



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลไม้ไทยต่อภาวะเครียดออกซิเดชัน
ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในเซลล์ HEK-293

**Antioxidant effects of crude extracts from Thai fruits on
 H_2O_2 -induced oxidative stress in HEK-293 cells**

โดย

รศ. ดร. ภก. ศุภโชค มั่งมุลและ

ผศ. ดร. ภาณุ ญักฐิณี อนันตโชค

ธันวาคม พ.ศ. 2558

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลไม้ไทยต่อภาวะเครียดออกซิเดชัน
ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในเซลล์ HEK-293

**Antioxidant effects of crude extracts from Thai fruits on H_2O_2 -
induced oxidative stress in HEK-293 cells**

คณะผู้วิจัย

สังกัด

ศุภโชค มั่งมุล

ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์

มหาวิทยาลัยมหิดล

ณัฐฐินี อนันต์โชค

ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์

มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ฝ่ายเกษตร และสำเร็จลงได้โดยความช่วยเหลือจาก ศาสตราจารย์ ดร. นันทวัน บุญยะประภัศร ที่ให้คำปรึกษา แนะนำ

นอกจากนี้ทางผู้วิจัยขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ วงศ์สถิตย์ จั่วกุล ภาควิชาเกษตรศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลที่ช่วยตรวจสอบเอกลักษณ์พืช และ ดร. ปัทมพรรณ โลมะรัตน์ที่ช่วยดำเนินการวิจัย และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บุคลากรหน่วยวิจัยกลาง และภาควิชาเกษตรวิทยา และภาควิชาเกษตรอินทรีย์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์ เครื่องมือที่จำเป็นต่อการวิจัย ทำให้โครงการนี้สำเร็จลงไปได้ด้วยดี

ศุภโชค มั่งมุล

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
สารบัญ	ii
สารบัญตาราง	iv
สารบัญรูป	v
คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อ	vi
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	vii
บทคัดย่อภาษาไทย	ix
Abstract	x
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ที่มาและความสำคัญหลักการและเหตุผล	1
1.2 ทบทวนเอกสารเชิงสังเคราะห์	1
1.3 วัตถุประสงค์การวิจัย	5
บทที่ 2 วัสดุและวิธีดำเนินการวิจัย	
2.1 ตัวอย่างผลไม้	6
2.2 วัสดุและสารเคมี	6
2.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ	7
2.4 วิธีดำเนินการวิจัย	7
2.4.1 การเตรียมสารสกัดผลไม้	9
2.4.2 การทำ fingerprint ของสารสกัดผลไม้แต่ละชนิดโดยวิธีTLC	9
2.4.3 การวิเคราะห์หาปริมาณtotal phenolic content ด้วยวิธีFolin Ciocalteu	10
2.4.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระDPPH	10
2.4.5 การเลี้ยงเซลล์	11
2.4.6 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดผลไม้ไทยโดยวิธีMTT	11
2.4.7 การทดสอบฤทธิ์ด้านการเกิดออกซิเดชันของสารสกัดผลไม้ไทย	11
2.4.8 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดผลไม้ไทยต่อการสร้างantioxidant enzymes	12
บทที่ 3 ผลการวิจัย	
3.1 การเตรียมสารสกัดผลไม้	15
3.2 การทำ fingerprint ของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้แต่ละชนิดโดยวิธีTLC	15
3.3 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณtotal phenolic content ด้วยวิธีFolin Ciocalteu	18
Colorimetry	

3.4	ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระDPPH	18
3.5	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity test) โดยวิธี MTT assay	21
3.6	ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทย	23
3.7	ผลของสารสกัดผลไม้ไทยต่อการสร้างเอนไซม์ที่ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน	28
บทที่ 4	สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	32
	เอกสารอ้างอิง	38
	ภาคผนวก ก	42
	ภาคผนวก ข	44

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ และโพลีฟีนอลที่พบในผลไม้และผักต่างๆ	2
2 ผลไม้ไทยที่มีรายงานสารสำคัญฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านออกซิเดชัน	3
3 ผลไม้ไทยที่ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	8
4 ลำดับ sequence ของ primers ของเอนไซม์ต้านออกซิเดชันชนิดต่างๆ	13
5 ปริมาณและลักษณะของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทย 11 ชนิด	15
6 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ในรูป gallic acid equivalent/100 g ของสารสกัดและผลไม้แห้งและสด	18
7 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระDPPH ของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 mg/ml และความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระDPPH ได้ร้อยละ 50	20
8 การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ของ gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ	42
9 การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทย	43
10 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ในรูป gallic acid equivalent ในสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทย	43

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	TLC chromatograms ของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทย 11 ชนิด (วัฏภาคเคลื่อนที่ methanol : methylene chloride [1:9])	16
2	TLC chromatograms ของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทย 11 ชนิด (วัฏภาคเคลื่อนที่ ethyl acetate : methylene chloride : formic acid : acetic acid : น้ำ [100:25:10:10:11])	17
3	TLC chromatogramsฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดด้วยเมทานอลของ ผลไม้ 11 ชนิด	19
4	ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทย	22
5	ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทย โดยการวัดปริมาณ ROS ภายในเซลล์ด้วย fluorescent microplate reader	24
6	ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทย โดยใช้กล้อง fluorescent microscope	27
7	ผลของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทยในการเหนี่ยวนำการสร้าง mRNA ของ antioxidant genes	29
8	ฤทธิ์ของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทยต่อการสร้างโปรตีนของ antioxidant enzymes	31
9	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทย	33
10	กราฟมาตรฐานของ gallic acid วิเคราะห์โดยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetry	42

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อ

α	=	Alpha
β	=	Beta
$^{\circ}\text{C}$	=	Degree Celsius
CAT	=	Catalase
CH_2Cl_2	=	Dichloromethane
DCF	=	2',7'-dichlorofluorescein
DCFH-DA	=	2',7'-dichlorofluorescein diacetate
DMEM	=	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	=	Dimethyl sulfoxide
EtOAc	=	Ethyl acetate
g	=	Gram
GPx	=	Glutathione peroxidase
GRe	=	Glutathione reductase
H_2O_2	=	Hydrogen peroxide
HEK-293	=	Human embryonic kidney-293
HO-1	=	Heme oxygenase-1
hr	=	Hour
IC_{50}	=	Median Inhibitory Concentration
L	=	Liter
MeOH	=	Methanol
mRNA	=	Messenger ribonucleic acid
MTT	=	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
μg	=	Microgram
mg	=	Milligram
min	=	Minute
ml	=	Milliliter
nm	=	Nanometer
PBS	=	Phosphate buffer saline
ROS	=	Reactive oxygen species
SOD	=	Superoxide dismutase
TLC	=	Thin Layer Chromatography

โครงการ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลไม้ไทยต่อภาวะเครียดออกซิเดชันที่ถูก
เหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในเซลล์ HEK-293

Antioxidant effects of crude extracts from Thai fruits on H₂O₂-induced oxidative stress in
HEK-293 cells

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

ภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) มีความเกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพของโรคต่าง ๆ เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด เบาหวาน เป็นต้น ดังนั้นการยับยั้งภาวะ oxidative stress ที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย จึงเป็นผลดีต่อร่างกาย ทำให้ความรุนแรงของโรคต่างๆ ลดลง ผลไม้หลายชนิดพบว่ามีสารสำคัญหลายชนิด โดยเฉพาะสารประกอบฟีนอลิกซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ในปัจจุบันมีการรับประทานผลไม้เพิ่มขึ้น เนื่องจากสารสำคัญที่อยู่ในผลไม้เป็นสารจากธรรมชาติ มีความปลอดภัย และมีคุณค่าทางอาหาร

ในงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งในหลอดทดลอง และเซลล์ ของสารสกัดจากผลไม้ไทยทั้ง 11 ชนิด ได้แก่ มะเฒ่าไข่ปลา (*Antidesma ghaesembilla*) จำปาตะ (Artocarpus integer) ตะลิงปลิง (*Averhoa bilimbi*) ทุเรียนหมอนทอง (*Durio zibethinus*) เชอร์รี่ไทย (*Malpighia glabra*) มะมุด (*Mangifera foetida*) มะม่วงอกร่อง (*Mangifera indica*) กล้วยน้ำว่า (*Musa x paradisiaca*) กระท้อนทับทิม (*Sandoricum koetjape*) ชมพู่มะเหมี่ยว (*Syzygium malaccense*) และพุทราหนามสด (*Zizyphus jujuba*) โดยทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง ด้วยวิธี DPPH assay และทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในเซลล์ โดยใช้เซลล์ human embryonic kidney 293 (HEK-293) นอกจากนี้ยังทดสอบผลของสารสกัดจากผลไม้ไทยต่อการสร้าง mRNA และโปรตีนของเอนไซม์ต้านออกซิเดชันชนิดต่างๆ ในเซลล์ HEK-293

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในหลอดทดลอง พบว่าสารสกัดจากเชอร์รี่ไทย มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด รองลงมาได้แก่สารสกัดจากกระท้อนทับทิม มะเฒ่าไข่ปลา มะม่วงอกร่อง ตะลิงปลิง มะมุด และชมพู่มะเหมี่ยว นอกจากนี้ยังพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลไม้ไทยมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่พบในผลไม้ โดยมีค่า R² เท่ากับ 0.9672 แสดงให้เห็นว่าสารประกอบฟีนอลิกที่พบได้ในผลไม้ น่าจะเป็นสารหลักที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในเซลล์ HEK-293 พบว่าสารสกัดจากมะม่วงอกร่อง พุทราหนามสด ชมพู่มะเหมี่ยว ตะลิงปลิง เชอร์รี่ไทย กระท้อนทับทิม และมะเฒ่าไข่ปลา ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยยับยั้งการเพิ่มขึ้นของ ROS ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย H₂O₂ ภายในเซลล์ HEK-293 กลไกในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลไม้ไทยเหล่านี้ เกิดขึ้นจากการที่สารสำคัญที่พบในสารสกัดดังกล่าวมีผลกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านออกซิเดชัน (antioxidant

enzymes) เช่น เอนไซม์ catalase, glutathione peroxidase (GPx), heme oxygenase-1 (HO-1) และ superoxide dismutase (SOD) เป็นต้น โดยไปเพิ่มการสร้างทั้ง mRNA และโปรตีนของเอนไซม์ดังกล่าว

ผลงานวิจัยนี้ช่วยสนับสนุนว่าการรับประทานผลไม้ไทย จะช่วยป้องกันและยับยั้งภาวะเครียดออกซิเดชันที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ได้ โดยมีผลเพิ่มการสร้างของเอนไซม์ต่างๆ ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

บทคัดย่อ

ภาวะเครียดออกซิเดชันมีความเกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพของโรคต่างๆ ดังนั้นการยับยั้งภาวะเครียดออกซิเดชันที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย จึงส่งผลดีทำให้การเกิดโรคต่างๆ ชะลอลง ในร่างกายเองก็มีกลไกต้านทานการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันโดยเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่พบได้ในเซลล์และเนื้อเยื่อ มีหลายการศึกษารายงานว่าผลไม้มีสารสำคัญหลายชนิดที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน เช่น สารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ คิวโนนและอัลคาลอยด์ ในปีปัจจุบันการบริโภคผลไม้ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเป็นที่นิยมกันมาก เนื่องจากสารสำคัญที่พบในผลไม้มีความปลอดภัยและมีคุณค่าทางอาหารอีกด้วย ถึงแม้ว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของผลไม้มีการศึกษาอย่างแพร่หลาย อย่างไรก็ตามผลของสารสำคัญที่พบในผลไม้ต่อการทำงานและการสร้างเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันยังไม่ทราบแน่ชัด ในงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่พบ ซึ่งสารสกัดผลไม้ที่มีปริมาณฟีนอลิกสูง จะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง โดยค่า R^2 เท่ากับ 0.9672 ดังนั้นสารประกอบฟีนอลิกที่พบได้ในผลไม้ น่าจะเป็นสารที่ออกฤทธิ์หลักในการต้านออกซิเดชัน นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังพบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลของ มะเฒ่าไข่ปลา (*Antidesma ghaesembilla*) ตะลิงปลิง (*Averhoa bilimbi*) เซอร์รี่ไทย (*Malpighia glabra*) มะม่วงอกร่อง (*Mangifera indica*) กระท้อนทับทิม (*Sandoricum koetjape*) ชมพู่มะเหมี่ยว (*Syzygium malaccense*) และ พุทราขนมสด (*Zizyphus jujuba*) มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยไปยับยั้งการเพิ่มขึ้นของอนุมูลออกซิเจนที่ว่องไว (reactive oxygen species) ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ภายในเซลล์ HEK-293 ฤทธิ์ดังกล่าวนี้เกิดจากการที่สารสำคัญในผลไม้ไปมีผลเพิ่มการสร้างทั้ง เอ็มอาร์เอ็นเอ และโปรตีนของเอนไซม์ที่ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน เช่น คาตาเลส กลูตาไธโอน เพอร์ออกซิเดสวัน และแมงกานีส ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเตส จากผลงานวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่าผลไม้ไทยมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยไปเพิ่มการสร้างเอนไซม์เหล่านี้

Abstract

Increased oxidative stress is involved in the pathophysiology of many diseases. The cellular antioxidant enzymes play the important role to protect the cells and organisms from the oxidative damage. Several studies demonstrated that fruits are a rich source of antioxidant compounds such as phenolics, flavonoids, quinones, and alkaloids. Natural antioxidants containing in fruits have attracted considerable interest because of their presumed safety and potential nutritional value. Even though antioxidant activities of many fruits have been reported, however, the effects of phytochemicals containing in fruits on the induction of antioxidant enzymes in the cells have not been fully defined. In this study, we found that several extracts from Thai fruits had antioxidant capacities and total phenolic contents. A high correlation ($R^2 = 0.9672$) between antioxidant capacity and total phenolic content indicated that phenolic compounds could be the major bioactive compounds showing potent antioxidant effects. We showed that extracts from *Antidesma ghaesembilla*, *Averrhoa bilimbi*, *Malpighia glabra*, *Mangifera indica*, *Sandoricum koetjape*, *Syzygium malaccense*, and *Ziziphus jujuba* attenuated H_2O_2 -induced intracellular reactive oxygen species production in HEK-293 cells. Additionally, these Thai fruit methanolic extracts increased the mRNA and protein expressions of antioxidant enzymes, catalase, glutathione peroxidase-1, and manganese superoxide dismutase. Data from our study provide evidence that Thai fruits exert the antioxidant effects through enhancing the production of antioxidant enzymes.

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญหลักการและเหตุผล

โรคเรื้อรัง เช่นโรคมะเร็ง โรคหัวใจและหลอดเลือด และอื่นๆ มีอุบัติการณ์เพิ่มขึ้นโดยเฉพาะกลุ่มประชากรในเมืองที่มีวิถีการดำเนินชีวิตอย่างเร่งรีบ รวมถึงเรื่องการรับประทานอาหาร ทำให้ได้สารอาหารไม่ครบถ้วน และสารที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย สาเหตุของโรคเรื้อรังส่วนใหญ่มีความสัมพันธ์กับอาหารที่รับประทาน มีหลายการศึกษาวิจัยว่าการไม่รับประทานผักและผลไม้หรือรับประทานน้อยมีอัตราเสี่ยงสูงต่อการเป็นโรคเรื้อรังต่างๆ

ผลไม้และผักต่างๆ จัดเป็นอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ เนื่องจากเป็นแหล่งของสารอาหาร วิตามิน เกลือแร่ และอินทรีย์สารจากพืช หรือไฟโตนิวเทรียนท์(phytonutrients) ซึ่งเป็นสารพฤกษเคมี หรือไฟโตเคมีคอล(phytochemical) ที่มีประโยชน์ต่อการทำงานของร่างกายและมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชัน และต้านอนุมูลอิสระ

อินทรีย์สารที่พบในผลไม้และผักมีหลายชนิด เป็นสารที่มักทำให้ผลไม้และผักมีสีที่สำคัญ ได้แก่ วิตามินซี แคโรทีนอยด์ (carotenoids) และสารกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenol) โดยอินทรีย์สารที่พบในผลไม้และผักที่ได้รับความสนใจมากเนื่องจากมีฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชัน และต้านอนุมูลอิสระ คือสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ และโพลีฟีนอล ซึ่งทำให้การบริโภคผลไม้และผักเป็นประโยชน์ในการป้องกันและรักษาโรคต่างๆ ที่มีสาเหตุจากอนุมูลอิสระ และปฏิกิริยาออกซิเดชัน

1.2 ทบทวนเอกสารเชิงสังเคราะห์

อินทรีย์สารที่พบในผลไม้และผักมีหลายชนิด เป็นสารที่มักทำให้ผลไม้และผักมีสีที่สำคัญ ได้แก่ วิตามินซี แคโรทีนอยด์ (carotenoids) และสารกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenol) (Ayyanar and Subash-Babu, 2012) โดยอินทรีย์สารที่พบในผลไม้และผักที่ได้รับความสนใจมากเนื่องจากมีฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชัน และต้านอนุมูลอิสระ คือสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ และโพลีฟีนอล ซึ่งทำให้การบริโภคผลไม้และผักเป็นประโยชน์ในการป้องกันและรักษาโรคต่างๆ ที่มีสาเหตุจากอนุมูลอิสระ และปฏิกิริยาออกซิเดชัน(Fu et al., 2010)

แคโรทีนอยด์เป็นสารกลุ่มเทอร์พีนมีโครงสร้างเป็นไฮโดรคาร์บอนสายยาวที่ไม่อิ่มตัว มีสีเหลือง สีส้ม จนถึงสีแดง สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่สำคัญและเป็นที่รู้จักกันดีได้แก่ แคโรทีน ไลโคปีน และลูทีน พบมากในผักและผลไม้ที่มีสีแดง ส้ม เหลือง และยังพบได้ในผักใบเขียว(ตารางที่ 1) (Khoo et al., 2008) และสำหรับบางชนิด สารกลุ่มนี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี นอกจากนี้แคโรทีนยังมีคุณสมบัติเป็นโปรวิตามินเอ คือสามารถเปลี่ยนเป็นวิตามินเอได้โดยตับ จึงมีประโยชน์ในการบำรุงสายตา ผิวหนัง กระดูก ฯลฯ

ส่วนสารกลุ่มโพลีฟีนอล หรือสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) ได้แก่ กรดฟีนอล (phenolic acids) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) แทนนิน (tannins) แซนโทน (xanthones) ลิกแนน (lignans) เป็นต้น (Kumazawa et al., 2007) โดยกลุ่มฟลาโวนอยด์ยังแบ่งเป็นกลุ่มย่อยๆ ตามโครงสร้างอีกหลายกลุ่มเช่น ฟลาวาโนน (flavanones) ฟลาโวน (flavones) ฟลาโวนอล (flavonols) ฟลาวานอล (flavanols) และแอนโทไซยานิดิน (anthocyanidins) เป็นต้น โดยสารประกอบฟีนอลิกที่

พบได้มากในผัก ผลไม้ (Fu et al., 2011; Fu et al., 2010; Assis et al., 2009) ดังตารางที่ 1 สารกลุ่มนี้นอกจากมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการเกิดออกซิเดชันแล้ว ยังมีรายงานว่า มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่นเช่น ฤทธิ์ต้านกรอักเสบ ต้านมะเร็ง ลดระดับไขมันและน้ำตาลในเลือด เป็นต้น (Schinella et al., 2002; Sun et al., 2002; Kurup and Mini, 2014; Zhang et al., 2011; Rabeta et al., 2013)

ตารางที่ 1. สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ และโพลีฟีนอลที่พบในผลไม้และผักต่าง ๆ

อินทรีย์สารจากพืช	ชนิดของผักผลไม้
1. แคโรทีนอยด์ (carotenoids)	
- เบต้าแคโรทีน (β -carotene)	แครอท ผักปวยเล้ง บร็อกโคลี่ มะม่วงสุก มะละกอ แอปริคอต พืช ฝรั่ง มะเขือเทศ แคนทาลูพีเนียนเทศ
- ไลโคปีน (lycopene)	มะเขือเทศ มะละกอ ฝรั่ง แตงโม ขนุน
- ลูทีน (lutein)	ผักปวยเล้ง บร็อกโคลี่ แครอท หน่อไม้ฝรั่ง มะเขือเทศ ผักกาดหอม แอปเปิ้ล แบล็คเบอร์รี่ บลูเบอร์รี่
2. สารกลุ่มฟีนอลิก (phenolic compounds)	
กรดฟีนอลิก (phenolic acids)	
- แกลลิก แอซิด (gallic acid)	มังกุด องุ่น ทับทิม มะขามป้อม
- เอลลาจิก แอซิด (ellagic acid)	ทับทิม สตรอเบอร์รี่ แบล็คเบอร์รี่ ราสเบอร์รี่ วอลนัท
ฟลาโวนอยด์ (flavonoids)	
- ฟลาโวนอล (flavonols) เช่น เคอควิทิน (quercetin) แคมป์เฟอรอล (kaempferol) ไมริซิทิน (myricetin)	หัวหอมใหญ่ หน่อไม้ฝรั่ง เบอร์รี่ ผักกาดหอม ผัก kale endive ปวยเล้ง เบอร์รี่ องุ่น กะหล่ำปลีแดง
- ฟลาโวน (flavones) เช่น ลูติโอลิน (luteolin) อาพิจินิน (apigenin)	พริกไทย อาร์ติโชค องุ่นแดง ส้ม อาร์ติโชค เซเลอรี่ หัวหอมแดง ผักกาดหอม
- ฟลาวานอน (flavanones) เช่น เฮสเพอริทิน (hesperetin) นารินจินิน (naringenin)	มะนาว ส้ม เลมอน เกรปฟรุต ส้ม อาร์ติโชค มะเขือเทศ
- ฟลาวานอล (flavanols) เช่น แคทีชิน catechin) อีพิกะทีชิน (epicatechin)	พืช เบอร์รี่ องุ่นแดง องุ่นแดง แอปริคอต แอปเปิ้ล
- แอนโทไซยานิดิน (anthocyanidins) เช่น ไซยานิดิน (cyanidin) เดลฟินิดิน (delphinidin) มาลวิดิน (malvidin)	เบอร์รี่ พลัม กะหล่ำปลีแดง เบอร์รี่ องุ่นแดง บลูเบอร์รี่ องุ่นแดง สตรอเบอร์รี่ หัวผักกาดแดง

จากตารางจะเห็นว่าผลไม้ประกอบด้วยอินทรีย์สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และด้านการเกิดออกซิเดชันมากมาย นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลไม้ไ้แก่ เบอร์รี่ต่าง ๆ แอปเปิ้ล องุ่นแดง พลัม พีช เลมอน กล้วย ส้ม เกรปฟรุ้ต สับปะรด มะขามป้อม หม่อน ฯลฯ (Puanppronpitag et al., 2008; Zhang and Lin, 2006; Aqil et al., 2012) โดยรายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และต้านออกซิเดชันของผลไม้ส่วนใหญ่เป็นการทดสอบแบบวิธี free radical scavenging activities แต่ยังไม่ค่อยมีการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในเซลล์ และผลต่อเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดออกซิเดชันในร่างกาย ดังนั้นผู้วิจัยมีความสนใจศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของผลไม้ไทยในระดับเซลล์และผลต่อ antioxidant enzymes ได้แก่ catalase (CAT), glutathione peroxidases-1 (GPx-1), heme oxygenase-1 (HO-1), manganese super oxide dismutases (Mn-SOD), super oxide dismutases-1 (SOD-1), glutathione S-transferase (GST) และ glutathione reductase (GRe)

ตัวอย่างผลไม้ที่มีรายงานการศึกษาสารสำคัญ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน เช่น มะม่วงหิมนะพานต์ มะเฒ่า จำปาตะ ตะลิงปลิง ส้มโอ ทูเรียน มะมุด เซอร์รี่ไทย มะม่วง กล้วย น้ำว้า ฝรั่งท่อน หว้า ชมพู่มะเหมี่ยว และพุทรา ซึ่งมีสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และด้านการเกิดออกซิเดชันโดยเฉพาะสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ และฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้ยังมีรายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านออกซิเดชันของผลไม้หลายชนิด (Gorinstein et al., 2011; Fu et al., 2011; Isabelle et al., 2010) ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2. ผลไม้ไทยที่มีรายงานสารสำคัญ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านออกซิเดชัน

ผลไม้	สารสำคัญในผล	วิธีศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
มะม่วงหิมนะพานต์ (<i>Anacardium occidentale</i> L.)	สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ เช่น α -carotene, β -carotene, ζ -carotene, cis- β -carotene, cryptoxanthin, สารกลุ่ม anthocyanin เช่น 3-O-hexoside of methyl-cyanidin สารกลุ่มฟลาโวนอล เช่น quercetin-3-O-glycosides, kaempferol-3-O-glucoside และ myricetin	ABTS และ nitric oxide radicals scavenging assays
มะเฒ่า (<i>Antidesma thwaitesianum</i> Muell.)	gallic acid, caffeic acid, monogalloyl glucoside, catechin สารกลุ่มแอนโทไซยานิน เช่น cyaniding-3-sophoroside, delphinidin-3-sambubioside และ pelargonidin-3-malonyl glucoside	ABTS และ DPPH assays
จำปาตะ (<i>Artocarpus integer</i> Merr.)	สารหอมระเหยเช่น 3-methylbutanoic acid และ 3-methylbutan-1-ol	DPPH, FRAP, ABTS assays

ผลไม้	สารสำคัญในผล	วิธีศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
ตะลิงปลิง (<i>Averrhoa bilimbi</i> L.)	วิตามินเอ วิตามินบี สารกลุ่มแคโรทีนอยด์	DPPH, FRAP, β -carotene bleaching assays
ส้มโอ (<i>Citrus grandis</i> [L.] Osbeck)	วิตามินซี สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ และฟลาโวนอยด์ เช่น naringin, naringenin และ hesperidin	ABTS, DPPH และ hydroxyl radical superoxide radical, scavenging assays, TEAC, ORAC และ FRAP assays
ทุเรียน (<i>Durio zibethinus</i> Murray)	สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ และฟลาโวนอยด์	ABTS, DPPH, CUPRAC, FRAP, TEAC
มะมุด (<i>Mangifera foetida</i> Lour.)	วิตามินเอ วิตามินบี สารกลุ่มแคโรทีนอยด์	β -carotene bleaching assay
เซอร์รี่ไทย (<i>Malpighia glabra</i> L. และ <i>Malpighia emarginata</i> DC.)	วิตามินซี วิตามินเอ dehydroascorbic acid, diketogulonic acids สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ เช่น quercitrin, สารกลุ่มแอนโทไซยานิน เช่น cyanidin-3- α -O-rhamnoside, pelargonidin-3- α -O-rhamnoside สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ เช่น β -carotene, β -cryptoxanthin, lutein, and violaxanthin	DPPH, AEAC, FRAP, TEAC, β -carotene bleaching assays
มะม่วง (<i>Mangifera indica</i> L.)	สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ เช่น β -carotene, lutein, α -carotene สารกลุ่มโพลีฟีนอล เช่น quercetin, kaempferol, gallic acid, caffeic acid, catechins และ tannins	electron spin resonance (ESR), และ DPPH assays,
กล้วย (<i>Musa acuminata</i>)	วิตามินเอ วิตามินบี สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ สารกลุ่มฟีนอลิก	DPPH และ ORAC
ฝรั่ง (<i>Psidium guajava</i> L.)	วิตามินซี สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ เช่น phytofluene, β -carotene, β -cryptoxanthin, γ -carotene, lycopene, rubixanthin, cryptoflavin, lutein, neochrome, ellagic acid, myricetin, apigenin และ สารกลุ่มแอนโทไซยานิน	ABTS, DMPD, DPPH, FRAP, TEAC, TOSC, ORAC และ β -carotene bleaching assays
กระท้อน (<i>Sandoricum koetjape</i> (Burm. f.) Merr.)	วิตามินซี วิตามินบี สารกลุ่มแคโรทีนอยด์	DPPH, FRAP, และ β -carotene bleaching assays

ผลไม้	สารสำคัญในผล	วิธีศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
หว่า (Syzygium cumini L.)	gallic acid, hydrolysable และ condensed tannins, anthocyanins เช่น delphinidin-3-gentiobioside, malvidin-3-laminaribioside, petunidin-3-gentiobioside, cyanidin diglycoside, petunidin และ malvidin	ABTS, DPPH, FRAP, hydroxyl and superoxide radical scavenging assays และ lipid peroxidation assay
ชมพู่มะเหมี่ยว (Syzygium malaccense (L.) Merrill & Perry)	วิตามินซี สารกลุ่มแคโรทีนอยด์, กลุ่มแอนโทไซยานิน เช่น cyanidin-3-O-glucoside, pelargonidin-3-O-glucoside, peonidin-O-glucoside, cyanidin-3,5-O-diglucoside, peonidin-3,5-odiglucoside และโพลีฟีนอลอื่นๆ เช่น quercitrin, rutin, quercetin, tannin, ellagic acid	ABTS, TEAC, DPPH และ FRAP assays
พุทรา (Ziziphus jujuba Mill)	วิตามินซี วิตามินเอ วิตามินบี สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ และสารกลุ่มฟีนอลิก เช่น caffeic acid, <i>p</i> -hydroxybenzoic acid, ferulic acid และ <i>p</i> -coumaric acid	DPPH, FRAP, β -carotene bleaching, superoxide anion radical, CUPRAC, และ TBARS assays

หมายเหตุ: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), N,N-dimethyl-p-phenylenediamine (DMPD) radical scavenging activity, ferric-ion-reducing antioxidant power (FRAP), Cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC), oxygen radical absorbance capacity (ORAC), Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), and total oxidant scavenging capacity (TOSC), antioxidant capacity equivalent to ascorbic acid (AEAC), Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

1.3 วัตถุประสงค์การวิจัย

- 1.3.1 เพื่อศึกษา fingerprint และวิเคราะห์หาปริมาณ total phenolic contents ของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทย
- 1.3.2 เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทย ต่อการยับยั้งภาวะ oxidative stress ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์
- 1.3.3 เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทย ต่อการแสดงออกของยีนต้านออกซิเดชัน (antioxidant genes) และการสร้างโปรตีนของเอนไซม์ที่ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่เกิดขึ้นภายในเซลล์

บทที่ 2 วัสดุและวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 ตัวอย่างผลไม้

ในงานวิจัยนี้ ทางคณะผู้วิจัยได้คัดเลือกผลไม้ไทย 11 ชนิด ดังนี้ มะเมาะไข้ปลา จำปาตะตะลิงปลิง ทุเรียนหมอนทอง เชอร์รี่ไทย มะมุด มะม่วงอกร่อง กล้วยน้ำว่า กระท้อนทับทิม ชมพูมะเหมี่ยว และพุทราหนมสด โดยมะเมาะไข้ปลา ตะลิงปลิง เก็บจาก อ. เมือง จ.ระนอง ตรวจสอบเอกลักษณ์โดย ศาสตราจารย์ วงศ์สถิตย์ ธีวกุลภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล จำปาตะซื้อจากตลาดในจังหวัดระนอง ส่วนผลไม้อื่นๆ ซื้อจากตลาดในกรุงเทพมหานคร

2.2 วัสดุและสารเคมี

- 2.2.1 TLC plate silica gel 60 F254 (Merck, layer thickness 0.2 mm)
- 2.2.2 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich)
- 2.2.3 Gallic acid (Sigma-Aldrich)
- 2.2.4 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox[®]) (Sigma-Aldrich)
- 2.2.5 Ascorbic acid (Sigma-Aldrich)
- 2.2.6 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich)
- 2.2.7 Hydrogen peroxide (Sigma-Aldrich)
- 2.2.8 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco)
- 2.2.9 Fetal bovine serum (Gibco)
- 2.2.10 0.25% Trypsin-EDTA solution, and penicillin/streptomycin solution (Gibco)
- 2.2.11 Methanol (Fisher Scientific, Analytical grade)
- 2.2.12 Ethanol (Merck, Analytical grade)
- 2.2.13 Ethyl acetate (Fisher Scientific, Analytical grade)
- 2.2.14 Dichloromethane (QRëC, Analytical grade)
- 2.2.15 PEG400 (Sigma-Aldrich)
- 2.2.16 Sulfuric acid (Merck)
- 2.2.17 Formic acid (Fisher Scientific)
- 2.2.18 Acetic acid (Lab-Scan)
- 2.2.19 Dichlorodihydrofluorescein (DCF) acetate (Sigma-Aldrich)
- 2.2.20 RNeasy mini kit (Thermo Fisher Scientific)
- 2.2.21 KAPA SYBR FAST one-step RT-qPCR (KAPAbiosystems)
- 2.2.22 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich)
- 2.2.23 PVDF membrane (BioRad)

- 2.2.24 Anti-GPx antibody (Cell Signaling)
- 2.2.25 Anti-catalase antibody (Cell Signaling)
- 2.2.26 Anti-Mn-SOD antibody (Cell Signaling)
- 2.2.27 Anti-GAPDH antibody (Cell Signaling)
- 2.2.28 Tris (Amresco)
- 2.2.29 Glycine (Amresco)
- 2.2.30 Sodium dodecyl sulfate (Amresco)
- 2.2.31 30% Acrylamide/Bis solution (BioRad)
- 2.2.32 Tween20 (Sigma-Aldrich)
- 2.2.33 Horseradish peroxide-conjugated anti-mouse IgG (GE Healthcare)
- 2.2.34 Horseradish peroxide-conjugated anti-rabbit IgG (GE Healthcare)
- 2.2.35 Chemiluminescent substrate (Thermo Scientific)
- 2.2.36 Leupeptin (Calbiochem)
- 2.2.37 Aprotinin (Calbiochem)

2.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 2.3.1 UV detector (CAMAG TLC Visualizer)
- 2.3.2 Sample applicator for TLC (CAMAG Linomat 5)
- 2.3.3 Rotary evaporator (Buchi)
- 2.3.4 Infinite M200 Microplate reader (Molecular device)
- 2.3.5 Tecan microplate reader (Tecan)
- 2.3.6 Multi-Detection microplate reader (BioTek Instruments)
- 2.3.7 IX-81 fluorescence microscope (Olympus)
- 2.3.8 KAPA SYBR FAST One-step RT-qPCR kit (KAPA biosystems)
- 2.3.9 Mx 3005p Real Time PCR system (Stratagene)
- 2.3.10 Bio-Rad protein assay kit (BioRad)
- 2.3.11 10cm culture dishes, 6-well plate, 12-well plate and 96-well plate (Corning)
- 2.3.12 CO₂ incubator (Binder)
- 2.3.13 Gel electrophoresis tank (BioRad)
- 2.3.14 Medical X-ray processor (Kodak)

2.4 วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยนี้ได้เลือกผลไม้ 11 ชนิด (ตารางที่ 1) ที่หาได้ตามฤดูกาล ที่มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน หรือยังไม่มีรายงานมาศึกษา เพื่อให้ได้ข้อมูลทางด้านฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเพิ่มเติม โดยเฉพาะผลต่อภาวะเครียดออกซิเดชันที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในเซลล์ HEK-293 และผลต่อการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant genes)

ตารางที่ 3. ผลไม้ไทยที่ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ลำดับ	ชื่อไทย/ชื่อวิทยาศาสตร์/วงศ์	รูป	ส่วนที่ใช้
1	มะเฒ่าไขปลา <i>Antidesma ghaesembilla</i> Gaertn. (Euphobiaceae)		ทั้งผล
2	จำปาตะ <i>Artocarpus integer</i> Merr. (Moraceae)		เนื้อผล
3	ตะลิงปลิง <i>Averhoa bilimbi</i> L. (Oxalidaceae)		ทั้งผล
4	ทุเรียนหมอนทอง <i>Durio zibethinus</i> L. cultivar Mon Thong (Bombacaceae)		เนื้อผล
5	เชอร์รี่ไทย <i>Malpighia glabra</i> L. (Malpighiaceae)		เนื้อและเปลือกผล
6	มะมุด <i>Mangifera foetida</i> Lour. (Anacardiaceae)		เนื้อผล
7	มะม่วงอกร่อง <i>Mangifera indica</i> L. cultivar Aok Rong (Anacardiaceae)		เนื้อผล

ลำดับ	ชื่อไทย/ชื่อวิทยาศาสตร์/วงศ์	รูป	ส่วนที่ใช้
8	กล้วยน้ำว้า <i>Musa × paradisiaca</i> cultivar Namwa (Musaceae)		เนื้อผล
9	กระทอนทับทิม <i>Sandoricum koetjape</i> (Burm. f.) Merr. cultivar Tuptim (Meliaceae)		เนื้อผลและเนื้อหุ้มเมล็ด
10	ชมพู่มะเหมี่ยว <i>Syzygium malaccense</i> (L.) Merrill & Perry (Myrtaceae)		เนื้อและเปลือกผล
11	พุทราหนามสด <i>Ziziphus jujuba</i> Mill. cultivar Milk Jujube (Rhamnaceae)		เนื้อและเปลือกผล

2.4.1 การเตรียมสารสกัดผลไม้

- นำส่วนที่ใช้รับประทานของผลไม้แต่ละชนิดป่นให้เป็นชิ้นเล็กลง แล้วแช่แข็ง
- ทำให้ตัวอย่างผลไม้แห้งโดยใช้เครื่อง freeze dryer บดตัวอย่างที่แห้งแล้วให้เป็นผง
- นำผงตัวอย่างผลไม้ชนิดละ 50 g สกัดโดยการหมักด้วย methanol (AR grade) 2 ครั้ง ครั้งละประมาณ 300 ml กรองสารละลายที่ได้
- รวบรวมสารสกัดที่ได้ แล้วทำให้แห้งด้วย rotary evaporator และ freeze dryer

2.4.2 การทำ fingerprint ของสารสกัดผลไม้แต่ละชนิดโดยวิธี TLC

- เตรียมสารละลายของสารสกัดผลไม้แต่ละชนิดความเข้มข้นประมาณ 30 mg/ml ใน methanol (AR grade)
- นำสารละลายที่ได้ขีดบนแผ่น TLC ปริมาตร 5-10 µl โดยใช้เครื่อง Sample applicator for TLC (CAMAG Linomat 5)
- นำแผ่น TLC (Silica gel 60 GF254) ไปใส่ใน TLC tank ที่บรรจุตัวทำละลายเคลื่อนที่เป็น 10:90 methanol : methylene chloride (AR grade)

— ตรวจสอบลักษณะการแยกของสารภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร และพ่นด้วยสารละลาย 30% sulfuric acid in methanol (AR grade) และ natural products-polyethylene glycol reagent (1% diphenylborinic acid in methanol (AR grade) and 5% polyethylene glycol 400 in ethanol (AR grade))

— บันทึกภาพด้วยเครื่องUV detector (CAMAG TLC Visualizer)

2.4.3 การวิเคราะห์หาปริมาณ total phenolic content ด้วยวิธี Folin Ciocalteu Method

— เตรียมสารละลายของสารสกัดผลไม้แต่ละชนิดใน 50% methanol (AR grade) ความเข้มข้น 1.5 mg/ml (ความเข้มข้นสุดท้ายหลังจากผสมสารละลายต่างๆ เป็น 200 µg/ml)

— เตรียมสารละลายมาตรฐาน gallic acid เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 225 mg/ml และ 150 mg/ml (ความเข้มข้นสุดท้ายหลังจากผสมสารละลายต่างๆ เป็น 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 15, 20 µg/ml)

— เติม 10% Folin-Ciocalteu's phenol reagent หลุมละ 50 µl และสารละลายมาตรฐาน gallic acid หรือสารละลายตัวอย่าง หรือ ตัวทำละลาย (blank) หลุมละ 20 µl ลงใน 96-well microtiter plates อย่างละ 3 หลุม

— ทิ้งไว้ 3 นาที เติมสารละลาย 7.5% w/v anhydrous sodium carbonate หลุมละ 80 µl

— ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ด้วยเครื่อง Infinite M 200 Microplate Reader (Tecan)

— คำนวณหาปริมาณ total phenolic content ของสารสกัดผลไม้ ในรูปของ gallic acid equivalent/100 g ของสารสกัด และตัวอย่างแห้ง (mg GAE/100 g crude extract and dried sample) โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของการดูดกลืนแสงของ gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ

2.4.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

2.4.4.1 TLC Method

— เตรียม TLC ของสารละลายของสารสกัดผลไม้แต่ละชนิดเช่นเดียวกับข้อ 2

— พ่นด้วยสารละลาย 0.2% w/v DPPH ใน methanol (AR grade)

— บันทึกภาพทันทีหลังพ่นสารละลาย 0.2% w/v DPPH และที่เวลา 8 และ 24 ชั่วโมง

2.4.4.2 Microplate method

— เตรียมสารละลายของสารสกัดผลไม้แต่ละชนิดความเข้มข้น 2 mg/ml ใน methanol (AR grade)

— เตรียมสารละลาย 0.02% w/v DPPH ใน methanol (AR grade)

— ใส่สารละลายลงใน microplate ดังนี้

A (test sample): สารละลายของสารสกัดผลไม้ 100 µl และสารละลาย DPPH 100 µl

B (blank): สารละลายของสารสกัดผลไม้ 100 µl และ methanol 100 µl

C (control): สารละลาย DPPH 100 µl และ methanol 100 µl

โดยทำอย่างละ 3 หลุม ทำ 3 ครั้ง

- Incubate ที่ 30 °C เป็นเวลา 30 นาที และนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ด้วยเครื่อง Infinite M 200 Microplate reader (Tecan)
- คำนวณหาค่าร้อยละของการยับยั้งดังสมการ% inhibition = $[C-(A-B)] \times 100/C$
- วิเคราะห์หาค่า IC₅₀ ของสารสกัดที่มีค่าร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH มากกว่า 50 ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml

2.4.5 การเลี้ยงเซลล์

เซลล์ Human embryonic kidney-293 (HEK-293) จะเลี้ยงใน Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่ประกอบไปด้วย 10% fetal bovine serum และ 1% penicillin-streptomycin ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO₂

2.4.6 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity test) ของสารสกัดผลไม้โดยวิธี MTT assay

ก่อนที่จะนำสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทยมาทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในเซลล์ จะต้องทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ก่อน โดยทำได้ดังนี้

เลี้ยงเซลล์ HEK-293 (10,000 เซลล์ต่อหลุม) ใน 96-well culture plate นานประมาณ 12-24 ชั่วโมงใน DMEM ปริมาตร 200 µl ที่ประกอบไปด้วย 1% fetal bovine serum และ 1% penicillin-streptomycin จากนั้นใส่สารสกัดผลไม้ไทย ในความเข้มข้นตั้งแต่ 0.01 µg/ml ถึง 2 mg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้ตัวทำละลาย (solvent) คือ methanol (MeOH) เป็นกลุ่มควบคุม (control) โดยสารสกัดแต่ละความเข้มข้น จะทำซ้ำสองครั้ง (2 duplicated wells) หลังจาก 24 ชั่วโมง เซลล์แต่ละหลุม จะถูกใส่ด้วยสาร MTT เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นเซลล์จะถูกล้างด้วย PBS หนึ่งครั้ง และใส่ DMSO ลงไปในเซลล์แต่ละหลุม เพื่อใช้ละลาย formazan crystal จะเห็นเป็นสีม่วง ทำการวัดความเข้มของสีม่วงโดยใช้เครื่อง UV spectrophotometer microplate reader ที่ความยาวคลื่น 595 nm ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นดังกล่าวจะแปรผันกับจำนวนเซลล์ (cell number) ที่มีอยู่ในแต่ละหลุม ร้อยละของจำนวนเซลล์ในแต่ละหลุมจะคำนวณได้จากสมการข้างล่างนี้

$$\% \text{ cell viability} = (\text{Absorbance of treated cells}) / (\text{Absorbance of control cells}) \times 100$$

2.4.7 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชันของสารสกัดผลไม้

2.4.7.1 การวัดปริมาณ reactive oxygen species (ROS) ที่เกิดขึ้น โดยใช้ microplate reader

— ทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทย โดยวิธีวัดปริมาณอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากการเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยใช้เซลล์ HEK-293 ซึ่งจะแบ่งการทดลองออกเป็นกลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 HEK-293 ซึ่งได้รับ methanol (solvent)

กลุ่มที่ 2 HEK-293 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์

กลุ่มที่ 3 HEK-293 ซึ่งได้รับสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทย (ที่ความเข้มข้น 10 และ 100 µg/ml) ก่อนที่จะถูกกระตุ้นด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

กลุ่มที่ 4 HEK-293 ซึ่งได้รับวิตามินซี ก่อนที่จะถูกกระตุ้นด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

เซลล์ดังกล่าวที่ถูกกระตุ้นแล้วจะทำการศึกษาฤทธิ์ ด้านการเกิดออกซิเดชันของสารสกัดที่ได้จากผลไม้ไทย

— ทำการวัดปริมาณ ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์โดยใช้สาร 2,7-dichlorodihydro-fluorescein diacetate (DCF-DA) ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับ ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์จะได้สารเรืองแสงที่ชื่อว่า DCF เซลล์ HEK-293 จำนวน 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใน 24-well plates จะถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทย (crude extract) ในปริมาณต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเซลล์จะถูกกระตุ้นให้เกิด ROS โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ปริมาณ 200 ไมโครโมลาร์ (µM) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเซลล์จะถูกล้างด้วย PBS (phosphate buffer saline) และเติมสาร DCFH-DA ลงไป เก็บเซลล์ไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที และล้างเซลล์อีกครั้งด้วย PBS จากนั้นทำการวัดปริมาณการเปล่งแสงของ DCF (fluorescent intensity) โดยใช้เครื่อง multi-detection microplate reader (BioTek Instruments) ที่ความยาวคลื่น 485 nm สำหรับ excitation และที่ความยาวคลื่น 530 nm สำหรับ emission

2.4.7.2 การวัดปริมาณ reactive oxygen species (ROS) ที่เกิดขึ้น โดยใช้กล้องฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescent microscope)

— ทำการวัดปริมาณ ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์โดยใช้สาร 2,7-dichlorodihydro-fluorescein diacetate (DCF-DA) ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับ ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์จะได้สารเรืองแสงที่ชื่อว่า DCF เซลล์ HEK-293 จำนวน 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใน 35-mm glass based dish จะถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดด้วยเมทานอลของใบรางจืดในปริมาณต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเซลล์จะถูกกระตุ้นให้เกิด ROS โดยใช้ H_2O_2 ปริมาณ 200 µM เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเซลล์จะถูกล้างด้วย PBS และเติมสาร DCFH-DA ลงไป เก็บเซลล์ไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการวัดปริมาณการเปล่งแสงของ DCF (DCF fluorescent intensity) โดยใช้กล้องฟลูออเรสเซนซ์

2.4.8 ทดสอบฤทธิ์ ของสารสกัดที่ได้จากผลไม้ไทยต่อการสร้าง antioxidant enzymes

2.4.8.1 วัดปริมาณ mRNA ของ antioxidant genes

— หลังจากทราบว่สารสกัดผลไม้ไทยชนิดใดที่มีฤทธิ์ ด้านออกซิเดชันในเซลล์แล้วต่อไป จะทำการทดสอบว่าสารสกัดดังกล่าวสามารถกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ต้านออกซิเดชันชนิดต่างๆ ได้หรือไม่ โดยการวัดปริมาณของ mRNA ที่เพิ่มขึ้นหลังการกระตุ้นด้วยสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทย เนื่องจากปริมาณที่เพิ่มขึ้นของ antioxidant enzymes ต่างๆ จะเป็นตัวบ่งบอกถึงฤทธิ์ ด้านออกซิเดชันโดยทำการวัดปริมาณของ mRNA ของ antioxidant enzymes โดยวิธี RT-qPCR ดังนี้

— ในขั้นตอนแรก ทำการสกัด RNA ของเซลล์โดยใช้ชุดสกัด Rneasy Mini kit (Qiagen) หลังจากนั้นนำ RNA ที่สกัดได้จากเซลล์มาวัดปริมาณของ mRNA ที่เพิ่มขึ้นหลังการกระตุ้น

ด้วยสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทย โดยใช้ชุดทดสอบจาก KAPA SYBR FAST One-step RT-qPCR kit (KAPA biosystems) และนำตัวอย่างเข้าเครื่อง Mx 3005p Real Time PCR system (Stratagene) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ mRNA และ primer ที่ใช้ในการวัดการสร้าง mRNA ของยีนต่าง ๆ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4

ตารางที่ 4. ลำดับ sequence ของ primers ของเอนไซม์ต้านออกซิเดชันชนิดต่าง ๆ

Gene specific primers		Sequences
Human GPx-1	Sense	5'-ctcttcgagaagtgcgaggt-3';
	Antisense	5'-tcgatgtcaatggtctggaa-3'
Human catalase	Sense	5'-gcagatacctgtgaactgtc-3'
	Antisense	5'-gtagaatgtccgcacctgag-3'
Human heme oxygenase-1	Sense	5'-caggcagagaatgctgag-3'
	Antisense	5'-gcttcacatagcgctgca-3'
Human Mn-SOD	Sense	5'-gcacattaacgcgcagatca-3'
	Antisense	5'-agcctccagcaactctcctt-3'
Human SOD1	Sense	5'-aaggccgtgtgctgaa-3'
	Antisense	5'-caggtctccaacatgcctct-3'
Human GST	Sense	5'-cggagacctcacctgtaccagtc-3'
	Antisense	5'-gcagcaagtccagcaggtgtagtca-3'
Human GRe	Sense	5'-cagtgggactcacggaagat-3'
	Antisense	5'-ttcactgcaacagcaaaacc-3'
Human GAPDH (ตัวควบคุม)	Sense	5'-cgagatccctccaaaatcaa-3'
	Antisense	5'-gtcttctgggtggcagtgat-3'

หมายเหตุ: catalase (CAT), glutathione peroxidases-1 (GPx-1), heme oxygenase-1 (HO-1), manganese superoxide dismutases (Mn-SOD), superoxide dismutases-1 (SOD-1), glutathione S-transferase (GST), glycy radical enzyme (GRe) และ glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)

2.4.8.2 วัดปริมาณโปรตีนของ antioxidant enzymes โดยวิธี Western blotting

— หลังจากทราบว่สารสกัดผลไม้ไทยชนิดใดที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในเซลล์แล้วต่อไปจะทำการทดสอบว่าสารสกัดดังกล่าวสามารถกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ต้านออกซิเดชัน (antioxidant enzymes) ได้หรือไม่ โดยการวัดปริมาณโปรตีน (protein expression) ที่เพิ่มขึ้นหลังการกระตุ้นด้วยสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทย เนื่องจากปริมาณที่เพิ่มขึ้นของ antioxidant

enzymes ต่างๆ จะเป็นตัวบ่งบอกถึงฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน โดยทำการวัดปริมาณโปรตีนของ antioxidant enzymes ชนิดต่างๆ โดยวิธี Western blotting ดังนี้

- หลังจากกระตุ้นด้วยสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทย เซลล์ HEK-293 จะถูกล้างด้วย phosphate buffer saline (PBS) จากนั้นเซลล์จะถูกย่อยเพื่อสกัดเอาเฉพาะโปรตีนด้วย lysis buffer ซึ่งประกอบด้วย 20mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.8% Triton X-100, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10% glycerol, 100 μ M PMSF, 5 μ g/ml aprotinin and 5 μ g/ml leupeptin จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที แล้วเก็บเอาส่วนที่เป็น supernatant เอาไว้ โดยทำการหาปริมาณของโปรตีนทั้งหมดใน supernatant ด้วย Bio-rad protein assay kit โดยใช้ bovine serum albumin เป็นสารมาตรฐาน

- ดูด supernatant ประมาณ 10-20 μ l (โดยคำนวณให้ปริมาณ total protein ในแต่ละตัวอย่างมีปริมาณเท่ากัน) ผสมกับ 4xloading buffer แล้วนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นใส่สารดังกล่าวลงใน 10% SDS-PAGE ทำการ run gel ด้วยเครื่อง gel electrophoresis เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง

- นำแผ่นเจลที่ได้ มาวางทับกับ PVDF membrane ทำการ transfer โปรตีนทั้งหมดที่อยู่บนเจลไปยังแผ่น PVDF โดยใช้ transfer buffer ทำการ transfer เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำเอาแผ่น PVDF มาใส่ใน blocking agent (5% skimmed milk) วางบนเครื่อง rocker เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

- ล้างแผ่น PVDF แล้วแช่ลงในสารละลายที่มี primary antibodies เช่น anti-GPx, anti-catalase, anti-MnSOD และ anti-GAPDH (ความเข้มข้นของ antibody เท่ากับ 1:2000) เป็นเวลาดำเนิน (overnight) จากนั้นทำการล้างแผ่น PVDF แล้วแช่แผ่นลงในสารละลายที่มี secondary antibodies เช่น HRP-conjugated anti-rabbit antibody วางบนเครื่อง rocker เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

- ล้างแผ่น PVDF และนำแผ่นดังกล่าวแช่ลงในสารละลายที่มี chemiluminescent reagent (Chemiluminescence detection system) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำแผ่น PVDF ไปส่องเพื่อหา band ของโปรตีนที่สนใจด้วยเครื่อง Gel documentation (Syngene) หรือเครื่อง Medical X-ray processor (Kodak)

บทที่ 3 ผลการวิจัย

3.1 การเตรียมสารสกัดผลไม้

การเตรียมสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ 11 ชนิด พบว่า % yield และลักษณะสารสกัดด้วยเมทานอลจากผลไม้แต่ละชนิดหลังทำให้แห้งด้วย rotary evaporator และ freeze dryer แตกต่างกันดังในตารางที่ 5

ตารางที่ 5. ปริมาณและลักษณะของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทย 11 ชนิด

ผลไม้	น้ำหนักเนื้อสด (g)	น้ำหนักเนื้อแห้ง (g)	น้ำหนักสารสกัด (g)/50 g เนื้อแห้ง	% yield*	ลักษณะสารสกัดด้วยเมทานอลหลังทำให้แห้ง
มะเฒ่าไขปลา	107.0	27.9	9.27**	4.83	สารหนืดสีม่วงแดง
จำปาตะ	1,106.7	370.7	10.23	6.85	สารหนืดสีเหลือง
ตะลิงปลิง	3,368.2	209.3	21.57	2.68	สารหนืดสีเหลืองเขียว
ทุเรียนหมอนทอง	920.8	367.2	6.09	4.86	สารหนืดสีเหลืองอ่อน
เชอร์รี่ไทย	570.0	54.5	23.02	4.40	สารหนืดสีเหลือง
มะมุด	2,983.9	535.2	18.78	6.74	สารหนืดสีเหลือง
มะม่วงอกร่อง	1,264.4	229.9	25.08	9.12	สารหนืดสีเหลือง
กล้วยน้ำว้า	1,056.6	328.5	11.64	7.24	สารหนืดสีเหลืองอ่อน
กระท้อนทับทิม	1,308.1	242.1	25.08	9.28	สารหนืดสีชมพู
ชมพู่มะเหมี่ยว	1,364.1	125.9	23.20	4.28	สารหนืดสีแดง
พุทราหนามสด	940.0	109.7	32.70	7.63	สารหนืดสีเหลืองอ่อน

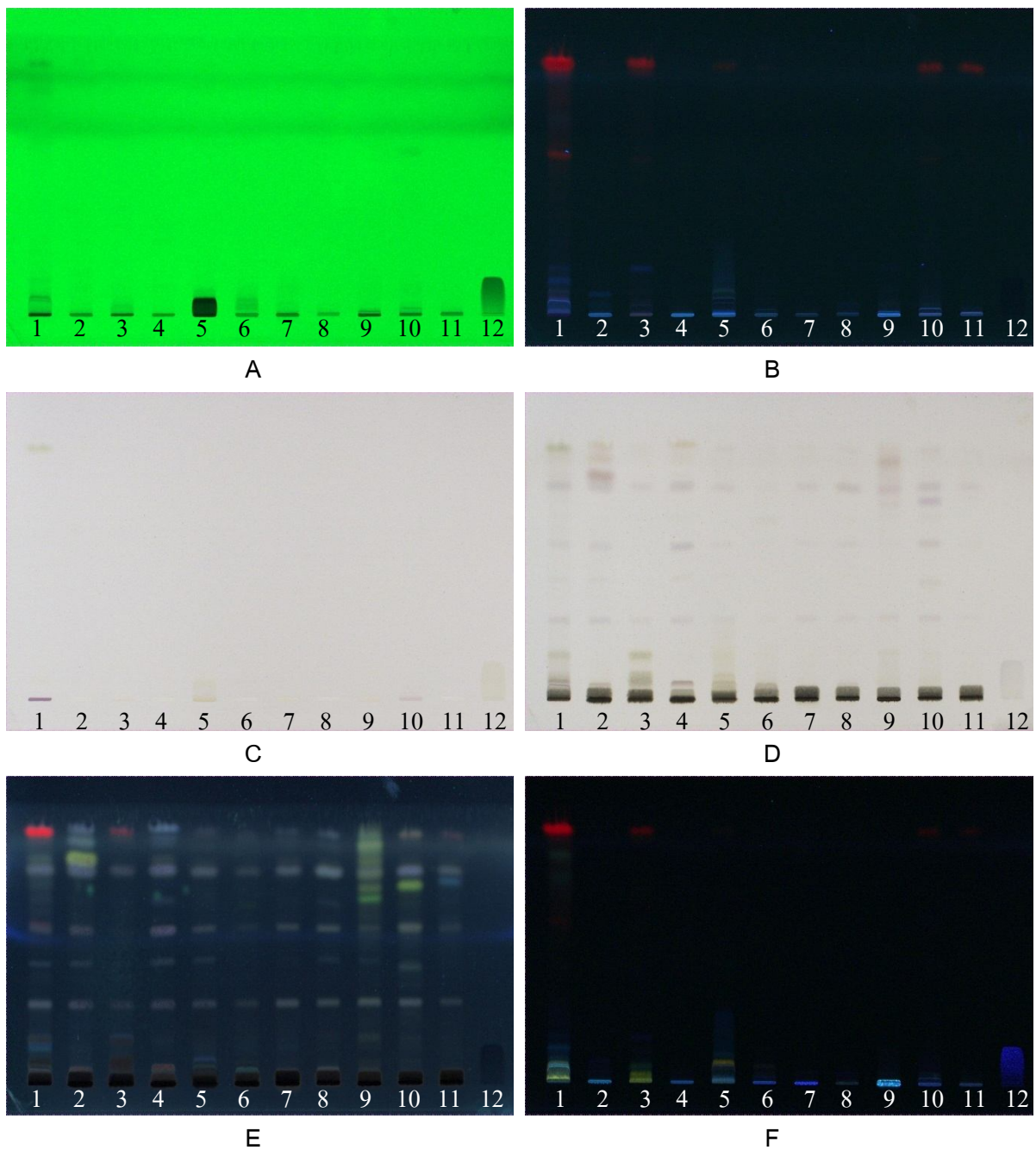
*คิดต่อน้ำหนักเนื้อผลสด

**น้ำหนักสารสกัดต่อน้ำหนักเนื้อแห้งรวมเมล็ด

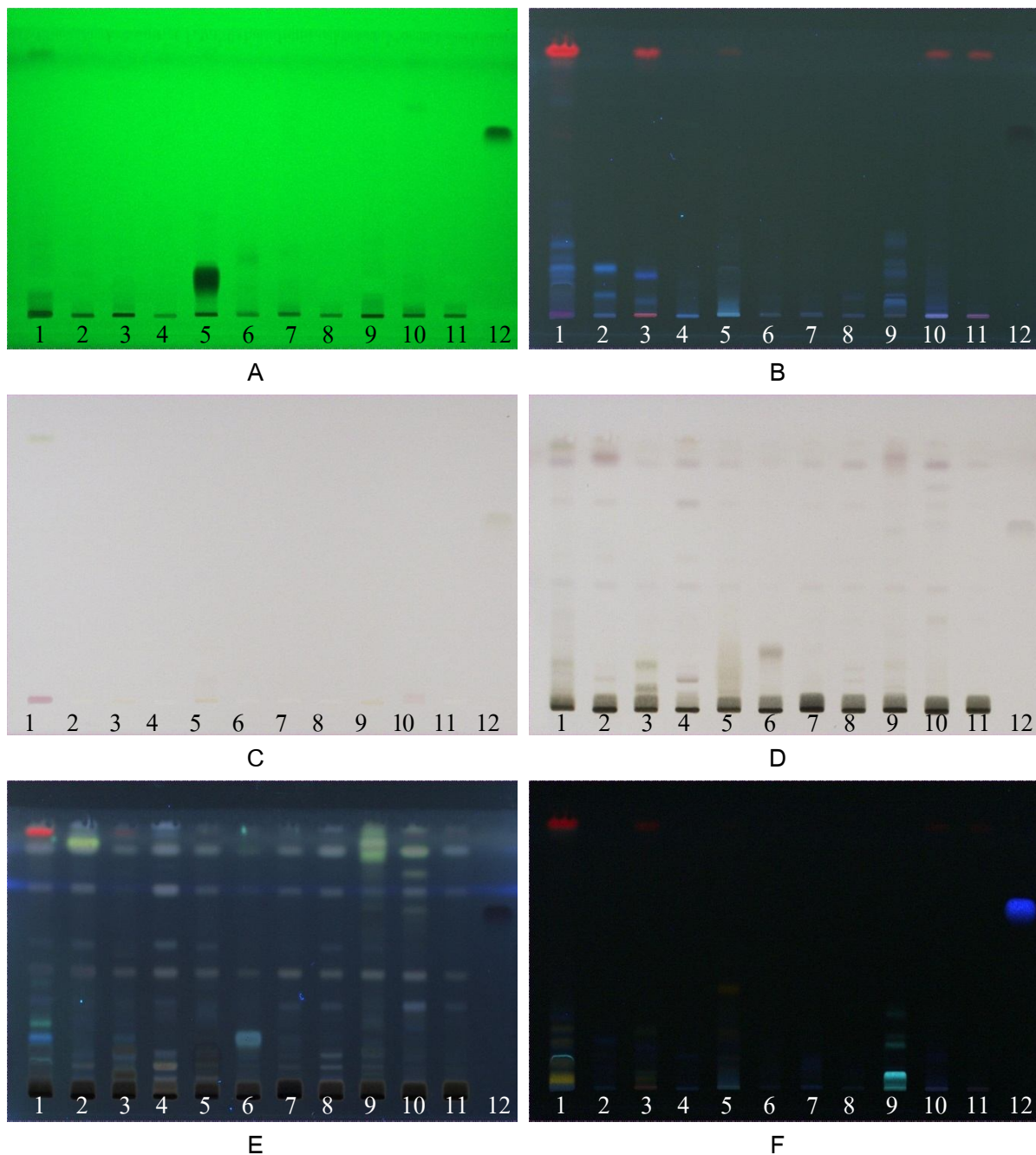
3.2 การทำ fingerprint ของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้แต่ละชนิดโดยวิธี TLC

การทำ fingerprint ของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้แต่ละชนิดโดยวิธี TLC โดยใช้วัสดุภาคคงที่เป็น Silica gel 60 F₂₅₄ วัสดุภาคเคลื่อนที่เป็น methanol : methylene chloride [1:9] และ ethyl acetate : methylene chloride : formic acid : acetic acid : น้ำ [100:25:10:10:11] ตรวจสอบแถบสารด้วย UV detector ความยาวคลื่น 254 และ 365 nm และพ่นด้วย 30% sulfuric acid ใน methanol และ natural products-polyethylene glycol reagent (NP/PEG) ได้ผลดัง(รูปที่ 1 และ 2)

จากข้อมูล TLC chromatograms พบว่าสารประกอบในสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้แต่ละชนิดแตกต่างกัน เมื่อตรวจสอบสารกลุ่ม flavonoids โดยพ่นแผ่น TLC ด้วย NP/PEG พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลของมะเฒ่าไขปลา ตะลิงปลิง เชอร์รี่ไทย และกระท้อนทับทิม น่าจะมีสารกลุ่ม flavonoids เนื่องจากปรากฏแถบเรืองแสงสีเหลืองสีส้ม แลสีเหลืองเขียว ภายใต้ UV 365 nm



รูปที่ 1. TLC chromatograms ของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทย 11 ชนิด คือ 1: มะเฒ่า ไข่ปลา, 2: จำปาตะ, 3: ตะลิงปลิง, 4: ทุเรียนหมอนทอง, 5: เชอร์รี่ไทย, 6: มะมุด, 7: มะม่วงอกร่อง, 8: กล้วยน้ำว้า, 9: กระท้อนทับทิม 10: ชมพู่มะเหมี่ยว, 11: พุทราณมสด และสารเทียบ 12: gallic acid; วัฏภาคเคลื่อนที่ methanol : methylene chloride [1:9]; Detector: A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = white light, D = 30% H_2SO_4 / white light, E = 30% H_2SO_4 / UV 366 nm, F = NP/PEG/ UV 366 nm



รูปที่ 2. TLC chromatograms ของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ 11 ชนิด คือ 1: มะเฒ่าไขปลา, 2: จำปาตะ, 3: ตะลิงปลิง, 4: พุริณหมอนทอง, 5: เซอร์รี่ไทย, 6: มะมุด, 7: มะม่วงอกร่อง, 8: กล้วยน้ำว้า, 9: กระท้อนทับทิม, 10: ชมพู่มะเหมี่ยว, 11: พุทราณมสด และสารเทียบ 12: gallic acid; วัฏภาคเคลื่อนที่ ethyl acetate : methylene chloride : formic acid : acetic acid : น้ำ [100:25:10:10:11]; Detector: A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = white light, D = 30% H₂SO₄/ white light, E = 30% H₂SO₄/ UV 366 nm, F = NP/PEG/ UV 366 nm

3.3 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ total phenolic content ด้วยวิธี Folin Ciocalteu Colorimetry

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม โดยใช้วิธีFolin-Ciocalteu colorimetry ของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทยทั้ง 11 ชนิด ในรูปของ gallic acid equivalent/100 g ของสารสกัด และตัวอย่างแห้ง โดยเปรียบเทียบการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทยหลังทำปฏิกิริยากับFolin Ciocalteu reagent (ภาคผนวก ก, ตารางที่ 9) กับกราฟมาตรฐานดูดกลืนแสงของ gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ (ภาคผนวก ก, ตารางที่ 8) พบว่าสารสกัดของเชอร์รี่ไทยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากที่สุด รองลงมาคือกระท้อนทับทิม และมะเฒ่าไข่ปลา โดยมีค่าเท่ากับ 16,450.7, 2,597.1 และ 2,036.9 mg gallic acid equivalent ในสารสกัด 100 g ตามลำดับ และเท่ากับ 723.8, 241.0 และ 98.3 mg gallic acid equivalent ในเนื้อผลไม้สด 100 g ตามลำดับ ส่วนในเนื้อผลไม้แห้งพบว่าในเนื้อแห้งของเชอร์รี่ไทยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากที่สุด รองลงมาคือกระท้อนทับทิม และตะลิงปลิง โดยมีค่าเท่ากับ 1,573.9, 1,302.7 และ 543.5 mg gallic acid equivalent ในเนื้อผลไม้แห้ง 100 g ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6. ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ในรูป gallic acid equivalent/100 g ของสารสกัดและผลไม้แห้งและสด

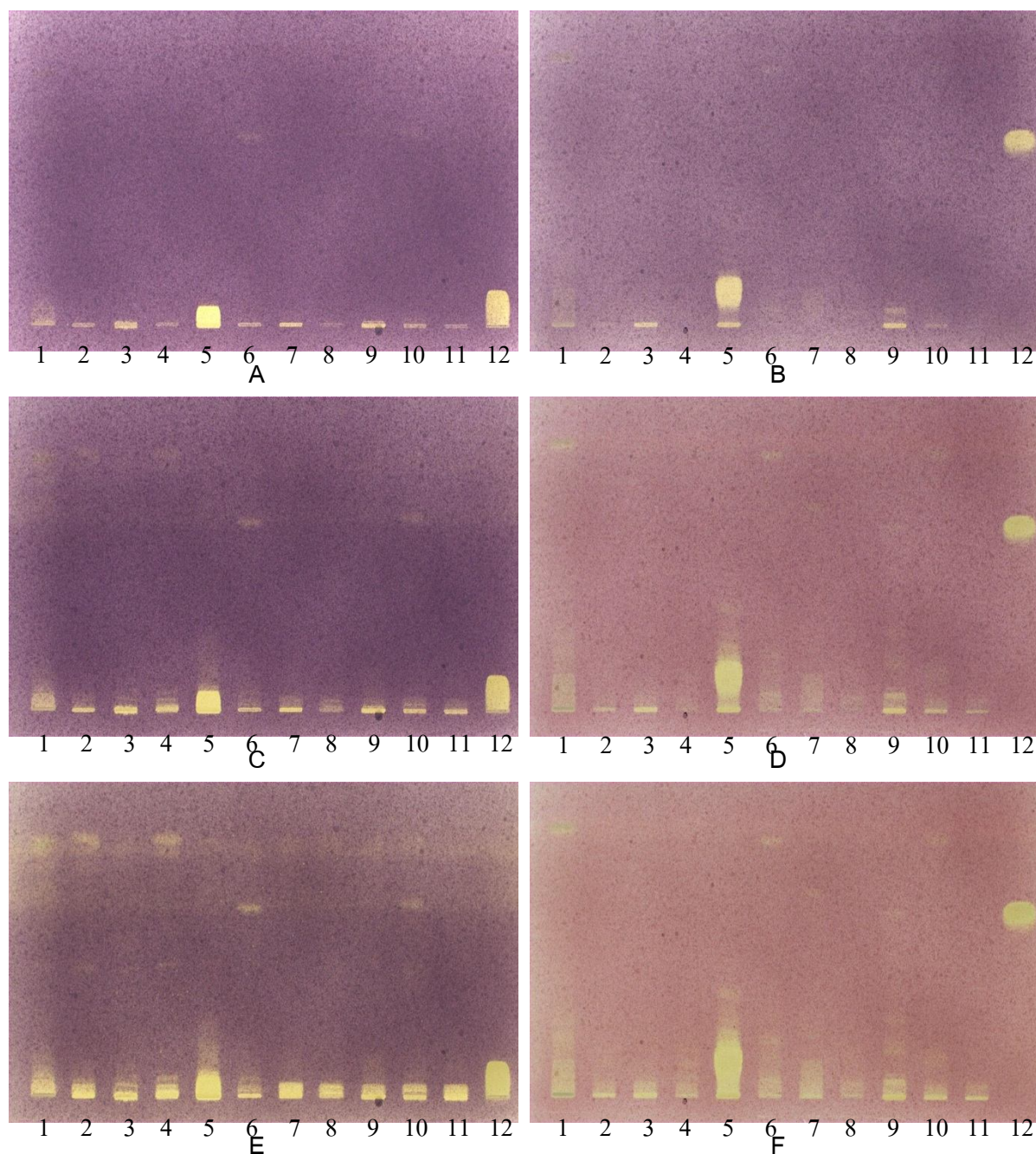
สารสกัดด้วย เมทานอลของ ผลไม้	gallic acid equivalent		
	mg/100 g สารสกัด	mg/100 g ผลไม้แห้ง	mg/100 g ผลไม้สด
มะเฒ่าไข่ปลา	2,036.9 ± 134.1	377.6 ± 24.9	98.4 ± 6.5
จำปาตะ	313.1 ± 33.3	64.1 ± 6.8	21.5 ± 2.3
ตะลิงปลิง	1,259.9 ± 51.1	543.5 ± 22.0	33.8 ± 1.4
ทุเรียนหมอนทอง	198.5 ± 14.7	24.2 ± 1.8	9.6 ± 0.7
เชอร์รี่ไทย	16,450.7 ± 839.5	7573.9 ± 386.5	723.8 ± 36.9
มะมุด	576.1 ± 46.8	216.4 ± 17.6	38.8 ± 3.2
มะม่วงอกร่อง	497.7 ± 14.6	249.6 ± 7.3	45.4 ± 1.3
กล้วยน้ำว้า	4.7 ± 2.0	1.1 ± 0.5	0.3 ± 0.2
กระท้อนทับทิม	2,597.1 ± 177.9	1302.7 ± 89.2	241.0 ± 16.5
ชมพูมะเหมี่ยว	690.4 ± 21.2	320.3 ± 9.8	29.6 ± 0.9
พุทราขนมสด	593.6 ± 45.3	388.2 ± 29.6	45.3 ± 3.4

3.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระDPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

3.4.1 TLC method

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระDPPH ด้วย TLC พบว่าหลังจากพ่นสารละลาย DPPH ใน methanol บนแผ่น TLC ของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ชนิดต่างๆ ที่แยกโดยใช้วัฏภาคคงที่

เป็น Silica gel 60 F₂₅₄ และวัฏภาคเคลื่อนที่เป็น methanol: methylene chloride [1:9] และ ethyl acetate : methylene chloride : formic acid : acetic acid : น้ำ [100:25:10:10:11] ได้ผลดังรูปที่ 3



รูปที่ 3. TLC chromatograms ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ 11 ชนิด คือ 1: มะเมีไ้ไขปลา, 2: จำปาตะ, 3: ตะลิงปลิง, 4: ทุเรียนหมอนทอง, 5: เชอร์รี่ไทย, 6: มะมุด, 7: มะม่วงอกร่อง, 8: กล้วยน้ำว้า, 9: กระท้อนทับทิม, 10: ชมพู่มะเหมี่ยว, 11: พุทธานมสด และสารเทียบ 12: gallic acid; วัฏภาคเคลื่อนที่ A, C, E = MeOH : CH₂Cl₂ [1:9] และ B, D, F = EtOAc : CH₂Cl₂ : formic acid : acetic acid : น้ำ [100:25:10:10:11], ตรวจสอบหลังพ้นสารละลาย DPPH A, B = 0 ชั่วโมง, C, D = 8 ชั่วโมง, E, F = 24 ชั่วโมง

จากรูปพบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระDPPH มากน้อยต่างกัน โดยสารสกัดที่มีฤทธิ์ มากจะปรากฏแถบสีเหลืองทันทีที่เวลา 0 ชั่วโมง หลังจากพ่น TLC ด้วยสารละลาย DPPH และพบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลของเชอร์รี่ไทยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระDPPH ดีที่สุด เนื่องจากปรากฏแถบสีเหลืองชัดเจนกว่าสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ชนิดอื่น นอกจากนี้ยับยั้งแถบสีเหลืองได้ในสารสกัดกระท้อนทับทิม มะเมาะไขปลา มะม่วงอกร่อง และตะลิงปลิง แต่ปรากฏแถบสีเหลืองมากขึ้นในทุกสารสกัด เมื่อเก็บแผ่น TLC ไว้ 8 และ 24 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้แต่ละชนิดมีสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณ โดยสารสกัดเชอร์รี่ไทยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด

3.4.2 Microplate method

การหาค่าร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระDPPH ของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1 mg/ml ได้ผลดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระDPPH ของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 mg/ml และความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระDPPH ได้ร้อยละ 50

ผลไม้	% inhibition $\pm$ SD ที่ 1.0 mg/ml	% inhibition $\pm$ SD ที่ 0.5 mg/ml	IC ₅₀ (μ g/ml)
มะเมาะไขปลา	67.6 $\pm$ 0.3	27.8 $\pm$ 1.6	648.0 $\pm$ 6.2
จำปาตะ	15.4 $\pm$ 1.5	8.4 $\pm$ 0.3	ND
ตะลิงปลิง	30.7 $\pm$ 2.0	16.0 $\pm$ 1.6	ND
ทุเรียนหมอนทอง	6.8 $\pm$ 1.0	4.2 $\pm$ 0.7	ND
เชอร์รี่ไทย	96.6 $\pm$ 0.4	96.7 $\pm$ 0.7	45.0 $\pm$ 1.9
มะมุด	25.6 $\pm$ 1.3	9.8 $\pm$ 1.1	ND
มะม่วงอกร่อง	44.8 $\pm$ 0.7	16.3 $\pm$ 1.7	ND
กล้วยน้ำว้า	5.2 $\pm$ 1.2	3.5 $\pm$ 0.1	ND
กระท้อนทับทิม	84.7 $\pm$ 1.4	55.8 $\pm$ 1.0	415.8 $\pm$ 1.4
ชมพู่มะเหมี่ยว	16.8 $\pm$ 1.1	12.7 $\pm$ 1.5	ND
พุทราหนมสด	4.4 $\pm$ 0.9	4.0 $\pm$ 0.7	ND
Tolox	-	-	4.1 $\pm$ 0.3

Tolox = positive control

ND = not determine เนื่องจากที่ความเข้มข้นของสารสกัด 1.0 mg/ml มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้น้อยกว่าร้อยละ 50

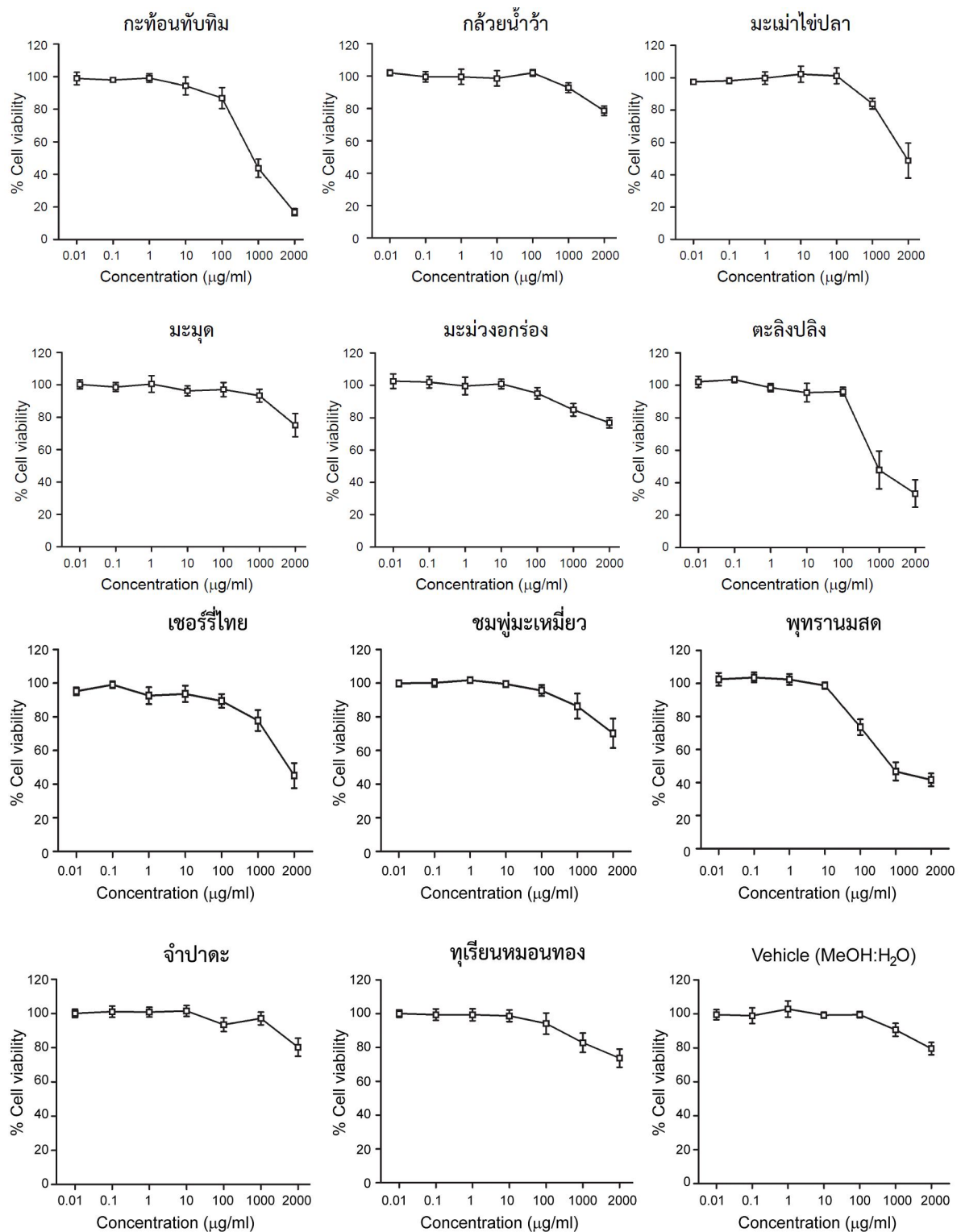
ผลจากตารางที่ 7 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดด้วยเมทานอลของเชอร์รี่ไทย มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุดเนื่องจากมีค่าร้อยละของการยับยั้งมากที่สุดที่ความเข้มข้นของสารสกัด 0.5 และ 1.0 mg/ml และมากกว่าร้อยละ 90 รองลงมาคือสารสกัดด้วยเมทานอลของกระถ่อนทับทิม มะเมาะไขปลา มะม่วงอกร่อง สารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH มากกว่าร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 1.0 mg/ml ได้แก่ สารสกัดด้วยเมทานอลของเชอร์รี่ไทย กระถ่อนทับทิม และมะเมาะไขปลา นำมาวิเคราะห์หาค่า IC_{50} ได้ผลดังตารางที่ 7 พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลของเชอร์รี่ไทยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH มากที่สุดด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ $45.0 \pm 1.9 \mu\text{g/ml}$ ส่วนสารสกัดด้วยเมทานอลของกระถ่อนทับทิมและมะเมาะไขปลามีค่า IC_{50} เท่ากับ 415.8 ± 1.4 และ $648.0 \pm 6.2 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ

3.5 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity test) โดยวิธี MTT assay

ก่อนที่จะทำการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทยในเซลล์ จะต้องทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดเพื่อหาความเข้มข้นของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทยที่ไม่มีพิษต่อเซลล์

ในการทดสอบความเป็นพิษนั้นใช้เซลล์ที่ได้จากตับ คือ HEK-293 เนื่องจากว่าเซลล์ชนิดนี้เป็นเซลล์ปกติ และมีการศึกษาถึงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันอย่างแพร่หลาย ผลการทดสอบพบว่าความเข้มข้นของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทยตั้งแต่ 0.01-100 $\mu\text{g/ml}$ ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ HEK-293 (รูปที่ 4) ที่ใช้ทดสอบ โดยสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทยทั้ง 11 ชนิดที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 100 $\mu\text{g/ml}$ มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตมากกว่าร้อยละ 90 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทยเพิ่มขึ้นมากกว่าหรือเท่ากับ 1 และ 2 mg/ml พบว่าจำนวนเซลล์ HEK-293 ที่มีชีวิตมีจำนวนลดลงเหลือน้อยกว่าร้อยละ 80 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงเลือกความเข้มข้นของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทยที่ 10 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ เพื่อทำการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทยในเซลล์ต่อไป เนื่องจากที่ความเข้มข้นดังกล่าวไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ HEK-293



รูปที่ 4. ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทย

กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตต่อความเข้มข้นของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทย สารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทยจะถูกทดสอบความเป็นพิษในเซลล์เซลล์ HEK-293 โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดตั้งแต่ 0.01 $\mu\text{g/ml}$ จนถึง 2 mg/ml โดยวิธี MTT assay (จำนวนครั้งของการทดลอง เท่ากับ 4) ข้อมูลที่ได้จะอยู่ในรูปของ ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของการวัด (mean $\pm$ SEM)

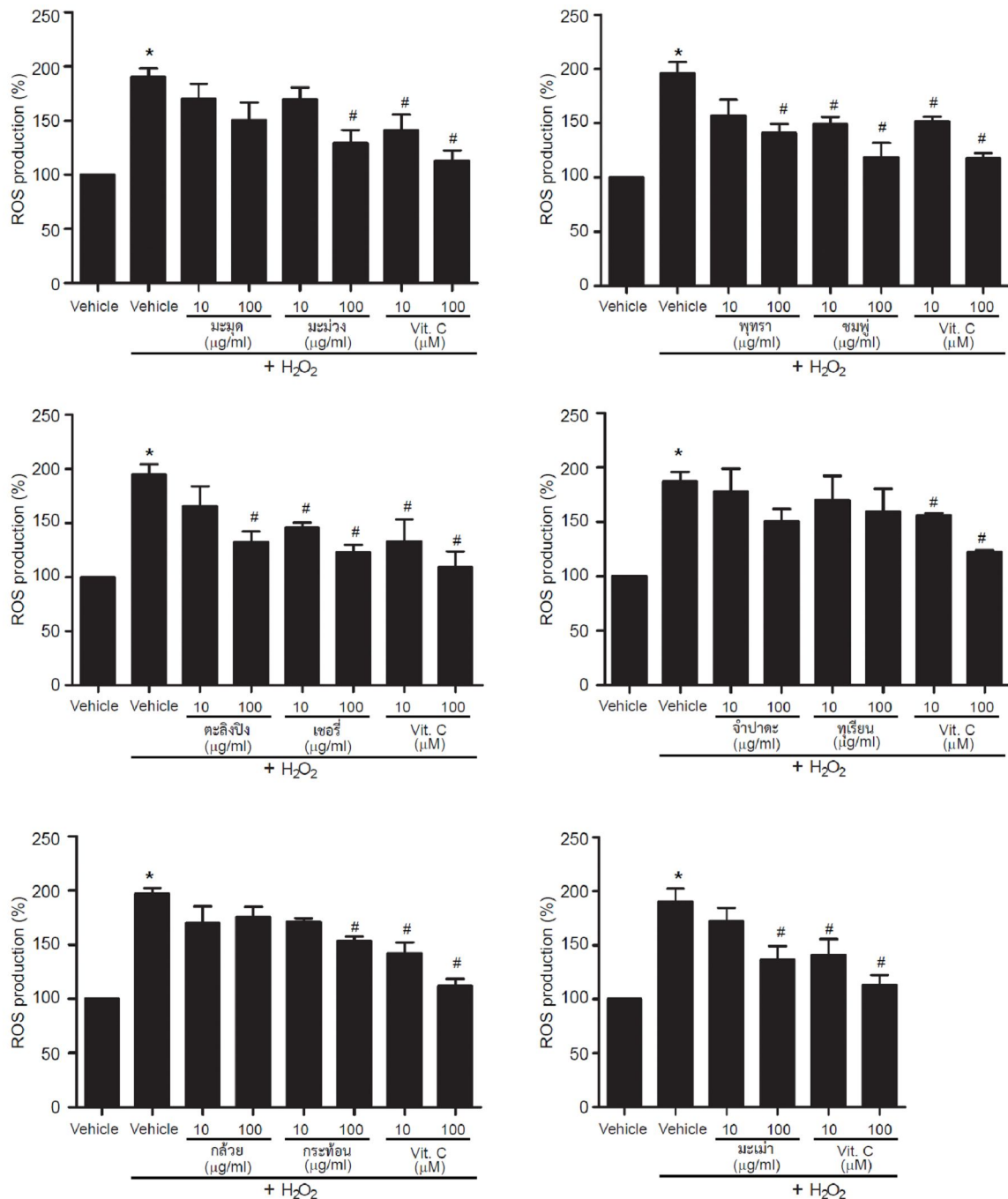
3.6 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทย

3.6.1 การวัดปริมาณ reactive oxygen species (ROS) ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ โดยใช้เครื่อง fluorescent microplate reader

ในการทดลองนี้จะใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการสร้าง ROS และทำการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทย โดยดูว่าสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทยสามารถลดการเกิด ROS ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย H_2O_2 ได้หรือไม่

จากการทดลองพบว่า เมื่อเซลล์ HEK-293 ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 ปริมาณ 200 μM เป็นเวลา 1 ชั่วโมงจะทำให้ปริมาณของ ROS เพิ่มขึ้นภายในเซลล์ (intracellular ROS production) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control ซึ่งใช้ตัวทำละลาย (vehicle) เพียงอย่างเดียว (รูปที่ 5)

Intracellular ROS production



รูปที่ 5.ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทย โดยการวัดปริมาณ ROS ภายในเซลล์ด้วย fluorescent microplate reader

กราฟแสดงผลของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทยทั้ง 11 ชนิดในการยับยั้งการสร้าง ROS ภายในเซลล์ HEK-293 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย H₂O₂ ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 10 และ 100 µg/ml เทียบกับวิตามินซีที่ความเข้มข้น 10 และ 100 µM (จำนวนครั้งของการทดลองเท่ากับ 4) ข้อมูลที่ได้จะอยู่ในรูปของค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของการวัด (mean ± SEM) **P* < 0.05 เทียบกับกลุ่มควบคุม (vehicle) และ #*P* < 0.05 เทียบกับกลุ่มที่ได้รับ H₂O₂ อย่างเดียว

นอลของผลไม้ทั้งสองชนิดสามารถยับยั้งการสร้าง ROS ที่ถูกเหนี่ยวนำจาก H_2O_2 ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) ซึ่งฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระ ROS ของสารสกัดด้วยเมทานอลของกระถ่อนทับทิมและมะเฒ่าไขปลา ที่ความเข้มข้น $100 \mu\text{g/ml}$ ใกล้เคียงกับฤทธิ์ ของวิตามินซี ที่ความเข้มข้น $10 \mu\text{M}$ (รูปที่ 5)

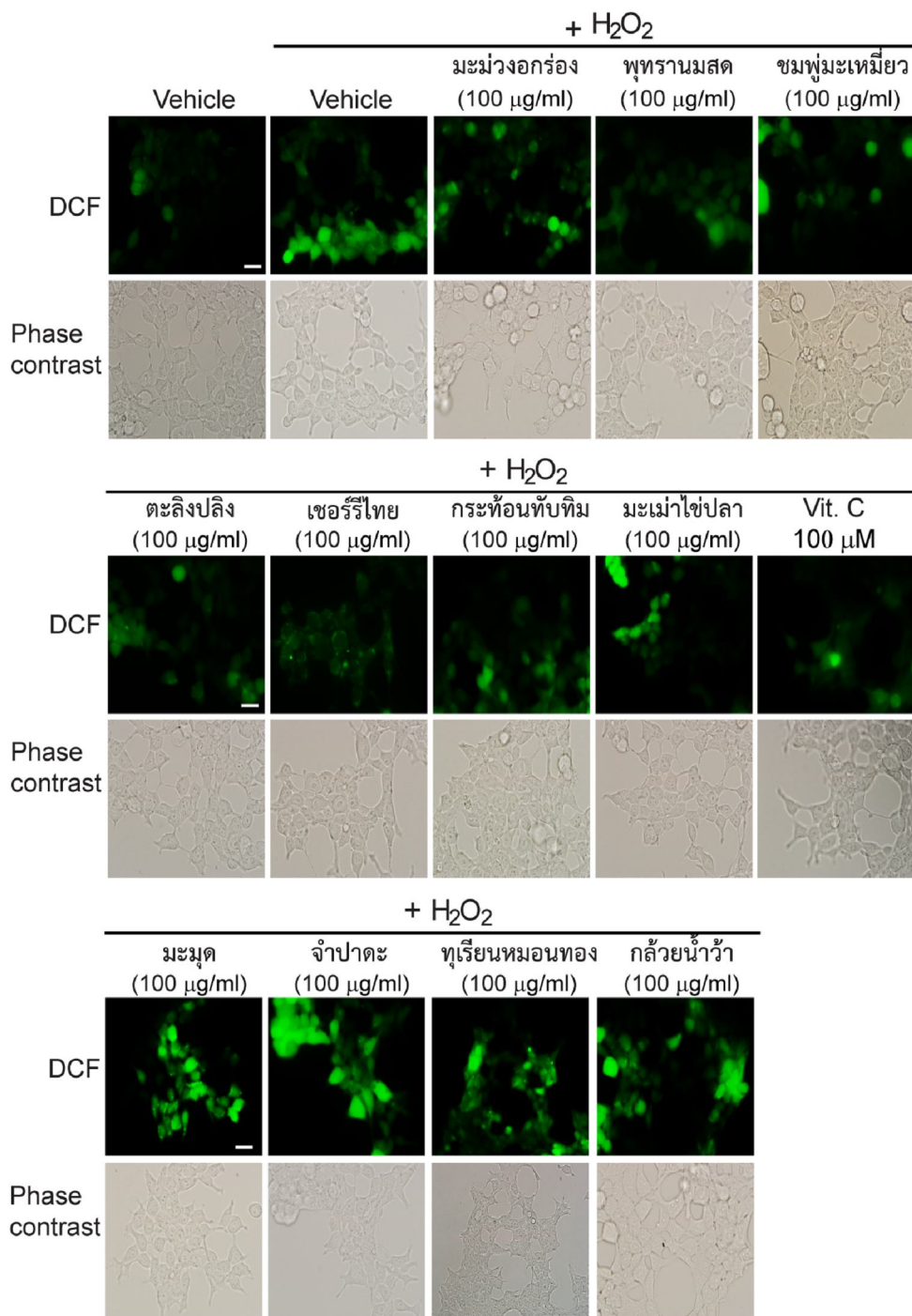
3.6.2 การวัดปริมาณ reactive oxygen species (ROS) ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ โดยใช้กล้อง fluorescent microscope

จากรูปที่ 6 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทยบางชนิด ที่ความเข้มข้น 10 และ $100 \mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้งการสร้าง ROS ภายในเซลล์ ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย H_2O_2 ในขั้นตอนต่อไป คณะผู้วิจัยได้ศึกษาถึงฤทธิ์ ต้าออกซิเดชันของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทยเพิ่มเติม โดยการวัด fluorescent intensity ของสาร DCF ที่เกิดจาก ROS ทำปฏิกิริยากับ DCF-HA ซึ่งเป็นสารเรืองแสงสีเขียวภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนซ์

จากการทดลองพบว่า เมื่อเซลล์ HEK-293 ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 ปริมาณ $200 \mu\text{M}$ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงจะทำให้เซลล์เรืองแสงสีเขียวเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 (control) (รูปที่ 6) แสดงให้เห็นว่า ปริมาณของ ROS เพิ่มขึ้นภายในเซลล์หลังจากได้รับ H_2O_2 แต่เมื่อเซลล์ HEK-293 ได้รับด้วยสารสกัดด้วยเมทานอลของมะม่วงอกร่อง พุทรานมสด ชมพู่มะเหมี่ยว ตะลิงปลิง เชอร์รี่ไทย กระถ่อนทับทิม และมะเฒ่าไขปลา ที่ความเข้มข้น $100 \mu\text{g/ml}$ พบว่าความเข้มของสารเรืองแสงสีเขียวลดลงเล็กน้อยอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด (รูปที่ 6) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดด้วยเมทานอลของมะม่วงอกร่อง พุทรานมสด ชมพู่มะเหมี่ยว ตะลิงปลิง เชอร์รี่ไทย กระถ่อนทับทิมและมะเฒ่าไขปลา ที่ความเข้มข้น $100 \mu\text{g/ml}$ สามารถลดปริมาณของ ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ได้ ซึ่งประสิทธิภาพในการลดปริมาณของ ROS ของสารสกัดดังกล่าวนี้เทียบเคียงได้กับวิตามินซี ที่ความเข้มข้น $100 \mu\text{M}$ โดยดูได้จากปริมาณเซลล์ที่เรืองแสงสีเขียว มีปริมาณใกล้เคียงกัน

อย่างไรก็ตาม เมื่อเซลล์ HEK-293 ได้รับสารสกัดด้วยเมทานอลของมะม่วง จําปาตะ พุเรียน หมอนทอง และกล้วยน้ำว้า ที่ความเข้มข้น $100 \mu\text{g/ml}$ ก่อนที่จะกระตุ้นด้วย H_2O_2 พบว่า ความเข้มของสารเรืองแสงสีเขียวไม่ลดลง เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด (รูปที่ 6) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ทั้งสองชนิดนี้ ไม่สามารถลดปริมาณของ ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ได้

ดังนั้นจากผลการทดลองนี้สรุปได้ว่าสารสกัดด้วยเมทานอลของมะม่วงอกร่อง พุทรานมสด ชมพู่มะเหมี่ยว ตะลิงปลิง เชอร์รี่ไทย กระถ่อนทับทิม และมะเฒ่าไขปลา ที่ความเข้มข้น $100 \mu\text{g/ml}$ มีฤทธิ์ ต้าออกซิเดชัน โดยไปยับยั้งการเพิ่มขึ้นของ ROS ภายในเซลล์ HEK-293 กลไกในการออกฤทธิ์ ต้าออกซิเดชันของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทยเหล่านี้ อาจเกิดขึ้นจากการที่สารสำคัญที่พบในสารสกัดดังกล่าวมีผลกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านออกซิเดชัน เช่น เพิ่มการสร้างของเอนไซม์ catalase, glutathione peroxidase (GPx), heme oxygenase-1 (HO-1) และ superoxide dismutase (SOD) เป็นต้น หรืออาจมีผลเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวด้วย ดังนั้นในการทดลองต่อไป คณะผู้วิจัยจะทดสอบฤทธิ์ ของสารสกัดด้วยเมทานอลของมะม่วงอกร่อง พุทรานมสด ชมพู่มะเหมี่ยว ตะลิงปลิง เชอร์รี่ไทย กระถ่อนทับทิม และมะเฒ่าไขปลา ต่อการสร้างเอนไซม์เหล่านี้



รูปที่ 6.ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทย โดยใช้กล้อง fluorescent microscope

รูปแสดงผลของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทย 11 ชนิด ในการยับยั้งการสร้าง ROS ภายในเซลล์ HEK-293 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย H₂O₂ ที่ความเข้มข้นสารสกัด 100 µg/ml เทียบกับวิตามินซี ที่ความเข้มข้น 100 µM โดยทำการวัด fluorescent intensity ของสาร DCF ซึ่งเป็นสารเรืองสีเขียวแสงภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนซ์ (DCF, รูปบน) และทำการส่องเซลล์ด้วยแสงปกติ (Phase contrast, รูปล่าง) เพื่อยืนยันว่าสารเรืองแสงสีเขียวนั้นอยู่ภายในเซลล์ ไม่ใช่เศษขยะหรือเซลล์ที่ตายแล้ว (จำนวนครั้งของการทดลอง เท่ากับ 4)

3.7 ผลของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทยต่อการสร้างเอนไซม์ที่ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

3.7.1 ผลของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทยต่อการสร้าง mRNA ของ antioxidant genes

จากผลการศึกษาข้างต้น จะเห็นว่าสารสกัดด้วยเมทานอลของมะม่วงอกร่อง พุทรา นมสด ชมพู่มะเหมี่ยว ตะลิงปลิง เชอร์รี่ไทย กระท้อนทับทิม และมะเฒ่าไข่ปลา ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml สามารถลดปริมาณของ ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ได้ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ดังกล่าว มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจะศึกษาต่อไปในการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทยเหล่านี้ โดยวัดปริมาณของ mRNA ของ antioxidant genes ต่างๆ เช่น catalase, glutathione peroxidase (GPx), heme oxygenase-1 (HO-1), manganese superoxide dismutase (Mn-SOD), CuZn-SOD และ glutathione reductase (GRe) เป็นต้น ซึ่งสารสำคัญที่พบได้ใ้สารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทยอาจมีผลเพิ่มการสร้างของเอนไซม์ต่างๆ นี้ได้

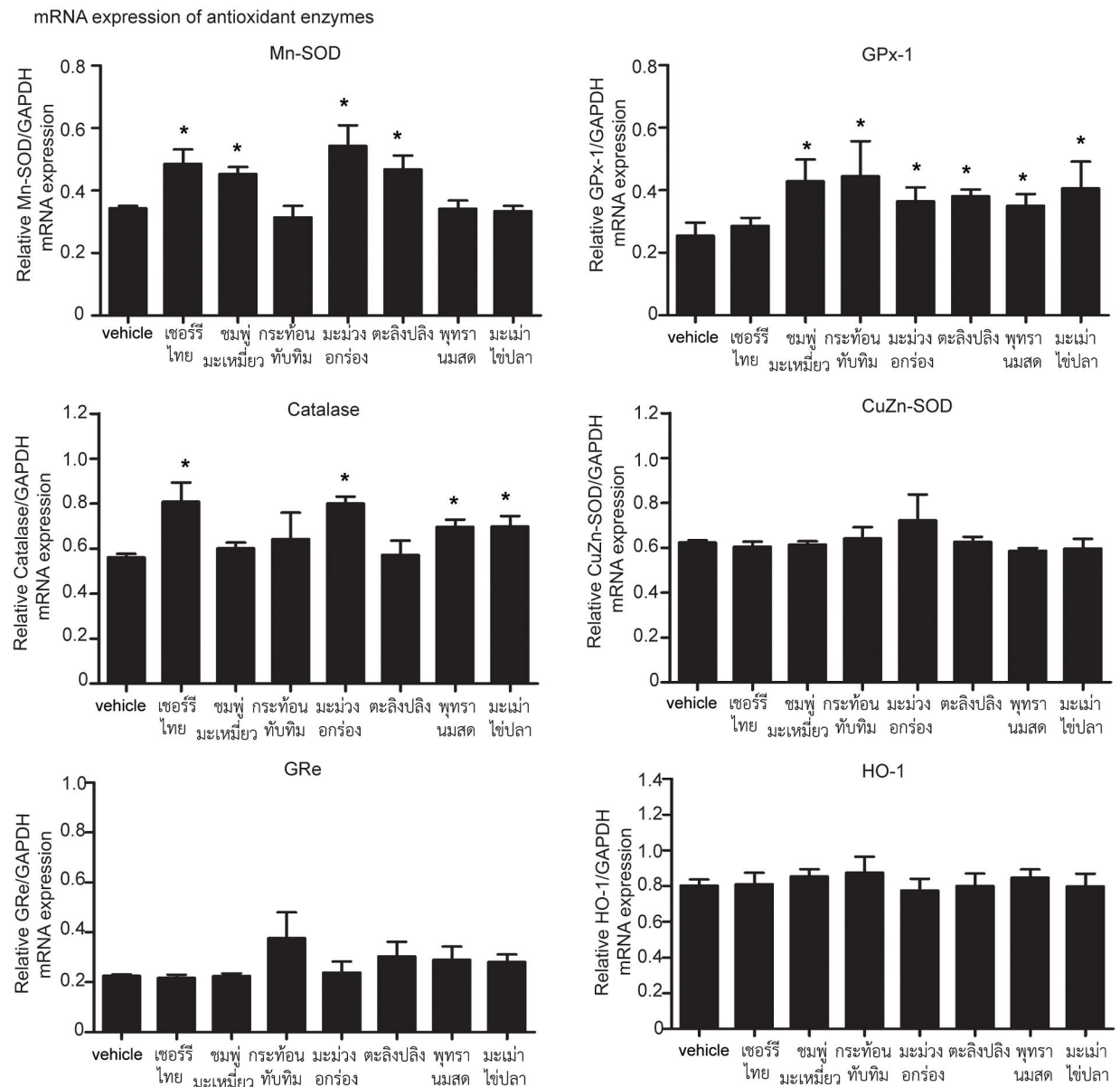
เมื่อกระตุ้นเซลล์ HEK-293 ด้วยสารสกัดด้วยเมทานอลของ เชอร์รี่ไทย ชมพู่มะเหมี่ยว มะม่วงอกร่อง และตะลิงปลิง ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml พบว่าสามารถเพิ่มการสร้าง mRNA (mRNA expression) ของ Mn-SOD ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (รูปที่ 7) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (vehicle) ในขณะที่สารสกัดด้วยเมทานอลของกระท้อนทับทิม พุทรา นมสด และมะเฒ่าไข่ปลา ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml ไม่มีผลต่อการสร้าง mRNA ของ Mn-SOD

เมื่อกระตุ้นเซลล์ HEK-293 ด้วยสารสกัดด้วยเมทานอลของ ชมพู่มะเหมี่ยว กระท้อนทับทิม มะม่วงอกร่อง ตะลิงปลิง พุทรา นมสด และมะเฒ่าไข่ปลา ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml พบว่าสามารถเพิ่มการสร้าง mRNA ของ GPx-1 ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (รูปที่ 7) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่สารสกัดด้วยเมทานอลของเชอร์รี่ไทย ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml ไม่มีผลต่อการสร้าง mRNA ของ GPx-1

เมื่อกระตุ้นเซลล์ HEK-293 ด้วยสารสกัดด้วยเมทานอลของเชอร์รี่ไทย มะม่วงอกร่อง พุทรา นมสด และมะเฒ่าไข่ปลา ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml พบว่าสามารถเพิ่มการสร้าง mRNA ของ catalase ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (รูปที่ 7) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่สารสกัดด้วยเมทานอลของชมพู่มะเหมี่ยว กระท้อนทับทิม และตะลิงปลิง ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml ไม่มีผลต่อการสร้าง mRNA ของ catalase

เมื่อกระตุ้นเซลล์ HEK-293 ด้วยสารสกัดด้วยเมทานอลของมะม่วงอกร่อง พุทรา นมสด ชมพู่มะเหมี่ยว ตะลิงปลิง เชอร์รี่ไทย กระท้อนทับทิม และมะเฒ่าไข่ปลา ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml พบว่าไม่มีผลต่อการสร้าง mRNA ของ CuZn-SOD, GRe และ HO-1 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

จากผลการทดลองนี้ พบว่ามีเอนไซม์เพียง 3 ชนิด ได้แก่ Mn-SOD, GPx-1 และ catalase ที่ถูกเหนี่ยวนำการสร้าง mRNA ได้ด้วยสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทยชนิดต่างๆ ดังนั้นในการทดลองต่อไป คณะผู้วิจัยจะศึกษาผลการสกัดจากผลไม้ไทยเหล่านี้ ต่อการสร้างโปรตีนของเอนไซม์ Mn-SOD, GPx-1 และ catalase



รูปที่ 7. ผลของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทยในการเหนี่ยวนำการสร้าง mRNA ของ antioxidant genes

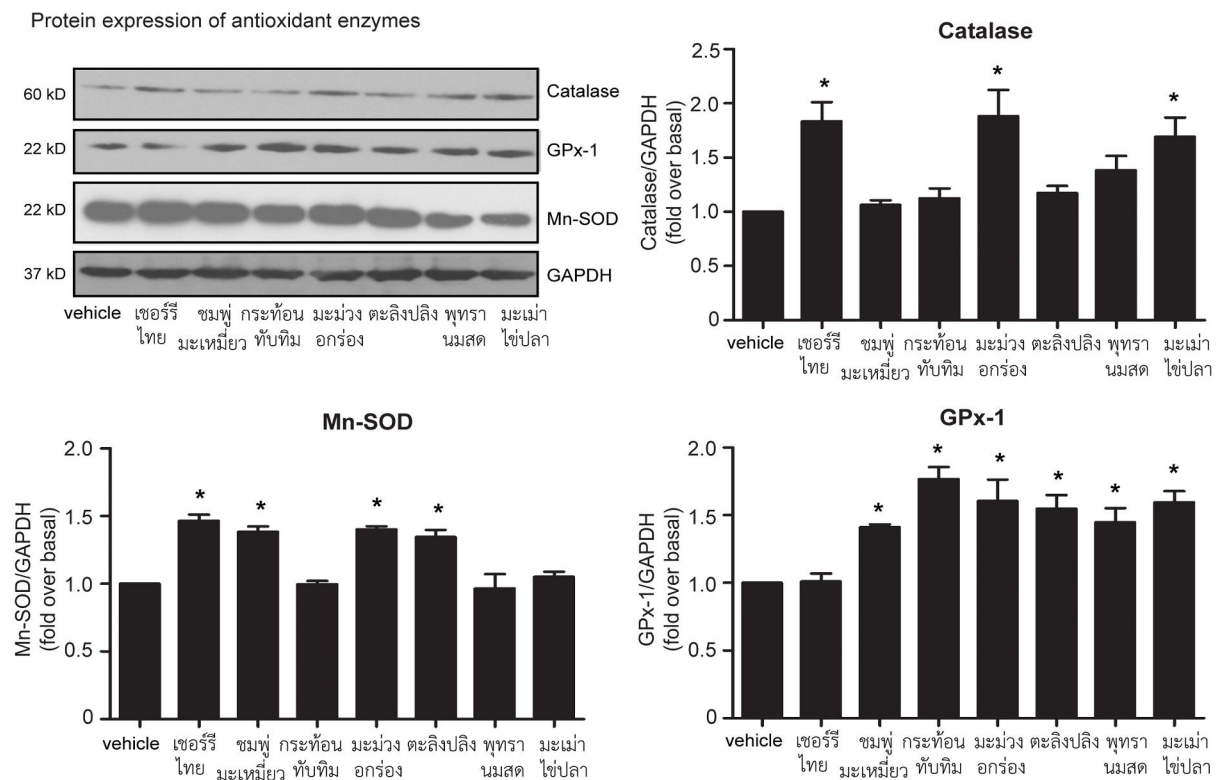
กราฟแสดงผลของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทยในการเหนี่ยวนำการสร้าง mRNA ของ catalase, glutathione peroxidase (GPx), heme oxygenase-1 (HO-1), manganese superoxide dismutase (Mn-SOD), CuZn-SOD และ glutathione reductase (GRe) เซลล์ HEK-293 ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 100 µg/ml (จำนวนครั้งของการทดลองเท่ากับ 4) ข้อมูลที่ได้จะอยู่ในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของการวัด (mean $\pm$ SEM) * P < 0.05 เทียบกับกลุ่มควบคุม (vehicle)

3.7.2 ผลของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทยต่อการสร้างโปรตีนของ antioxidant enzymes

จากรูปที่ 7 พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทยมีฤทธิ์ เพิ่มการสร้าง mRNA ของ Mn-SOD, GPx-1 และ catalase ในเซลล์ HEK-293 ดังนั้นคณะผู้วิจัยจะทดสอบผลของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทยว่ามีผลต่อการสร้างโปรตีนของเอนไซม์ทั้งสามดังกล่าวด้วย เมื่อกระตุ้นเซลล์ HEK-293 ด้วยสารสกัดด้วยเมทานอลของเชอร์รี่ไทย มะม่วงอกร่อง และมะเมาะไขปลา ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่าสามารถเพิ่มการสร้างโปรตีน (protein expression) ของเอนไซม์ catalase ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (รูปที่ 7) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (vehicle) จากรูปที่ 7 และ 8 พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลของเชอร์รี่ไทย มะม่วงอกร่อง และมะเมาะไขปลา มีฤทธิ์ ด้านออกซิเดชันได้โดยไปมีผลเพิ่มการสร้างที่ mRNA และโปรตีนของเอนไซม์ catalase

เมื่อกระตุ้นเซลล์ HEK-293 ด้วยสารสกัดด้วยเมทานอลของเชอร์รี่ไทย ชมพู่มะเหมี่ยว มะม่วงอกร่อง และตะลิงปลิง ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่าสามารถเพิ่มการสร้างโปรตีนของเอนไซม์ Mn-SOD ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (รูปที่ 8) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม จากรูปที่ 7 และ 8 พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลของเชอร์รี่ไทย ชมพู่มะเหมี่ยว มะม่วงอกร่อง และตะลิงปลิง มีฤทธิ์ ด้านออกซิเดชันได้โดยไปมีผลเพิ่มการสร้างที่ mRNA และโปรตีนของเอนไซม์ Mn-SOD

เมื่อกระตุ้นเซลล์ HEK-293 ด้วยสารสกัดด้วยเมทานอลของชมพู่มะเหมี่ยว กระท้อนทับทิม มะม่วงอกร่อง ตะลิงปลิง พุทราณมสด และมะเมาะไขปลา ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้เหล่านี้สามารถเพิ่มการสร้างโปรตีนของเอนไซม์ GPx-1 ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (รูปที่ 8) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม จากรูปที่ 7 และ 8 พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลของชมพู่มะเหมี่ยว กระท้อนทับทิม มะม่วงอกร่อง ตะลิงปลิง พุทราณมสด และมะเมาะไขปลา มีฤทธิ์ ด้านอนุมูลอิสระได้โดยไปมีผลเพิ่มการสร้างที่ mRNA และโปรตีนของเอนไซม์ GPx-1



รูปที่ 8.ฤทธิ์ของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทยต่อการสร้างโปรตีนของ antioxidant enzymes

กราฟแสดงผลของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทยทั้ง 7 ชนิดในการเหนี่ยวนำการสร้างโปรตีนของ antioxidant enzymes ต่างๆ เช่น catalase, glutathione peroxidase (GPx) และ manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) เซลล์ HEK-293 จะถูกทดสอบฤทธิ์โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทยที่ 100 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปริมาณโปรตีนของเอนไซม์สามารถหาได้ด้วยวิธี Western blotting (จำนวนครั้งของการทดลองเท่ากับ 4) ข้อมูลที่ได้จะอยู่ในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของการวัด (mean $\pm$ SEM) * $P < 0.05$ เทียบกับกลุ่มควบคุม (vehicle)

บทที่ 4 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

ภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) มีความเกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพของโรคต่างๆ เช่น โรคเบาหวาน โรคมะเร็ง โรคหัวใจและหลอดเลือด (Fearon and Faux, 2009) ดังนั้นการยับยั้งภาวะ oxidative stress ที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย จึงส่งผลดีทำให้การเกิดโรคต่างๆ ลดลง ในร่างกายเองก็มีกลไกต้านทานการเกิดภาวะ oxidative stress อย่างไรก็ดีตาม เมื่อระบบต่างๆ ในร่างกายทำงานผิดปกติไปจากเดิม ทำให้กลไกนี้ทำงานได้น้อยลง ดังนั้นการรับประทานพืช ผัก ผลไม้ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จะช่วยป้องกันและยับยั้งภาวะ oxidative stress ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ หรือเนื้อเยื่อต่างๆ ในร่างกาย

ในปัจจุบันพบว่า การรับประทานผลไม้ น่าจะมีผลลดอุบัติการณ์เกิดของโรคเรื้อรัง เนื่องจากในผลไม้มีสารสำคัญหลายชนิด เช่น สารประกอบฟีนอลิก สารประกอบฟลาโวนอยด์ สารประกอบควิโนน วิตามินและอัลคาลอยด์ ต่างๆ ซึ่งมีรายงานวิจัยมากมายพบว่า สารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้สามารถลดการเกิดภาวะ oxidative stress ที่เกิดขึ้นในร่างกายได้ (Basak et al., 2013; Gargantiel and Ysrael, 2014) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ มักขึ้นอยู่กับชนิดของสารสกัด มีวิธีการสกัดมากมายและใช้สารสกัดหลากหลายเช่น น้ำ เอทานอล เมทานอล และตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ (Garcia-Salas et al., 2010) สำหรับชนิดของสารสกัดที่ใช้สกัดผลไม้ เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จะใช้สารละลายน้ำที่มีส่วนประกอบของเมทานอลอยู่ระหว่างร้อยละ 50-100 ทำการสกัดสารสำคัญที่มีอยู่ในผลไม้ (Cai et al., 2004) ในการวิจัยครั้งนี้ คณะผู้วิจัยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัดผลไม้ไทยทั้ง 11 ชนิด

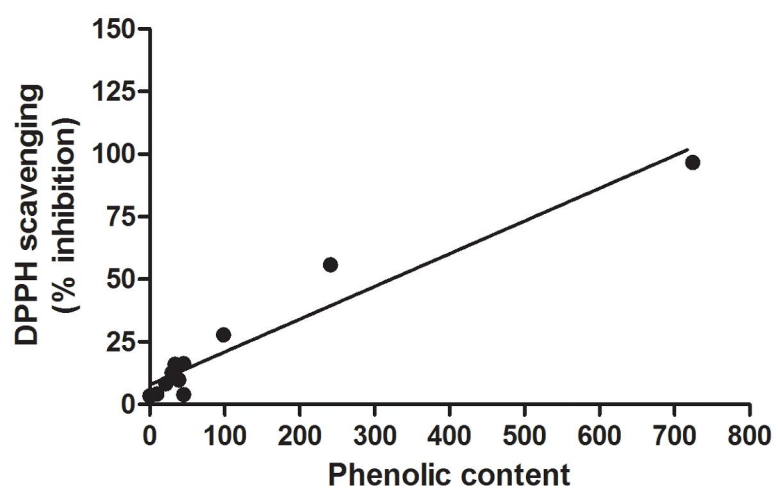
การสกัดผลไม้ไทยทั้ง 11 ชนิด ด้วยเมทานอล พบว่าสารสกัดที่ได้ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นสารหนืดสีเหลืองและสีแดง ได้ปริมาณสารสกัดประมาณ 2.6-9.3 กรัม / 100 g น้ำหนักเนื้อแห้ง การวิเคราะห์สารประกอบในสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ด้วย TLC พบว่าสารสกัดของผลไม้แต่ละชนิดมีองค์ประกอบแตกต่างกัน และพบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลของมะเมาะไขปลา ตะลิงปลิง เซอร์รี่ไทย และกระท้อนทับทิม น่าจะมีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์เนื่องจากปรากฏแถบเรืองแสงสีเหลือง สีส้ม และสีเหลืองเขียว หลังจากตรวจสอบด้วย NP/PEG และดูภายใต้ UV 366 nm

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu colorimetry ของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ทั้ง 11 ชนิดในรูปของ mg gallic acid equivalent/100 g ของสารสกัด และตัวอย่างแห้ง พบว่าสารสกัดของเซอร์รี่ไทยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากที่สุด รองลงมาคือกระท้อนทับทิม มะเมาะไขปลา และตะลิงปลิง โดยมีค่าเท่ากับ 16,450.7, 2,597.1, 2,036.9 และ 1,259.9 mg gallic acid equivalent ในสารสกัด 100 g ตามลำดับ และพบว่าในเนื้อแห้งของเซอร์รี่ไทยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากที่สุด รองลงมาคือกระท้อนทับทิม ตะลิงปลิงและมะเมาะไขปลา โดยมีค่าเท่ากับ 7,573.9, 1,302.7, 543.5 และ 377.6 mg gallic acid equivalent ในตัวอย่างแห้ง 100 g ตามลำดับ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ด้วย TLC และ microplate method พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลของเซอร์รี่ไทยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด รองลงมาคือสารสกัดด้วยเมทานอลของกระท้อนทับทิม มะเมาะไขปลา มะม่วงอกร่อง และตะลิงปลิง ตามลำดับ โดยสารสกัดด้วยเมทา

นอลของเชอร์รี่ไทย กระท้อนทับทิม และมะเเฒ่าไ้ปลา มีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 1.0 mg/ml มากกว่าร้อยละ 50 จึงนำมาวิเคราะห์หาค่า IC_{50} พบว่าสารสกัดเชอร์รี่ไทยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ $45.0 \pm 1.9 \mu\text{g/ml}$ ส่วนสารสกัดกระท้อนทับทิมและมะเเฒ่าไ้ปลา มีค่า IC_{50} เท่ากับ 415.8 ± 1.45 และ $648.0 \pm 6.2 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ซึ่งผลต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของผลไม้ในงานวิจัยนี้สอดคล้องกับรายงานวิจัยที่ผ่านมา ซึ่งศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของน้ำผลไม้จากผลไม้ที่พบได้ในประเทศไทยพบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด รองลงมาได้แก่ กระท้อน ตะลิงปลิง และชมพู่มะเหมียว ตามลำดับ (Suliaman and Ooi, 2014) ผลที่ได้จากงานวิจัยทั้งสองมีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH แตกต่างกันในผลไม้บางชนิด เนื่องจากงานวิจัยนี้ทดสอบด้วยสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ที่สุกแล้ว ในขณะที่งานวิจัยจากประเทศไทยทดสอบด้วยน้ำผลไม้จากผลไม้ที่ยังไม่สุกนอกจากนี้อาจเป็นผลไม้คนละสายพันธุ์

เมื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (total phenolic content) ของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทย พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่พบในผลไม้ โดยสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ที่มีปริมาณฟีนอลิกสูง จะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงเช่นกัน โดยมีค่า correlation สูง ซึ่งค่า R^2 เท่ากับ 0.9672 (รูปที่ 9) นอกจากค่าที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี DPPH แล้ว ยังสามารถหาค่า antioxidant capacity โดยใช้วิธีอื่นๆ อีกเช่น FRAP (Ferric reducing antioxidant power) หรือ TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) (Chen et al., 2014; Fu et al., 2010) ซึ่งงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าผลไม้ที่มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกสูงจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าผลไม้ที่มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกต่ำ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ ที่ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในผลไม้แถบทวีปอเมริกาและทวีปเอเชีย (Sun et al., 2002; Fu et al., 2010)



รูปที่ 9. ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทย

การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทยในเซลล์โดยวัดความสามารถในการยับยั้งการเพิ่มขึ้นของROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ และการเพิ่มการสร้างของ antioxidant enzymes ชนิดต่างๆ พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลของมะม่วงอกร่อง พุทรา นมสด ชมพู มะเหมี่ยว ตะลิงปลิง เชอร์รี่ไทย กระท้อนทับทิม และมะเเฒ่า ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ สามารถลดปริมาณของ ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ได้ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ใกล้เคียงกับวิตามินซีความเข้มข้น 10 μM ถึงแม้ว่าผลไม้บางชนิดจะมีวิตามินซีเป็นส่วนประกอบ จากรายงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่าปริมาณวิตามินซีที่พบในผลไม้ มักไม่ค่อยมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมากนัก เนื่องจากมีรายงานว่าผลไม้ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันใกล้เคียงกันมีปริมาณวิตามินซีที่แตกต่างกัน(Wang et al., 1996) ดังนั้นนอกจากวิตามินซีแล้วฤทธิ์ต้านออกซิเดชันน่าจะมาจากการออกฤทธิ์ร่วมกัน(synergistic effects) ของสารสำคัญหลายๆ ชนิดที่พบได้ในผลไม้ (Eberhardt et al., 2000)

จากผลการทดลองครั้งนี้พบว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของผลไม้ไทยมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่พบ โดยมีค่า correlation สูง ซึ่งค่า R^2 เท่ากับ 0.9934 ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยของSun (Sun et al., 2002) ซึ่งมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9788 ดังนั้นสารประกอบฟีนอลิกที่พบได้ในผลไม้ น่าจะเป็นสารที่ออกฤทธิ์หลักในการต้านออกซิเดชัน เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกมีมากมายหลายชนิดที่พบได้ในผลไม้ ดังนั้นการวิเคราะห์หาสารสำคัญในกลุ่มอนุพันธ์ของฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเป็นสิ่งที่ต้องทำต่อไป

จากรายงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่า สารประกอบฟีนอลิก เช่น gentisic acid, gallic acid, ferulic acid และ *p*-coumaric acid สามารถกระตุ้นการสร้าง antioxidant enzymes ชนิดต่างๆ เช่น CuZn-SOD, GPx และ catalase ได้ โดยเมื่อให้สารเหล่านี้แก่หนูแรทในขนาด 100 mg/kg น้ำหนักตัวเป็นเวลาติดต่อกัน 14 วัน พบว่าปริมาณของ mRNA ที่ตับของเอนไซม์ทั้งสามชนิดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (Yeh and Yen, 2006) นอกจากสารประกอบฟีนอลิกจะเพิ่มการสร้าง antioxidant enzymes แล้วยังมีผลเพิ่มการทำงานของเอนไซม์อีกด้วย

กลไกในการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทยนี้ น่าจะเกิดขึ้นจากการที่สารสำคัญที่พบได้ในผลไม้มีผลกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านออกซิเดชัน เช่น catalase, GPx-1, Mn-SOD, CuZn-SOD, GRe หรือ HO-1 เป็นต้น หรือมีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เหล่านี้ จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทยสามารถเพิ่มการสร้างทั้ง mRNA และ โปรตีนของเอนไซม์ catalase, GPx-1 และ Mn-SOD ซึ่งสารสำคัญที่สามารถกระตุ้นการสร้าง antioxidant enzymes น่าจะเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่พบได้ในผลไม้ไทย

SOD, catalase และ GPx เป็นเอนไซม์ที่ใช้ทำลายอนุมูลอิสระ (oxygen free radical) ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์และมีส่วนสำคัญในการยับยั้งกระบวนการ oxidative stress ที่เกิดขึ้น (Halliwell et al., 1994) เอนไซม์ GPx และ catalase มีส่วนในการกำจัด H_2O_2 ในขณะที่ SOD จะเปลี่ยน superoxide radical กลายเป็น H_2O_2 และ H_2O_2 จะถูกกำจัดอีกทีโดยอาศัยเอนไซม์ GPx (Day et al., 2009) ตัวอย่างของเอนไซม์ SOD เช่น Mn-SOD และ CuZn-SOD เป็นต้น ปริมาณเอนไซม์ SOD ที่ลดลงมักมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด (Crawford et al., 2012)

Glutathione peroxidase (GPx) เป็นเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยน peroxides และ hydroperoxides โดยเกิดปฏิกิริยารีดักชันของสารเหล่านี้ให้กลายเป็น H₂O และ alcohol (Espinoza et al., 2008) การทำงานที่ลดลงของเอนไซม์ GPx จะบ่งชี้ถึงการเกิดภาวะ oxidative stress ส่งผลให้พบปริมาณ H₂O₂ เพิ่มขึ้นภายในเซลล์ ส่วนการทำงานของเอนไซม์ catalase จะคล้ายกับ GPx พบว่าเอนไซม์ catalase จะเปลี่ยน peroxides เช่น H₂O₂ กลายเป็น H₂O และ oxygen ซึ่งจะช่วยป้องกันเซลล์ต่างๆ จากภาวะ oxidative damage ที่เกิดขึ้นโดย ROS (Chaudiere et al., 1999)

เชอร์รี่ไทย (*Malpighia glabra* L.) ผลของเชอร์รี่ไทยมีรสเปรี้ยว จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า สารสกัดด้วยเมทานอลของเชอร์รี่ไทย มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH มากที่สุดเมื่อเทียบกับผลไม้ไทย อื่นๆ ชนิด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่รายงานว่าผลดิบและผลสุกของเชอร์รี่ไทย มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ด้วยเช่นกัน โดยมีค่า IC₅₀ ประมาณ 4.33 ± 1.67 และ 8.69 ± 1.95 µg/ml ตามลำดับ (Nunes et al., 2011) และยังพบว่าสารสกัดด้วยน้ำของเชอร์รี่ไทย ยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ด้วยเช่นกัน (Wang et al., 2015) และการวิจัยครั้งนี้ยังพบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลของเชอร์รี่ไทยมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยยับยั้งการเพิ่มปริมาณ ROS ภายในเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย H₂O₂ และกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ที่ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้แก่ Mn-SOD และ catalase โดยไปเพิ่มการสร้างทั้ง mRNA และโปรตีนของเอนไซม์ทั้งสอง

มะม่วงอกร่อง (*Mangifera indica* L. cultiva Aok Rong) เป็นผลไม้ชนิดหนึ่ง ที่นิยมรับประทานในประเทศไทย จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลของมะม่วงอกร่องมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ปานกลาง มีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มปริมาณ ROS ภายในเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย H₂O₂ และกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ Mn-SOD, GPx-1 และ catalase นอกจากนี้มีรายงานว่าเมื่อให้หนูแร้รับประทานสารสกัดมะม่วงเป็นเวลา 8 วัน สามารถลดการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย ipofundin ได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยพบว่าสารสกัดดังกล่าวมีผลเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) และ catalase ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (Roche et al., 2012) สารสกัดมะม่วงประกอบไปด้วยสารสำคัญหลายชนิด เช่น สารประกอบฟีนอลิก เทอร์ปีนอยด์ กรดไขมัน เป็นต้น โดยพบว่าสารสำคัญที่พบมากในมะม่วง ได้แก่ mangiferin, amentoflavone, friedelin, daucosterol และ beta-sitosterol (Roche and Perez, 2012) และจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ทั้งผลและเปลือกของมะม่วงหลายชนิด จะพบสารประกอบฟีนอลิก เช่น gallic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, protocatechuic acid แต่ที่ผลของมะม่วงจะพบเฉพาะ ferulic acid และ vanillic acid ในขณะที่จะพบ p-coumaric acid ได้เฉพาะที่เปลือกเท่านั้น (Abbasi et al., 2015) อย่างไรก็ตาม ยังไม่ทราบแน่ชัดว่าสารสำคัญชนิดใดที่พบในมะม่วงมีฤทธิ์กระตุ้นการสร้าง antioxidant enzymes

ตะลิงปลิง (*Averhoa bilimbi* L.) เป็นผลไม้ชนิดหนึ่งที่พบได้ทั่วไป ในประเทศไทย การศึกษาครั้งนี้พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลของตะลิงปลิงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ปานกลาง และมีรายงานว่าสารสกัดตะลิงปลิงด้วยน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้เช่นกัน โดยมีร้อยละของการยับยั้งประมาณ 38.09 ± 1.87 % และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากพอสมควร (Asna and Noriham, 2014) อย่างไรก็ตามสารสำคัญชนิดใดที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในผลของตะลิงปลิงยังไม่ทราบแน่ชัด จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า สารสกัดด้วยเมทานอลของตะลิงปลิงมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

โดยยับยั้งการเพิ่มปริมาณ ROS ภายในเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย H_2O_2 และกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ที่ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ได้แก่ Mn-SOD และ GPx-1 และเพิ่มการสร้าง mRNA และโปรตีนของเอนไซม์ทั้งสองดังกล่าวในเซลล์ HEK-293 นอกจากนี้มีรายงานว่าเมื่อให้สารสกัดตะลิงปลิงแก่หนูเบาหวาน ในขนาด 50 mg/kg เป็นเวลา 60 วัน สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือด ลดระดับไขมันในเลือด และลดการเกิด lipid peroxidation ได้ และยังเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ catalase, SOD และ GPx ได้อีกด้วย (Kurup and Mini, 2014) ในทำนองเดียวกันมีรายงานว่าน้ำผลไม้จากตะลิงปลิงสามารถเพิ่มการทำงานของ antioxidant enzymes ต่างๆ เช่น SOD และ GPx ในสัตว์ทดลองได้อีกด้วย (Thamizhselvam et al., 2015)

กระถ่อนทับทิม (*Sandoricum koetjape* (Burm. f.) Merr. cultivar Tuptim) เป็นผลไม้อีกชนิดหนึ่งที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทย การศึกษาครั้งนี้พบสารสกัดด้วยเมทานอลของกระถ่อนทับทิมมีฤทธิ์ต้าน DPPH ได้ดีปานกลาง มีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มปริมาณ ROS ภายในเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย H_2O_2 และกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ GPx-1 โดยที่เพิ่มการสร้างทั้ง mRNA และโปรตีนของเอนไซม์ดังกล่าวในเซลล์ HEK-293 นอกจากนี้เนื้อผลที่ได้จากกระถ่อนจะมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันแล้ว ยังมีรายงานว่าเปลือกผลของกระถ่อนก็มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเช่นกัน (Shalini et al., 2014)

มะเฒ่าไขปลา (*Antidesma ghaesmbilla* Gaertn.) จัดเป็นไม้พุ่มกึ่งไม้ยืนต้น ผลของมะเฒ่าไขปลาจะเป็นช่อ ผลอ่อนจะเป็นสีขาว พอแก่จะกลายเป็นสีแดงเข้ม การศึกษาครั้งนี้พบสารสกัดด้วยเมทานอลของมะเฒ่าไขปลา มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH แรงเป็นอันดับสาม รองจากเชอร์รี่ไทย และกระถ่อนทับทิม และยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มปริมาณ ROS ภายในเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย H_2O_2 และกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ที่ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ได้แก่ GPx-1 และ catalase ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ผ่านมาว่าสารสกัดผลมะเฒ่าไขปลามีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ SOD และ catalase ได้ในหลอดทดลอง (Basak et al., 2013) นอกจากนี้มีรายงานว่าสารสกัดใบของมะเฒ่าไขปลา มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ด้วยค่า IC_{50} ประมาณ 113 μ g/ml และมีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ (Gargantiel and Ysrael, 2014)

ชมพูมะเหมี่ยว (*Syzygium malaccense* (L.) Merrill & Perry) จัดเป็นไม้ยืนต้น ผลการศึกษาครั้งนี้พบสารสกัดด้วยเมทานอลของชมพูมะเหมี่ยวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้เล็กน้อย แต่มีรายงานว่าสารสกัดชมพูมะเหมี่ยวด้วยน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ (Lim and Rabeta, 2013) นอกจากนี้สารสกัดด้วยเมทานอลของชมพูมะเหมี่ยวยังมียับยั้งการเพิ่มปริมาณ ROS ภายในเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย H_2O_2 และกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ที่ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ได้แก่ GPx-1 และ Mn-SOD

พุทรานมสด (*Ziziphus jujuba* Mill. cultivar Milk Jujube) เป็นผลไม้อีกชนิดหนึ่งที่พบได้ทั่วไป ในประเทศไทย การศึกษาครั้งนี้พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลของพุทรานมสดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เพียงเล็กน้อย แต่มีรายงานว่าน้ำผลไม้จากพุทราฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี (Suliaman and Ooi, 2014) ซึ่งงานผลที่แตกต่างกันนี้อาจเนื่องจากความแตกต่างของสายพันธุ์พุทรา ความสุกของผล และวิธีการสกัด อย่างไรก็ตามสารสกัดด้วยเมทานอลของพุทรานมสดมีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มขึ้นของ ROS ภายในเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย H_2O_2 และกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ Mn-SOD ได้อีกด้วย

สำหรับสารสกัดที่ได้จากผลของจำปาตะ (*Artocarpus integrar* Merr.) ทุเรียนหมอนทอง (*Durio zibethinus* L. cultivar Mon Thong) มะมุด (*Mangifera foetida* L.) และกล้วยน้ำว้า *Musa × paradisiaca* cultivar Namwa) พบสารประกอบฟีนอลิกเล็กน้อย และจากการทดลองพบว่าที่ สารสกัดด้วยเมทานอลของจำปาตะ ทุเรียนหมอนทอง และกล้วยน้ำว้า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้น้อยมากเมื่อเทียบกับผลไม้ชนิดอื่นๆ โดยมีรายงานวิจัยว่าพบว่ากล้วยหอมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH น้อยกว่า แครนเบอร์รี่ แอปเปิ้ล องุ่นแดง สตรอว์เบอร์รี่ พีช เลมอน และแพร์ (Sun et al., 2002) และพบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้สามชนิดไม่มีผลยับยั้งการเพิ่มขึ้นของ ROS ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย H_2O_2 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดด้วยเมทานอลของจำปาตะ ทุเรียนหมอนทอง มะมุด และกล้วยน้ำว้าไม่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในเซลล์ HEK-293 นอกจากนี้ถึงแม้ว่าสารสกัดด้วยเมทานอลของมะมุดจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้เล็กน้อย และพบว่าความเข้มข้นที่ 100 $\mu\text{g/ml}$ ของสารสกัดด้วยเมทานอลของมะมุดมีแนวโน้มที่จะยับยั้งการเพิ่มขึ้นของ ROS ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย H_2O_2 แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (vehicle)

จากผลการวิจัยคณะผู้วิจัยพบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลของมะม่วงอกร่อง ชมพู่มะเหมี่ยว กระท้อนทับทิม ตะลิงปลิง พุทรา นมสด และมะเมาะไขปลา มีฤทธิ์ต้านอนุมูลออกซิเดชันโดยสามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของ ROS ภายในเซลล์ ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย H_2O_2 เนื่องจากสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้เหล่านี้เพิ่มการสร้างของ antioxidant enzymes ต่างๆ ภายในเซลล์ เช่น catalase, Mn-SOD และ GPx-1 เป็นต้น และผลงานวิจัยนี้ยังสนับสนุนว่าการรับประทานผลไม้ไทย จะช่วยป้องกันและยับยั้งภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ หรือเนื้อเยื่อต่างๆ ในร่างกาย และน่าจะมีผลลดอุบัติการณ์เกิดของโรคเรื้อรังที่พบบ่อยที่เกิดจากภาวะเครียดออกซิเดชัน

เอกสารอ้างอิง

- Ayyanar M, and Subash-Babu P. *Syzygium cumini* (L.) Skeels: a review of its phytochemical constituents and traditional uses. *Asian pacific journal of tropical biomedicine*. 2012;2(3):240-6.
- Abbasi AM, Guo X, Fu X, Zhou L, Chen Y, Zhu Y, Yan H, and Liu RH. Comparative assessment of phenolic content and in vitro antioxidant capacity in the pulp and peel of *Mango cultivars*. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(6):13507-27.
- Aqil F, Gupta A, Munagala R, Jeyabalan J, Kausar H, Sharma RJ, Singh IP, and Gupta RC. Antioxidant and antiproliferative activities of anthocyanin/ellagitannin-enriched extracts from *Syzygium cumini* L. (Jamun, the Indian Blackberry). *Nutrition and cancer*. 2012;64(3):428-38.
- Asna AN and Noriham A. Antioxidant activity and bioactive components of oxalidaceae fruit extracts. *Malaysian journal of analytical sciences*. 2014;18:116-126.
- de Assis SA, Velloso JC, Brunetti IL, Khalil NM, Leite KM, Martins AB, and Oliveira OM. Antioxidant activity, ascorbic acid and total phenol of exotic fruits occurring in Brazil. *International journal of food sciences and nutrition*. 2009;60(5):439-48.
- Basak UC, Mahapatra AK, and Mishra S. Assessment of protective antioxidant mechanisms in some ethno-medicinally important wild edible fruits of Odisha, India. *Agrotechnology*. 2013;2:3.
- Cai Y, Luo Q, Sun M, and Corke H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life sciences*. 2004;74(17):2157-84.
- Chaudiere J, and Ferrari-Iliou R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food and chemical toxicology*. 1999;37(9-10):949-62.
- Chen GL, Chen SG, Zhao YY, Luo CX, Li J, and Gao YQ. Total phenolic contents of 33 fruits and their antioxidant capacities before and after in vitro digestion. *Industrial Crops Product*. 2014;57:150-157.
- Crawford A, Fassett RG, Geraghty DP, Kunde DA, Ball MJ, Robertson IK, and Coombes JS. Relationships between single nucleotide polymorphisms of antioxidant enzymes and disease. *Gene*. 2012;501(2):89-103.
- Day BJ. Catalase and glutathione peroxidase mimics. *Biochemical pharmacology*. 2009;77(3):285-96.
- Eberhardt MV, Lee CY, and Liu RH. Antioxidant activity of fresh apples. *Nature*. 2000;405(6789):903-4.

- Espinoza SE, Guo H, Fedarko N, DeZern A, Fried LP, Xue QL, Leng S, Beamer B, and Walston JD. Glutathione peroxidase enzyme activity in aging. *The journals of gerontology series A, Biological sciences and medical sciences*. 2008;63(5):505-9.
- Fearon IM, and Faux SP. Oxidative stress and cardiovascular disease: novel tools give (free) radical insight. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2009;47:372-381.
- Fu L, Xu BT, Xu XR, Qin XS, Gan RY, and Li HB. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 wild fruits from South China. *Molecules*. 2010;15(12):8602-17.
- Fu L, Xu BT, Xu XR, Gan RY, Zhang Y, Xia EQ, and Li HB. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chemistry*. 2011;129:345-350.
- Garicia-Salas P, Moreles-Soto A, Segura-Carretero A, and Fernandez-Gutierrez A. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules*. 2010;15:8813-8826.
- Gargantiel MF and Ysrael MC. Antioxiant activity and hypoglycemic potential of *Antidesma Ghaesembilla* Gaertn (Phyllantaceae). *International journal science and technology research*. 2014;3:422-429.
- Gorinstein S, Poovarodom S, Leontowicz H, Leontowicz M, Namiesnik J, et al. Antioxidant properties and bioactive constituents of some rare exotic Thai fruits and comparison with conventional fruits. *Food research international*. 2011;44:2222-2232.
- Halliwell B, and Cross CE. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environmental health perspectives*. 1994;102 Suppl 10(5-12)
- Isabelle M, Lee BL, Lim MT, Koh WP, Huang DJ, Ong CN. Antioxidant activity and profiles of common fruits in Singapore. *Food Chemistry*. 2010;123:77-84.
- Khoo HE, Ismail A, Mohd-Esa N, and Idris S. Carotenoid content of underutilized tropical fruits. *Plant foods for human nutrition*. 2008;63:170-175.
- Kumazawa S, Ikenaga M, Usui Y, Kajiya K, Miwa S, Endo J, et al. Comprehensive analysis of polyphenols in fruits consumed in Japan. *Food science and technology research*. 2007;13:404-413.
- Kurup SB, and Mini S. Attenuation of hyperglycemia and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats by aqueous extract of *Averrhoa bilimbi* LINN fruits. *International journal of pharmaceutical science and research*. 2014;5:4981-4988.
- Lim ASL and Rabeta MS. Proximate analysis, mineral content and antioxidant capacity of milk apple, malay apple and water apple. *International food research journal*. 2013;20:673-679.
- Nunes RS, Kahl VFS, Sarmiento MS, Richter MF, Costa-Lotufo LVC, Rodrigues FAR, et al. Antigenotoxicity and antioxidant activity of Acerola fruit (*Malpighia galbra* L.) at two stages of ripeness. *Plant food human nutrition*. 2011;66:129-135.

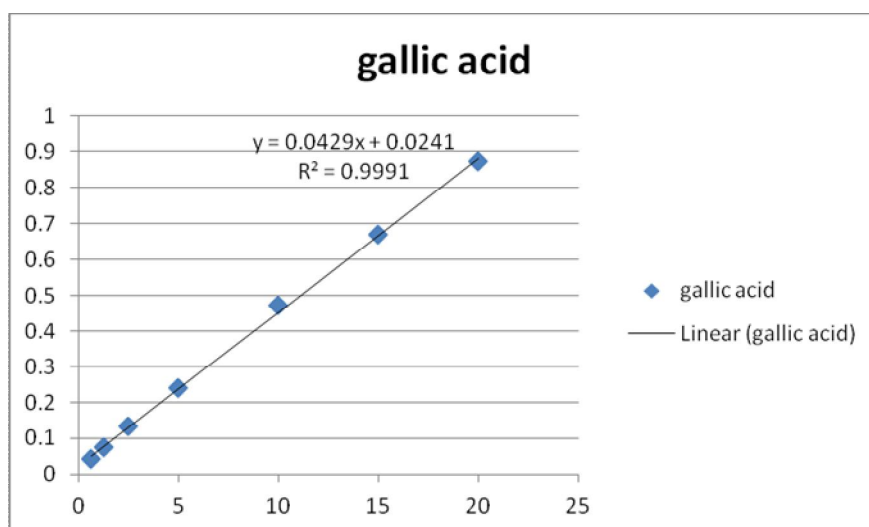
- Puangpronpitag D, Areejitranusorn P, Boonsiri P, Suttajit M, and Yongvanit P. Antioxidant activities of polyphenolic compounds isolated from *Antidesma thwaitesianum* Mull. Arg. seeds and marcs. *Journal of food science*. 2008;73(9):C648-53.
- Rabeta MS, Chan S, Neda GD, Lam KL and Ong MT. Anticancer effect of underutilized fruits. *International food research journal*. 2013;20:551-556.
- Roche LD, Medina EA, Perez AF, Viart MAB, et al. Lipofundin-induced hyperlipidemia promotes oxidative stress and atherosclerotic lesions in New Zealand white rabbits. *International journal of vascular medicine*. 2012. Article ID 898769, 7 pages
- Roche LD and Perez AF. Protective effects of *Mangifera indica* L. extract against lipofundin-induced oxidative stress in rats. *Pharmaceutical crops*. 2012;3:94-98.
- Schinella GR, Tournier HA, Prieto JM, Mordujovich de Buschiazso P, and Rios JL. Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts. *Life sciences*. 2002;70(9):1023-33.
- Shalini M, Vimala S, Abdull Rashih A, and Muhammad Kail O. Antioxidant evaluation of agricultural waste: *Sandoricum Koetjape* (Burm. F.) Merr. Fruit peel extract. 2014. Conference paper. June 2014.
- Singh R, Sharma J, and Goyal PK. Prophylactic role of *Averrhoa carambola* (Star fruit) extract against chemically induced hepatocellular carcinoma in Swiss albino mice. *Advances in pharmacological science*. 2014. Article ID 158936, 8 pages.
- Sulaiman SF, and Ooi KL. Antioxidant and alpha-glucosidase inhibitory activities of 40 tropical juices from Malaysia and identification of phenolics from the bioactive fruit juices of *Barringtonia racemosa* and *Phyllanthus acidus*. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2014;62(39):9576-85.
- Sun J, Chu YF, Wu X, and Liu RH. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2002;50(25):7449-54.
- Thamizhselvam N, Liji IV, Sanjayakumar YR, Sanal Gopi CG, et al. Evaluation of antioxidant activity of *Averrhoa bilimbi* Linn. Fruit juice in paracetamol intoxicated Wistar albino rats. *Enliven: Toxicology and allied clinical pharmacology*. 2015;1:1-6.
- Wang L, Li F, He C, Dong Y, and Wang Q. Antioxidant activity and melanogenesis inhibitory effect of acerola fruit (*Malpighia glabra* L.) aqueous extract and its safe use in cosmetics. *Asian journal of chemistry*. 2015;27:957-960.
- Wang S, Cao G, and Prior R. Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of agricultural and food chemistry*. 1996;44:701-705.
- Yeh CT, and Yen GC. Induction of hepatic antioxidant enzymes by phenolic acids in rats is accompanied by increased levels of multidrug resistance-associated protein 3 mRNA expression. *Journal of nutrition*. 2006;136(1):11-5.

- Zhang L, Ravipati AS, Koyyalamudi SR, Jeong SC, Reddy N, Smith PT, Bartlett J, Shanmugam K, Munch G, and Wu MJ. Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants containing phenolic and flavonoid compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2011;59(23):12361-7
- Zhang LL, Lin YM. Antioxidant tannins from *Syzygium cumini* fruit. *African journal of biotechnology*. 2006; 8(10):2301-2309.

ภาคผนวก ก

ตารางที่ 8. การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ของ gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ

Gallic acid (µg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่น 765nm				
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย	SD
20	0.8747	0.8684	0.8711	0.8714	0.0032
15	0.6187	0.6697	0.7170	0.6684	0.0492
10	0.4669	0.4859	0.4650	0.4726	0.0115
5	0.2396	0.2386	0.2382	0.2388	0.0007
2.5	0.1357	0.1321	0.1293	0.1323	0.0032
1.25	0.0806	0.0717	0.0713	0.0745	0.0053
0.625	0.0478	0.0393	0.0399	0.0423	0.0047



รูปที่ 10. กราฟมาตรฐานของ gallic acid วิเคราะห์โดยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetry

ตารางที่ 9. การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทย

สารสกัดด้วยเม- ทานอลของผลไม้	ค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่น 765nm				
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย	SD
มะเฒ่าไข่ปลา	0.1876	0.2106	0.1984	0.1989	0.0115
จำปาตะ	0.0482	0.0539	0.0508	0.0510	0.0029
ตะลิงปลิง	0.1363	0.1327	0.1276	0.1322	0.0044
ทุเรียนหมอนทอง	0.0398	0.0413	0.0423	0.0411	0.0013
เชอร์รี่ไทย	1.5132	1.4226	1.3709	1.4355	0.0720
มะมุด	0.0732	0.0697	0.0777	0.0735	0.0040
มะม่วงอกร่อง	0.0664	0.0682	0.0658	0.0668	0.0012
กล้วยน้ำว้า	0.0247	0.0244	0.0244	0.0245	0.0002
กระท้อนทับทิม	0.2579	0.2534	0.2295	0.2469	0.0153
ชมพูมะเหมี่ยว	0.0826	0.0854	0.0820	0.0833	0.0018
พุทราเนมสด	0.0707	0.0782	0.0762	0.0750	0.0039

* วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้นของสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้เท่ากับ 200 µg/ml

ตารางที่ 10. ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ในรูป gallic acid equivalent ในสารสกัดด้วยเมทานอลของผลไม้ไทย

สารสกัดด้วยเม- ทานอลของผลไม้	µg gallic acid equivalent/200 µg สารสกัด				
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย	SD
มะเฒ่าไข่ปลา	3.8112	4.3473	4.0629	4.0738	0.2682
จำปาตะ	0.5618	0.6946	0.6224	0.6263	0.0665
ตะลิงปลิง	2.6154	2.5315	2.4126	2.5198	0.1019
ทุเรียนหมอนทอง	0.3660	0.4009	0.4242	0.3970	0.0293
เชอร์รี่ไทย	34.7110	32.5991	31.3939	32.9013	1.6790
มะมุด	1.1445	1.0629	1.2494	1.1523	0.0935
มะม่วงอกร่อง	0.9860	1.0280	0.9720	0.9953	0.0291
กล้วยน้ำว้า	0.0140	0.0070	0.0070	0.0093	0.0040
กระท้อนทับทิม	5.4499	5.3450	4.7879	5.1943	0.3558
ชมพูมะเหมี่ยว	1.3636	1.4289	1.3497	1.3807	0.0423
พุทราเนมสด	1.0862	1.2611	1.2145	1.1873	0.0905

การนำเสนอผลงานในที่ประชุมระดับนานาชาติ

Antioxidant effects of Thai fruit extracts on H₂O₂-induced oxidative stress in HEK-293 cells

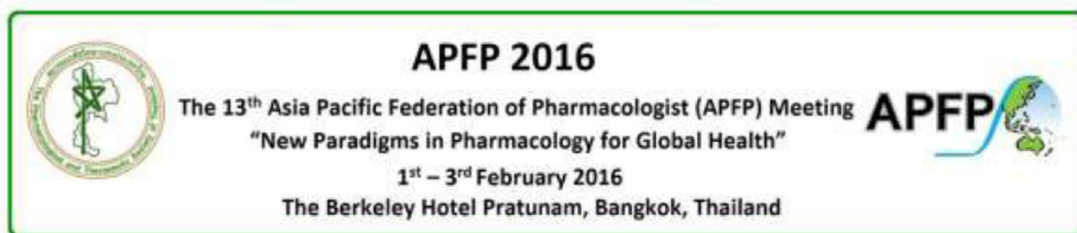
Supachoke Mangmool^{1,2,*}, Pattamapan Lomarat³, Natthinee Anantachoke⁴

¹*Department of Pharmacology;* ³*Department of Food Chemistry;* ⁴*Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand*

²*Center of Excellence for Innovation in Drug Design and Discovery, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand*

The 13th Asia Pacific Federation of Pharmacologist (APFP) Meeting. 2016. Bangkok, THAILAND. Feb 1-3, 2016

Increased oxidative stress is involved in the pathophysiology of many diseases. The cellular antioxidant enzymes play the important role to protect the cells and organisms from the oxidative damage. Several studies demonstrated that fruits are a rich source of antioxidant compounds such as phenolics, flavonoids, quinones and alkaloids. Natural antioxidants contained in fruits have attracted considerable interest because of their presumed safety and potential nutritional value. Even though antioxidant activities of many fruits have been reported, however, the effects of phytochemicals contained in fruits on the induction of antioxidant enzymes in the cells have not been fully defined. In this study, we showed that extracts from *Antidesma ghaesembilla*, *Averrhoa bilimbi*, *Malpighia glabra*, *Mangifera indica*, *Sandoricum koetjape*, *Syzygium malaccense* and *Ziziphus mauritiana* attenuated H₂O₂-induced intracellular reactive oxygen species production in HEK-293 cells. Additionally, these Thai fruit extracts increased the mRNA and protein expressions of antioxidant enzymes, catalase, glutathione peroxidase-1 and manganese superoxide dismutase. Data from our study provide evidence that Thai fruits exert the antioxidant effects through enhancing the production of antioxidant enzymes.



LETTER OF ACCEPTANCE

8th January, 2016

Presenter: Supachoke Mangmool

Abstract title: Antioxidant effects of Thai fruit extracts on H₂O₂-induced oxidative stress in HEK-293 cells

Dear Author,

Thank you for your interest in participating The 13th Asia Pacific Federation of Pharmacologist (APFP) Meeting. On behalf of the Conference Academic Committees, we are pleased to inform you that **your abstract has been accepted for poster presentation at the APFP meeting** during 1st-3rd February, 2016 at the Berkeley Hotel, Bangkok, Thailand.

A poster size recommendation is 80 cm (width) and 120 cm (height) and, the poster features should include concise study overview, key data, points of discussion, conclusion and appropriate references. The schedule of presentation will be announced via the APFP website by 15th January, 2016.

Please note that your registration and the acceptance of your abstract/presentation are not considered completed until the registration fee is fully paid.

We look forward to meeting you at the APFP meeting.

Regards,

W. Tassaneeyakul

Professor WichitraTassaneeyakul, Ph.D.
Chair of the Conference Academic Committees, APFP2016 Meeting

Head of Department of Pharmacology
Faculty of Medicine, KhonKaen University
KhonKaen 40002
Tel: 6681 659 4623



Antioxidant effects of Thai fruit extract on H₂O₂-induced oxidative stress in HEK-293 cells



Supachoke Mangmool^{1,2}, Pattamapan Lomarat³, Natthinee Anantachoke⁴

¹Department of Pharmacology; ²Department of Food Chemistry; ³Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University

²Center of Excellence for Innovation in Drug Design and Discovery, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok, Thailand

Purpose

Natural antioxidants contain in fruits have attracted considerable interest because of their presumed safety and potential nutritional value. Even though antioxidant activities of many fruits have been reported, however, the effects of phytochemicals containing in fruits on the induction of antioxidant enzymes in the cells have not been fully defined.

In this study, we showed that extracts from *Antidesma ghaesembilla*, *Averrhoa bilimbi*, *Malpighia glabra*, *Mangifera indica*, *Sandoricum koetjape*, *Syzygium malaccense* and *Ziziphus mauritiana* attenuated H₂O₂-induced intracellular reactive oxygen species production in HEK-293 cells.

Additionally, these Thai fruit extracts increased the mRNA and protein expressions of antioxidant enzymes, catalase, glutathione peroxidase-1 and manganese superoxide dismutase. Our study provide evidence that Thai fruits exert the antioxidant effects through enhancing the production of antioxidant enzymes.

Methods

@ Dried fruits were extracted with methanol and the solvent was removed using a rotary evaporator.

@ Total phenolic contents were analyzed by the Folin-Ciocalteu colorimetric method.

@ Antioxidant capacity of fruit extracts were measured in terms of radical-scavenging ability, using the stable radical DPPH.

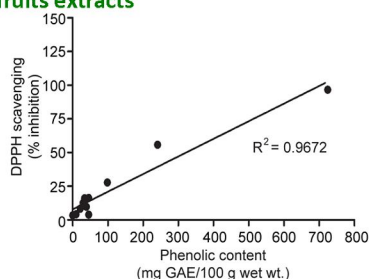
@ HEK-293 cells were induced by incubating cells with H₂O₂. Intracellular reactive oxygen species (ROS) level was measured using 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA).

@ mRNA expression of antioxidative genes were assessed by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR).

@ Protein expression of antioxidant enzymes were determined by Western blotting.

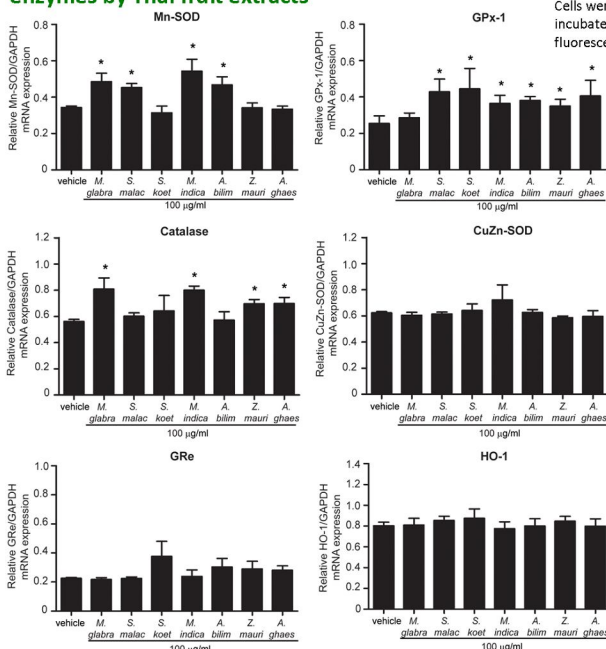
Results

1. A highly correlation between DPPH scavenging value and total phenolic content of fruits extracts



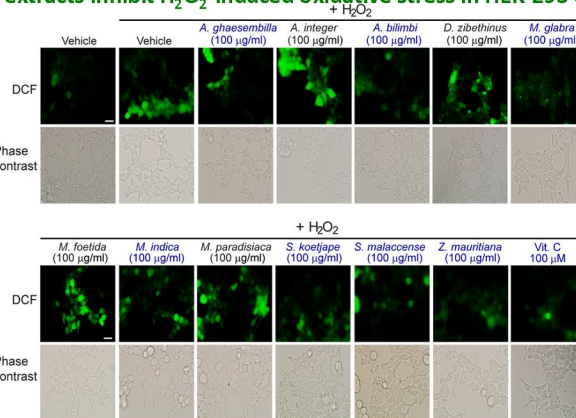
A highly positive correlation ($R^2 = 0.9934$) between the DPPH scavenging value and total phenolic content indicated that phenolic compounds mainly contributed to the antioxidant activities of these fruits.

3. Induction of mRNA expression of antioxidant enzymes by Thai fruit extracts



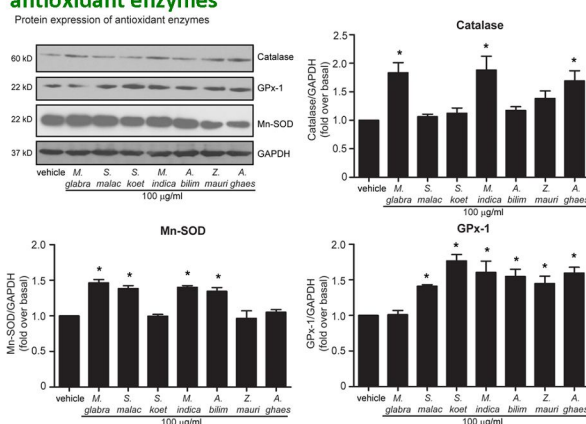
Cells were treated with vehicle (control) or 100 µg/ml fruit extracts for 6 h. The relative mRNA levels were quantified and shown as the mean ± SEM (n=4). *P < 0.05 vs. vehicle.

2. Thai fruit extracts inhibit H₂O₂-induced oxidative stress in HEK-293 cells



Cells were treated with vehicle (control), 100 µg/ml fruit extracts, or 100 µM vitamin C for 6 h. Cells were then incubated with 200 µM H₂O₂ for 30 min. The intracellular ROS production was determined by increasing DCF fluorescent intensity. DCF fluorescence is shown in green color. Scale bar, 10 µm (n=4)

4. Thai fruit extracts enhance the protein expression of antioxidant enzymes



Cells were treated with vehicle (control) or 100 µg/ml fruit extracts for 24 h. Cell lysates were immunoblotted with anti-GPx-1, anti-Mn-SOD, anti-catalase and anti-GAPDH antibodies. The relative protein levels were quantified, expressed as fold increase over control, and shown as the mean ± SEM (n=4). *P < 0.05 vs. control.

Conclusions

Extracts from *Antidesma ghaesembilla*, *Averrhoa bilimbi*, *Malpighia glabra*, *Mangifera indica*, *Sandoricum koetjape*, *Syzygium malaccense* and *Ziziphus mauritiana* exhibits the antioxidant effects by increasing the production of antioxidant enzymes in HEK-293 cells

Acknowledgements

This work was supported by Thailand Research Fund (TRF) grant RDG5720041

Correspondence to S. Mangmool, E-mail: supachoke.man@mahidol.ac.th

References

- Fu L et al. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. Food Chemistry. 2011;129:345-350.
- Vongsak B, Mangmool S, Gritsanapan W. Antioxidant activity and induction of mRNA expressions of antioxidant enzymes in HEK-293 cells of Moringa oleifera Leaf extract. Planta Med. 2015;81:1084-1089.

การตีพิมพ์ผลงานในวารสารระดับนานาชาติ

อยู่ในระหว่างการตีพิมพ์เรื่อง

Antioxidant effects of Thai fruit extracts on H₂O₂-induced oxidative stress in HEK-293 cells

Supachoke Mangmool^{1,2,*}, Pattamapan Lomarat³, Natthinee Anantachoke⁴

¹*Department of Pharmacology; ³Department of Food Chemistry; ⁴Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand*

²*Center of Excellence for Innovation in Drug Design and Discovery, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand*