



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของน้ำผลไม้ไทย กล้วย ฝรั่ง มะม่วง มะละกอ มังคุด และสับปะรด
ต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450

Impact of Thai fruits juice: banana, guava, mango, papaya, mangosteen, and
pineapple on cytochrome P450 enzyme activities

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร.กนกวรรณ จารุกำจร

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น

กรกฎาคม 2555

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ : ผลของน้ำผลไม้ไทย กล้วย ฝรั่ง มะม่วง มะละกอ มังคุด และสับปะรด
ต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450

Impact of Thai fruits juice: banana, guava, mango, papaya, mangosteen, and
pineapple on cytochrome P450 enzyme activities

ผู้วิจัย

รศ.ดร.กนกวรรณ จารุกัจฉา

สังกัด

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ชุดโครงการ “การเพิ่มคุณค่าสมุนไพรครบวงจร” สกว. ฝ่ายเกษตร

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Executive Summary

ปัจจุบันประชาชนนิยมบริโภคน้ำผลไม้มากขึ้นเพื่อหวังผลในการเสริมสร้างสุขภาพ ดังนั้นจึงมีผู้ที่บริโภคน้ำผลไม้อย่างต่อเนื่องเป็นประจำเป็นระยะเวลานาน ผลไม้ไทยที่นิยมนำมาแปรรูปเป็นน้ำผลไม้เพื่อเพิ่มมูลค่าและ/หรือเพื่อความสะดวกต่อการบริโภค ได้แก่ กล้วย ฝรั่ง มะม่วง มะละกอ มังคุด และสับปะรด แม้จะมีการศึกษารายงานถึงประโยชน์และข้อดีของน้ำผลไม้เหล่านี้แล้ว แต่การศึกษาผลกระทบของน้ำผลไม้เหล่านี้ต่อการแสดงออกของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 นั้นยังมีอยู่อย่างจำกัดและไม่เพียงพอ เนื่องจากเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่สำคัญในตับที่มีหน้าที่หลักในการเปลี่ยนแปลงยาและสารแปลกปลอมต่าง ๆ ที่เข้าสู่ร่างกาย ดังนั้นการบริโภคน้ำผลไม้เป็นระยะเวลานานอาจส่งผลเปลี่ยนแปลงสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 และอาจส่งผลให้เกิดอันตรกิริยาระหว่างยาหรือสารแปลกปลอมต่าง ๆ อันจะนำไปสู่อาการไม่พึงประสงค์หรือการเกิดพิษจากยา หรือในทางตรงข้ามอาจส่งผลให้ประสิทธิภาพการรักษาลดลงหรือรักษาไม่ได้ผล ดังนั้น การศึกษานี้จึงต้องการศึกษาผลของน้ำผลไม้ไทย 6 ชนิด ได้แก่ กล้วย ฝรั่ง มะม่วง มะละกอ มังคุด และสับปะรด ต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ไอโซฟอร์มหลักที่ทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงยาและสารแปลกปลอมส่วนใหญ่ในชีวิตประจำวัน ผลจากการศึกษานี้จะให้ข้อมูลอันเป็นประโยชน์ในแง่ของการส่งเสริมการบริโภคน้ำผลไม้ในปริมาณและระยะเวลาที่เหมาะสม รวมไปถึงการตระหนักถึงข้อควรระวังในการบริโภคน้ำผลไม้ดังกล่าว อันเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อการต่อยอดพัฒนาผลิตภัณฑ์จากผลไม้ไทยที่มีคุณภาพและความปลอดภัยสูง อันเป็นการเพิ่มมูลค่าผลไม้ไทยอีกทางหนึ่ง

จากการศึกษาตรวจพบปริมาณฟลาโวนอยด์รวมในน้ำผลไม้ทั้งหกชนิดที่ความเข้มข้น 0.49 – 4.92 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์เซตินต่อกรัมของผงแห้ง โดยน้ำมะละกอสุกมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงสุด ในขณะที่ตรวจไม่พบฟลาโวนอยด์รวมในกล้วยน้ำว้า ปริมาณฟีนอลิครวมในน้ำผลไม้ทั้งหกชนิดอยู่ที่ความเข้มข้น 0.77 – 5.95 มิลลิกรัมสมมูลของแกลลิกแอซิดต่อกรัมของผงแห้ง โดยฝรั่งมีปริมาณฟีนอลิครวมสูงสุด ในขณะที่กล้วยน้ำว้ามีปริมาณฟีนอลิครวมต่ำที่สุด โดยไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟลาโวนอยด์รวมและปริมาณฟีนอลิครวมต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 การศึกษาโดยการประเมินค่ามัธยฐานของความเข้มข้นที่ยับยั้ง (IC_{50} , Median Inhibitory Concentration) สมรรถนะของเอนไซม์ CYP1A1, CYP1A2, CYP2B9, CYP2B10, CYP2E1 และ CYP3A พบว่า สับปะรดมีศักยภาพสูงสุดในการยับยั้งเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ทุกไอโซฟอร์มในไมโครโซมจากตับหนูเมาส์ ในขณะที่มังคุด ฝรั่ง มะม่วง มะละกอสุก และกล้วยน้ำว้า แสดงผลการยับยั้งเอนไซม์เหล่านี้ลดลงตามลำดับ ส่วนการศึกษาภายในกายหนูเมาส์ สายพันธุ์ ICR เพศผู้ พบว่าน้ำสับปะรด ขนาด 10, 20 และ 40 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน (ซึ่งขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วันนี้เทียบเท่าได้กับปริมาณการบริโภคน้ำสับปะรด 200 มิลลิลิตรหรือเนื้อสับปะรดสด 300 กรัมโดยปกติใน 1 วัน) มีผลเพิ่มสมรรถนะของ ethoxyresorufin O-deethylase (EROD), aniline hydroxylase (ANH) และ erythromycin N-demethylase (ENDM) ซึ่งเป็นดัชนีบ่งชี้การทำงานที่เพิ่มขึ้นของเอนไซม์ CYP1A1, CYP2E1 และ CYP3A11 ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังพบการแสดงออกของ CYP1A1, CYP2E1 และ CYP3A11 mRNA ที่สูงขึ้นสอดคล้องกับสมรรถนะของเอนไซม์ EROD, ANH และ ENDM จากผลการศึกษาเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงแนวโน้มหรือโอกาสการก่อให้เกิดอันตรกิริยาระหว่างอาหารและยาของผลไม้ทั้งหกชนิดนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสับปะรด ดังนั้นการบริโภคน้ำผลไม้ในปริมาณมากและ/หรือเป็นระยะเวลานานควรพึงระวังอันตรกิริยาระหว่างน้ำผลไม้และยา

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาผลกระทบของน้ำผลไม้ไทย 6 ชนิด ได้แก่ กล้วย ฝรั่ง มะม่วง มะละกอ มังคุด และสับปะรด ต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ไอโซฟอร์มหลักที่ทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงยาและสารแปลกปลอมส่วนใหญ่ในชีวิตประจำวัน การประเมินค่ามัธยฐานของความเข้มข้นที่ยับยั้ง (IC_{50}) สมรรถนะของเอนไซม์ CYP1A1, CYP1A2, CYP2B9, CYP2B10, CYP2E1 และ CYP3A พบว่า สับปะรดมีศักยภาพสูงสุดในการยับยั้งเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ทุกไอโซฟอร์มในไมโครโซมจากตับหนูเมาส์ รองลงมาได้แก่ มังคุด ฝรั่ง มะม่วง มะละกอสุก และกล้วยน้ำว้า ตามลำดับ หนูเมาส์ สายพันธุ์ ICR เพศผู้ ที่ได้รับน้ำสับปะรด ขนาด 10, 20 และ 40 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน โดยการป้อนทางปากทุกวัน เป็นเวลา 7 และ 28 วัน มีสมรรถนะของ ethoxyresorufin O-deethylase (EROD), aniline hydroxylase (ANH) และ erythromycin N-demethylase (ENDM) ซึ่งเป็นดัชนีบ่งชี้การทำงานที่เพิ่มขึ้นของเอนไซม์ CYP1A1, CYP2E1 และ CYP3A11 ที่เพิ่มขึ้นตามลำดับ นอกจากนี้ ระดับการแสดงออกของ CYP1A1, CYP2E1 และ CYP3A11 mRNA ถูกเหนี่ยวนำสอดคล้องกับสมรรถนะของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงแนวโน้มหรือโอกาสการก่อให้เกิดอันตรกิริยาระหว่างอาหารและยาของผลไม้ทั้งหกชนิดนี้โดยเฉพาะอย่างยิ่งสับปะรด อันเนื่องมาจากศักยภาพของผลไม้ต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ดังนั้นการบริโภคน้ำผลไม้ในปริมาณมากและ/หรือเป็นระยะเวลานานควรพึงระวังอันตรกิริยาระหว่างน้ำผลไม้และยา

Abstract

The effects of six Thai fruits, namely banana, guava, mangosteen, pineapple, ripe mango, and ripe papaya, on cytochrome P450 (P450) activities were investigated. The median inhibitory concentrations (IC_{50}) of each of the fruit juices on CYP1A1, CYP1A2, CYP2E1, and CYP3A11 activities were determined. Pineapple juice showed the strongest inhibitory effect against all the evaluated P450 isozyme activities in mouse hepatic microsomes, followed by mangosteen, guava, ripe mango, ripe papaya, and banana. The study was further performed in male ICR mice given pineapple juice intragastrically at doses of 10, 20, and 40 mg/kg/day for 7 or 28 days. In a concentration-dependent fashion, the pineapple juice raised ethoxyresorufin *O*-deethylase, aniline hydroxylase, and erythromycin *N*-demethylase activities, which are marker enzymatic reactions responsible for CYP1A1, CYP2E1, and CYP3A11, respectively. The effect of pineapple juice on the expression of CYP1A1, CYP2E1, and CYP3A11 mRNAs corresponded to their enzymatic activities. However, the pineapple juice significantly decreased methoxyresorufin *O*-demethylase activity. These observations supported that the six Thai fruits were a feasible cause of food-drug interaction or adverse drug effects due to their potential to modify several essential P450 activities. Individuals consuming large quantities of pineapple for long periods of time should be cautioned of these potential adverse effects.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัย ผลของน้ำผลไม้ไทย กล้วย ฝรั่ง มะม่วง มะละกอ มังคุด และสับปะรด ต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 (Impact of Thai fruits juice: banana, guava, mango, papaya, mangosteen, and pineapple on cytochrome P450 enzyme activities) ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ชุดโครงการ “การเพิ่มคุณค่าสมุนไพรบวกร” สกว. ฝ่ายเกษตร

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศูนย์สัตว์ทดลองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สำหรับการจัดหา การเลี้ยงและดูแลสัตว์ทดลองตลอดโครงการวิจัย ห้องปฏิบัติการกลางและห้องปฏิบัติการเภสัชชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ ศูนย์เครื่องมือกลาง คณะแพทยศาสตร์ และห้องปฏิบัติการสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สำหรับการเอื้อเฟื้อและสนับสนุนเครื่องมือวิจัยขั้นสูงในโครงการวิจัย รวมถึงความทุ่มเทและความร่วมมือ ร่วมใจ และเป็นอันหนึ่งอันเดียวกันของผู้ช่วยวิจัยและนักวิจัย กลุ่มวิจัยฤทธิ์ทางยาของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติโดยเทคโนโลยีชีวภาพทางเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

รองศาสตราจารย์ ดร.กนกวรรณ จารุกัจฉา

25 กรกฎาคม 2555

สารบัญ

	หน้า
Executive Summary	i
บทคัดย่อ	ii
Abstract	iii
กิตติกรรมประกาศ	iv
สารบัญรูป	vii
สารบัญตาราง	viii
ความสำคัญของปัญหาวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ระเบียบวิธีวิจัย	3
การเตรียมตัวอย่างน้ำผลไม้	3
การประเมินสารสำคัญหรือสารออกฤทธิ์หลักจากตัวอย่างน้ำผลไม้	3
การประเมินปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoids assay)	3
การประเมินปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic assay)	3
การยื่นขอรับการพิจารณาข้อเสนอโครงการฯ ต่อคณะกรรมการจรรยาบรรณและมาตรฐานการเลี้ยง	
และการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น	3
การทดสอบผลกระทบของน้ำผลไม้ต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในหลอดทดลอง	4
การเตรียมสัตว์ทดลองเพื่อเป็นแหล่งของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 จากตับหนูเมาส์	4
การเตรียมไมโครโซมเพื่อเป็นแหล่งเอนไซม์จากตับหนูเมาส์	4
การตรวจวัดสมรรถนะของเอนไซม์ ไซโตโครม พี 450 (P450 enzyme activity) ในหลอดทดลอง (in vitro)	4
Alkoxyresorufin O-dealkylation (AROD)	4
Aniline hydroxylation (ANH)	5
Erythromycin N-demethylation (ENDM)	5
การแปลผลการศึกษา	5
การทดสอบผลกระทบของน้ำผลไม้ต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในกาย (in vivo) ในหนูเมาส์	5
การเตรียมสัตว์ทดลอง	6
การตรวจวัดระดับการแสดงออกของ mRNA ของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450	6
การเตรียมไมโครโซม	7
การตรวจวัดสมรรถนะ (enzyme activity) ของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450	7
การวิเคราะห์ทางสถิติ	7
การแปลผลการศึกษา	7
ผลการทดลอง	9
การเตรียมตัวอย่างน้ำผลไม้	9

	หน้า
สารสำคัญหลักในตัวอย่างน้ำผลไม้	9
ผลกระทบของน้ำผลไม้ต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในหลอดทดลอง	10
ผลกระทบของน้ำผลไม้ต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในกาย (in vivo) ในหนูเมาส์	13
ผลกระทบของน้ำสับปะรดต่อการแสดงออกของ mRNA ของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในตับหนูเมาส์	13
ผลของน้ำสับปะรดต่อสมรรถนะ ของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในตับหนูเมาส์	14
บทสรุปและอภิปรายผลการทดลอง	15
เอกสารอ้างอิง	17
ผลลัพธ์และตัวชี้วัดความสำเร็จของโครงการ	19
ภาคผนวก	20
ภาคผนวก ก หนังสือเห็นชอบจากคณะกรรมการจรรยาบรรณและมาตรฐานการเลี้ยงและการใช้สัตว์ เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น	21
ภาคผนวก ข Reprint การตีพิมพ์ผลงานในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ	23
ภาคผนวก ค การเผยแพร่ผลงานรูปแบบโปสเตอร์ ในการประชุมวิชาการระดับชาติ	32
ภาคผนวก ง การขยายผลความรู้ที่ได้จากการวิจัยสู่นักศึกษาเภสัชศาสตร์	34
ภาคผนวก จ ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนและกิจกรรมที่ดำเนินการและ ผลที่ได้รับ	38

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 โครงร่างการยับยั้ง (Inhibitory profile) ของน้ำผลไม้ 6 ชนิดต่อเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ไอโซฟอร์มต่าง ๆ 11

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ชนิดและความเข้มข้นของสารทดสอบที่ให้สัตว์ทดลอง	6
ตารางที่ 2 โพรป และ/หรือไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับยีนที่ศึกษา	8
ตารางที่ 3 น้ำหนักผลไม้สดและผงแห้ง	9
ตารางที่ 4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)	9
ตารางที่ 5 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoids content)	10
ตารางที่ 6 ผลของน้ำผลไม้ต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในหลอดทดลอง	12
ตารางที่ 7 เปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนและกิจกรรมที่ดำเนินการและผลลัพธ์ที่ได้รับ	39

ความสำคัญของปัญหาวิจัย

ปัจจุบัน ประชาชนให้ความสนใจต่อสุขภาพและนิยมบริโภคน้ำผลไม้เพิ่มมากขึ้น เพื่อประโยชน์ต่อสุขภาพร่างกาย (จำเริญ เสลาคุณ 2546) ผลไม้ไทยที่นิยมนำมาแปรรูปเป็นน้ำผลไม้เพื่อบริโภค ได้แก่ กัลย ฝรั่ง มะม่วง มะละกอ มังคุด และสับปะรด ได้ถูกรายงานประโยชน์และข้อดีมากมายเพื่อเป็นข้อมูลในการตัดสินใจแก่ผู้บริโภค อาทิ เช่น เป็นแหล่งของวิตามินเอและวิตามินซี ช่วยบำรุงสายตา และป้องกันเลือดออกตามไรฟัน (น้ำสมุนไพรรเพื่อสุขภาพ, 2546)

กัลยน้ำว่า (*Musa sapientum* Linn., MUSACEAE) นอกจากจะอุดมไปด้วยวิตามินแล้ว ส่วนต่างๆ ของกัลยยังมีรายงานฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย อาทิเช่น ลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือด (Pari and Umamaheswari, 2000) รักษาแผลในกระเพาะอาหาร (Goel et al., 1986) ฝรั่ง (*Psidium guajava* Linn., MYRTACEAE) เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระและเส้นใย (Jiménez-Escrig et al., 2001) มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือด (Roman-Ramos et al., 1995) มะม่วงน้ำดอกไม้ (*Mangifera indica* Linn., ANACARDIACEAE) เป็นหนึ่งในมะม่วงสุกที่ประชาชนนิยมบริโภคที่อุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระและเส้นใย (Mahattanatawee et al., 2006) นอกจากนี้ น้ำมะม่วงยังมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Percival et al., 2006) มะละกอพันธุ์แขกดำ (*Carica papaya* Linn., CARICACEAE) เป็นผลไม้อีกชนิดหนึ่งที่เป็นที่นิยมรับประทานเช่นกัน น้ำมะละกอสุกอุดมไปด้วยวิตามินเอและวิตามินซี และมีรายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับวิตามินอี (Mehdipour, et al. 2006) อีกทั้งยังมีข้อดีในการลดความดันเลือด (Eno et al., 2000) มังคุด (*Garcinia mangostana* Linn., GUTTIFERAE) มีฤทธิ์ป้องกันกล้ามเนื้อหัวใจตาย (Sampath and Vijayaraghavan, 2007) น้ำมังคุดมีฤทธิ์ต้านอักเสบ (Udani et al., 2009) สับปะรด (*Ananas comosus* Merr., BROMELIACEAE) มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Obloh G, Elusiyan CA, 2004) น้ำสับปะรดมีรายงานว่ามฤทธิ์ฆ่าพยาธิด้วย (Berger and Asenjo, 1939) ดังนั้น จะเห็นได้ว่าการบริโภคน้ำผลไม้ไทยดังกล่าวนี้ล้วนเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ การส่งเสริมให้มีการบริโภคที่มากขึ้นจะเป็นการเพิ่มมูลค่าของผลไม้ไทยเหล่านี้ได้อีกทางหนึ่ง อย่างไรก็ตาม นอกเหนือจากการศึกษาด้านคุณประโยชน์แล้ว การศึกษาผลกระทบของผลไม้เหล่านี้ต่อการแปลงรูปทางชีวภาพในร่างกายยังมีความจำเป็นเพื่อเป็นข้อมูลแสดงแนวโน้มอันตรกิริยาระหว่างผลไม้และยา หรือผลไม้และการแปลงรูปทางชีวภาพของสารในร่างกายในสภาวะต่างๆ เพื่อประโยชน์ในการตัดสินใจและเลือกบริโภคผลไม้ที่เหมาะสมกับสภาวะร่างกายหรือการรักษาโรคที่ใช้ร่วมด้วยต่อไป

การศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 เป็นการศึกษาแขนงหนึ่งซึ่งถูกพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ในการทำนายหรืออธิบายการเกิดความเป็นพิษของยาในทางคลินิก ซึ่งเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่พบมากในตับและมีหน้าที่ในการเปลี่ยนแปลงยาและสารแปลกปลอมต่างๆ มากกว่าร้อยละ 60 ของยาที่ใช้ในท้องตลาด (Guengerich, 2008) หน้าที่หลักคือเปลี่ยนแปลงยาหรือสารแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายให้อยู่ในรูปแบบที่ร่างกายสามารถกำจัดออกได้ง่าย เนื่องจากเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 มีอยู่ในปริมาณที่จำกัดในอวัยวะต่างๆ การได้รับยาหรือสารใด ๆ เข้าสู่ร่างกายพร้อมกันหรือในเวลาเดียวกันจึงอาจมีผลต่อการถูกกำจัดของยาหรือสารแปลกปลอมนั้น ๆ ทั้งในแง่ของปริมาณและอัตราเร็วในการกำจัด ซึ่งประชาชนส่วนใหญ่อาจบริโภคน้ำผลไม้เพื่อหวังผลการสร้างเสริมสุขภาพ แต่ในขณะเดียวกันก็อาจมีโรคประจำตัวหรือมีการบริโภทยาหรือสารร่วมกันด้วย ดังนั้น หากบริโภทยาหรือสารร่วมกับน้ำผลไม้เป็นระยะเวลานาน จึงอาจมีความเป็นไปได้สูงที่จะก่อให้เกิดอันตรกิริยาระหว่างยาหรือสารแปลกปลอมต่างๆ จากการบริโภคน้ำผลไม้เหล่านี้ อันจะส่งผลต่อระดับยาที่ผู้ป่วยใช้อยู่ ตลอดจนอาจกระทบต่อประสิทธิภาพในการรักษาโรคในลำดับถัดไปได้ อีกทั้งยังเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดอันตรายจากอาการข้างเคียงของยาแผนปัจจุบันด้วย หรืออาจส่งผลให้

การทำงานของระบบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงสารแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายมีความผิดปกติหรือแปรเปลี่ยนไป รายงานก่อนหน้านี้แสดงผลของน้ำและเนื้อเกรปฟรุต (grapefruit) ซึ่งเป็นผลไม้ต่างประเทศที่มีประโยชน์มากมายต่อสุขภาพ ว่ามีความสามารถเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 3 เอ (CYP3A) อันส่งผลต่อระดับยาหลายชนิดในกระแสเลือด รวมทั้งสามารถลดประสิทธิภาพการรักษาของยาบางชนิด (Kay et al., 2010) แต่จนถึงปัจจุบันยังไม่มีรายงานการศึกษาผลของน้ำผลไม้ไทยในลักษณะดังกล่าวนี้มาก่อน ดังนั้นในการศึกษานี้คณะผู้วิจัยจึงทำการศึกษาลักษณะของน้ำผลไม้ไทย 6 ชนิด ได้แก่ กล้วยน้ำว้า ฝรั่ง มะม่วงน้ำดอกไม้ มะละกอพันธุ์แขกดำ มังคุด และสับปะรด ต่อการแสดงออกของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงยาและสารแปลกปลอมที่สำคัญ คือ แฟมิลี 1, 2, และ 3 ได้แก่ CYP1A1, CYP1A2, CYP2B9, CYP2B10, CYP2E1 และ CYP3A เป็นต้น ข้อมูลที่ได้รับจากการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์ในการทำนายการเกิดอันตรกิริยาจากการบริโภคน้ำผลไม้เหล่านี้ร่วมกับยาแผนปัจจุบันอื่นๆ และเป็นข้อควรระวังของการบริโภคน้ำผลไม้ไทยร่วมกับการใช้ยาแผนปัจจุบันบางชนิดได้อีกทางหนึ่ง อีกทั้งยังเป็นข้อมูลสนับสนุนการกำหนดปริมาณบริโภคน้ำผลไม้ที่เหมาะสม รวมทั้งการส่งเสริมการบริโภคน้ำผลไม้ดังกล่าวตามภูมิปัญญาดั้งเดิมอย่างสมเหตุสมผลเพื่อประโยชน์ต่อสุขภาพอย่างแท้จริง

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาลักษณะของผลน้ำผลไม้ไทย 6 ชนิด ได้แก่ กล้วยน้ำว้า ฝรั่ง มะม่วงน้ำดอกไม้ มะละกอพันธุ์แขกดำ มังคุด และสับปะรด ต่อสมรรถนะ (enzyme activity) ของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 แฟมิลี 1, 2, และ 3 ได้แก่ CYP1A1, CYP1A2, CYP2B9, CYP2B10, CYP2E1 และ CYP3A ในไมโครโซมตับหนูเมาส์เพื่อเป็นข้อมูลทำนายการเกิดอันตรกิริยาจากการบริโภคน้ำผลไม้เหล่านี้ร่วมกับยาแผนปัจจุบันการส่งเสริมการใช้หรือข้อควรระวังของการบริโภคน้ำผลไม้เหล่านี้เป็นระยะเวลานาน หรือการบริโภคร่วมกับยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารอื่นๆ อย่างถูกต้องและเหมาะสม

ระเบียบวิธีวิจัย

การเตรียมตัวอย่างน้ำผลไม้

เตรียมน้ำผลไม้ไทยทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ กล้วยน้ำว่า ฝรั่ง มะม่วงน้ำดอกไม้ มะละกอพันธุ์แขกดำ มังคุด และสับปะรด โดยซื้อผลไม้สดทั้ง 6 ชนิดจากตลาดสด อำเภอเมือง ขอนแก่น นำมาปอกเปลือก (ยกเว้น ฝรั่ง เนื่องจากรับประทานพร้อมเปลือกได้) และแยกเมล็ด จากนั้นนำมาคั้นน้ำสดด้วยเครื่องแยกกาก (Phillips, Germany) ก่อนกรองน้ำผลไม้ที่ได้ผ่านตะแกรงและผ้าขาวบาง จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dryer ต่อไป เมื่อได้ผงแห้งของน้ำผลไม้แต่ละชนิดทำการชั่งปริมาณอย่างแม่นยำ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนทำการทดลองต่อไป

การประเมินสารสำคัญหรือสารออกฤทธิ์หลักจากตัวอย่างน้ำผลไม้

1. การประเมินปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoids assay)

การประเมินปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดใช้หลักการการเกิดสารประกอบที่มีสีกับอลูมิเนียมคลอไรด์ (aluminium chloride) ตามวิธีของ Woisky และ Salatino (1998) โดยย่อคือ การเจือจางตัวอย่างน้ำผลไม้ที่ต้องการทดสอบให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ก่อนเติม 1 โมลาร์ โซเดียมอะซีเตทและ 10 เปอร์เซ็นต์ อะลูมิเนียมคลอไรด์ แล้วนำไปวัดสีที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร โดยปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoids content) คำนวณโดยการเปรียบเทียบกับปริมาณของเคอเซตินมาตรฐาน (standard quercetin) (Chang et al., 2002)

2. การประเมินปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic assay)

ขั้นตอนนี้ ใช้วิธีการตรวจสอบของ Folin-Ciocalteu (Kähkönen et al., 1999) ซึ่งมีหลักการ คือ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในตัวอย่างน้ำผลไม้จะเข้าทำปฏิกิริยากับสารละลายฟอลิน-ซีโอแคลโท (Folin-Ciocalteu reagent) ซึ่งประกอบด้วยฟอสโฟโมลิบดีค-ฟอสโฟทังสติก แอซิด (phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent) ซึ่งจะถูกรีดิวซ์ได้โดยหมู่ฟีนอลิกไฮดรอกซิล (phenolic hydroxyl groups) ของโพลีฟีนอลทั้งหมด (total polyphenols) ในตัวอย่างน้ำผลไม้เกิดเป็นสารประกอบของทั้งสเดนและโมลิบดีนัม บลู ซึ่งให้น้ำเงินและนำไปวัดสีที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content) คำนวณโดยการเปรียบเทียบกับปริมาณของกรดแกลลิกมาตรฐาน (standard gallic acid)

การยื่นขอรับการพิจารณาข้อเสนอโครงการฯ ต่อคณะกรรมการจรรยาบรรณและมาตรฐานการเลี้ยงและการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

การยื่นข้อเสนอโครงการฯ ต่อคณะกรรมการจรรยาบรรณและมาตรฐานการเลี้ยงและการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ผ่านคณะเภสัชศาสตร์ เป็นเวลาประมาณ 1-2 เดือนก่อนเริ่มการศึกษาในส่วนที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ทดลอง ตอบคำถามและ/หรือทำการแก้ไขระเบียบวิธีวิจัยที่เกี่ยวกับสัตว์ทดลองตามข้อเสนอแนะของคณะกรรมการ (ถ้ามี) และส่งเอกสารการแก้ไขกลับไปยังคณะกรรมการเพื่อรอรับการพิจารณาอนุมัติ เมื่อได้เลขที่อนุมัติฯ จึงเริ่มดำเนินการศึกษาในส่วนที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ทดลองทั้งหมด สำหรับข้อเสนอโครงการนี้ผ่านความเห็นชอบของคณะกรรมการฯ เป็นที่เรียบร้อยแล้ว โดยมีเลขที่อนุมัติฯ คือ จส.มข. 13/2554 (AEKKU 13/2554)

การทดสอบผลกระทบของน้ำผลไม้ต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในหลอดทดลอง

1. การเตรียมสัตว์ทดลองเพื่อเป็นแหล่งของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 จากตับหนูเมาส์

หนูเมาส์ สายพันธุ์ ICR เพศผู้ อายุ 7 สัปดาห์ จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา นครปฐม แบ่งออกเป็น 5 กลุ่มแบบสุ่ม (กลุ่มละ 5 ตัว) ให้หนูทุกตัวได้รับอาหารและน้ำอย่างเพียงพอตลอดเวลา โดยกลุ่มควบคุมไม่ได้รับสารใด ๆ กลุ่มที่เหลือให้สารกระตุ้นตับแบบที่เฉพาะเจาะจงกับเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 แต่ละไอโซฟอร์ม ดังนี้ กลุ่มที่ได้รับสารกระตุ้นของ CYP1A1 และ CYP1A2 คือ beta-naphthoflavone (BNF) ขนาด 30 mg/kg/d, s.c., เป็นระยะเวลา 3 วัน (Boobis et al., 1977) สารกระตุ้นของ CYP2B9 และ CYP2B10 คือ phenobarbital (PB) 100 mg/kg/d, i.p., เป็นระยะเวลา 3 วัน (Jarukamjorn et al., 1999) สารกระตุ้นของ CYP3A คือ dexamethasone (DEX) 30 mg/kg/d, s.c., เป็นระยะเวลา 3 วัน (Jarukamjorn et al., 2002) และ สารกระตุ้นของ CYP2E1 คือ acetone (Ace) 1% ผสมในน้ำดื่ม เป็นระยะเวลา 7 วัน (Wang et al., 2000)

24 ชั่วโมงหลังจากการได้รับยาครั้งสุดท้าย สัตว์จะถูกทำให้สลบด้วย Nembutal® ขนาด 40–50 mg/kg ทดสอบการสลบโดยใช้ pedal reflex ก่อนเปิดช่องท้องสัตว์ทำการ perfuse สารละลาย 1.15% (w/v) โปแตสเซียมคลอไรด์ผ่าน portal vein ไปยัง inferior vena cava เพื่อกำจัดเลือดออกจากตัวสัตว์ และทำการแยกตับและเก็บรักษาที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อเตรียมไมโครโซมต่อไป

2. การเตรียมไมโครโซมเพื่อเป็นแหล่งเอนไซม์จากตับหนูเมาส์

การเตรียมไมโครโซมใช้หลักการของการปั่นเหวี่ยง โดยนำตับมาตัดให้เป็นชิ้นเล็กละเอียดด้วยกรรไกรบนแผ่นอลูมิเนียมที่วางบนอ่างน้ำแข็ง จากนั้นนำตับที่ตัดละเอียดแล้วไปบดให้ละเอียดในสารละลาย 1.15% (w/v) โปแตสเซียมคลอไรด์ที่เย็นก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนแขวนลอยใส่อ่างปั่นด้วยความเร็วสูงยวดยิ่งที่ 104,000xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และทำการแขวนลอยตะกอนไมโครโซมที่ได้ด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ที่เย็น และเก็บรักษาไมโครโซมที่ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทดสอบสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ต่อไป

การหาปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนในไมโครโซม ใช้วิธีของแบรดฟอร์ด (Bradford method) โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นสารมาตรฐาน (Nemoto and Sakurai, 1992).

3. การตรวจวัดสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 (P450 enzyme activity) ในหลอดทดลอง (in vitro)

การตรวจวัดสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 อาศัยหลักการคือ การให้ซับสเตรท (substrate) ที่จำเพาะกับเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 แต่ละไอโซฟอร์ม ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในไมโครโซมซึ่งเตรียมจากตับหนูที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสารกระตุ้นที่จำเพาะต่อไอโซฟอร์มนั้น ๆ จากนั้นตรวจวัดผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค spectrofluorophotometry หรือ UV-spectrophotometry โดยใช้ปฏิกิริยา ethoxyresorufin O-deethylation (EROD) สำหรับ CYP1A1, methoxyresorufin O-demethylation (MROD) สำหรับ CYP1A2, pentoxyresorufin O-dealkylation (PROD) และ benzyloxyresorufin O-dealkylation (BROD) สำหรับ CYP2B9 และ CYP2B10, aniline hydroxylation สำหรับ CYP2E1, และ erythromycin N-demethylation สำหรับ CYP3A11 (Sakuma et al., 1999; Robert et al., 1995)

- **Alkoxyresorufin O-dealkylation (AROD).** การตรวจวัดสมรรถนะของ AROD ดัดแปลงจากวิธีของ Sakuma et al (1999) โดยปฏิกิริยามีปริมาตรสุดท้าย 200 ไมโครลิตร ประกอบด้วยน้ำผลไม้ที่ต้องการทดสอบ ความเข้มข้น 0.8 – 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร Tris-HCl (pH 7.8) ความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ NADPH ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ไม

โครโมโซม ปริมาณโปรตีน 5 ไมโครกรัม และ ethoxyresorufin สำหรับ CYP1A1 หรือ methoxyresorufin สำหรับ CYP1A2 หรือ pentoxyresorufin หรือ benzyloxyresorufin สำหรับ CYP2B9 และ CYP2B10 ความเข้มข้น 0.625 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ทำการวัดปริมาณ resorufin ที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค spectrofluorometry ที่ excitation wavelength 520 นาโนเมตร และ emission wavelength 590 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับ resorufin มาตรฐาน หลังการบ่มปฏิกิริยาที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นวิเคราะห์ค่า IC_{50} ของน้ำผลไม้แต่ละชนิดด้วยโปรแกรม Probit และ SPSS 11.5

- **Aniline hydroxylation (ANH).** การวิเคราะห์สมรรถนะของ ANH ดัดแปลงจากวิธีของ Robert et al. (1995) โดยปฏิกิริยามีปริมาตรสุดท้าย 100 ไมโครลิตร ประกอบด้วย น้ำผลไม้ที่ต้องการทดสอบ ความเข้มข้น 1.6 – 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แมกนีเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ NADPH 1 มิลลิโมลาร์ aniline hydrochloride 15 มิลลิโมลาร์ นิโคตินาไมด์ 10 นาโนโมลาร์ Tris-HCl (pH 7.8) ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ และ ไมโครโซม ปริมาณโปรตีน 150 มิลลิกรัม ทำการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ก่อนหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก ความเข้มข้น 10% แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,900 rpm นาน 15 นาที นำ supernatant ที่ได้ไปเติมโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 20% และฟีนอลในโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 4% และบ่มปฏิกิริยาเป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับ *p*-aminophenol มาตรฐาน จากนั้นวิเคราะห์ค่า IC_{50} ของน้ำผลไม้แต่ละชนิดด้วยโปรแกรม Probit และ SPSS 11.5

- **Erythromycin N-demethylation (ENDM).** สมรรถนะของ ENDM ตรวจวัดจากปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ที่เกิดขึ้นจากการดัดแปลงปฏิกิริยา Hantzsch (Roberts et al., 1995) โดยปฏิกิริยาปริมาตรสุดท้าย 100 ไมโครลิตร ประกอบด้วย น้ำผลไม้ที่ต้องการทดสอบ ความเข้มข้น 1.6 – 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร NADPH 1 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ erythromycin ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.4) ความเข้มข้น 70 มิลลิโมลาร์ ลาร์ และ ไมโครโซม ปริมาณโปรตีน 15 มิลลิกรัม บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาทีหลังจากเริ่มเติม NADPH ลงในปฏิกิริยา และหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก ความเข้มข้น 12.5% ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,900 rpm นาน 15 นาที supernatant ที่ได้นำไปเติมสารละลาย Nash (Nash, 1953; Compton and Purdy, 1980) และบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับฟอร์มาลดีไฮด์มาตรฐาน จากนั้นวิเคราะห์ค่า IC_{50} ของน้ำผลไม้แต่ละชนิดด้วยโปรแกรม Probit และ SPSS 11.5

4. การแปลผลการศึกษา

หากน้ำผลไม้ที่ทดสอบมีแนวโน้มที่จะถูกเปลี่ยนแปลงโดยผ่านเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ไอโซฟอร์มใด ค่าสมรรถนะของเอนไซม์ฯ ของปฏิกิริยาที่จำเพาะต่อไอโซฟอร์มนั้นๆ จะลดลงต่ำกว่าค่าสมรรถนะของเอนไซม์ฯ ของกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสารสกัดน้ำผลไม้ชนิดใดมีผลเปลี่ยนแปลงสมรรถนะของเอนไซม์ฯ ไอโซฟอร์มใดมาก จะแสดงถึงศักยภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ไอโซฟอร์มนั้นๆ มากตามไปด้วย จากโครงร่างการยับยั้ง (inhibitory profile) ของน้ำผลไม้แต่ละชนิดนำมาคำนวณค่า IC_{50} (median inhibitory concentration) ของน้ำผลไม้เหล่านั้นๆ ต่อเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 แต่ละไอโซฟอร์ม ด้วยโปรแกรม Probit analysis software (SPSS 11.5)

การทดสอบผลกระทบของน้ำผลไม้ต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในกาย (in vivo) ในหนูเมาส์

การศึกษาในส่วนนี้ได้คัดเลือกน้ำผลไม้ที่มีศักยภาพสูงที่สุดในการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในหลอดทดลอง ได้แก่ น้ำสับปะรด มาทำการศึกษาเชิงลึก เพื่อศึกษาผลของน้ำสับปะรดต่อการเปลี่ยนแปลงของ

เอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ที่ระดับอนุชีวโมเลกุล แบบภายในกาย (*in vivo*) หนูเมาส์ทั้งแบบระยะสั้น (1 สัปดาห์) และระยะกึ่งยาว (4 สัปดาห์)

1. การเตรียมสัตว์ทดลอง

หนูเมาส์ สายพันธุ์ ICR จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ เพศผู้ เต็มวัย อายุ 7 สัปดาห์ แบ่งกลุ่มโดยสุ่ม (กลุ่มละ 5 ตัว) ออกเป็น (1) กลุ่มควบคุม ให้ได้รับ corn oil 0.1 ml/mouse/d, i.p., เป็นระยะเวลา 3 วัน (2) กลุ่มควบคุมเชิงบวก (positive control) ให้ได้รับสารกระตุ้นตับแบบที่เฉพาะเจาะจงกับเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ดังนี้ สารกระตุ้นของ CYP1A1 และ CYP1A2 คือ beta-naphthoflavone (BNF) 30 mg/kg/d, i.p., เป็นระยะเวลา 3 วัน (Boobis et al., 1977) สารกระตุ้นของ CYP2E1 คือ 1% acetone (Ace) ผสมในน้ำดื่ม เป็นระยะเวลา 7 วัน (Wang et al., 2000) สารกระตุ้นของ CYP3A คือ dexamethasone (DEX) 30 mg/kg/d, i.p., เป็นระยะเวลา 3 วัน (Jarukamjorn et al., 2002) และ (3) กลุ่มทดลอง ให้ได้รับน้ำสัปรด (3 ขนาด คือ ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 mg/kg/day, i.g., เป็นระยะเวลา 1 หรือ 4 สัปดาห์ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ชนิดและความเข้มข้นของสารทดสอบที่ให้สัตว์ทดลอง

กลุ่มการศึกษา	ระยะเวลา	
	7 วัน	28 วัน
กลุ่มควบคุม	Corn oil	NT
กลุ่มควบคุมเชิงบวก		
CYP1A1/CYP1A2	BNF	–
CYP2E1	Ace	–
CYP3A	Dex	–
กลุ่มทดลอง		
น้ำสัปรด	10 mg/kg/day	10 mg/kg/day
	20 mg/kg/day	20 mg/kg/day
	40 mg/kg/day	40 mg/kg/day

หมายเหตุ. NT, non treatment; BNF, beta-naphthoflavone; Ace, acetone; Dex, dexamethasone

24 ชั่วโมงหลังได้รับยาครั้งสุดท้าย จะทำการสลบสัตว์ด้วย Nembutal® ขนาด 40 mg/kg ทดสอบการสลบโดยการสังเกต pedal reflex ก่อนเปิดช่องท้องสัตว์เพื่อทำการ perfuse สารละลาย 1.15% (w/v) โปแตสเซียมคลอไรด์ผ่าน portal vein ไปยัง inferior vena cava เพื่อกำจัดเลือดออกจากตัวสัตว์ และทำการเก็บแยกตับเพื่อเตรียม total RNA และไมโครโซมต่อไป

2. การตรวจวัดระดับการแสดงออกของ mRNA ของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450

Total RNA เตรียมจากตับสัตว์ทดลองแต่ละตัว ด้วยวิธี guanidine thiocyanate-phenol-chloroform method จากนั้นนำไปวิเคราะห์การแสดงออกของ mRNA โดยใช้เทคนิค RT-realtime PCR ซึ่งใช้โพรบ และ/หรือไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับยีนที่สนใจศึกษา (ตารางที่ 2) ได้แก่ CYP1A1, CYP1A2, CYP2E1 และ CYP3A11 (Jarukamjorn et al., 1999; Chatuphonprasert et al., 2009)

3. การเตรียมไมโครโซม

การเตรียมไมโครโซมใช้หลักการการปั่นเหวี่ยง (centrifugation) โดยนำตับมาตัดให้ละเอียดด้วยการกรไกรบนน้ำแข็ง จากนั้นบดให้ละเอียดในสารละลาย 1.15% (w/v) โปแตสเซียมคลอไรด์ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนแขวนลอยไปปั่นด้วยความเร็วสูงยดยิ่งที่ 104,000xg เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และทำการแขวนลอยไมโครโซมด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์และรักษาเก็บไมโครโซมที่ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทดสอบ การหาปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนในไมโครโซมทำโดยวิธีการของแบรดฟอร์ด (Bradford method) โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นสารมาตรฐาน (Nemoto and Sakurai, 1992)

4. การตรวจวัดสมรรถนะ ของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 (P450 enzyme activity) ในกาย (in vivo)

การตรวจวัดสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 อาศัยหลักการคือการใช้ซับสเตรท (substrate) ที่จำเพาะกับเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 แต่ละไอโซฟอร์ม จากนั้นตรวจวัดผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค spectrofluorophotometry หรือ UV-spectrophotometry โดยจะใช้ปฏิกิริยา ethoxyresorufin-O-demethylase (EROD) สำหรับ CYP1A1, methoxyresorufin-O-demethylase (MROD) สำหรับ CYP1A2, aniline hydroxylation (ANH) สำหรับ CYP2E1, และ erythromycin N-demethylation (ENDM) สำหรับ CYP3A11 (Sakuma et al., 1999; Roberts et al., 1995) ดังรายละเอียดที่อธิบายไว้ก่อนหน้านี้

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองที่ได้นำมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วย one way ANOVA ร่วมกับ Tukey (SPSS 11.5) โดยค่าความแตกต่างที่ p -value มากกว่า 0.05 ขึ้นไปจัดว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

6. การแปลผลการศึกษา

หากน้ำผลไม้ที่ทดสอบมีแนวโน้มที่จะเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ไอโซฟอร์มใด การแสดงออกของ mRNA (mRNA expression) และค่าสมรรถนะของปฏิกิริยาที่จำเพาะต่อไอโซฟอร์มนั้นๆ จะมีการเปลี่ยนแปลงในลักษณะของการแสดงออกที่มากกว่าหรือน้อยกว่าการแสดงออกของ mRNA ของยีนเดียวกันหรือค่าสมรรถนะของเอนไซม์เดียวกันของกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังทำการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวกด้วย หากน้ำผลไม้ที่ทดสอบมีแนวโน้มที่จะสามารถเหนี่ยวนำหรือยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ไอโซฟอร์มใด ก็จะเป็นข้อมูลนำไปสู่การกำหนดข้อควรระวังของการบริโภคผลไม้ชนิดนั้นๆ ในลำดับต่อไป

ตารางที่ 2 แสดงไพรเมอร์ และ/หรือไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับยีนที่ศึกษา

Genes	Specific TaqMan [®]		Specific TaqMan [®] TAMRA Gene Expression Detection kit			SYBR Green I Dye		References
	Gene Expression Assays (Inventoried)		Forward primer	Reverse primer	Probe	Forward primer	Reverse primer	
<i>Cyp1a1</i>			5′-GAC ATT TGA GAA GGGCCA CAT C-3′	5′-CCA AAG AGG TCC AAA ACA ATC G-3′	5′-FAM-CGA GAA TGC CAA TGT CCA GCT GTC A- TAMRA-3′			Jarukamjorn, et al., 2009; Chatuphonprasert, et al., 2011
<i>Cyp1a2</i>	Mm00487224_ml							Jarukamjorn, et al., 2009; Chatuphonprasert, et al., 2011
<i>Cyp2e1</i>	Mm00491127_m1							Chatuphonprasert, et al., 2011
<i>Cyp3a11</i>	Mm00731567_m1							Chatuphonprasert, et al., 2011
<i>GAPDH</i>						5′-TCC ACT CAC GGC AAA TTC AAC G-3′	5′-TAG ACT CCA CGA CAT ACT CAG C-3′	Jarukamjorn, et al., 2009; Udomsuk, et al., 2012

ผลการทดลอง

การเตรียมตัวอย่างน้ำผลไม้

การเตรียมน้ำผลไม้ไทย 6 ชนิด ได้แก่ กัลยน้ำว่า ฝรั่ง มะม่วงน้ำดอกไม้ มะละกอพันธุ์แขกดำ มังคุด และสับปะรด โดยการล้างทำความสะอาดผิวของผลไม้ เช็ดให้แห้ง แล้วทำการชั่งปริมาณเนื้อผลไม้ส่วนที่รับประทานได้ ก่อนการสกัดน้ำผลไม้สดด้วยเครื่องปั่นแยกกาก (Phillips, Germany) กรองผ่านตะแกรงและผ้าขาวบาง ตวงปริมาตรน้ำผลไม้ที่สกัดได้ทั้งหมด (ตารางที่ 3) จากนั้นนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dryer

ตารางที่ 3 น้ำหนักผลไม้สดและผงแห้ง

ผลไม้		ปริมาณน้ำผลไม้ต่อเนื้อ ผลไม้สด 1000 กรัม (มิลลิลิตร)	น้ำหนักผงแห้งผลไม้ต่อน้ำ ผลไม้ 100 มิลลิลิตร (กรัม)
ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์		
กัลยน้ำว่า	<i>Musa sapientum</i> Linn.	150.00	30.60
ฝรั่ง	<i>Psidium guajava</i> L.	392.31	11.74
มะม่วงน้ำดอกไม้	<i>Manaifera indica</i> Linn.	272.73	18.96
มะละกอแขกดำ	<i>Carica papaya</i> Linn.	519.61	4.66
มังคุด	<i>Garcinia mangostana</i> Linn.	127.12	12.28
สับปะรด	<i>Ananas comosus</i> Merr.	546.88	11.06

สารสำคัญหลักในตัวอย่างน้ำผลไม้

ซึ่งผงแห้งน้ำผลไม้แต่ละชนิดอย่างแม่นยำและละลายด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์เพื่อหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด จากการศึกษา พบว่าน้ำผลไม้ไทยทั้ง 6 ชนิดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดดังตารางที่ ตารางที่ 4 และ 5 ตามลำดับ

ตารางที่ 4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)

ผลไม้	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (มิลลิกรัมกรดแกลลิก/กรัมน้ำหนักผงแห้ง ผลไม้)		ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (ไมโครกรัมกรดแกลลิก/กรัมน้ำหนักเนื้อ ผลไม้สด)	
	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
ชื่อสามัญ				
กัลยน้ำว่า	0.77	0.16	35.34	7.34
ฝรั่ง	5.95	0.49	274.04	22.57
มะม่วงน้ำดอกไม้	2.66	0.17	137.55	8.79
มะละกอแขกดำ	3.40	0.17	82.33	4.12
มังคุด	1.71	0.08	26.69	1.25
สับปะรด	2.53	0.21	153.03	12.70

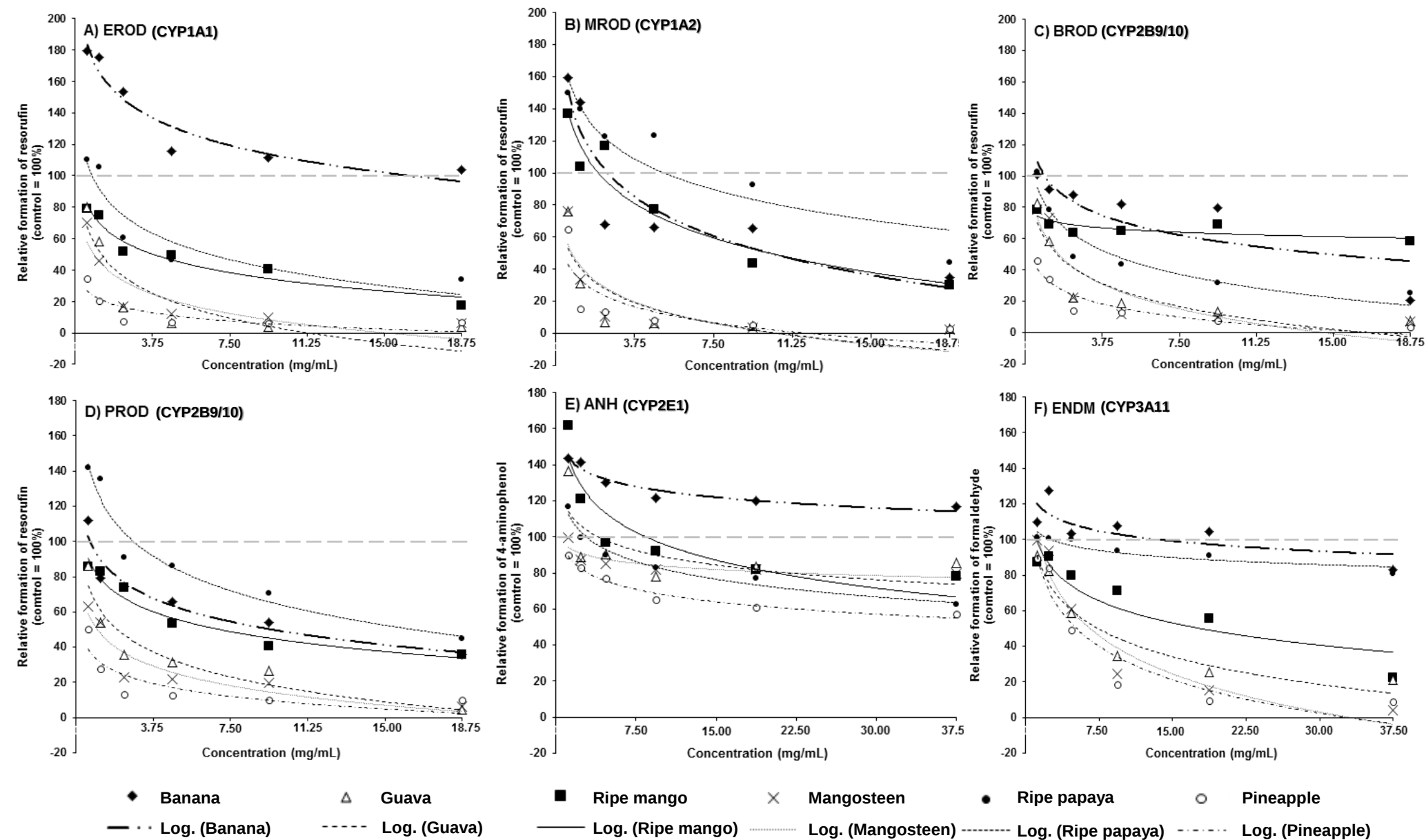
ตารางที่ 5 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoids content)

ชื่อสามัญ	ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (มิลลิกรัมเคอเซติน/กรัมน้ำหนักแห้ง ผลไม้)		ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (ไมโครกรัมเคอเซติน/กรัมน้ำหนักเนื้อ ผลไม้สด)	
	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
กล้วยน้ำว้า	ND	ND	ND	ND
ฝรั่ง	0.71	0.04	32.70	1.84
มะม่วงน้ำดอกไม้	0.49	0.07	25.34	3.62
มะละกอแขกดำ	4.92	0.35	119.13	8.47
มังคุด	1.39	0.13	21.70	2.03
สับปะรด	0.55	0.04	33.27	2.42

หมายเหตุ. ND, not determined.

ผลกระทบของน้ำผลไม้ต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในหลอดทดลอง

การทดสอบผลของน้ำผลไม้ชนิดต่างๆ ต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ไอโซฟอร์มต่างๆ ได้แก่ CYP1A1, CYP1A2, CYP2B9/10, CYP2E1 และ CYP3A4 ในหลอดทดลอง ด้วยปฏิกิริยาที่จำเพาะ ได้แก่ EROD, ethoxyresorufin O-deethylase activity; MROD, methoxyresorufin O-demethylase activity; BROD, benzyloxyresorufin O-dealkylase activity; PROD, pentoxyresorufin O-dealkylase activity; ANH, aniline hydroxylation; ENDM, erythromycin N-demethylase activity ตามลำดับ ได้เส้นโครงร่างการยับยั้ง (Inhibitory profile) ของน้ำผลไม้ทั้ง 6 ชนิดต่อเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ดังรูปที่ 1 และค่า IC₅₀ ของน้ำผลไม้ต่อเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ไอโซฟอร์มต่างๆ แสดงดังตารางที่ 6



รูปที่ 1 โครงร่างการยับยั้ง (Inhibitory profile) ของน้ำผลไม้ 6 ชนิดต่อเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ไอโซฟอร์มต่างๆ

EROD, ethoxyresorufin *O*-deethylase activity; MROD, methoxyresorufin *O*-demethylase activity; BROD, benzyloxyresorufin *O*-dealkylase activity;

PROD, pentoxyresorufin *O*-dealkylase activity; ENDM, erythromycin *N*-demethylase activity

ตารางที่ 6 ผลของน้ำผลไม้ต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในหลอดทดลอง

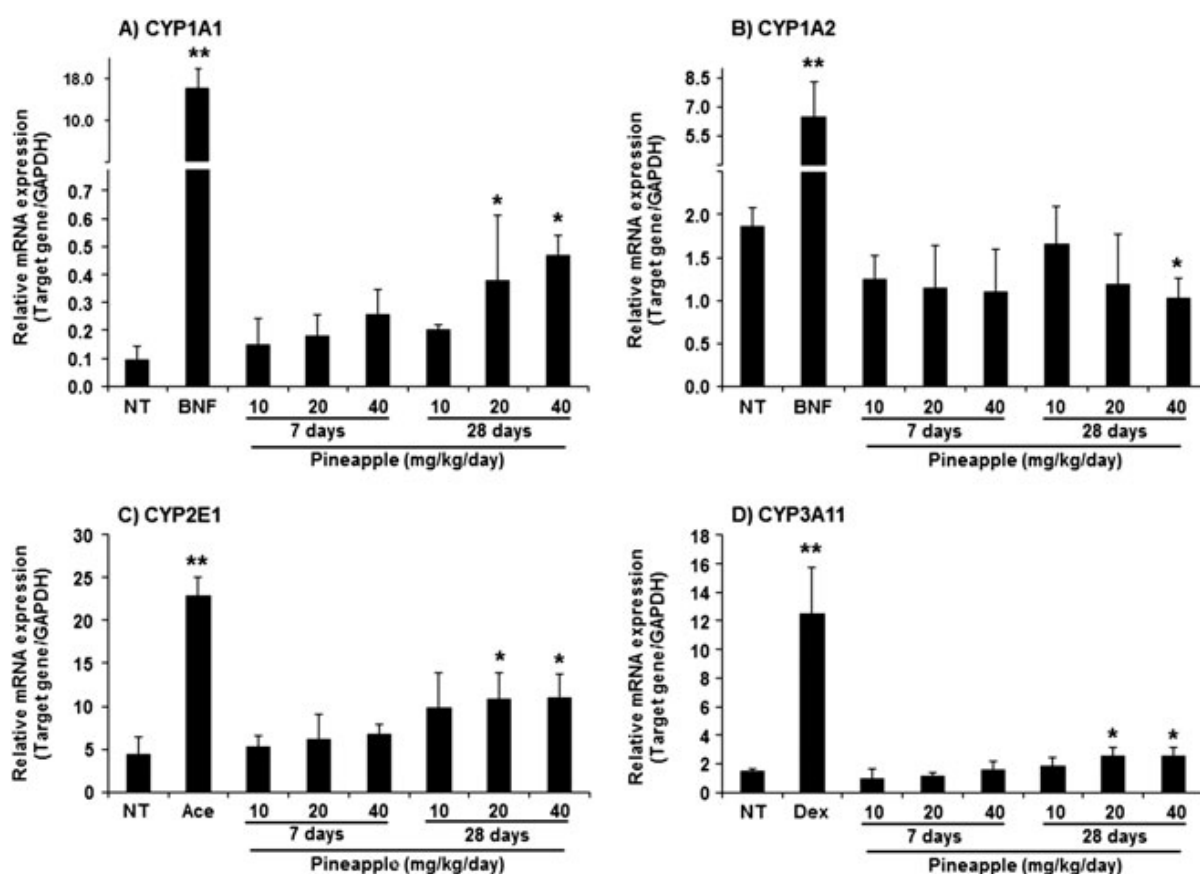
ผลไม้	IC ₅₀ ¹ (mg/ml)					
	EROD	MROD	BROD	PROD	ENDM	ANH
	CYP1A1	CYP1A2	CYP2B9/10	CYP2B9/10	CYP3A	CYP2E1
กล้วยน้ำว้า	ND	10.63±1.92	15.43±3.80	10.76±2.66	878.10±2.15	ND
ฝรั่ง	0.98±0.05	0.84±0.10	0.84±0.45	1.83±0.34	3.19±0.39	ND
มะม่วงน้ำดอกไม้	3.10±0.19	9.55±0.31	27.37±8.38	7.67±2.60	15.54±0.35	170.08±9.01
มะละกอแขกดำ	6.27±0.13	ND	3.97±0.99	18.45±1.05	877.79±1.02	76.98±2.06
มังคุด	0.97±0.03	0.90±0.06	1.56±0.06	1.12±0.11	2.85±0.20	919.78±5.04
สับปะรด	0.14±0.01	0.55±0.04	0.59±0.19	0.35±0.20	2.70±0.30	48.90±1.54

หมายเหตุ. ¹IC₅₀, median inhibitory concentration (ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน); EROD, ethoxyresorufin *O*-deethylase activity; MROD, methoxyresorufin *O*-demethylase activity; BROD, benzyloxyresorufin *O*-dealkylase activity; PROD, pentoxyresorufin *O*-dealkylase activity; ENDM, erythromycin *N*-demethylase activity

การทดสอบผลกระทบของน้ำผลไม้ต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในกาย (*in vivo*) ในหนูเมาส์
ผลกระทบของน้ำสัประดต่อการแสดงออกของ mRNA ของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในตับหนูเมาส์

ทำการเตรียม Total RNA จากตับสัตว์ทดลองแต่ละตัวและวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของตัวอย่าง Total RNA ทุกตัวอย่าง ก่อนนำไปวิเคราะห์การแสดงออกของ mRNA ของยีน *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, *Cyp2e1*, *Cyp3a11* และ *GAPDH* ด้วยเทคนิค RT-realtime PCR ด้วยไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงต่อยีน (ตารางที่ 2) โดยโปรแกรม realtime PCR ด้วยเครื่อง ABI Prism® 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems) ดังนี้ denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 15 วินาที ตามด้วย annealing และ extension ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 45 รอบ จากนั้นทำการวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม ABI Prism® 7500 SDS ภายในเครื่อง

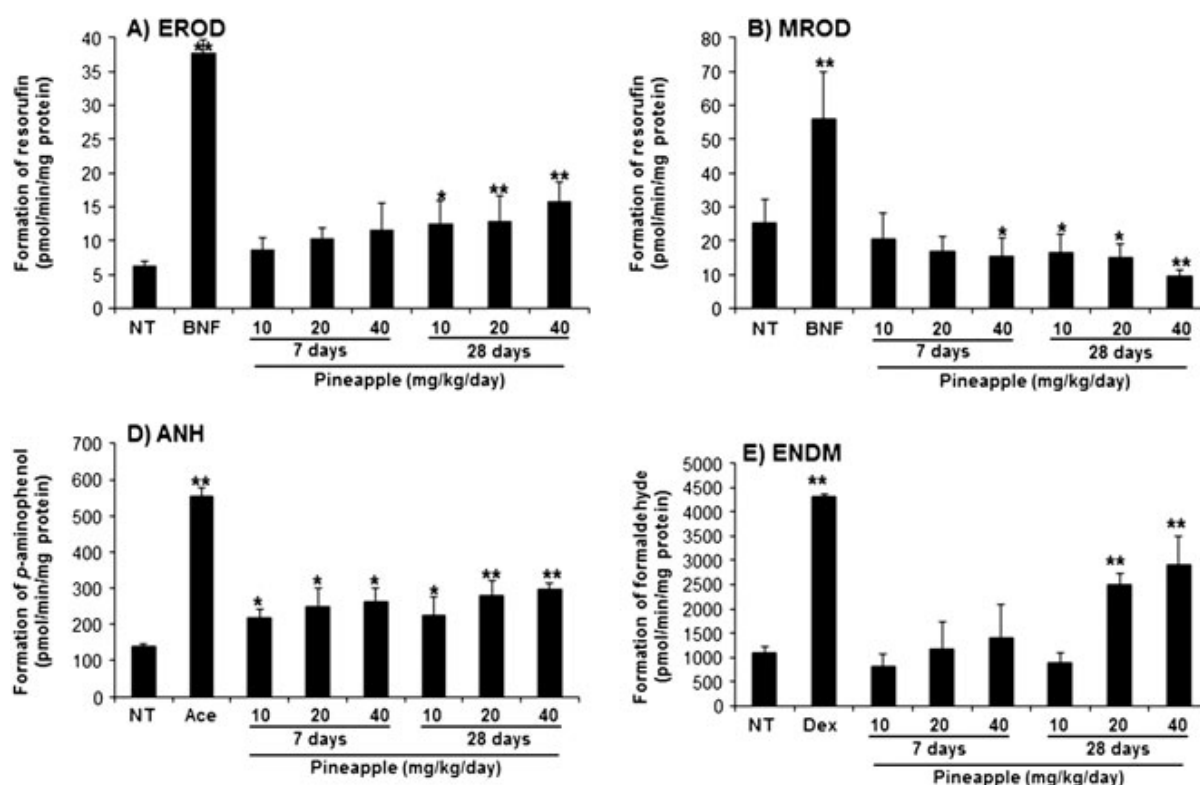
จากการศึกษาพบว่า หนูเมาส์ที่ได้รับน้ำสัประด ขนาด 20 และ 40 mg/kg/d เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ มีการแสดงออกของยีน *Cyp1a1* (รูปที่ 2A), *Cyp2e1* (รูปที่ 2C) และ *Cyp3a11* (รูปที่ 2D) ในตับที่ระดับ mRNA เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่น้ำสัประดขนาดสูงสุดที่ศึกษา กลับแสดงผลต่อการแสดงออกของยีน *Cyp1a2* ที่ระดับ mRNA ในลักษณะตรงกันข้าม (รูปที่ 2B)



รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของไซโตโครม พี 450 mRNA ในตับหนูเมาส์ที่ได้รับน้ำสัประด เป็นระยะเวลา 1 หรือ 4 สัปดาห์ (* p < 0.05, ** p < 0.001; NT, non treatment; BNF, beta-naphthoflavone; Ace, acetone; Dex, dexamethasone)

ผลของน้ำสัประดต่อสมรรถนะ ของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในตับหนูเมาส์

สมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ตรวจวิเคราะห์โดยปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่จำเพาะต่อไอโซฟอร์มหนึ่งๆ ดังนี้ ปฏิกิริยา ethoxyresorufin-O-demethylase (EROD) สำหรับ CYP1A1, methoxyresorufin-O-demethylase (MROD) สำหรับ CYP1A2, aniline hydroxylation (ANH) สำหรับ CYP2E1, และ erythromycin N-demethylation (ENDM) สำหรับ CYP3A11 (Sakuma et al., 1999; Roberts et al., 1995) จากการศึกษาพบการเพิ่มสูงขึ้นของสมรรถนะของ EROD, ANH และ ENDM ในตับหนูเมาส์อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 3A, C และ D) ในลักษณะที่แปรผันตรงตามระยะเวลาและปริมาณของน้ำสัประดที่ได้รับ ในขณะที่พบการลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญของสมรรถนะของ MROD เมื่อระยะเวลาและปริมาณน้ำสัประดที่ได้รับเพิ่มขึ้น (รูปที่ 3B) สอดคล้องกับผลการแสดงออกของยีนเดียวกันที่ระดับ mRNA (รูปที่ 2A-D)



รูปที่ 3 การเปลี่ยนแปลงสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในตับหนูเมาส์ที่ได้รับน้ำสัประด เป็นระยะเวลา 1 หรือ 4 สัปดาห์ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$; NT, non treatment; BNF, beta-naphthoflavone; Ace, acetone; Dex, dexamethasone)

บทสรุปและอภิปรายผลการทดลอง

การศึกษาผลกระทบของผลไม้ไทย 6 ชนิดได้แก่ กล้วยน้ำว้า ฝรั่งพันธุ์แป้นสีทอง มะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ มะละกอ พันธุ์แขกดำ มังคุด และสับปะรดพันธุ์ศรีราชา ต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 โดยการประเมินค่ามัธยฐานของความเข้มข้นที่ยับยั้ง (IC_{50}) สมรรถนะของเอนไซม์ CYP1A1, CYP1A2, CYP2B9, CYP2B10, CYP2E1 และ CYP3A พบว่า สับปะรดมีศักยภาพสูงสุดในการยับยั้งเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ทุกไอโซฟอร์มในไมโครโซมจากตับหนูเมาส์ ในขณะที่มังคุด ฝรั่ง มะม่วง มะละกอสุก และกล้วยน้ำว้า แสดงผลการยับยั้งเอนไซม์เหล่านี้น้อยลงตามลำดับ

การศึกษาภายในตับหนูเมาส์ สายพันธุ์ ICR เพศผู้ ที่ได้รับการป้อนสับปะรดทางปาก ขนาด 10, 20 และ 40 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน พบว่าสับปะรดมีผลเพิ่มสมรรถนะของ EROD, ANH และ ENDM ซึ่งเป็นดัชนีบ่งชี้การทำงานของเอนไซม์ CYP1A1, CYP2E1 และ CYP3A11 ตามลำดับ นอกจากนี้ สับปะรดยังเพิ่มการแสดงออกของ CYP1A1, CYP2E1 และ CYP3A11 mRNA สอดคล้องกับสมรรถนะของเอนไซม์ EROD, ANH และ ENDM แต่น้ำสับปะรดกลับมีผลลดสมรรถนะของ MROD อย่างมีนัยสำคัญ จากผลการศึกษาเหล่านี้แสดงถึงแนวโน้มหรือโอกาสการก่อให้เกิดอันตรายระหว่างอาหารและยาของผลไม้ทั้งหกชนิดนี้ อันเนื่องมาจากศักยภาพในการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ที่สำคัญหลายชนิด ดังนั้นการบริโภคน้ำผลไม้ในปริมาณมากและ/หรือเป็นระยะเวลานานควรพึงระวังอันตรายระหว่างน้ำผลไม้และยา

การศึกษานี้พบปริมาณฟลาโวนอยด์รวมในน้ำผลไม้ทั้งหกชนิดที่ความเข้มข้น 0.49 – 4.92 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์เซตินต่อกรัมของผงแห้ง โดยน้ำมะละกอสุกมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงสุดในขณะที่ตรวจไม่พบฟลาโวนอยด์รวมในกล้วยน้ำว้า ปริมาณฟีนอลิกรวมในน้ำผลไม้ทั้งหกชนิดอยู่ที่ความเข้มข้น 0.77 – 5.95 มิลลิกรัมสมมูลของแกลลิกแอซิดต่อกรัมของผงแห้ง โดยฝรั่งมีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุดในขณะที่กล้วยน้ำว้ามีปริมาณฟีนอลิกรวมต่ำที่สุด ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมและปริมาณฟีนอลิกรวมที่วิเคราะห์ได้ในการศึกษานี้มีค่าที่ไม่สูงมากนักเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาก่อนหน้านี้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากส่วนของผลไม้ที่ทำการศึกษา โดยการศึกษาก่อนหน้านี้ทำการวิเคราะห์ในเปลือกหรือเมล็ด ในขณะที่การศึกษานี้ทำการวิเคราะห์ในน้ำผลไม้ซึ่งเป็นส่วนที่ใช้บริโภค

โดยทั่วไปฟลาโวนอยด์และฟีนอลิกเป็นสารที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แต่การศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟลาโวนอยด์รวมและปริมาณฟีนอลิกรวมต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 สับปะรดแสดงฤทธิ์ต่อเอนไซม์ EROD, MROD, ANH และ ENDM สูงสุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.14, 0.55, 48.90, และ 2.70 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ตรวจพบระดับปริมาณฟลาโวนอยด์รวมและปริมาณฟีนอลิกรวมอยู่ในระดับปานกลาง คือ 0.55 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์เซตินต่อกรัมของผงแห้ง และ 2.53 มิลลิกรัมสมมูลของแกลลิกแอซิดต่อกรัมของผงแห้ง ตามลำดับ จากรายงานพบว่าสับปะรดสุกมีสารประกอบหอมระเหยมากถึง 127 ชนิด โดยหลักๆ ประกอบด้วยสารกลุ่ม ethyl acetate และ butane-2,3-diol diacetate (Umano et al., 1992) ดังนั้น นอกเหนือจากสารประกอบฟลาโวนอยด์และฟีนอลิกแล้ว สารประกอบหอมระเหยอาจเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ที่ศึกษา

น้ำสับปะรดมีผลเหนี่ยวนำเอนไซม์ CYP1A1, CYP2E1 และ CYP3A11 ในตับหนูเมาส์ โดยการเพิ่มสมรรถนะของปฏิกิริยา EROD, ANH และ ENDM ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการแสดงออกที่ระดับ mRNA ที่เพิ่มสูงขึ้นของยีน CYP1A1, CYP2E1 และ CYP3A11 โดยปริมาณน้ำสับปะรดที่ใช้ในการทดลองภายในตับหนูเมาส์เริ่มต้นที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน นั้นเทียบเท่าได้กับปริมาณการบริโภคโดยปกติใน 1 วัน คือน้ำสับปะรด 200 มิลลิลิตรหรือเนื้อสับปะรดสด 300 กรัม แม้ว่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของน้ำสับปะรดที่ใช้ในการศึกษาภายในตับ คือ 10

มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน เป็นเวลานาน 1 เดือน จะไม่แสดงผลต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 อย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อใช้ความเข้มข้นที่สูงขึ้น คือ 20 และ 40 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน เป็นเวลานาน 7 วัน และ 1 เดือน จะสามารถพบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 หลายไอโซฟอร์ม นอกจากนี้แล้วผลไม้ชนิดอื่นที่ทำการศึกษาก็ได้แก่ ฝรั่ง มะม่วง และมังคุด ยังสามารถแสดงศักยภาพต่อสมรรถนะของเอนไซม์ CYP1A1, CYP1A2 CYP2E1 และ CYP3A11 ในไมโครโซมจากตับหนูเมาส์ในหลอดทดลองได้ ดังนั้น การบริโภคผลไม้หรือผลไม้ร่วมกับยาแผนปัจจุบันจึงควรพึงระวังการเกิดอันตรกิริยา อาการข้างเคียงจากยา หรือการรักษาที่ไม่ได้ผล อันเนื่องมาจากศักยภาพของผลไม้ต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450

เอกสารอ้างอิง

- จำเริญ เสลาคุณ. (2546). ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อพฤติกรรมการบริโภคน้ำผลไม้พร้อมดื่มตราสินค้าของผู้บริโภค ในห้างสรรพสินค้าเขตคลองเตย กรุงเทพมหานคร. สารนิพนธ์ บธ.ม. (สาขาการจัดการ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
- น้ำสมุนไพรเพื่อสุขภาพ. (2546). คณะกรรมการสาธารณสุขมูลฐาน กระทรวงสาธารณสุข
- Berger J, Asenjo CF, 1939. Anthelmintic activity of fresh pineapple juice. *Science*, 29: 299–300.
- Boobis AR, Nebert DW, Felton JS, 1977. Comparison of 3-naphthoflavone and 3-methylcholanthrene as inducers of hepatic cytochrome(s) P-448 and aryl hydrocarbon (benzo[a]pyrene) hydroxylase activity. *Molecular and Pharmacology*, 13: 259–268.
- Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC, 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10:178–182.
- Chatuphonprasert W, Jarukamjorn K, Kondo S, Nemoto N, 2009. Synergistic increases of metabolism and oxidation–reduction genes on their expression after combined treatment with a CYP1A inducer and andrographolide. *Chemico–Biological Interaction*, 182: 233–238.
- Chiosa V, Mandravel C, Kleinjans JCS, Moonen E, 2005. Determination of β -carotene concentration in orange and apple juice and in vitamin supplemented drinks. *Analele Universitatii din Bucuresti– Chimie*, Anul XIV, 1–2: 253–258.
- Compton B and Purdy W, 1980. The mechanism of the reaction of the Nash and the Sawicki aldehyde reagent. *Canadian Journal of Chemistry* 58: 2207–2211.
- Eno AE, Owo OI, Itam EH, Konya RS, 2000. Blood pressure depression by the fruit juice of *Carica papaya* (L.) in renal and DOCA-induced hypertension in the rat. *Phytotherapy Research*, 14(4): 235–239.
- Goel RK, Gupta S, Shankar R, Sanyal AK, 1986. Anti-ulcerogenic effect of banana powder (*Musa sapientum* var. *paradisiaca*) and its effect on mucosal resistance. *Journal of Ethnopharmacology*, 18(1): 33–44.
- Guengerich FP, 2008. Cytochrome P450 and chemical toxicology. *Chemical Research Toxicology*, 21: 70–83.
- Jarukamjorn K, Sakuma T, Miyaura J, Nemoto N, 1999. Different regulation of the expression of mouse hepatic cytochrome P450 2B enzymes by glucocorticoid and phenobarbital. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 369: 89–99.
- Jarukamjorn K, Sakuma T, Nemoto N, 2002. Sexual dimorphic expression of mouse hepatic CYP2B: alterations during development or after hypophysectomy. *Biochemistry and Pharmacology*, 63: 2037–2041.
- Jiménez-Escrig A, Rincón M, Pulido R, Saura-Calixto F, 2001. Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11): 5489–5493.
- Kay S, Laura D, Saye K, David B, 2010. Grapefruit–drug interactions. *Drugs*, 70(18): 2373–2407.
- Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M, 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 47: 3954–3962.

- Mahattanatawee K, Manthey JA, Luzio G, Talcott ST, Goodner K, Baldwin EA, 2006. Total antioxidant activity and fiber content of select florida-grown tropical fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(19): 7355-7363.
- Mehdipour S, Yasa N, Dehghan G, Khorasani R, Mohammadirad A, Rahimi R, Abdollahi M, 2006. Antioxidant potentials of Iranian Carica papaya juice in vitro and in vivo are comparable to α -tocopherol. *Phytotherapy Research*, 20(7): 591-594.
- Nash T, 1953. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochemical Journal* 55: 416-421.
- Nemoto N, Sakurai J, 1992. Differences in regulation of gene expression between Cyp1a-1 and Cyp1a-2 in adult mouse hepatocytes in primary culture. *Carcinogenesis*, 13: 2249-2254.
- Oboh G, Elusiyan CA, 2004. Nutrient composition and antimicrobial activity of sorrel drinks (Soborodo). *Journal of Medicinal Food*, 7(3): 340-342.
- Pari L, Umamaheswari J, 2000. Antihyperglycaemic activity of *Musa sapientum* flowers: effect on lipid peroxidation in alloxan diabetic rats. *Phytotherapy Research*, 14: 136-138.
- Percival SS, Talcott ST, Chin ST, Mallak AC, Lounds-Singleton A, Pettit-Moore J, 2006. Neoplastic transformation of BALB/3T3 cells and cell cycle of HL-60 cells are inhibited by mango (*Mangifera indica* L.) juice and mango juice extracts. *Journal of Nutrition*, 136(5): 1300-1304.
- Roberts BJ, Elizabeth S, Shoaf SE, Song BJ. 1995. Rapid changes in cytochrome P4502E1 (CYP2E1) activity and other P450 isozymes following ethanol withdrawal in rats. *Biochemical Pharmacology* 49: 1666-1673.
- Roman-Ramos R, Flores-Saenz JL, Alarcon-Aguilar FJ, 1995. Anti-hyperglycemic effect of some edible plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 48(1): 25-32.
- Sakuma T, Ohtake M, Katsurayama Y, Jarukamjorn K, Nemoto N. 1999. Induction of CYP1A2 by phenobarbital in the livers of aryl hydrocarbon-responsive and -nonresponsive mice. *Drug Metabolism and Disposition* 27: 379-384.
- Sampath PD, Vijayaraghavan K, 2007. Cardioprotective effect of α -mangostin, a xanthone derivative from mangosteen on tissue defense system against isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 21(6): 336-339.
- Udani JK, Singh BB, Barrett ML, Singh VJ, 2009. Evaluation of mangosteen juice blend on biomarkers of inflammation in obese subjects: a pilot, dose finding study. *Nutrition Journal*, 8: 48-55.
- Wang T., Shankar, K., Ronis MJJ, Mehendale HM, 2000. Potentiation of thioacetamide liver injury in diabetic rats is due to induced CYP2E1. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 294: 473-479.
- Woisky R, Salatino A, 1998. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research* 37: 99-105.

ผลลัพธ์และตัวชี้วัดความสำเร็จของโครงการ

1. การตีพิมพ์ผลงานในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ จำนวน 1 เรื่อง
 - 1.1. นิพนธ์ต้นฉบับ เรื่อง Impact of six fruits–banana, guava, mangosteen, pineapple, ripe mango and ripe papaya–on murine hepatic cytochrome P450 activities. ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ Journal of Applied Toxicology 2012 (*in press*) (wileyonlinelibrary.com: DOI 10.1002/jat.2740) [Impact Factor 2012 = 2.322] _____ภาคผนวก ข
2. การเผยแพร่ผลงานในงานประชุมวิชาการ จำนวน 1 ครั้ง
 - 2.1. การเผยแพร่ผลงานรูปแบบโปสเตอร์ ในการประชุมวิชาการระดับชาติ “The 4th Northeast Pharmacy Research Conference 2012 “Pharmacy Profession in Harmony” เรื่อง “Impact of six innate Thai fruits on murine hepatic cytochrome P450 activity” วันที่ 11–12 กุมภาพันธ์ 2555 ณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น _____ภาคผนวก ค
3. การขยายผลความรู้ที่ได้จากการวิจัยสู่นักศึกษาเภสัชศาสตร์ จำนวน 2 ปฏิบัติการ
 - 3.1. การประยุกต์การทดสอบสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในตับหนูเมาส์ เป็นปฏิบัติการประกอบการเรียน ในรายวิชา เคมีวิเคราะห์เชิงเภสัชศาสตร์ขั้นสูง (Advanced Pharmaceutical Analysis) สำหรับนักศึกษาเภสัชศาสตร์ ชั้นปีที่ 4 ภาคปลาย ปีการศึกษา 2554 _____ภาคผนวก ง
 - 3.1.1. การทดสอบสมรรถนะเอนไซม์ CYP3A ผ่านปฏิกิริยา Erythromycin N–demethylation
 - 3.1.2. การทดสอบสมรรถนะเอนไซม์ CYP2E1 ผ่านปฏิกิริยา Aniline hydroxylation

ปฏิบัติการ 613 554 การวิเคราะห์เชิงเภสัชศาสตร์ขั้นสูง
เรื่อง การทดสอบสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในตับหนูไมซ์

ภาคปลาย

รศ.ดร.กนกวรรณ จารุกำจร

ปีการศึกษา 2554

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

การศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ถูกพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ในการทำนายหรืออธิบายการเกิดความเป็นพิษของยาในทางคลินิก ซึ่งเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่พบมากในตับและมีหน้าที่ในการเปลี่ยนแปลงยาและสารแปลกปลอมต่างๆ มากกว่าร้อยละ 60 ของยาที่ใช้ในท้องตลาด หน้าที่หลักคือเปลี่ยนแปลงยาหรือสารแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายให้อยู่ในรูปแบบที่ร่างกายสามารถกำจัดออกได้ง่าย เนื่องจากเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 มีอยู่ในปริมาณที่จำกัดในอวัยวะต่างๆ การได้รับยาหรือสารใดๆ เข้าสู่ร่างกายพร้อมกันหรือในเวลาเดียวกันจึงอาจมีผลต่อการถูกกำจัดของยาหรือสารแปลกปลอมเหล่านั้นๆ ทั้งในแง่ของปริมาณและอัตราเร็วในการกำจัด การบริโภคยารักษาโรคร่วมกับสมุนไพรหรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร อาจจะทำให้เกิดอันตรกิริยาระหว่างยาหรือสารแปลกปลอมต่างๆ อันจะส่งผลต่อระดับยาที่ผู้ป่วยใช้อยู่ ตลอดจนอาจกระทบต่อประสิทธิภาพในการรักษาโรคในลำดับถัดไปได้ อีกทั้งยังเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดอันตรายจากอาการข้างเคียงของยาแผนปัจจุบันด้วย หรืออาจส่งผลให้การทำงานของระบบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงสารแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายมีความผิดปกติหรือแปรเปลี่ยนไป

บรรณานุกรม

- Guengerich FP. Cytochrome P450 and chemical toxicology. Chem Res Toxicol 21: 70-83, 2008.
- Huang SM, Temple R, Throckmorton DC, Lesko LJ. Drug interaction studies: study design, data analysis, and implications for dosing and labeling. Clin Pharmacol Ther 81, 298-304, 2007.
- Koop DR. Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1. FASEB J, 6: 724-730, 1992.
- Masubuchi Y, Hosokawa S, Horie T, Suzuki T, Ohmori S, Kitada M, Narimatsu S. Cytochrome P450 isozymes involved in propranolol metabolism in human liver microsomes. The role of CYP2D6 as ring-hydroxylase and CYP1A2 as N-desisopropylase. Drug Metab Dispos, 22, 909-915, 1994.
- Roberts BJ, Shoaf SE, Song BJ. Rapid changes in cytochrome P4502E1 (CYP2E1) activity and other P450 isozymes following ethanol withdrawal in rats. Biochem Pharmacol, 49, 1665-1673, 1995.

ปฏิบัติการที่ 1

การทดสอบสมรรถนะเอนไซม์ CYP3A ผ่านปฏิกิริยา erythromycin N-demethylation

เอนไซม์ CYP3A เป็นไอโซฟอร์มหนึ่งในกลุ่มเอนไซม์ ไซโตโครม พี 450 สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด มีหน้าที่หลักในกระบวนการเปลี่ยนแปลงยาหรือสารแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย ยาแผนปัจจุบันที่จำหน่ายในท้องตลาดมากกว่าร้อยละ 40 ถูกเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์ CYP3A

วิธีการทดสอบ

- 1) เตรียม sample, control และ blank ใน 1.5 ml-microtube

	Sample	Control	Blank
PBS (μ l)	55	55	80
Erythromycin (μ l)	10	10	-
MgCl ₂ (μ l)	10	10	10
Microsome <u>10 mg/mL</u> (μ l)	15 ¹	15 ²	-
NADPH (μ l)	10	10	10

หมายเหตุ. ¹, Dexamethasone-induced microsome; ², Non treated microsome

- 2) เตรียม standard formaldehyde 0, 10, 50, 100, 200 μ M ใน 1.5 ml-microtube
- 3) นำตัวอย่างและ standard จาก 1) และ 2) ไป incubate 37°C 20 min shaking 100 rpm
- 4) เติม 20% trichloroacetic acid 50 μ l
- 5) Centrifuge 3500 rpm 10 min
- 6) ปิเปต supernatant 100 μ l ใส่ 96 wells-plate
- 7) เติม Nash reagent 50 μ l แล้วปิดเพลทด้วยแผ่น sticker ใส แล้ว incubate 50°C 15 min shaking 100 rpm
- 8) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ wavelength 405 nm (สีเหลือง)
- 9) คำนวณเป็น Formation of formaldehyde (pmol/min/mg protein)

ปฏิบัติการที่ 2

การทดสอบสมรรถนะเอนไซม์ CYP2E1 ผ่านปฏิกิริยา aniline hydroxylation

เอนไซม์ CYP2E1 เป็นไอโซฟอร์มหนึ่งในกลุ่มเอนไซม์ ไซโตโครม พี 450 สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด มีหน้าที่หลักในกระบวนการเปลี่ยนแปลงสารพิษ หรือสารแปลกปลอม ที่เข้าสู่ร่างกายได้หลากหลาย อาทิเช่น aromatic hydrocarbons, halogenated alkanes/alkenes, alcohol/ketone และสารกลุ่ม nitrosamine นอกจากนี้ CYP2E1 ยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการรีดักชันในร่างกาย และการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับการบริโภคแอลกอฮอล์

วิธีการทดสอบ

- 1) เตรียม sample, control และ blank ใน 1.5 ml-microtube

	Sample	Control	Blank
Tris buffer (μl)	40	40	55
MgCl ₂ (μl)	10	10	10
Nicotinamide (μl)	10	10	10
Aniline HCl	15	15	15
Microsome <u>10 mg/mL</u> (μl)	15 ¹	15 ²	-
NADPH (μl)	10	10	10

หมายเหตุ. ¹, Acetone-induced microsome; ², Non treated microsome

- 2) เตรียม standard p-aminophenol 0, 3.125, 6.25, 15.625, 31.25 μM ใน 1.5 ml-microtube
- 3) นำตัวอย่างและ standard จาก 1) และ 2) ไป incubate 37°C 20 min shaking 100 rpm
- 4) เติม 20% trichloroacetic acid 50 μl
- 5) Centrifuge 3500 rpm 5 min
- 6) ปิเปต supernatant 100 μl ใส่ 96 wells-plate
- 7) เติม 20% Na₂CO₃ 25 μl และ 4% phenol 50 μl
- 8) incubate 30 min ที่อุณหภูมิห้อง
- 9) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ wavelength 620 nm (สีม่วง)
- 10) คำนวณเป็น Formation of p-aminophenol (pmol/min/mg protein)

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนและกิจกรรมที่ดำเนินการและผลลัพธ์ที่ได้รับ

วัตถุประสงค์	กิจกรรมหลัก	กิจกรรมรอง	ผลการดำเนินงาน	ผลลัพธ์
ศึกษาผลของผล น้ำไม้ไทย 6 ชนิด ได้แก่ กล้วย ฝรั่ง มะม่วง มะละกอ มังคุด และ สับปะรด ต่อ สมรรถนะ ของ เอนไซม์ไซโต โครม พี 450 แฟมิลี 1, 2, และ 3	1. การเตรียมตัวอย่างน้ำผลไม้	-	แล้วเสร็จ	Chatuphonprasert, W., Jarukamjorn, K.* Impact of six fruits-banana, guava, mangosteen, pineapple, ripe mango and ripe papaya-on murine hepatic cytochrome P450 activities. <i>Journal of Applied Toxicology</i> . 2012. DOI 10.1002/jat2740 [The publication is in press.] Impact factor 2011=2.322
	2. การประเมินสารสำคัญ หรือ สารออกฤทธิ์หลักจากตัวอย่าง น้ำผลไม้	2.1 Total phenolic assay	แล้วเสร็จ	
		2.2 Total flavonoids assay	แล้วเสร็จ	
	3. การทดสอบผลของน้ำผลไม้ ต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโต โครม พี 450 ในหลอดทดลอง	3.1 การเตรียม สัตว์ทดลอง	แล้วเสร็จ	
		3.2 การเตรียมไม โครโซมจากตับ สัตว์ทดลอง	แล้วเสร็จ	
		3.3 การประเมิน สมรรถนะของ เอนไซม์ (enzyme activity)	แล้วเสร็จ	
	4. การทดสอบผลของน้ำผลไม้ ต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโต โครม พี 450 ในกายหนูไมซ์ (<i>in vivo</i>)	4.1 การเตรียม สัตว์ทดลอง	แล้วเสร็จ	
		4.2 การเตรียม RNA และไม โครโซมจากตับ สัตว์ทดลอง	แล้วเสร็จ	
		4.3 การประเมิน การแสดงออกของ mRNA และ สมรรถนะของ เอนไซม์ (enzyme activity)	แล้วเสร็จ	
	5. สรุปผลการศึกษา การจัดทำ รายงานฉบับสมบูรณ์ และการ เผยแพร่ผลงานตีพิมพ์ทาง วิชาการระดับนานาชาติ	-	แล้วเสร็จ	

ลงนาม.....

(หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน)