



รายงานฉบับสมบูรณ์

ฤทธิ์ป้องกันมะเร็งจากสับปะรด

Cancer chemopreventive activity from pineapple

โดย รศ.ดร.กนกพร นิวัฒน์นันท์ และคณะ

ตุลาคม 2555

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ ฤทธิ์ป้องกันมะเร็งจากสับปะรด

Cancer chemopreventive activity from pineapple

คณะผู้วิจัย

รศ. ดร. กนกพร นิวัฒน์นันท์
รศ. ดร. วิรัตน์ นิวัฒน์นันท์
ศ. นพ.ไพฑูรย์ ณรงค์ชัย
ดร. เชิดศักดิ์ ใจแข็ง
นางสาวมณี เขม้นเขตรการ

สังกัด

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 10
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ชุดโครงการ สมุนไพรเพื่อคุณภาพชีวิต

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Executive summary

โรคมะเร็งเป็นโรคที่ก่อให้เกิดปัญหาสุขภาพ สูญเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาเป็นจำนวนมาก เนื่องจากเป็นโรคที่รุนแรง รักษาให้หายขาดได้ยาก จากสถิติข้อมูลพบว่าคนไทยป่วยและเสียชีวิตด้วยโรคนี้เป็นอันดับหนึ่งของประเทศ และมีแนวโน้มว่าจะทวีความรุนแรงมากขึ้น นโยบายของรัฐบาลที่ต้องการลดภาระการรักษาพยาบาล เช่น การปรับเปลี่ยนบทบาทของสถานีนอมาัยเป็นโรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อลดภาระค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลด้วยวิธีป้องกันโรค ในกระบวนการป้องกันโรคที่ประหยัดที่สุด คือ การบริโภคอาหารให้เหมาะสม เพื่อประโยชน์ต่อสุขภาพ สับปะรดเป็นพืชเศรษฐกิจที่นิยมปลูกในภาคเหนือโดยเฉพาะจังหวัดเชียงรายและลำปาง พันธุ์ที่นิยมปลูกคือพันธุ์นางแลและปัตตาเวียถึงแม้จะมีงานวิจัยหลายเรื่องที่จะบ่งชี้ถึงประโยชน์ของสับปะรดในการต้านอนุมูลอิสระและศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีในสับปะรด แต่ยังขาดข้อมูลบางส่วนเกี่ยวกับศักยภาพการต้านมะเร็งรวมทั้งรายละเอียดของกลไกที่เกี่ยวข้อง

การวิจัยครั้งนี้จึงได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสับปะรดทั้งสองสายพันธุ์คือพันธุ์นางแลและพันธุ์ปัตตาเวีย ผลของสารสกัดสับปะรดต่อการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครมพี450 CYP2E1, CYP1A และ CYP2D6ที่ใช้ในกระบวนการแปรสภาพสารเคมีให้เป็นสารก่อมะเร็งโดยใช้ไมโครโซมจากตับศพเป็นแหล่งเอนไซม์ รวมทั้งศึกษาผลของสารสกัดสับปะรดต่อเซลล์มะเร็ง เพื่อเป็นการเชื่อมโยงองค์ความรู้ด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ไปสู่การส่งเสริมสุขภาพ ทำให้สามารถลดและป้องกันการเกิดโรคมะเร็งจากการใช้ผลไม้ไทย

งานวิจัยนี้ได้ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสับปะรดทั้งสองสายพันธุ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH, superoxide anion และ hydrogen peroxide ในหลอดทดลอง รวมทั้งทดสอบผลต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP2E1, CYP1A และ CYP2D6 โดยใช้ p-nitrophenol, phenacetin และ codeine เป็นสับสเตรต และศึกษาการยับยั้งเอนไซม์โดยใช้ความสัมพันธ์ Cornish-Bowden และ Dixon นอกจากนี้ยังศึกษา ผลต่อเซลล์มะเร็งตับชนิด Hep G2 และ สารที่เป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัดสับปะรดด้วย

ผลการวิจัยพบว่าสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียมีร้อยละของผลผลิตสูงกว่าพันธุ์นางแล (ร้อยละ 10.3 เทียบกับร้อยละ 5.7) รวมทั้งพบว่ามี ปริมาณรวมฟีนอลิก สูงกว่าสับปะรดพันธุ์นางแลด้วย โดยพบ 25.0 มิลลิกรัมที่เทียบเท่ากับกรดแกลิก เมื่อเทียบกับพันธุ์นางแลที่พบ 11.7 มิลลิกรัมที่เทียบเท่ากับกรดแกลิก

ส่วนปริมาณรวมฟลาโวนอยด์สับประรดพันธุ์ปัตตาเวียก็มีปริมาณที่สูงกว่า คือ พบ 2.9 มิลลิกรัมที่เทียบเท่ากับเคอร์เซตินเมื่อเทียบกับพันธุ์นางแลที่พบ พบ 1.7 มิลลิกรัมที่เทียบเท่ากับเคอร์เซติน สำหรับสารสำคัญที่พบในสารสกัดของสับประรดทั้งสองสายพันธุ์ ได้แก่ กรดแกลิก รูตินและอิพิแกลโลคาเตชิน โดยปริมาณของสารสำคัญทั้งสามชนิดที่พบใน สับประรดพันธุ์ปัตตาเวียสูงกว่าในพันธุ์นางแล โดยพบกรดแกลิก 860.0 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัมสารสกัด สำหรับรูตินและอิพิแกลโลคาเตชิน พบ 220.1 และ 5.5 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัมสารสกัดตามลำดับ ส่วนปริมาณของสารสำคัญในพันธุ์นางแลพบ กรดแกลิก ปริมาณ 627.5 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัมสารสกัด สำหรับรูตินและอิพิแกลโลคาเตชินพบ 163.5 และ 2.1 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัมสารสกัดตามลำดับ

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าในการวิเคราะห์ส่วนใหญ่สารสกัดสับประรดพันธุ์ปัตตาเวียมีความแรงในการกำจัดอนุมูลอิสระสูงกว่าพันธุ์นางแลโดยพิจารณาจากค่าความเข้มข้นที่สามารถกำจัดอนุมูลได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ของสารสกัดสับประรดโดยพันธุ์ปัตตาเวียมีค่าในการกำจัดอนุมูล DPPH, Superoxide และ Hydrogen peroxide มีค่า 65.18, 2.48 และ 106.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เมื่อเทียบกับค่า IC_{50} ของสารสกัดสับประรดพันธุ์นางแลซึ่งมีค่า 116.65, 5.15 และ 109.10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

ในการศึกษาฤทธิ์และกลไกการยับยั้ง CYP โดยใช้ตับศพ จำนวน 9 ราย เป็นแหล่งเอนไซม์ พบว่าสารสกัดสับประรดพันธุ์ปัตตาเวียและพันธุ์นางแลยับยั้งการทำงานของ CYP1A2 โดยกลไกแบบแข่งขัน โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 266.87 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 274.98 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ส่วนการยับยั้งการทำงานของ CYP2E1 ของสารสกัดสับประรดพันธุ์ปัตตาเวียและพันธุ์นางแลนั้น มีกลไกแบบไม่แข่งขัน (noncompetitive) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 152.41 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ 177.13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ สำหรับการยับยั้งการทำงานของ CYP2D6 มีกลไกแบบไม่แข่งขัน (uncompetitive) โดยมีค่า IC_{50} ของพันธุ์นางแลและพันธุ์ปัตตาเวียเท่ากับ 132.46 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ 445.04 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

ผลของสารสกัดสับประรดทั้งสองสายพันธุ์ ต่อเซลล์มะเร็ง Hep-G2 โดยใช้วิธี วิเคราะห์ MTT พบว่าสารสกัดสับประรดทั้งสองสายพันธุ์ มีความแรงในการทำลายเซลล์มะเร็งโดยมีค่า IC_{50} ของสารสกัดสับประรดพันธุ์ปัตตาเวียและพันธุ์นางแลเท่ากับ 22.40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ 24.28 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดสับปะรดทั้งสองสายพันธุ์ มีศักยภาพในการป้องกันการเกิดมะเร็งทั้งสามขั้นตอนคือขั้นเริ่มต้น ขั้นส่งเสริม และขั้นตอนการเพิ่มจำนวน โดยผ่านการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแปรสภาพให้เกิดสารก่อมะเร็ง กลไกด้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ในการทำลายเซลล์มะเร็งด้วย ซึ่งควรต้องมีการศึกษาต่อไปเพื่อหาหลักฐานสนับสนุนการใช้สารสกัดสับปะรดในการป้องกันการเกิดมะเร็ง

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระและหาากลุ่มสารสำคัญของสารสกัดสับปะรดสายพันธุ์นางแลและปัตตาเวีย ผลของสารสกัดสับปะรดต่อการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 (CYP) ได้แก่ CYP1A2, CYP2E1 และ CYP2D6 โดยใช้ไมโครโซมจากตับศพและหางลไกที่เกี่ยวข้อง รวมทั้งศึกษาความเป็นพิษต่อ เซลล์มะเร็งของสารสกัดสับปะรด

ผลการวิจัยพบว่าสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียมีร้อยละของผลผลิตสูงกว่าพันธุ์นางแล (ร้อยละ 10.3 เทียบกับร้อยละ 5.7) รวมทั้งมี ปริมาณรวมฟีนอลิกและปริมาณรวมฟลาโวนอยด์สูงกว่าสับปะรดพันธุ์นางแลด้วย สำหรับสารสำคัญที่พบในสารสกัดของสับปะรดทั้งสองสายพันธุ์ ได้แก่ กรดแกลิก รูตินและอิพิ แกลโลคาเตชิน โดยปริมาณของสารสำคัญทั้งสามชนิดที่พบใน สับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียสูงกว่าในพันธุ์นางแล ผลการทดสอบฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระ พบว่าในการวิเคราะห์ส่วนใหญ่สารสกัดสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียมีความแรงในการกำจัดอนุมูลอิสระสูงกว่าพันธุ์นางแลโดยพิจารณาจากค่าความเข้มข้นที่สามารถกำจัดอนุมูลได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ของสารสกัดสับปะรดโดยพันธุ์ปัตตาเวียมีค่าในการกำจัดอนุมูล DPPH, Superoxide และ Hydrogen peroxide เท่ากับ 65.18, 2.48 และ 106.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเทียบกับค่า IC_{50} ของสารสกัดสับปะรดพันธุ์นางแลซึ่งมีค่าเท่ากับ 116.65, 5.15 และ 109.10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

ในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสับปะรดต่อการทำงานของ CYP และกลไกที่เกี่ยวข้อง พบว่าสารสกัดสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียและพันธุ์นางแลยับยั้งการทำงานของ CYP1A2, CYP2E1 และ CYP2D6 โดยมีความแรงที่ใกล้เคียงกันในการยับยั้งการทำงานของ CYP1A2 และ CYP2E1 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 266.87 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 274.98 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ สำหรับ CYP1A2 และ มีค่า IC_{50} ของพันธุ์ปัตตาเวียและพันธุ์นางแล เท่ากับ 152.41 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ 177.13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับสำหรับ CYP2E1 ส่วนผลต่อการทำงานของ CYP2D6 นั้นพบว่าสารสกัดสับปะรดพันธุ์นางแล มีความแรงมากกว่าพันธุ์ปัตตาเวีย โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 132.46 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ 445.04 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ส่วนกลไกของสารสกัดสับปะรดในการยับยั้ง CYP พบว่าแตกต่างกันโดยการยับยั้ง CYP1A2 มีกลไกแบบแข่งขัน แต่การยับยั้ง CYP2E1 ใช้กลไกแบบไม่แข่งขัน (noncompetitive) และสำหรับ CYP2D6 ใช้กลไกแบบไม่แข่งขัน (uncompetitive)

ผลของสารสกัดสับปะรดต่อเซลล์มะเร็ง Hep G2 ทดสอบโดยใช้วิธี วิเคราะห์ MTT พบว่า สารสกัดสับปะรดทั้งสองสายพันธุ์ มีความแรงในการทำลายเซลล์มะเร็งโดยมีค่า IC_{50} ของสารสกัดสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียและพันธุ์นางแลเท่ากับ 22.40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ 24.28 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดสับปะรดทั้งสองสายพันธุ์มีศักยภาพในการป้องกันการเกิดมะเร็ง ทั้งสามขั้นตอนคือขั้นเริ่มต้น ขั้นส่งเสริม และขั้นการเพิ่มจำนวน โดยผ่านการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแปรสภาพให้เกิดสารก่อมะเร็ง กลไกต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ในการทำลายเซลล์มะเร็งด้วย ซึ่งควรต้องมีการศึกษาต่อไปเพื่อหาหลักฐานสนับสนุนการใช้สารสกัดสับปะรดในการป้องกันการเกิดมะเร็ง

Abstract

The objectives of this study were to compare antioxidant activity and the polyphenolic contents as well as effects of two types of pineapple extracts, Pattavia (Sriracha) and Nanglae, on CYP1A2, CYP2E1 and CYP2D6 activity using human liver microsomes and mechanisms involved. Cytotoxicity of pineapple extracts toward HepG2 cells was also evaluated. The results of this study show that Pattavia gained higher yield and higher total phenolic and flavonoid content compared to those of Nanglae (10.3 % vs 5.7% yield). By HPLC analysis, polyphenols containing in pineapple extracts both Pattavia and Nanglae were gallic acid, epigallocatechin and rutin. The content of these three compounds found in Pattavia was higher than those of Nanglae. Pattavia tend to be a more potent antioxidant than Nanglae according to IC_{50} derived from DPPH assay, superoxide radical and hydrogen peroxide scavenging assay. IC_{50} value of Pattavia were 65.18 $\mu\text{g/ml}$, 2.48 $\mu\text{g/ml}$ and 106.75 $\mu\text{g/ml}$ compared to those of Nanglae (116.65 $\mu\text{g/ml}$, 5.15 $\mu\text{g/ml}$ and 109.10 $\mu\text{g/ml}$) in DPPH, superoxide and hydrogen peroxide assay, respectively.

Both Pattavia and Nanglae extracts inhibited CYP1A2-, CYP2E1- and CYP2D6-mediated metabolisms. Pattavia and Nanglae exhibited similar extent of inhibition on CYP1A2 activity (IC_{50} values of 266.87 $\mu\text{g/ml}$ and 274.98 $\mu\text{g/ml}$, respectively), and on CYP2E1 activity with IC_{50} values of 152.41 $\mu\text{g/ml}$ and 177.13 $\mu\text{g/ml}$, respectively, whereas Nanglae was more potent than Pattavia in inhibition of CYP2D6-mediated metabolism with IC_{50} values of 132.46 $\mu\text{g/ml}$ and 445.04 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Type of inhibition of pineapple extracts on the CYP-mediate metabolisms studied varied with competitive type for CYP1A2, noncompetitive type for CYP2E1 and uncompetitive type for CYP2D6.

Effect of pineapple extracts on cancer cell, Hep G2, was investigated using MTT assay. Both Pattavia and Nanglae extracts showed cytotoxic effect with IC_{50} value of 22.40 $\mu\text{g/ml}$ and 24.28 $\mu\text{g/ml}$, respectively.

The results of this study show that pineapple extracts, Pattavia and Nanglae, have chemopreventive potential in initiation, promotion and proliferation stage of carcinogenesis via inhibitory effects on bioactivation-related CYPs, antioxidant activity as well as cytotoxicity. Further studies need to be carried out to provide support for the use of pineapple extracts in chemoprevention.

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาหลักการและเหตุผล

ปัจจุบันมีการใช้สารเคมีทั้งในภาคอุตสาหกรรมและเกษตรกรรมเพิ่มขึ้นอย่างมากซึ่งส่งผลต่อเนื่องทำให้เกิดสารพิษตกค้างในระบบนิเวศ สารเคมีเหล่านี้มักสลายตัวช้าในธรรมชาติ จึงเป็นเหตุให้เกิดการสะสมในสิ่งแวดล้อมและบางส่วนกระจายเป็นมลพิษและถ่ายทอดเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารหรือห่วงโซ่อาหารส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภคโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารเคมีที่สะสมในเนื้อเยื่อไขมันและตับ สารเคมีเหล่านี้เป็นเหตุให้เกิดโรคมะเร็งใช้เจ็บโดย เหนียวนำไปเกิดอนุมูลอิสระอันก่อให้เกิดโรคต่างๆ เช่น มะเร็ง เบาหวาน โรคหัวใจ เป็นต้น (Loeb และ Harris, 2008)

ปกติแล้วร่างกายมนุษย์มีวิถีของการเปลี่ยนแปลงสารพิษในร่างกาย 3 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนที่ 1 เป็นขั้นตอนที่เปลี่ยนสารพิษให้มีสมบัติละลายน้ำได้ดีขึ้นโดยใช้เอนไซม์ไซโตโครมพี 450 เป็นส่วนมาก ขั้นตอนที่ 2 เป็นขั้นตอนที่ทำให้สารพิษหรือสารเคมีหมดฤทธิ์โดยอาศัยสารประเภทคาร์โบไฮเดรต ไขมันหรือโปรตีนจับกับสารพิษและในขั้นตอนที่ 3 เป็นการพาสารเคมีที่ผ่านกระบวนการแปรสภาพจากขั้นตอนที่ 1 และ 2 ออกจากเซลล์โดยใช้โปรตีนที่เป็นตัวพาช่วยขับออก (Klaassen, 2001)

การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 (CYP450) ที่สามารถเปลี่ยนสารเคมีที่ร่างกายได้รับเข้าไปให้กลายเป็นสารพิษได้และการเพิ่มกระบวนการทำงานของเอนไซม์ในเฟสที่ 2 ที่ช่วยทำลายพิษของสารในร่างกายเป็นกลไกหนึ่งที่จะช่วยลดภาวะเสี่ยงต่อการเจ็บป่วยที่มีสาเหตุมาจากสารเคมีซึ่งจะทำให้การทำงานของเซลล์ผิดปกติจนเป็นสาเหตุของการเกิดโรคในที่สุด (Iyanagi, 2007)

อุบัติการณ์การเกิดโรคมะเร็งในประเทศไทยมีเพิ่มมากขึ้นจากสถิติข้อมูลในปี พ.ศ. 2544-2547 ซึ่งเก็บโดยสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ที่ทำการสำรวจจากประชากร 9 จังหวัดทั่วประเทศ พบว่าในเพศชาย มะเร็งที่พบมากที่สุดคือ มะเร็งตับ พบในอัตราสูงถึง 38.6 ต่อแสนประชากรและอยู่ในลำดับที่สองของมะเร็งในเพศหญิงรองจากมะเร็งปากมดลูก ดังนั้นโรคมะเร็งจึงจัดเป็นปัญหาสุขภาพที่สำคัญของของประชากรไทย สาเหตุส่วนใหญ่ของการเกิดมะเร็งนั้นร้อยละ 90 มีสาเหตุมาจากสารเคมีในสิ่งแวดล้อม โดยทั่วไปแล้วสารเคมีที่ก่อให้เกิดมะเร็งไม่มีฤทธิ์เพียงพอที่จะกระตุ้นให้เซลล์เกิดความผิดปกติ สารเคมีนั้นจำเป็นต้องได้รับการกระตุ้นหรือเปลี่ยนสภาพให้มีฤทธิ์ก่อมะเร็งโดยใช้เอนไซม์ที่อยู่ในร่างกายในเซลล์โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่แปรสภาพสารเคมีต่างๆ ด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นหลัก ไซโตโครมพี 450 มีอยู่ด้วยกันหลายชนิด ชนิดที่พบมากและมีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดมะเร็งคือ CYP2E1 CYP2D6 และ CYP1Aโดยมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นให้เกิดสารก่อมะเร็งจาก ตัวทำละลายที่ใช้ในอุตสาหกรรม สารเคมีจำพวกอะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอน แอลกอฮอล์ และยาฆ่าโรคบางชนิด ในความเป็นจริงแล้วมนุษย์ไม่สามารถ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่อุดมสมบูรณ์ไปด้วยทรัพยากรธรรมชาติ ด้านอาหาร โดยเฉพาะผลไม้ ในบรรดาผลไม้ไทย สับปะรด จัดเป็นผลไม้ที่มีประโยชน์และคุณค่าสูง เป็นที่นิยมบริโภคและปลูกได้ทั่วไป อีกทั้งยังมีสรรพคุณใช้ในการป้องกัน รักษาโรค เนื่องจากพฤษเคมีที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในพืชผลไม้นั้นมีรายงานผลการวิจัยจำนวนมากที่บ่งชี้ว่ามีสารสำคัญต่างๆ ในกลุ่มของ โพลีฟีนอล แทนนิน แอนโทไซยานิน อัลคาลอยด์ ซึ่งจัดเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการลดและป้องกันการเกิดโรค แต่ยังคงขาดข้อมูลสนับสนุนทางวิทยาศาสตร์และองค์ความรู้ในด้านการผสมผสานโดยการนำมาใช้เพื่อยับยั้ง ป้องกัน และกำจัดสารเคมีที่ส่งผลต่อภาวะสุขภาพแบบองค์รวมซึ่งจัดเป็นนวัตกรรมการสรรหาและเลือกใช้ทรัพยากรของประเทศที่มีสรรพคุณดีมีประโยชน์เพื่อให้เกิดมูลค่า

การวิจัยครั้งนี้จึงได้ศึกษาฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสับปะรด ศึกษาผลของสารสกัดสับปะรดต่อการยับยั้งเอนไซม์ CYP2D6, CYP2E1 และ CYP1A ที่ใช้ในกระบวนการแปรสภาพสารเคมีให้เกิดพิษมากขึ้นโดยใช้ไมโครโซมจากตับศพเป็นแหล่งเอนไซม์ เป็นการเชื่อมโยงองค์ความรู้ด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์เพื่อส่งเสริมสุขภาพ ลดภาระค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลด้วยวิธีป้องกันการเกิดโรคจากการใช้ผลไม้ไทยซึ่งจะส่งผลต่อคุณภาพชีวิตของประชาชนโดยรวมด้วย

บทที่ 2

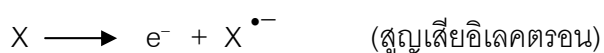
ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

สับปะรด (*Ananas comosus* (L.) Merr.) เป็นไม้ผลในวงศ์ bromeliaceae (Family Bromeliaceae) มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกาใต้ เมื่อพิจารณาแบ่งสับปะรดเพื่อการค้าทั่วโลกพบว่ามียอยู่ 5 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่ กลุ่ม Cayenne กลุ่ม Queen กลุ่ม Spanish กลุ่ม Abacaxis และกลุ่ม Maipure พันธุ์สับปะรดที่ปลูกในประเทศไทยเมื่อแบ่งแยกออกแล้วพบว่ามียอยู่เพียง 5 พันธุ์ คือ พันธุ์ปัตตาเวีย พันธุ์อินทรีหรืออินทรีขีดแดง พันธุ์ขาว พันธุ์ภูเก็ทหรือพันธุ์สวี พันธุ์นางแลหรือพันธุ์น้ำผึ้ง โดยบางพันธุ์มีชื่อเรียกแตกต่างกันออกไปแล้วแต่ท้องถิ่นซึ่งทำให้เกิดความเข้าใจสับสนอยู่มาก สับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียและพันธุ์นางแลจัดอยู่ในกลุ่ม Cayenne พันธุ์ปัตตาเวียเป็นพันธุ์ที่ปลูกมากในปัจจุบัน แถบจังหวัดภาคตะวันตก เช่น ประจวบคีรีขันธ์ เพชรบุรี และแถบ ภาคตะวันออก เช่น ชลบุรี ระยอง โดยเรียกในนามของสับปะรดปราณบุรี และสับปะรดศรีราชา ซึ่งสับปะรดที่ปลูกในสองแหล่งนี้มีการผลิตและบริโภคผลสดมากเป็นอันดับหนึ่งของประเทศและ มีรสชาติเป็นที่ชื่นชอบของผู้บริโภคเพราะมีรสหวานฉ่ำ สำหรับจังหวัดลำปางก็เป็นอีกแหล่งหนึ่งที่มีการปลูกสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียมากและมีอัตราการปลูกที่ขยายตัวมากขึ้นเนื่องจากมีอุตสาหกรรมผลไม้กระป๋องเข้ามาดำเนินการ สำหรับสับปะรดพันธุ์นางแลหรือน้ำผึ้งเป็นพันธุ์ย่อย (sub-variety) ของพันธุ์ปัตตาเวีย กล่าวกันว่าผู้นำมาปลูกในบริเวณ ตำบลนางแล อำเภอเมือง จังหวัดเชียงราย และขยายพันธุ์เพิ่มเนื่องจากการปลูกมากขึ้นเนื่องจากมีรสชาติดีเป็นที่นิยมของตลาด (จารุพันธ์ ทองแถม, 2526, จินดารัฐ วีระวุฒิ, 2541)

เนื้อในผลสับปะรดมีเอนไซม์โบรมีเลน (bromelain) ซึ่งมีฤทธิ์ย่อยโปรตีนได้เป็นอย่างดี ทั้งในภาวะเป็นกรดและด่าง มีคุณสมบัติเหมาะสมในการช่วยย่อยในกระเพาะซึ่งเป็นกรด และในลำไส้เล็กซึ่งเป็นด่าง จึงช่วยกระตุ้นระบบการย่อยอาหารและทำความสะอาดลำไส้ สารนี้ยังช่วยให้แผลผ่าตัดทุเลาเร็วขึ้น รวมทั้งลดอาการอักเสบ แผลบวมหรืออาการบาดเจ็บ รวมทั้งมีการทดลองใช้บรรเทาอาการอักเสบจากโรคผิวหนัง อารมณ์เกี่ยวกับเส้นเลือดดำ โรคกระดูก และข้ออักเสบ รูมาตอยด์เก๊าท์ และอาการปวดประจำเดือน มีรายงานวิจัยที่พบด้วยว่า ด้วยฤทธิ์ย่อยโปรตีนอย่างเป็นธรรมชาติของโบรมีเลนทำให้เมื่อโบรมีเลนดูดซึมเข้ากระแสเลือด อาจช่วยลดการเกาะกันเป็นลิ่มเลือดของเกล็ดเลือดในหลอดเลือดแดง ซึ่งจะมีส่วนช่วยลดความเสี่ยงจากโรคหัวใจและหลอดเลือดได้อีกหลายชนิด ในปัจจุบันได้มีการสกัดเอนไซม์โบรมีเลนจากสับปะรดไปใช้ในอุตสาหกรรม เครื่องสำอาง ยาและอาหารเสริม แต่ยังมีข้อควรระวังการเกิดอันตรายกิริยา กับการใช้ยาบางชนิด เช่น ผู้ที่ใช้ยาต้านการแข็งตัวของเลือด โบรมีเลนมีคุณสมบัติเหมือนเอนไซม์จากธรรมชาติทั่วไป คือ ไม่ทนความร้อน ดังนั้นการกินสับปะรดสดจึงได้รับประโยชน์มากกว่า โดยเฉพาะเส้นใยอาหารในสับปะรดยังมีคุณสมบัติช่วยลด

ในการเกิดมะเร็ง กลไกหนึ่งที่เกี่ยวข้องคือการเกิดความเป็นพิษโดยปฏิกิริยาของออกซิเจนที่เรียกว่า oxidative stress สามารถนำไปสู่การทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตได้ กลไกการเกิดความเป็นพิษเกิดจากการสร้างอนุมูลอิสระ (free radical) ที่มีความไวสูงในการเข้าทำปฏิกิริยาส่งผลให้มีการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อตามมา

