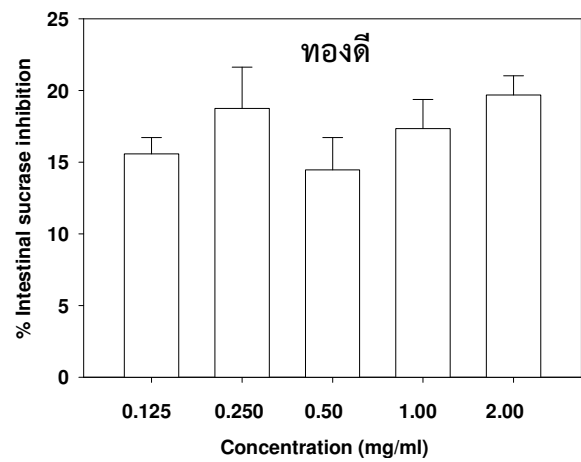
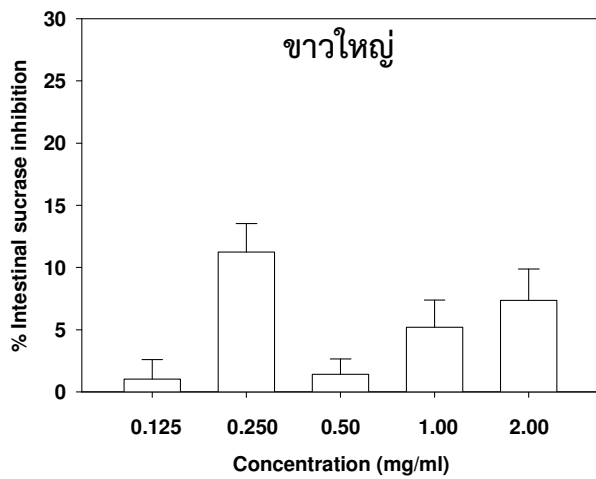
2. การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-กลูโคซิเดสและอัลฟา-อะไมเลสของสกัดจากเนื้อส้มโอ

พบว่าสารสกัดส้มโอสายพันธุ์ต่างๆมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-กลูโคซิเดสทั้งมอลเตสและซูเครสค่อนข้างต่ำ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นสูงขึ้นจนถึง 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-กลูโคซิเดสนั้นไม่เกิน 30% ในขณะเดียวกันการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสจากตับอ่อนนั้นมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานในระดับค่อนข้างต่ำเช่นเดียว (รูปที่ 11-13) เมื่อเปรียบเทียบกับยาอะคาร์โบส (รูปที่ 14) พบว่าสารสกัดส้มโอมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-กลูโคซิเดสทั้งมอลเตสและซูเครส รวมถึงอัลฟา-อะไมเลสที่ต่ำ

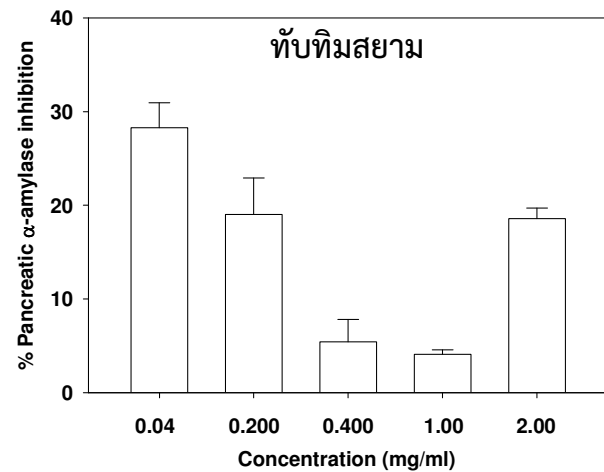
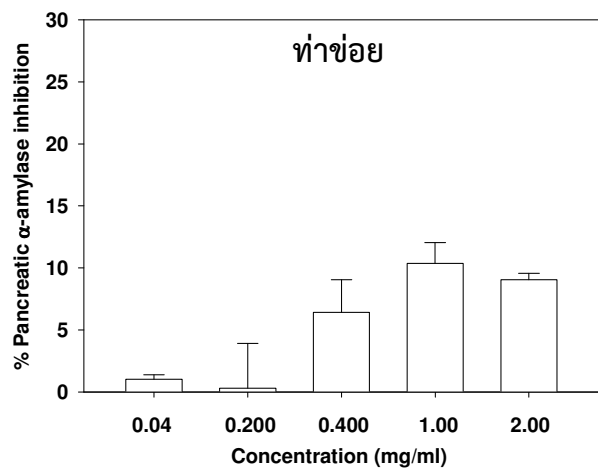
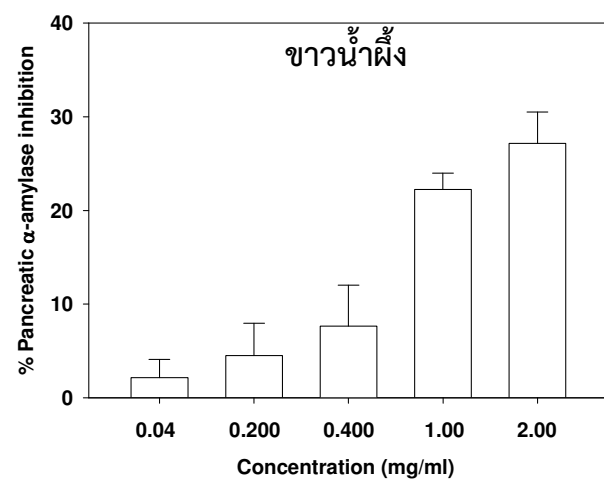
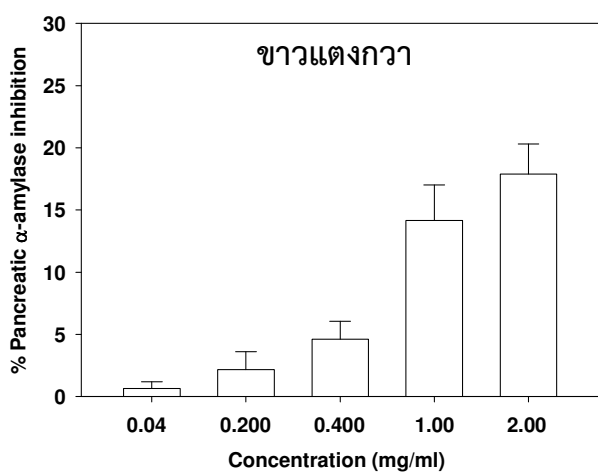
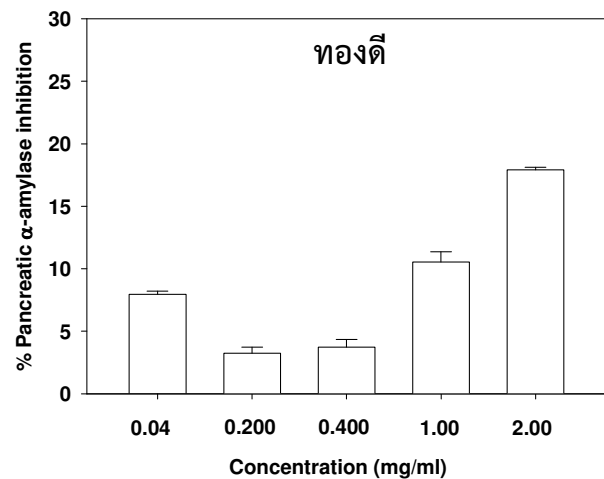
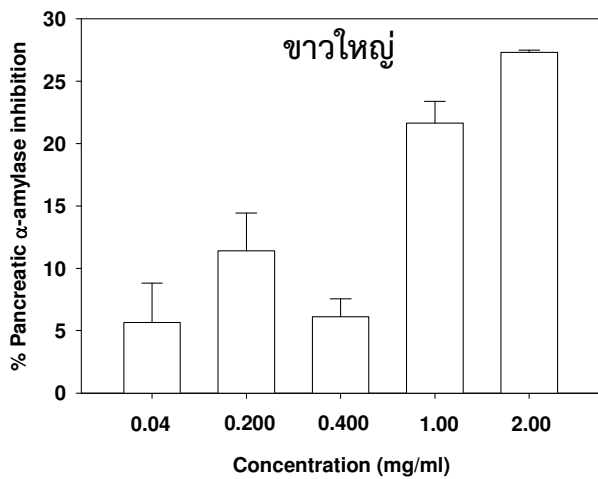
การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-กลูโคซิเดสและเอนไซม์อัลฟา-อะไมเลส ช่วยให้กระบวนการย่อยคาร์โบไฮเดรตให้กลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส ฟรุคโตส ซ้ำลง (Adisakwattana et al., 2009) ส่งผลให้ระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดของผู้ป่วยเบาหวานหลังรับประทานอาหารนั้นไม่สูงขึ้นในทันที มีการศึกษาพบว่า การชะลอการเพิ่มขึ้นของน้ำตาลกลูโคสภายหลังจากรับประทานอาหารช่วยลดการเพิ่มขึ้นของน้ำตาลกลูโคสสะสม เช่น HbA1C ในผู้ป่วยเบาหวานได้ การชะลอกระบวนการย่อยคาร์โบไฮเดรตในผู้ป่วยเบาหวานจึงเป็นแนวทางหนึ่งในการป้องกันโรคแทรกซ้อนที่ตามมาในผู้ป่วยเบาหวานได้ ฟลาโวนอยด์เป็นสารพฤกษเคมีที่มีรายงานการศึกษาถึงฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-กลูโคซิเดสและเอนไซม์อัลฟา-อะไมเลส มีรายงานวิจัยที่กล่าวถึงการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเนื้อส้มโอที่ปลูกในเกาะเซจู ประเทศเกาหลีใต้ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-กลูโคซิเดสและเอนไซม์อัลฟา-อะไมเลส พบว่ามีฤทธิ์ค่อนข้างต่ำ แต่เมื่อทำการหมัก microbial enzyme (*A. saitoi*) ทำให้สารสำคัญที่พบในสารสกัดเนื้อส้มโอ เปลี่ยนสภาพโครงสร้างไปทำให้มีฤทธิ์ในการต้านการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-กลูโคซิเดสและเอนไซม์อัลฟา-อะไมเลส รวมถึงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้น (Kim et al., 2009) จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า สารสกัดจากเนื้อส้มโอมีประสิทธิภาพในการต้านการทำงานของอัลฟา-กลูโคซิเดสและเอนไซม์อัลฟา-อะไมเลสในระดับที่ค่อนข้างต่ำ หากจำเป็นต้องพัฒนาสารสกัดจากเนื้อส้มโอไปสู่สารเสริมสุขภาพเพื่อวัตถุประสงค์ดังกล่าว อาจจำเป็นต้องใช้ microbial enzyme เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพต่อการต้านการทำงานของอัลฟา-กลูโคซิเดสและเอนไซม์อัลฟา-อะไมเลส อีกแนวทางหนึ่งในอนาคตคือ การประยุกต์ใช้สารสกัดเนื้อส้มโอร่วมกับยาอะคาร์โบส ซึ่งเป็นยาแผนปัจจุบันที่ใช้ควบคุมระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดของผู้ป่วยเบาหวาน มีรายงานการวิจัยที่กล่าวถึงสารพฤกษเคมีในกลุ่มฟลาโวนอยด์ เช่น แอนโธไซยานิน สามารถเสริมฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองชนิดเมื่อให้ร่วมกับยาอะคาร์โบส (Adisakwattana et al., 2011) ซึ่งเป็นหนทางหนึ่งที่ใช้สารพฤกษเคมีร่วมกับยาแผนปัจจุบัน และนำไปสู่การลดขนาดยาที่ใช้ เนื่องจากยาอะคาร์โบสอาจทำให้เกิดท้องอืด ท้องเฟ้อ ซึ่งเป็นอาการข้างเคียงที่พบได้เมื่อใช้ดังกล่าว ดังนั้นงานวิจัยในอนาคตอาจมุ่งเน้นถึงการศึกษาสารสกัดจากเนื้อส้มโอต่อการเสริมฤทธิ์กับยาอะคาร์โบส



รูปที่ 11ฤทธิ์ของสารสกัดเนื้อส้มโอต่อการต้านการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-กลูโคซิเดส (มอลเตส) ผลการทดลอง
รายงานในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean $\pm$ S.E.M) n = 3



รูปที่ 12ฤทธิ์ของสารสกัดเนื้อส้มโอต่อการต้านการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-กลูโคซิเดส (ซูเครส) ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean $\pm$ S.E.M) n = 3



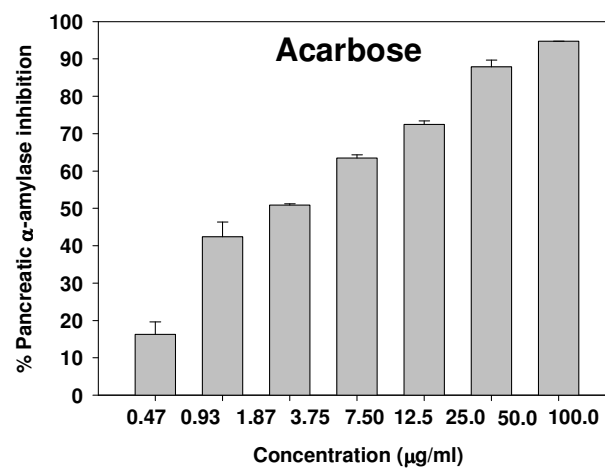
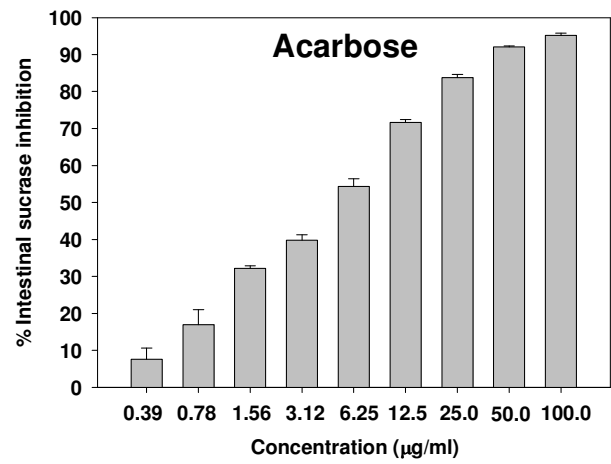
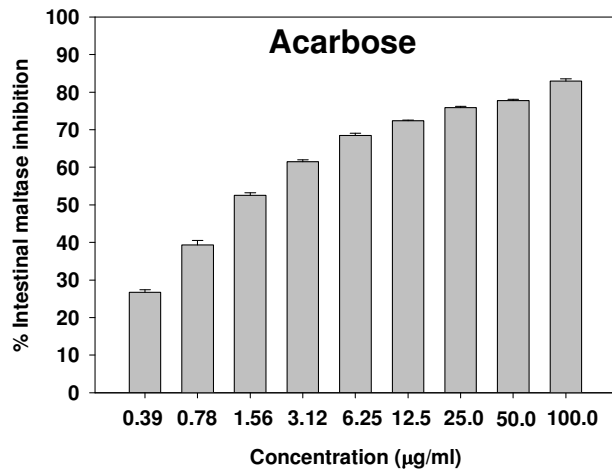
รูปที่ 13ฤทธิ์ของสารสกัดเนื้อส้มโอต่อการต้านการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-อะไมเลส ผลการทดลองรายงานในรูปแบบค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean $\pm$ S.E.M) n = 3

ตารางที่ 2 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มอลเตส ซูเครส และอัลฟา-อะไมเลสของสารสกัดจากเนื้อส้มโอ ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean $\pm$ S.E.M) n = 3

ความเข้มข้นของ สารสกัด (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	% การยับยั้งเอนไซม์มอลเตส					
	ขาวใหญ่	ทองดี	ขาวแดงกาว	ขาวน้ำผึ้ง	ท่าข่อย	ทับทิมสยาม
0.125	5.55 $\pm$ 0.31	9.34 $\pm$ 0.59	0.60 $\pm$ 0.40	-0.75 $\pm$ 2.71	-7.67 $\pm$ 0.86	20.24 $\pm$ 0.96
0.25	6.35 $\pm$ 0.77	11.69 $\pm$ 1.31	5.40 $\pm$ 0.86	8.49 $\pm$ 0.54	1.23 $\pm$ 0.97	22.75 $\pm$ 1.87
0.5	11.89 $\pm$ 0.36	19.65 $\pm$ 1.94	12.05 $\pm$ 0.42	15.83 $\pm$ 0.20	5.68 $\pm$ 4.74	23.93 $\pm$ 2.29
1	16.17 $\pm$ 0.69	24.27 $\pm$ 0.37	12.81 $\pm$ 0.34	21.94 $\pm$ 1.71	8.82 $\pm$ 2.07	19.32 $\pm$ 0.23
2	22.66 $\pm$ 1.42	32.92 $\pm$ 0.37	16.11 $\pm$ 1.05	33.05 $\pm$ 1.73	17.76 $\pm$ 1.73	20.06 $\pm$ 1.21

ความเข้มข้นของ สารสกัด (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	% การยับยั้งเอนไซม์ซูเครส					
	ขาวใหญ่	ทองดี	ขาวแดงกาว	ขาวน้ำผึ้ง	ท่าข่อย	ทับทิมสยาม
0.125	-2.85 $\pm$ 1.63	15.59 $\pm$ 1.12	9.76 $\pm$ 0.91	14.20 $\pm$ 1.50	3.55 $\pm$ 1.67	4.72 $\pm$ 1.27
0.25	11.43 $\pm$ 2.20	18.74 $\pm$ 2.88	10.33 $\pm$ 1.96	14.71 $\pm$ 1.72	16.10 $\pm$ 2.19	9.79 $\pm$ 1.89
0.5	1.63 $\pm$ 1.06	14.47 $\pm$ 2.24	4.18 $\pm$ 0.43	10.92 $\pm$ 1.74	12.38 $\pm$ 2.35	8.70 $\pm$ 0.76
1	5.39 $\pm$ 2.01	17.35 $\pm$ 2.02	4.42 $\pm$ 1.34	23.09 $\pm$ 0.67	7.33 $\pm$ 1.91	5.39 $\pm$ 0.92
2	7.53 $\pm$ 2.59	19.68 $\pm$ 1.35	3.08 $\pm$ 0.75	32.96 $\pm$ 0.27	8.17 $\pm$ 1.09	12.45 $\pm$ 2.44

ความเข้มข้นของ สารสกัด (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	% การยับยั้งเอนไซม์อัลฟา-อะไมเลส					
	ขาวใหญ่	ทองดี	ขาวแดงกาว	ขาวน้ำผึ้ง	ท่าข่อย	ทับทิมสยาม
0.125	5.56 $\pm$ 3.13	7.94 $\pm$ 0.27	0.65 $\pm$ 0.53	2.14 $\pm$ 1.98	1.04 $\pm$ 0.36	28.28 $\pm$ 2.68
0.25	11.40 $\pm$ 3.03	3.24 $\pm$ 0.49	2.17 $\pm$ 1.44	4.51 $\pm$ 3.44	0.32 $\pm$ 3.59	19.02 $\pm$ 3.89
0.5	6.13 $\pm$ 1.43	3.74 $\pm$ 0.61	4.63 $\pm$ 1.42	7.65 $\pm$ 4.37	6.43 $\pm$ 2.61	5.42 $\pm$ 2.38
1	21.65 $\pm$ 1.74	10.54 $\pm$ 0.82	14.15 $\pm$ 2.87	22.23 $\pm$ 1.75	10.36 $\pm$ 1.69	4.07 $\pm$ 0.49
2	27.23 $\pm$ 0.17	17.91 $\pm$ 0.26	17.89 $\pm$ 2.40	27.15 $\pm$ 3.43	9.05 $\pm$ 0.51	18.59 $\pm$ 1.09



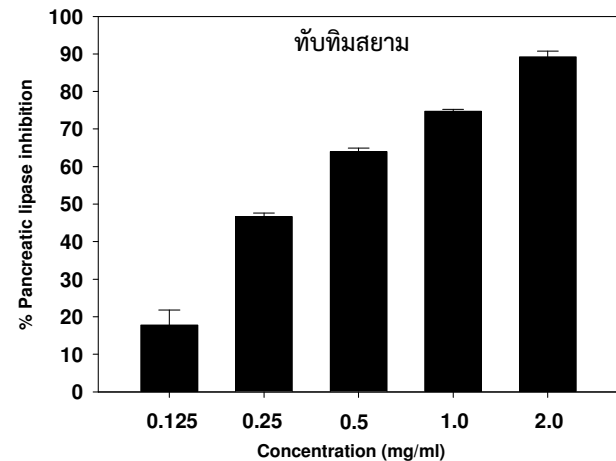
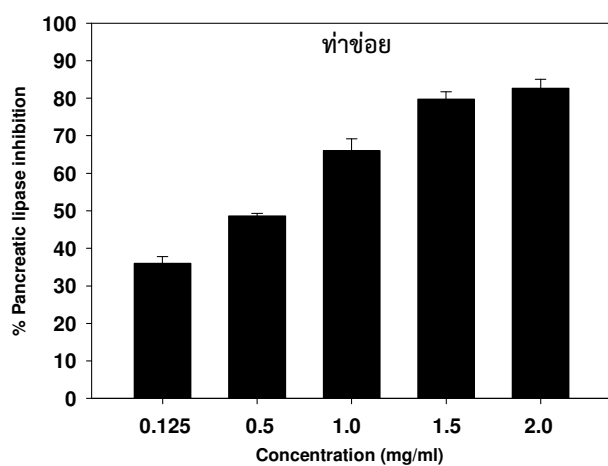
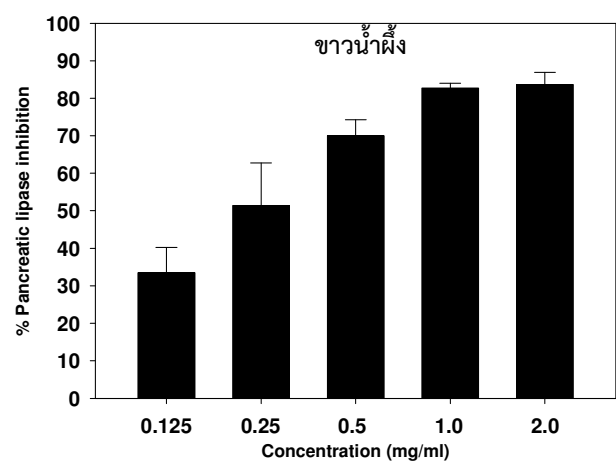
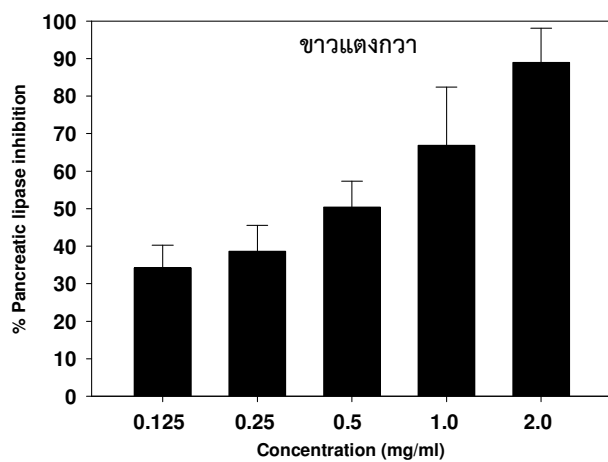
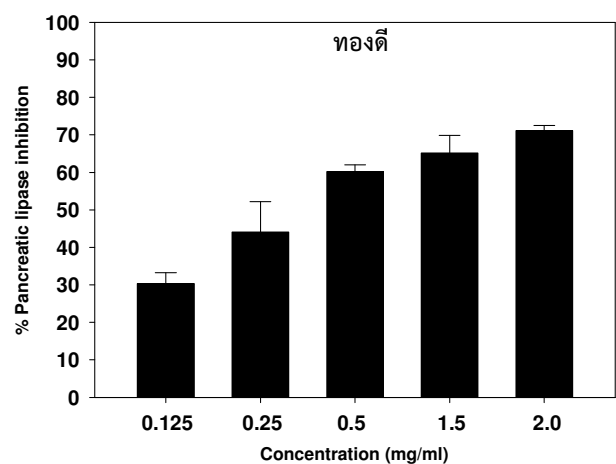
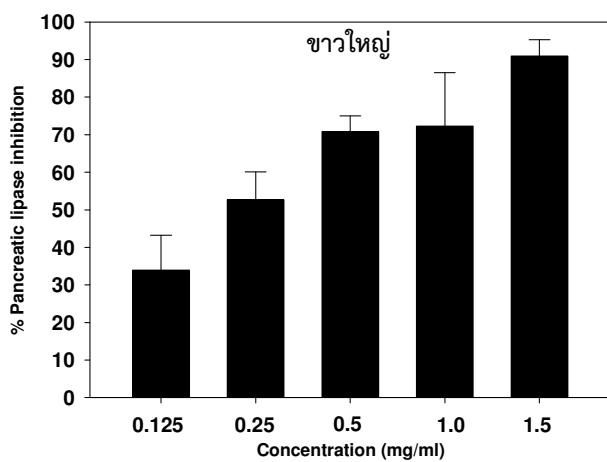
IC ₅₀ ของอะคาร์โบส (µg/ml)		
เอนไซม์มอลเตส	เอนไซม์ซูเครส	เอนไซม์อัลฟา-อะไมเลส
1.334 ± 0.049	4.644 ± 0.447	3.070 ± 0.302

รูปที่ 14ฤทธิ์ของยาอะคาร์โบสต่อการต้านการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-กลูโคซิเดสและอัลฟา-อะไมเลส และค่า IC₅₀ ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean ± S.E.M) n = 3

3. การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสของสกัดจากเนื้อส้มโอ

จากการทดลองการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนด้วยสารสกัดส้มโอพันธุ์สายพันธุ์ต่างๆ พบว่าการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนจะแปรผันตามความเข้มข้นของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทุกสายพันธุ์ ดังรูปที่ 15 โดยมีค่า IC_{50} ตามตารางที่ 3 โดยมีส้มโอขาวน้ำผึ้ง ทองดี และขาวแตงกวาที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสได้ดี จากการทดลองการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนด้วยยาอริสแตท (orlistat) แสดงในรูปที่ 16 และตารางที่ 4 พบว่าการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อน จะแปรผันตามความเข้มข้นของยาอริสแตท เมื่อความเข้มข้นยิ่งมาก จะมีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แพนกรีเอติกไลเปสได้มากและความเข้มข้นของยาอริสแตท ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แพนกรีเอติกไลเปสได้ 50% คือ ความเข้มข้น 0.035 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามสารสกัดจากเนื้อส้มโอทั้ง 6 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไลเปสน้อยกว่ายาอริสแตท

การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนเป็นแนวทางหนึ่งในการชะลอการย่อยไขมันในกลุ่มของไตรกลีเซอไรด์ให้กลายเป็นกรดไขมันอิสระช้าลง จึงมีผลให้การดูดซึมกรดไขมันอิสระลดลง การสังเคราะห์ไขมันไตรกลีเซอไรด์ในกระแสเลือดจึงลดน้อยตาม (Birari et al., 2007) ดังนั้นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนจึงเป็นกลไกหนึ่งที่มีความสนใจในการค้นหาสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติหรือจากการสังเคราะห์ เพื่อใช้ในการควบคุมระดับไขมันในเลือด ซึ่งจะช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด (Sugiyama et al., 2007) รายงานการวิจัยที่ศึกษาในมะนาวซึ่งเป็นผลไม้ในตระกูลส้มพบว่า สารสกัดจากมะนาวสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปส (Sharma et al., 2005) Kawaguchi รายงานว่าพบว่ามีสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ เช่น hesperidin ที่สกัดจากเปลือกส้มสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อน (Kawaguchi et al., 1997) นอกจากนี้พบว่าสารสกัดชาเขียวที่มีฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบหลักหลายชนิด เช่น สารอีจีซีจี ((-)-Epigallocatechin 3-O-gallate (EGCG)) มีความสามารถในการต้านการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนได้เช่นเดียวกัน (Nakai et al., 2005) ในงานวิจัยยังกล่าวถึงสารพฤษเคมีที่โครงสร้างในลักษณะโพลีเมอร์ของสารในกลุ่มคาเทชิน (catechin) ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 903 และ 2,017 มีความสามารถในการต้านเอนไซม์ไลเปสมากที่สุด เมื่อพิจารณาจากความสัมพันธ์ของโครงสร้างของสารเคมีกับความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปส พบว่าสารพฤษเคมีที่มีหมู่ galloyl ภายในโครงสร้างจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานมากที่สุด ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าสารสกัดเนื้อส้มโอที่มีสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบนั้น อาจเป็นสารที่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อน

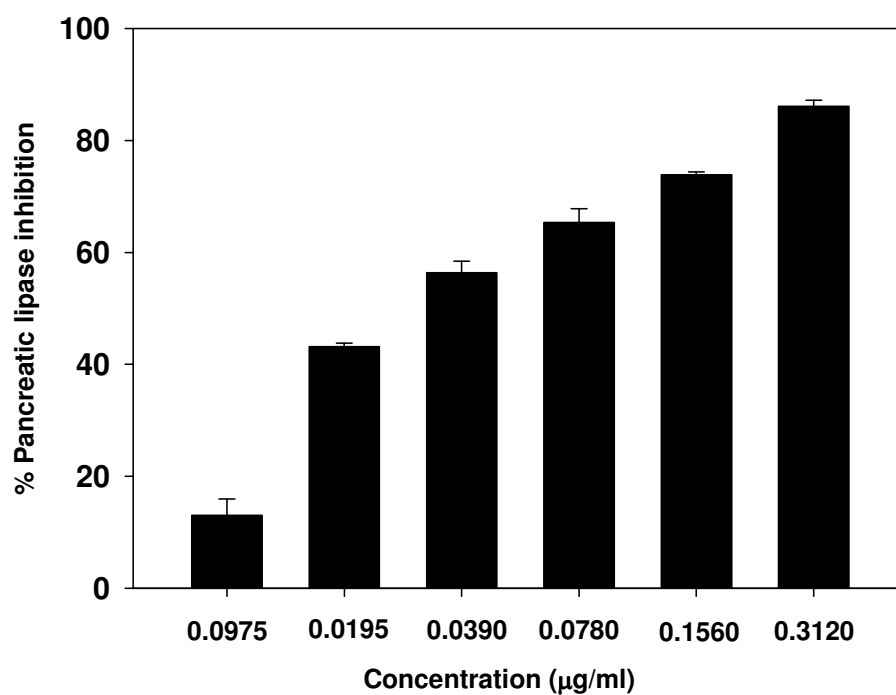


รูปที่ 15ฤทธิ์ของสารสกัดเนื้อส้มโอต่อการต้านการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อน ผลการทดลองรายงานในรูปแบบค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean $\pm$ S.E.M) n = 3

ตารางที่ 3 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสของสารสกัดจากเนื้อส้มโอ และค่า IC_{50} ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean $\pm$ S.E.M) n = 3

ความเข้มข้น ของสารสกัด	% การยับยั้งเอนไซม์ไลเปส					
	ขาวใหญ่	ทองดี	ขาวแตงกวา	ขาวน้ำผึ้ง	ท่าข่อย	ทับทิมสยาม
0.125	33.90 $\pm$ 9.29	37.99 $\pm$ 2.12	34.20 $\pm$ 6.03	33.53 $\pm$ 6.74	36.00 $\pm$ 1.77	17.77 $\pm$ 4.08
0.25	52.66 $\pm$ 7.48	48.68 $\pm$ 4.71	38.61 $\pm$ 6.95	51.38 $\pm$ 11.41	48.58 $\pm$ 0.72	46.73 $\pm$ 0.88
0.5	70.83 $\pm$ 4.20	60.09 $\pm$ 1.80	50.43 $\pm$ 6.89	70.05 $\pm$ 4.26	66.00 $\pm$ 3.18	64.00 $\pm$ 0.95
1	72.33 $\pm$ 14.23	66.01 $\pm$ 1.32	84.37 $\pm$ 3.57	82.71 $\pm$ 1.23	79.78 $\pm$ 1.94	74.76 $\pm$ 0.50
2	90.94 $\pm$ 4.35	71.15 $\pm$ 1.37	97.40 $\pm$ 1.30	83.63 $\pm$ 3.26	82.69 $\pm$ 2.36	89.27 $\pm$ 1.46

IC_{50} ของสารสกัดเนื้อส้มโอ (mg/ml)					
ขาวใหญ่	ทองดี	ขาวแตงกวา	ขาวน้ำผึ้ง	ท่าข่อย	ทับทิมสยาม
0.277 $\pm$ 0.048	0.262 $\pm$ 0.044	0.316 $\pm$ 0.081	0.252 $\pm$ 0.067	0.359 $\pm$ 0.024	0.340 $\pm$ 0.016



รูปที่ 16ฤทธิ์ของอริสเทท (orlistat) ต่อการต้านการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อน ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean $\pm$ S.E.M) $n = 3$

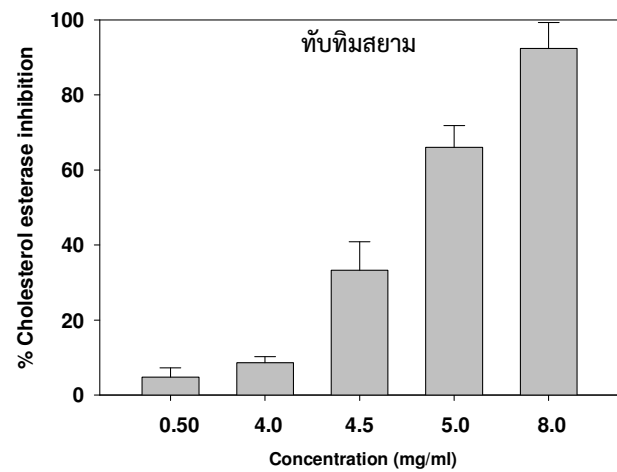
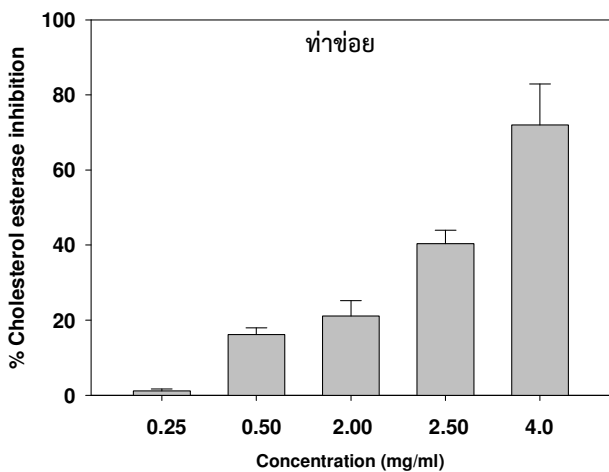
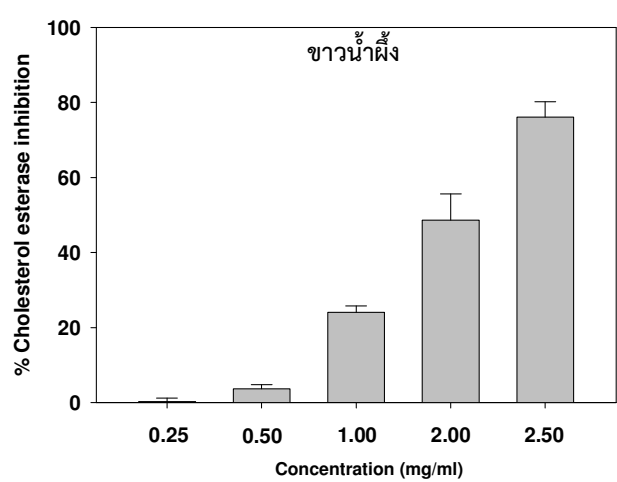
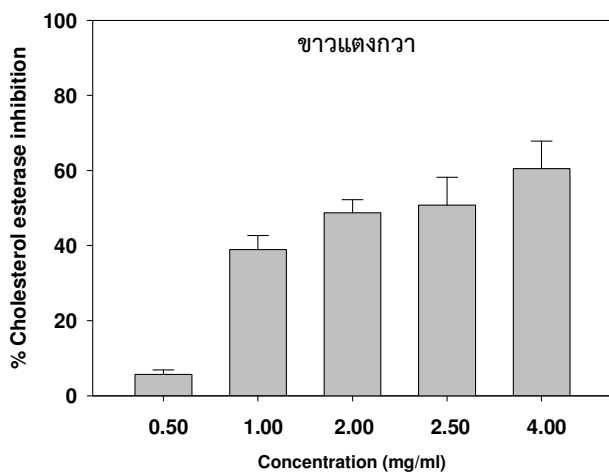
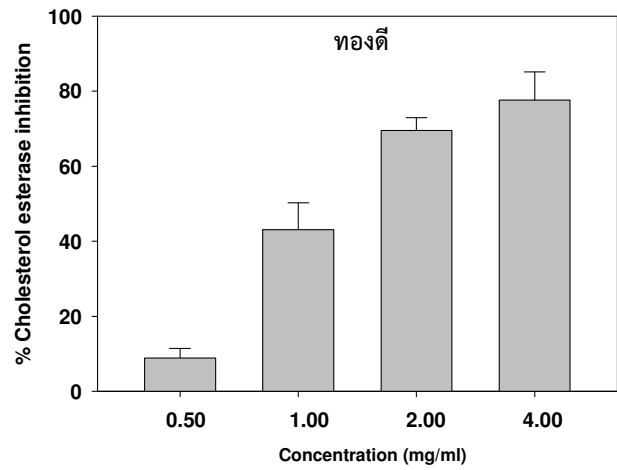
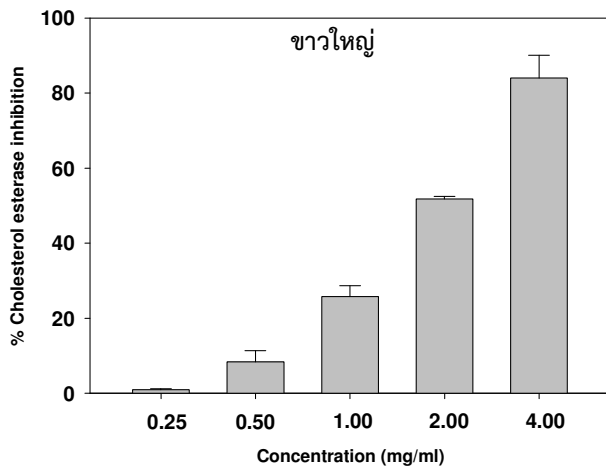
ตารางที่ 4 ฤทธิ์ของอริสเทท (orlistat) ต่อการต้านการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนและค่า IC_{50} ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean $\pm$ S.E.M) $n = 3$

ความเข้มข้นของยาอริสเทท	% การยับยั้งเอนไซม์ไลเปส
0.0975	13.05 $\pm$ 2.89
0.0195	43.16 $\pm$ 0.63
0.0390	56.35 $\pm$ 2.06
0.0780	65.33 $\pm$ 2.47
0.1560	73.88 $\pm$ 0.54
0.3120	86.12 $\pm$ 1.06
IC_{50} (µg/ml)	0.035 $\pm$ 0.002

4. การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอเลสเตอรอลเอสเทอร์เอสของสกัดจากเนื้อส้มโอ

จากการทดลองการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอเลสเตอรอลเอสเทอร์เอสด้วยสารสกัดส้มโอสายพันธุ์ต่างๆ พบว่าการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอเลสเตอรอลเอสเทอร์เอสจะแปรผันตามความเข้มข้นของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทุกสายพันธุ์ ดังรูปที่ 17 โดยมีค่า IC_{50} ตามตารางที่ 5 ซึ่งพบว่าสารสกัดจากเนื้อส้มโอสายพันธุ์ทองดีและขาวน้ำผึ้งมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอเลสเตอรอลเอสเทอร์เอสมากที่สุดโดยพิจารณาจากค่า IC_{50} และจากการทดลองการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอเลสเตอรอลเอสเทอร์เอสด้วยยาซิมวาสแตตินแสดงในรูปที่ 18 และตารางที่ 5 พบว่ายาดังกล่าวมีค่า IC_{50} น้อยกว่าสารสกัดจากเนื้อส้มโอ จึงเปรียบเทียบได้ว่าสารสกัดจากเนื้อส้มโอมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์คอเลสเตอรอลเอสเทอร์เอสน้อยกว่ายาซิมวาสแตติน

บทบาทหน้าที่ของเอนไซม์เอนไซม์คอเลสเตอรอลเอสเทอร์เอสเป็นสิ่งที่น่าสนใจในปัจจุบันซึ่งสามารถช่วยควบคุมการสลายไขมันโดยเฉพาะอาหารที่มีคอเลสเตอรอลในรูปของพันธะเอสเทอร์ โดยทั่วไปการสลายพันธะเอสเทอร์ของคอเลสเตอรอลในลำไส้เล็กจะเกิดขึ้นโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์เอนไซม์คอเลสเตอรอลเอสเทอร์เอส ผลลัพธ์จากการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวทำให้เกิดคอเลสเตอรอลในรูปอิสระขึ้น นอกจากนี้เอนไซม์คอเลสเตอรอลเอสเทอร์เอสยังช่วยสนับสนุนให้คอเลสเตอรอลเข้าสู่ในรูปไมเซลล์ได้ง่ายขึ้น มีผลโดยตรงต่อการเพิ่มการดูดซึมคอเลสเตอรอล (Myers-Payne et al., 1995) ดังนั้นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้จึงมีผลต่อการลดการดูดซึมคอเลสเตอรอลเข้าสู่กระแสเลือด (Ngamukote et al., 2011) การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเนื้อส้มโอมีประสิทธิภาพปานกลางในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอเลสเตอรอลเอสเทอร์เอส ซึ่งสมมติฐานหนึ่งของสารพฤษเคมีที่ออกฤทธิ์อาจมาจากสารในกลุ่มของ ฟลาโวนอยด์ การศึกษาต่อไปที่น่าสนใจ คือ การแยกสารพฤษเคมีออกจากสารสกัดเนื้อส้มโอให้มีความบริสุทธิ์ที่สูง เพื่อนำมาศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอเลสเตอรอลเอสเทอร์เอสและนำไปสู่การพัฒนาเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อพัฒนาเป็นยาหรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่ช่วยลดการดูดซึมคอเลสเตอรอลได้

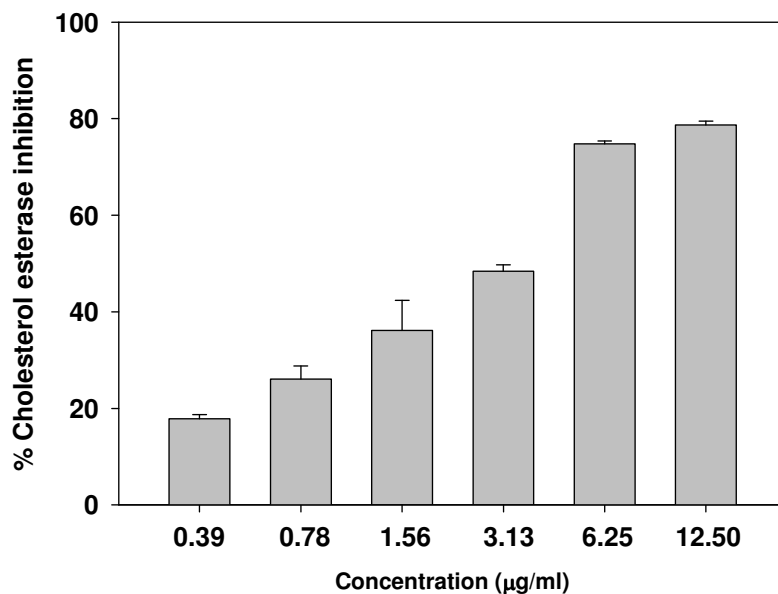


รูปที่ 17ฤทธิ์ของสารสกัดเนื้อส้มโอต่อการต้านการทำงานของเอนไซม์คอเลสเตอรอลเอสเทอเรสจากตับอ่อน ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean $\pm$ S.E.M) n = 3

ตารางที่ 5 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอเลสเทอรอลเอสเทอเรสจากตับอ่อนของสารสกัดจากเนื้อส้มโอ และ
ค่า IC₅₀ ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean ± S.E.M) n = 3

ความเข้มข้น ของสารสกัด	% การยับยั้งเอนไซม์คอเลสเทอรอลเอสเทอเรสจากตับอ่อน					
	ขาวใหญ่	ทองดี	ขาวแตงกวา	ขาวน้ำผึ้ง	ท่าข่อย	ทับทิมสยาม
0.25	0.94±0.31	-	-	0.25±0.98	1.13±0.51	-
0.50	8.37±3.00	9.57±2.57	7.88±3.24	5.31±1.55	14.04±2.31	4.75±2.48
1.00	27.04±3.61	43.07±7.20	38.90±3.76	21.54±1.55	-	8.62±1.65
2.00	50.88±1.25	69.53±3.40	48.75±3.47	48.29±5.29	23.10±6.61	33.28±7.60
2.50	-	-	50.76±7.39	76.40±3.26	40.35±3.62	66.01±5.77
4.00	84.07±6.01	77.60±7.54	58.03±7.62	-	79.54±7.26	92.35±6.90

IC ₅₀ ของสารสกัดเนื้อส้มโอ (mg/ml)					
ขาวใหญ่	ทองดี	ขาวแตงกวา	ขาวน้ำผึ้ง	ท่าข่อย	ทับทิมสยาม
2.10±0.06	1.50±0.30	2.97±0.97	1.87±0.12	2.89±0.32	2.31±0.27



รูปที่ 18ฤทธิ์ของซิมวาสแตติน (simvastatin) ต่อการต้านการทำงานของเอนไซม์คอเลสเตอรอลเอสเทอเรสจากตับอ่อน ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean $\pm$ S.E.M) $n = 3$

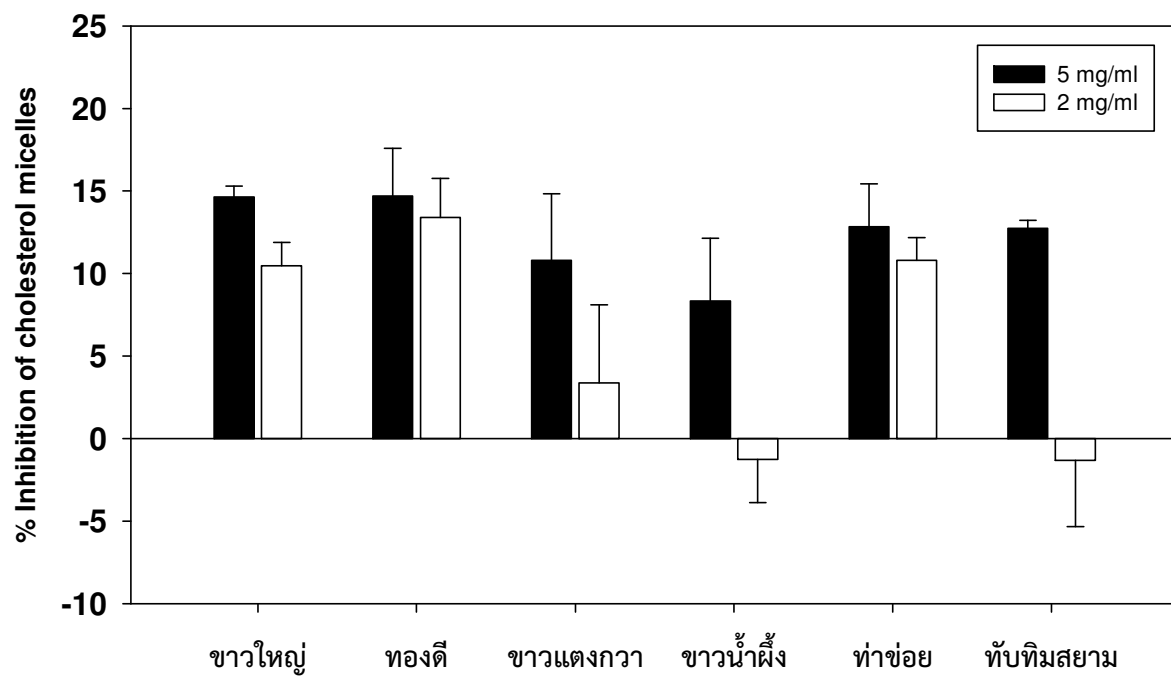
ตารางที่ 6 ฤทธิ์ของซิมวาสแตติน (simvastatin) ต่อการต้านการทำงานของเอนไซม์คอเลสเตอรอลเอสเทอเรสจากตับอ่อนและค่า IC_{50} ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean $\pm$ S.E.M) $n = 3$

ความเข้มข้นของยาซิมวาสแตติน	% การยับยั้งเอนไซม์คอเลสเตอรอลเอสเทอเรส
0.3900	17.81 $\pm$ 0.92
0.7800	26.03 $\pm$ 2.77
1.5600	36.12 $\pm$ 6.28
3.1300	48.38 $\pm$ 1.35
6.2500	74.78 $\pm$ 0.59
12.5000	78.70 $\pm$ 0.76
IC_{50} (µg/ml)	2.63 $\pm$ 0.35

5. การยับยั้งการรวมตัวเป็นคอเลสเตอรอลไมเซลล์ของสกัดจากเนื้อส้มโอ

จากการทดลองการยับยั้งการรวมตัวเป็นคอเลสเตอรอลไมเซลล์ด้วยสารสกัดส้มโอสายพันธุ์ต่างๆ ดังรูปที่ 7 พบว่าสารสกัดส้มโอเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการรวมตัวเป็นไมเซลล์ของคอเลสเตอรอล ได้เรียงลำดับความสามารถอยู่ระหว่าง 9-14% เมื่อลดความเข้มข้นของสารสกัดเนื้อส้มโอลงเหลือ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความสามารถในการยับยั้งการเกิดไมเซลล์ลดน้อยลง และส้มโอในสายพันธุ์ขาวน้ำผึ้งและทับทิมสยามไม่สามารถยับยั้งการเกิดไมเซลล์ได้

กระบวนการดูดซึมคอเลสเตอรอลนั้นอาศัยการเกิดเป็นอิมัลชันและเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพันธะเอสเทอร์ โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์คอเลสเตอรอลเอสเทอเรส จากนั้นเกิดกระบวนการไมเซลล์ไลเซชัน และถูกดูดซึมผ่านลำไส้เล็กส่วนเจจูนัม (jejunum) จนเกิดกระบวนการเอสเทอร์ฟิเคชันของคอเลสเตอรอลขึ้นอีกครั้งในเซลล์ลำไส้เล็กและเคลื่อนย้ายไปสู่ส่วนต่างๆ ในรูปไคโลไมครอน (chylomicron) ผ่านทางระบบน้ำเหลือง การลดกระบวนการดูดซึมคอเลสเตอรอลโดยการยับยั้งการเกิดไมเซลล์ไลเซชันในทางเดินอาหารบริเวณลำไส้เล็ก เป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยในการรักษาโรคไขมันในเลือดสูงและโรคอ้วน มีรายงานว่าสารพฤกษเคมีในกลุ่มของฟลาโวนอยด์ เช่น สารเดอะฟลาวิน (theaflavins) พบมากในสารสกัดชาดำ สามารถยับยั้งการเกิดไมเซลล์ของคอเลสเตอรอลในหนูขาว ซึ่งช่วยลดการดูดซึมคอเลสเตอรอลเข้าสู่กระแสเลือด (Ikeda et al., 2010) สารสกัดจากชาเขียวที่มีสารในกลุ่มอีจีซีจี (EGCG) สามารถยับยั้งการเกิดคอเลสเตอรอลไมเซลล์ ได้เช่นกัน (Raederstorff et al., 2003) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าสารสกัดจากเนื้อส้มโอมีความสามารถในการยับยั้งการเกิดกระบวนการไมเซลล์ของคอเลสเตอรอล อาจมาจากสารพฤกษเคมีในกลุ่มฟลาโวนอยด์ก็เป็นได้

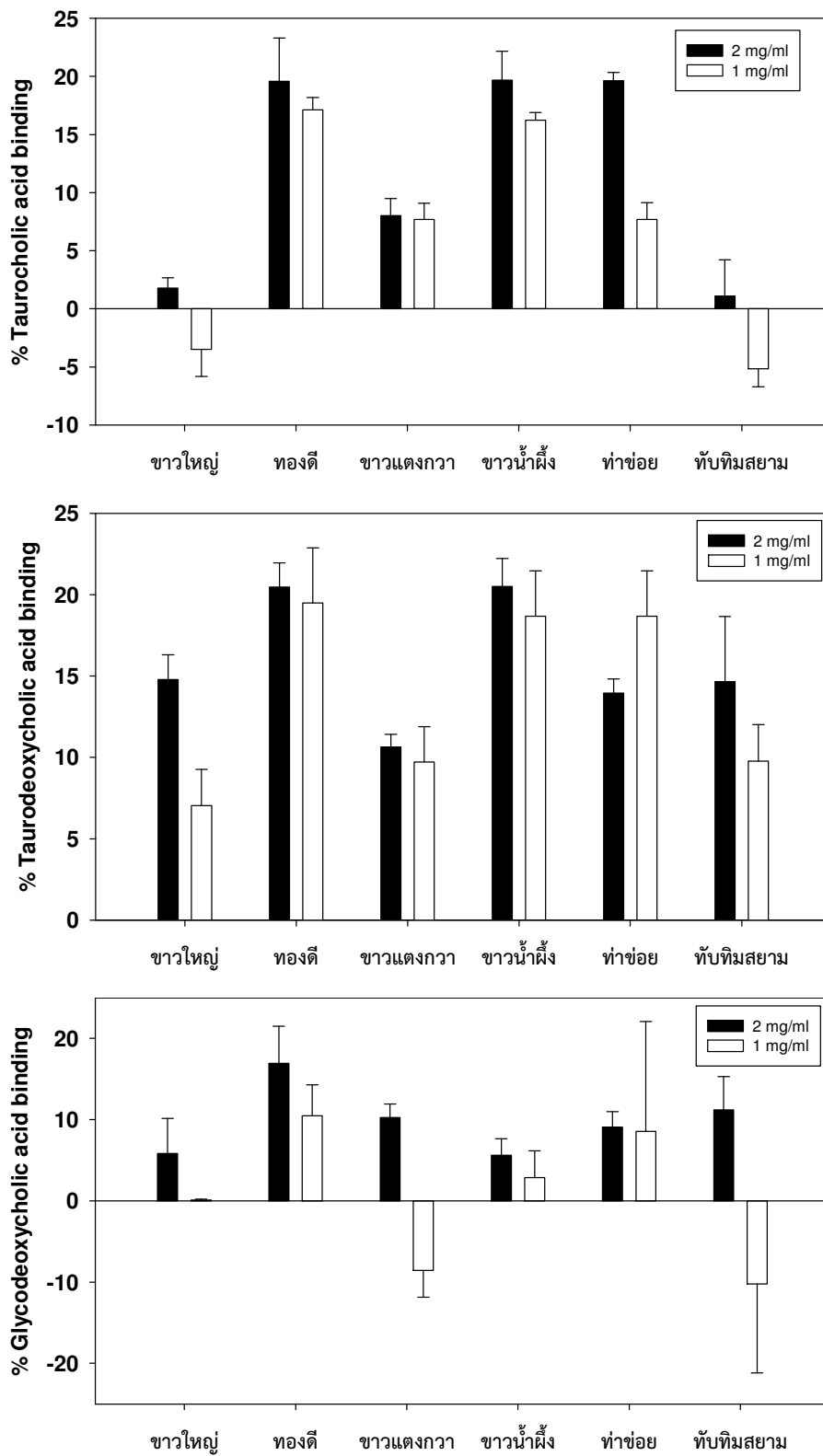


รูปที่ 7ฤทธิ์ของสารสกัดเนื้อสัมผัสต่อการยับยั้งการรวมตัวกันเป็นคอเลสเตอรอลไมเซลล์ ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean $\pm$ S.E.M) $n = 3$

6. การจับกับกรดน้ำดีของสกัดจากเนื้อส้มโอ

ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า สารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดี ขาวน้ำผึ้ง ขาวแตงกวาและท่าช้อย มีฤทธิ์ในการจับกับกรดน้ำดีชนิด taurocholic acid ระหว่าง 6-16% (รูปที่ 8) ในขณะที่ส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่และทับทิมสยาม ไม่มีฤทธิ์ในการจับกับกรดน้ำดีชนิดทอโรโคลิค เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดเป็น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า สารสกัดส้มโอพันธุ์ทุกสายพันธุ์มีความสามารถจับกับกรดน้ำดีชนิดนี้เพิ่มขึ้นเล็กน้อย ขณะที่ cholestyramine ซึ่งเป็นยาที่มีคุณสมบัติในการจับกับกรดน้ำดีมีความสามารถจับกับกรดน้ำดีชนิดนี้ได้ที่ความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่ากับ 24 % และ 32% ตามลำดับ เมื่อเปลี่ยนชนิดของกรดน้ำดี พบว่า สารสกัดส้มโอทุกสายพันธุ์มีฤทธิ์ในการจับกับกรดน้ำดีชนิด taurodeoxycholic acid ได้ดี ที่ความเข้มข้นที่ 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความสามารถในการจับกับกรดน้ำดีอยู่ระหว่าง 6-20% ขณะที่ cholestyramine ซึ่งเป็นยาที่มีคุณสมบัติในการจับกับกรดน้ำดีมีความสามารถจับกับกรดน้ำดีชนิดนี้ได้ที่ความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่ากับ 27 % และ 49 % ตามลำดับ และสำหรับกรดน้ำดีชนิด glycodeoxycholic acid พบว่าสารสกัดจากเนื้อส้มโอมีคุณสมบัติในการจับกับกรดน้ำดีชนิดนี้ค่อนข้างต่ำ ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีความสามารถในการจับกับกรดน้ำดีระหว่าง 5-17% ส่วนที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากเนื้อส้มโอทุกสายพันธุ์มีความสามารถในการจับกับกรดน้ำดีชนิดนี้ค่อนข้างต่ำ มีความสามารถในการจับไม่เกิน 10% ขณะที่ cholestyramine ซึ่งเป็นยาที่มีคุณสมบัติในการจับกับกรดน้ำดีมีความสามารถจับกับกรดน้ำดีชนิดนี้ได้ที่ความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่ากับ 30 % และ 42 % ตามลำดับ

กรดน้ำดีถูกสังเคราะห์จากคอเลสเตอรอลภายในตับ กรดน้ำดีสามารถรวมตัวกับกรดอะมิโน เช่น ไกลซีน และทอรีน และจะถูกหลั่งมายังลำไส้เล็กในส่วนดูโอดินัม (duodenum) ซึ่งจะเรียกว่ากรดน้ำดีปฐมภูมิ (primary bile acid) โดยปกติกรดน้ำดีจะถูกดูดซึมกลับที่ลำไส้ใหญ่ในส่วนของไอเลียม (ileum) ในรูปของทุติยภูมิ (secondary bile acid) และไหลเวียนกลับเข้าสู่ตับอีกครั้ง (Hofmann et al., 2008) การขัดขวางน้ำดีไม่ให้ถูกดูดซึมกลับไปยังระบบไหลเวียนโลหิต สามารถทำได้โดยการใช้สารเคมีที่จับตัวของน้ำดีเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ไม่ละลายน้ำในลำไส้เล็ก เช่น cholestyramine ซึ่งจะเพิ่มการขจัดน้ำดีออกทางอุจจาระมากขึ้น ทำให้น้ำดีไม่สามารถดูดซึมกลับไปยังระบบไหลเวียนโลหิต ดังนั้นจึงจำเป็นต้องสังเคราะห์กรดน้ำดีขึ้นมาทดแทนเพื่อควบคุมสมดุลจากการใช้คอเลสเตอรอล ด้วยกลไกนี้จะมีผลให้ระดับคอเลสเตอรอลในเลือดลดลงได้ (Insull, 2006) และประการที่สำคัญก็คือ ระดับของกรดน้ำดีชนิดทุติยภูมิที่สะสมสูงมากเกินไปในลำไส้ใหญ่นั้น อาจเป็นสาเหตุให้เกิดการอักเสบของทางเดินอาหารซึ่งเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ (Peterlik, 2008) จากข้อมูลของการศึกษานี้ พบว่าสารสกัดจากเนื้อส้มโอสามารถจับตัวได้กับ glycodeoxycholic acid และ taurocholic acid และ taurodeoxycholic acid ซึ่งเป็นทั้งกรดน้ำดีปฐมภูมิและทุติยภูมิ ซึ่งอาจช่วยลดคอเลสเตอรอลในเลือดและลดความเสี่ยงในการพัฒนาการเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้



รูปที่ 8ฤทธิ์ของสารสกัดเนื้อสัมผัสต่อการรวมตัวกับกรดน้ำดีชนิดต่างๆ ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean $\pm$ S.E.M) n = 3

การยับยั้งปฏิกิริยาไกลเคชั่นของสกัดจากเนื้อส้มโอ

จากผลการทดลอง (ตารางที่ 7-12) พบว่ามีสารสกัดจากเนื้อส้มโอทุกสายพันธุ์ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.25 ถึง 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดไกลเคชั่นที่เหนี่ยวนำโดยการใช้น้ำตาลฟรุกโตสได้ดีตั้งแต่วันที่ 7 หลังจากการเริ่มปฏิกิริยา โดยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดไกลเคชั่น อยู่ระหว่าง 62-95% จากนั้นเมื่อปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินต่อไป พบว่าสารสกัดจากเนื้อส้มโอยังสามารถยับยั้งการเกิดไกลเคชั่นได้เช่นกัน แต่ประสิทธิภาพการยับยั้งลดลงเมื่อเพิ่มระยะเวลาของการเกิดปฏิกิริยาในวันที่ 14, 21 และ 28 ประสิทธิภาพมีความใกล้เคียงกับยา aminoguanidine ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดที่สูงขึ้นนั้น เป็นสาเหตุของการพัฒนาไปสู่โรคแทรกซ้อนที่สำคัญในผู้ป่วยเบาหวานโดยผ่านกระบวนการไกลเคชั่นซึ่งสาเหตุสำคัญของการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในโปรตีน หากมีการสะสมของผลิตภัณฑ์ไกลเคชั่น (AGEs) ในสิ่งมีชีวิตจะเป็นสาเหตุให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเนื้อเยื่อโปรตีน มีรายงานการศึกษาที่มีความสอดคล้องเชิงประจักษ์ว่าการเกิดไกลเคชั่นมีบทบาทสำคัญของการพัฒนาไปสู่โรคเรื้อรังตามมาในอนาคต เช่น โรคเบาหวาน โรคหัวใจ โรคอัลไซเมอร์ เป็นต้น การเกิดไกลเคชั่นเป็นสาเหตุสำคัญในการผลิต reactive oxygen species (ROS) ทั้งผ่านกระบวนการไกลโคออกซิเดชัน (glycoxidation) หรือไม่ใช้กระบวนการออกซิเดชัน นอกจากนี้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโตสนั้นเกิดกระบวนการ autooxidation และสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) และสารคีโตอัลดีไฮด์ เมื่อมีโลหะทรานซิชันสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง AGEs ได้ มีรายงานการศึกษาว่าน้ำตาลฟรุกโตสนั้นสามารถเกิดปฏิกิริยาไกลเคชั่นได้เร็วกว่าน้ำตาลกลูโคสประมาณ 10 เท่า (Suárez et al., 1989) หลักฐานทางวิทยาศาสตร์ในปัจจุบันแสดงให้เห็นว่าความเป็นไปได้ในการลดความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะแทรกซ้อนในผู้ป่วยเบาหวานคือการยับยั้งการเกิด AGEs (Brownlee et al., 1988) ยา aminoguanidine เป็นสารเคมีที่มีฤทธิ์การต้านไกลเคชั่นซึ่งได้รับความสนใจในทางคลินิกโดยการยับยั้งการเกิด AGEs ทั้งในหลอดทดลองและสัตว์ทดลอง แต่อย่างไรก็ตามพบว่า aminoguanidine มีความเป็นพิษกับผู้ที่ป่วยเบาหวานที่มีอาการแทรกซ้อนทางไต (Giardino et al., 1998; Ihm et al., 1999) ดังนั้นจึงมีความพยายามที่จะค้นหาสารเคมีจากธรรมชาติจากพืช ผลไม้และสมุนไพรต่อการยับยั้งการเกิดไกลเคชั่นของ AGE มีรายงานวิจัยพบว่าสารสกัดจากส้มในส่วนองเปลือกสามารถต้านการเกิดไกลเคชั่นได้ดีและมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ สารสกัดนี้ช่วยลดการเกิดโปรตีนคาร์บอนิลในเซลล์ไขมันซึ่งถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Ramful et al., 2010) จากงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาครั้งแรกที่สกัดสารพิษจากส่วนของเนื้อส้มโอต่อการต้านการเกิดไกลเคชั่น พบว่าส้มโอทุกสายพันธุ์มีความสามารถในการต้านไกลเคชั่นใกล้เคียงกัน ซึ่งสามารถนำมาพัฒนาสารต้านไกลเคชั่นได้ในอนาคต

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิด AGE ของสารสกัดจากเนื้อส้มโอสายพันธุ์ขาวใหญ่

% การยับยั้งการเกิด AGE				
	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
ขาวใหญ่ 0.25 mg/ml	78.37 ± 0.74	67.32 ± 4.12	59.05 ± 2.20	49.97 ± 0.96
ขาวใหญ่ 0.50 mg/ml	87.49 ± 1.19	82.32 ± 1.37	74.69 ± 1.64	71.53 ± 0.52
ขาวใหญ่ 0.75 mg/ml	88.68 ± 1.33	87.24 ± 0.90	86.38 ± 0.77	80.65 ± 0.63
ขาวใหญ่ 1.00 mg/ml	91.04 ± 0.03	88.85 ± 0.95	87.01 ± 0.66	86.31 ± 0.48
ขาวใหญ่ 1.50 mg/ml	93.51 ± 0.60	89.88 ± 0.19	87.97 ± 0.48	89.61 ± 0.15
ขาวใหญ่ 2.00 mg/ml	94.68 ± 0.73	92.06 ± 0.73	91.75 ± 0.42	90.68 ± 0.42
AG 0.50 mg/ml	85.23 ± 1.89	86.06 ± 0.56	81.81 ± 4.54	73.62 ± 0.90
AG 1.00 mg/ml	91.13 ± 2.73	90.10 ± 0.42	87.36 ± 0.80	84.23 ± 0.60

ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean ± S.E.M) n = 3 AG = aminoguanidine

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิด AGE ของสารสกัดจากเนื้อส้มโอสายพันธุ์ทองดี

% การยับยั้งการเกิด AGE				
	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
ทองดี 0.25 mg/ml	69.12 ± 0.82	59.63 ± 2.30	58.34 ± 0.13	54.96 ± 0.21
ทองดี 0.50 mg/ml	75.37 ± 3.47	69.90 ± 0.94	66.66 ± 0.09	62.6 ± 0.55
ทองดี 0.75 mg/ml	78.13 ± 0.40	72.65 ± 1.84	69.81 ± 1.62	63.63 ± 0.06
ทองดี 1.00 mg/ml	88.31 ± 2.04	80.56 ± 0.66	75.59 ± 0.39	71.59 ± 0.87
ทองดี 1.50 mg/ml	91.80 ± 4.39	83.71 ± 1.01	81.45 ± 0.46	79.19 ± 0.12
ทองดี 2.00 mg/ml	97.83 ± 0.45	88.71 ± 0.29	85.83 ± 0.33	82.2 ± 0.20
AG 0.50 mg/ml	85.23 ± 1.89	86.06 ± 0.56	81.81 ± 4.54	73.62 ± 0.90
AG 1.00 mg/ml	91.13 ± 2.73	90.10 ± 0.42	87.36 ± 0.80	84.23 ± 0.60

ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean ± S.E.M) n = 3 AG = aminoguanidine

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิด AGE ของสารสกัดจากเนื้อส้มโอสายพันธุ์ขาวแตงกวา

% การยับยั้งการเกิด AGE				
	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
ขาวแตงกวา 0.25 mg/ml	63.89 ± 1.92	62.24 ± 9.13	49.50 ± 7.78	37.63 ± 1.30
ขาวแตงกวา 0.50 mg/ml	68.1 ± 1.60	63.52 ± 8.48	55.83 ± 8.59	47.94 ± 1.71
ขาวแตงกวา 0.75 mg/ml	72.54 ± 2.47	67.39 ± 0.59	59.81 ± 1.01	49.15 ± 4.79
ขาวแตงกวา 1.00 mg/ml	80.72 ± 4.56	71.06 ± 2.89	63.08 ± 0.44	60.01 ± 5.70
ขาวแตงกวา 1.50 mg/ml	87.96 ± 2.37	85.69 ± 2.20	75.17 ± 6.73	65.40 ± 8.99
ขาวแตงกวา 2.00 mg/ml	92.80 ± 0.34	91.43 ± 0.47	88.57 ± 1.81	86.72 ± 1.00
AG 0.50 mg/ml	85.23 ± 1.89	86.06 ± 0.56	81.81 ± 4.54	73.62 ± 0.90
AG 1.00 mg/ml	91.13 ± 2.73	90.10 ± 0.42	87.36 ± 0.80	84.23 ± 0.60

ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean ± S.E.M) n = 3 AG = aminoguanidine

ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิด AGE ของสารสกัดจากเนื้อส้มโอสายพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง

% การยับยั้งการเกิด AGE				
	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
ขาวน้ำผึ้ง 0.25 mg/ml	62.37 ± 0.21	57.49 ± 0.20	54.07 ± 0.43	49.48 ± 0.31
ขาวน้ำผึ้ง 0.50 mg/ml	69.33 ± 0.01	62.53 ± 0.32	60.36 ± 0.79	56.56 ± 0.50
ขาวน้ำผึ้ง 0.75 mg/ml	76.11 ± 0.05	70.70 ± 0.97	68.35 ± 0.82	67.43 ± 0.55
ขาวน้ำผึ้ง 1.00 mg/ml	85.00 ± 0.15	72.80 ± 0.20	71.55 ± 0.33	69.52 ± 0.40
ขาวน้ำผึ้ง 1.50 mg/ml	90.26 ± 0.12	88.39 ± 0.10	86.22 ± 0.24	84.75 ± 0.18
ขาวน้ำผึ้ง 2.00 mg/ml	95.29 ± 0.13	91.64 ± 0.71	89.81 ± 0.21	87.17 ± 0.25
AG 0.50 mg/ml	85.23 ± 1.89	86.06 ± 0.56	81.81 ± 4.54	73.62 ± 0.90
AG 1.00 mg/ml	91.13 ± 2.73	90.10 ± 0.42	87.36 ± 0.80	84.23 ± 0.60

ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean ± S.E.M) n = 3 AG = aminoguanidine

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิด AGE ของสารสกัดจากเนื้อส้มโอสายพันธุ์ท่าซ้อย

% การยับยั้งการเกิด AGE				
	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
ท่าซ้อย 0.25 mg/ml	63.89 ± 1.92	62.24 ± 9.13	49.50 ± 7.78	37.63 ± 1.30
ท่าซ้อย 0.50 mg/ml	68.1 ± 1.60	63.52 ± 8.48	55.83 ± 8.59	47.94 ± 1.71
ท่าซ้อย 0.75 mg/ml	72.54 ± 2.47	67.39 ± 0.59	59.81 ± 1.01	49.15 ± 4.79
ท่าซ้อย 1.00 mg/ml	80.72 ± 4.56	71.06 ± 2.89	63.08 ± 0.44	60.01 ± 5.70
ท่าซ้อย 1.50 mg/ml	87.96 ± 2.37	85.69 ± 2.20	75.17 ± 6.73	65.40 ± 8.99
ท่าซ้อย 2.00 mg/ml	92.80 ± 0.34	91.43 ± 0.47	88.57 ± 1.81	86.72 ± 1.00
AG 0.50 mg/ml	85.23 ± 1.89	86.06 ± 0.56	81.81 ± 4.54	73.62 ± 0.90
AG 1.00 mg/ml	91.13 ± 2.73	90.10 ± 0.42	87.36 ± 0.80	84.23 ± 0.60

ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean ± S.E.M) n = 3 AG = aminoguanidine

ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิด AGE ของสารสกัดจากเนื้อส้มโอสายพันธุ์ทับทิมสยาม

% การยับยั้งการเกิด AGE				
	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
ทับทิมสยาม 0.25 mg/ml	62.37 ± 0.21	57.49 ± 0.20	54.07 ± 0.43	49.48 ± 0.31
ทับทิมสยาม 0.50 mg/ml	69.33 ± 0.01	62.53 ± 0.32	60.36 ± 0.79	56.56 ± 0.50
ทับทิมสยาม 0.75 mg/ml	76.11 ± 0.05	70.70 ± 0.97	68.35 ± 0.82	67.43 ± 0.55
ทับทิมสยาม 1.00 mg/ml	85.00 ± 0.15	72.80 ± 0.20	71.55 ± 0.33	69.52 ± 0.40
ทับทิมสยาม 1.50 mg/ml	90.26 ± 0.12	88.39 ± 0.10	86.22 ± 0.24	84.75 ± 0.18
ทับทิมสยาม 2.00 mg/ml	95.29 ± 0.13	91.64 ± 0.71	89.81 ± 0.21	87.17 ± 0.25
AG 0.50 mg/ml	85.23 ± 1.89	86.06 ± 0.56	81.81 ± 4.54	73.62 ± 0.90
AG 1.00 mg/ml	91.13 ± 2.73	90.10 ± 0.42	87.36 ± 0.80	84.23 ± 0.60

ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean ± S.E.M) n = 3 AG = aminoguanidine

การยับยั้งการเกิดฟรุกโตซามีนของสกัดจากเนื้อส้มโอ

จากการทดลองพบว่าเมื่อปล่อยให้ปฏิกิริยาไกลเคชันดำเนินจากวันที่ 7 ไปถึงวันที่ 28 พบว่าปริมาณ fructosamine เพิ่มขึ้นจากปฏิกิริยาเมื่อใช้น้ำตาลฟรุกโตสกับโปรตีนอัลบูมิน ดังตารางที่ 11 จากผลการทดลอง บ่งชี้ว่ามีการเพิ่มขึ้นของปริมาณสาร amadori product ซึ่งเป็นสารเคมีที่ผลิตขึ้นมาก่อนจะเปลี่ยนแปลงเป็น advanced glycation end products สารสกัดเนื้อส้มโอสายพันธุ์ต่างมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดฟรุกโตซามีนได้เท่าๆกัน การยับยั้งสามารถสังเกตได้ตั้งแต่วันที่ 7 จนถึงวันที่ 28 จะพบว่าปริมาณฟรุกโตซามีนลดลงตามความเข้มข้นของสารสกัดส้มโอเพิ่มขึ้น ในขณะที่ยา aminoguanidine ช่วยยับยั้งการเกิด fructosamine ได้ตั้งแต่วันที่ 7 จนกระทั่งถึงวันที่ 28 โดยมีความแตกต่างทางนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในแต่ละสัปดาห์ ปริมาณฟรุกโตซามีนที่ลดลงนี้สอดคล้องกับการยับยั้งการเกิดไกลเคชัน

AGEs เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการไกลเคชัน ซึ่งเป็นการทำปฏิกิริยาแบบไม่อาศัยเอนไซม์ระหว่างกลุ่มอัลดีไฮด์ของน้ำตาลรีดิวซ์กับหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีน ทำให้เกิด Schiff base ขึ้นมา ซึ่งสารตัวนี้เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและสามารถผันกลับได้ แต่ถ้าหากปฏิกิริยายังดำเนินต่อไป Schiff base ก็จะมีการเรียงตัวกันใหม่ กลายเป็น amadori product ซึ่งมีความคงตัวมากขึ้นแต่ก็สามารถผันกลับได้ amadori product อาจเกิดปฏิกิริยาต่อไป โดยจะเข้าไปทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับหมู่อะมิโนต่างๆ สุดท้ายกลายเป็น AGEs ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความคงตัว ไม่สามารถคืนสู่สภาพเดิมได้ โดย AGEs จะไปเชื่อมจับกับโปรตีนตัวอื่นๆแล้วทำให้โปรตีนนั้นเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพและทำให้การทำงานเปลี่ยนไป กระบวนการไกลเคชันเป็นปฏิกิริยาที่มีการดำเนินติดต่อกันไปเรื่อยๆ และในแต่ละขั้นตอนของปฏิกิริยาจะมีสารประกอบตัวใหม่เกิดขึ้นมา ซึ่งอาจแบ่งช่วงต่างๆของกระบวนการไกลเคชันออกเป็น 3 ระยะคือ 1) ระยะต้น (early phase) 2) ระยะกลาง (intermediate phase) 3) ระยะท้าย (late phase) สารฟรุกโตซามีน เป็นสารคีโตเอมีน ซึ่งจัดเป็น amadori product ที่เกิดในช่วงต้นของกระบวนการไกลเคชัน (early glycation) โดยเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาแบบไม่อาศัยเอนไซม์ระหว่างน้ำตาลฟรุกโตสและโปรตีนของ BSA ที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้เกิดการจัดเรียงโครงสร้างใหม่คือ สาร schiff base และ amadori product ตามลำดับ ซึ่งสารฟรุกโตซามีนจะเป็นสารตั้งต้นของการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและปฏิกิริยาไกลคอกซิเดชันต่อไป

มีงานวิจัยหลายผลงานพบว่า สารสกัดจากพืชที่มีสารประกอบฟีนอลิกสามารถลดปริมาณสารฟรุกโตซามีนได้ เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกฟลาโวนอยด์ (Ardestani et al., 2007; Wu et al., 2009) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองนี้คือ สารสกัดจากเนื้อส้มโอซึ่งมีส่วนประกอบของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สามารถลดปริมาณฟรุกโตซามีนได้ จึงอาจเป็นไปได้ว่า สารสกัดจากเนื้อส้มโอมีผลต่อกระบวนการไกลเคชันในช่วงก่อนการเกิดสาร amadori product หรือ early glycation โดยช่วยลดปริมาณ amadori product

ตารางที่ 11 ปริมาณการเกิดฟรุกโตซามีนของสารสกัดจากเนื้อส้มโอสายพันธุ์ขาวใหญ่

ปริมาณฟรุกโตซามีน (mM)				
	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
กลุ่มควบคุม	1.77 ± 0.07	2.17 ± 0.06	2.49 ± 0.16	2.73 ± 0.33
ขาวใหญ่ 0.25 mg/ml	1.47 ± 0.21	1.80 ± 0.04 [#]	2.31 ± 0.01	2.63 ± 0.02
ขาวใหญ่ 0.50 mg/ml	1.39 ± 0.06 [#]	1.70 ± 0.03 [#]	2.07 ± 0.12 [#]	2.46 ± 0.02
ขาวใหญ่ 0.75 mg/ml	1.32 ± 0.07 [#]	1.57 ± 0.01 [#]	2.01 ± 0.31 [#]	2.39 ± 0.01 [#]
ขาวใหญ่ 1.00 mg/ml	1.28 ± 0.11 [#]	1.44 ± 0.03 [#]	1.88 ± 0.06 [#]	2.25 ± 0.01 [#]
ขาวใหญ่ 1.50 mg/ml	1.21 ± 0.07 [#]	1.39 ± 0.01 [#]	1.70 ± 0.16 [#]	2.13 ± 0.01 [#]
ขาวใหญ่ 2.00 mg/ml	1.13 ± 0.10 ^{*#}	1.20 ± 0.01 [#]	1.57 ± 0.21 [#]	2.03 ± 0.03 [#]
AG 0.50 mg/ml	1.47 ± 0.21 [#]	1.88 ± 0.16 [#]	1.88 ± 0.06 [#]	2.39 ± 0.01 [#]
AG 1.00 mg/ml	1.31 ± 0.04 [#]	1.59 ± 0.21 [#]	1.76 ± 0.60 [#]	2.04 ± 0.02 [#]

ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean ± S.E.M) n = 3

AG = aminoguanidine กลุ่มควบคุม = BSA+น้ำตาลฟรุกโตส [#]P<0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม *P<0.05 เปรียบเทียบกับ AG ที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 12 ปริมาณการเกิดฟรุกโตซามีนของสารสกัดจากเนื้อส้มโอสายพันธุ์ทองดี

ปริมาณฟรุกโตซามีน (mM)				
	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
กลุ่มควบคุม	1.77 ± 0.07	2.17 ± 0.06	2.49 ± 0.16	2.73 ± 0.33
ทองดี 0.25 mg/ml	1.66 ± 0.21	1.88 ± 0.14	1.99 ± 0.39 [#]	2.22 ± 0.27 [#]
ทองดี 0.50 mg/ml	1.51 ± 0.06	1.69 ± 0.20 [#]	1.84 ± 0.74 [#]	2.07 ± 0.06 [#]
ทองดี 0.75 mg/ml	1.32 ± 0.21 [#]	1.51 ± 0.06 [#]	1.77 ± 0.75 [#]	1.96 ± 0.17 [#]
ทองดี 1.00 mg/ml	1.24 ± 0.07 [#]	1.43 ± 0.32 [#]	1.66 ± 0.23 [#]	1.84 ± 0.28 [#]
ทองดี 1.50 mg/ml	1.13 ± 0.20 [#]	1.36 ± 0.14 [#]	1.54 ± 0.51 ^{#*}	1.77 ± 0.07 [#]
ทองดี 2.00 mg/ml	1.06 ± 0.11 ^{*#}	1.24 ± 0.16 [#]	1.47 ± 0.17 [#]	1.62 ± 0.30 [#]
AG 0.50 mg/ml	1.47 ± 0.21 [#]	1.88 ± 0.16 [#]	1.88 ± 0.06 [#]	2.39 ± 0.01 [#]
AG 1.00 mg/ml	1.31 ± 0.04 [#]	1.59 ± 0.21 [#]	1.76 ± 0.60 [#]	2.04 ± 0.02 [#]

ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean ± S.E.M) n = 3

AG = aminoguanidine กลุ่มควบคุม = BSA+น้ำตาลฟรุกโตส [#]P<0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม *P<0.05 เปรียบเทียบกับ AG ที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 13 ปริมาณการเกิดฟรุกโตซามีนของสารสกัดจากเนื้อส้มโอสายพันธุ์ขาวแตงกวา

ปริมาณฟรุกโตซามีน (mM)				
	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
กลุ่มควบคุม	1.77 ± 0.07	2.17 ± 0.06	2.49 ± 0.16	2.73 ± 0.33
ขาวแตงกวา 0.25 mg/ml	1.88 ± 0.14 [#]	2.01 ± 0.17 [#]	2.11 ± 0.23	2.52 ± 0.17
ขาวแตงกวา 0.50 mg/ml	1.81 ± 0.14	1.94 ± 0.29 [#]	2.02 ± 0.17 [#]	2.29 ± 0.19 [#]
ขาวแตงกวา 0.75 mg/ml	1.77 ± 0.25	1.86 ± 0.14 [#]	1.99 ± 0.11 [#]	2.18 ± 0.11 [#]
ขาวแตงกวา 1.00 mg/ml	1.62 ± 0.11 [#]	1.69 ± 0.23 [#]	1.86 ± 0.17 [#]	2.10 ± 0.36 [#]
ขาวแตงกวา 1.50 mg/ml	1.36 ± 0.07 [#]	1.59 ± 0.14 [#]	1.73 ± 0.17 [#]	1.84 ± 0.22 ^{#*}
ขาวแตงกวา 2.00 mg/ml	1.28 ± 0.06 [#]	1.48 ± 0.16 [#]	1.66 ± 0.55 [#]	1.77 ± 0.04 [#]
AG 0.50 mg/ml	1.47 ± 0.21 [#]	1.88 ± 0.16 [#]	1.88 ± 0.06 [#]	2.39 ± 0.01 [#]
AG 1.00 mg/ml	1.31 ± 0.04 [#]	1.59 ± 0.21 [#]	1.76 ± 0.60 [#]	2.04 ± 0.02 [#]

ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean ± S.E.M) n = 3

AG = aminoguanidine กลุ่มควบคุม = BSA+น้ำตาลฟรุกโตส [#]P<0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม *P<0.05 เปรียบเทียบกับ AG ที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 14 ปริมาณการเกิดฟรุกโตซามีนของสารสกัดจากเนื้อส้มโอสายพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง

ปริมาณฟรุกโตซามีน (mM)				
	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
กลุ่มควบคุม	1.77 ± 0.07	2.17 ± 0.06	2.49 ± 0.16	2.73 ± 0.33
ขาวน้ำผึ้ง 0.25 mg/ml	1.58 ± 0.19*	1.96 ± 0.05*	2.04 ± 0.05	2.82 ± 0.19 [#]
ขาวน้ำผึ้ง 0.50 mg/ml	1.53 ± 0.11*	1.74 ± 0.19 ^{#*}	1.99 ± 0.28*	2.73 ± 0.23 [#]
ขาวน้ำผึ้ง 0.75 mg/ml	1.41 ± 0.09 [#]	1.63 ± 0.14 [#]	1.89 ± 0.19 [#]	2.36 ± 0.53 [#]
ขาวน้ำผึ้ง 1.00 mg/ml	1.37 ± 0.11 [#]	1.58 ± 0.16 [#]	1.79 ± 0.09 [#]	2.28 ± 0.15 [#]
ขาวน้ำผึ้ง 1.50 mg/ml	1.31 ± 0.05 [#]	1.53 ± 1.19 [#]	1.62 ± 0.30 [#]	2.01 ± 0.09 [#]
ขาวน้ำผึ้ง 2.00 mg/ml	1.26 ± 0.01 [#]	1.42 ± 0.09 [#]	1.54 ± 0.30 [#]	1.85 ± 0.46 [#]
AG 0.50 mg/ml	1.47 ± 0.21 [#]	1.88 ± 0.16 [#]	1.88 ± 0.06 [#]	2.39 ± 0.01 [#]
AG 1.00 mg/ml	1.31 ± 0.04 [#]	1.59 ± 0.21 [#]	1.76 ± 0.60 [#]	2.04 ± 0.02 [#]

ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean ± S.E.M) n = 3

AG = aminoguanidine กลุ่มควบคุม = BSA+น้ำตาลฟรุกโตส [#]P<0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม *P<0.05 เปรียบเทียบกับ AG ที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 15 ปริมาณการเกิดฟรุกโตซามีนของสารสกัดจากเนื้อส้มโอสายพันธุ์ท่าซ้อย

ปริมาณฟรุกโตซามีน (mM)				
	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
กลุ่มควบคุม	1.77 ± 0.07	2.17 ± 0.06	2.49 ± 0.16	2.73 ± 0.33
ท่าซ้อย 0.25 mg/ml	1.69 ± 0.43	1.96 ± 0.11	2.22 ± 0.04	2.37 ± 0.20*
ท่าซ้อย 0.50 mg/ml	1.51 ± 0.28	1.73 ± 0.11	2.10 ± 0.20	2.14 ± 0.10 [#]
ท่าซ้อย 0.75 mg/ml	1.43 ± 0.20 [#]	1.62 ± 0.11 [#]	1.92 ± 0.04	2.03 ± 0.10 [#]
ท่าซ้อย 1.00 mg/ml	1.39 ± 0.07 [#]	1.43 ± 0.26 [#]	1.81 ± 0.23 [#]	1.90 ± 0.09 [#]
ท่าซ้อย 1.50 mg/ml	1.28 ± 0.11 [#]	1.32 ± 0.10 [#]	1.69 ± 0.26 [#]	1.88 ± 0.14 [#]
ท่าซ้อย 2.00 mg/ml	1.13 ± 0.10 [#]	1.24 ± 0.04 ^{#*}	1.54 ± 0.75 [#]	1.77 ± 0.15 [#]
AG 0.50 mg/ml	1.47 ± 0.21 [#]	1.88 ± 0.16 [#]	1.88 ± 0.06 [#]	2.39 ± 0.01 [#]
AG 1.00 mg/ml	1.31 ± 0.04 [#]	1.59 ± 0.21 [#]	1.76 ± 0.60 [#]	2.04 ± 0.02 [#]

ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean ± S.E.M) n = 3

AG = aminoguanidine กลุ่มควบคุม = BSA+น้ำตาลฟรุกโตส [#]P<0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม *P<0.05 เปรียบเทียบกับ AG ที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 16 ปริมาณการเกิดฟรุกโตซามีนของสารสกัดจากเนื้อส้มโอสายพันธุ์ทับทิมสยาม

ปริมาณฟรุกโตซามีน (mM)				
	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
กลุ่มควบคุม	1.77 ± 0.07	2.17 ± 0.06	2.49 ± 0.16	2.73 ± 0.33
ทับทิมสยาม 0.25 mg/ml	1.77 ± 0.04	1.92 ± 0.31	2.18 ± 0.11	2.55 ± 0.16
ทับทิมสยาม 0.50 mg/ml	1.69 ± 0.10	1.75 ± 0.07 [#]	1.96 ± 0.06 [#]	2.18 ± 0.28 [#]
ทับทิมสยาม 0.75 mg/ml	1.58 ± 0.07 [#]	1.69 ± 0.10 [#]	1.88 ± 0.04 [#]	2.10 ± 0.04 [#]
ทับทิมสยาม 1.00 mg/ml	1.47 ± 0.04 [#]	1.57 ± 0.15 [#]	1.77 ± 0.04 [#]	2.03 ± 0.04 [#]
ทับทิมสยาม 1.50 mg/ml	1.32 ± 0.31 [#]	1.32 ± 0.10 ^{#*}	1.62 ± 0.17 [#]	1.92 ± 0.10 ^{#*}
ทับทิมสยาม 2.00 mg/ml	1.21 ± 0.16 [#]	1.28 ± 0.13 ^{#*}	1.54 ± 0.10 [#]	1.84 ± 0.06 [#]
AG 0.50 mg/ml	1.47 ± 0.21 [#]	1.88 ± 0.16 [#]	1.88 ± 0.06 [#]	2.39 ± 0.01 [#]
AG 1.00 mg/ml	1.31 ± 0.04 [#]	1.59 ± 0.21 [#]	1.76 ± 0.60 [#]	2.04 ± 0.02 [#]

ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean ± S.E.M) n = 3

AG = aminoguanidine กลุ่มควบคุม = BSA+น้ำตาลฟรุกโตส [#]P<0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม *P<0.05 เปรียบเทียบกับ AG ที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

การยับยั้งการโครงสร้าง β -amyloid ในโปรตีนอัลบูมินของสกัดจากเนื้อส้มโอ

จากการทดลองพบว่าเมื่อปล่อยให้ปฏิกิริยาไกลเคชั่นดำเนินจากวันที่ 7 ไปถึงวันที่ 28 พบว่าปริมาณโครงสร้าง β -amyloid เพิ่มขึ้นจากปฏิกิริยาเมื่อใช้น้ำตาลฟรุกโตสกับโปรตีนอัลบูมิน ดังตารางที่ 17 จากผลการทดลองบ่งชี้ว่ามีการเพิ่มขึ้นของปริมาณสาร amadori product ซึ่งเป็นสารเคมีที่ผลิตขึ้นมาก่อนจะเปลี่ยนแปลงเป็น advanced glycation end products สารสกัดเนื้อส้มโอสายพันธุ์ต่างมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโครงสร้าง β -amyloid ได้เท่าเทียมกัน การยับยั้งสามารถสังเกตได้ตั้งแต่วันที่ 7 จนถึงวันที่ 28 (ตารางที่ 17-22) จะพบว่าโครงสร้าง β -amyloid ลดลงตามความเข้มข้นของสารสกัดส้มโอเพิ่มขึ้น ในขณะที่ยา aminoguanidine ช่วยยับยั้งการเกิดโครงสร้าง β -amyloid ได้ตั้งแต่วันที่ 7 จนกระทั่งถึงวันที่ 28 ปริมาณโครงสร้าง β -amyloid ที่ลดลงนี้สอดคล้องกับการยับยั้งการเกิดไกลเคชั่นและปริมาณฟรุกโตซามีนลดลงด้วย

ระหว่างโปรตีน amyloid และน้ำตาลฟรุกโตส ทำให้โปรตีน amyloid มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจากโปรตีนหุติยภูมิที่มีโครงสร้างเป็นเกลียวหรือลักษณะของ helical protein เกิดการยืดออกเป็นแผ่นหรือ beta sheet แทน กลายเป็น cross beta amyloid structure ซึ่งโปรตีนตัวนี้สามารถไปเกิดปฏิกิริยาไกลเคชั่นหรือเกิดการเชื่อมต่อกับ amyloid ตัวอื่นได้ต่อไปเรื่อยๆ และเมื่อมีการสะสมของ beta sheet มากขึ้น ก็จะเกิดการเกาะกลุ่มเป็นไฟบริลที่ไม่ละลายน้ำ และกลายเป็น amyloid plaque ที่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่างๆต่อไป เช่น โรคอัลไซเมอร์ โรคเบาหวาน พาร์กินสัน (Sasaki et al., 1998) ยังพบว่าการทำให้โครงสร้างของโปรตีนอัลบูมินมี cross beta amyloid เพิ่มขึ้น มีผลให้สภาพการทำงานของอัลบูมินผิดปกติ ความสามารถในการจับกับสารเคมี วิตามิน ผิดปกติไป นอกจากนี้ยังพบว่าการเกิด cross beta amyloid เหนี่ยวนำให้เกิดโปรตีน aggregation มีรายงานว่าอาจส่งผลต่อการทำลายหรือทำให้เซลล์เบต้าบาดเจ็บ การหลั่งอินซูลินจะลดลงและเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคเบาหวาน (Chiti et al., 2006; Uversky et al., 2004)

มีการรายงานก่อนหน้านี้พบว่า สารที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระช่วยลดการเกิด cross beta amyloid structure เนื่องจากยับยั้งการเกิดกระบวนการไกลเคชั่นผ่านทางกลไกการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน รวมทั้งช่วยลดการเกิดภาวะ oxidative stress ได้ (Prasad et al., 2004) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในการศึกษาครั้งนี้ คือ สารสกัดจากส้มโอซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระสามารถช่วยลดปริมาณ cross beta amyloid structure ได้ เนื่องจากสารสกัดจากเปลือกงุ่นแดงมีส่วนประกอบของสารฟลาโวนอยด์ ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณที่สูง จึงสามารถยับยั้งปฏิกิริยาไกลเคชั่น ด้วยการดักจับอนุมูลอิสระและโลหะหนักในช่วงการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและปฏิกิริยาไกลคอกซิเดชัน ทำให้มีสารประเภท reactive intermediates ลดลงและส่งผลให้ปริมาณของ glycated amyloid ลดลงไปด้วย

ตารางที่ 17 ปริมาณการเกิดโครงสร้าง β -amyloid ในอัลบูมินเมื่อมีสารสกัดจากเนื้อสมองของหนูขาวใหญ่

ปริมาณโครงสร้าง β -amyloid (435/485 nm)				
	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
กลุ่มควบคุม	2,946 $\pm$ 71.63	3,808 $\pm$ 208.85	4,371 $\pm$ 103.24	5,156 $\pm$ 24.92
ขาวใหญ่ 0.25 mg/ml	2,020 $\pm$ 60.41 [#]	2,934 $\pm$ 36.84 ^{#*}	2,965 $\pm$ 286.70 ^{#*}	3,295 $\pm$ 59 ^{#*}
ขาวใหญ่ 0.50 mg/ml	1,725 $\pm$ 32.62 [#]	2,113 $\pm$ 49 ^{#*}	2,090 $\pm$ 67.58 ^{#*}	2,603 $\pm$ 200 ^{#*}
ขาวใหญ่ 0.75 mg/ml	1,697 $\pm$ 190.97 ^{#*}	1,999 $\pm$ 88.88 ^{#*}	1,597 $\pm$ 21.96 ^{#*}	2,169 $\pm$ 124.30 ^{#*}
ขาวใหญ่ 1.00 mg/ml	1,545 $\pm$ 20.48 ^{#*}	1,337 $\pm$ 50.45 ^{#*}	1,578 $\pm$ 40.34 ^{#*}	1,829 $\pm$ 181.47 ^{#*}
ขาวใหญ่ 1.50 mg/ml	1,210 $\pm$ 29.79 ^{#*}	1,454 $\pm$ 106.78 ^{#*}	1,415 $\pm$ 82.11 ^{#*}	1,696 $\pm$ 148.94 ^{#*}
ขาวใหญ่ 2.00 mg/ml	829 $\pm$ 111.90 ^{#*}	1,082 $\pm$ 32.27 ^{#*}	1,308 $\pm$ 111.19 ^{#*}	1,506 $\pm$ 117.23 ^{#*}
AG 0.50 mg/ml	2,878 $\pm$ 40.38	3,713 $\pm$ 311.67	4,019 $\pm$ 111.32	4,203 $\pm$ 147.87
AG 1.00 mg/ml	2,643 $\pm$ 45.26	3,456 $\pm$ 367.52	3,658 $\pm$ 132.55	3,949 $\pm$ 101.10

ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean $\pm$ S.E.M) n = 3

AG = aminoguanidine กลุ่มควบคุม = BSA+น้ำตาลฟรุกโตส [#]P<0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม *P<0.05 เปรียบเทียบกับ AG ที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 18 ปริมาณการเกิดโครงสร้าง β -amyloid ในอัลบูมินเมื่อมีสารสกัดจากเนื้อสมองของหนูทองดี

ปริมาณโครงสร้าง β -amyloid (435/485 nm))				
	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
กลุ่มควบคุม	2,946 $\pm$ 71.63	3,808 $\pm$ 208.85	4,371 $\pm$ 103.24	5,156 $\pm$ 24.92
ทองดี 0.25 mg/ml	1,099 $\pm$ 148.43 ^{#*}	1,340 $\pm$ 48.06 ^{#*}	1,392 $\pm$ 293.55 ^{#*}	1,638 $\pm$ 293.55 ^{#*}
ทองดี 0.50 mg/ml	615 $\pm$ 134.54 ^{#*}	1,295 $\pm$ 180.82 ^{#*}	1,384 $\pm$ 51.32 ^{#*}	1,553 $\pm$ 92.45 ^{#*}
ทองดี 0.75 mg/ml	573 $\pm$ 16.99 ^{#*}	1,104 $\pm$ 110.20 ^{#*}	1,296 $\pm$ 213.27 ^{#*}	1,423 $\pm$ 51.32 ^{#*}
ทองดี 1.00 mg/ml	493 $\pm$ 68.20 ^{#*}	1,007 $\pm$ 331.20 ^{#*}	1,218 $\pm$ 92.55 ^{#*}	1,372 $\pm$ 213.27 ^{#*}
ทองดี 1.50 mg/ml	401 $\pm$ 84.87 ^{#*}	889 $\pm$ 202.47 ^{#*}	592 $\pm$ 230.96 ^{#*}	1040 $\pm$ 92.55 ^{#*}
ทองดี 2.00 mg/ml	358 $\pm$ 22 ^{#*}	419 $\pm$ 338.34 ^{#*}	520 $\pm$ 72.16 ^{#*}	901 $\pm$ 230.96 ^{#*}
AG 0.50 mg/ml	2,878 $\pm$ 40.38	3,713 $\pm$ 311.67	4,019 $\pm$ 111.32	4,203 $\pm$ 147.87
AG 1.00 mg/ml	2,643 $\pm$ 45.26	3,456 $\pm$ 367.52	3,658 $\pm$ 132.55	3,949 $\pm$ 101.10

ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean $\pm$ S.E.M) n = 3

AG = aminoguanidine กลุ่มควบคุม = BSA+น้ำตาลฟรุกโตส [#]P<0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม *P<0.05 เปรียบเทียบกับ AG ที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 19 ปริมาณการเกิดโครงสร้าง β -amyloid ในอัลบูมินเมื่อมีสารสกัดจากเนื้อสมองของหนูขาวแดงขาว

ปริมาณโครงสร้าง β -amyloid (435/485 nm))				
	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
กลุ่มควบคุม	2,946 $\pm$ 71.63	3,808 $\pm$ 208.85	4,371 $\pm$ 103.24	5,156 $\pm$ 24.92
ขาวแดงขาว0.25 mg/ml	1,560 $\pm$ 100.6 ^{#*}	2,014 $\pm$ 271.91 ^{#*}	2,293 $\pm$ 126.51 ^{#*}	3,283 $\pm$ 54.87 ^{#*}
ขาวแดงขาว0.50 mg/ml	1,380 $\pm$ 91.92 ^{#*}	1,520 $\pm$ 155.83 ^{#*}	1,891 $\pm$ 84.72 ^{#*}	2,314 $\pm$ 383.11 ^{#*}
ขาวแดงขาว0.75 mg/ml	1,207 $\pm$ 113.35 ^{#*}	1,482 $\pm$ 161.38 ^{#*}	1,619 $\pm$ 138.78 ^{#*}	1,908 $\pm$ 143.59 ^{#*}
ขาวแดงขาว1.00 mg/ml	548 $\pm$ 186.36 ^{#*}	1,121 $\pm$ 18.67 ^{#*}	1,381 $\pm$ 61.55 ^{#*}	1,681 $\pm$ 430.19 ^{#*}
ขาวแดงขาว1.50 mg/ml	433 $\pm$ 294.77 ^{#*}	646 $\pm$ 58.77 ^{#*}	1,115 $\pm$ 100 ^{#*}	1,289 $\pm$ 256.75 ^{#*}
ขาวแดงขาว2.00 mg/ml	269 $\pm$ 86.10 ^{#*}	362 $\pm$ 181.78 ^{#*}	754 $\pm$ 331.11 ^{#*}	831 $\pm$ 165.33 ^{#*}
AG 0.50 mg/ml	2,878 $\pm$ 40.38	3,713 $\pm$ 311.67	4,019 $\pm$ 111.32	4,203 $\pm$ 147.87
AG 1.00 mg/ml	2,643 $\pm$ 45.26	3,456 $\pm$ 367.52	3,658 $\pm$ 132.55	3,949 $\pm$ 101.10

ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean $\pm$ S.E.M) n = 3

AG = aminoguanidine กลุ่มควบคุม = BSA+น้ำตาลฟรุกโตส [#]P<0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม *P<0.05 เปรียบเทียบกับ AG ที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 20 ปริมาณการเกิดโครงสร้าง β -amyloid ในอัลบูมินเมื่อมีสารสกัดจากเนื้อสมองของหนูขาวน้ำผึ้ง

ปริมาณโครงสร้าง β -amyloid (435/485 nm))				
	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
กลุ่มควบคุม	2,946 $\pm$ 71.63	3,808 $\pm$ 208.85	4,371 $\pm$ 103.24	5,156 $\pm$ 24.92
ขาวน้ำผึ้ง 0.25 mg/ml	18,446 $\pm$ 91.80 ^{#*}	2,077 $\pm$ 51.54 ^{#*}	3,245 $\pm$ 26.59 ^{#*}	3,306 $\pm$ 52.48 ^{#*}
ขาวน้ำผึ้ง 0.50 mg/ml	1,616 $\pm$ 70.59 ^{#*}	1,731 $\pm$ 101.66 ^{#*}	2,427 $\pm$ 172.83 ^{#*}	3,110 $\pm$ 236.04 ^{#*}
ขาวน้ำผึ้ง 0.75 mg/ml	1,536 $\pm$ 115.57 ^{#*}	1,680 $\pm$ 112.15 ^{#*}	2,301 $\pm$ 167.12 ^{#*}	2,637 $\pm$ 218.88 ^{#*}
ขาวน้ำผึ้ง 1.00 mg/ml	1,478 $\pm$ 210.25 ^{#*}	1,584 $\pm$ 42.49 ^{#*}	1,689 $\pm$ 86.91 ^{#*}	1,815 $\pm$ 66.64 ^{#*}
ขาวน้ำผึ้ง 1.50 mg/ml	1,342 $\pm$ 221.97 ^{#*}	1,472 $\pm$ 266.16 ^{#*}	1,576 $\pm$ 73.39 ^{#*}	1,676 $\pm$ 184.32 ^{#*}
ขาวน้ำผึ้ง 2.00 mg/ml	1,296 $\pm$ 156.39 ^{#*}	1,394 $\pm$ 133.72 ^{#*}	1,477 $\pm$ 188.37 ^{#*}	1,584 $\pm$ 113.88 ^{#*}
AG 0.50 mg/ml	2,878 $\pm$ 40.38	3,713 $\pm$ 311.67	4,019 $\pm$ 111.32	4,203 $\pm$ 147.87
AG 1.00 mg/ml	2,643 $\pm$ 45.26	3,456 $\pm$ 367.52	3,658 $\pm$ 132.55	3,949 $\pm$ 101.10

ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean $\pm$ S.E.M) n = 3

AG = aminoguanidine กลุ่มควบคุม = BSA+น้ำตาลฟรุกโตส [#]P<0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม *P<0.05 เปรียบเทียบกับ AG ที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 21 ปริมาณการเกิดโครงสร้าง β -amyloid ในอัลบูมินเมื่อมีสารสกัดจากเนื้อสมองฮิปโปแคมปัส

ปริมาณโครงสร้าง β -amyloid (435/485 nm))				
	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
กลุ่มควบคุม	2,946 $\pm$ 71.63	3,808 $\pm$ 208.85	4,371 $\pm$ 103.24	5,156 $\pm$ 24.92
ทำช่อง 0.25 mg/ml	1,800 $\pm$ 20.9 ^{#*}	1,894 $\pm$ 59.41 ^{#*}	2,294 $\pm$ 30.66 ^{#*}	2,683 $\pm$ 275.39 ^{#*}
ทำช่อง 0.50 mg/ml	1,721 $\pm$ 20.67 ^{#*}	1,781 $\pm$ 18.5 ^{#*}	2,219 $\pm$ 97.59 ^{#*}	2,599 $\pm$ 123.14 ^{#*}
ทำช่อง 0.75 mg/ml	1,699 $\pm$ 10.82 ^{#*}	1,756 $\pm$ 113.88 ^{#*}	2,163 $\pm$ 62.13 ^{#*}	2,5087 $\pm$ 5.61 ^{#*}
ทำช่อง 1.00 mg/ml	1,641 $\pm$ 25.83 ^{#*}	1,735 $\pm$ 120.8 ^{#*}	1,915 $\pm$ 20.03 ^{#*}	2,286 $\pm$ 77.51 ^{#*}
ทำช่อง 1.50 mg/ml	1,510 $\pm$ 10.67 ^{#*}	1,615 $\pm$ 99.7 ^{#*}	1,747 $\pm$ 208.73 ^{#*}	2,043.67 $\pm$ 64.38 ^{#*}
ทำช่อง 2.00 mg/ml	1,286 $\pm$ 8.41 ^{#*}	1,456 $\pm$ 17.16 ^{#*}	1,693 $\pm$ 182.18 ^{#*}	1,764.67 $\pm$ 152.88 ^{#*}
AG 0.50 mg/ml	2,878 $\pm$ 40.38	3,713 $\pm$ 311.67	4,019 $\pm$ 111.32	4,203 $\pm$ 147.87
AG 1.00 mg/ml	2,643 $\pm$ 45.26	3,456 $\pm$ 367.52	3,658 $\pm$ 132.55	3,949 $\pm$ 101.10

ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean $\pm$ S.E.M) n = 3

AG = aminoguanidine กลุ่มควบคุม = BSA+น้ำตาลฟรุกโตส [#]P<0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม *P<0.05 เปรียบเทียบกับ AG ที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 22 ปริมาณการเกิดโครงสร้าง β -amyloid ในอัลบูมินเมื่อมีสารสกัดจากเนื้อสมองฮิปโปแคมปัส

ปริมาณโครงสร้าง β -amyloid (435/485 nm))				
	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
กลุ่มควบคุม	2,946 $\pm$ 71.63	3,808 $\pm$ 208.85	4,371 $\pm$ 103.24	5,156 $\pm$ 24.92
ทำช่อง 0.25 mg/ml	1,805 $\pm$ 120.50 ^{#*}	2,608 $\pm$ 122.58 ^{#*}	3,241 $\pm$ 72.34	4,273 $\pm$ 67.27
ทำช่อง 0.50 mg/ml	1,793 $\pm$ 133.41 ^{#*}	2,527 $\pm$ 20.22 ^{#*}	3,104 $\pm$ 25.20 ^{#*}	3,780 $\pm$ 138.84
ทำช่อง 0.75 mg/ml	1,762 $\pm$ 55.43 ^{#*}	2,443 $\pm$ 37.55 ^{#*}	2,635 $\pm$ 40.25 ^{#*}	3,500 $\pm$ 58.01
ทำช่อง 1.00 mg/ml	1,718 $\pm$ 29.55 ^{#*}	2,243 $\pm$ 109.88 ^{#*}	2,493 $\pm$ 72.43 ^{#*}	3,115 $\pm$ 35.53 ^{#*}
ทำช่อง 1.50 mg/ml	1,693 $\pm$ 44.44 ^{#*}	1,931 $\pm$ 62.76 ^{#*}	2,227 $\pm$ 13.5 ^{#*}	2,852 $\pm$ 167.75 ^{#*}
ทำช่อง 2.00 mg/ml	1,671 $\pm$ 38.63 ^{#*}	1,885 $\pm$ 169.01 ^{#*}	2,104 $\pm$ 37 ^{#*}	2,406 $\pm$ 127.87 ^{#*}
AG 0.50 mg/ml	2,878 $\pm$ 40.38	3,713 $\pm$ 311.67	4,019 $\pm$ 111.32	4,203 $\pm$ 147.87
AG 1.00 mg/ml	2,643 $\pm$ 45.26	3,456 $\pm$ 367.52	3,658 $\pm$ 132.55	3,949 $\pm$ 101.10

ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean $\pm$ S.E.M) n = 3

AG = aminoguanidine กลุ่มควบคุม = BSA+น้ำตาลฟรุกโตส [#]P<0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม *P<0.05 เปรียบเทียบกับ AG ที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

การป้องกันโครงสร้าง thiol และการยับยั้งการเกิดโปรตีน carbonyl ในโปรตีนอัลบูมินของสกัดจากเนื้อส้มโอ

การเกิดปฏิกิริยาไกลเคชันจะส่งผลโดยตรงต่อโปรตีนอัลบูมิน จะเหนี่ยวนำให้โปรตีนเสียสภาพทำให้ปริมาณ thiol group ที่อยู่ในโครงสร้างเปลี่ยนแปลงไป ปริมาณโครงสร้าง thiol group จะลดลงเมื่อปฏิกิริยาไกลเคชันเกิดขึ้นระหว่างวันที่ 7 ถึง วันที่ 28 (ตารางที่ 23) ในทางตรงข้ามกันพบว่าน้ำตาลฟรุกโตสสามารถเหนี่ยวนำให้โปรตีนเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้เช่นกัน ทำให้เกิดโครงสร้าง carbonyl ขึ้นภายในโครงสร้าง ซึ่งสามารถสังเกตได้จากปฏิกิริยาไกลเคชันที่เกิดขึ้นระหว่างวันที่ 7 ถึง 28 (ตารางที่ 29) จากผลทดลองสารสกัดเนื้อส้มโอสายพันธุ์ต่างมีประสิทธิภาพในการรักษาโครงสร้าง thiol ของโปรตีนอัลบูมิน และลดปริมาณ carbonyl ตามความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น การเพิ่มขึ้นของโครงสร้าง thiol นั้นสอดคล้องกับปริมาณ carbonyl ที่ลดลง

โปรตีนคาร์บอนิลเป็นผลจากเกิดโปรตีนออกซิเดชัน (protein oxidation) ในระยะ intermediate ของกระบวนการไกลเคชัน ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดอนุมูลอิสระ และ Reactive oxygen species (ROS) จากนั้นจะทำให้เกิดภาวะ oxidative stress ปฏิกิริยาออกซิเดชันของกระบวนการไกลเคชันสามารถเกิดได้จากขั้นตอน ได้แก่ 1) ปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารเริ่มต้นต่างๆ เช่น น้ำตาล หมู่อะมิโน ไซมัน หรือสาร schiff base และ 2) ปฏิกิริยาไกลคอกซิเดชันของ amadori product ซึ่งทั้ง 2 ปฏิกิริยาทำให้เกิดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์และสารประกอบคาร์บอนิลซึ่งเป็นสาร reactive intermediates หรือ AGEs precursor จากนั้นสารประกอบคาร์บอนิลจะเข้าไปจับกับหมู่อะมิโนอื่นๆ โดยทำให้เกิดการจัดเรียงโครงสร้างใหม่และกลายเป็น AGEs ต่อไป ดังนั้นการเกิดอนุมูลอิสระ ROS จำนวนมาก จึงบอกถึงการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน รวมทั้งการเกิดโปรตีนคาร์บอนิลซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญถึงความเสียหายของโปรตีนอันเนื่องมาจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Stadtman et al., 2000) ในขณะที่โปรตีน thiol เป็นโปรตีนอิสระ เมื่อเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือเกิดโปรตีนออกซิเดชัน จะส่งผลให้โปรตีน thiol เปลี่ยนแปลงโครงสร้างและเกิดอนุมูลอิสระขึ้นมา ซึ่งหากเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นจำนวนมากก็จะเกิดภาวะ oxidative stress การลดลงหรือการสูญเสียโปรตีน thiol จึงเป็นการบ่งชี้ถึงความรุนแรงของกระบวนการไกลเคชันเนื่องจากโปรตีนออกซิเดชันอีกทางหนึ่ง (Telci et al., 2000)

สารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ โดยทั่วไปเป็นสารต้านออกซิเดชัน สามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือปฏิกิริยาไกลคอกซิเดชัน ด้วยการดักจับอนุมูลอิสระและไอออนของโลหะ หรือทำลายอนุมูลอิสระให้มีความว่องไวลดลง ฟลาโวนอยด์ ที่พบในสารสกัดส้มโอนั้น ได้แก่ naringin naringenin hesperidin มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี (Wang et al., 2012; Nandakumar et al., 2011) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองนี้ คือสารสกัดจากเนื้อส้มโอช่วยลดปริมาณโปรตีนคาร์บอนิลและสามารถลดการสูญเสียโปรตีน thiol ได้ กลไกที่ช่วยลดการเกิดไกลเคชันและออกซิเดชันอาจมาจากความสามารถของสารฟลาโวนอยด์ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยยับยั้งกระบวนการไกลเคชันในระยะ intermediate glycation ได้ ช่วยลดปริมาณโปรตีนคาร์บอนิล และช่วยลดการสูญเสียโปรตีน thiol ได้

ตารางที่ 23 ปริมาณโครงสร้าง thiol ในอัลบูมินเมื่อมีสารสกัดจากเนื้อส้มโอสายพันธุ์ขาวใหญ่

ปริมาณ thiol (nmol/mg protein)				
	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
กลุ่มควบคุม	2.14 ± 0.14	1.81 ± 0.14	1.42 ± 0.22	1.29 ± 0.17
ขาวใหญ่ 0.25 mg/ml	2.15 ± 0.20	1.55 ± 0.20	1.38 ± 0.25	0.76 ± 0.36
ขาวใหญ่ 0.50 mg/ml	2.29 ± 0.83	1.88 ± 0.83	1.45 ± 0.38	0.81 ± 0.13
ขาวใหญ่ 0.75 mg/ml	2.39 ± 0.49	2.04 ± 0.49	1.58 ± 0.41	0.99 ± 0.28
ขาวใหญ่ 1.00 mg/ml	2.50 ± 1.08 [#]	2.14 ± 1.08 [#]	1.62 ± 0.21	1.16 ± 0.15
ขาวใหญ่ 1.50 mg/ml	2.71 ± 0.74 [#]	2.23 ± 0.74 [#]	1.80 ± 0.56 [#]	1.38 ± 0.34 [#]
ขาวใหญ่ 2.00 mg/ml	2.99 ± 0.49 ^{#*}	2.42 ± 0.49 [#]	1.92 ± 0.74 [#]	1.55 ± 0.28 [#]
AG 0.50 mg/ml	2.38 ± 0.12	1.66 ± 0.12	1.32 ± 0.61	1.06 ± 0.60
AG 1.00 mg/ml	2.46 ± 0.08 [#]	2.20 ± 0.08 [#]	1.97 ± 0.58 [#]	1.54 ± 0.48 [#]

ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean ± S.E.M) n = 3

AG = aminoguanidine กลุ่มควบคุม = BSA+น้ำตาลฟรุกโตส [#]P<0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม *P<0.05 เปรียบเทียบกับ AG ที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 24 ปริมาณโครงสร้าง thiol ในอัลบูมินเมื่อมีสารสกัดจากเนื้อส้มโอสายพันธุ์ทองดี

ปริมาณ thiol (nmol/mg protein)				
	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
กลุ่มควบคุม	2.14 ± 0.14	1.81 ± 0.14	1.42 ± 0.22	1.29 ± 0.17
ทองดี 0.25 mg/ml	2.46 ± 0.16	2.05 ± 0.06	1.72 ± 0.14	1.31 ± 0.21
ทองดี 0.50 mg/ml	2.55 ± 0.11 [#]	2.23 ± 0.17 [#]	1.96 ± 0.47 [#]	1.57 ± 0.21 [#]
ทองดี 0.75 mg/ml	2.70 ± 0.17 [#]	2.36 ± 0.16 [#]	2.03 ± 0.05 [#]	1.70 ± 0.20 [#]
ทองดี 1.00 mg/ml	2.60 ± 0.42 [#]	2.33 ± 0.22 [#]	1.80 ± 0.14	1.52 ± 0.20
ทองดี 1.50 mg/ml	2.93 ± 0.14 [#]	2.65 ± 0.51 [#]	2.38 ± 0.10 [#]	2.06 ± 0.20 [#]
ทองดี 2.00 mg/ml	3.06 ± 0.08 [#]	2.89 ± 0.17 [#]	2.46 ± 0.15 ^{#*}	2.23 ± 0.11 ^{#*}
AG 0.50 mg/ml	2.38 ± 0.12	1.66 ± 0.12	1.32 ± 0.61	1.06 ± 0.60
AG 1.00 mg/ml	2.46 ± 0.08 [#]	2.20 ± 0.08 [#]	1.97 ± 0.58 [#]	1.54 ± 0.48 [#]

ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean ± S.E.M) n = 3

AG = aminoguanidine กลุ่มควบคุม = BSA+น้ำตาลฟรุกโตส [#]P<0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม *P<0.05 เปรียบเทียบกับ AG ที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 25 ปริมาณโครงสร้าง thiol ในอัลบูมินเมื่อมีสารสกัดจากเนื้อส้มโอสายพันธุ์ขาวแตงกวา

ปริมาณ thiol (nmol/mg protein)				
	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
กลุ่มควบคุม	2.14 ± 0.14	1.81 ± 0.14	1.42 ± 0.22	1.29 ± 0.17
ขาวแตงกวา 0.25 mg/ml	2.04 ± 0.22	1.85 ± 0.75	1.62 ± 0.39	1.08 ± 0.09 [#]
ขาวแตงกวา 0.50 mg/ml	2.23 ± 0.29	1.96 ± 0.26	1.75 ± 0.44	1.13 ± 0.05 [#]
ขาวแตงกวา 0.75 mg/ml	2.36 ± 0.25	2.20 ± 0.79 [#]	1.86 ± 0.08	1.30 ± 0.11 [#]
ขาวแตงกวา 1.00 mg/ml	2.84 ± 0.11 [#]	2.63 ± 0.18 [#]	2.00 ± 0.15 [#]	1.64 ± 0.64 [#]
ขาวแตงกวา 1.50 mg/ml	2.94 ± 0.10 [#]	2.85 ± 0.28 [#]	2.10 ± 0.18 [#]	1.92 ± 0.28 [#]
ขาวแตงกวา 2.00 mg/ml	3.06 ± 0.25 [#]	2.94 ± 0.12 [#]	2.36 ± 0.10 [#]	2.20 ± 0.17 ^{#*}
AG 0.50 mg/ml	2.38 ± 0.12	1.66 ± 0.12	1.32 ± 0.61	1.06 ± 0.60
AG 1.00 mg/ml	2.46 ± 0.08 [#]	2.20 ± 0.08 [#]	1.97 ± 0.58 [#]	1.54 ± 0.48 [#]

ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean ± S.E.M) n = 3

AG = aminoguanidine กลุ่มควบคุม = BSA+น้ำตาลฟรุคโตส [#]P<0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม *P<0.05 เปรียบเทียบกับ AG ที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 26 ปริมาณโครงสร้าง thiol ในอัลบูมินเมื่อมีสารสกัดจากเนื้อส้มโอสายพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง

ปริมาณ thiol (nmol/mg protein)				
	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
กลุ่มควบคุม	2.14 ± 0.14	1.81 ± 0.14	1.42 ± 0.22	1.29 ± 0.17
ขาวน้ำผึ้ง 0.25 mg/ml	1.93 ± 0.73	1.72 ± 1.02	1.26 ± 0.32	1.13 ± 0.71
ขาวน้ำผึ้ง 0.50 mg/ml	2.09 ± 0.41	2.08 ± 0.25	1.32 ± 0.54	1.22 ± 0.41
ขาวน้ำผึ้ง 0.75 mg/ml	2.32 ± 0.70	2.22 ± 0.91 [#]	1.42 ± 0.12	1.32 ± 0.21
ขาวน้ำผึ้ง 1.00 mg/ml	2.50 ± 0.40 [#]	2.34 ± 0.30 [#]	1.80 ± 0.73 [#]	1.58 ± 0.14
ขาวน้ำผึ้ง 1.50 mg/ml	2.76 ± 0.08 [#]	2.45 ± 0.07 [#]	1.99 ± 0.43 [#]	1.72 ± 0.58 [#]
ขาวน้ำผึ้ง 2.00 mg/ml	2.92 ± 0.40 [#]	2.56 ± 0.39 [#]	2.15 ± 0.27 [#]	1.87 ± 0.36 [#]
AG 0.50 mg/ml	2.38 ± 0.12	1.66 ± 0.12	1.32 ± 0.61	1.06 ± 0.60
AG 1.00 mg/ml	2.46 ± 0.08 [#]	2.20 ± 0.08 [#]	1.97 ± 0.58 [#]	1.54 ± 0.48 [#]

ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean ± S.E.M) n = 3

AG = aminoguanidine กลุ่มควบคุม = BSA+น้ำตาลฟรุคโตส [#]P<0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม *P<0.05 เปรียบเทียบกับ AG ที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 27 ปริมาณโครงสร้าง thiol ในอัลบูมินเมื่อมีสารสกัดจากเนื้อส้มโอสายพันธุ์ท่าซ้อย

ปริมาณ thiol (nmol/mg protein)				
	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
กลุ่มควบคุม	2.14 ± 0.14	1.81 ± 0.14	1.42 ± 0.22	1.29 ± 0.17
ท่าซ้อย 0.25 mg/ml	2.26 ± 0.12	2.16 ± 0.19	1.20 ± 0.24	0.98 ± 0.02
ท่าซ้อย 0.50 mg/ml	2.40 ± 0.41	2.21 ± 0.37*	1.24 ± 0.25	1.04 ± 0.03
ท่าซ้อย 0.75 mg/ml	2.57 ± 0.23 [#]	2.35 ± 0.43 [#]	1.33 ± 0.46*	1.08 ± 0.05
ท่าซ้อย 1.00 mg/ml	2.72 ± 0.23 [#]	2.39 ± 0.14 [#]	1.52 ± 0.54 [#]	1.25 ± 0.08 [#]
ท่าซ้อย 1.50 mg/ml	2.61 ± 0.41 [#]	2.43 ± 0.11 [#]	1.84 ± 0.72 [#]	1.18 ± 0.21 [#]
ท่าซ้อย 2.00 mg/ml	2.80 ± 0.76 [#]	2.49 ± 0.21 [#]	1.83 ± 0.02 [#]	1.39 ± 0.07 [#]
AG 0.50 mg/ml	2.38 ± 0.12	1.66 ± 0.12	1.32 ± 0.61	1.06 ± 0.60
AG 1.00 mg/ml	2.46 ± 0.08 [#]	2.20 ± 0.08 [#]	1.97 ± 0.58 [#]	1.54 ± 0.48 [#]

ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean ± S.E.M) n = 3

AG = aminoguanidine กลุ่มควบคุม = BSA+น้ำตาลฟรุคโตส [#]P<0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม *P<0.05 เปรียบเทียบกับ AG ที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 28 ปริมาณโครงสร้าง thiol ในอัลบูมินเมื่อมีสารสกัดจากเนื้อส้มโอสายพันธุ์ทับทิมสยาม

ปริมาณ thiol (nmol/mg protein)				
	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
กลุ่มควบคุม	2.14 ± 0.14	1.81 ± 0.14	1.42 ± 0.22	1.29 ± 0.17
ทับทิมสยาม 0.25 mg/ml	2.01 ± 0.06	1.45 ± 0.23	1.37 ± 0.19	1.06 ± 0.13
ทับทิมสยาม 0.50 mg/ml	2.03 ± 0.18	1.67 ± 0.21	1.49 ± 0.23	1.24 ± 0.08
ทับทิมสยาม 0.75 mg/ml	2.11 ± 0.08	1.79 ± 0.21	1.60 ± 0.09	1.30 ± 0.02
ทับทิมสยาม 1.00 mg/ml	2.19 ± 0.32	2.03 ± 0.32	1.70 ± 0.08 [#]	1.60 ± 0.50
ทับทิมสยาม 1.50 mg/ml	2.47 ± 0.27 [#]	2.22 ± 0.53 [#]	1.83 ± 0.27 [#]	1.66 ± 0.23 [#]
ทับทิมสยาม 2.00 mg/ml	2.78 ± 0.26 [#]	2.52 ± 0.44 [#]	2.2 ± 0.34 [#]	1.80 ± 0.02 [#]
AG 0.50 mg/ml	2.38 ± 0.12	1.66 ± 0.12	1.32 ± 0.61	1.06 ± 0.60
AG 1.00 mg/ml	2.46 ± 0.08 [#]	2.20 ± 0.08 [#]	1.97 ± 0.58 [#]	1.54 ± 0.48 [#]

ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean ± S.E.M) n = 3

AG = aminoguanidine กลุ่มควบคุม = BSA+น้ำตาลฟรุคโตส [#]P<0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม *P<0.05 เปรียบเทียบกับ AG ที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 29 ปริมาณโครงสร้าง carbonyl ในอัลบูมินเมื่อมีสารสกัดจากเนื้อส้มโอสายพันธุ์ขาวใหญ่

ปริมาณ carbonyl (nmol/mg protein)				
	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
กลุ่มควบคุม	16.28 ± 0.88	21.13 ± 1.05	23.47 ± 1.27	26.28 ± 3.22
ขาวใหญ่ 0.25 mg/ml	9.87 ± 0.22 [#]	13.31 ± 0.76	16.58 ± 0.55	28.48 ± 0.31
ขาวใหญ่ 0.50 mg/ml	9.37 ± 1.49 [#]	11.45 ± 0.47 [#]	14.04 ± 0.46	27.30 ± 0.45
ขาวใหญ่ 0.75 mg/ml	8.31 ± 0.75 [#]	9.47 ± 0.76	13.50 ± 0.72	24.24 ± 0.57
ขาวใหญ่ 1.00 mg/ml	7.70 ± 0.59 [#]	8.30 ± 1.40 ^{#*}	12.81 ± 0.60 [#]	23.86 ± 0.60
ขาวใหญ่ 1.50 mg/ml	6.77 ± 0.46 [#]	7.88 ± 0.98 ^{#*}	11.86 ± 0.49 [#]	21.02 ± 0.69
ขาวใหญ่ 2.00 mg/ml	5.63 ± 0.45 ^{#*}	7.51 ± 1.24 ^{#*}	10.38 ± 0.25 [#]	18.80 ± 0.36 [#]
AG 0.50 mg/ml	8.25 ± 1.11 [#]	16.44 ± 0.71 [#]	15.11 ± 0.56 [#]	23.34 ± 3.48
AG 1.00 mg/ml	7.86 ± 0.88 [#]	14.48 ± 2.29 [#]	16.89 ± 2.46 [#]	20.69 ± 2.24 [#]

ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean ± S.E.M) n = 3

AG = aminoguanidine กลุ่มควบคุม = BSA+น้ำตาลฟรุกโตส [#]P<0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม *P<0.05 เปรียบเทียบกับ AG ที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 30 ปริมาณโครงสร้าง carbonyl ในอัลบูมินเมื่อมีสารสกัดจากเนื้อส้มโอสายพันธุ์ทองดี

ปริมาณ carbonyl (nmol/mg protein)				
	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
กลุ่มควบคุม	16.28 ± 0.88	21.13 ± 1.05	23.47 ± 1.27	26.28 ± 3.22
ทองดี 0.25 mg/ml	7.99 ± 0.58	16.91 ± 0.40	26.13 ± 3.08	31.44 ± 3.42
ทองดี 0.50 mg/ml	7.43 ± 0.32 [#]	15.96 ± 1.02	25.80 ± 2.01	30.13 ± 1.64
ทองดี 0.75 mg/ml	7.07 ± 0.56 [#]	14.02 ± 1.45	24.31 ± 1.66	27.48 ± 1.65
ทองดี 1.00 mg/ml	6.14 ± 0.85 [#]	13.91 ± 1.51 [#]	19.58 ± 1.88	22.98 ± 2.81
ทองดี 1.50 mg/ml	5.51 ± 0.52 [#]	12.54 ± 1.78 [#]	21.20 ± 2.18	24.43 ± 1.21
ทองดี 2.00 mg/ml	4.75 ± 0.94 ^{#*}	11.90 ± 1.23 [#]	16.89 ± 2.67	20.36 ± 1.92
AG 0.50 mg/ml	8.25 ± 1.11 [#]	16.44 ± 0.71 [#]	15.11 ± 0.56	23.34 ± 3.48
AG 1.00 mg/ml	7.86 ± 0.88 [#]	14.48 ± 2.29 [#]	16.89 ± 2.46 [#]	20.69 ± 2.24 [#]

ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean ± S.E.M) n = 3

AG = aminoguanidine กลุ่มควบคุม = BSA+น้ำตาลฟรุกโตส [#]P<0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม *P<0.05 เปรียบเทียบกับ AG ที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 31 ปริมาณโครงสร้าง carbonyl ในอัลบูมินเมื่อมีสารสกัดจากเนื้อส้มโอสายพันธุ์ขาวแตงกวา

ปริมาณ carbonyl (nmol/mg protein)				
	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
กลุ่มควบคุม	16.28 ± 0.88	21.13 ± 1.05	23.47 ± 1.27	26.28 ± 3.22
ขาวแตงกวา0.25 mg/ml	11.73 ± 3.91 [#]	21.37 ± 0.39	20.06 ± 2.20	31.95 ± 2.24
ขาวแตงกวา0.50 mg/ml	11.45 ± 1.18 [#]	19.49 ± 1.58	19.12 ± 0.38	30.71 ± 1.43
ขาวแตงกวา0.75 mg/ml	10.72 ± 1.59 [#]	17.87 ± 0.51	17.93 ± 3.14	28.20 ± 1.90
ขาวแตงกวา1.00 mg/ml	9.01 ± 0.43 [#]	15.98 ± 1.28 [#]	17.04 ± 2.20 [#]	24.61 ± 0.84
ขาวแตงกวา1.50 mg/ml	8.71 ± 1.56 [#]	14.80 ± 1.63 [#]	16.64 ± 1.07	22.83 ± 1.76
ขาวแตงกวา2.00 mg/ml	7.79 ± 1.22 [#]	13.72 ± 0.99 [#]	15.83 ± 0.42 [#]	20.82 ± 1.47
AG 0.50 mg/ml	8.25 ± 1.11 [#]	16.44 ± 0.71 [#]	15.11 ± 0.56 [#]	23.34 ± 3.48
AG 1.00 mg/ml	7.86 ± 0.88 [#]	14.48 ± 2.29 [#]	16.89 ± 2.46 [#]	20.69 ± 2.24 [#]

ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean ± S.E.M) n = 3

AG = aminoguanidine กลุ่มควบคุม = BSA+น้ำตาลฟรุคโตส [#]P<0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม *P<0.05 เปรียบเทียบกับ AG ที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 32 ปริมาณโครงสร้าง carbonyl ในอัลบูมินเมื่อมีสารสกัดจากเนื้อส้มโอสายพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง

ปริมาณ carbonyl (nmol/mg protein)				
	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
กลุ่มควบคุม	16.28 ± 0.88	21.13 ± 1.05	23.47 ± 1.27	26.28 ± 3.22
ขาวน้ำผึ้ง 0.25 mg/ml	10.11 ± 1.18 [#]	13.03 ± 1.47 [#]	17.97 ± 1.21	25.96 ± 2.52
ขาวน้ำผึ้ง 0.50 mg/ml	9.40 ± 1.77 [#]	12.24 ± 0.27 ^{#*}	16.79 ± 1.07	23.99 ± 2.59
ขาวน้ำผึ้ง 0.75 mg/ml	9.12 ± 1.03 [#]	10.59 ± 0.85 [#]	16.55 ± 0.55	20.75 ± 1.37
ขาวน้ำผึ้ง 1.00 mg/ml	8.11 ± 0.54 [#]	12.00 ± 0.76 [#]	15.05 ± 2.28 [#]	19.33 ± 3.59 [#]
ขาวน้ำผึ้ง 1.50 mg/ml	7.46 ± 2.11 [#]	9.26 ± 1.99 [#]	13.96 ± 1.07 [#]	17.43 ± 2.26
ขาวน้ำผึ้ง 2.00 mg/ml	7.11 ± 0.94 [#]	8.30 ± 1.80 ^{#*}	11.78 ± 1.07 [#]	16.27 ± 3.70 [#]
AG 0.50 mg/ml	8.25 ± 1.11 [#]	16.44 ± 0.71 [#]	15.11 ± 0.56 [#]	23.34 ± 3.48
AG 1.00 mg/ml	7.86 ± 0.88 [#]	14.48 ± 2.29 [#]	16.89 ± 2.46 [#]	20.69 ± 2.24 [#]

ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean ± S.E.M) n = 3

AG = aminoguanidine กลุ่มควบคุม = BSA+น้ำตาลฟรุคโตส [#]P<0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม *P<0.05 เปรียบเทียบกับ AG ที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 33 ปริมาณโครงสร้าง carbonyl ในอัลบูมินเมื่อมีสารสกัดจากเนื้อส้มโอสายพันธุ์ท่าซ้อย

ปริมาณ carbonyl (nmol/mg protein)				
	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
กลุ่มควบคุม	16.28 ± 0.88	21.13 ± 1.05	23.47 ± 1.27	26.28 ± 3.22
ท่าซ้อย 0.25 mg/ml	8.81 ± 0.39 [#]	18.94 ± 0.42	21.85 ± 1.59	24.01 ± 1.24
ท่าซ้อย 0.50 mg/ml	8.46 ± 0.77 [#]	16.90 ± 1.48	19.17 ± 1.69	23.86 ± 0.09
ท่าซ้อย 0.75 mg/ml	8.09 ± 0.40 [#]	15.79 ± 1.62 [#]	18.23 ± 1.13	22.99 ± 2.40
ท่าซ้อย 1.00 mg/ml	7.48 ± 0.84 [#]	14.55 ± 1.18 [#]	16.81 ± 1.33 [#]	20.81 ± 2.62
ท่าซ้อย 1.50 mg/ml	7.03 ± 0.19 [#]	13.30 ± 0.16 [#]	15.98 ± 2.41 [#]	17.53 ± 0.54 [#]
ท่าซ้อย 2.00 mg/ml	6.83 ± 3.25 [#]	12.54 ± 1.24 [#]	14.95 ± 0.75 ^{#*}	16.67 ± 1.08 [#]
AG 0.50 mg/ml	8.25 ± 1.11 [#]	16.44 ± 0.71 [#]	15.11 ± 0.56 [#]	23.34 ± 3.48
AG 1.00 mg/ml	7.86 ± 0.88 [#]	14.48 ± 2.29 [#]	16.89 ± 2.46 [#]	20.69 ± 2.24 [#]

ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean ± S.E.M) n = 3

AG = aminoguanidine กลุ่มควบคุม = BSA+น้ำตาลฟรุคโตส [#]P<0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม *P<0.05 เปรียบเทียบกับ AG ที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 34 ปริมาณโครงสร้าง carbonyl ในอัลบูมินเมื่อมีสารสกัดจากเนื้อส้มโอสายพันธุ์ทับทิมสยาม

ปริมาณ carbonyl (nmol/mg protein)				
	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
กลุ่มควบคุม	16.28 ± 0.88	21.13 ± 1.05	23.47 ± 1.27	26.28 ± 3.22
ทับทิมสยาม 0.25 mg/ml	8.58 ± 0.34 [#]	19.92 ± 0.94	29.47 ± 2.17	35.15 ± 1.34
ทับทิมสยาม 0.50 mg/ml	8.36 ± 0.14 [#]	19.51 ± 0.37	27.32 ± 0.97	34.64 ± 3.43
ทับทิมสยาม 0.75 mg/ml	8.36 ± 0.14 [#]	19.00 ± 3.28	26.26 ± 0.03	32.25 ± 1.95
ทับทิมสยาม 1.00 mg/ml	8.13 ± 0.41 [#]	18.74 ± 0.33	24.72 ± 2.22	29.88 ± 0.52
ทับทิมสยาม 1.50 mg/ml	7.56 ± 0.79 [#]	18.12 ± 0.99	22.62 ± 1.22	27.02 ± 0.84
ทับทิมสยาม 2.00 mg/ml	7.24 ± 0.52 [#]	17.25 ± 1.13	21.04 ± 0.75	24.51 ± 0.45
AG 0.50 mg/ml	8.25 ± 1.11 [#]	16.44 ± 0.71 [#]	15.11 ± 0.56 [#]	23.34 ± 3.48
AG 1.00 mg/ml	7.86 ± 0.88 [#]	14.48 ± 2.29 [#]	16.89 ± 2.46 [#]	20.69 ± 2.24 [#]

ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean ± S.E.M) n = 3

AG = aminoguanidine กลุ่มควบคุม = BSA+น้ำตาลฟรุคโตส [#]P<0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม *P<0.05 เปรียบเทียบกับ AG ที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ปริมาณ N^E-(carboxymethyl)lysine (CML) ในโครงสร้างของโปรตีนอัลบูมิน

การตรวจวัดปริมาณ N^E-(carboxymethyl)lysine (CML) เป็นสิ่งที่บ่งชี้ปริมาณ advanced glycation end product ซึ่งเป็นสารที่พัฒนามาจาก amadori products ในวันที่ 28 ปริมาณของ CML ในกลุ่มควบคุมมีค่าประมาณ 3.16 ng/mL เมื่อใช้น้ำตาลฟรุกโตสเป็นตัวเหนี่ยวนำในการเกิดไกลเคชั่น จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดจากเนื้อส้มโอทุกสายพันธุ์ ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดการเกิด CML ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ aminoguanidine สามารถลดปริมาณ CML ได้เช่นกัน ประสิทธิภาพของสารสกัดจากเนื้อส้มโอมีความสามารถในการลด CML เท่าเทียมกับ aminoguanidine

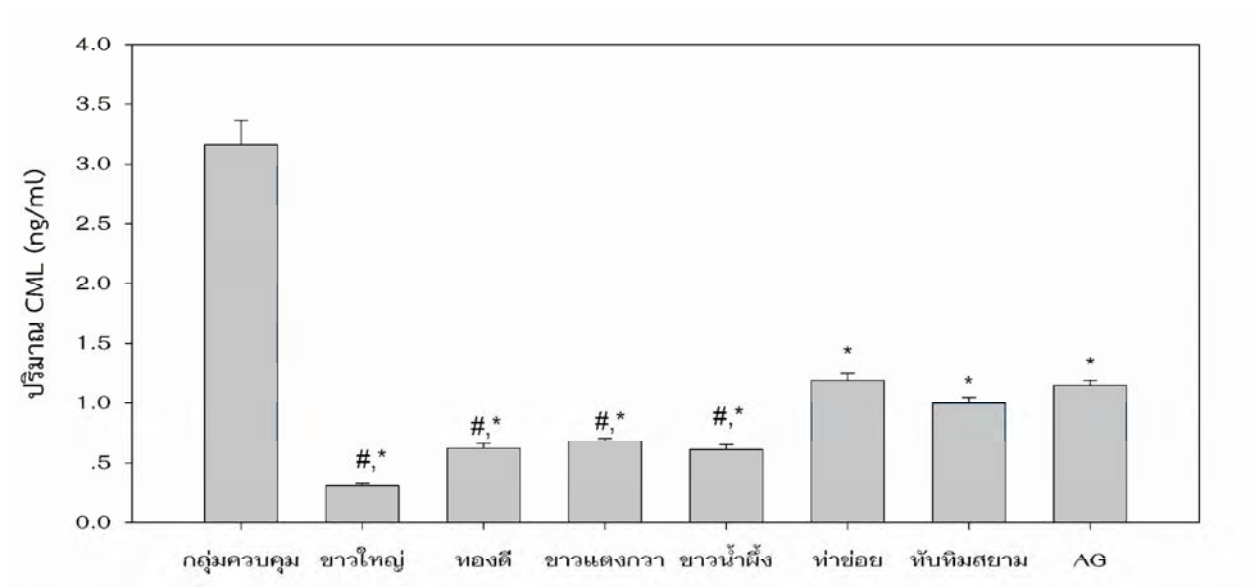
CML เป็น AGEs ที่เกิดจากโปรตีนที่มีกรดอะมิโนไลซีนและอาร์จินีน ถูกทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเนื่องจากปฏิกิริยาไกลคอกซิเดชันของ amadori product หรือเกิดจากสารประกอบคาร์บอนิล ซึ่งเป็นสาร reactive intermediates หรือ AGEs precursor AGEs ชนิด CML จัดเป็น AGEs กลุ่มใหญ่และมีบทบาทสำคัญในการก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่างๆในคน โดยมีรายงานการตรวจพบ CML ในพลาสมา เนื้อเยื่อไต เรตินา คอลลาเจน ในผู้ป่วยโรคเบาหวาน (Peyroux et al., 2006) รวมทั้งเซลล์ประสาทรวมทั้งภายในเซลล์ประสาทของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ (Cervantes-Lauren et al., 2006) มีรายงานก่อนหน้านี้พบว่า สารสกัดจากพืชที่มีส่วนประกอบของสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระสามารถยับยั้งกระบวนการไกลเคชั่น โดยสามารถช่วยลดการเกิด CML (Verzelloni et al., 2010) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษานี้ คือสารสกัดจากเนื้อส้มโอสามารถยับยั้งกระบวนการไกลเคชั่น โดยสามารถช่วยลดการเกิด CML ได้ เนื่องจากสารสกัดจากเนื้อส้มโอมีส่วนประกอบของสารฟลาโวนอยด์ ซึ่งเป็นสารที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นไปในทางเดียวกับกับผลการทดลองอื่นๆ ทั้งการลดลงของปริมาณฟรุกโตซามีน การป้องกันหมู่ thiol การลดลงของปริมาณ carbonyl และการลดลงของโครงสร้าง β -amyloid

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเนื้อส้มโอมีพบว่า สารสกัดจากเนื้อส้มโอมีสารพฤกษเคมีในกลุ่มของฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบสารสกัดจากเนื้อส้มโอ ซึ่งความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-กลูโคซิเดสและอัลฟา-อะไมเลสค่อนข้างต่ำ และสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสและคอเลสเตอรอลเอสเทอเรสในระดับปานกลาง นอกจากนี้พบว่าสารสกัดจากเนื้อส้มโอสามารถจับกับกรดน้ำดีได้ดี และลดการเกิดไมเซลล์ของคอเลสเตอรอล และสามารถต้านทานต้านไกลเคชั่นได้ดีมาก ลดการเกิด AGEs ลดปริมาณโปรตีนคาร์บอนิล ระดับฟรุกโตซามีน และความเข้มข้นของ CML ในอัลบูมิน เมื่อมีการสะสม AGEs นับว่าเป็นปัจจัยที่นำไปสู่ภาวะแทรกซ้อนในผู้ป่วยเบาหวาน ดังนั้นจากการผลการศึกษาในครั้งนี้ยืนยันถึงประโยชน์ของสารสกัดจากเนื้อส้มโอที่สามารถนำไปพัฒนาเป็นสารส่งเสริมสุขภาพเพื่อป้องกันโรคเบาหวาน โรคไขมันในเลือดสูงและภาวะแทรกซ้อนในผู้ป่วยเบาหวาน

ตารางที่ 35 ปริมาณ CML ในอัลบูมินเมื่อมีสารสกัดจากเนื้อส้มโอสายพันธุ์ต่างๆ

ปริมาณ CML (ng/ml)	
กลุ่มควบคุม	3.16 ± 0.21
ขาวใหญ่ 0.50 mg/ml	0.31 ± 0.02 ^{#*}
ทองดี 0.50 mg/ml	0.62 ± 0.04 ^{#*}
ขาวน้ำผึ้ง 0.50 mg/ml	0.68 ± 0.03 ^{#*}
ขาวแดงกวา 0.50 mg/ml	0.61 ± 0.04 ^{#*}
ท่าข่อย 0.50 mg/ml	1.19 ± 0.06 [#]
ทับทิมสยาม 0.50 mg/ml	1.00 ± 0.05 [#]
AG 0.50 mg/ml	1.15 ± 0.04 [#]



รูปที่ 9 ปริมาณ CML ในอัลบูมินเมื่อมีสารสกัดจากเนื้อส้มโอสายพันธุ์ต่างๆ ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองรายงานในรูปค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean ± S.E.M) n = 3
AG = aminoguanidine กลุ่มควบคุม = BSA+น้ำตาลฟรุคโตส [#]P<0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม
^{*}P<0.05 เปรียบเทียบกับ AG ที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารอ้างอิง

- Adisakwattana S, Chantarasinlapin P, Thammarat H, Yibchok-Anun S. A series of cinnamic acid derivatives and their inhibitory activity on intestinal α -glucosidase. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2009;24(5):1194-200.
- Adisakwattana S, Yibchok-Anun S, Charoenlertkul P, Wongsasiripat N. Cyanidin-3-rutinoside alleviates postprandial hyperglycemia and its synergism with acarbose by inhibition of intestinal α -glucosidase. *J Clin Biochem Nutr*. 2011;49(1):36-41.
- Ahmed N. Advanced glycation end products-role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clinical Pract*. 2005; 67: 3-21.
- Ardestani A, Yazdanparast R. Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food Chem*. 2007;104: 21–29.
- Birari RB, Bhutani KK. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. *Drug Discov Today*. 2007;12(19-20):879-89.
- Brownlee M. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med*. 1995;46:223-34.
- Cervantes-Lauren D, Schramm D.D, Jacobson EL, Halaweish I, Bruckner GG, Boissonneault GA. Inhibition of advanced glycation end product formation on collagen by rutin and its metabolites. *J Nutr Biochem*. 2006;17: 531-540.
- Chiasson JL. Acarbose for the prevention of diabetes, hypertension, and cardiovascular disease in subjects with impaired glucose tolerance: the Study to Prevent Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus (STOP-NIDDM) Trial. *Endocr Pract*. 2006 ;12
- Chiti F, Dobson CM. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem*. 2006; 75: 333–366.
- Curtis J, Wilson C. Preventing type 2 diabetes mellitus. *J Am Board Fam Pract*. 2005;18(1):37-43.
- D'Autreaux B, Toledano MB. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(10):813-24.
- Dyer DG. Accumulation of maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *J Clin Invest*. 1993;91: 2463-2469.
- Eriksson JW. Metabolic stress in insulin's target cells leads to ROS accumulation - a hypothetical common pathway causing insulin resistance. *FEBS Lett*. 2007 ;581(19):3734-42.

- Giardino I, Fard AK, Hatchell DL, Brownlee M. Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation, and oxidant-induced apoptosis. *Diabetes*. 1998;47(7):1114-20.
- Hofmann AF, Hagey LR. Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. *Cell Mol Life Sci*. 2008; 65; 2461-2483.
- Ihm SH, Yoo HJ, Park SW, Ihm J. Effect of aminoguanidine on lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Metabolism*. 1999;48(9):1141-5.
- Ikedo I, Yamahira T, Kato M, Ishikawa A. Black-tea polyphenols decrease micellar solubility of cholesterol in vitro and intestinal absorption of cholesterol in rats. *J Agric Food Chem*. 2010;58(15):8591-5.
- Insull W Jr. Clinical utility of bile acid sequestrants in the treatment of dyslipidemia: a scientific review. *South Med J*. 2006; 99: 257-273.
- Kawaguchi K, Mizuno T, Aida K, Uchino K. Hesperidin as an inhibitor of lipases from porcine pancreas and *Pseudomonas*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1997;61(1):102-4.
- Kim GN, Shin JG, Jang HD. Antioxidant and antidiabetic activity of Dangyuja (*Citrus grandis* Osbeck) extract treated with *Aspergillus saitoi*. *Food Chem*. 2009;117: 35–41.
- King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995–2025 : prevalence numerical estimates and projectios. *Diabetes Care*. 1998; 21: 1414– 1431.
- Le NA, Walter MF. The role of hypertriglyceridemia in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2007;9(2):110-5.
- Leiter LA, Ceriello A, Davidson JA, Hanefeld M, Monnier L, Owens DR, Tajima N, Tuomilehto J; International Prandial Glucose Regulation Study Group. Postprandial glucose regulation: new data and new implications. *Clin Ther*. 2005; 27 Suppl B:S42-56.
- Liu IM, Tzeng TF, Liou SS, Lan TW. Myricetin, a naturally occurring flavonol, ameliorates insulin resistance induced by a high-fructose diet in rats. *Life Sci*. 2007;81:1479-88.
- McCance D. et al. Maillard reaction products and their relation to complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1993; 91: 2470-2478.
- Miller A, Adeli K. Dietary fructose and the metabolic syndrome. *Curr Opin Gastroenterol*. 2008;24(2):204-9.
- Myers-Payne SC, Hui DY, Brockman HL, Schroeder F. Cholesterol esterase: a cholesterol transfer protein. *Biochemistry*. 1995; 34: 3942-3947.

- Nakai M, Fukui Y, Asami S, Toyoda-Ono Y, Iwashita T, Shibata H, Mitsunaga T, Hashimoto F, Kiso Y. Inhibitory effects of oolong tea polyphenols on pancreatic lipase in vitro. *J Agric Food Chem.* 2005;53(11):4593-8
- Nandakumar N, Balasubramanian MP. Hesperidin protects renal and hepatic tissues against free radical-mediated oxidative stress during DMBA-induced experimental breast cancer. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2011;30(4):283-300.
- Ngamukote S, Mäkynen K, Thilawech T, Adisakwattana S. Cholesterol-lowering activity of the major polyphenols in grape seed. *Molecules.* 2011;16(6):5054-6.
- Peterlik M. Role of bile acid secretion in human colorectal cancer. *Wien Med. Wochenschr.* 2008; 158: 539-541.
- Peyroux J, Sternberg M. Advanced glycation endproducts (AGEs): Pharmacological inhibition in diabetes. *Pathol Biol (Paris)* 2006;54: 405-419.
- Prasad AS, Bao B, Beck FWJ, Kucuk O, Sarkar FH. Antioxidant effect of zinc in humans. *Free Radic Bio Med.* 2004;37: 1182-1190.
- Raederstorff DG, Schlachter MF, Elste V, Weber P. Effect of EGCG on lipid absorption and plasma lipid levels in rats. *J Nutr Biochem.* 2003;14(6):326-32.
- Ramful D, Tarnus E, Rondeau P, Robert Da Silva C, Baborun T, Bourdon E. Citrus Fruit Extracts Reduce Advanced Glycation End Products (AGEs)- and H₂O₂-Induced Oxidative Stress in Human Adipocytes. *J Agric Food Chem.* 2010;58: 11119–11129.
- Rosak C. The pathophysiologic basis of efficacy and clinical experience with the new oral antidiabetic agents. *J Diabetes Complications.* 2002;16(1):123-32.
- Semenkovich CF. Insulin resistance and atherosclerosis. *J Clin Invest.* 2006 ;116(7):1813-22.
- Sharma N SV, Seo S. Screening of some medicinal plants for anti-lipase activity. *J Res Pharmaceul Sci.* 2005;97:453-6.
- Stadtman ER, Levin RL. 2000. Protein oxidation. *Ann NY Acad Sci.* 2000;899:191-208.
- Suárez G, Rajaram R, Oronsky AL, Gawinowicz MA. Nonenzymatic glycation of bovine serum albumin by fructose (fructation). Comparison with the Maillard reaction initiated by glucose. *J Biol Chem.* 1989;264(7):3674-9.

- Sugiyama H, Akazome Y, Shoji T, Yamaguchi A, Yasue M, Kanda T, Ohtake Y. Oligomeric procyanidins in apple polyphenol are main active components for inhibition of pancreatic lipase and triglyceride absorption. *J. Agric. Food Chem.* 2007;55:4604-4609.
- Telci A, Cakatay U, Salman S, Satman I, Sivas A. Oxidative protein damage in early stage type 1 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract.* 2000;50: 213–223.
- Uversky VN, Fink AL. Conformational constraints for amyloid fibrillation: The importance of being unfolded. *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1698: 131–153.
- Verzelloni E, Tagliazucchi D, Rio D, Calani L, Conte A. Antiglycative and antioxidative properties of coffee fractions. *Food Chemistry.* 2010;124: 1430-1435.
- Wang J, Yang Z, Lin L, Zhao Z, Liu Z, Liu X. Protective effect of naringenin against lead-induced oxidative stress in rats. *Biol Trace Elem Res.* 2012;146(3):354-9.
- Wu CH, Huang SM, Lin JA, Yen GC. Inhibition of advanced glycation endproduct formation by foodstuffs. *Food Funct.* 2011;2(5):224-34.
- Zhang M, Duan C, Zang Y, Huang Z, Liu G. The flavonoid composition of flavedo and juice from the pummelo cultivar (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) and the grapefruit cultivar (*Citrus paradisi*) from China. *Food Chem.* 2011;129:1530–1536.

ภาคผนวก

ตารางแผนการปฏิบัติงาน

กิจกรรมในข้อเสนอโครงการ	ผลสำเร็จ (%)	ผลการดำเนินการ
1. สกัดและวิเคราะห์สารพฤษเคมี	100%	สำเร็จตรงตามวัตถุประสงค์ ทราบสารพฤษเคมีที่สกัดได้จากเนื้อส้มโอ
2. ศึกษาฤทธิ์ต่อการชะลอการย่อยคาร์โบไฮเดรต	100%	สำเร็จตรงตามวัตถุประสงค์ ทราบฤทธิ์ของสารสกัดจากเนื้อส้มโอในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-กลูโคซิเดสและอัลฟา-อะไมเลส
3. ศึกษาฤทธิ์ต่อการชะลอการย่อยและดูดซึมไขมัน	100%	สำเร็จตรงตามวัตถุประสงค์ ทราบฤทธิ์ของสารสกัดจากเนื้อส้มโอในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนคอเลสเตอรอลเอสเทอเรส การยับยั้งการเกิดคอเลสเตอรอลไมเซลล์ และการจับกับกรดน้ำดี
4. ศึกษาฤทธิ์ต่อการยับยั้งการเกิดไกลเคชั่น	100%	สำเร็จตรงตามวัตถุประสงค์ ทราบฤทธิ์การต้านไกลเคชั่นของสารสกัดเนื้อส้มโอ ลดปริมาณฟรุกโตซามีน ลดโครงสร้าง β -mayloid ป้องกันโครงสร้าง thiol และลดปริมาณ carbonyl และปริมาณ CML
5. รวบรวมข้อมูลเพื่อเขียนรายงานวิจัยและเผยแพร่ผลงาน	100%	สำเร็จตรงตามวัตถุประสงค์ งานวิจัยบางส่วนได้ไปนำเสนอผลงานที่งานประชุมนานาชาติ The First ASEAN Plus Three Graduate Research Congress จังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย วันที่ 1-2 มีนาคม พ.ศ. 2555 ในหัวข้อ” Antglycation Effects of Pomelo Extract on <i>in vitro</i> AGE Formation from Fructose

Antiglycation Effects of Pomelo Extract on *in vitro* AGE Formation from Fructose

Natarin Caengprasath*, Sirichai Adisakwattana**, Sathaporn Ngamukote**, Kittana Mäkynen**

*Program in Food and Nutrition, Department of Nutrition and Dietetics, Chulalongkorn University

**Research Group of Herbal Medicine for Prevention and Therapeutic of Metabolic Diseases, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand

Abstract

Chronic hyperglycemia in diabetes causes non-enzymatic protein glycation by reducing sugars, leading to the formation of Advanced Glycation End Products (AGEs) and the production of oxidative stress; which results in complications of hemodialysis, amyloidosis, diabetes, Parkinson's disease and Alzheimer's disease. Much effort has been devoted into finding effective antiglycation compounds from dietary plants and fruits for prevention of diabetic complications. Pomelo, one of the Thailand's largest citrus fruits, contains many citrus polyphenols and flavonoids which have been shown to benefit human health. The purpose of the present study was to determine the effect of pomelo (Kao Yai) against bovine serum albumin (BSA) in fructose-mediated non-enzymatic glycation and oxidation-dependent damages to BSA induced by fructose. The results showed that the total phenolic and flavonoid contents of pomelo extract were 105.88 ± 0.65 mg gallic acid equivalent/g extract, and 82.41 ± 1.48 mg catechin equivalent/g extract, respectively. It was found that the pomelo extract (0.25-1 mg/ml) inhibited overall formation of AGEs in a concentration-dependent manner. In addition, pomelo extract reduced the level of fructosamines which was associated with the decreased formation of AGEs. Notably, our data clearly demonstrated that the pomelo extract had suppressed the formation of amyloid cross-linked β -structures of BSA, which might lead to reducing the risk of debilitating degenerative diseases developing in diabetic patients. Finally, the pomelo extract also decreased protein carbonyl formation, indicating the prevention of protein oxidation in BSA. These results indicated that pomelo extract may be a useful dietary supplement for preventing AGE-mediated diabetic complications.

Keywords: Pomelo, Glycation, Flavonoids, Polyphenol, Antiglycation

Introduction

Glycation is a non-enzymatic reaction that occurs between a carbonyl group of a sugar and an amino group of an amino acid, leading to the formation of N-substituted glycosylamine and water [1] and, eventually, advanced glycation end-products (AGEs). AGEs are a diverse class of modified proteins whose activity can result in high levels of oxidative stress.

Therapeutic strategies targeting on the alleviation of glycation have recently been of much interest. Common treatments are the use of antiglycation compounds such as aminoguanidine. Aminoguanidine acts by blocking carbonyl groups on reducing sugars, and decrease the formation of cascade intermediates for the formation of AGEs, Amadori products and 3-deoxyglucosones [2]. Furthermore, antioxidants and chelators have

* Natarin Caengprasath (M.Sc.), Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, natarinc@hotmail.com

** Assistant Professor Dr. Sirichai Adisakwattana, Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, sirichai.a@chula.ac.th

** Dr. Sathaporn Ngamukote, Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, amppam10@gmail.com

** Dr. Kittana Mäkynen, Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, kittana.makynen@gmail.com

been shown to prevent glycoxidation and remove transition metals. Antiglycation compounds inhibiting AGE formation via different modes of action are available, but the majority of these products are still under clinical trials. Alternative therapies for antiglycation are natural products such as nutrients and medicinal plant extracts, which have also shown potential to inhibit overall AGE formation. Nutrients with potential antiglycation properties are ascorbic acid, folic acid, zinc [3], vitamin E, vitamin B6 and vitamin B3 [4].

Pomelo (*Citrus grandis*) is a native citrus fruit of Southeast Asia and a cash crop of Thailand. Common cultivars of pomelo include Kao Yai, Kao Nampueng, Tubtim Siam, Tar Koi, Kao Tang-Gwa and Tongdee. Pomelo contains large amounts of flavonoids; such as hesperidin, neohesperidin, kaempferol, rutin, apigenin, quercetin, narirutin, and naringin [5]. This citrus fruit also provides an ample supply of vitamin C, folic acid, potassium and pectin [6]. The flavonoids from pomelo are pharmacologically active [7], however, studies regarding their antiglycation properties have not yet been investigated. The objective of this study was to evaluate the antiglycation effects of pomelo extract (*Citrus grandis*) against bovine serum albumin (BSA) in fructose-mediated non-enzymatic glycation. We also investigated the inhibitory effect of pomelo extract on oxidation-dependent damages to BSA induced by fructose.

Methodology

1. Preparation of pomelo extract. The pomelo (Kao Yai) was obtained from Nakhon Phatom province and harvested at mature stage. The pomelo pulp was collected by manual peeling from the peel and then homogenized using a commercial blender. The pulped material was lyophilized for approximately 96 hours. The dried pomelo pulp was then exhaustively extracted in a two

step aqueous methanol process at 4 °C for 6 consecutive days. The supernatant was evaporated in a rotary evaporator at 60°C for approximately 5 hours. The dried extract was stored in the dark under vacuum desiccation, at room temperature. Thereafter, the dried extract was purified to remove sugars and organic acids using a Sep-Pak C18 Cartridge [8].

2. Total phenolic content. The total phenolic content in pomelo extract was determined with the Folin-Ciocalteu's reagent. A sample of purified extract (50 µl) was mixed with 1.5 ml of Folin-Ciocalteu's reagent (previously diluted 10- fold with distilled water), followed by 50 µL of aqueous Na₂CO₃ (60 g/l). The absorbance was then measured at 725 nm after incubation for 90 min. The results were expressed as mg gallic acid equivalent/g dry weight of extract. [9]

3. Total flavonoid content. The total flavonoid was determined using the aluminum chloride colorimetric assay. Amounts of total flavonoid were quantified as mg catechin equivalents (CE)/g dry weight. [9]

4. Preparation of AGEs. The induction of advanced glycation end-products was achieved by the incubation of BSA with 0.5 M fructose. A solution of BSA (10 mg/ml) and 1.1 M aqueous fructose were prepared in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) and the purified pomelo extract (0.25-1 mg/ml) in DMSO 10 % (v/v). For comparison, instead of the addition of purified pomelo extract, aminoguanidine at concentrations of 0.5 and 1 mg/ml were used as a positive control. For the negative control, DMSO 4% (v/v) was used instead of adding aminoguanidine or purified pomelo extract. The glycated BSA was incubated at 37 °C for 7, 14, 21, and 28 days. After each incubation period, the glycated BSA and blank BSA solutions were assessed for the formation of

* Natarin Caengprasath (M.Sc.), Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, natarinc@hotmail.com

** Assistant Professor Dr. Sirichai Adisakwattana, Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, sirichai.a@chula.ac.th

** Dr. Sathaporn Ngamukote, Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, amppam10@gmail.com

** Dr.Kittana Mäkynen ,Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, kittana.makynen@gmail.com

advanced glycation end-products formation using spectrofluorometry. The fluorescence intensity was recorded at an excitation wavelength of 355 nm and emission wavelength of 460 nm [10].

5. Carbonyl content estimation. For the assessment of the extent of protein oxidation, the protein carbonyl content was measured [11]. To quantify the protein carbonyl content, the sample was reacted with 2, 4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) and the absorbance was measured at 370 nm. The protein carbonyl group concentration was calculated by the absorption coefficient ($\epsilon = 22,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). The results were expressed as nmol carbonyl/mg protein.

6. Determination of fructosamine. The measurement of fructosamine was carried out by a nitroblue tetrazolium (NBT) colorimetric assay [12]. The absorbance was measured at 530 nm. The concentration of fructosamine was determined using the different absorbance at the time point of 10 and 15 min. The level of fructosamine was calculated by using 1-deoxy-1-morpholino-fructose (1-DMF) as a standard.

7. Identification of β -amyloid structures. The formation of amyloid fibrils resulting from protein crosslinks during glycation was quantified using the Thioflavin T dye (ThT assay) [3]. Thioflavin T dye is a benzothiazole dye that exhibits enhanced fluorescence upon binding to amyloid fibrils. The fluorescence intensity was recorded at excitation wavelength 435 nm and emission wavelength 485 nm. The ThT fluorescence emission gives a direct quantitative assessment of the β -amyloid structures contents.

Statistical analysis. Data was expressed as mean $\pm$ S.E.M for all experimental measurements, based on triplicate results ($n=3$). Significant differences were determined using the one way analysis of variance

(ANOVA) followed by a post-hoc test with the Fisher Least Significance Difference test. Significant differences were considered at $p<0.05$.

Results

The total phenolic and flavonoid content of the pomelo extract was found to be 105.88 ± 0.65 mg gallic acid equivalent/g extract and 82.41 ± 1.48 mg catechin equivalent/g extract, respectively. Incubation of BSA with high fructose for 7, 14, 21, and 28 days, resulted in a progressive accumulation of AGE formation over time. The results showed that the pomelo extract exerted inhibitory effects against the formation of AGEs in a concentration dependent manner (Figure 1). After 28 days of incubation, the pomelo extract (0.75 and 1.0 mg/ml) significantly inhibited the AGEs formation ($85.75 \pm 0.91\%$ and $87.6 \pm 0.48\%$ inhibition, respectively) compared to aminoguanidine (0.5 mg/ml) which also promotes AGE inhibition ($82 \pm 1.20\%$). These results indicated that pomelo extract was able to prevent fructose mediated protein modification.

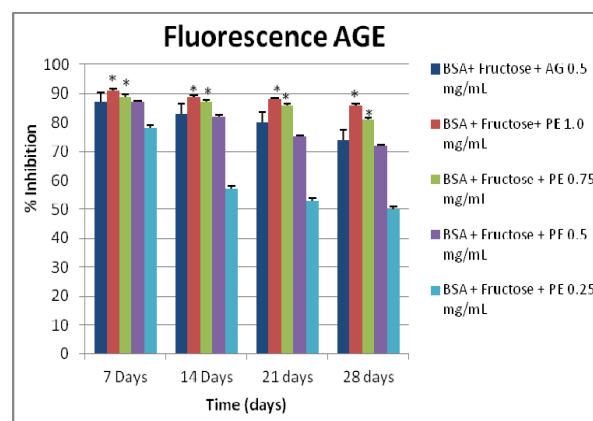


Figure 1. The effects of pomelo extract (PE) and aminoguanidine (AG) on AGE formation. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M, $n=3$. * $P < 0.05$ compared to aminoguanidine.

* Natarin Caengprasath (M.Sc.), Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, natarinc@hotmail.com

** Assistant Professor Dr. Sirichai Adisakwattana, Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, sirichai.a@chula.ac.th

** Dr. Sathaporn Ngamukote, Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, amppam10@gmail.com

** Dr.Kittana Mäkinen ,Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, kittana.makynen@gmail.com

The inhibitory effects of pomelo extract on the formation of fructosamine products after 14 and 28 days are shown in Table 1. The pomelo extract exhibited over 20% inhibitory effects when compared to the BSA+fructose. At the same concentration (0.5 mg/ml), pomelo extracts exerted higher inhibition than that of AG. In addition, the pomelo extract also showed inhibitory effects against the formation of fructosamine in a concentration dependent manner. The level of fructosamine suppression by the pomelo extract, suggest the ability of the extract to inhibit the formation of Amadori products.

Table 1. Fructosamine levels in the presence of Aminoguanidine (AG) and pomelo extract (PE). Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M, n =3. * $P < 0.01$ compared to AG and $^{\#}P < 0.01$ compared to BSA+fructose.

Fructosamine(mg/ml)		
	Day 14	Day 28
BSA + Fructose	2.19 $\pm$ 0.06	2.72 $\pm$ 0.02
BSA + Fructose + Ag 0.5 mg/ml	1.88 $\pm$ 0.16 [#]	2.58 $\pm$ 0.09 [#]
BSA + Fructose + PE 1 mg/ml	1.44 $\pm$ 0.03 ^{*#}	2.25 $\pm$ 0.01 ^{*#}
BSA + Fructose + PE 0.75 mg/ml	1.57 $\pm$ 0.01 ^{*#}	2.39 $\pm$ 0.18 ^{*#}
BSA + Fructose + PE 0.5 mg/ml	1.70 $\pm$ 0.03 ^{*#}	2.46 $\pm$ 0.02 ^{*#}
BSA + Fructose + PE 0.25 mg/ml	1.80 $\pm$ 0.04 ^{*#}	2.63 $\pm$ 0.02 ^{*#}

The level of β aggregation was determined at 14 and 28 days (Figure 2). All concentrations of the pomelo extract showed significant decreases in the fluorescent intensity when compared to BSA + fructose, suggesting that the pomelo extract was able to marginally

reduce the level β -amyloid structures. Moreover, 0.5 mg/ml of pomelo extract also showed a 15% higher inhibitory effect of β -aggregation than that of 0.5 mg/ml of AG.

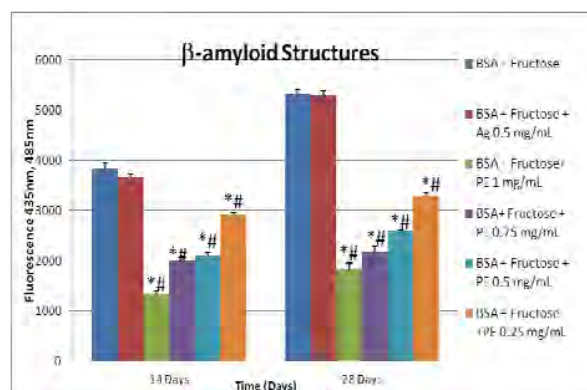


Figure 2. The effect of pomelo extract on the formation of β -amyloid structure. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M, n =3. * $P < 0.01$ compared to AG and $^{\#}P < 0.01$ compared to BSA+fructose.

The formation of carbonyl content, representing the formation of reactive carbonyl intermediates, was determined by the level of carbonyl content at days 14 and 28 (Table 2). Each concentration of the pomelo extract exhibited over 45% inhibitory effects compared to the BSA+fructose. The results showed that the pomelo extract significantly reduced the formation of carbonyl content compared to those of BSA+fructose, and AG.

Discussion

It has been reported that the pulp of pomelo contained flavonoids such as hesperidin, naringin, narirutin, neohesperidin and kaempferol [13]. These flavonoids have shown antioxidant activity which is directly related to their ability to inhibit radical formation, anti-lipoperoxidation [14]. Citrus flavonoids have also shown antiglycation properties [15,16]. For instance, naringin has shown high trapping efficacy of methylglyoxal, one an AGE precursor, which

* Natarin Caengprasath (M.Sc.), Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, natarinc@hotmail.com

** Assistant Professor Dr. Sirichai Adisakwattana, Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, sirichai.a@chula.ac.th

** Dr. Sathaporn Ngamukote, Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, amppam10@gmail.com

** Dr.Kittana Mäkinen ,Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, kittana.makynen@gmail.com

can suppress or inhibit the overall formation of AGEs [15]. Furthermore, hesperidin showed the ability to decrease the formation of fructosamine resulting in inhibition of AGE formation [16].

Table 2. Carbonyl content levels in the presence of AG and pomelo extract (PE).

Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M, n=3. * P < 0.01 compared to AG and $^{\#}P$ < 0.01 compared to BSA+fructose.

Carbonyl Content (nmol carbonyl/mg protein)		
	Day 14	Day 28
BSA + Fructose	24.37 $\pm$ 0.67 ^{*#}	38.27 $\pm$ 0.36 ^{*#}
BSA + Fructose + Ag 0.5 mg/ml	16.12 $\pm$ 0.22 [#]	34.27 $\pm$ 0.36 [#]
BSA + Fructose + PE 1 mg/ml	8.31 $\pm$ 0.10 ^{*#}	23.89 $\pm$ 0.34 ^{*#}
BSA + Fructose + PE 0.75 mg/ml	9.41 $\pm$ 0.25 ^{*#}	24.85 $\pm$ 0.65 ^{*#}
BSA + Fructose + PE 0.5 mg/ml	11.34 $\pm$ 0.33 ^{*#}	27.83 $\pm$ 0.6 ^{*#}
BSA + Fructose + PE 0.25 mg/ml	13.64 $\pm$ 0.36 ^{*#}	28.76 $\pm$ 0.41 ^{*#}

The formation of AGEs is a diverse class of protein modifications formed by various reactions. Amadori product is an early glycation product which undergoes complex cascades that cause proteins to be oxidatively attacked. This reaction leads to the formation of reactive carbonyl intermediaries, which in turn cause the development of cross-linked proteins [17]. The synthesis of cross-linked proteins or cross β -amyloid structures results in insoluble β -amyloid, β -sheet fibrils and high oxidative stress [17]. Glycation is a key mechanism to induce the conformational changes of protein by increasing the level of amyloid cross β -structure, which plays a

fundamental role in the protein aggregation. Studies reveal that the deposition of protein aggregation has been associated with the progression of several debilitating degenerative diseases including hemodialysis amyloidosis, diabetes, Parkinson's disease and Alzheimer's disease [18].

In general, glycation and AGE-induced toxicity are known to be associated with increased free radical production [19]. Especially, the process of oxidative degradation of Amadori intermediates can generate free radical, causing oxidation of protein damage [20]. Major molecular modifications of protein structural changes can be investigated by protein carbonyl formations. The marked increase in protein carbonyl formation in BSA was observed when it was incubated with fructose. Our findings showed that the pomelo extract significantly suppressed the protein carbonyl formation during AGEs induction by fructose. There is considerable evidence to support that the trapping free radicals and reactive carbonyl group formation by antioxidant compounds is a strategy for the inhibition of protein glycation [17]. It can be assumed that the mechanism of pomelo extract for lowering protein glycation may be related to their antioxidant activity.

Conclusion

The results obtain from this study indicate that the pomelo extract exhibits antiglycative activity. This effect correlates to reduce the level of fructosamine, β -amyloid structures, and protein oxidation. These findings may be applied for developing a nutraceutical product in order to prevent AGE-mediated diabetic complications.

Acknowledgments

We wish to thank the Thailand Research Fund (TRF) for financial support in this work

* Natarin Caengprasath (M.Sc.), Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, natarinc@hotmail.com

** Assistant Professor Dr. Sirichai Adisakwattana, Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, sirichai.a@chula.ac.th

** Dr. Sathaporn Ngamukote, Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, amppam10@gmail.com

** Dr.Kittana Mäkynen ,Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, kittana.makynen@gmail.com

(RDG5420029). The authors would like to thank The Medical Food Research and Development Center, and The Research Group of Herbal Medicine for Prevention and Therapeutic of Metabolic diseases which have been financially and institutionally supported by Chulalongkorn University.

References

1. Lapolla, A., D. Fedele, and P. Traldi, Glyco-oxidation in diabetes and related diseases. *Clin Chim Acta.* **2005**, 357, 236-50.
2. Ahmad, M.S. and N. Ahmed, Antiglycation properties of aged garlic extract: possible role in prevention of diabetic complications. *J. Nutr.* **2006**, 136, 796S-799S.
3. Tupe, R.S. and V.V. Agte, Role of zinc along with ascorbic acid and folic acid during long-term in vitro albumin glycation. *Br. J. Nutr.* **2010**, 103, 370-7.
4. Vinson, J.A. and T. Howard, Inhibition of protein glycation and advanced glycation end products by ascorbic acid and other vitamins and nutrients. *J. Nutr. Biochem.* **1996**, 7, 659-663.
5. Theppakorn, T. and S. Chaiwong, Bioactive compounds and antioxidant capacity of pink pummelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) cv.“Thong Dee” from Thailand. *Int. J. ISSAAS.* **2010**, 16, 10 - 16.
6. Benavente-García, O., et al., Uses and Properties of Citrus Flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 4505-4515.
7. Bocco, A., et al., Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Citrus Peel and Seed Extracts. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 2123-2129.
8. Li, B.B., B. Smith, and M.M. Hossain, Extraction of phenolics from citrus peels: I. Solvent extraction method. *Sep. Purif. Technol.* **2006**, 48, 182-188.
9. Yoo, K.M., et al., Major Phytochemical Composition of 3 Native Korean Citrus Varieties and Bioactive Activity on V79-4 Cells Induced by Oxidative Stress. *J. Food Sci.* **2009**, 74, C462-C468.
10. Adisakwattana, S., Jiphimai, P., Prutanopajai, P., Chanathong, B., Sapwarobol, S., and Ariyapitipan, T., Evaluation of alpha-glucosidase, alpha-amylase and protein glycation inhibitory activities of edible plants. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2010**, 61, 295-305.
11. Schmitt, A., et al., Characterization of advanced glycation end products for biochemical studies: side chain modifications and fluorescence characteristics. *Anal. Biochem.* **2005**, 338, 201-215.
12. Johnson, R.N., P.A. Metcalf, and J.R. Baker, Fructosamine: A new approach to the estimation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control. *Clin. Chim. Acta.* **1983**, 127, 87-95.
13. Ortuno, A., et al., Flavanone and Nootkatone Levels in Different Varieties of Grapefruit and Pummelo. *J. Agric. Food Chem.*, **1995**. 43. 1-5.
14. Tripoli, E., et al., Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chem.* **2007**, 104, 466-479.
15. Shao, X., Scavenging effects of dietary flavonoids on reactive dicaronyl species and their possible implications on the inhibition of the formation of advanced glycation-end products. PhD Thesis, The State University of New Jersey, **2010**.
16. Ibrahim, S.S., Protective Effect of Hesperidin, a Citrus Bioflavonoid, on Diabetes-Induced Brain Damage in Rats. *J. Appl. Sci. Res.* **2008**, 4, 84-95.
17. Wu, C.-H., et al., Inhibition of advanced glycation endproduct

* Natarin Caengprasath (M.Sc.), Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, natarinc@hotmail.com

** Assistant Professor Dr. Sirichai Adisakwattana, Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, sirichai.a@chula.ac.th

** Dr. Sathaporn Ngamukote, Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, amppam10@gmail.com

** Dr.Kittana Mäkynen ,Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, kittana.makynen@gmail.com

- formation by foodstuffs. *Food & Func.* **2011**, 2, 224-234.
18. Chiti, F. and Dobson, C.M., Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, 75, 333-366.
 19. Cohen, G., Riahi, Y., Alpert, E., Gruzman, A. and Sasson, S. The roles of hyperglycaemia and oxidative stress in the rise and collapse of the natural protective mechanism against vascular endothelial cell dysfunction in diabetes. *Arch. Physiol. Biochem.* **2007**, 113, 259-267.
 20. Bouma, B., Kroon-Batenburg, L.M, Wu, Y.P., Brünjes, B., Posthuma, G., Kranenburg, O., de Groot, P.G., Voest, E.E. and Gebbink, M.F. Glycation induces formation of amyloid cross-beta structure in albumin. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 41810-41819.

* Natarin Caengprasath (M.Sc.), Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, natarinc@hotmail.com

** Assistant Professor Dr. Sirichai Adisakwattana, Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, sirichai.a@chula.ac.th

** Dr. Sathaporn Ngamukote, Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, amppam10@gmail.com

** Dr.Kittana Mäkynen ,Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, kittana.makynen@gmail.com

สารสกัดจากเนื้อส้มโอที่อุดมไปด้วยฟลาโวนอยด์ต่อการต้านปฏิกิริยาไกลเคชั่น การชะลอการย่อยคาร์โบไฮเดรตและไขมัน

ส้มโอเป็นผลไม้ท้องถิ่นในตระกูล citrus ของภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และเป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย เป็นผลไม้ไทยที่อุดมไปด้วยคุณค่าอาหารและโภชนาการ ส้มโอในประเทศไทยพบได้หลากหลายสายพันธุ์ เช่น ทองดี ขาวน้ำผึ้ง ขาวใหญ่ ขาวแป้น ขาวแตงกวา และท่าข่อย เป็นต้น ในเนื้อส้มโอมีสารพฤกษเคมีในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เช่น นารินจินิน (naringin) เฮสพิริดิน (hesperidin) นีโอเฮสพิริดิน (neohesperidin) นารินจินิก (naringenin) และ เฮสพิริติน (hesperitin) ซึ่งมีประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์ ฟลาโวนอยด์จากเนื้อส้มโอช่วยส่งเสริมสุขภาพแก่ร่างกายเนื่องจากฟลาโวนอยด์มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ และต้านอนุมูลอิสระ จากงานวิจัยนี้ได้ค้นพบว่าสารสกัดจากเนื้อส้มโอที่อุดมไปด้วยฟลาโวนอยด์ จากส้มโอสายพันธุ์ ขาวทองดี ขาวน้ำผึ้ง ขาวใหญ่ ขาวแป้น ขาวแตงกวา และท่าข่อย มีฤทธิ์ต้านการเกิดปฏิกิริยาไกลเคชั่น ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างโปรตีนทำปฏิกิริยากับน้ำตาลกลูโคส มักเกิดขึ้นมากในผู้ป่วยโรคเบาหวานและเป็นต้นเหตุในการเกิดภาวะแทรกซ้อน เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคไต เป็นต้น ซึ่งได้นับว่าเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนับสารสกัดจากเนื้อส้มโอที่อุดมไปด้วยฟลาโวนอยด์มาประยุกต์ใช้กับการพัฒนาเป็นสารเสริมสุขภาพในผู้ป่วยเบาหวาน นอกจากนี้ยังพบว่าฟลาโวนอยด์จากเนื้อส้มโอนั้นยังมีคุณสมบัติในการชะลอการย่อยคาร์โบไฮเดรตโดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-กลูโคซิเดสและอัลฟา-อะไมเลส รวมถึงคุณสมบัติในการชะลอการย่อยและการดูดซึมไขมันเข้าสู่กระแสเลือด ฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าวมีประโยชน์อย่างยิ่งในการช่วยชะลอระดับน้ำตาลกลูโคสและไขมันในเลือดไม่ให้สูงเกินไปในผู้ป่วยเบาหวาน อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มทั้งในสัตว์ทดลองและในมนุษย์ เพื่อนำสู่การประยุกต์ใช้งานจริงต่อไป