อนุมูลอิสระ หมายถึงโมเลกุลใดๆ ที่มีความคงตัวระดับหนึ่ง และมีอิเล็กตรอนเดี่ยว (unpaired electron) ที่ orbital นอกสุด จากการที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวทำให้สารกลุ่มนี้มีมีความไว (reactivity) ในการเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่น เนื่องจากการที่อิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระพยายามจับคู่กับอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นเพื่อเพิ่มความคงตัวของตัวเอง แต่ในขณะเดียวกันโมเลกุลที่สูญเสียอิเล็กตรอนก็จะเกิดอิเล็กตรอนอิสระและกลายเป็นอนุมูลอิสระต่อไปได้ ดังนั้นการที่โมเลกุลใดจะเกิดเป็นอนุมูลอิสระหรือไม่ขึ้นอยู่กับปฏิกิริยาทางเคมีที่มีการรับหรือการสูญเสียอิเล็กตรอน

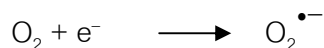


การเกิดอนุมูลอิสระอาจเกิดได้จากแตกหัก (hemolytic fission) ของพันธะโควาเลนต์ที่ทำให้มีการแบ่งอิเล็กตรอนให้แก่แต่ละอะตอมของโมเลกุลนั้นๆ การเกิด hemolytic fission ต้องอาศัยพลังงานเพื่อแยกพันธะโควาเลนต์ ซึ่งอาจเป็นพลังงานที่ได้จากความร้อน คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าหรืออื่นๆ

อนุมูลอิสระสามารถถูกสร้างขึ้นในร่างกายได้ระหว่างกระบวนการ oxidative metabolism และกระบวนการสร้างพลังงานของร่างกายที่มีการถ่ายเทอิเล็กตรอนให้แก่ตัวรับอิเล็กตรอนต่างๆ นอกจากนี้การสร้างอนุมูลอิสระยังเกิดได้จากสารภายนอกในร่างกาย (xenobiotics) ที่เข้าสู่ร่างกายและเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระ

Oxygen-centered radical หรือที่เรียกว่า Reactive Oxygen Species (ROS) เมื่อพิจารณาถึงความไวของออกซิเจนในรูปแบบต่างๆ จัดเป็นอนุมูลอิสระที่มีผู้ศึกษาถึงความเป็นพิษ ความสัมพันธ์กับการเกิดโรค บทบาทในกระบวนการส่งสัญญาณภายในเซลล์ อนุมูลอิสระกลุ่มนี้ได้แก่ superoxide radical ($O_2^{\bullet-}$), hydroxyl radical ($HO^{\bullet}$) และ singlet oxygen (1O_2)

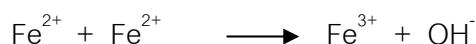
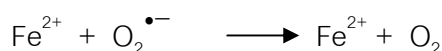
Superoxide radical ($O_2^{\bullet-}$) เกิดจากการที่โมเลกุลของออกซิเจนในสภาวะ ground-state ได้รับความไวโดยอิเล็กตรอนอิสระโดยการเติมอิเล็กตรอนอิสระที่ π^* antibonding orbital ทำให้เกิดเป็นอิเล็กตรอน



Hydroxyl radical ($\text{HO}^\bullet$) เป็นอนุมูลอิสระที่มีความไวมากที่สุด ทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ และส่วนประกอบต่างๆ ของเซลล์มากที่สุด ปฏิกิริยาของการสร้าง $\text{HO}^\bullet$ คือ Fenton reaction เมื่อ Iron (II) salts ทำปฏิกิริยากับ hydrogen peroxide



Fe^{3+} ยังอาจถูกรีดิวซ์ได้โดย $\text{O}_2^{\bullet -}$ ให้เป็น Fe^{2+} และทำให้เกิดปฏิกิริยาต่อเนื่อง



Sulfur- Centered Radicals

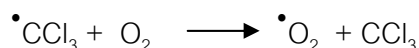
Thiyl radicals ($\text{RS}^\bullet$) จัดเป็น sulfur-centered radicals ที่มีความไวโดยสามารถรวมตัวกับโมเลกุลออกซิเจน ($\text{RS}^\bullet + \text{O}_2 \longrightarrow \text{RSO}_2^\bullet$) นอกจากนี้ thiyl radical ยังสามารถออกซิไดซ์ NADPH ได้ $\text{NAD}^\bullet (\text{RS}^\bullet + \text{NADPH} \longrightarrow \text{RS}^- + \text{NAD}^\bullet + \text{H}^+)$ และสามารถทำให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระตัวอื่นๆ ได้ เช่น $\text{HO}^\bullet$, $\text{O}_2^{\bullet -}$ การสร้าง thiyl radical ยังพบว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดพิษจากสารประกอบ disulphide บางชนิด เช่น sporidesmin และ diphenyl disulphide

Carbon-Centered Radicals

Carbon-centered radicals ถูกสร้างได้ในระบบของสิ่งมีชีวิต เช่น ระหว่างกระบวนการเมตาบอลิซึมของ carbon tetrachloride (CCl_4) โดย liver microsomes ได้ trichloromethyl radical



Carbon-centered radical มักทำปฏิกิริยากับ O_2 อย่างรวดเร็วได้ peroxy radical ($^\bullet\text{O}_2$) โดยการถ่ายเทอิเล็กตรอนให้กับออกซิเจน



(trichloromethylperoxy radical)

นอกจากอนุมูลอิสระที่ได้กล่าวมาแล้ว ยังมีอนุมูลอิสระอีกหลายประเภท อย่างเช่น nitrogen-centered radicals ($\text{R}_2^\bullet\text{NO}$), reducing radicals ($\text{CO}_2^{\bullet -}$), oxidizing radical ($\text{LOO}^\bullet$)

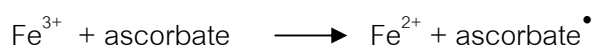
การทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อที่เกิดจากอนุมูลอิสระเริ่มต้นจากการทำลายส่วนประกอบของเซลล์ส่งผลให้เซลล์เสียสภาพโครงสร้าง การทำงาน จนอาจนำไปสู่การเสียสภาพอย่างถาวรของเซลล์ ได้แก่ ไขมัน โปรตีน ดีเอ็นเอ

ร่างกายมีระบบป้องกันตัวเองที่สำคัญที่สามารถช่วยลดความรุนแรงของความเป็นพิษจากอนุมูลอิสระ จากระบบของสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) การจะเกิดภาวะ oxidative stress หรือไม่นั้นขึ้นอยู่กับความสมดุลระหว่างอนุมูลอิสระกับปริมาณสารต้านออกซิเดชัน

สารต้านออกซิเดชัน เป็นสารใดๆ ที่สิ่งมีชีวิตใช้เพื่อป้องกันตนเองจากความเป็นพิษที่เกิดจากอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ป้องกันดังกล่าวอาจเกิดได้ทั้งจากความสามารถของสารต้านออกซิเดชันในการยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระ หรือการจับกับอนุมูลอิสระ (radical scavenging) ทำให้อนุมูลอิสระสูญเสียความไวในการเข้าทำปฏิกิริยาโดยกลไกการทำงานที่แตกต่างกัน เช่น

- สาร หรือเอนไซม์ ที่ลดปริมาณอนุมูลอิสระโดยการกำจัดอนุมูลอิสระ เช่น superoxide dismutase, catalase, peroxidases, thio-specific antioxidants
- โปรตีนที่ลดปริมาณ pro-oxidants ที่เป็นตัวเร่งการสร้างอนุมูลอิสระ เช่น ion binding proteins จับกับ free ions และลดปริมาณ free ions ในการเร่งการสร้างอนุมูลอิสระ
- โปรตีนป้องกัน biomolecules จากการทำลายเซลล์โดยอนุมูลอิสระ
- โมเลกุลขนาดเล็ก (low-molecular-mass) ที่มีส่วนทั้งทางตรงและทางอ้อมในการลดปริมาณอนุมูลอิสระโดยการกำจัดอนุมูลอิสระ เช่น glutathione, α -tocopherol, ascorbic acid ซึ่งได้จากสารอาหาร

Ascorbic acid หรือ ascorbate ทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชันโดยการให้อิเลคตรอน 1 ตัวแก่อนุมูลอิสระใดๆ และตัวมันเองถูกเปลี่ยนจาก ascorbic acid เป็น semidehydroascorbate (SDA) หรือ ascorbyl radical ซึ่งถูกออกซิไดซ์ต่อไปได้ dehydroascorbate (DHA) เนื่องจาก ascorbyl radical เป็นอนุมูลอิสระที่มีความคงตัวสูงไม่สามารถทำปฏิกิริยาต่อไปได้ การทำปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลอิสระใดๆ กับ ascorbate จึงถือเป็นการหยุดยั้งปฏิกิริยาต่อเนื่องก่อนที่อนุมูลอิสระนั้นจะทำลาย macromolecules ต่างๆ ภายในเซลล์ แต่ ascorbic acid ก็สามารถเป็น pro-oxidant (เพิ่มการสร้างอนุมูลอิสระ) ได้เช่นกัน โดยคุณสมบัติที่เป็น reducing agent ทำให้เกิด reduction ของ ferric ion (Fe^{3+}) ได้เป็น ferrous ion (Fe^{2+}) และเกิดการสร้าง hydroxyl radical มากขึ้นได้ โดยผ่าน fenton reaction



Tocopherol หรือ vitamin E สารในธรรมชาติที่เป็นสารต้านออกซิเดชันที่ละลายในไขมันได้ดี สามารถกำจัดอนุมูลอิสระโดยการเข้าทำปฏิกิริยาโดยตรงได้โดยเฉพาะ peroxy radical หรือ lipid peroxy radical ($\text{LOO}^{\bullet}$)

การป้องกันการเกิดมะเร็ง อาจเกิดโดยกลไกการต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงการยับยั้งกระบวนการเมแทบอลิซึมโดยเอนไซม์ไซโตโครมพี 450

สำหรับการต้านอนุมูลอิสระของสับปะรดนั้น มีการศึกษาของ Leong และ Shui (2002) โดยใช้สับปะรดที่จำหน่ายในตลาดประเทศสิงคโปร์โดย พบว่า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH, ABTs ในหลอดทดลอง เช่นเดียวกับ Alothan และคณะ (2009) ที่รายงานผลการศึกษาว่าสารฟลาโวนอยด์ที่พบในสับปะรด กล้วยและฝรั่งในประเทศมาเลเซียมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระขึ้นอยู่กับปริมาณสารฟลาโวนอยด์ที่พบในผลไม้แต่ละชนิด ในการสกัดสับปะรดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ น้ำ, เมทานอล, เอทานอล และ อะซิโตน พบว่าการสกัดด้วย 70% เอทานอล จะได้ปริมาณรวมของสารฟลาโวนอยด์สูงที่สุดและ สามารถยับยั้งอนุมูล DPPH ได้ถึงร้อยละ 87.5 สำหรับ Hossain และ Rahman (2011) พบว่าสารสกัดสับปะรดจากตัวทำละลายเมทานอล มีปริมาณรวมฟีนอลิก และสารฟลาโวนอยด์ สูงที่สุด และสามารถยับยั้งอนุมูล DPPH ได้สูงที่สุดด้วยเมื่อเทียบกับการสกัดด้วยน้ำและethyl acetate

สำหรับการป้องกันการเกิดมะเร็ง โดยกลไกการยับยั้งกระบวนการเมแทบอลิซึมโดยเอนไซม์ไฮโดรโครมพี 450 นั้น มีการศึกษาของ Breinholt และคณะ (2002) พบว่าสารฟลาโวนอยด์ สามารถยับยั้งเอนไซม์ไฮโดรโครมพี 450 ชนิด 1A2 และ 2D6 ใน microsomes จากเซลล์ตับมนุษย์และหนู ต่อมา Moon และคณะ (2006) ศึกษาพบว่าสารฟลาโวนอยด์ซึ่งพบได้ในผลไม้ ผัก เครื่องดื่มที่ทำจากพืช ได้แก่ ชา ไวน์แดง ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมจากสมุนไพร และ ถั่วเหลือง สามารถยับยั้ง ไฮโดรโครมพี 450 ชนิด 1A1, 1A2, 2E1 และ 3A4 ได้ นอกจากนี้ Foster และคณะ (2003) พบว่า เครื่องเทศสมุนไพร ชาดำ และผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองสามารถยับยั้งไฮโดรโครมพี 450 ชนิด CYP 3A4, 2C9, 2C19 และ 2D6 ได้ด้วย สำหรับ สับปะรด Hidaka และคณะ (2008) พบว่า สามารถยับยั้งเอนไซม์ไฮโดรโครมพี 450 ชนิด 2C9 ที่ทำการศึกษาใน microsomes จากเซลล์ตับมนุษย์ได้ จากการศึกษาของ Vasilis และคณะ (2010) ได้รวบรวมและสรุปรายงานผลการศึกษาว่าสารฟลาโวนอยด์ที่สามารถยับยั้งการทำงานของไฮโดรโครมพี 450 ชนิด CYP 1 family จะป้องกันการเกิดมะเร็งโดยยับยั้งกระบวนการสร้างสารก่อมะเร็ง (carcinogenic product formation) ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการยับยั้งกระบวนการก่อมะเร็งในขั้นตอนเริ่มต้น (initiation)

บทที่ 3

ระเบียบวิธีดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

1. UV-VIS Spectrophotometer
2. เครื่องวัดความเป็นกรดเบส (pH meter)
3. ไมโครปิเปต
4. ปิเปตเอ็ด
5. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
6. เครื่องเขย่าสาร (vortex)
7. Freezer -70 °C
8. Homogenizer
9. เครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง
10. Water bath
11. Rotary evaporator
12. Magnetic stirrer and hot plate
13. HPLC
14. ตู้อบ memmert western Germany
15. กระดาษกรอง cellulose acetate
16. ปีกเกอร์ขนาด 50, 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
17. ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot air oven)
18. ปิเปต ขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร
19. ปากคีบ forceps
20. ตะเกียงแอลกอฮอล์
21. แ่งแก้วคนสาร
22. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave)
23. 25 และ 75 cm³ T-culture flask
24. Microculture plate ขนาด 96 และ 6 หลุม
25. กล้องจุลทรรศน์ชนิดธรรมดา (Light microscope)

26. กล้องจุลทรรศน์ชนิดกลับหัว (inverted microscope)
27. Multimode detector
28. Pasture pipette
29. Haemocytometer

สารเคมี

1. Ethanol 95 %
2. Folin-Ciocalteu reagent
3. Methanol
4. Aluminium chloride
5. Potassium acetate
6. Sucrose
7. Trolox
8. 2,4,6-tris (1-pyridyl)-5-triazine [T PTZ]
9. Hydrochloric acid
10. Ferric chloride
11. Ferrous sulfate
12. Acetate buffer
13. Dimethylsulfoxide (DMSO)
14. Hydrogen peroxide
15. Tris-HCL buffer
16. Nitroblue tetrasodium (NBT)
17. NADH
18. p-nitrophenol
19. 4-nitrocatechol
20. Sodium hydroxide
21. Trichloroacetic acid
22. Glycerol
23. Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)
24. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)
25. NADPH
26. Glucose-6-phosphate dehydrogenase

27. Glucose-6-phosphate salt
28. MgCl_2
29. Potassium chloride
30. K_2HPO_4
31. Phenacetin
32. Paracetamol
33. Codeine
34. Morphine
35. Gallic acid
36. Quercetin
37. PMS
38. Sodium phosphate
39. Sodium dihydrogen phosphate
40. Naphthylethylenediamine dihydrochloride
41. Sodium nitroprusside
42. Sulfanilic acid
43. Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM)
44. Mycoplasma-Free FCS (Fetal calf Serum)
45. Penicillin/Streptomycin mixture (Stock) 10,000 Units/ml
46. Fungizone (Amphotericin B) 250 ug/ml
47. N-2-Hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulphonic acid (HEPES)
48. Sodium bicarbonate (NaHCO_3)
49. Trypsinizing solution 0.25%(w/v) trypsin/ Versine or Trpson in TD-EDTA buffer
50. Sodium carbonate (Na_2CO_3)
51. Sodium hydroxide (NaOH)
52. Sodium chloride (NaCl)
53. Potassium chloride (KCl)
54. Sodium phosphate (Na_2HPO_4)
55. Tris-hydroxymethyl-aminomethane
56. Mercaptoethanol
57. Trypan blue

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดสับปะรด

นำสับปะรดสายพันธุ์นางแล(*Ananas comosus* (L)Merr) ที่ซื้อมาจากตำบลนางแล อ.เมือง จ. เชียงรายและสายพันธุ์ปัตตาเวีย(*Ananas comosus* (L) Merr) ที่ซื้อมาจากตลาดเมืองใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ ล้างให้สะอาด ปอกเปลือกออก แยกเนื้อและแกนสับปะรด จากนั้นชั่งน้ำหนักสด จำนวน 400 กรัม ตัดเป็นชิ้น บดให้ละเอียด แล้วสกัดด้วย 70% Ethanol จากนั้นนำชิ้นสารละลายส่วนใสมาระเหยให้แห้ง ภายใต้ความดันต่ำและนำสารสกัดส่วนที่เหลือไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้ง (Lyophilizer) ชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้และเก็บไว้ที่ ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส

2. การศึกษาหาปริมาณสารสำคัญในสารสกัดสับปะรด

2.1 หาปริมาณรวมของ ฟีนอลิกในสารสกัดด้วย Folin reagent (McDonald และคณะ, 2001)

เตรียมสารละลาย Folin reagent เข้มข้น 10% โดยละลายในน้ำกลั่น ผสมกับสารสกัดสับปะรด จากนั้นเติม 1M sodium carbonate ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตรโดยใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐาน

2.2 หาปริมาณรวมของ ฟลาโวนอยด์ด้วยอะลูมิเนียมคลอไรด์(Chang และคณะ, 2002)

เตรียมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ เข้มข้น 10% โดยละลายในน้ำกลั่น ผสมกับสารสกัดสับปะรด จากนั้นเติม 1M potassium acetate ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตรโดยใช้ quercetin เป็นสารมาตรฐาน

3. การศึกษาฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ

3.1 ฤทธิ์กำจัดอนุมูล DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

การทดสอบฤทธิ์กำจัดอนุมูล DPPH ซึ่งประยุกต์จากวิธีของ Banerjee และคณะ (2005) โดยนำสารสกัดมาละลายในเมทานอลให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นนำมา 0.2 มิลลิลิตรผสมกับ 0.1 มิลลิลิตร 0.16 mM DPPH จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 3 มิลลิลิตรด้วยเมทานอลจากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตรโดยใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน

3.2 ฤทธิ์กำจัดอนุมูล superoxide

การทดสอบฤทธิ์กำจัดอนุมูลsuperoxide ประยุกต์วิธีของ Chen และคณะ (2007)โดยอนุมูล superoxide ถูกสร้างขึ้นในสารละลาย 3 มิลลิลิตร Tris-HCl buffer 16 mM pH8 ประกอบด้วย 1 มิลลิลิตร

3.3 ฤทธิ์กำจัด hydrogen peroxide

ฤทธิ์การกำจัด hydrogen peroxide ประยุกต์ใช้วิธีของ Sharma และคณะ (2010) โดยนำสารสกัดสับปะรดมาละลายใน DMSO ปิเปตสารละลายมา 200 ไมโครลิตร เติมน้ำในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ปริมาตร 2.8 มิลลิลิตร บ่มทิ้งที่อุณหภูมิห้องไว้เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณการยับยั้งการเกิด hydrogen peroxide

4. การศึกษาหาชนิดของสารสำคัญในสารสกัดสับปะรด

การหาปริมาณสารสำคัญในสารสกัดสับปะรดด้วย HPLC

4.1 การเตรียมสารสกัดเพื่อหาสารกลุ่มฟีนอลิก

นำสารสกัดสับปะรดมาละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วหยดกรดเกลือเข้มข้นลงไป 3-4 หยด จากนั้นนำไปต้มเป็นเวลา 20 นาทีทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นนำมาแยกสารสำคัญด้วย C-18 solid phase extraction (SPE) SPE ถูกชะด้วย ethyl acetate, methanol, milliQ water และสารละลายสับปะรด ตามลำดับ เก็บส่วนที่ถูกดูดซับด้วย methanol ระเหยให้แห้ง จากนั้นนำมาละลายด้วย methanol เพื่อตรวจวิเคราะห์สารสำคัญด้วยเครื่อง HPLC ต่อไป

4.2. การตรวจสอบสารสำคัญกลุ่มฟีนอลิกด้วย HPLC

สภาวะเครื่อง โดยใช้ ODS C₁₈ คอลัมน์ (ขนาด 4 x 250 มิลลิเมตร อนุภาคขนาด 5 ไมครอน) ตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดชนิด Photodiode Array Detector (DAD) สารละลายตัวพาประกอบด้วย น้ำ 70 ส่วน 0.4% acetic acid 20 ส่วน methanol 5 ส่วน และ acetonitrile 5 ส่วน อัตราการไหล 0.7 มิลลิลิตรต่อนาที

4.3 การเตรียมตัวอย่างเพื่อหาสารสำคัญในกลุ่มฟลาโวนอยด์

ซึ่งผงสารสกัดสับปะรด 1 กรัม จากนั้นเติมน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร คนให้ผงสารสกัดสับปะรดละลาย จากนั้นนำมาสกัดด้วย ethyl acetate 3 ครั้ง ครั้งละ 15 มิลลิลิตร นำส่วน ethyl acetate มารวมกันระเหยให้แห้ง จากนั้นละลายกลับด้วย methanol เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

4.4 การตรวจสอบสารสำคัญกลุ่มฟลาโวนอยด์ด้วย HPLC

สภาวะเครื่อง โดยใช้ ODS C₁₈ คอลัมน์ (ขนาด 4 x 250 มิลลิเมตร อนุภาคขนาด 5 ไมครอน) ตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดชนิด Photodiode Array Detector (DAD) สารละลายตัวพาประกอบด้วย น้ำ 45 ส่วน methanol 40 ส่วน และ acetonitrile 15 ส่วน อัตราการไหล 0.7 มิลลิลิตรต่อนาที

4.5 การวิเคราะห์หาสารสำคัญด้วยเครื่อง GC-MS

นำสารสกัดสับปะรดสายพันธุ์นางแลและปัตตาเวียที่ได้จากการเตรียมด้วย SPE ดังข้อ 4.1 ไปตรวจวิเคราะห์หาสารสำคัญด้วย GC-MS

5. การเตรียมไมโครโซม

5.1 การเตรียมไมโครโซม โดยใช้วิธีของ Jaikang และคณะ (2011)

ขั้นตอน

1. นำตับศพที่แช่แข็งไว้มาทำให้อ่อนตัวลงโดยวางบนน้ำแข็งนาน 30-40 นาที แล้วตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยกรรไกร และแช่ไว้ใน 0.05 โมลาร์ Tris buffer 4 °C pH 7.4 (สารละลายประกอบด้วย 1 มิลลิโมล EDTA , 0.25 โมลาร์ sucrose และ 0.15 โมลาร์ KCl) ในอัตราส่วน 1 : 3 ระหว่างตับและสารละลาย (น้ำหนัก : ปริมาตร)

2. บดตับด้วยเครื่องบดแล้วนำไปตกตะกอนส่วนของเซลล์ที่ไม่ต้องการออกด้วยความเร็ว 9,000 g ที่ 4 °C นาน 30 นาที

3. นำเอาของเหลวใสส่วนบนไปปั่นอีกครั้งใน ultracentrifuge ที่ความเร็ว 105,000 g ที่ 4 °C นาน 30 นาที

4. เก็บ microsomal pellets ใน 0.5 M Tris buffer pH 7.4 ที่ผสมไว้ด้วย 1 mM EDTA, 0.25 sucrose และ 20% glycerol ที่อุณหภูมิ -70 °C ก่อนการวัดระดับโปรตีนและฤทธิ์ของ enzymes

5.2 การวัดระดับโปรตีนในไมโครโซม

เจือจางโปรตีนในไมโครโซมโดยใช้ phosphate buffer pH 7.4 และวัดปริมาณโปรตีนโดยใช้ BCA protein assay reagent kit

ขั้นตอน

1. เตรียมสารมาตรฐานโปรตีน โดยละลายสารมาตรฐานด้วยอัลบูมินให้มีความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 และ 1.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

2. เติมน้ำผสมของสารละลายระหว่าง BCA ในต่างที่ผสมด้วย sodium carbonate, sodium bicarbonate และ sodium tartarate กับ CuSO_4 หรือ reagent A และ B จาก reagent kit ด้วยอัตราส่วน 50:1 (A:B)

3. เติมน้ำ reagent ลงในหลอด สารมาตรฐานโปรตีน หลอดละ 2 มิลลิลิตรบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที แล้วอ่านสีม่วงของ BCA-Cu^+ protein complex ด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 562 นาโนเมตร โดยใช้น้ำเป็นตัวเปรียบเทียบ

4. เจือจางโปรตีนในไมโครโซมด้วยน้ำและนำไปวัดหาระดับ protein เทียบกับกราฟ
โปรตีนมาตรฐาน

6. การวัดผลของสารสกัดตับประตต่อการทำงานของเอนไซม์ cytochrome p450 (CYP)

6.1 การวัดผลของสารสกัดตับประตต่อการทำงานของเอนไซม์CYP2E1

เตรียม reaction mixture ซึ่งประกอบด้วย phosphate buffer (0.1 M, pH 6.8), p-nitrophenol เข้มข้น 100 มิลลิโมล สารสกัดตับประต (50-1000 ug/ml) ไมโครโซมที่มี 0.5 มก.โปรตีน นำไปบ่มที่ 37°C นาน 2 นาที จากนั้นเติม NADPH (100 มิลลิโมลใน phosphate buffer pH 6.8) ทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นเติม trichloroacetic acid เข้มข้น 0.5 M เพื่อหยุดปฏิกิริยา จากนั้นนำไปปั่นแยกโปรตีนด้วยความเร็ว 2500g นาน 15 นาที นำของเหลวใสส่วนบนมา 1 มิลลิลิตร เติม NaOH เข้มข้น 10 N จากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 511 นาโนเมตร ผลที่ได้แสดงในหน่วยไมโครโมล/มิลลิลิตร/นาที

6.2 การวัดผลของสารสกัดตับประตต่อการทำงานของเอนไซม์CYP1A2

เตรียม reaction mixture ซึ่งประกอบด้วย phosphate buffer (100 mM, pH 7.4), 0.1 mM EDTA, 0.4 mM MgCl₂ , NADPH-generating system (20 mM NADPH, 2mM glucose-6-phosphate, 1 IU/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase), phenacetin (100 uM), สารสกัดตับประต (25-1000 ug/ml) ไมโครโซมที่มี 0.1 มก.โปรตีน นำไปบ่มที่ 37°C นาน 60 นาที จากนั้นเติม cold methanol 200 ul และ 50 ul ของ phenacetin นำไปปั่นแยกโปรตีนด้วยความเร็ว 13,000g นาน 5 นาที นำส่วนใสส่วนบนมา 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดปริมาณ paracetamol ด้วย HPLC ผลที่ได้แสดงในหน่วยไมโครโมล/มิลลิลิตร/นาที

สภาวะเครื่อง HPLC ใช้ ODS C₁₈ คอลัมน์ (ขนาด 4 x 250 มิลลิเมตร อนุภาคขนาด 5 ไมครอน) ตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดชนิด Photodiode Array Detector (DAD) สารละลายตัวพาประกอบด้วย น้ำ 55 ส่วน methanol 20 ส่วน acetonitrile 20 ส่วน และ tetrahydrofuran 5 ส่วน อัตราการไหล 0.7 มิลลิลิตร ต่อนาที

6.3 การวัดผลของสารสกัดตับประตต่อการทำงานของ เอนไซม์CYP2D6

เตรียม reaction mixture ซึ่งประกอบด้วย phosphate buffer (100 mM, pH 7.4), 0.1 mM EDTA, 0.4 mM MgCl₂ , NADPH-generating system (20 mM NADPH, 2mM glucose-6-phosphate, 1 IU/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase), codeine (100 uM), สารสกัดตับประต (50-1500 ug/ml) ไมโครโซมที่มี 0.1 มก.โปรตีน นำไปบ่มที่ 37°C นาน 60 นาที จากนั้นเติม cold methanol 200 ul และ 50 ul ของ phenacetin นำไปปั่นแยกโปรตีนด้วยความเร็ว 13,000g นาน 5 นาที นำส่วนใสส่วนบนมา 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดปริมาณ morphine ด้วย HPLC ผลที่ได้แสดงในหน่วยไมโครโมล/มิลลิลิตร/นาที

สภาวะเครื่อง HPLC ใช้ ODS C₁₈ คอลัมน์ (ขนาด 4 x 250 มิลลิเมตร อนุภาคขนาด 5 ไมครอน) ตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดชนิด Photodiode Array Detector (DAD) สารละลายตัวพาประกอบด้วย methanol 20 ส่วน acetonitrile 7 ส่วน และ 25 mM KH₂PO₄ (pH 3.5) 73 ส่วน อัตราการไหล 0.7 มิลลิลิตร ต่อนาที

7. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ สารเคมีและน้ำยาต่างๆ

7.1 การเตรียม D-MEM medium

วิธีการเตรียม

1. เทผง D-MEM จากซองใส่ภาชนะขนาด 1 ลิตรที่มี deionized distilled water อยู่ประมาณ 800 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน
2. ชั่ง HEPES ปริมาณ 3.57 กรัม เติมลงไปคนให้เข้ากัน
3. ชั่ง NaHCO₃ ปริมาณ 3.7 กรัม เติมลงไปคนให้เข้ากัน
4. เติม mercaptoethanol จาก stock ลงไป 1 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร
5. นำสารละลายไปกรองด้วย Suction filter ที่ปราศจากเชื้อแล้ว โดยใช้กระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน จากนั้นแบ่งอาหารใส่ขวดปริมาตร 500 มิลลิลิตร เก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

7.2 การเตรียม Complete medium

วิธีการเตรียม

1. นำ D-MEM incomplete medium มา 88 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปริมาตร 100 มิลลิลิตร
2. เติม Pen/Strep 1ml จาก stock (10,000 unit/ml) ลงไปในขวดและเติม fungizone 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
3. ดูด FCS ใส่ลงไปปริมาตร 10 มิลลิลิตร
4. ใช้ pasture pipette ดูด medium ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน 24 well plate นำไปบ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เพื่อตรวจสอบว่า medium ปราศจากเชื้อ

7.3 การเตรียม TD-EDTA buffer pH 7.4

วิธีการเตรียม สำหรับ 500 มิลลิลิตร

1M Tris-Base	12.5	ml
1 M NaCl	73.5	ml
100 mM KCl	25.0	ml

352 mM Na ₂ HPO ₄	1.0 ml
100 mM EDTA	0.5 ml
Deionized distilled water	25.0 ml

ปรับ pH ให้ได้ 7.4 ด้วย 1 N HCl เติม deionized distilled water ให้ครบ 500ml นำไปกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอนเก็บไว้ในขวด 500 มิลลิลิตรที่ 4 องศาเซลเซียส

7.4 การเตรียม phosphate buffer saline (PBS)

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง KH₂PO₄ 0.24 กรัม Na₂HPO₄ 1.44 กรัม, NaCl 8 กรัม และ KCl 0.2 กรัม
2. นำมาละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 7.4 แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร
3. นำมาใส่ในขวดแล้วทำการนึ่งฆ่าเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิห้อง

7.5 การเพาะเลี้ยงเซลล์ Hep G2

7.5.1 สภาพะที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์

เลี้ยงเซลล์ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความชื้น 95% ในบรรยากาศที่มี 5% CO₂ ทำการ subculture เซลล์ทุกๆ 2 วัน ในทุกขั้นตอนของการทดลองจะต้องเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะที่ไม่มีเชื้อโรคปะปนอยู่ เซลล์ที่เกาะอยู่บนผิวพลาสติกก่อนนำมาทดลองจะต้องทำให้หลุดจากผิวพลาสติกโดยใช้สารละลาย trypsin 0.25 %

7.5.2. การเลี้ยงเซลล์ Hep G2 cell line

1. เมื่อเซลล์เจริญเติบโต 80-100% confluent ให้ใช้ Pasteur-pipette ที่อบฆ่าเชื้อแล้วดูดเอาอาหารเก่าออกให้หมด
2. เติม 0.25% trypsin ใน TD-EDTA เพื่อเซลล์ให้หลุดออกจากกันทิ้งไว้ 1-2 นาที
3. ดูดสารละลาย trypsin ออกให้หมดจากนั้นเติม TD-EDTA ประมาณ 2 มิลลิลิตรดูดกลับไปกลับมาให้เซลล์หลุดออกให้หมด
4. แบ่งเซลล์ใส่ในงานทดลองอันใหม่โดยนำเซลล์จากข้อ 3 ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อนำไปบ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์

7.5.3 การเตรียมเซลล์เพื่อใช้ในการทดลอง

1. เมื่อเซลล์เจริญเติบโตเต็มที่ให้เก็บเซลล์ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงนำไปปั่นด้วยความเร็ว 3,000 rpm นาน 5 นาที

2. ดูดส่วนใสทิ้ง เติม complete medium ใหม่ลงไปอีกผสมให้เข้ากันจากนั้นแบ่งเซลล์มานับด้วย haemocytometer

7.5.4 การทดสอบความเป็นพิษของสารทดสอบต่อเซลล์เพาะเลี้ยง

1. นำเซลล์ HepG2 ออกจาก culture T-flask ที่มีการเจริญของเซลล์ 70-80% confluent ใส่ในหลอดทดลองนำไปปั่นที่ความเร็ว 3,000rpm นาน 5 นาทีดูดส่วนใสทิ้ง เติม complete medium ใหม่ลงไปใช้ pasture pipette ดูดเบาๆ ให้เข้ากัน นำไปวัดปริมาณเซลล์

2. ทำการเตรียมเซลล์ให้มีความเข้มข้น 10^6 cell/ml นำไปดูดใส่ 96 well plate หลุมละ 100ul จำนวน 3 หลุม

3. เก็บเซลล์ที่ 37 องศาเซลเซียสในตู้บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4. เติมสารที่มีความเข้มข้นต่างๆ กันในช่วง 0.625 -100ug/ml บ่มต่ออีก 48 ชั่วโมง

5. เมื่อครบเวลาดูดเอาอาหารเลี้ยงเชื้อออก 100ul

6. เติม สารละลาย MTT dye solution 15 ul/well และทำการบ่มเซลล์ต่อที่ 37 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง

7. เมื่อครบเวลาให้คว่ำ 96 well plate เพื่อทิ้งสารละลายออกให้หมด

8. เติม DMSO หลุมละ 100ul จากนั้นอ่านค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570nm และใช้ค่าความยาวคลื่น 630nm เป็นตัวอ้างอิง

9. ทำการคำนวณ % survival โดยเทียบกับหลุมควบคุม

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาการเตรียมสารสกัดสับปะรด

ปริมาณของสารสกัดสับปะรดสายพันธุ์นางแล (*Ananas comosus* (L) Merr.) และสายพันธุ์ปัตตาเวีย (*Ananas comosus* (L) Merr.) ด้วย 70% Ethanol แสดงในตารางที่ 1 โดย สับปะรดสายพันธุ์ปัตตาเวียให้น้ำหนักและร้อยละของผลผลิตสูงกว่าสับปะรดสายพันธุ์นางแล เมื่อเทียบน้ำหนักสดที่เท่ากัน

ตารางที่ 1 แสดงร้อยละของผลผลิตสารสกัดสับปะรด

สับปะรด	น้ำหนักสด (กรัม)	น้ำหนักผงของสารสกัด (กรัม)	ร้อยละของผลผลิต (%yield)
สายพันธุ์นางแล	400	22.89	5.72
สายพันธุ์ปัตตาเวีย	400	41.34	10.34

4.2 ผลการศึกษาหาปริมาณสารสำคัญในสารสกัดสับปะรด

-ปริมาณรวมของฟีนอลิกในสารสกัดสับปะรด

ปริมาณรวมของฟีนอลิกในสารสกัดสับปะรดที่หาด้วยสารละลาย Folin reagent แสดงดังตารางที่ 2 จากผลทดสอบพบว่าสับปะรดสายพันธุ์ปัตตาเวียมีปริมาณรวมของฟีนอลิกสูงกว่าสับปะรดสายพันธุ์นางแล เมื่อเทียบน้ำหนักสดที่เท่ากัน

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณรวมของฟีนอลิกในสารสกัดสับปะรด

สับปะรด	ปริมาณรวมของฟีนอลิก(มก.ที่เทียบเท่ากับ gallic acid/ น้ำหนักสด 100 กรัม)
สายพันธุ์นางแล	11.72 ± 0.15
สายพันธุ์ปัตตาเวีย	25.01 ± 0.46

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3)

- ปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์ในสารสกัดสับปะรด

ปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์ในสารสกัดสับปะรดที่หาด้วยการใช้อะลูมิเนียมคลอไรด์ผลการศึกษาดังตารางที่ 3 การทดสอบพบว่าสับปะรดสายพันธุ์ปัตตาเวียมีปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์สูงกว่าสับปะรดสายพันธุ์นางแล เมื่อเทียบน้ำหนักสดที่เท่ากัน

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์ในสารสกัดสับปะรด

สับปะรด	ปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์ (มก. ที่เทียบเท่ากับ quercetin/ น้ำหนักสด 100 กรัม)
สายพันธุ์นางแล	1.68 ± 0.11
สายพันธุ์ปัตตาเวีย	2.97 ± 0.04

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3)

4.3 ผลการศึกษาฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ

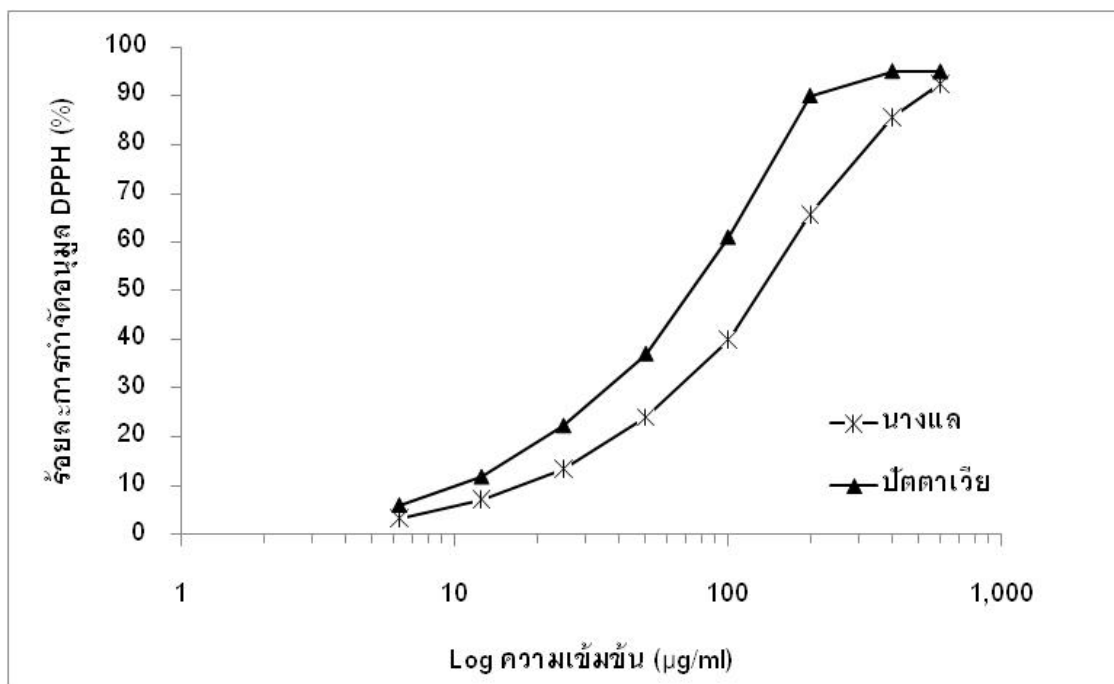
4.3.1 ฤทธิ์กำจัดอนุมูล DPPH

ค่าร้อยละของการยับยั้งอนุมูล DPPH ของสารสกัดจากสับปะรด แสดงในตารางที่ 4 และรูปที่ 1 จากการทดลองพบว่าประสิทธิภาพการกำจัดอนุมูล DPPH นั้นขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัดสับปะรดโดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดสับปะรด ประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูล DPPH จะเพิ่มมากขึ้น สารสกัดสับปะรดสายพันธุ์ปัตตาเวียยับยั้งอนุมูล DPPH ได้สูงสุดร้อยละ 95.12 ที่ความเข้มข้น 400 µg/ml เมื่อเพิ่มความเข้มข้นขึ้นไปอีก ประสิทธิภาพการกำจัดอนุมูลจะเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย สำหรับสารสกัดสับปะรดสายพันธุ์นางแลยับยั้งอนุมูล DPPH ได้สูงสุดร้อยละ 92.67 ที่ความเข้มข้น 600 µg/ml เมื่อหาความเข้มข้นที่สามารถกำจัดอนุมูล DPPH ได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) ของสารสกัดสับปะรดสายพันธุ์ปัตตาเวียและสับปะรดสายพันธุ์นางแล พบว่ามีค่าเท่ากับ 65.18 µg/ml (0.63 mg ของน้ำหนักสด/ml) และ 116.65 µg/ml (2.04 mg ของน้ำหนักสด/ml) ตามลำดับ

ตารางที่ 4 แสดงร้อยละของการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดสับปะรด

ความเข้มข้นของสารสกัด (µg/ml)	ร้อยละของการกำจัดอนุมูล DPPH	
	สายพันธุ์นางแล	สายพันธุ์ปัตตาเวีย
6.25	3.25 ± 0.10	6.09 ± 0.60
12.5	7.19 ± 0.29	11.93 ± 0.59
25	13.50 ± 0.53	22.40 ± 0.58
50	24.08 ± 0.53	37.16 ± 0.91
100	40.06 ± 0.47	61.05 ± 0.94
200	65.81 ± 1.31	90.06 ± 0.89
400	85.84 ± 1.80	95.12 ± 0.22
600	92.67 ± 2.15	95.04 ± 0.50

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3)



รูปที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดสับปะรดและความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH

4.3.2 ฤทธิ์กำจัดอนุมูล superoxide

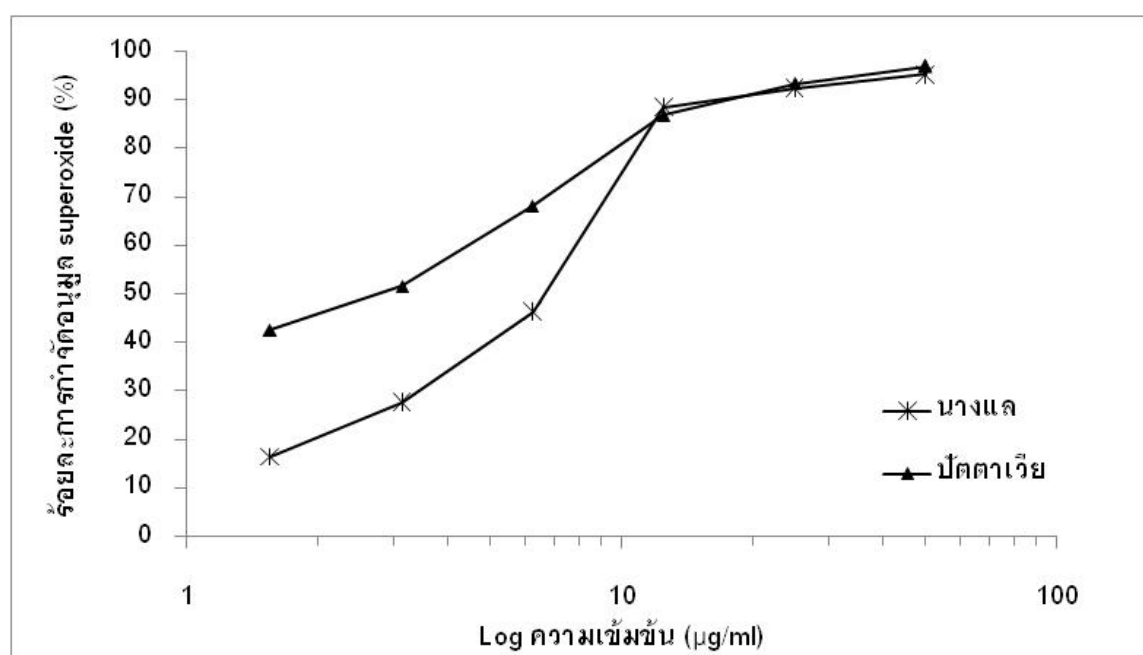
ร้อยละของการกำจัดอนุมูล superoxide แสดงในตารางที่ 5 และรูปที่ 2 จากการศึกษพบว่า ฤทธิ์การกำจัดอนุมูล superoxide ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัดสับปะรด โดยถ้าเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดสับปะรดประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูล superoxide ก็จะสูงขึ้นด้วย ในช่วงความเข้มข้น 0.39 - 6.25 µg/ml พบว่าสารสกัดสับปะรดสายพันธุ์ปัตตาเวียมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูล superoxide สูงกว่าสารสกัดสับปะรดสายพันธุ์นางแล แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดให้สูงขึ้นพบว่า ฤทธิ์การยับยั้งอนุมูล superoxide ใกล้เคียงกัน โดยฤทธิ์การยับยั้งสูงสุดเกิดที่ความเข้มข้น 50 µg/ml

เมื่อหาค่าความเข้มข้นที่สามารถกำจัดอนุมูล superoxide ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ของสารสกัดสับปะรดสายพันธุ์ปัตตาเวียและสับปะรดสายพันธุ์นางแล พบว่ามีค่าเท่ากับ 2.48 µg/ml (24.00 µg ของน้ำหนัสด/ml) และ 5.15 µg/ml (90.00 µg ของน้ำหนัสด/ml) ตามลำดับ

ตารางที่ 5 แสดงร้อยละการกำจัดอนุมูล superoxide ของสารสกัดสับปะรด

ความเข้มข้นของสารสกัด ($\mu\text{g/ml}$)	ร้อยละของการกำจัดอนุมูล superoxide	
	สายพันธุ์นางแล	สายพันธุ์ปัตตาเวีย
0.39	3.93 ± 1.18	13.77 ± 1.87
0.78	8.59 ± 0.65	21.84 ± 0.78
1.56	16.46 ± 0.93	42.75 ± 1.09
3.13	27.74 ± 1.56	51.76 ± 0.65
6.25	46.48 ± 0.95	68.22 ± 1.47
12.5	88.61 ± 0.72	86.96 ± 0.54
25	92.55 ± 0.54	93.48 ± 0.00
50	95.34 ± 0.82	97.00 ± 0.18

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3)



รูปที่ 2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดสับปะรดและความสามารถในการกำจัดอนุมูล superoxide

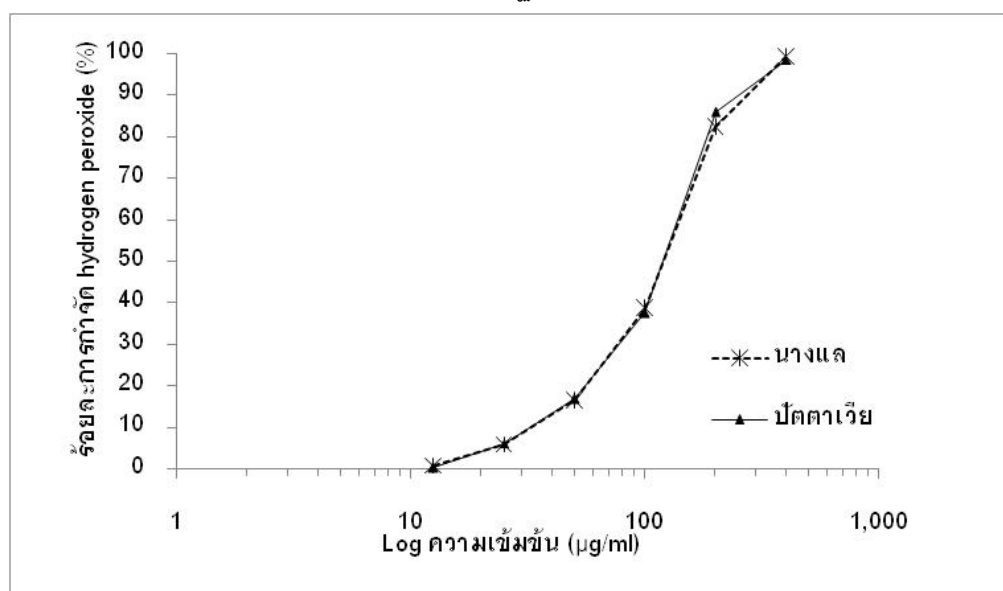
4.3.3ฤทธิ์กำจัด hydrogen peroxide

ร้อยละของการกำจัด hydrogen peroxideแสดงในตารางที่ 6 และรูปที่ 3 สารสกัดสับปะรดทั้งสองสายพันธุ์มีฤทธิ์ในการกำจัด hydrogen peroxide ที่ใกล้เคียงกัน ที่ความเข้มข้นในช่วง 12.5-400 µg/ml ค่าความเข้มข้นที่สามารถกำจัด hydrogen peroxide ได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) ของสารสกัดสับปะรดสายพันธุ์ ปัตตาเวียและ สับปะรดสายพันธุ์นางแล มีค่าเท่ากับ 106.75 µg/ml (1.03 mg ของน้ำหนักสด/ml) และ 109.10 µg/ml (1.91 mg ของน้ำหนักสด/ml) ตามลำดับ

ตารางที่ 6 แสดงร้อยละการกำจัด hydrogen peroxide ของสารสกัดสับปะรด

ความเข้มข้นของสารสกัด (µg/ml)	ร้อยละการกำจัด hydrogen peroxide	
	สายพันธุ์นางแล	สายพันธุ์ปัตตาเวีย
12.5	0.57 ± 0.16	0.21 ± 0.05
25	5.71 ± 0.44	6.01 ± 0.18
50	16.46 ± 0.33	16.78 ± 0.23
100	38.76 ± 0.20	37.45 ± 0.16
200	82.37 ± 0.18	85.96 ± 0.46
400	99.19 ± 0.39	98.53 ± 0.24

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3)



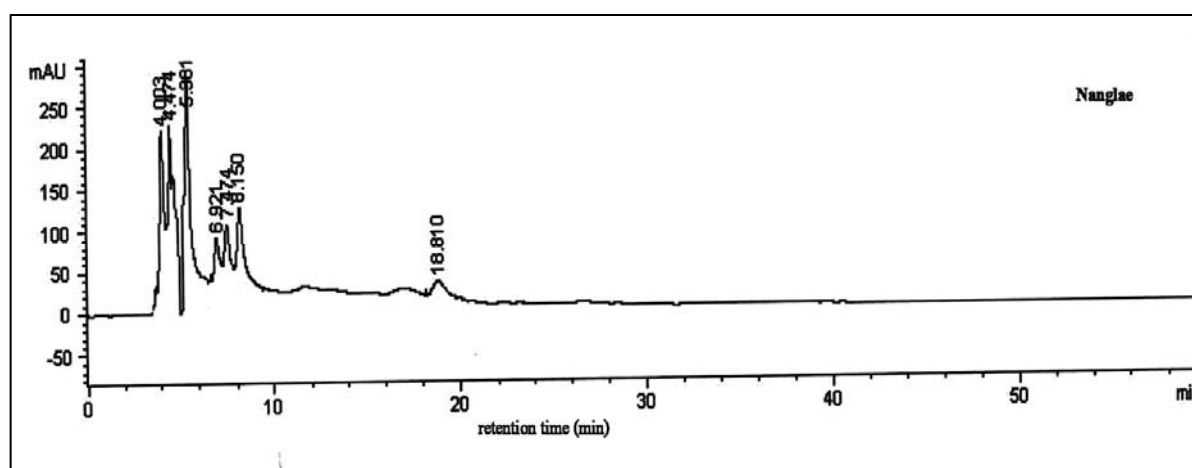
รูปที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดสับปะรดและความสามารถในการกำจัด hydrogen peroxide

4.4 ผลการศึกษาหาชนิดของสารสำคัญในสารสกัดสับปะรดด้วยเทคนิค HPLC

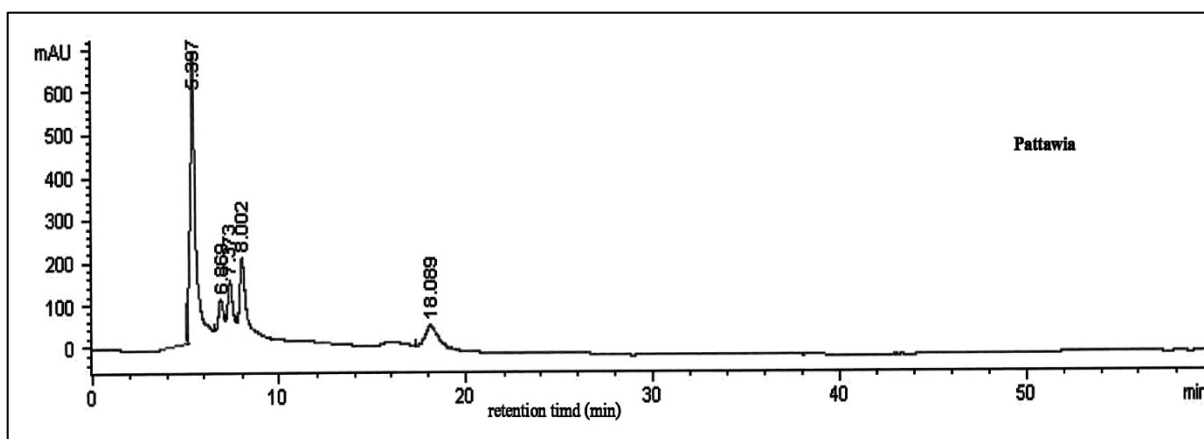
การตรวจหาปริมาณสารสำคัญกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์โดยใช้gallic acid, caffeic acid, catechin, (-)-epicatechin, epigallocatechin, rutin, quercetin และ pyrogallol เป็นสารมาตรฐาน ผลการศึกษาพบว่า

สารสกัดสับปะรดสายพันธุ์นางแลพบสารกลุ่มฟีนอลิกชนิดgallic acid ในปริมาณ 627.5 $\mu\text{g}/1\text{g}$ ของสารสกัด แต่ไม่พบcaffeic acid ส่วนสารกลุ่มฟลาโวนอยด์พบepigallocatechin และ rutin ในปริมาณ 2.05 และ 163.5 $\mu\text{g}/1\text{ g}$ ของสารสกัด ตามลำดับแต่ไม่พบcatechin, (-)-epicatechin, quercetin และ pyrogallol โครมาโทแกรมแสดงดังรูปที่ 4

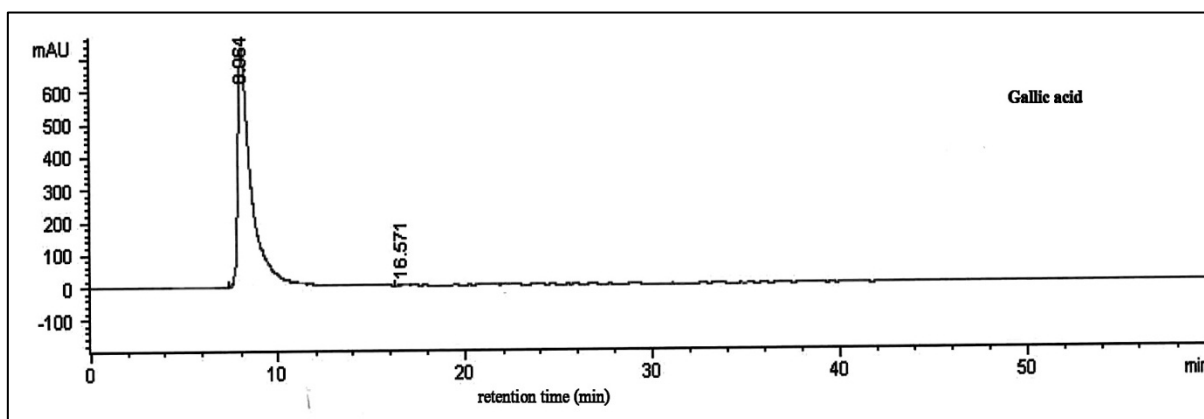
สารสกัดสับปะรดสายพันธุ์ปัตตาเวียพบสารกลุ่มฟีนอลิกชนิดgallic acid ในปริมาณ 860 $\mu\text{g}/1\text{ g}$ ของสารสกัด แต่ไม่พบcaffeic acid ส่วนสารกลุ่มฟลาโวนอยด์พบepigallocatechin และ rutin ในปริมาณ 5.5 และ 220.1 $\mu\text{g}/1\text{ g}$ ของสารสกัด ตามลำดับ แต่ไม่พบcatechin, (-)-epicatechin, quercetin และ pyrogallol โครมาโทแกรมแสดงดังรูปที่ 5

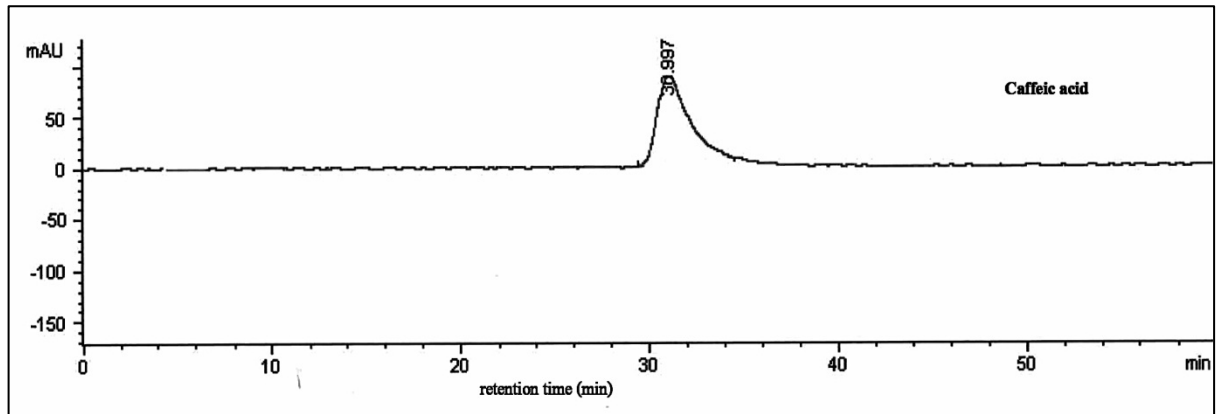


รูปที่ 4 โครมาโทแกรมแสดงชนิดของสารสำคัญกลุ่มฟีนอลิกและกลุ่มฟลาโวนอยด์ในสารสกัดสับปะรดสายพันธุ์นางแลที่ตรวจวิเคราะห์ด้วย HPLC

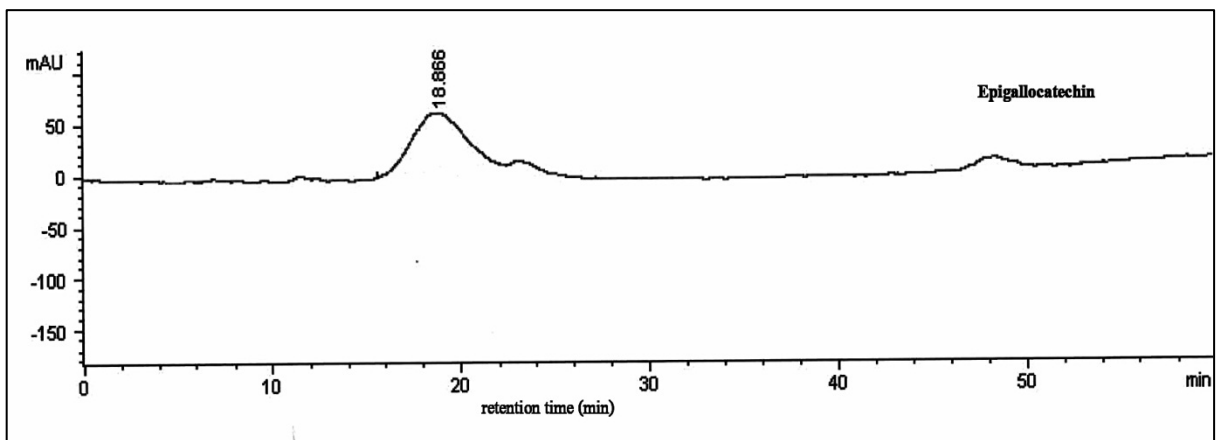


รูปที่ 5 โครมาโทแกรมแสดงชนิดของสารสำคัญกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในสารสกัดสับปะรดสายพันธุ์ปัตตาเวียที่ตรวจวิเคราะห์ด้วย HPLC

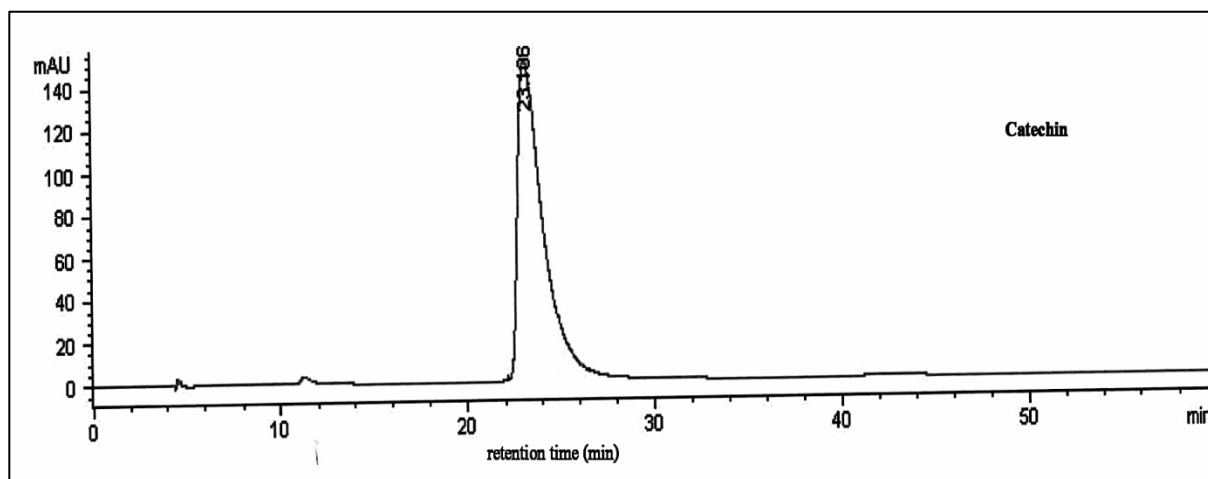




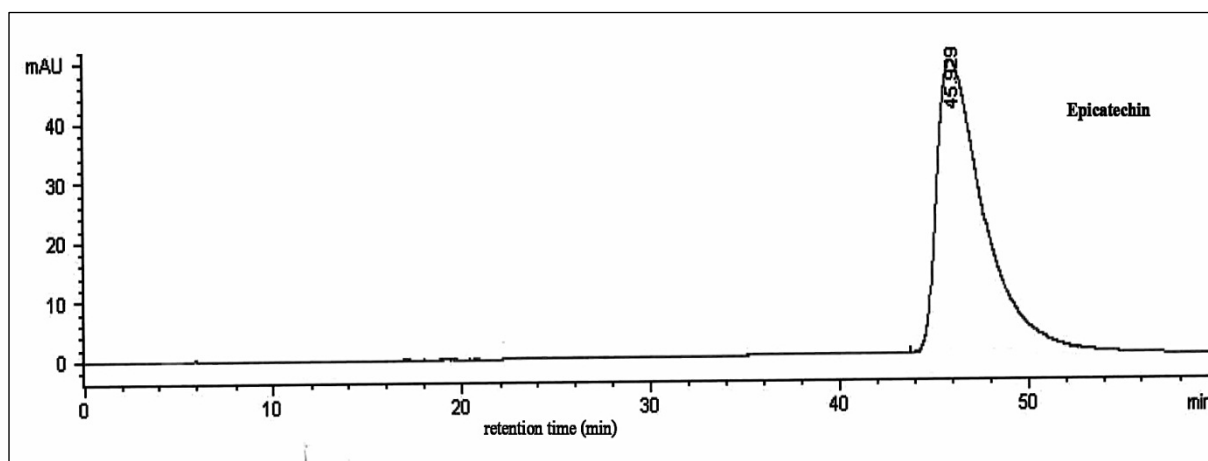
รูปที่ 7 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน caffeic acid



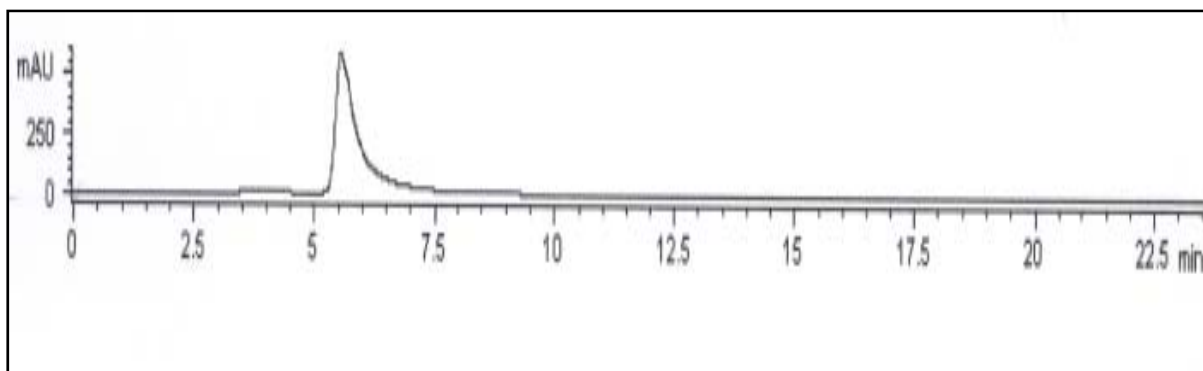
รูปที่ 8 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน epigallocatechin



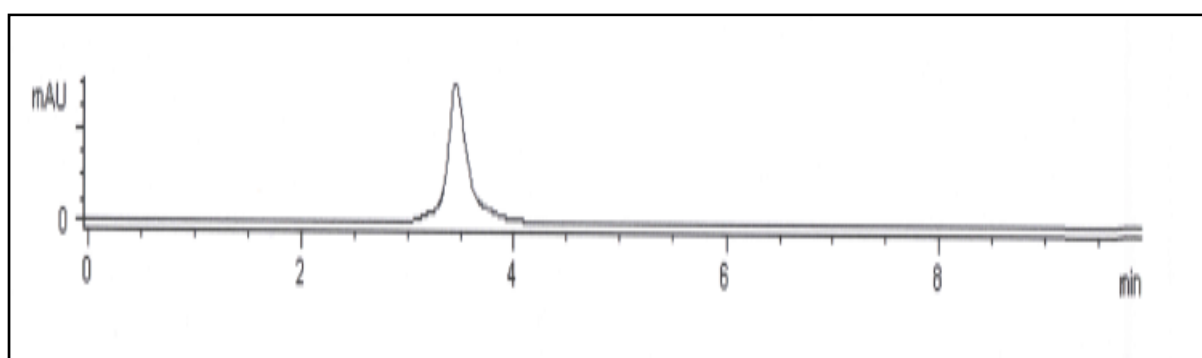
รูปที่ 9 โคโรมาโทแกรมของสารมาตรฐาน catechin



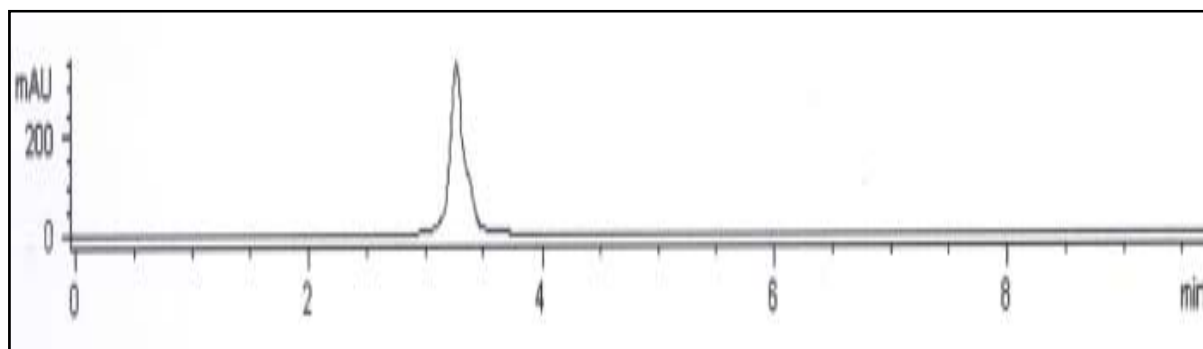
รูปที่ 10 โคโรมาโทแกรมของสารมาตรฐาน epicatechin



รูปที่ 11 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน Rutin



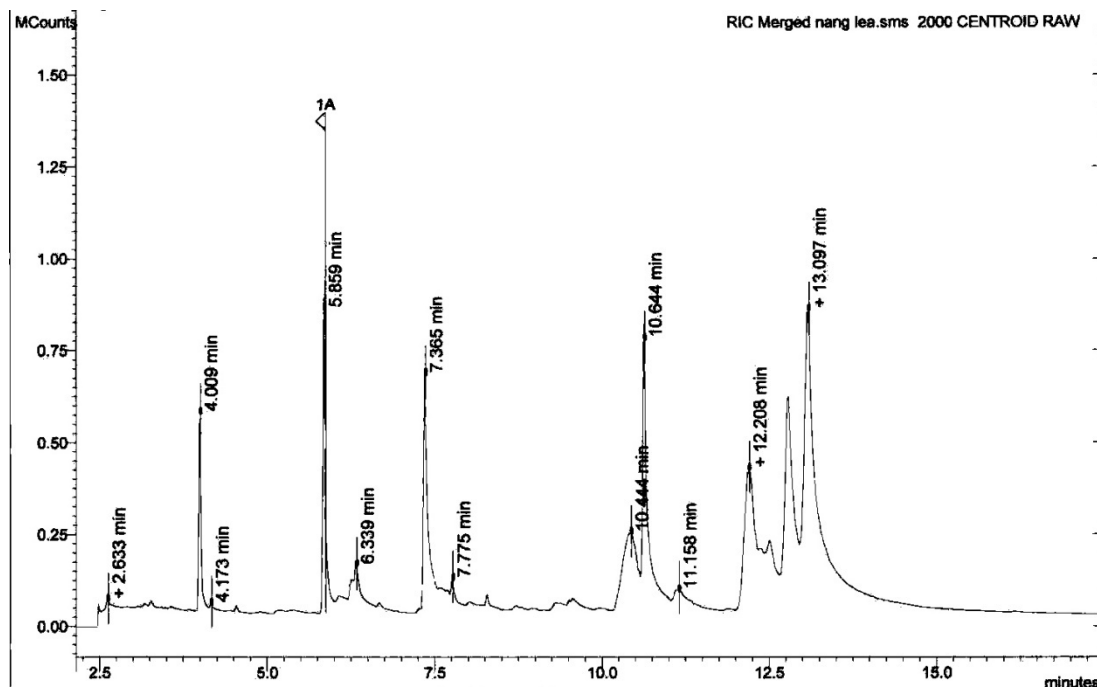
รูปที่ 12 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน Quercetin



รูปที่ 13 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน Pyrogallol

ผลการวิเคราะห์หาสารสำคัญด้วยเครื่อง GC-MS

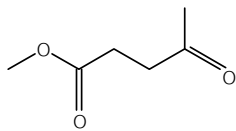
เมื่อนำสารสกัดสับปะรดสายพันธุ์นางแลและปัตตาเวียไปตรวจวิเคราะห์หาสารสำคัญด้วย GC-MS โครมาโทแกรมแสดงดังรูปที่ 14 และ 16 ตามลำดับและชนิดของสารสำคัญแสดงดังตารางที่ 7 และ 8 ตามลำดับ



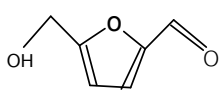
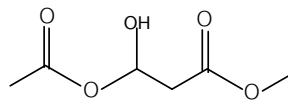
รูปที่ 14 โครมาโทแกรม GC-MS ของสับปะรดสายพันธุ์นางแล

ตารางที่ 7 สารสำคัญที่ได้จากการวิเคราะห์ สารสกัดสับปะรดสายพันธุ์นางแลด้วยเทคนิค GC-MS

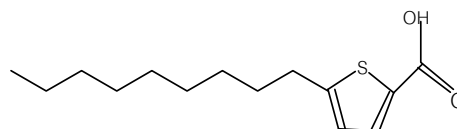
Retention time (นาที)	ชื่อสาร
4.009	Methyl levulinate
5.859	Butanedioic acid
7.365	5-Hydroxymethylfurfural
8.200	5-Nonylthiophene-2-carboxylic acid
9.571	E-8-methyl-9-tetradecan-1-ol acetate
10.444	α -D-Glucopyranoside
10.644	Citric acid
11.158	D-Maltose
12.208	α -Methyl-l-sorbose
12.842	β -d-Methyl-mannofuranoside
13.097	β -d-Methyl-mannofuranoside



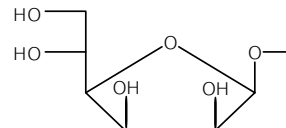
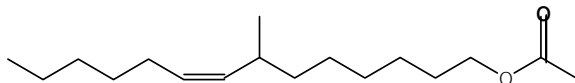
Methyl levulinate



5- Hydroxymethyl furfural

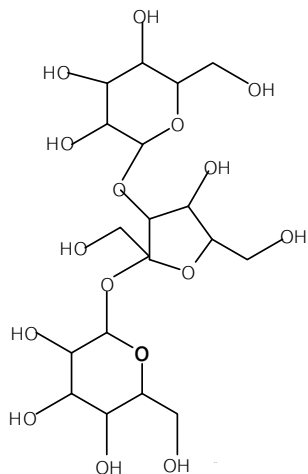


5- nonylthiophene-2carboxylic acid

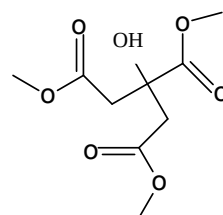


E-8-Methyl-9-tetradecen-1-ol acetate β -d-Methyl-mannofuranoside

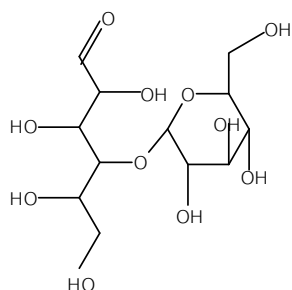
รูปที่ 15 โครงสร้างสารสำคัญที่ได้จากการวิเคราะห์ สารสกัดสับปะรดสายพันธุ์นางแลด้วย GC-MS



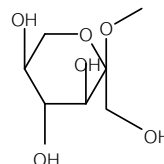
α -D-Glucopyranoside



Citric acid

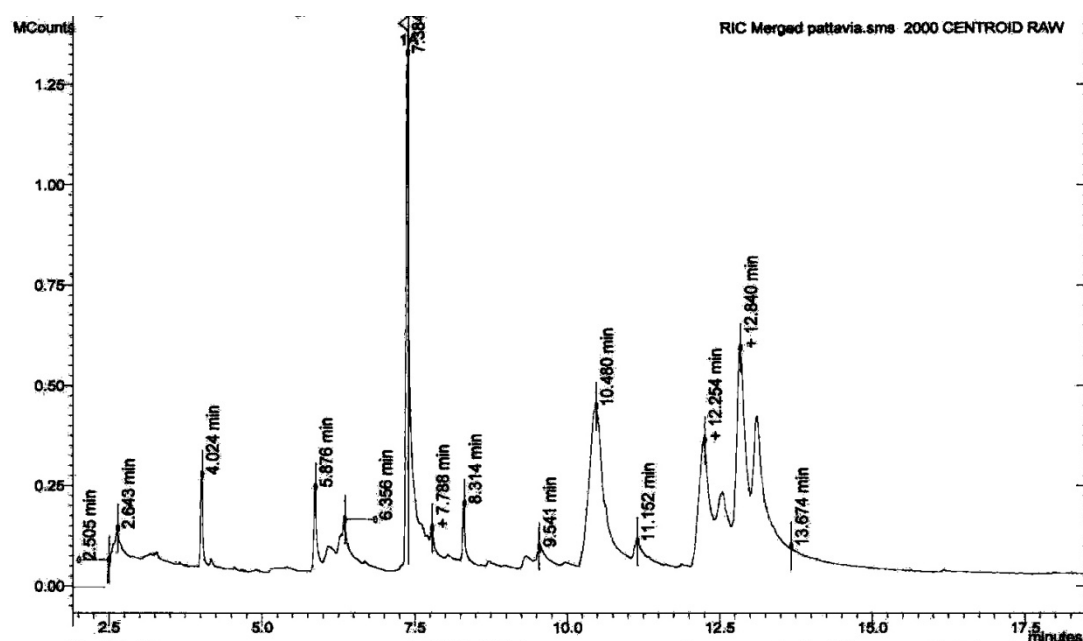


D-Maltose



α -Methyl-l-sorbose

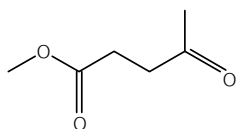
รูปที่ 15(ต่อ) โครงสร้างสารสำคัญที่ได้จากการวิเคราะห์ สารสกัดสับปะรดสายพันธุ์นางแลด้วย GC-MS



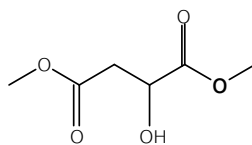
รูปที่ 16 โครมาโทแกรม GC-MS ของสับปะรดสายพันธุ์ปัตตาเวีย

ตารางที่ 8 สารสำคัญที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดสับปะรดสายพันธุ์ปัตตาเวียด้วยเทคนิค GC-MS

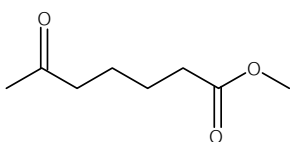
Retention time (นาที)	ชื่อสาร
4.024	Pentanoic acid
5.876	Dimethyl malate
6.356	Methyl-6- oxoheptanoate
7.384	5- Hydroxymethylfurfural
7.788	6-Acetyl- β -d-mannose
8.314	6-Acetyl- β -d-mannose
9.541	N-carboxyhydrazide
10.480	α -D-Glucopyranoside
11.152	α -D-Glucopyranoside
12.245	α -Methyl-l-sorbose
12.840	β -d-Glucopyranose



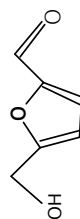
Pentanoic acid



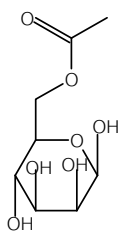
Dimethyl malate



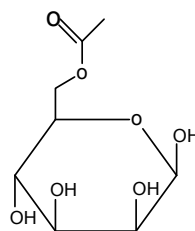
Methyl-6-oxoheptanoate



5-Hydroxymethylfurfural

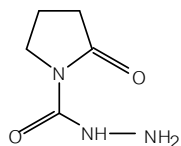


6-Acetyl- β -D-mannose

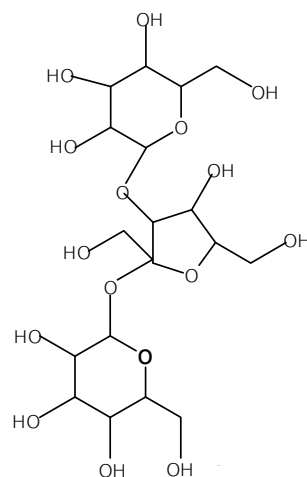


6-Acetyl- β -D-mannose

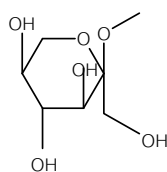
รูปที่ 17 โครงสร้างสารสำคัญที่ได้จากการวิเคราะห์ สารสกัดสับปะรดสายพันธุ์ปัตตาเวียด้วย GC-MS



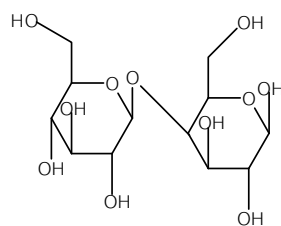
N-carboxyhydrazide



α -D-Glucopyranoside



α -Methyl-I-sorboside β -d-Glucopyranose



รูปที่ 17(ต่อ) โครงสร้างสารสำคัญที่ได้จากการวิเคราะห์ สารสกัดสับปะรดสายพันธุ์ปัตตาเวีย
ด้วย GC-MS

4.5 การเตรียมไมโครโซมของมนุษย์

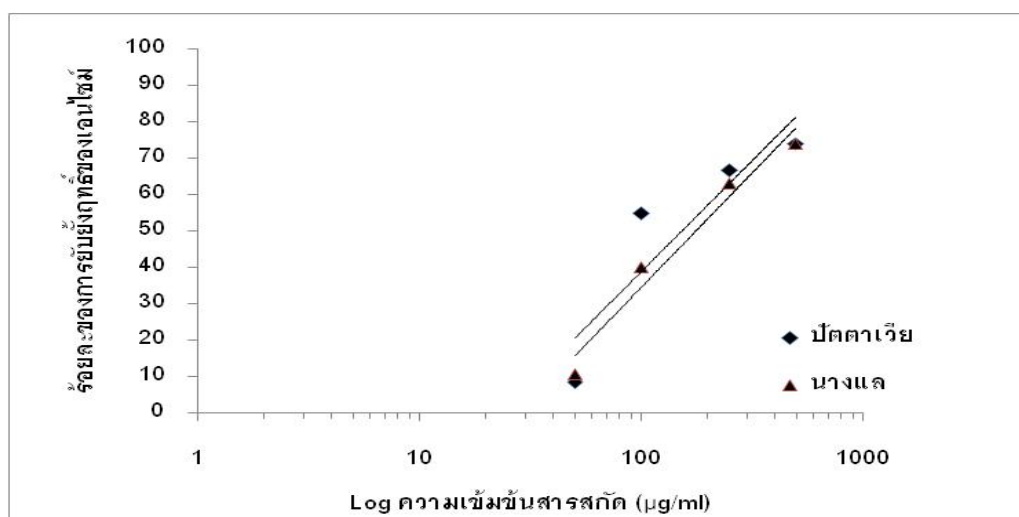
ได้เตรียมไมโครโซมจากตับศพชายไทยจำนวน 9 คน ที่ส่วนใหญ่เสียชีวิตด้วยอุบัติเหตุเพื่อใช้ทดสอบฤทธิ์ของเอนไซม์ไซโตโครมพี450 แล้วรายละเอียดของตัวอย่างจากตับศพที่ใช้เตรียมไมโครโซมแสดงดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 รายละเอียดของตัวอย่างตับจากศพ

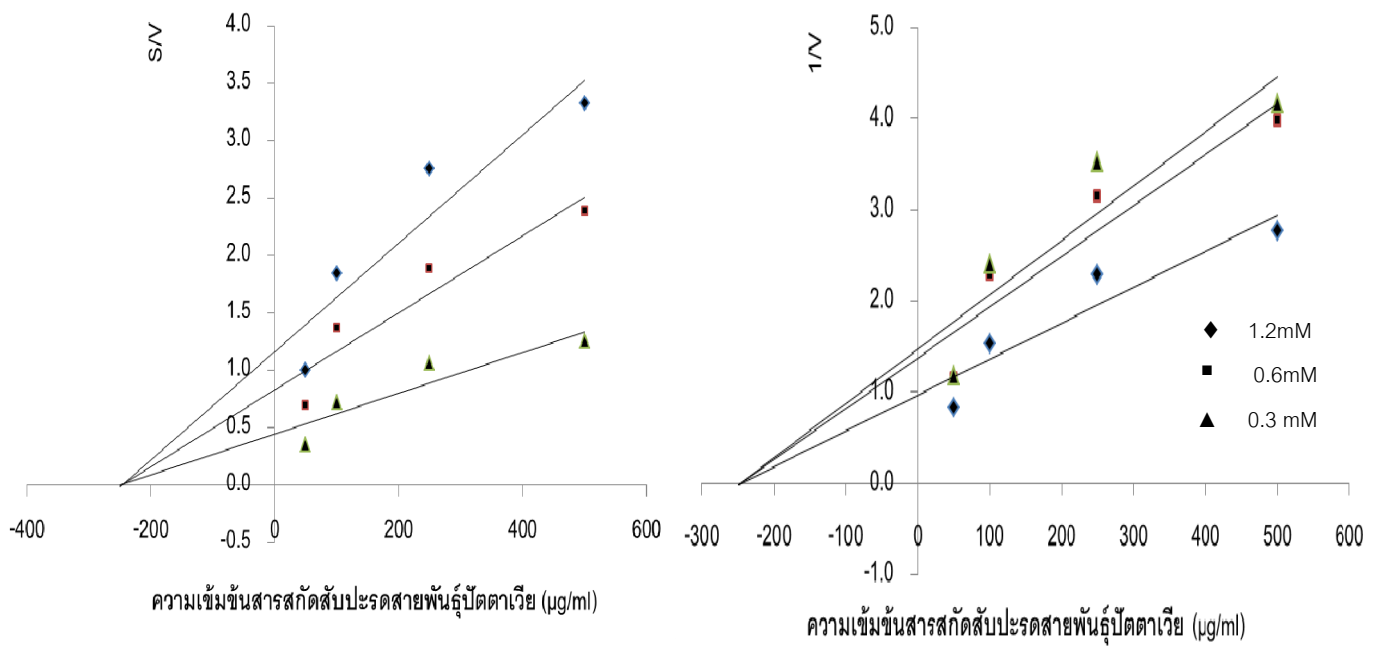
รหัส	อายุ (ปี)	เพศ	สาเหตุการตาย
120810	31	ชาย	อุบัติเหตุ
120042	22	ชาย	อุบัติเหตุ
120043	42	ชาย	ยิงกันตาย
120049	30	ชาย	อุบัติเหตุ
120048	45	ชาย	อุบัติเหตุ
120054	23	ชาย	อุบัติเหตุ
120059	42	ชาย	อุบัติเหตุ
120065	24	ชาย	อุบัติเหตุ
120068	25	ชาย	อุบัติเหตุ

4.6 ผลการศึกษาฤทธิ์และกลไกการยับยั้งไซโตโครมพี450 (CYP)

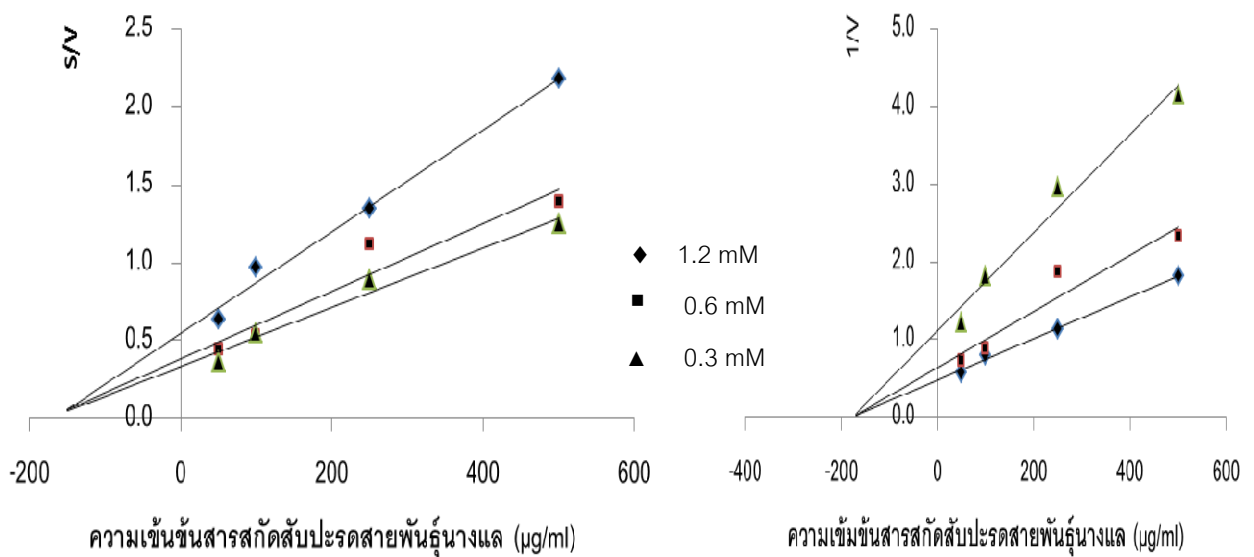
4.6.1 ผลของสารสกัดตับประรดต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ CYP2E1



รูปที่ 18 ค่าร้อยละของการยับยั้งฤทธิ์ของเอนไซม์CYP2E1 ของสารสกัดตับประรดพันธุ์นางแลและพันธุ์ปัสคาเวีย โดยใช้ p-nitrophenol ความเข้มข้น 0.3mM



รูปที่ 19 Cornish-Bowden plot และ Dixon plot ผลของสารสกัดสับปะรดสายพันธุ์ปัตตาเวียต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ CYP2E1

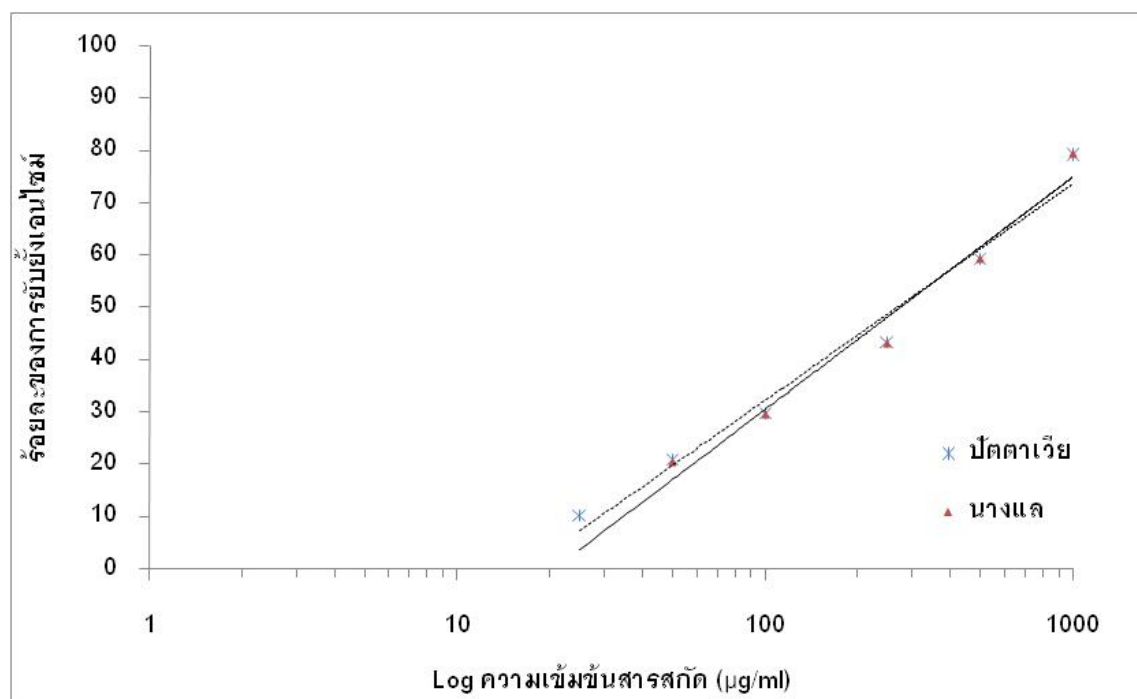


รูปที่ 20 Cornish-Bowden plot และ Dixon plot ผลของสารสกัดสับปะรดสายพันธุ์นางแลต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ CYP 2E1

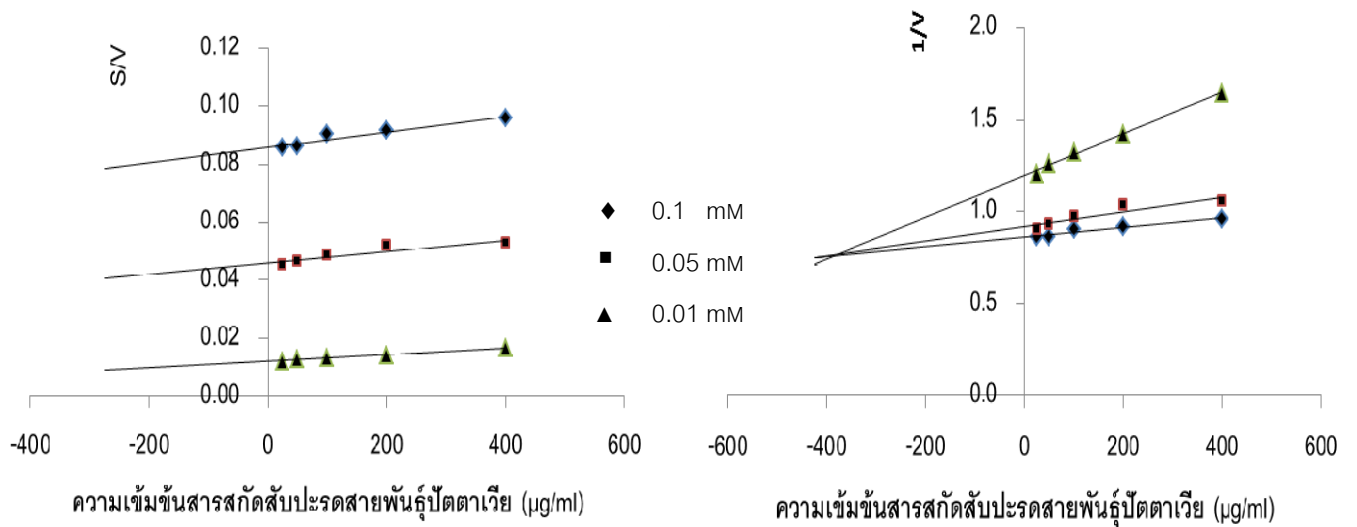
สารสกัดสับปะรดสายพันธุ์ปัตตาเวียและนางแลเมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต่อเอนไซม์ CYP2E1 พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) มีค่าเท่ากับ 152.41 $\mu\text{g/ml}$ (1.47mg ของน้ำหนัสด/ml) และ 177.13 $\mu\text{g/ml}$ (3.10 mg ของน้ำหนัสด/ml) ตามลำดับ ผลแสดงในรูปที่ 18

เมื่อพิจารณากลไกการยับยั้งฤทธิ์ของเอนไซม์ CYP2E1 ของสารสกัดสับปะรดสายพันธุ์ปัตตาเวียและนางแล โดยใช้ความสัมพันธ์ Cornish-Bowden วาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารตั้งต้น(S)/อัตราเร็วของปฏิกิริยา (V) กับ ความเข้มข้นสารสกัดสับปะรด (50,100,250 500 $\mu\text{g/ml}$)และความสัมพันธ์ Dixon จากวาดกราฟระหว่าง $1/V$ และความเข้มข้นสารสกัดสับปะรดโดยใช้ความเข้มข้นของสารตั้งต้น p-nitrophenol ตั้งแต่ 0.3mM ถึง 1.2 mM พบว่าสารสกัดสับปะรดสายพันธุ์ปัตตาเวียและสายพันธุ์นางแลยับยั้งฤทธิ์ของเอนไซม์ CYP2E1 แบบไม่แข่งขัน(Non-competitive inhibition) ผลแสดงในรูปที่ 19 และ 20

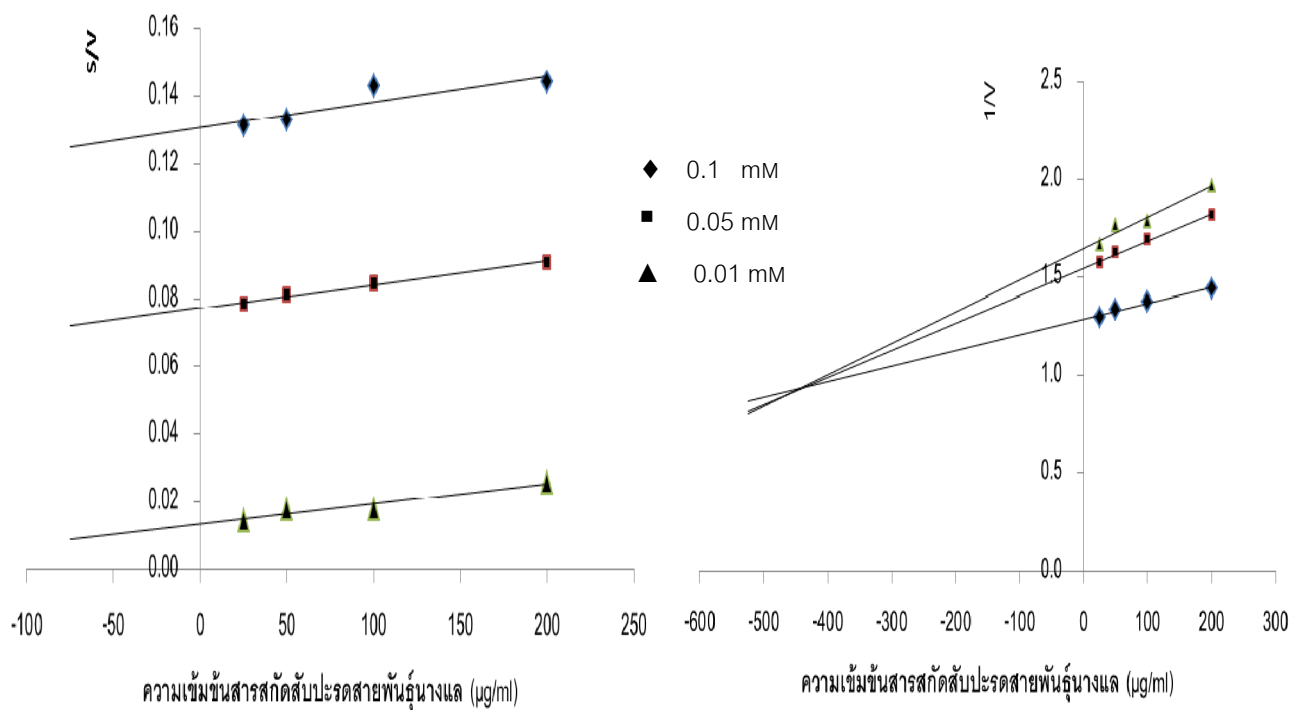
4.6.2 ผลของสารสกัดสับปะรดต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ CYP1A2



รูปที่ 21 ค่าร้อยละของการยับยั้งฤทธิ์ของเอนไซม์ CYP1A2 ของสารสกัดสับปะรดพันธุ์นางแลและพันธุ์ปัตตาเวีย โดยใช้ phenacetin ความเข้มข้น 0.1mM



รูปที่ 22 Cornish-Bowden plot และ Dixon plot ผลของสารสกัดสับปะรดสายพันธุ์ปัตตาเวียต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ CYP1A2

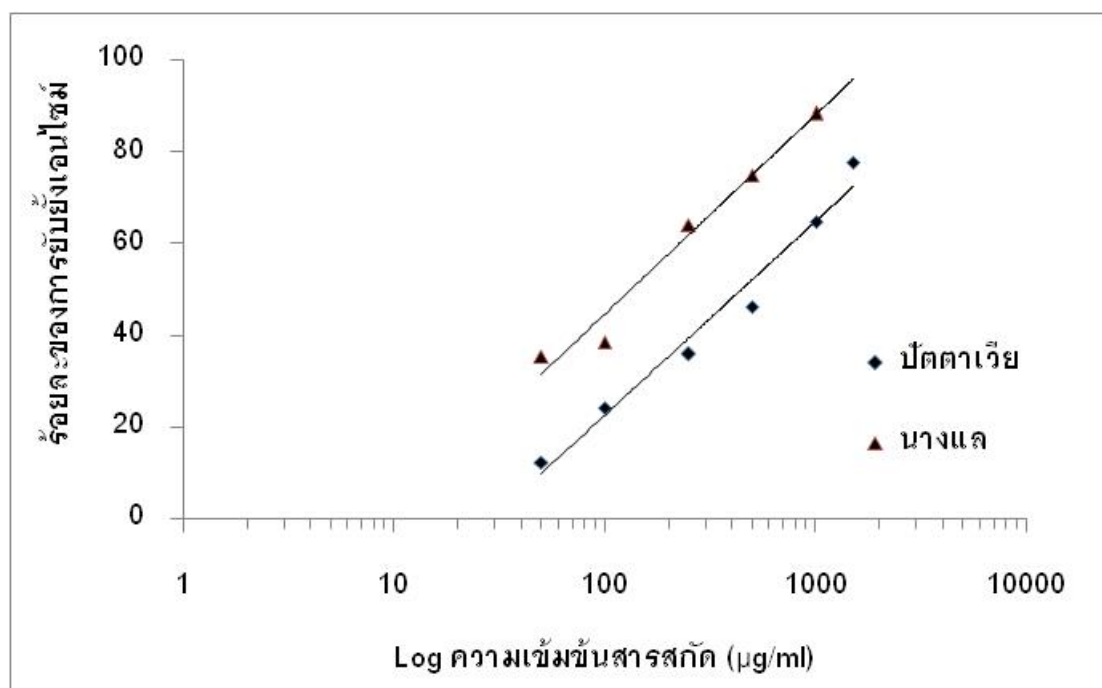


รูปที่ 23 Cornish-Bowden plot และ Dixon plot ผลของสารสกัดสับปะรดสายพันธุ์นางแลต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ CYP1A2

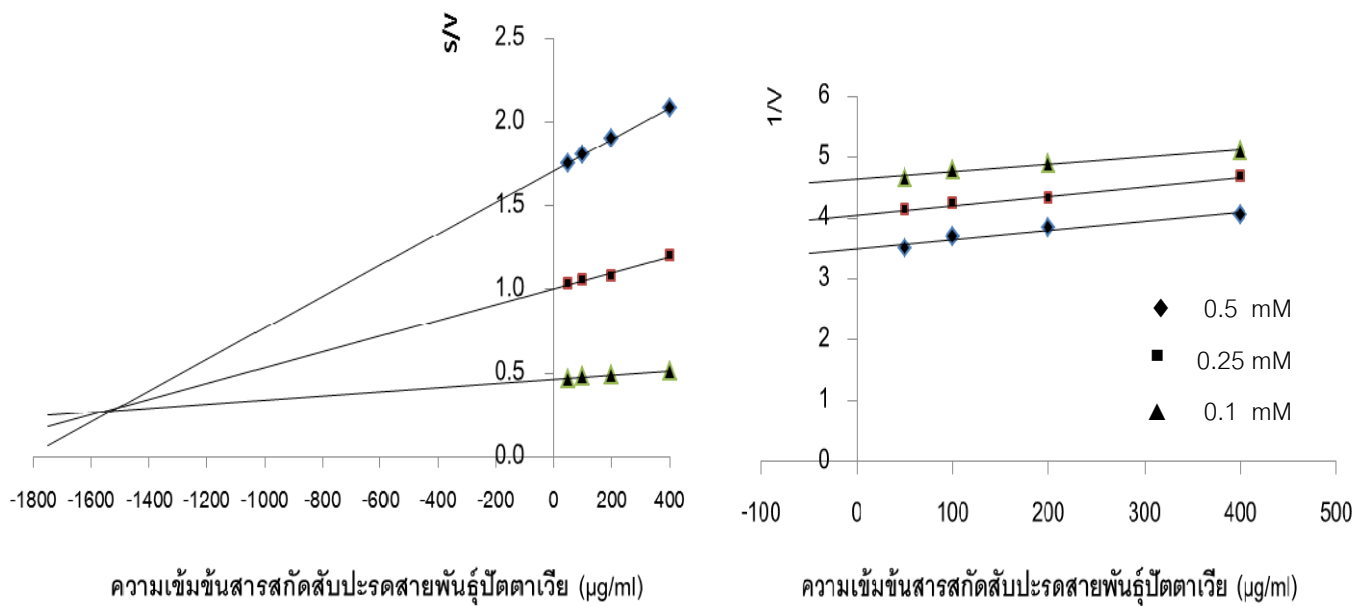
สารสกัดสับปะรดสายพันธุ์ปัตตาเวียและนางแล เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต่อเอนไซม์CYP1A2 พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) มีค่าเท่ากับ 266.87 $\mu\text{g/ml}$ (2.58mg ของน้ำหนัสด/ml) และ 274.98 $\mu\text{g/ml}$ (4.81 mgของน้ำหนัสด/ml) ตามลำดับ ผลแสดงในรูปที่ 2

เมื่อพิจารณาการยับยั้งฤทธิ์ต่อเอนไซม์CYP1A2ของสารสกัดสับปะรดสายพันธุ์ปัตตาเวียและนางแลในความเข้มข้น (25, 50,100,200, 400 $\mu\text{g/ml}$) โดยใช้ความสัมพันธ์Cornish-Bowden และความสัมพันธ์ Dixon โดยใช้ความเข้มข้นของ phenacetinระหว่าง 0.01 ถึง 0.1mM พบว่าสารสกัดสับปะรดสายพันธุ์ปัตตาเวียและนางแลยับยั้งฤทธิ์ต่อเอนไซม์CYP1A2 แบบแข่งขัน (Competitive inhibition)ผลแสดงในรูปที่ 22และ 23

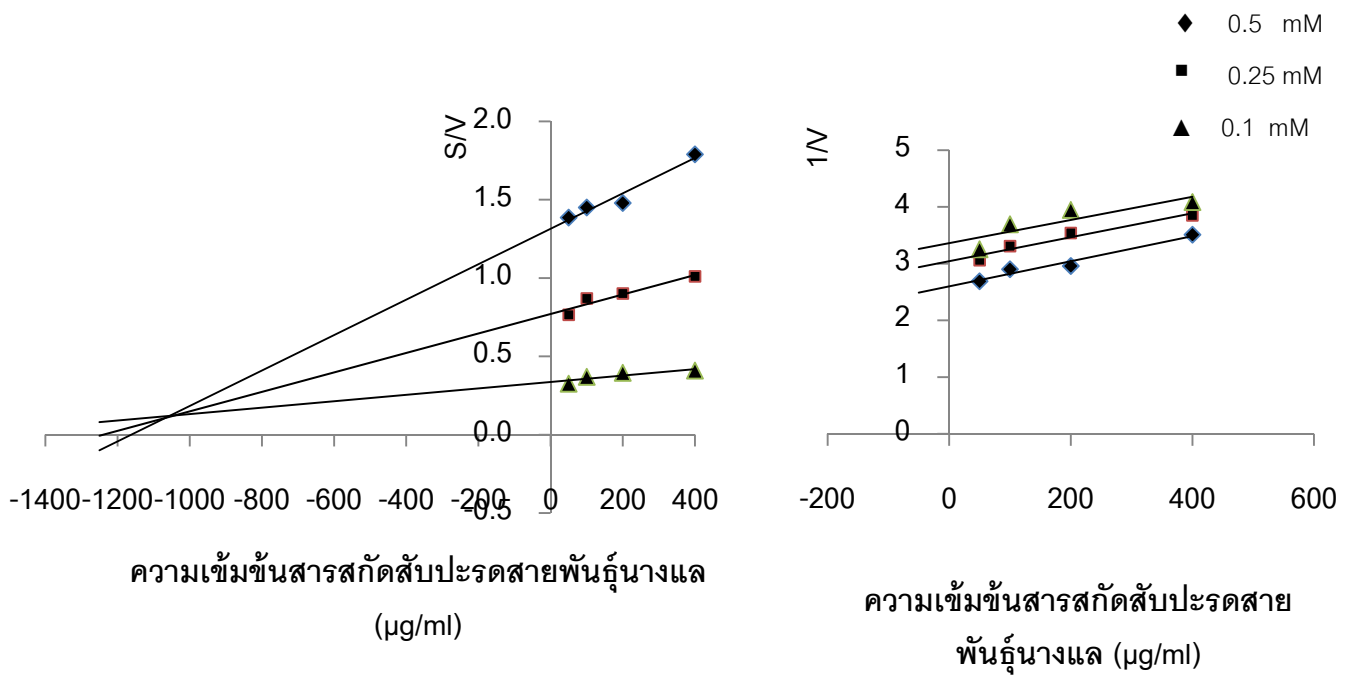
4.6.3 ผลของสารสกัดสับปะรดต่อฤทธิ์ของเอนไซม์CYP2D6



รูปที่ 24 ค่าร้อยละของการยับยั้งฤทธิ์ของเอนไซม์CYP2D6 ของสารสกัดสับปะรดพันธุ์นางแลและพันธุ์ปัตตาเวีย โดยใช้codeine ความเข้มข้น 0.1 mM



รูปที่ 25 Cornish-Bowden plot และ Dixon plot ผลของสารสกัดสับปะรดสายพันธุ์ปัตตาเวียต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ CYP2D6



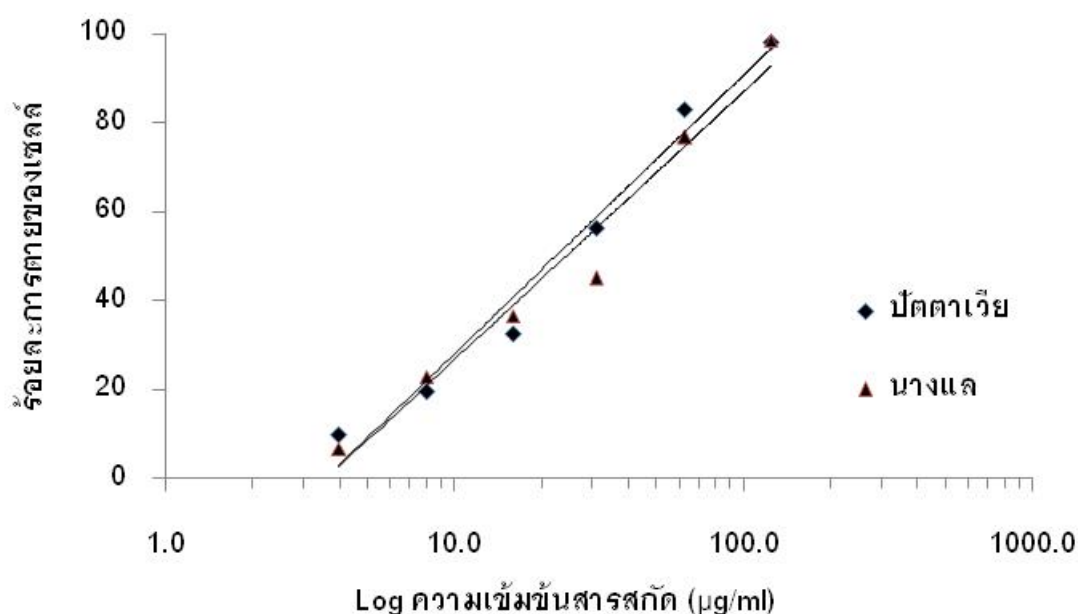
รูปที่ 26 Cornish-Bowden plot และ Dixon plot ผลของสารสกัดสับปะรดสายพันธุ์นางแลต่อฤทธิ์ของเอนไซม์ CYP2D6

สารสกัดสับปะรดสายพันธุ์นางแลและปัตตาเวียเมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต่อเอนไซม์CYP2D6 พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) มีค่าเท่ากับ 132.46 $\mu\text{g/ml}$ (1.28mg ของน้ำหนักสด/ml) และ 445.04 $\mu\text{g/ml}$ (7.78mg ของน้ำหนักสด/ml) ตามลำดับ ผลแสดงในรูปที่24

เมื่อพิจารณาการยับยั้งฤทธิ์ต่อเอนไซม์CYP2D6ของสารสกัดสับปะรดสายพันธุ์ปัตตาเวียและนางแลในความเข้มข้น (50,100,200, 400 $\mu\text{g/ml}$) โดยใช้ความสัมพันธ์ Cornish-Bowden และ Dixon โดยใช้ความเข้มข้นของcodeineระหว่าง0.1 ถึง0.5mM พบว่า สารสกัดสับปะรดสายพันธุ์นางแลและปัตตาเวียยับยั้งเอนไซม์CYP2D6 แบบไม่แข่งขัน (Uncompetitive inhibition) ผลแสดงในรูปที่ 25และ26

4.7 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสับปะรดต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2

ในการศึกษานี้ได้นำเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการแบ่งเซลล์ของสารสกัดสับปะรด พบว่าค่าความสามารถในการยับยั้งการแบ่งเซลล์ของสารสกัดที่ร้อยละ 50(IC_{50}) ของสารสกัดสับปะรดสายพันธุ์ปัตตาเวียและนางแล มีค่า 22.40 และ 24.28 $\mu\text{g/ml}$ (0.22 และ 0.42 mg ของน้ำหนักสด/ml) ตามลำดับ สารสกัดสับปะรดทั้งสองสายพันธุ์มีความเป็นพิษต่อเซลล์สูงสุดร้อยละ 98 ที่ความเข้มข้น 125 $\mu\text{g/ml}$ ดังแสดงในรูปที่ 27



รูปที่27 ความเป็นพิษของสารสกัดสับปะรดต่อเซลล์มะเร็งHepG2

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไซโตโครมพี450 ชนิด 2E1, 2D6 และ 1A ของสารสกัดสับปะรดสายพันธุ์ปัตตาเวียและสายพันธุ์นางแล รวมทั้งหากกลุ่มสารสำคัญ และศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งด้วย ทั้งนี้เนื่องจากการยับยั้งเอนไซม์ไซโตโครมพี450 ที่เกี่ยวข้องกับการแปรสภาพสารให้กลายเป็นสารก่อมะเร็ง จะมีผลยับยั้งการก่อมะเร็งในขั้นเริ่มต้น (initiation) ส่วน การต้านอนุมูลอิสระจะมีผลยับยั้งการก่อมะเร็งในขั้นส่งเสริม (promotion) สำหรับการเกิดพิษต่อเซลล์มะเร็งจะมีผลต่อเซลล์มะเร็งในขั้นตอนการเพิ่มจำนวน (proliferation) (Gerhauser *et al.* 2003)

ในการศึกษานี้พบว่าสารสกัดสับปะรดทั้งสองสายพันธุ์ประกอบด้วยสารสำคัญกลุ่มโพลีฟีนอล โดยสารสกัดสับปะรดสายพันธุ์นางแลมีปริมาณรวมของฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์น้อยกว่าสายพันธุ์ปัตตาเวีย ปริมาณรวมของฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่ได้จากสับปะรดสายพันธุ์ปัตตาเวีย มีค่าเท่ากับ 25.01 มิลลิกรัมที่เทียบเท่ากับgallic acid/ น้ำหนักสับปะรดสด 100 กรัมและ 2.97 มิลลิกรัมที่เทียบเท่ากับquercetin/ น้ำหนักสับปะรดสด 100 กรัม ตามลำดับ ส่วนปริมาณรวมของฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่ได้จากสับปะรดสายพันธุ์นางแลในภาคเหนือของประเทศไทย มีค่าเท่ากับ 11.72 มิลลิกรัมที่เทียบเท่ากับgallic acid/ น้ำหนักสับปะรดสด 100 กรัมและ 1.68 มิลลิกรัมที่เทียบเท่ากับquercetin/ น้ำหนักสับปะรดสด 100 กรัม ตามลำดับ เมื่อเทียบปริมาณสารกลุ่มโพลีฟีนอลกับสับปะรดจากประเทศอื่น จากการศึกษาของ Alothmanและคณะ (2009)พบปริมาณรวมของฟีนอลิกในสารสกัดสับปะรดของประเทศมาเลเซียที่สกัดด้วยเอธานอล 70% ได้ 54.7 มิลลิกรัมที่เทียบเท่ากับgallic acid/ น้ำหนักสับปะรดสด 100 กรัม ส่วนปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์ได้ 4.14 มิลลิกรัมที่เทียบเท่ากับcatechin/ น้ำหนักสับปะรดสด 100 กรัม ทั้งนี้อาจเนื่องจากความแตกต่างของลักษณะภูมิประเทศ ภูมิอากาศ รวมถึงปริมาณแร่ธาตุในดินที่อาจส่งผลต่อปริมาณสารสำคัญได้แต่เมื่อเทียบกับงานวิจัยของ Chatuphonprasertและ Jarukamjorn(2012)ที่รายงานปริมาณรวมของฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ของน้ำสับปะรดสายพันธุ์ศรีราชา(ปัตตาเวีย)เท่ากับ 2.53มิลลิกรัมที่เทียบเท่ากับgallic acid/ น้ำหนักผงสับปะรดแห้ง1กรัมและ 0.55มิลลิกรัมที่เทียบเท่ากับquercetin/ น้ำหนักสับปะรดแห้ง1กรัม เมื่อเทียบกับการศึกษานี้ที่ได้น้ำหนักผงสับปะรดแห้ง1กรัมจาก น้ำหนักสับปะรดสด10 กรัมจะเห็นว่าปริมาณรวมของฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ของสับปะรดสายพันธุ์ปัตตาเวีย (ศรีราชา)มีค่าใกล้เคียงกัน

เมื่อวิเคราะห์หาสารสำคัญในสารสกัดสับปะรดพันธุ์นางแล และ พันธุ์ปัตตาเวียโดยใช้ HPLC พบสารสำคัญ สามชนิด คือ gallic acid rutinและ epigallocatechinโดยสารสำคัญทั้งสามชนิดพบ

เมื่อนำสารสกัดสับปะรดที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย GC-MS พบสารที่ให้กลิ่นเช่น methyl levulinate และกลุ่มน้ำตาลเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Umano และคณะ(1992) ที่พบสารหอมระเหย 127 ชนิดในสับปะรดซึ่งประกอบด้วย ethyl acetate และ butane-2,3-diol diacetate เป็นส่วนใหญ่

ในการศึกษาฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระได้ใช้วิธีวิเคราะห์ สามวิธี วิธีแรกเป็นการวิเคราะห์อนุมูล DPPH ซึ่งเป็นอนุมูลเป็นที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ เนื่องจาก DPPH มีความเสถียร สะดวกต่อการตรวจวัดและแปลผลการทดสอบได้ง่าย โดย DPPH จะเปลี่ยนจากสารสีม่วงเป็นสีเหลืองเมื่อถูกรีดิวซ์ โดยอนุมูล DPPH มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรถ้าค่าการดูดกลืนแสงน้อยลงแสดงว่าสารที่นำมาทดสอบมีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระหรือให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระได้มาก (Su *et al.*, 2008) จากผลการวิจัยพบว่าประสิทธิภาพการกำจัดอนุมูล DPPH ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัดสับปะรดเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลจะสูงขึ้นด้วย สารสกัดสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียมีฤทธิ์กำจัดอนุมูล DPPH ได้สูงสุดร้อยละ 95.1 ที่ความเข้มข้น 400 µg/ml สำหรับสารสกัดสับปะรดสายพันธุ์นางแลกำจัดอนุมูล DPPH ได้สูงสุดร้อยละ 92.7 ที่ความเข้มข้น 600 µg/ml เมื่อพิจารณาค่าความเข้มข้นที่สามารถการกำจัดอนุมูล DPPH ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ของสารสกัดสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียมีค่า 77.5 µg/ml ส่วน IC_{50} ของสารสกัดสับปะรดพันธุ์นางแลมีค่า 142.5 µg/ml ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารออกฤทธิ์กลุ่มโพลีฟีนอลในสับปะรดสายพันธุ์ปัตตาเวียที่มีปริมาณมากกว่าสับปะรดสายพันธุ์นางแล จึงมีผลทำให้ประสิทธิภาพการกำจัดอนุมูล DPPH ของสับปะรดสายพันธุ์ปัตตาเวียสูงกว่าสับปะรดสายพันธุ์นางแล ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Khan และคณะ(2012) ที่พบว่าฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH มีความสัมพันธ์มากกับปริมาณรวมของฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ($R^2 = 0.9762$ และ 0.8843 ตามลำดับ)

วิธีที่สองในการวัดฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระในการศึกษานี้ใช้วิธีวิเคราะห์อนุมูล superoxide ซึ่ง superoxide เป็นอนุมูลที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ ก่อให้เกิด hydroperoxy, hydroxyl, hydrogen peroxide หรือ nitric oxide จากปฏิกิริยาถูกใช้โดยทำปฏิกิริยากับสารต่างๆภายในเซลล์ ความเป็นพิษของอนุมูล superoxide นั้นเกิดจากการที่อนุมูลเองหรืออนุมูลอื่นๆ ทำลายสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์เช่น ลิพิด โปรตีน และ ดีเอ็นเอ การยับยั้งการเกิดอนุมูล superoxide นั้นจะช่วยป้องกันอันตรายจากอนุมูลอิสระได้ (Ley *et al.*, 1982) จากการศึกษาพบว่าฤทธิ์การกำจัดอนุมูล superoxide ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัดสับปะรดในช่วงความเข้มข้น 0.39 - 6.25 µg/ml พบว่าสารสกัดสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลสูงกว่าสารสกัดสับปะรดพันธุ์นางแล เมื่อเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นที่สามารถกำจัดอนุมูล superoxide ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ของสารสกัดสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียมีค่า 4.54 µg/ml ส่วนสาร

สำหรับวิธีที่สามที่ใช้ วัดฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดสับปะรดคือ การกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์โดยเปลี่ยนเป็นอนุมูลไฮดรอกซิลแล้วไปจับกับชีวโมเลกุลทำให้เนื้อเยื่อถูกทำลายและเซลล์ตายจากการวิจัยนี้พบว่าประสิทธิภาพการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัดสับปะรด เช่นเดียวกับการกำจัดอนุมูล superoxide และ DPPH สารสกัดสับปะรดทั้งสองสายพันธุ์มีฤทธิ์การกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ใกล้เคียงกัน เมื่อทดสอบโดยใช้ความเข้มข้นในช่วง 12.5 -400 µg/ml ค่าความเข้มข้นที่สามารถกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ของสารสกัดสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียและพันธุ์นางแลมีค่าเท่ากับ 123.03 และ 126.02 µg/ml ตามลำดับข้อมูลที่ได้อาจบ่งชี้ว่าปริมาณสารกลุ่มโพลีฟีนอลในสารสกัดสับปะรดทั้งสองสายพันธุ์มีความสัมพันธ์ในระดับน้อยกับประสิทธิภาพของการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของKhan และคณะ (2012) ที่พบว่าฤทธิ์ในการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีความสัมพันธ์น้อยมากกับปริมาณรวมของฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ($R^2 = 0.1223$ และ 0.1056 ตามลำดับ)

ไซโตโครมพี 450 (CYP) เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการแปรสภาพยาและสารแปลกปลอมต่างๆ โดยเฉพาะการกระตุ้นให้เกิดสารก่อมะเร็งซึ่งมีฤทธิ์ในการเข้าจับสารพันธุกรรมหรือสารชีวโมเลกุลต่างๆ ภายในเซลล์ทำให้เกิดการก่อกลายพันธุ์จนเกิดเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุดไซโตโครมพี 450 ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสารก่อมะเร็งได้แก่ CYP 2E1, CYP1A2 และ CYP2D6 การยับยั้งฤทธิ์ของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารก่อมะเร็งจะมีผลป้องกันการก่อมะเร็งในขั้นเริ่มต้น (initiation) ในการวิจัยครั้งนี้ใช้ไมโครโซมที่เตรียมจากตับศพนุชเป็นแหล่งของเอนไซม์และหากกลไกของการยับยั้งโดยใช้ Dixon และ Cornish-Bowden plot

จากการศึกษาพบว่าสารสกัดสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียและนางแลสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2E1 ได้โดยขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ (dose-dependent) โดยคำนวณค่า IC_{50} ได้ 152.41 µg/ml และ 177.13 µg/ml โดยกลไกในการยับยั้งนั้นเป็นแบบไม่แข่งขัน (noncompetitive) คือ เมื่อ เพิ่มความเข้มข้นของสารตั้งต้น (substrate) ขึ้นจะไม่มีผลให้การยับยั้งลดลง เนื่องจาก ตัวยับยั้งและสารตั้งต้น จับคนละตำแหน่งบนเอนไซม์ (Coleman, 2005) การยับยั้งลักษณะนี้จะมีผลต่ออัตราเร็วสูงสุดของการเกิดปฏิกิริยา (V_{max}) โดยไม่เกี่ยวข้องกับความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่ทำให้ปฏิกิริยามีความเร็วเป็นครึ่งหนึ่งของอัตราเร็วสูงสุด (K_m) กลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP 2E1

สำหรับ เอนไซม์ CYP1A2 นั้นพบว่าสารสกัดสับปะรดสายพันธุ์ปัตตาเวียและสายพันธุ์นางแล มีผลยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์ CYP1A2 โดยมีค่า IC_{50} ที่ใกล้เคียงกันมีค่า 266.87 $\mu\text{g/ml}$ และ 274.98 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ และมีกลไกในการยับยั้งเป็นแบบแข่งขัน(competitive) คือเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารตั้งต้นขึ้นจะมีผลให้การยับยั้งลดลงได้ เนื่องจาก ตัวยับยั้งและสารตั้งต้น จับที่ตำแหน่งเดียวกันบนเอนไซม์ (Coleman, 2005) การยับยั้งลักษณะนี้จะไม่มีผลต่อ V_{max} แต่จะมีผลต่อ K_m มีรายงานว่า ฟลาโวนอยด์ ตัวอย่างเช่น chrysin, galangin และ quercetin เป็นตัวยับยั้ง CYP1A2 ที่มีความแรง (Androutsopoulos *et al*, 2010) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า naringin และ naringenin ที่พบใน น้ำเกรพฟรุต มีฤทธิ์ยับยั้ง CYP1A2 ในอาสาสมัครสุขภาพดี (Fuhr *et al*, 1993) มีรายงานว่า epigallocatechin มีฤทธิ์ยับยั้ง CYP1A2 (Wenget *al*. 2012) ดังนั้น epigallocatechin ที่พบในสารสกัดสับปะรดทั้งสองสายพันธุ์อาจเกี่ยวข้องกับการยับยั้ง CYP1A2 ในการศึกษา

ส่วน เอนไซม์ CYP2D6 นั้นพบว่าสารสกัดสับปะรดสายพันธุ์นางแลมีค่า IC_{50} ในการยับยั้ง CYP2D6 ที่น้อยกว่าสายพันธุ์ปัตตาเวีย ประมาณ 3 เท่า 132.46 $\mu\text{g/ml}$ และ 445.04 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ และกลไกในการยับยั้งเป็นแบบไม่แข่งขัน(uncompetitive) คือ ตัวยับยั้งจะเข้าไปจับกับ เอนไซม์ที่จับอยู่กับสารตั้งต้นแล้ว โดยที่ตัวยับยั้งจะไม่สามารถเข้าไปยับยั้งเอนไซม์ที่อยู่เป็นอิสระได้ (Coleman, 2005) การยับยั้งลักษณะนี้จะมีผลต่อทั้ง V_{max} และ K_m ด้วยมีรายงานว่า tangeretin ซึ่งเป็นฟลาโวนอยด์ที่พบในผลไม้ตระกูลส้มมีฤทธิ์ยับยั้ง CYP3A4 ในไมโครโซมตับของมนุษย์ แบบ uncompetitive (Obermeier *et al*. 1995)

ในงานวิจัยนี้ได้แสดงข้อมูลเกี่ยวกับกลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 แต่ยังขาดข้อมูลที่ชัดเจนเกี่ยวกับชนิดของสารออกฤทธิ์ที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการทำงานของไซโตโครม พี 450 ซึ่งจำเป็นต้องทำการศึกษาต่อไปทั้งในหลอดทดลอง สัตว์ทดลองและอาสาสมัครต่อไปเพื่อที่จะได้องค์ความรู้และนำไปสู่การพัฒนาเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ป้องกันมะเร็งต่อไป

ในการวิจัยนี้ได้ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ Hep-G2 เพื่อประเมินผลของสารสกัดสับปะรดต่อเซลล์มะเร็งซึ่งจะเชื่อมโยงผลไปยังขั้นตอนการเพิ่มจำนวน (proliferation) ของเซลล์มะเร็งจากการศึกษาของ Sun และคณะ (2002) ได้ทดสอบ ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง Hep-G2 ของสาร

จากผลการศึกษาทั้งหมดสรุปได้ว่า สารสกัดสับปะรดทั้งพันธุ์ปัตตาเวียและพันธุ์นางแลมีศักยภาพในการต้านมะเร็งโดยมีผลต่อขั้นตอนการเกิดมะเร็งทั้งสามขั้นตอน คือ ในขั้นเริ่มต้น (initiation) โดยมีผลยับยั้งฤทธิ์ของเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสารก่อมะเร็งได้แก่ CYP 2E1, CYP1A2 และ CYP2D6 ส่วนผลต่อการเกิดมะเร็งในขั้นส่งเสริม (promotion) นั้นเกิดจากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สำหรับในขั้นตอนสุดท้ายของการเกิดมะเร็งคือขั้นเพิ่มจำนวน (proliferation) นั้นพบว่าสารสกัดสับปะรดมีพิษต่อเซลล์มะเร็งด้วยจากฤทธิ์ทั้งหมดข้างต้นอาจสรุปได้ว่าสารสกัดสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย น่าจะมีความแรงในการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งได้ดีกว่าสารสกัดสับปะรดพันธุ์นางแล

เอกสารอ้างอิง

1. Alothman M., Rajeev Bhat., Karim AA. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. Food Chemistry. 2009; 115: 785–788.
2. Antolino-Lobo I., Meulenbelt J, Nijmeijer SM. et al. Differential roles of phase I and phase II enzymes in 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced cytotoxicity. Drug Metab Dispos. 2010; 38:1105–1112.
3. Banerjee A., Dasgupta N., De B. In vitro study of antioxidant activity of Syzygium cumini fruit. Food Chem. 2005; 90: 727-33.

4. Boyd, MR. The NCI in vitro anticancer drug discovery screen. In Teicher, B. (Ed.). Anticancer drug development guide; preclinical screening, clinical trials and approval, Human Press, Totowa. 1997. p 30.
5. Breinholt VM., Offord EA., Brouwer C., et al. In vitro investigation of cytochrome P450-mediated metabolism of dietary flavonoids. Food Chem Toxicol. 2002; 40(5): 609-16.
6. Chang CC., Yang MH., Wne HM., Chen JC. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. J. Food Drug Anal. 2002; 10: 178-82.
7. Chatuphonprasert W., and Jarukamjorn K. Impact of six fruits-banana, guava, mangosteen, pineapple, ripe mango and ripe papaya-on murine hepatic cytochrome P450 activities. J. Appl. Toxicol. 2012; on line
8. Chen HY., Yen GC. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity of extracts from guava (*Psidium guajava* L) leaves. Food Chem. 2007; 101: 686-94.
9. Chobotova K., Vernallis AB., Majid FAA. Bromelain's activity and potential as an anti-cancer agent: Current evidence and perspectives. Cancer Letters. 2010; 290: 148–156.
10. Coleman MD. Phase I enzyme inhibition. In Coleman MD (Ed.) Human Drug Metabolism John Wiley & Sons., West Sussex. 2005. 79-83.
11. Cornish-Bowden A. A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors. Biochem J. 1974; 137, 143-4.
12. Dinham B. Prolonged exposure to some agricultural pesticides may increase the risk of lung cancer in agricultural workers. Evidence-based Healthcare & Public Health. 2005; 9(3): 203-5.
13. Dixon M. The determination of enzyme inhibitor constants. Biochem J. 1953 ;55:170–1.
14. Foster, B.C., Vandenhoeck S., Hana J et al. In vitro inhibition of human cytochrome P450-mediated metabolism of marker substrates by natural products. Phytomedicine 2003; 10: 334-42.

15. Fuhr, U., Klittich, K., Staib, A.H., Inhibitory effect of grapefruit juice and its bitter principal, naringenin, on CYP1A2 dependent metabolism of caffeine in man. *Br J Clin Pharm.* 1993; 35:431-6.
16. Gerhauser C, Klimo K, Heiss E., et al. Mechanism-based in vitro screening of potential cancer chemopreventive agents. *Mutat Res.* 2003; 523-524:163-72.
17. Hidaka M., Nagata M., Kawano Y., et al. Inhibitory Effects of Fruit Juices on Cytochrome P450 2C9 Activity in Vitro. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2008; 72 (2): 406–11.
18. Hossain A., Rahman MSM. Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of tropical fruit pineapple. *Food Research International.* 2010;672-6.
19. Hsu JD., Kao SH., Ou TT., Chen YJ., Li YJ., Wang CJ. Gallic acid induces G2/M phase arrest of breast cancer cell MCF-7 through stabilization of p27(Kip1) attributed to disruption of p27(Kip1)/Skp2 complex. *J. Agric. Food Chem.* 2011; 59: 1996-2003.
20. Iyanagi T. Molecular mechanism of phase I and phase II drug-metabolizing enzymes: implications of detoxification. *Int. Rev. Cytol.* 2007; 260: 35-112.
21. Jaikang C., Chaiyasut C., Narongchai P., Niwatananun K., Narongchai S., Kusirisin W. Inhibitory effects of caffeic acid ester analogues on free radicals and human liver microsome CYP1A2 activities. *Med. Chem.* 2011; 7: 99-105.
22. Jaikang C., Niwatananun K., Narongchai S., Narongchai P., Chaiyasut C. Inhibitory effects of caffeic acid and its amide derivatives on human liver microsome P4501A2. *Drug Metab Reviews.* 2009. 41(suppl 2)
23. Ji BC., Hsu WH., Yang JS., Hsia TC., Lu CC., Chiang JH., Yang JL., Lin CH., Lin JJ., Suen LJW., Wood WG., Chung JG. Gallic acid induces apoptosis via caspase-3 and mitochondrion-dependent pathways in vitro and suppresses lung xenograft tumor growth in vivo. *J. Agric. Food Chem.* 2009; 57: 7596-604.
24. Khan RA., Khan MR., Sahreen S., Ahmed M. Evaluation of phenolic contents and antioxidant activity of various solvent extracts of *Sonchus asper* (L.) Hill. *Chemistry Central Journal.* 2012; 6:12-8.
25. Klaassen CD. Ed.. *Casarett&Doull's Toxicology*, 6^{ed}. McGraw-Hill. New York Chicago. 2001, 133-219.

26. Leong L.P., Shui G. Investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets, *Food Chemistry*. 2002; 76: 69–75.
27. Ley K., and Arfors KE. Changes in macromolecular permeability in intravascular generation of oxygen derived free radicals. *Microvascular. Res*. 1982; 24: 25-33.
28. Lin JK., and Liang YC. Cancer chemoprevention by tea polyphenol. *Proc.. Natl. Sci. Counc ROC (B)*. 2000; 24: 1-13.
29. Liu Z., Li D., Niu F. Gallic acid as a cancer-selective agent induces apoptosis in pancreatic cancer cells. *Chemotherapy*. 2012; 58: 185-94.
30. Loeb L A., and Harris CC. Advance in chemical carcinogenesis: A historical review and prospective. *Cancer Res* 2008;68:6863-6872.
31. Mark DC., Belov L., Davey MW., Davey RA., Kidman AD. The MTT cell viability assay for cytotoxicity testing in multidrug resistant human leukemic cells. *Leuk Res*. 1992; 16: 1165-73.
32. McDonald S., Prenzler PD, Antolovich M., Robards K. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chem*. 2001;73: 73-84
33. Moon Y.J., Wang X., Morris M.E. Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicology in Vitro*. 2006; 20: 187-210.
34. Nelson DR., Koymans L., Kamataki T., et al. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetic*. 1996; 6: 1-42.
35. Obermeier MT, White RE, Yang CS. Effects of bioflavonoids on hepatic P450 activities. *Xenobiotica*. 1995 ;25(6):575-84.
36. Sams C., Mason H.J., Rawbone R. Evidence for the activation of organophosphate pesticides by cytochromes P450 3A4 and 2D6 in human liver microsomes. *Toxicology Letters*. 2000; 116 : 217-21.
37. Sharma A., Kumar V., Jain S., Sharma PC. Thiazolidin-4-one and hydrazone derivatives of capric acid as possible anti-inflammatory, analgesic and hydrogen peroxide-scavenging agents. *J. Enzyme Inhib Med Chem*. 2010; 1: 1-7.
38. Sun J., Chu YF., Wu X., Liu RH. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J. Agric. Food Chem*. 2002; 50: 7449-54.

39. Tan XL., and Spivack SD. Dietary chemoprevention strategies for induction of phase II xenobiotic-metabolizing enzymes in lung carcinogenesis: A reviews. *Lung Cancer*. 2009; 65: 129-137.
40. Umano T., Hagi Y., Nakahara K., Shoji A., Shibamoto T. Volatile constituents of green and ripened pineapple (*Ananascomosus* [L.] Merr.). *J. Argic. Food Chem.*1992; 40: 599-603.
41. Vasilis P.A., Athanasios P., Dionisios V., Aristidis M.T., Demetrios A.S. Dietary flavonoids in cancer therapy and prevention: Substrates and inhibitors of cytochrome P450 CYP1 enzymes. *Pharmacology & Therapeutics*. 2010; 126: 9–20
42. Walsky RL. and Obach RC. Validated assays for human cytochrome P450 activities. *Drug. Metab. Disposal*. 2004; 32: 647-60.
43. Weng Z, Greenhaw J, Salminen W F. ShiQ. Mechanisms for epigallocatechingallate induced inhibition of drug metabolizing enzymes in rat liver microsomes *Toxicology Letters*2012;214 (3) 328–38.
44. Yang M., Coles BF., Delongchamp R., Lang NP., Kadlubar F. Effects of the ADH3, CYP2E1, and GSTP1 genetic polymorphisms on their expressions in Caucasian lung tissue. *Lung Cancer*. 2002. 15-21.
45. จารุพันธ์ ทองแถม. สับปะรดและอุตสาหกรรมสับปะรดในประเทศไทย. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2526. 9-53.
46. จินดารัฐ วีระวุฒิ. สับปะรดและสรีรวิทยาการเจริญเติบโตของสับปะรด. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2541. 1-26.
47. ดำรงค์ดี เป็กทองและภักวดี เสริมสรรพสุข. รายงานการวิจัยเรื่องผลของการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ที่ใช้ทำลาย xenobiotic ในตับโดยผลไม้ไทย,รายงานวิจัยสกว.ฉบับสมบูรณ์ 2552.

ภาคผนวก

บทความสำหรับการเผยแพร่

**Cancer Chemopreventive Potential of Pineapple Extracts as Antioxidant
and Inhibitor of Cytochrome P450**

Manee Kamenkatekarn^a, Churdsak Jaikang^b Paitoon Narongchai^b, Wirat Niwatananun^a,

Kanokporn Niwatananun^a

^aDepartment of Pharmaceutical Care, Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand
50200

^b Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand
50200

Corresponding author: Assoc. Prof. Kanokporn Niwatananun, Ph.D.

^aDepartment of Pharmaceutical Care, Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand
50200

Phone +66 53 944334

Fax; +66 53 222741

E-mail address: kniwatan@gmail.com

Abstract

Pineapple, *Ananus comosus* (L) Merr, is a known tropical fruit that is gained popularity worldwide because of its palatability and nutritious value. In Thailand, there are various types of pineapple grown but only two types, Pattavia (Sriracha) and Nanglae were chosen for this study. The objectives of this study were to compare the polyphenolic contents and antioxidant activity as well as inhibitory effects of both types of pineapple extracts on CYP1A2, CYP2E1 and CYP2D6 activity using human liver microsomes and types of inhibition were also investigated. Pattavia gained higher yield and higher total phenolic and flavonoid content compared to those of Nanglae. By HPLC analysis, polyphenols containing in pineapple extracts both Pattavia and Nanglae were gallic acid, epigallocatechin and rutin. The content of these three compounds

found in Pattavia was higher than those in Nanglae. Pattavia was a more potent antioxidant than Nanglae according to IC₅₀ derived from DPPH assay and superoxide radical scavenging assay. Both Pattavia and Nanglae inhibited CYP1A2-, CYP2E1- and CYP2D6-mediated metabolisms by which Pattavia and Nanglae exhibited similar extent of inhibition on CYP1A2 and CYP2E1, whereas Nanglae was more potent in inhibition of CYP2D6-mediated metabolism. Type of inhibition of pineapple extracts on the CYP-mediated metabolisms studied varied with competitive type for CYP1A2, noncompetitive type for CYP2E1 and uncompetitive type for CYP2D6. The results of this study show that pineapple extracts, Pattavia and Nanglae, exhibit inhibitory effects on bioactivation-related CYPs as well as antioxidant activity that may contribute to chemopreventive potential in initiation and promotion stage of carcinogenesis. Further studies need to be carried out to provide support for the potential of pineapple extracts in chemoprevention.

Keywords pineapple Pattavia Nanglae antioxidant CYP inhibitor cancer chemopreventive agent

Introduction

Chemoprevention of cancer is an alternative way to promote health in populations. Numerous methods have been proposed to prevent cancer, since cancer is a multistage process taking years to develop a tumor cell from a normal cell. Phases of tumor formation are initiation, promotion and proliferation. Blocking of initiation process can be achieved by inhibition of cytochrome P450 enzyme (CYP), whereas prevention of promotion phase can be performed by anti-oxidative mechanism and anti-inflammatory activity. Proliferation of tumor cells can be blocked by induction of apoptosis (Gerhauser et al, 2003).

Fruits intake has been recognized as a way to decrease incidence of various chronic diseases including cancer and coronary heart disease, which may be at least in part due to their antioxidant activity (Eberhardt et al. 2000; Ganesan et al, 2011). Additionally, substances contain in fruits, for example, mangosteen exerted inhibitory effect on CYP enzymes (Chatuphonprasert and Jarukamjorn, 2012). From evidence provided, fruits contribute in cancer chemoprevention at least in two phases, initiation and promotion.

Pineapple, *Ananus comosus* (L) Merr, is a known tropical fruit that is gained popularity worldwide because of its palatability and nutritious value. There are various vitamins including vitamin A, B and C and several minerals, for examples, iron, calcium and phosphorus containing in pineapple (Gardner et al, 2000).

In Thailand, there are different types of pineapple grown such as Pattavia (Sriracha), Nanglae, Phuket, Phulae, Indharachit and White . Pattavia type is mostly grown in the eastern part of the country, whereas Nanglae type is grown in the Northern part mostly in Chiang Rai province.

There are some reports regarding antioxidant activity of pineapple which was grown in other countries such as Malaysia and Brazil. Alothman *et al.* (2009) reported that honey pineapple extracted with 70% ethanol yielding highest total phenolic content as well as total flavonoid content compared to other solvents. Additionally, honey pineapple possessed antioxidant capacity by using FRAP and DPPH assay. Hossain and Rahman (2011) reported that pineapple exerted antioxidant capacity by using DPPH assay, phosphomolybdenum method and β -carotene-linoleate model system. Extract obtained from pulp and peel of pineapple showed antioxidant capacity measured by DPPH assay and superoxide anion radical scavenging activity (Oliveira *et al.*, 2009). In addition, there are some reports regarding inhibitory effect of pineapple extract on CYP activity. Hidaka *et al.* (2008) reported that pineapple juice exhibited potent inhibitory effect on CYP2C9 activity using human liver microsome. Murine CYP1A, CYP2E and CYP3A activity were also inhibited by pineapple juice in a dose-dependent manner (Chatuphonprasert and Jarukamjorn, 2012). To date, no report regarding effect of pineapple extract on CYP2D6 activity is available.

The objectives of this study were to compare the polyphenolic contents and antioxidant activity of two types of pineapple, Pattavia and Nanglae. Inhibitory effects of both type of pineapple extracts on CYP1A2, CYP2E1 and CYP2D6 activity using human liver microsomes and types of inhibition were also investigated.

Materials and methods

Chemicals and apparatus

Folin-Ciocalteu reagent, gallic acid, quercetin, p-nitrophenol, 4-nitrocatechol, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), nitrobluetetrazolium (NBT), phenazinemethosulfate (PMS) were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Codeine, phenacetin and morphine were obtained from Toxicology section, Regional Medical Science Center 10 (Chiang Mai). Paracetamol, potassium ferricyanide, ferrous chloride, ferric chloride, methanol and trichloroacetic acid

(TCA) were obtained from E. Merck (Darmstadt, Germany). All other chemicals and solvents are of analytical grade.

Sample collection and extraction

Pineapple (Pattavia and Nanglae) were purchased from local markets in Chiang Mai, Thailand and were washed with sterile water and peeled. Then, pulp of pineapple were weighed and cut into small pieces before homogenized. Pineapple paste was then extracted with 70% ethanol at room temperature following method of Allothman *et al.* (2009). The extract was then filtered and centrifuged (Ultracentrifuge Beckman Optima L 100xp, USA) at 4750 g for 15 min. The supernatant was decanted and evaporated at 50 degree celcius using a rotary evaporator (Buchi, Rotavapor R-114, Switzerland). Then, the extract was collected and kept in container protected from light and in freezer at temperature -20 degree celcius until use.

Determination of total phenolic content

Total phenolic content (TPC) in pineapple extract was measured by using Folin-Ciocalteu reagent as described by McDonald *et al.* (2001). 0.5 ml of diluted extract solution was mixed with 5 ml of Folin-Ciocalteu's reagent. The reagent was pre-diluted, 10 times, with distilled water. Then 0.5 ml of 1 M sodium carbonate was added and mixed. The mixture was allowed to stand for 15 min at room temperature and the absorbance was measured at 765 nm using UV-Visible spectrophotometer (Shimadzu, UV-2450, Japan). A calibration curve was prepared using a standard solution of gallic acid. The total phenolic content was expressed as gallic acid equivalent (mg GAE/100g fresh weight of extract).

Determination of total flavonoid contents

Total flavonoid contents (TFC) of ethanolic extract was determined in accordance with aluminum chloride which was described by Chang (2002). 1.5 ml of diluted extract in methanol was separately mixed with 1.5 ml of 95% methanol, 0.1 ml of 10% aluminum chloride, 0.1 of 1 M potassium acetate as well as 2.8 ml of distilled water. After standing for 30 min at room temperature and the absorbance was measured at 415 nm with UV-Visible spectrophotometer (Shimadzu, UV-2450, Japan). The standard curve was prepared by using various concentrations of quercetin in methanol and expressed as quercetin equivalent (mg QE/100g fresh weight of extract).

Superoxide radical scavenging assay

Superoxide anion scavenging activity of pineapple extract was evaluated following method of Gulcin, (2006). Superoxide radicals were generated in PMS-NADH system by oxidation of NADH and assayed by reduction of NBT. The superoxide radicals were generated in 3 ml of Tris-HCl buffer (16mM, pH 8.0) containing 1 ml of NBT (50 μ M) solution, 1 ml NADH (78 μ M) solution and various concentrations of pineapple extract were added. The reaction was started by adding 1 ml of PMS solution (10 μ M) to the mixture and the reaction mixture was incubated at 25 °C for 15 min and absorbance was measured at 560 nm. The percentage of inhibition of superoxide anion generation was calculated.

DPPH radical scavenging assay

Stable DPPH was used for determination of free radical scavenging activity of pineapple extract following the method of Banerjee et al. (2005). Aqueous dilution of CAF and its analogues was added to 3 ml of 0.004% methanol solution of DPPH. Absorbance at 517 nm was determined after 30 min, and the percentage of inhibition was calculated.

Preparation of human microsomes

Human liver samples (n=9) were mostly obtained from donors who died from accident. In accordance with Thai law, the Ethical Committee for Human Research, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, gave prior approval to the Department of Forensic Medicine (Research ID: 1098/ Study Code: FOR-12-1098-Ex). A pooled microsomes were prepared by different centrifugation using a previously described method (Jaikang et al., 2011). The microsome pellets were kept in Tris buffer pH 7.4 and stored at -70 °C until use. Protein contents were determined by bicinchonic acid (BCA) protein assay kit using bovine serum albumin as a standard.

Determination of Human CYP1A2 activity

Phenacetin O-deethylation was used to assess CYP1A2 activity. Incubation mixture of 1 ml contained 0.1 mg microsomal protein, 100 mM potassium phosphate pH 7.4, 0.1mM EDTA, 0.4 mM MgCl₂, NADPH generating system (0.5 mM NADP⁺, 20 mM NADPH, 2 mM glucose-6-phosphate, 1 IU/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase), phenacetin (0.1 mM) and pineapple extract (25-1000 μ g/ml). Reaction was

stopped after 60 min by the addition of 200 μ l cooled methanol and 50 μ l of caffeine 100 μ g/ ml was added as an internal standard. The mixtures were centrifuged at 13,000 RPM for 5 min and the supernatant was filtered and injected into the analytical high performance liquid chromatography (HPLC). HPLC systems consisted of an Agilent 1100 Series high- performance liquid chromatography, Agilent 1100 series diode-array detector, HPLC pumps, autosampler, column oven, and diode- array. The system was monitored and controlled by the HP chem. station computer program (Agilent). Wavelength used for the identification of the compounds with the diode array detector was at 253 nm. Acetaminophen was separated by water C18 column (250 $\times$ 4 mm, 5 μ m), column oven was set up at 25°C. Mobile phase consisted of water: methanol: acetonitrile: tetrahydrofuran (55:20:20: 5), with flow rate 0.7 ml/ min and the injection volume was 5 μ l. The CYP1A2 activity was calculated in μ mol acetaminophen formed / min /mg protein.

Determination of Human CYP2E1 activity

p-Nitrophenol hydroxylation was carried out to assess CYP2E1 activity based on the method of Kusirinsin (2009). The reaction mixture contained 0.5 mg microsomal protein in phosphate buffer pH 7.4, p-nitrophenol 0.3 mM and ethanolic extract of pineapple in various concentrations. The reaction was initiated by the addition of NADPH solution containing 0.5 mM NADP⁺, 20 mM NADPH, 2 mM glucose-6-phosphate and 1 IU/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase. After 1 hour, the reaction was terminated by the addition of trichloroacetic acid(0.6 M; 0.5 ml). The precipitated protein was then removed by centrifugation (1500g, 10 min) and 0.1 ml 10 M sodium hydroxide was added to the supernatant. The yellow color was developed and then absorbance was measured at 546 nm. The CYP2E1 activity was calculated in μ mol 4-nitrocatechol/ min /mg protein.

Determination of Human CYP2D6 activity

CYP2D6 activity was determined by using metabolism of codeine to morphine. Incubation mixture of 1 ml contained 0.1 mg microsomal protein, 100 mM potassium phosphate pH 7.4, 0.1 mM EDTA, 0.4 mM MgCl₂, NADPH generating system(0.5 mM NADP⁺, 20 mM NADPH, 2 mM glucose-6-phosphate, 1 IU/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase), codeine and ethanolic extract of pineapple in various concentrations. Reaction was stopped after 60 min by the addition of 200 μ l cooled methanol. The mixtures were then centrifuged at 13,000 RPM for 5 min and the supernatant was injected into the analytical high

performance liquid chromatography (HPLC). HPLC system consisted of an Agilent 1100 Series diode array detector wavelength at 214 nm. Codeine and morphine were separated by ODS C18 column (250×4 mm, 5 μ m), column oven was set up at 25°C. Isocratic elution was employed with mobile phase consisting of methanol : acetonitrile : 25 mM phosphate buffer, pH 7.4 (20 : 7 : 73), with flow rate 0.7 ml/ min and the injection volume was 5 μ l. The activity of CYP2D6 was calculated in μ mol/ min /mg protein.

Kinetic studies in human liver microsomes

Three different concentrations of substrates, phenacetin (0.01, 0.05, 0.1 mM), p-nitrophenol (0.03, 0.06, 1.2 mM) and codeine (0.1, 0.25, 0.5 mM), and at least four different concentrations of pineapple extracts were used in kinetic studies in human liver microsomes. The reactions were carried out as described earlier. The data obtained were analyzed according to the method of Dixon (1953) by which 1/V was plotted against the concentration of the each pineapple extract [I] , where V is the rate of metabolite formation. The Cornish-Bowden plot was illustrated using S/V versus [I] where S is the substrate concentration. The results of the inhibition study were analyzed by Cornish-Bowden and Dixon plots to determine type of inhibition.

Identification of polyphenols containing in pineapple extracts using HPLC analysis

The polyphenols from ethanolic pineapple extract was purified by solid phase extraction (SPE) and isolated with HPLC(Hewlett Packard, HP1100, USA). The ethanolic extract was dissolved with distilled water, 1-2 drop of HCl concentration were added, and heated for 20 minutes. C18 Cartridge column was rinsed with 3 ml of ethyl acetate and methanol, and 10 ml of milli Q water, followed by the deposition of extract sample solution, 10 ml. Solvent was allowed to dry under reduced pressure, and polyphenols remained in the column were eluted with 1 ml methanol before analysis. The standard compounds, such as gallic acid, caffeic acid, epigallocatechin and catechin were dissolved in methanol.

The polyphenolic compound was analyzed using an HPLC-DAD unit and ODS C18 column (250×4 mm, 5 μ m), column oven was set up at 25°C. Isocratic elution was employed with mobile phase consisting of methanol : acetonitrile : water (40 : 15 : 45), with flow rate 0.7 ml/ min and the injection volume was 5 μ l.

Statistical analysis

Data was expressed as mean $\pm$ S.D of three values and analysed by one way ANOVA followed by Duncan.

P values of less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

Total phenolic and total flavonoid contents of pineapple extracts

Comparison has been made between two types of pineapples grown in Thailand, Pattavia and Nanglae, in terms of percentage of yield, total phenolic (TPC) and total flavonoid contents (TFC). By using 70% ethanol for extraction, Pattavia gained higher (10.34%) yield compared to that of Nanglae (5.72%). Both of TPC and TFC of Pattavia were higher than those of Nanglae as shown in Table. 1.

Identification of polyphenols containing in pineapple extracts

By HPLC analysis, polyphenol containing in pineapple extracts both Pattavia and Nanglae were gallic acid, epigallocatechin and rutin as shown in Figure 1. Compared to Nanglae extracts, Pattavia contained higher contents of all three polyphenol substances (860 μ g, 5.5 μ g and 220.1 μ g/ 1 g extract vs 627.5 μ g, 2.05 μ g and 163.5 μ g/1 g extract for gallic acid, epigallocatechin and rutin, respectively)

Scavenging activity of pineapple extracts toward DPPH radical and superoxide radical

DPPH as well as superoxide scavenging activities of Pattavia and Nanglae were compared as shown in Figure 2. Pattavia possessed lower 50% inhibitory concentration (IC_{50}) value of 65.18 μ g/ml and 2.48 μ g/ml compared to those of Nanglae (116.65 μ g/ml and 5.15 μ g/ml) in DPPH assay and superoxide assay, respectively.

Inhibition of pineapple extracts on CYP1A2, CYP2E1 and CYP2D6 activities

Pattavia and Nanglae extracts exhibited inhibitory effects on CYP1A2-mediated phenacetin O-deethylation dose-dependently at concentrations ranged from 25 -1,000 μ g/ml. IC_{50} values of Pattavia and Nanglae extracts were similar (266.87 μ g/ml and 274.98 μ g/ml, respectively, Figure 3). From Cornish-Bowden and Dixon plots (Figure 4), type of inhibition of Pattavia and Nanglae extracts on CYP1A2 activity can be considered as competitive.

Inhibition on CYP 2E1-mediated p-nitrophenol hydroxylation was shown by Pattavia and Nanglae extracts at concentrations ranged from 50 -1,000 $\mu\text{g/ml}$ with IC_{50} values of 152.41 $\mu\text{g/ml}$ and 177.13 $\mu\text{g/ml}$, respectively (Figure 5). In contrast to inhibitory effect on CYP1A2 activity, type of inhibition of Pattavia and Nanglae extracts on CYP 2E1 activity can be considered as noncompetitive (Figure. 6).

CYP 2D6-mediated codeine O-demethylation was dose-dependently inhibited with both Pattavia and Nanglae extracts at concentrations ranged from 50 -1,500 $\mu\text{g/ml}$. IC_{50} values of Pattavia and Nanglae extracts were quite different (445.04 $\mu\text{g/ml}$ and 132.46 $\mu\text{g/ml}$, respectively, Figure. 7). Type of inhibition of Pattavia and Nanglae extracts on CYP2D6 activity was found to be uncompetitive (Figure 8).

Discussions and Conclusion

In this study , comparison has been made between two types of pineapple grown in Thailand, Pattavia and Nanglae in terms of inhibitory effects on bioactivation-related CYPs and mechanism involved that may attribute to the potential of pineapple extract as chemopreventive agent in initiation stage of carcinogenesis. Antioxidant activity and polyphenolic content as well as polyphenolic compounds containing in the extracts were explored that may attribute to the potential of the extract in promotion stage.

Pattavia contained higher contents of polyphenols compared to Nanglae. TPC as well as TFC of Pattavia extract found in this study were consistent with previous report of Chatuphonprasert and Jarukamjorn (2012) but was lower than those of Alothman *et al.* (2009) reported. This might be due to variation in location of orchard, climate including minerals containing in soil. According to HPLC analysis, there were three compounds, gallic acid, epigallocatechin and rutin containing in both types of pineapple extracts in which those compounds found in higher content in Pattavia compared to Nanglae.

Antioxidant activity of pineapple extracts was investigated using DPPH assay and superoxide anion radical scavenging assay. DPPH assay is an indirect method widely used to assess radical scavenging activity of compound. (Su et al., 2008). Absorbance is reduced when DPPH exposed to an antioxidant. Both Pattavia and Nanglae extracts showed antioxidant activity in a dose-dependent fashion with IC_{50} values of 77.5 $\mu\text{g/ml}$ and 142.5 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Since Pattavia extract contained higher TPC and TFC compared to Nanglae, therefore it is more potent than Nanglae in scavenging activity toward DPPH radical.

Khan et al. (2012) reported that there is a strong correlation between TPC and TFC and DPPH radical scavenging activity.

Regarding to superoxide anion radical scavenging assay, in which xanthine and xanthine oxidase were used to form superoxide anion radical, both Pattavia and Nanglae extracts exhibited scavenging activity in a dose-dependent fashion with IC_{50} values of 4.54 μ g/ml and 6.24 μ g/ml, respectively. Compared to DPPH assay, Pattavia showed less discrepancy in antioxidant activity with Nanglae in term of IC_{50} values. This may be attributed to a moderate correlation between TPC and TFC and superoxide radical scavenging activity (Khan et al., 2012).

Inhibitory effects of both types of pineapple extracts, Pattavia and Nanglae, were investigated on activity of CYP1A2, CYP2E1 and CYP2D6 enzymes that contribute to bioactivation process, leading to formation of reactive intermediates or carcinogens (Coleman, 2005, Antolino-Lobo *et al*, 2010).

Pattavia and Nanglae extracts inhibited CYP1A2-mediated phenacetin O-deethylation in human microsomes dose-dependently with IC_{50} values of 266.87 μ g/ml and 274.98 μ g/ml, respectively. The type of inhibition was found to be competitive according to Cornish-Bowden and Dixon plots. Androutsopoulos *et al.*(2010) reported that several flavonoids e.g., chrysin, galangin and quercetin are potent CYP1A2 inhibitors. There was a report of Weng et al. (2012) regarding inhibitory effect of epigallocatechin on CYP1A2 enzyme. Therefore, epigallocatechin found in extracts of Pattavia and Nanglae may contribute to CYP1A2 inhibition.

CYP2E1-mediated p-Nitrophenol hydroxylation was inhibited by Pattavia and Nanglae extracts in concentration-dependent manner with IC_{50} values of 152.41 μ g/ml and 177.13 μ g/ml, respectively. The type of inhibition involved was noncompetitive which is consistent with the report of Pekthong and Sermsapasuk (2009). Chatuphonprasert and Jarukamjorn (2012) reported that pineapple juice (Pattavia or Sriraja type) inhibited CYP1A1, 1A2, 2E1 and 3A11-mediated metabolism in murine liver microsomes. Inhibition of pineapple extracts on CYP2E1-mediated p-nitrophenol hydroxylation may not related to epigallocatechin found in the extracts, since Weng et al. (2012) reported that epigallocatechin did not inhibit CYP2E1 activity in rat liver microsomes.

Regarding to CYP2D6-mediated codeine o-demethylation, Pattavia and Nanglae extracts inhibited the metabolism dose-dependently with IC₅₀ values of 445.04 µg/ml and 132.46 µg/ml, respectively. The type of inhibition was found to be uncompetitive. The results of this study show that pineapple extracts, Pattavia and Nanglae, exhibit inhibitory effects on bioactivation-related CYPs as well as antioxidant activity that may contribute to prevention of initiation and promotion stage of carcinogenesis. Further studies need to be carried out to provide support for the potential of pineapple extracts in chemoprevention.

Acknowledgements

This work was supported by Thailand Research Fund (RDG5420054), and Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University Thailand. We are also grateful to Toxicology section, Regional Medical Science Center 10 (Chiang Mai) for HPLC instruments and chemicals.

References

1. Alothman M., Rajeev Bhat., Karim AA. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chemistry*. 2009; 115: 785–788.
2. Antolino-Lobo,I., Meulenbelt J, Nijmeijer SM. et al. Differential Roles of Phase I and Phase II Enzymes in 3,4-Methylenedioxymethamphetamine-Induced Cytotoxicity. *Drug Metab Dispos*. 2010; 38:1105–1112.
3. Banerjee A., Dasgupta N., De B. In vitro study of antioxidant activity of Syzygium cumini fruit. *Food Chem*. 2005; 90: 727-733.
4. Boyd, MR. The NCI in vitro anticancer drug discovery screen. In Teicher, B.(Ed.). *Anticancer drug development guide;preclinical screening,clinical trials and approval*, Human Press, Totowa.1997.p 30.
5. Breinholt VM., Offord EA., Brouwer C.,et al. In vitro investigation of cytochrome P450-mediated metabolism of dietary flavonoids. *Food Chem Toxicol*. 2002; 40(5): 609-16.
6. Chang CC., Yang MH., Wne HM., Chen JC. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Anal*. 2002; 10: 178-182.
7. Chatuphonprasert, W. and Jarukamjorn, K. Impact of six fruits-banana, guava, mangosteen, pineapple, ripe mango and ripe papaya-on murine hepatic cytochrome P450 activities. *J. Appl.Toxicol*. 2012; on line
8. Chen HY., Yen GC. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity of extracts from guava (*Psidium guajava* L) leaves. *Food Chem*. 2007; 101: 686-694.
9. Coleman MD. Phase I enzyme inhibition. In Coleman MD (Ed.) *Human Drug Metabolism* John Wiley & Sons., West Sussex.2005. 79-83.
10. Cornish-Bowden A. A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors. *Biochem J*. 1974; 137, 143-144.
11. Dinham B. Prolonged exposure to some agricultural pesticides may increase the risk of lung cancer in agricultural workers. *Evidence-based Healthcare & Public Health*. 2005; 9(3): 203-205.
12. Dixon M. The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem J*. 1953 ;55:170–171.
13. Foster, B.C., Vandenhoeck S., Hana J et al. In vitro inhibition of human cytochrome P450-mediated metabolism of marker substrates by natural products. *Phytomedicine* 2003; 10: 334-342.
14. Gerhauser C, Klimo K, Heiss E.,et al. Mechanism-based in vitro screening of potential cancer chemopreventive agents. *Mutat Res*. 2003; 523-524:163-172.
15. Hidaka M., Nagata M., Kawano Y., et al. Inhibitory Effects of Fruit Juices on Cytochrome P450 2C9 Activity in Vitro. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 2008; 72 (2): 406–411.

16. Hossain A., Rahman MSM. Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of tropical fruit pineapple. *Food Research International*. 2010;672-676.
17. Jaikang C., Chaiyasut C., Narongchai P., Niwatananun K., Narongchai S., Kusirisin W. Inhibitory effects of caffeic acid ester analogues on free radicals and human liver microsome CYP1A2 activities. *Med. Chem.* 2011; 7: 99-105.
18. Jaikang C., Niwatananun K., Narongchai S., Narongchai P., Chaiyasut C. Inhibitory effects of caffeic acid and its amide derivatives on human liver microsome P4501A2. *Drug Metab Reviews*. 2009. 41(suppl 2)
19. Khan RA., Khan MR., Sahreen S., Ahmed M. Evaluation of phenolic contents and antioxidant activity of various solvent extracts of *Sonchus asper* (L.) Hill. *Chemistry Central Journal*. 2012; 6:12-18.
20. Leong L.P., Shui G. Investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets, *Food Chemistry*. 2002; 76: 69–75.
21. Ley K., and Arfors KE. Changes in macromolecular permeability in intravascular generation of oxygen derived free radicals. *Microvascular. Res.* 1982; 24: 25-33.
22. Mark DC., Belov L., Davey MW., Davey RA., Kidman AD. The MTT cell viability assay for cytotoxicity testing in multidrug resistant human leukemic cells. *Leuk Res.* 1992; 16: 1165-1173.
23. McDonald S., Prenzler PD, Antolovich M., Robards K. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chem.* 2001;73: 73-84
24. Moon Y.J., Wang X., Morris M.E. Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicology in Vitro*. 2006; 20: 187-210.
25. Nelson DR., Koymans L., Kamataki T., et al. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetic*. 1996; 6: 1-42.
26. Pekthong D. and Sermasapuk P. Effect of alteration in hepatic xenobiotic-metabolizing enzymes in Thai Fruits. Report submitted to Thailand Research Fund. 2009.
27. Sams C., Mason H.J., Rawbone R. Evidence for the activation of organophosphate pesticides by cytochromes P450 3A4 and 2D6 in human liver microsomes. *Toxicology Letters*. 2000; 116 : 217-221.
28. Sharma A., Kumar V., Jain S., Sharma PC. Thiazolidin-4-one and hydrazone derivatives of capric acid as possible anti-inflammatory, analgesic and hydrogen peroxide-scavenging agents. *J. Enzyme Inhib Med Chem*. 2010; 1: 1-7.
29. Umamo T., Hagi Y., Nakahara K., Shoji A., Shibamoto T. Volatile constituents of green and ripened pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.). *J. Agric. Food Chem.*1992; 40: 599-603.
30. Vasilis P.A., Athanasios P., Dionisios V., Aristidis M.T., Demetrios A.S. Dietary flavonoids in cancer therapy and prevention: Substrates and inhibitors of cytochrome P450 CYP1 enzymes. *Pharmacology & Therapeutics*. 2010; 126: 9–20
31. Walsky RL. and Obach RC. Validated assays for human cytochrome P450 activities. *Drug. Metab. Dispos.* 2004; 32: 647-660.
32. Weng Z, Greenhaw J, Salminen W F, Shi Q. Mechanisms for epigallocatechin gallate induced inhibition of drug metabolizing enzymes in rat liver microsomes *Toxicology Letters* 2012;214 (3) 328–338.
33. Yang M., Coles BF., Delongchamp R., Lang NP., Kadlubar F. Effects of the ADH3, CYP2E1, and GSTP1 genetic polymorphisms on their expressions in Caucasian lung tissue. *Lung Cancer*. 2002. 15-21.

Table 1. Ethanolic extraction yields, total phenolic contents and total flavonoid contents of pineapple extracts, Pattavia and Nanglae type

Type of pineapple	Extraction yields (%)	Total phenolic contents (mg GAE/100 g fresh weight)	Total flavonoid contents (mg quercetin/100 g fresh weight)
Pattavia	10.34	25.01 + 0.46	2.97 + 0.04
Nanglae	5.72	11.72 + 0.15	1.68 + 0.11

Value are mean (n= 3) $\pm$ SD

Legend

Figure 1. Chromatograms of polyphenols containing in Pattavia and Nanglae extracts by HPLC analysis

Figure 2 . DPPH and superoxide radical scavenging activities of pineapple extracts

Figure 3. Inhibitory effects of Pattavia and Nanglae extracts on CYP1A2-mediated metabolism in human liver microsomes

Figure 4. The Cornish-Bowden and Dixon plots of the effect of Pattavia and Nanglae extracts on CYP1A2-mediated metabolism in human liver microsomes

Figure 5. Inhibitory effects of Pattavia and Nanglae extracts on CYP2E1-mediated metabolism in human liver microsomes

Figure 6. The Cornish-Bowden and Dixon plots of the effect of Pattavia and Nanglae extracts on CYP2E1-mediated metabolism in human liver microsomes

Figure 7. Inhibitory effects of Pattavia and Nanglae extracts on CYP2D6-mediated metabolism in human liver microsomes

Figure. 8. The Cornish-Bowden and Dixon plots of the effect of Pattavia and Nanglae extracts on CYP2D6-mediated metabolism in human liver microsomes

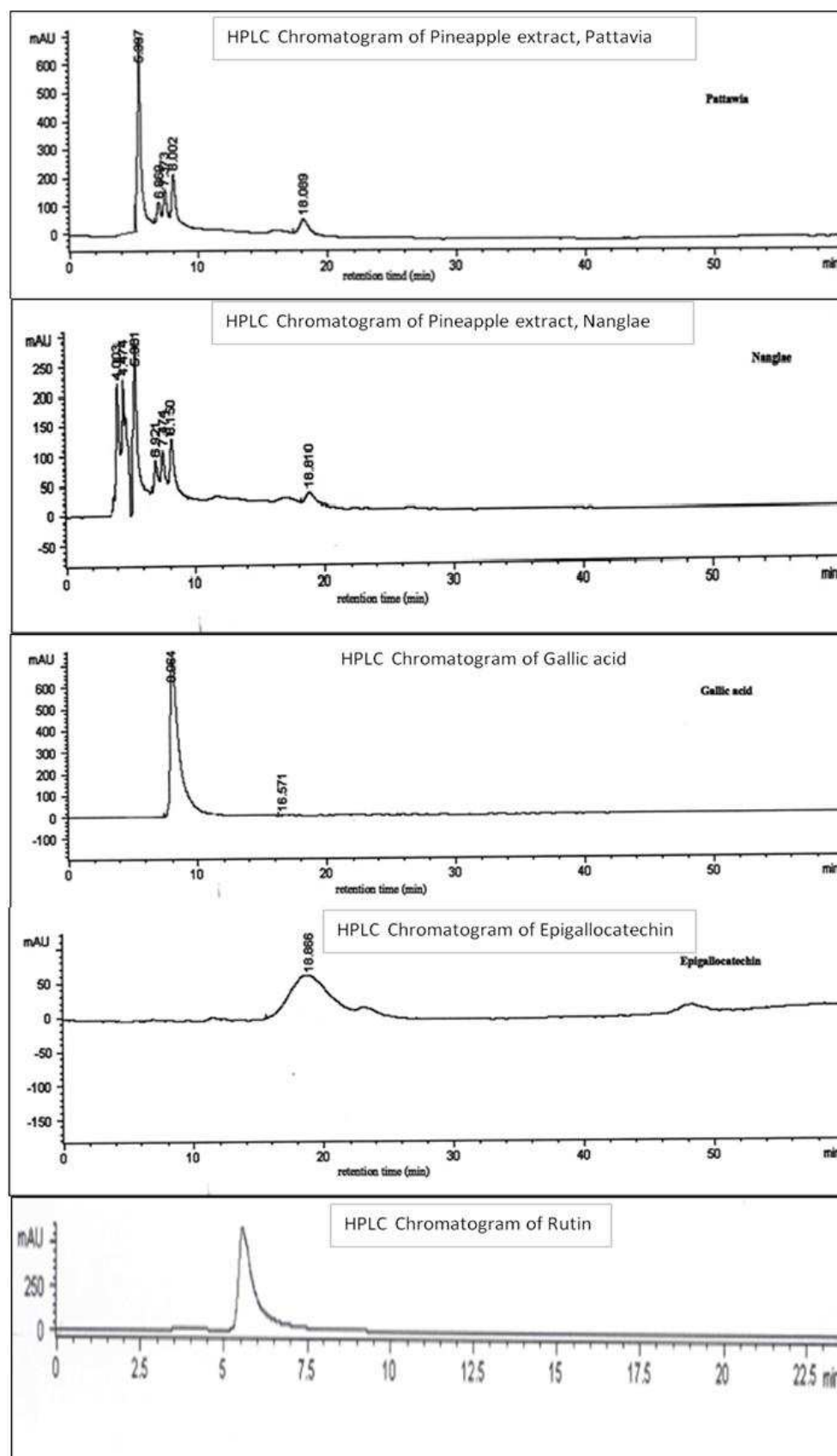


Figure 1

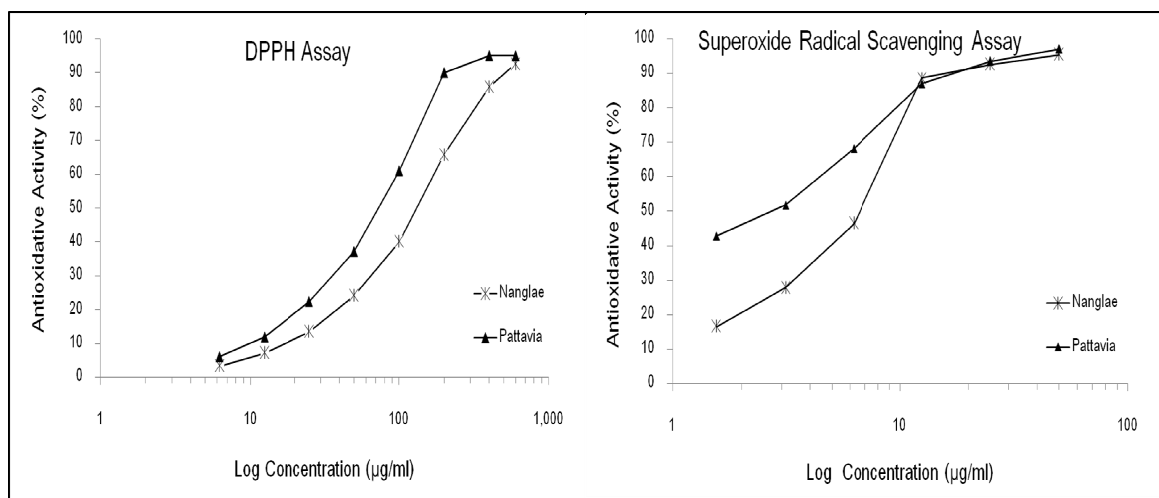


Figure 2

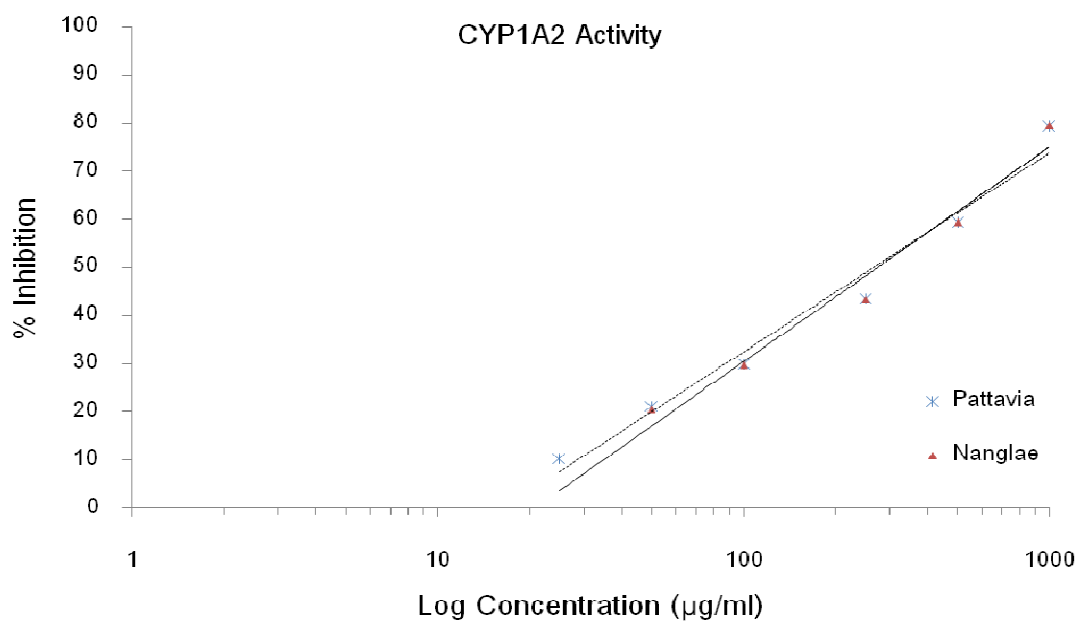


Figure 3

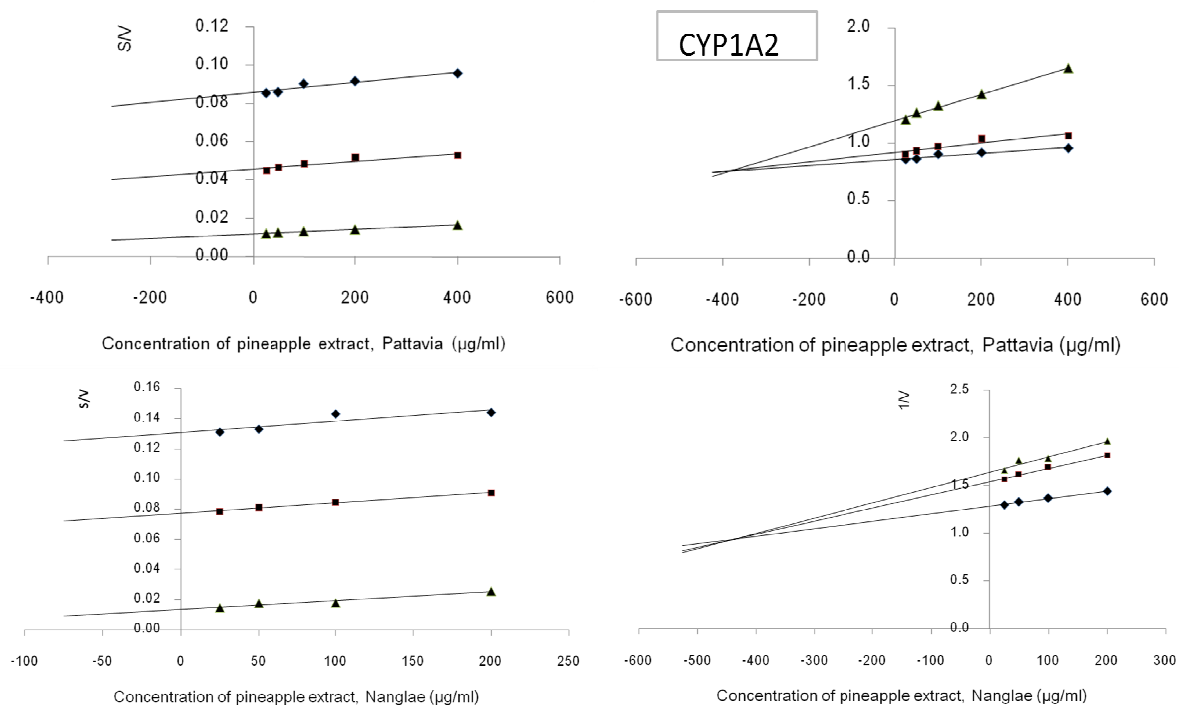


Figure 4

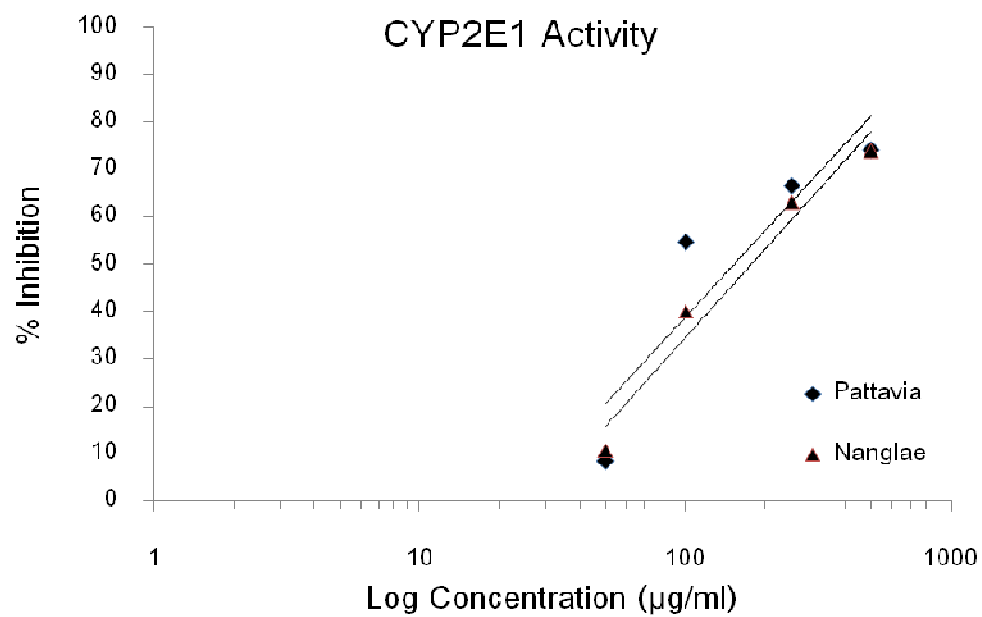


Figure 5

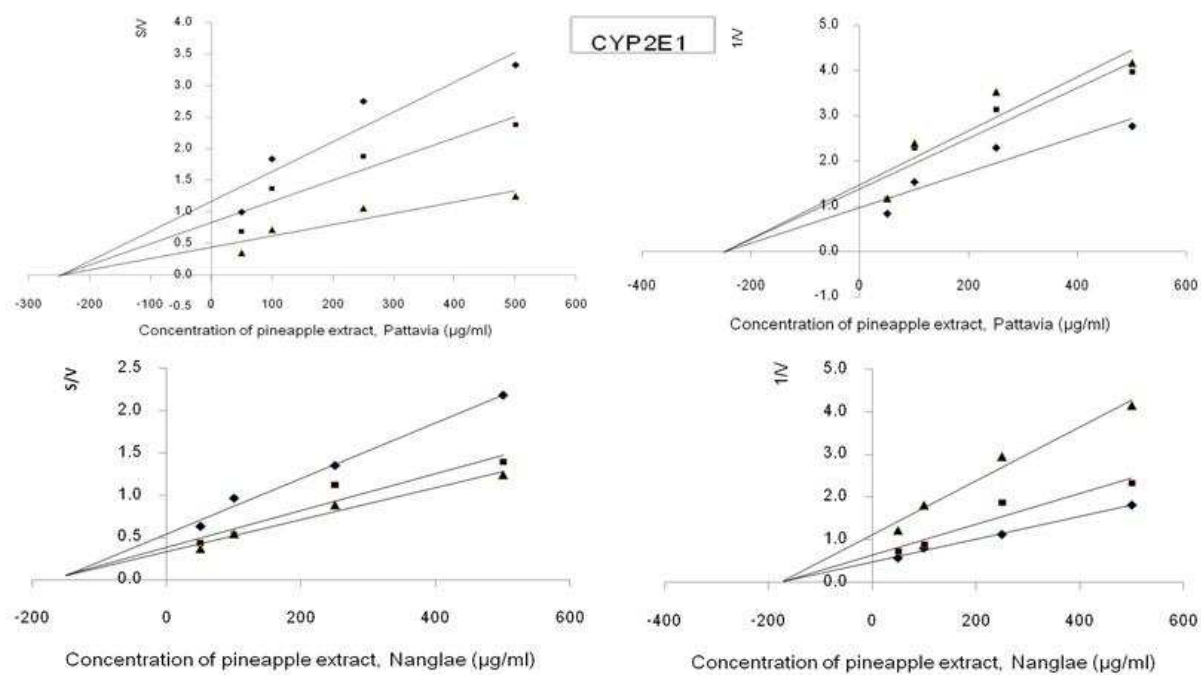


Figure 6

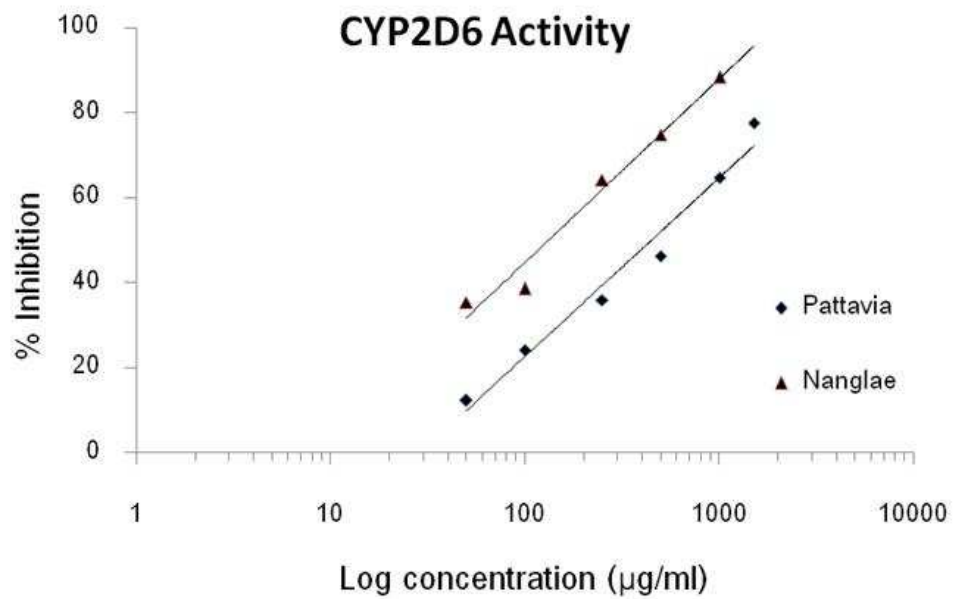


Figure 7

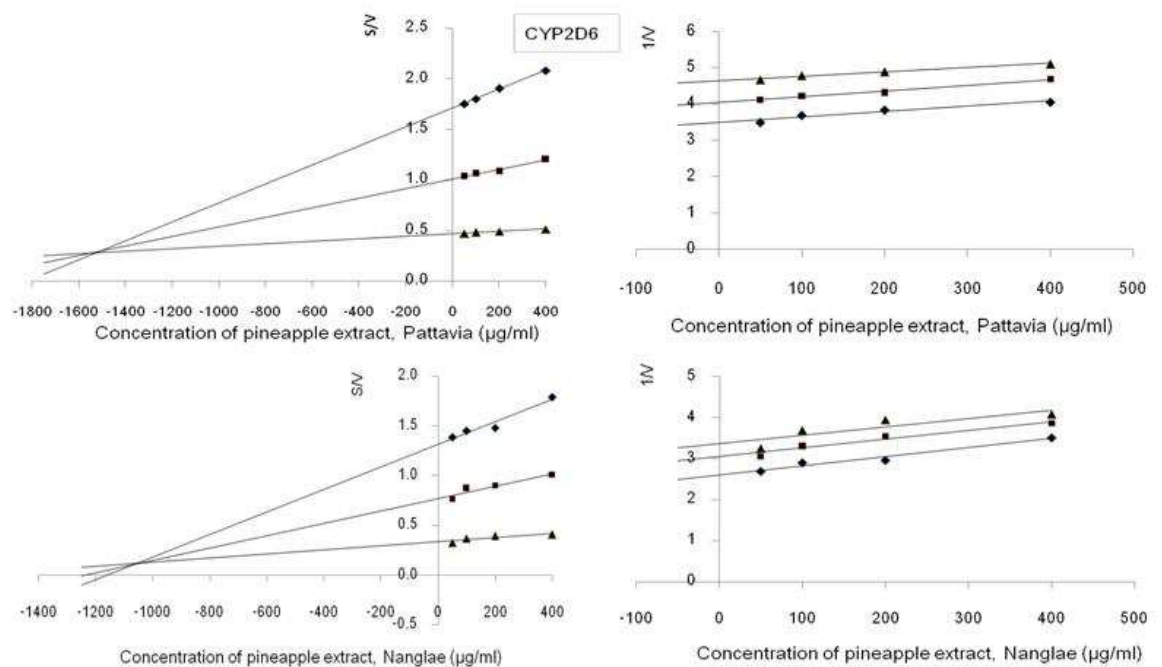


Figure. 8

กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์

โครงการนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ของสับปะรดต่อการป้องกันมะเร็งเมื่อโครงการวิจัยนี้เสร็จสิ้น ประโยชน์ที่อาจจะได้จากการนำผลจากการศึกษาจากโครงการนี้ไปใช้คือ

1. ได้ข้อมูลและปริมาณสารออกฤทธิ์ที่เป็นองค์ประกอบในสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียและพันธุ์นางแล ข้อมูลนี้อาจนำไปอ้างอิงถึงปริมาณสารสำคัญและสรรพคุณของสับปะรดในผลิตภัณฑ์แปรรูปจากชุมชนเพื่อเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์ซึ่งจะทำให้รายได้ของเกษตรกรเพิ่มสูงขึ้นได้
2. ทำการเผยแพร่ข้อมูลเกี่ยวกับฤทธิ์ของสับปะรดเพื่อให้ประชาชนได้ทราบถึงศักยภาพของสับปะรด ในการช่วยป้องกันมะเร็งและกำจัดอนุมูลอิสระได้ โดยอาจนำเสนอผ่านการบริการวิชาการ การสัมมนาทางวิชาการ การเผยแพร่เป็นบทความทางวิชาการ เป็นต้น
3. ให้ข้อมูลแก่ประชาชนเพื่อเฝ้าระวังการเกิดอันตรายของสับปะรดกับยาแผนปัจจุบันในผู้ที่ใช้ยาที่แปรรูปโดยเอนไซม์ที่สับปะรดมีผลยับยั้ง เพื่อเลี่ยงการเกิดอาการไม่พึงประสงค์หรือความเป็นพิษจากยา โดยอาจจะนำไปเผยแพร่เป็นบทความวิชาการ หรือในวารสารต่างๆ

ตารางเปรียบเทียบวัตถุดิบพืช กิจกรรมที่วางแผนไว้และกิจกรรมที่ดำเนินการมาและผลได้รับ
ตลอดโครงการ

วัตถุดิบพืช	กิจกรรมที่วางแผนไว้และได้ดำเนินการ	ผลที่ได้รับตลอดโครงการ
1. เพื่อศึกษากลุ่มสารสำคัญจากสับปะรด	1.1 คัดเลือกสับปะรด 1.2. สกัดสับปะรดด้วยสารละลายอินทรีย์ 1.3 วิเคราะห์หาปริมาณรวมฟลาโวนอยด์และปริมาณ total phenolic ด้วย spectrophotometer 1.4 วิเคราะห์สารสำคัญด้วยเครื่อง HPLC และ GC-MS	ได้คัดเลือกพันธุ์สับปะรดที่ปลูกในภาคเหนือคือสายพันธุ์ปัตตาเวียจากจังหวัดลำปางและนางแลจากเชียงรายจากงานวิจัยพบว่า สับปะรดทั้งสองสายพันธุ์นี้มีสารกลุ่มโพลีฟีนอลเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ gallic acid, epigallocatechin และ rutin ในสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียมีปริมาณ 860.0, 5.5 และ 220.1ug/1g ของสารสกัด และในสับปะรดพันธุ์นางแลมีปริมาณ 627.5, 2.05 และ 163.5µg/1g ของสารสกัดซึ่งสารดังกล่าวนี้มีบทบาทสำคัญในการต้านมะเร็งและใช้เสริมสร้างสุขภาพให้แข็งแรงได้
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสับปะรดสายพันธุ์ภาคเหนือ	2.1 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสับปะรด โดยใช้ อนุมูล DPPH, Hydrogen peroxide, superoxide anion	เมื่อทดสอบการกำจัดอนุมูลอิสระDPPH, superoxide anion, hydrogen peroxide ในหลอดทดลองพบว่าสับปะรดทั้งสองสายพันธุ์มีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยค่า IC ₅₀ ของการกำจัดอนุมูลของพันธุ์ปัตตาเวียและนางแล ในส่วนของ DPPH เท่ากับ 65.18 และ 116.65 µg/ml, superoxide anionเท่ากับ 2.48 และ 5.15 µg/mlและสำหรับ hydrogen peroxide เท่ากับ 106.75และ 109.10µg/ml ตามลำดับ
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ และกลไกการยับยั้ง CYP 2E1และ2D6 ในหลอดทดลอง	3.1 ศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ CYP1A2 CYP 2E1 และCYP2D6	เมื่อนำสารสกัดสับปะรดมาทดสอบฤทธิ์และจลนศาสตร์ของเอนไซม์ที่มีหน้าที่แปรสภาพสารก่อมะเร็งได้แก่ CYP 2E1,CYP 1A2 และCYP2D6 พบว่าสารสกัดสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียและนางแลนั้นมีฤทธิ์ยับยั้ง CYP1A แบบแข่งขัน (competitive)ยับยั้งเอนไซม์ CYP 2E1 แบบไม่แข่งขัน (noncompetitive) และยับยั้งCYP2D6 แบบไม่แข่งขัน (uncompetitive)

4. เพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดสับปะรดต่อเซลล์มะเร็ง	4.1 ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT assay	สารสกัดสับปะรดนั้นมีสารกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบที่สำคัญและยังมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับชนิด Hep G2 ด้วยวิธี MTT assay พบว่าสารสกัดสับปะรดทั้งสองสามารถทำลายเซลล์มะเร็งได้ เมื่อคำนวณหา IC_{50} ของสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียและนางแลมีค่า 22.40 และ 24.28 $\mu\text{g}/\text{m}$ ตามลำดับ
--	---	---