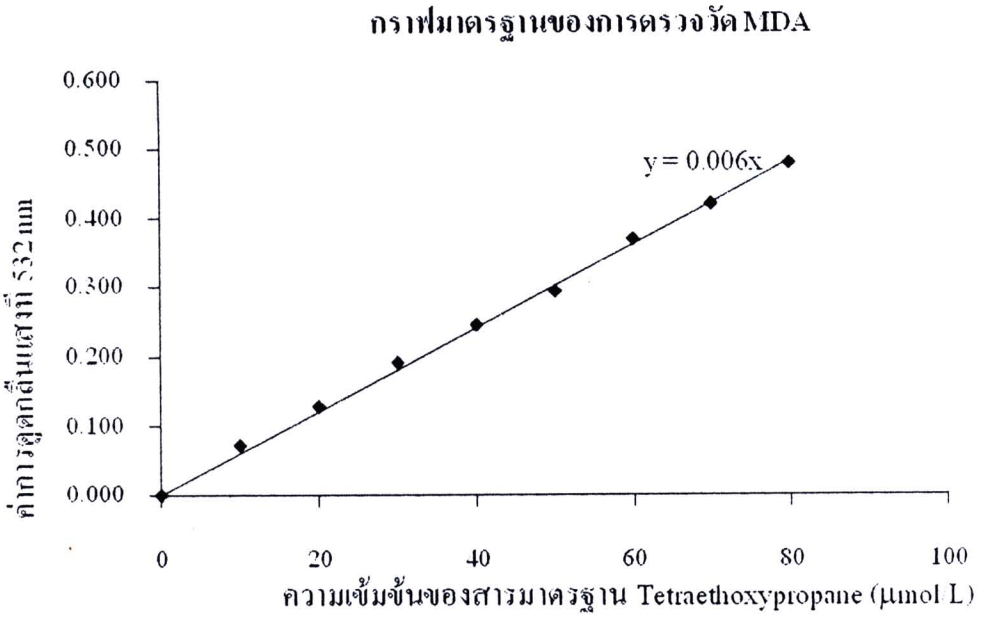
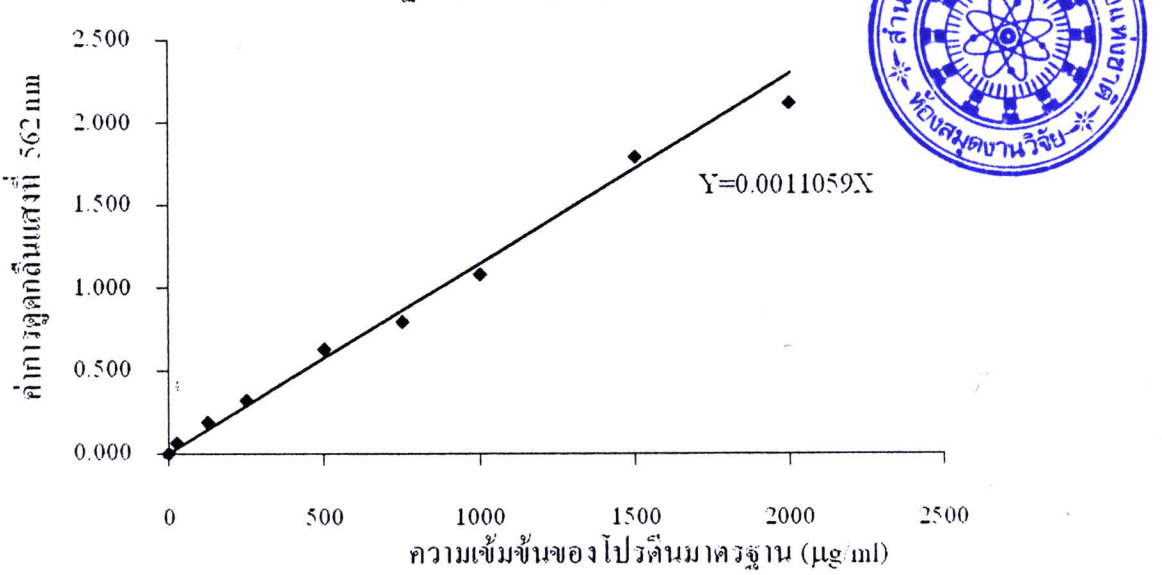
ผลการทดลอง

การวัดฤทธิ์ของผลไม้ไทยในการยับยั้ง Lipoprotein oxidation ไม่ได้ใช้การปั่นแยก Lipoprotein โดยวิธี ultracentrifugation แต่ทำโดยการเตรียม Lipoprotein จากพลาสมาด้วยวิธีการตกตะกอนแทน ซึ่งจะได้ apo B-containing lipoprotein ที่ประกอบด้วย LDL และ VLDL ผสมกันอยู่ จากนั้นได้ทดลองออกซิไดซ์ Lipoprotein ดังกล่าวด้วย $CuCl_2$ แต่ให้ผลการออกซิไดซ์น้อยมาก ค่าการดูดกลืนแสงต่ำเกินไป (ไม่ได้แสดงผล) จึงได้ทดลองเปลี่ยนมาออกซิไดซ์ด้วย $CuSO_4$ ร่วมกับ H_2O_2 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ ความเข้มข้นสุดท้ายของ $CuSO_4$ และ H_2O_2 เท่ากับ 250 μM และ 0.198 mM ตามลำดับ โดยค่าการดูดกลืนแสงเมื่อวัดปริมาณของสารผลิตภัณฑ์คือ malondialdehyde (MDA) ที่เกิดขึ้นโดยปฏิกิริยา TBARS ซึ่งเป็นผลพวงของปฏิกิริยาลิโปโปรตีนออกซิเดชัน สามารถเทียบจากกราฟมาตรฐานที่ใช้ Tetraethoxypropane (TEP) เป็นสารมาตรฐาน ดังรูปที่ 1 ค่าของ MDA จะรายงานในหน่วย nmol/mg protein ซึ่งปริมาณโปรตีนต่อพลาสมา ตัวอย่างที่เป็น pooled plasma ปริมาตร 500 μl ที่วัดโดยเทียบกราฟมาตรฐานจากวิธี Bicinchoninic acid ดังรูปที่ 2 ได้ค่าอยู่ระหว่าง 6.2-10.2 μg/ml



รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานของการตรวจวัด Malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลิโปโปรตีนออกซิเดชัน โดยใช้ Tetraethoxypropane (TEP) ที่เป็นสารตั้งต้น (precursor) ของ MDA เป็นสารมาตรฐาน

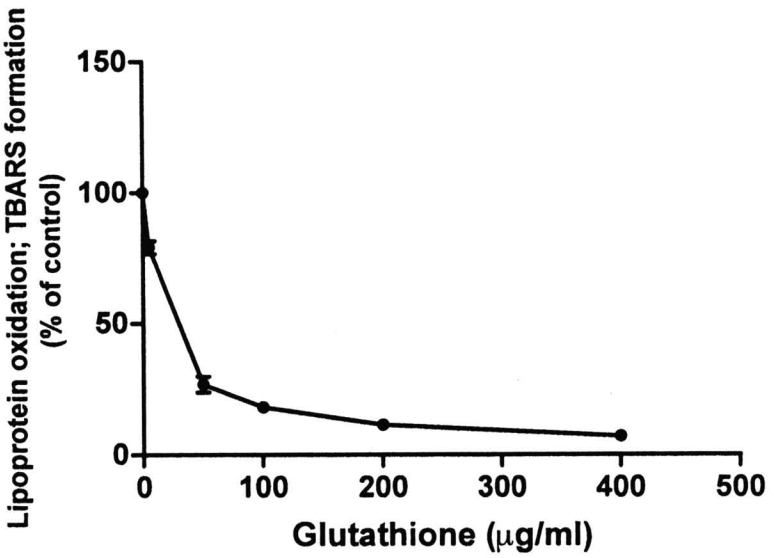


สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

รูปที่ 2 กราฟมาตรฐานของการตรวจวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bicinchoninic acid (BCA) Protein Assay

ผลของสารสกัดผลไม้ในการยับยั้งปฏิกิริยาลิโปโปรตีนออกซิเดชัน แสดงในรูปของ MDA ที่ลดลงเมื่อเทียบกับลิโปโปรตีนที่ถูกออกซิไดซ์ในสภาวะที่ไม่มีสารสกัด ความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้คือ 5, 50, 100, 200, 400 mg/ml โดยใช้ glutathione (GSH) เป็นแอนตี้ออกซิแดนซ์มาตรฐานที่ความเข้มข้นเดียวกัน glutathione แสดงผลการยับยั้งปฏิกิริยาลิโปโปรตีนออกซิเดชันแบบขึ้นกับความเข้มข้น (concentration-dependent manner) ดังรูปที่ 3 ส่วนฤทธิ์ของสารสกัดผลไม้ต่างๆ ได้แก่ มังคุด มะม่วงดิบ มะม่วงสุก ส้มโอ มะละกอดิบ มะละกอสุก กล้วยน้ำว้า และฝรั่งในการยับยั้งปฏิกิริยาลิโปโปรตีนออกซิเดชัน แสดงดังรูปที่ 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ตามลำดับ ส่วน % การยับยั้งปฏิกิริยาลิโปโปรตีน ออกซิเดชันโดยสารสกัดผลไม้แสดงดังตารางที่ 1 สารสกัดผลไม้ทุกชนิดและทุกความเข้มข้น (5, 50, 100, 200, 400 μg/ml) สามารถยับยั้งปฏิกิริยาลิโปโปรตีนออกซิเดชันได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$, Mann Whitney U test, SPSS V.14)

จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดผลไม้ทุกชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งลิโปโปรตีนออกซิเดชัน โดยมีค่า IC_{50} ที่คำณวนโดยใช้โปรแกรม ED50 plus V 1.0 เรียงตามลำดับจากน้อยไปหามาก ดังนี้คือ ฝรั่ง < มะละกอดิบ < กล้วยน้ำว้า ~ มะละกอสุก ~ มะม่วงน้ำดอกไม้สุก < ส้มโอ < มังคุด < มะม่วงเขียวเสวยดิบ ดังตารางที่ 3 แสดงว่า ฝรั่งมีฤทธิ์การยับยั้งลิโปโปรตีนออกซิเดชันที่ดีที่สุด ส่วนมะม่วงเขียวเสวยดิบมีฤทธิ์การยับยั้งลิโปโปรตีนออกซิเดชันน้อยที่สุด



รูปที่ 3 ผลของ glutathione ในการยับยั้งปฏิกิริยาลิโปโปรตีนออกซิเดชัน ในรูปของ TBARS formation (MDA) ซึ่งแสดงค่าเป็น % เทียบกับ control คือลิโปโปรตีนที่ถูกออกซิไดซ์ใน สภาวะที่ไม่มี glutathione

ตารางที่ 1 แสดงผลการยับยั้ง Lipoprotein oxidation โดย glutathione (GSH) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารสกัด	ความเข้มข้น (µg/ml)	TBARS formation (MDA) (nmolMDA/mg protein)	% inhibition of lipoprotein oxidation	% of oxidized lipoprotein
Lipoprotein	-	0.12	-	-
Ox-lipoprotein	-	12.06	-	-
GSH	5	10.3±0.87	21.2 ± 2.45	78.8±2.45
	50	3.5±0.21	73.2±3.01	26.8±3.01
	100	2.4±0.37	81.8±1.04	18.2±1.04
	200	1.5±0.33	88.6±1.88	11.4±1.88
	400	0.9±0.11	92.9±0.46	7.1±0.46

ตารางที่ 2 แสดงผลการยับยั้ง *Lipoprotein oxidation* โดยสารสกัดมังคุด,มะม่วงเขียวเสวยดิบ, มะม่วงน้ำดอกไม้สุก และส้มโอ ที่ความเข้มข้นต่างๆ

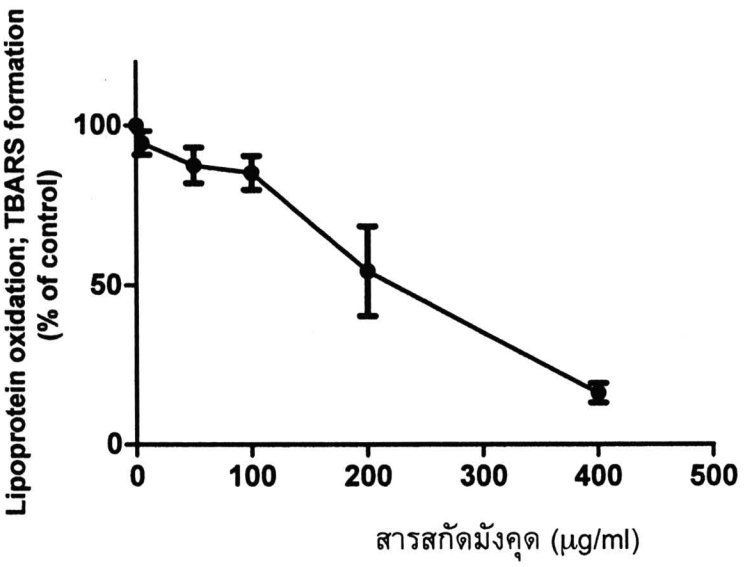
สารสกัด	ความเข้มข้น (µg/ml)	TBARS formation (MDA) (nmolMDA/mg protein)	% inhibition of lipoprotein oxidation	% of oxidized lipoprotein
มังคุด	5	12.4±1.1	5.4±3.73	94.6±3.73
	50	11.5±1.34	12.4±5.56	87.6±5.56
	100	11.1±1.29	14.8±5.29	85.2±5.29
	200	7.1±2.21	45.5±14.02	54.5±14.02
	400	2.1±0.52	83.9±3.09	16.1±3.09
มะม่วง (ดิบ)	5	10.6±0.52	18.9±8.32	81.1±8.32
	50	10.0±0.23	23.2±5.89	76.8±5.89
	100	9.6±0.32	26.0±6.44	74.0±6.44
	200	9.1±0.31	30.2±6.11	69.8±6.11
	400	8.0±0.43	38.4±6.58	61.6±6.58
มะม่วง (สุก)	5	11.8±0.79	9.8±1.21	90.2±1.21
	50	9.6±0.56	26.6±0.32	73.4±0.32
	100	3.3±0.13	74.6±0.37	25.4±0.37
	200	2.7±0.19	79.6±0.38	20.4±0.38
	400	2.3±0.04	82.3±0.63	17.7±0.63
ส้มโอ	5	11.2±0.98	13.7±12.09	86.3±12.09
	50	7.4±0.42	43.5±6.25	56.5±6.25
	100	6.9±0.41	51.7±0.95	48.3±0.95
	200	6.4±0.44	55.5±1.07	44.5±1.07
	400	6.1±0.48	57.4±1.83	42.6±1.83

ตารางที่ 3 แสดงผลการยับยั้ง Lipoprotein oxidation โดย สารสกัดมะละกอดิบ, มะละกอสุก, กล้วยน้ำว้า และฝรั่ง ที่ความเข้มข้นต่างๆ

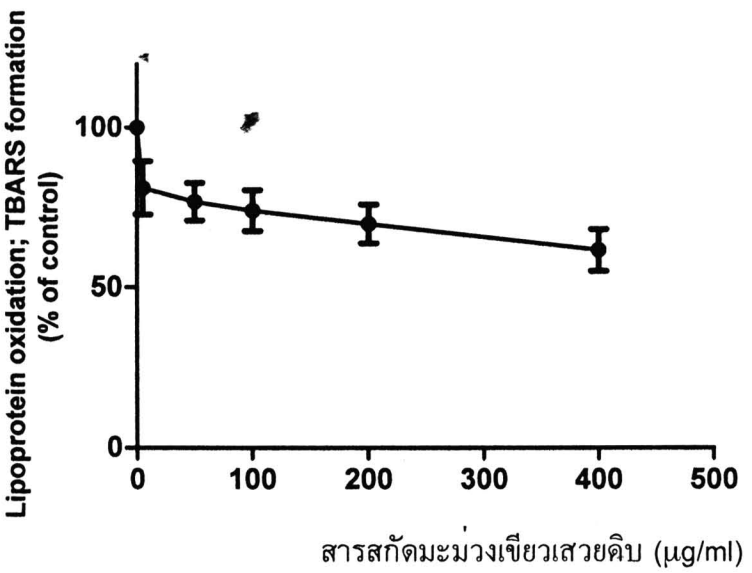
สารสกัด	ความเข้มข้น (µg/ml)	TBARS formation (MDA) (nmolMDA/mg protein)	% inhibition of lipoprotein oxidation	% of oxidized lipoprotein
มะละกอ (ดิบ)	5	9.3±0.77	28.3±9.76	71.7±9.76
	50	4.0±0.45	69.2±5.07	30.8±5.07
	100	2.9±0.38	77.7±4.09	22.3±4.09
	200	2.6±0.48	80.2±4.77	19.8±4.77
	400	2.4±0.31	81.4±3.39	18.6±3.39
มะละกอ (สุก)	5	9.8±0.23	25.1±5.78	74.9±5.78
	50	5.4±0.20	58.7±3.76	41.3±3.76
	100	4.9±0.31	62.8±4.4	37.2±4.4
	200	4.3±0.29	66.3±4.09	33.7±4.09
	400	3.8±0.19	70.6±3.09	29.4±3.09
กล้วยน้ำว้า	5	10.7±0.38	17.5±7.28	82.5±7.28
	50	9.9±0.43	24.3±7.34	75.7±7.34
	100	4.0±0.35	69.2±4.30	30.8±4.30
	200	2.3±0.16	82.3±2.17	17.7±2.17
	400	2.1±0.15	83.6±1.99	16.4±1.99
ฝรั่ง	5	10.6±1.36	18.7±6.07	81.3±6.07
	50	3.2±0.15	75.8±0.14	24.2±0.14
	100	1.1±0.02	92.6±0.61	8.40±0.61
	200	0.6±0.01	95.5±0.36	4.5±0.36
	400	0.5±0.05	95.9±0.61	4.1±0.61

ตารางที่ 4 แสดงค่า IC_{50} ของสารสกัดผลไม้ชนิดต่างๆ ในการยับยั้ง Lipoprotein oxidation

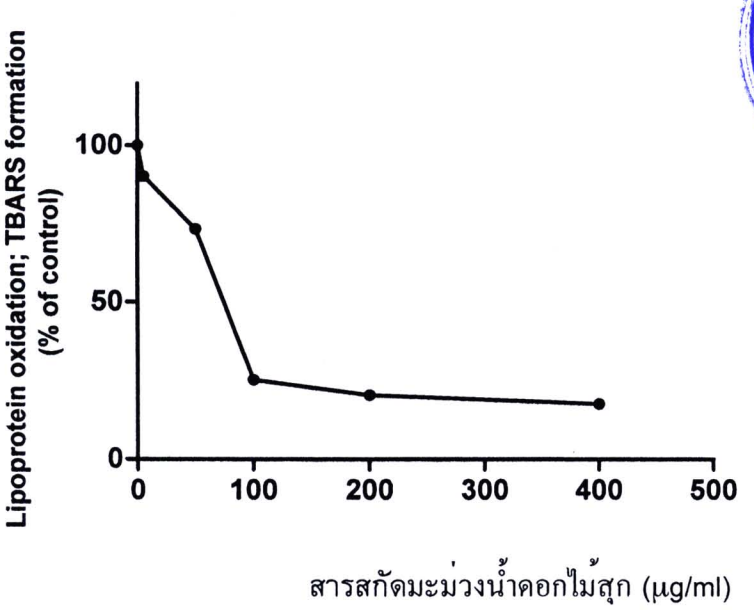
สารสกัดผลไม้	ค่า IC_{50} (μg/ml)
มังคุด	236.5
มะม่วงเขียวเสวยดิบ	522.7
มะม่วงน้ำดอกไม้สุก	148.5
ส้มโอ	231.6
มะละกอดิบ	85.0
มะละกอสุก	146.9
กล้วย	144.9
ฝรั่ง	59.7



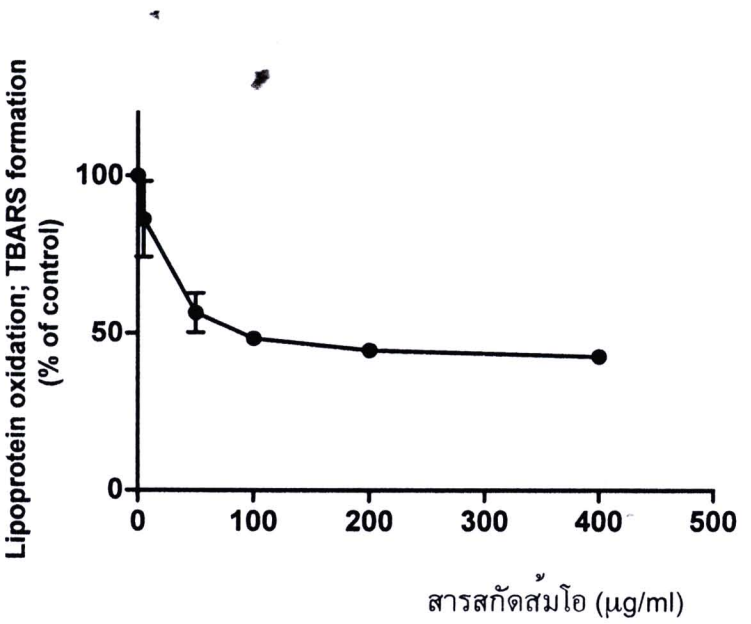
รูปที่ 4 แสดงผลการยับยั้ง Lipoprotein oxidation โดยสารสกัดมังคุดที่ความเข้มข้นต่างๆ ในรูปของ TBARS คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับ Oxidized Lipoprotein



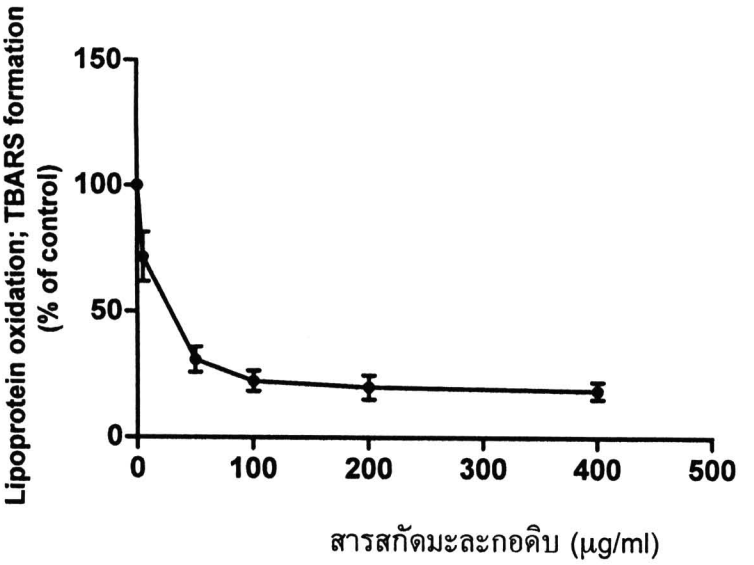
รูปที่ 5 แสดงผลการยับยั้ง Lipoprotein oxidation โดยสารสกัดมะม่วงเขียวเสวยดิบที่ความเข้มข้นต่างๆ ในรูปของ TBARS คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับ Oxidized Lipoprotein



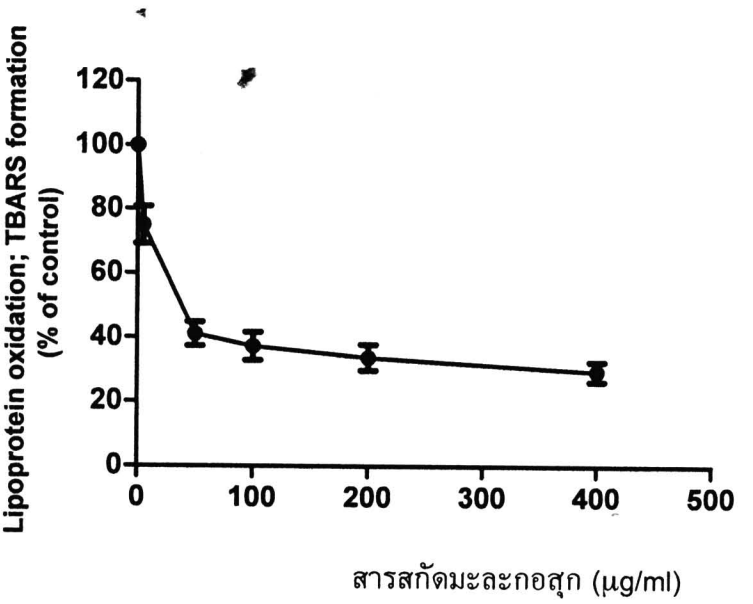
รูปที่ 6 แสดงผลการยับยั้ง Lipoprotein oxidation โดยสารสกัดมะม่วงน้ำดอกไม้สุกที่ความเข้มข้นต่างๆ ในรูปของ TBARS คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับ Oxidized Lipoprotein



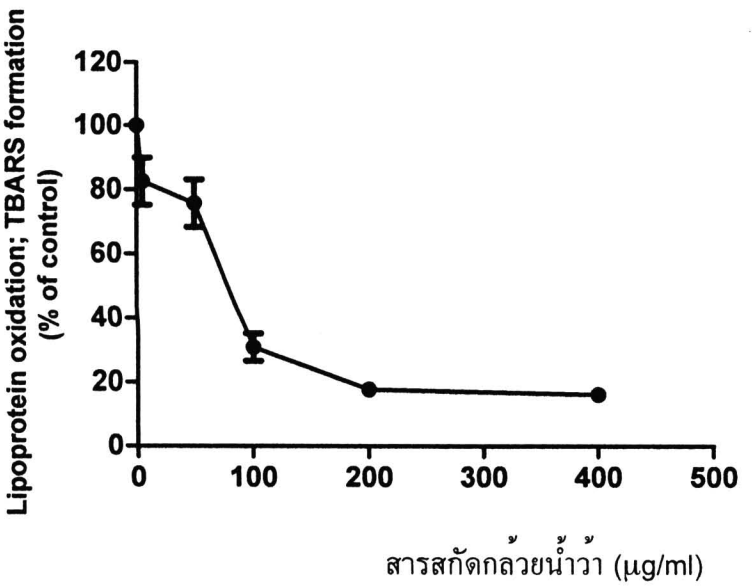
รูปที่ 7 แสดงผลการยับยั้ง Lipoprotein oxidation โดยสารสกัดส้มโอที่ความเข้มข้นต่างๆ ในรูปของ TBARS คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับ Oxidized Lipoprotein



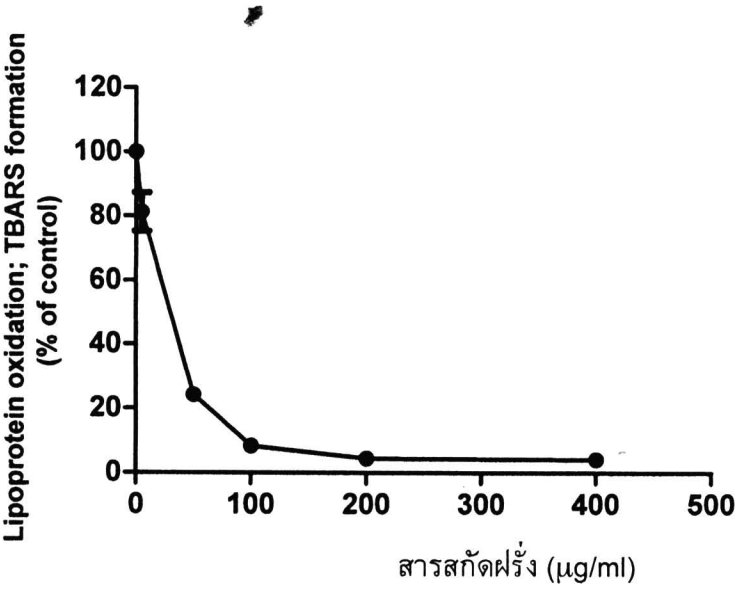
รูปที่ 8 แสดงผลการยับยั้ง Lipoprotein oxidation โดยสารสกัดมะละกอดิบที่ความเข้มข้นต่างๆ ในรูปของ TBARS คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับ Oxidized Lipoprotein



รูปที่ 9 แสดงผลการยับยั้ง Lipoprotein oxidation โดยสารสกัดมะละกอสุกที่ความเข้มข้นต่างๆ ในรูปของ TBARS คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับ Oxidized Lipoprotein

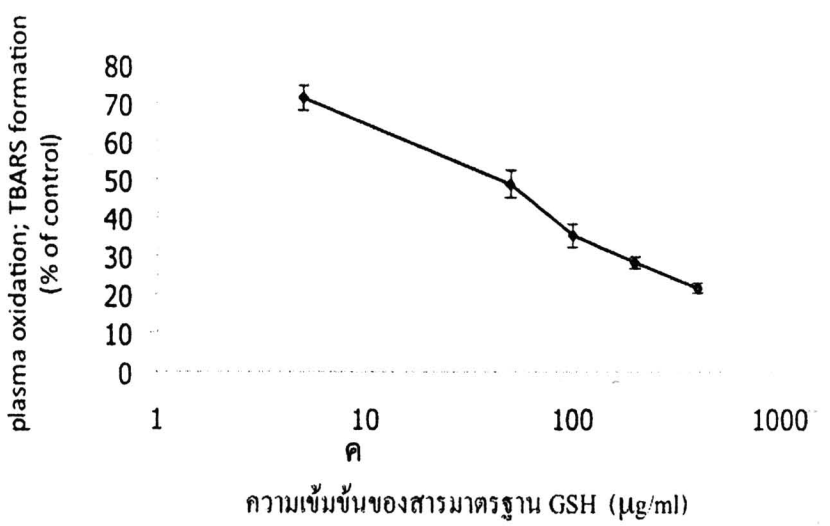


รูปที่ 10 แสดงผลการยับยั้ง Lipoprotein oxidation โดยสารสกัดกล้วยน้ำว้าที่ความเข้มข้นต่างๆ ในรูปของ TBARS คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับ Oxidized Lipoprotein

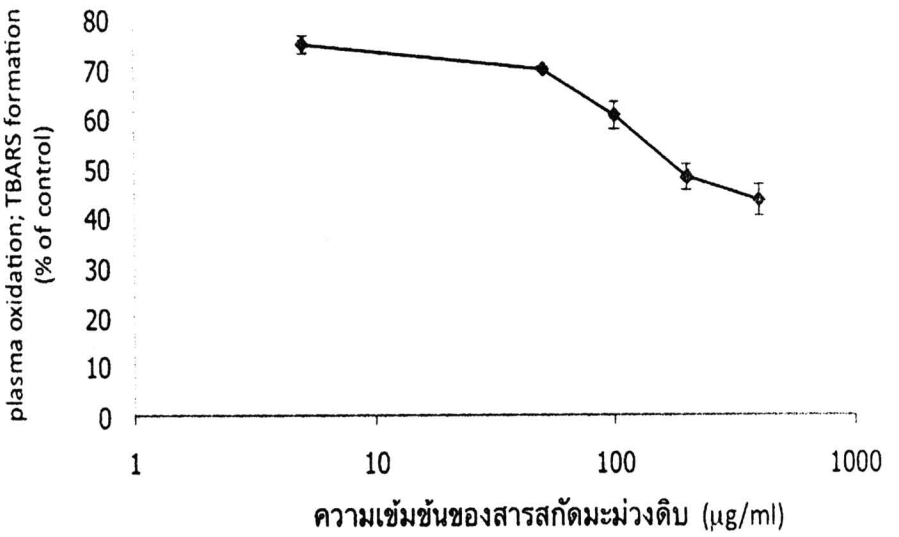


รูปที่ 11 แสดงผลการยับยั้ง Lipoprotein oxidation โดยสารสกัดฝรั่งที่ความเข้มข้นต่างๆ ในรูปของ TBARS คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับ Oxidized Lipoprotein

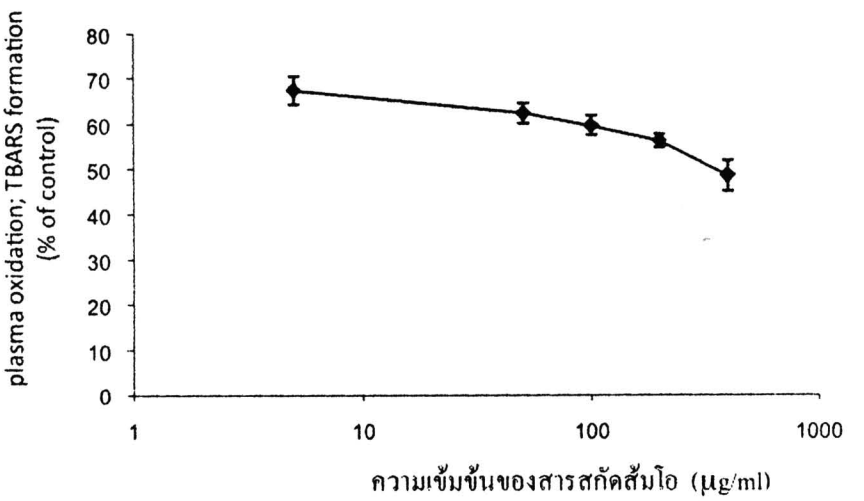
สำหรับฤทธิ์ของสารสกัดผลไม้ต่างๆ ได้แก่ มังคุด มะม่วงดิบ มะม่วงสุก ส้มโอ มะละกอดิบ มะละกอสุก กล้วยน้ำว้า และฝรั่งในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในพลาสมา ทำโดยการเก็บ pooled plasma จากคนสุขภาพดีและจากผู้ป่วยเบาหวาน แล้วนำมาทดสอบเปรียบเทียบกัน จะเห็นว่า ระดับ MDA ในพลาสมาของผู้ป่วยเบาหวานสูงกว่าในคนที่มีสุขภาพดี ทั้งในสภาวะที่ไม่ถูกออกซิไดซ์และถูกออกซิไดซ์ด้วย $CuSO_4$ ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 250 μM (ตารางที่ 5) ส่วนฤทธิ์การยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในพลาสมาของผู้ป่วยเบาหวาน แสดงดังรูปที่ 12, 13, 14, 15, 16 ตามลำดับ ฤทธิ์การยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในพลาสมาของคนที่มีสุขภาพดี แสดงดังรูปที่ 17, 18, 19, 20, 21 ตามลำดับ สำหรับ % การยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในพลาสมาโดยสารสกัดผลไม้ชนิดต่างๆ แสดงดังตารางที่ 5 จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดผลไม้ทุกชนิดและทุกความเข้มข้น (5, 50, 100, 200, 400 μg/ml) สามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในหลอดทดลองที่มีพลาสมาของคนที่มีสุขภาพดี และในผู้ป่วยเบาหวานได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$, Mann Whitney U test, SPSS V.14)



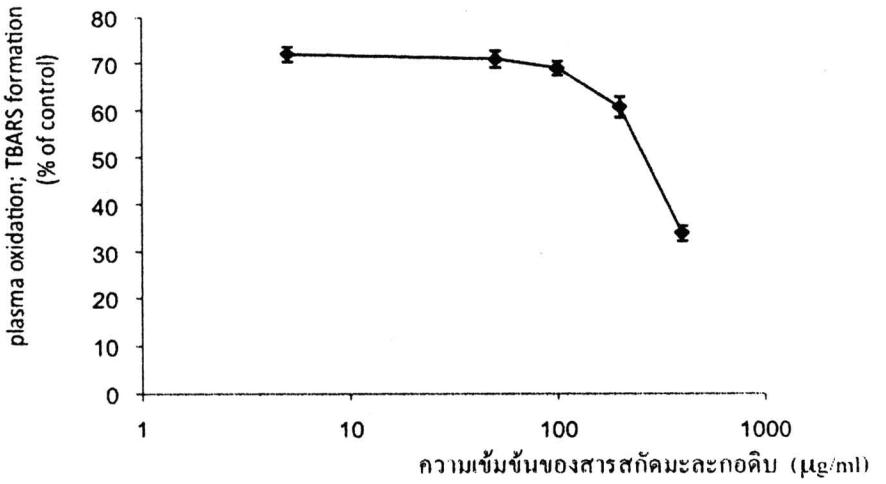
รูปที่ 12 ผลของ glutathione ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในพลาสมาของผู้ป่วยเบาหวาน ในรูปของ TBARS formation (MDA) ซึ่งแสดงค่าเป็น % เทียบกับ control คือพลาสมาที่ถูกออกซิไดซ์ในสภาวะที่ไม่มี glutathione



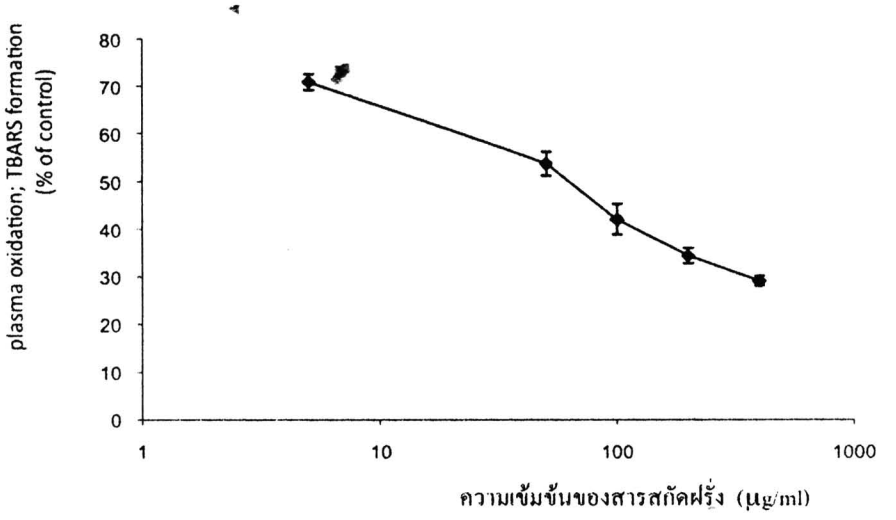
รูปที่ 13 ผลของสารสกัดมะม่วงดิบ ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ในพลาสมาของผู้ป่วยเบาหวาน ในรูปของ TBARS formation (MDA) ซึ่งแสดงค่าเป็น % เทียบกับ control คือพลาสมาที่ ถูกออกซิไดซ์ในสภาวะที่ไม่มีสารสกัดมะม่วงดิบ



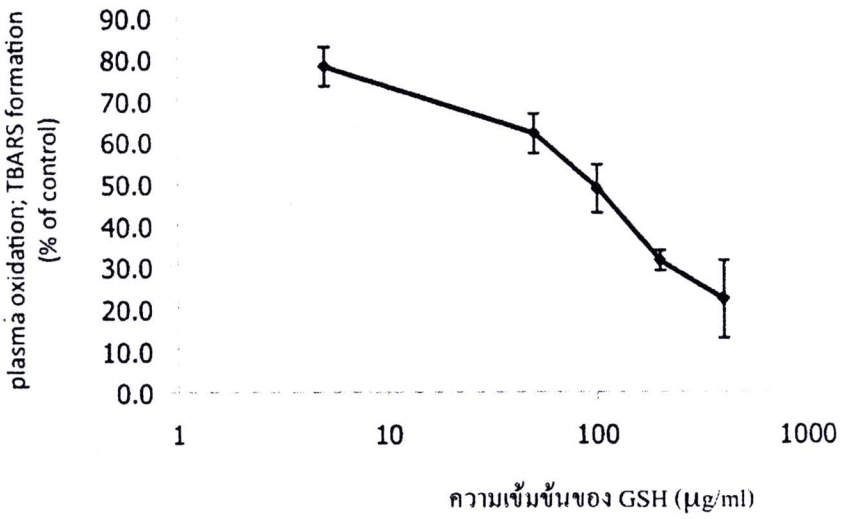
รูปที่ 14 ผลของสารสกัดส้มโอในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในพลาสมาของผู้ป่วยเบาหวาน ในรูปของ TBARS formation (MDA) ซึ่งแสดงค่าเป็น % เทียบกับ control คือพลาสมาที่ถูกออกซิไดซ์ในสภาวะที่ไม่มีสารสกัดส้มโอ



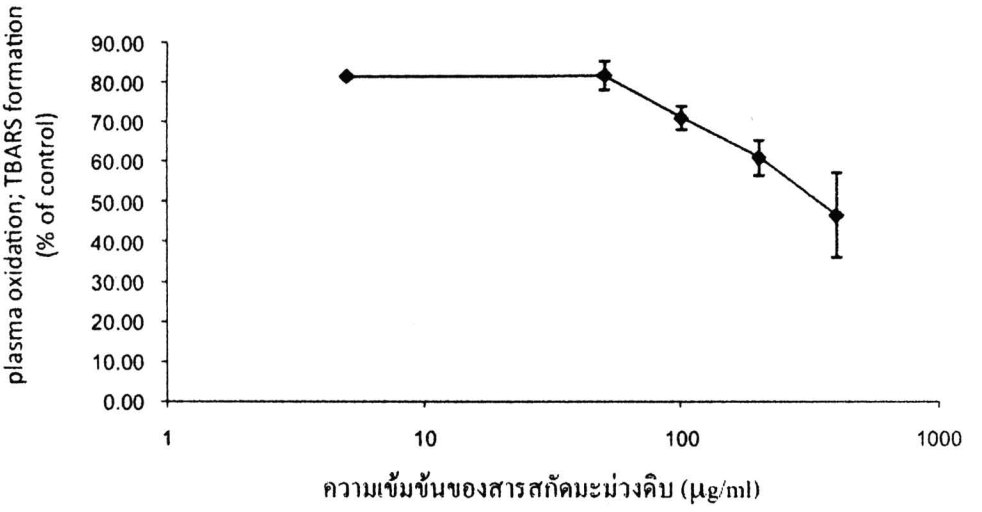
รูปที่ 15 ผลของสารสกัดมะละกอดิบในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในพลาสมาของผู้ป่วยเบาหวาน ในรูปของ TBARS formation (MDA) ซึ่งแสดงค่าเป็น % เทียบกับ control คือพลาสมาที่ถูก ออกซิไดซ์ในสภาวะที่ไม่มีสารสกัดมะละกอดิบ



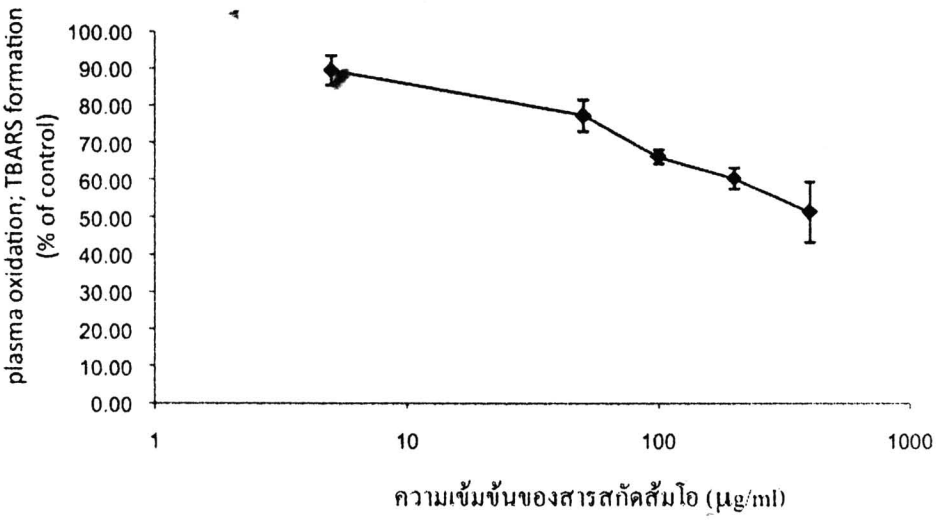
รูปที่ 16 ผลของสารสกัดฝรั่งในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในพลาสมาของผู้ป่วยเบาหวาน ในรูปของ TBARS formation (MDA) ซึ่งแสดงค่าเป็น % เทียบกับ control คือพลาสมาที่ถูกออกซิไดซ์ในสภาวะที่ไม่มีสารสกัดฝรั่ง



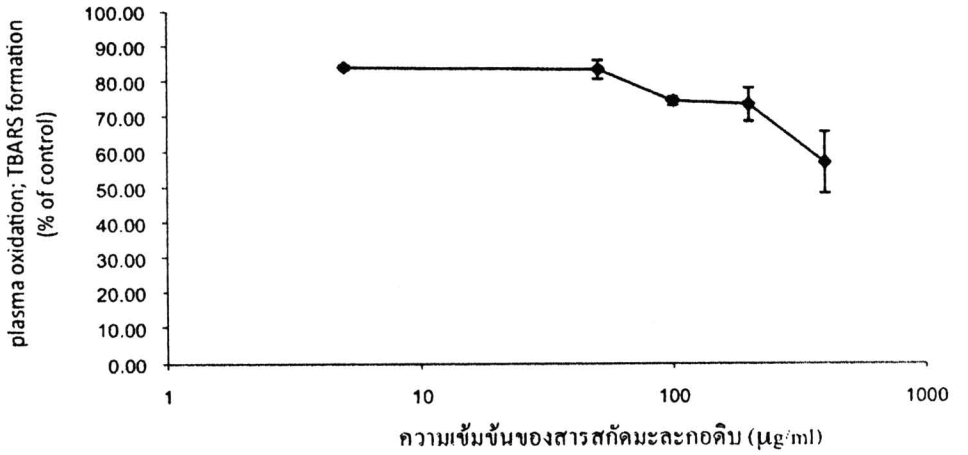
รูปที่ 17 ผลของ glutathione ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในพลาสมาของคนที่มีสุขภาพดี ในรูปของ TBARS formation (MDA) ซึ่งแสดงค่าเป็น % เทียบกับ control คือพลาสมาที่ถูกออกซิไดซ์ในสภาวะที่ไม่มี glutathione



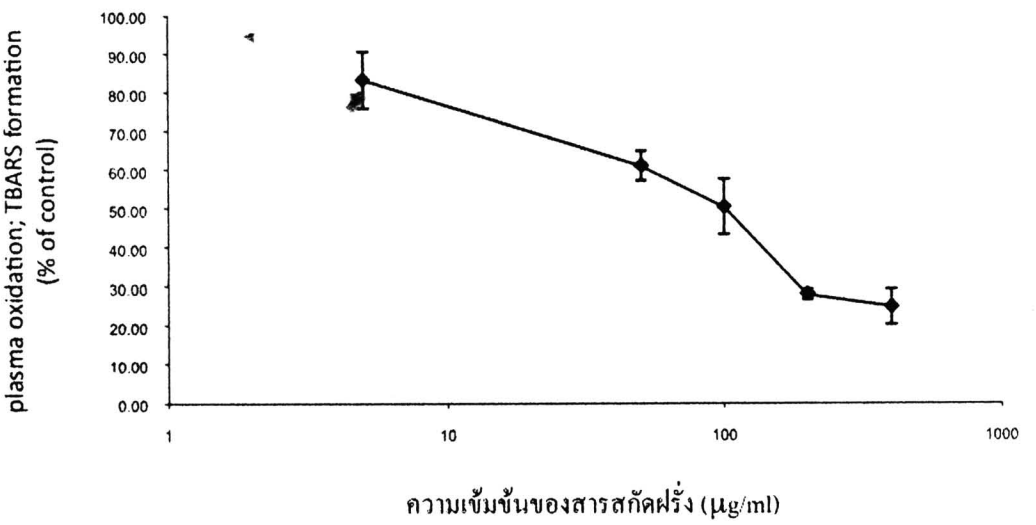
รูปที่ 18 ผลของสารสกัดมะม่วงดิบในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในพลาสมาของคนที่มีสุขภาพดี ในรูปของ TBARS formation (MDA) ซึ่งแสดงค่าเป็น % เทียบกับ control คือพลาสมาที่ถูกออกซิไดซ์ในสภาวะที่ไม่มีสารสกัดมะม่วงดิบ



รูปที่ 19 ผลของสารสกัดส้มโอในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในพลาสมาของคนที่มีสุขภาพดี ในรูปของ TBARS formation (MDA) ซึ่งแสดงค่าเป็น % เทียบกับ control คือพลาสมาที่ถูกออกซิไดซ์ในสภาวะที่ไม่มีสารสกัดส้มโอ



รูปที่ 20 ผลของสารสกัดมะละกอดิบในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในพลาสมาของคนที่มีสุขภาพดี ในรูปของ TBARS formation (MDA) ซึ่งแสดงค่าเป็น % เทียบกับ control คือพลาสมาที่ถูก ออกซิไดซ์ในสภาวะที่ไม่มีสารสกัดมะละกอดิบ



รูปที่ 21 ผลของสารสกัดฝรั่งในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในพลาสมาของคนที่มีสุขภาพดี ในรูปของ TBARS formation (MDA) ซึ่งแสดงค่าเป็น % เทียบกับ control คือพลาสมา ที่ถูกออกซิไดซ์ ในสภาวะที่ไม่มีสารสกัดฝรั่ง

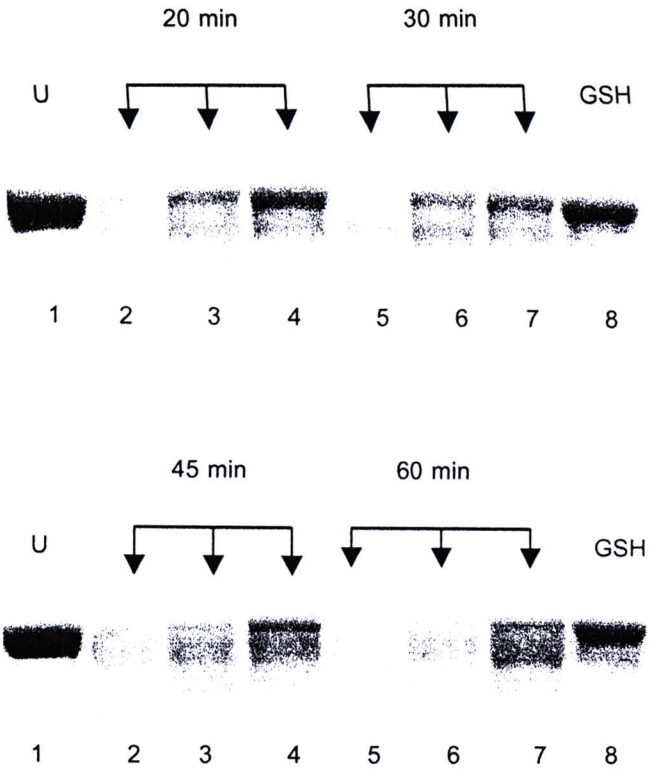
ตารางที่ 5 แสดง % การยับยั้ง plasma oxidation โดยสารสกัดผลไม้ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อนำพลาสมาของคนสุขภาพดีและพลาสมาของผู้ป่วยเบาหวานมาออกซิไดซ์ด้วย 250 μM $CuSO_4$

		พลาสมาจากคนสุขภาพดี		พลาสมาจากผู้ป่วยเบาหวาน	
		TBARS formation (MDA); μmol/L	%inhibition of plasma oxidation	TBARS formation (MDA); μmol/L	%inhibition of plasma oxidation
	plasma (untreated)	1.3 ± 0.36		2.4 ± 0.28	
	Plasma Oxidation	29.5 ± 1.14		34.4 ± 1.49	
Glutathione	5 μg/ml	23.0 ± 0.45	21.9± 4.71	24.6 ± 1.12	29.6 ± 3.27
	50 μg/ml	18.3 ± 0.92	38.2± 4.77	16.9 ± 1.24	51.1± 3.59
	100 μg/ml	14.3 ± 0.41	52.4 ± 5.78	12.3 ± 1.02	65.4± 2.97
	200 μg/ml	9.3 ± 0.36	68.7 ± 2.39	9.8 ± 0.52	72.5 ± 1.53
	400 μg/ml	6.5 ± 0.59	77.9 ± 9.27	7.5 ± 0.43	79.1 ± 1.27
สารสกัดมะม่วงดิบ	5 μg/ml	24.0 ± 0.69	19.5 ± 0.42	25.7 ± 0.59	25.3 ± 1.74
	50 μg/ml	24.1 ± 0.28	19.2± 3.59	24.0 ± 0.19	31.3 ± 0.56
	100 μg/ml	21.0± 0.55	28.9± 2.98	20.8 ± 0.93	40.6 ± 2.72
	200 μg/ml	18.0± 0.51	39.2 ± 4.45	16.5 ± 0.89	53.1 ± 2.59
	400 μg/ml	13.8 ± 0.55	53.4± 10.5	14.9 ± 1.09	57.6 ± 3.17
สารสกัดส้มโอ	5 μg/ml	26.4 ± 1.39	10.5 ± 3.96	23.2 ± 1.06	33.6 ± 3.09
	50 μg/ml	22.8 ± 1.12	22.6 ± 4.23	21.5 ± 0.76	37.7± 2.21
	100 μg/ml	19.6 ± 0.58	33.6± 1.88	20.5 ± 0.73	40.3± 2.14
	200 μg/ml	17.9 ± 0.49	39.4 ± 2.79	19.4 ± 0.49	43.7 ± 1.44
	400 μg/ml	15.2 ± 0.69	48.5± 8.12	16.7 ± 1.16	51.5± 3.38

ตารางที่ 6 (ต่อ) แสดง % การยับยั้ง plasma oxidation โดยสารสกัดผลไม้ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อนำพลาสมาของคนสุขภาพดีและพลาสมาของผู้ป่วยเบาหวานมาออกซิไดซ์ด้วย 250 μM $CuSO_4$

		พลาสมาจากคนสุขภาพดี		พลาสมาจากผู้ป่วยเบาหวาน	
		TBARS formation (MDA); μmol/L	%inhibition of plasma oxidation	TBARS formation (MDA); μmol/L	%inhibition of plasma oxidation
สารสกัดมะละกอดิบ	5 μg/ml	24.8± 1.24	16.9± 0.61	24.8 ± 0.55	32.6 ± 3.09
	50 μg/ml	24.6 ± 0.61	16.7 ± 2.7	24.4± 0.61	37.7 ± 2.21
	100 μg/ml	21.9 ± 0.75	25.7 ± 1.17	23.8± 0.51	40.3± 2.14
	200 μg/ml	21.6± 1.01	26.7± 4.74	20.9± 0.75	43.7 ± 1.44
	400 μg/ml	16.8 ± 0.68	43.1± 8.65	11.7 ± 0.56	51.4 ± 3.38
สารสกัดฝรั่ง	5 μg/ml	24.6 ± 0.49	17.5 ± 7.31	24.4± 0.58	27.1± 1.60
	50 μg/ml	18.0± 0.76	38.8 ± 3.83	18.5 ± 0.84	29.1 ± 1.79
	100 μg/ml	14.9 ± 0.64	49.4 ± 7.13	14.5 ± 1.11	30.9 ± 1.50
	200 μg/ml	8.3± 0.49	71.8 ± 1.27	11.8 ± 0.56	39.2 ± 2.18
	400 μg/ml	7.4 ± 0.69	74.9 ± 4.52	10.0 ± 0.36	66.1 ± 1.63

การตรวจหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในผลไม้ไทย ในการป้องกันการเกิดออกซิเดชันของโปรตีน BSA โดย Cu^{2+} และ H_2O_2 ทำโดยเริ่มต้นทดสอบหาความเข้มข้นของ Cu^{2+} และ H_2O_2 และเวลาที่เหมาะสมในการออกซิไดซ์โปรตีน BSA จากผลการทดลอง เมื่อให้ความเข้มข้นของ Cu^{2+} คงที่ (0.05 mM) แล้วเพิ่มความเข้มข้นของ H_2O_2 จาก 0.625, เป็น 3.125 และ 1.25 mM H_2O_2 ตามลำดับ ที่ระยะเวลาต่างๆ คือ 20, 30, 45, และ 60 นาที พบว่า แถบความเข้มของโปรตีน BSA ลดลงตามความเข้มข้นของ Cu^{2+} และ H_2O_2 ที่เพิ่มขึ้น รวมทั้งระยะเวลาที่นานขึ้น ก็ยิ่งทำให้แถบความเข้มของโปรตีนจางลงตามลำดับ ดังรูปที่ 22 ในการทดลองนี้เลือกใช้สภาวะการออกซิไดซ์ที่ 0.05 mM Cu^{2+} และ 0.625 mM H_2O_2 เป็นเวลา 30 นาที glutathione (GSH) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ก็สามารถป้องกันการเกิดโปรตีนออกซิเดชันได้ โดยสังเกตจากแถบความเข้มของโปรตีน BSA ที่กลับมาเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีน BSA ในสภาวะที่ถูกออกซิไดซ์ (treated, T) เมื่อทำการทดสอบกับสารสกัดผลไม้ไทยชนิดต่างๆ พบว่า สารสกัดจากมังคุดมีฤทธิ์ในการต้านโปรตีนออกซิเดชันได้ดีที่สุด รองลงมาคือสารสกัดมะม่วงน้ำดอกไม้สุกและสารสกัดส้มโอ ส่วนสารสกัดมะม่วงเขียวเสวยดิบ มะละกอดิบ มะละกอสุก กล้วยน้ำว้าสุก และฝรั่ง มีฤทธิ์ต้านโปรตีนออกซิเดชันได้เช่นเดียวกันแต่ไม่มากนัก (รูปที่ 23)

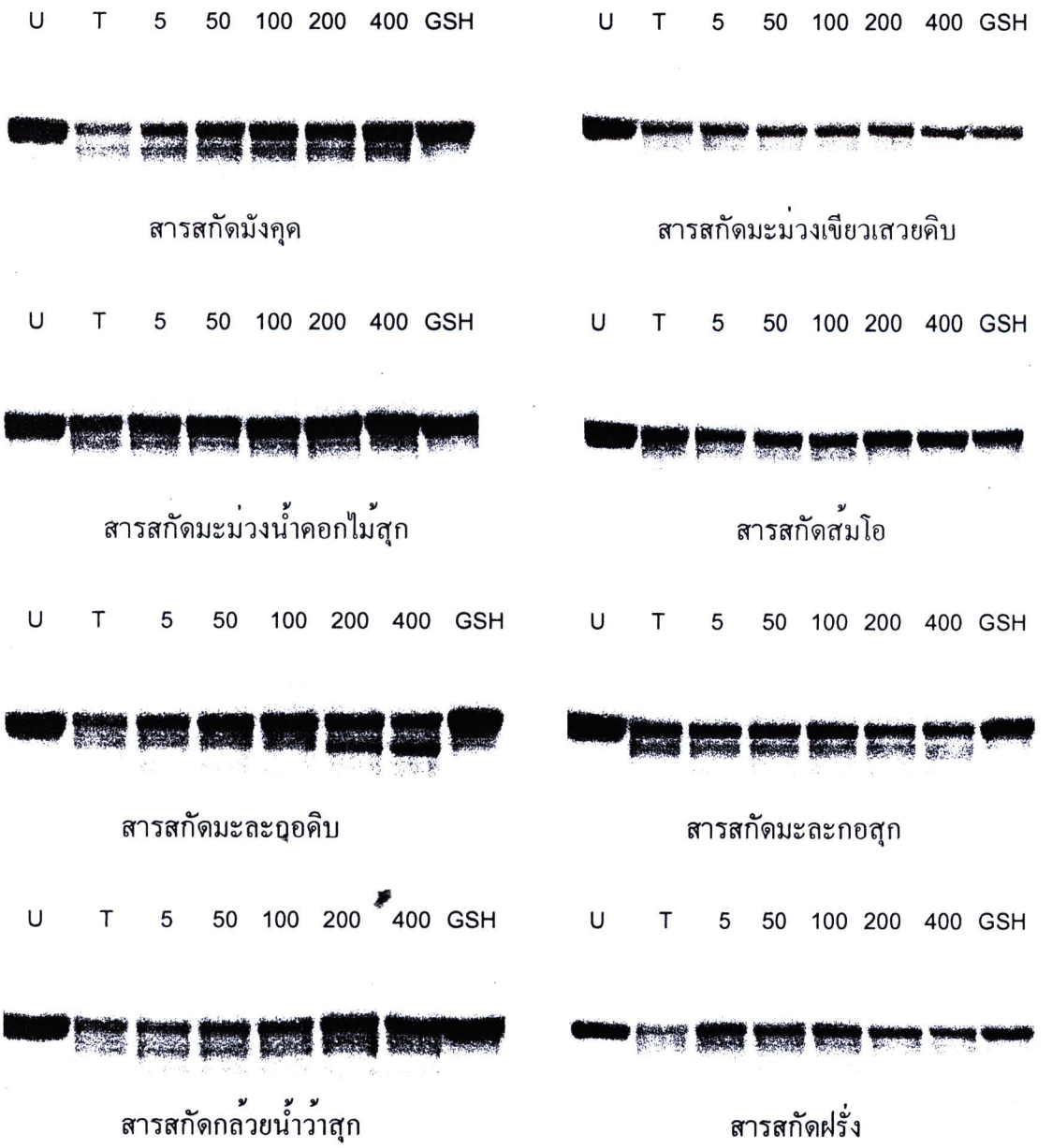


รูปที่ 22 ผลของการเกิดปฏิกิริยาโปรตีนออกซิเดชันระหว่าง BSA กับ Cu^{2+}/H_2O_2 ที่ระยะเวลา 20, 30, 45 และ 60 นาที [U=untreated BSA, GSH = glutathione]

Lane 2, 5 = 0.05 mM Cu^{2+} / 1.25 mM H_2O_2

Lane 3, 6 = 0.05 mM Cu^{2+} / 0.625 mM H_2O_2

Lane 4, 7 = 0.05 mM Cu^{2+} / 0.3125 mM H_2O_2



รูปที่ 23 ฤทธิ์ของสารสกัดผลไม้ชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 5-400 μg/ml ในการต้านออกซิเดชันต่อโปรตีน BSA ที่ถูกออกซิไดซ์ด้วย Cu^{2+}/H_2O_2, U = untreated (BSA), T = treated (BSA + Cu^{2+}/H_2O_2), GSH = Glutathione

ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ Protein carbonyl content

การทดลองนี้ได้จำลองสถาณการณ์ที่เกิดขึ้นในร่างกาย ในภาวะที่โปรตีนสัมผัสกับน้ำตาลกลูโคสเป็นระยะเวลานาน โดยคาดว่ากลูโคสจะเป็นตัวชักนำให้เกิดออกซิเดชันต่อโปรตีนเช่นเดียวกับพยาธิสภาพที่พบในผู้ป่วยเบาหวาน วัดปริมาณ carbonyl content ของสารละลายโปรตีนที่ผสมกับน้ำตาลกลูโคสในสภาวะที่มีและไม่มีสารสกัดผลไม้ ที่ความยาวคลื่น 370 nm ผลแสดงดังตารางที่ 7, 8

ตารางที่ 7 ปริมาณ carbonyl content และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 370 nm ของสารละลายโปรตีน BSA ที่ผสมกับน้ำตาลกลูโคส 100 mM ในสภาวะที่มีและไม่มีสารสกัดผลไม้ เป็นเวลา 4 และ 8 สัปดาห์

	Protein carbonyl content (mM/mg protein)		
	day 0	Week 4	week 8
BSA	4.01 ± 0.167	5.67 ± 0.251	6.35 ± 1.463
BSA + glu (100 mM)	3.10 ± 0.209	7.29 ±1.379	11.9 ± 0.042
1) BSA + glu (100 mM) + มะม่วงเขียวเสวย (ดิบ)			
5 µg / mL		8.14 ±3.886	12.8 ± 4.513
100 µg / mL		10.22 ± 1.54	14.4 ± 5.014
400 µg / mL		11.05 ± 0.669	13.3 ± 2.465
2) BSA + glu (100 mM) + ส้มโอ			
5 µg / mL		10.19 ± 4.555	14.4 ± 9.695
100 µg / mL		8.95 ± 0.460	12.5 ± 1.546
400 µg / mL		10.31 ±1.463	10.9 ± 1.671
3) BSA + glu (100 mM) + มะละกอ (ดิบ)			
5 µg / mL		11.32 ± 4.054	14.8 + 6.519
100 µg / mL		7.77 ± 1.128	10.9 +2.674
400 µg / mL		7.51 ± 3.845	14.8 ± 9.277
4) BSA + glu (100 mM) + ฝรั่ง			
5 µg / mL		14.6 ± 10.99	16.6 ± 10.448
100 µg / mL		9.01 ± 0.543	10.3 ± 0.295
400 µg / mL		10.46 ± 0.418	12.3 ±1.629
BSA + glu + vit C	4.37 ± 0.001	25.53 ± 1.003	23.6 ± 1.003
BSA + glu + GSH	4.31 ± 0.001	10.73 ± 0.878	11.2 ± 0.209

ตารางที่ 8 ปริมาณ carbonyl content และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 370 nm ของสารละลายโปรตีน BSA ที่ผสมกับน้ำตาลกลูโคส 500 mM ในสภาวะที่มีและไม่มีสารสกัดผลไม้ เป็นเวลา 4 และ 8 สัปดาห์

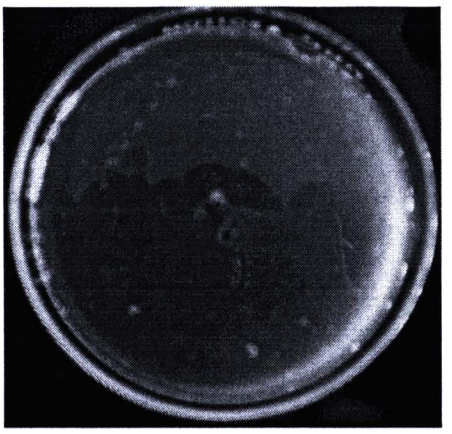
	Protein carbonyl content (mM/mg protein)		
	Day 0	Week 4	Week 8
BSA	4.02 ± 0.167	5.67 ± 0.251	6.35 ± 1.463
BSA + glu (500 mM)	4.25 ± 0.167	12.4 ± 1.254	33.3 ± 0.710
1) BSA + glu (500 mM) + มะม่วงเขียวเสวย (ดิบ)			
5 µg / mL		12.32 ± 0.293	32.5± 7.104
100 µg / mL		13.85 ±0.376	30.7 ±1.713
400 µg / mL		13.95 ±0.752	25.9 ±0.752
2) BSA + glu (500 mM) + ส้มโอ			
5 µg / mL		13.74 ±5.892	23.8 ±19.85
100 µg / mL		12.97± 0.209	29.7± 10.239
400 µg / mL		12.59 ±0.627	20.7± 2.382
3) BSA + glu (500 mM) + มะละกอ (ดิบ)			
5 µg / mL		11.47 ±0.836	24.6± 1.546
100 µg / mL		13.03± 2.716	20.2± 0.251
400 µg / mL		11.6 ±0.919	19.1± 2.925
4) BSA + glu (500 mM) + ฝรั่ง			
5 µg / mL		10.58 ±0.501	18.1 ±1.295
100 µg / mL		19.1± 2.048	28.4 ±0.543
400 µg / mL		15.3 ±0.46	27.8 ±12.37
BSA + glu + vit C	4.55 ± 0.001	28.33 ±1.881	37.6 ±5.391
BSA + glu + GSH	3.90 ±0.083	17.73 ±4.597	33.01 ±8.358

จากผลการทดลองพบว่า เมื่อบ่มโปรตีน BSA กับน้ำตาลกลูโคส 100 mM ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C เป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ ปริมาณ protein carbonyl content มีระดับเพิ่มขึ้น (7.29 $\pm$ 1.379 *VS* 11.9 $\pm$ 0.042 mM/mg protein) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเป็น 500 mM ปริมาณ protein carbonyl content ของ BSA ยิ่งเพิ่มขึ้นตามลำดับ ที่ระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ (12.4 $\pm$ 1.254 *VS* 33.3 $\pm$ 0.710 mM/mg protein) เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีน BSA ในสภาวะที่มีและไม่มีน้ำตาลกลูโคสในวันแรก (day 0) อย่างไรก็ตาม ในสภาวะที่มีสารสกัดผลไม้เมื่อบ่มโปรตีน BSA กับน้ำตาล กลูโคส 100 mM ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C เป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ กลับไม่พบฤทธิ์การยับยั้งการเกิดโปรตีน carbonyl แต่อย่างใด ทั้งค่าของ protein carbonyl content ยังแปรปรวนมากทีเดียว เมื่อบ่มโปรตีน BSA กับน้ำตาลกลูโคส 500 mM ในสภาวะที่มีสารสกัดผลไม้ชนิดต่างๆ พบว่า สารสกัดมะละกอดิบกับสารสกัดมะม่วงเขียวเสวยดิบ ที่แสดงฤทธิ์การยับยั้งการเกิดโปรตีน carbonyl ที่เวลา 8 สัปดาห์ตามความเข้มข้น ส่วนสารสกัดส้มโอ ค่าไม่เป็นไปตามความเข้มข้นของสารสกัด ในการทดลองนี้ได้ใช้สาร antioxidant มาตรฐานคือ Glutathione (GSH) และวิตามินซี (ascorbic acid) มาทดสอบควบคู่ไปด้วย แต่ผลการทดลองพบว่า Glutathione (GSH) ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเกิดโปรตีน carbonyl ส่วนวิตามินซี (ascorbic acid) กลับทำให้เกิดโปรตีน carbonyl มากยิ่งขึ้น ดังตารางที่ 7, 8

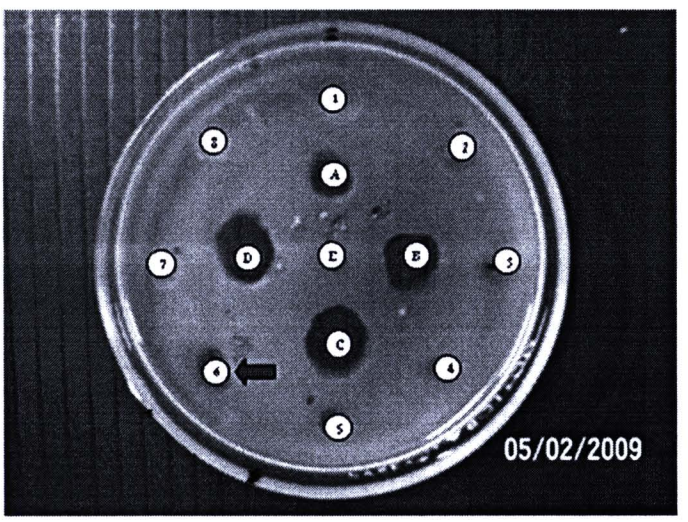
ผลการตรวจวัด Fibrinolytic activities ของผลไม้ไทย ด้วยวิธี *in vitro* modified fibrin plate assay

เมื่อนำสารละลาย human fibrinogen ผสมกับสารละลาย thrombin จะเกิดการก่อตัวเป็นไฟบริน (fibrin layer) ดังรูปที่ 24 (a) จากนั้นหยด plasmin ซึ่งเป็นสารมาตรฐานลงไปในปริมาณต่างๆ คือ 2, 5, 10, และ 15 μg อุ่นที่ 37 °C เป็นเวลา 8 ชม. จะได้ส่วนใส (clear zone) ดังรูปที่ 24 (b) วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของแถบใส (cleared zone) นำมาหาค่าเฉลี่ยเพื่อคำณวนพื้นที่ส่วนใส สร้างเป็นกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ส่วนใสกับปริมาณของ plasmin ดังแสดงในรูปที่ 25 สำหรับ sample ที่เป็นสารสกัดผลไม้ก็หยดลงไปในเพลทเดียวกัน โดยหยดน้ำกลั่นเป็น negative control ค่า Fibrinolytic activity คิดจากพื้นที่ ของแถบใส (cleared zone) ที่เกิดขึ้น เทียบกับ plasmin จากผลการทดลองพบว่า เมื่อหยดสารสกัดผลไม้ชนิดต่างๆ ทั้ง 8 ชนิด ได้แก่ สารสกัดมังคุด, สารสกัดมะม่วงดิบ, สารสกัดมะม่วงสุก, สารสกัดส้มโอ, สารสกัดมะละกอดิบ, สารสกัดมะละกอสุก, สารสกัด กล้วยน้ำว้าสุก และสารสกัดฝรั่ง ในปริมาณ 2 mg มีเพียงสารสกัดมะละกอสุกเท่านั้นที่ปรากฏแถบใส (รูปที่ 24) สำหรับฤทธิ์การสลายไฟบรินของสารสกัดมะละกอสุก คำณวนเทียบกับ plasmin แสดงดังตารางที่ 9

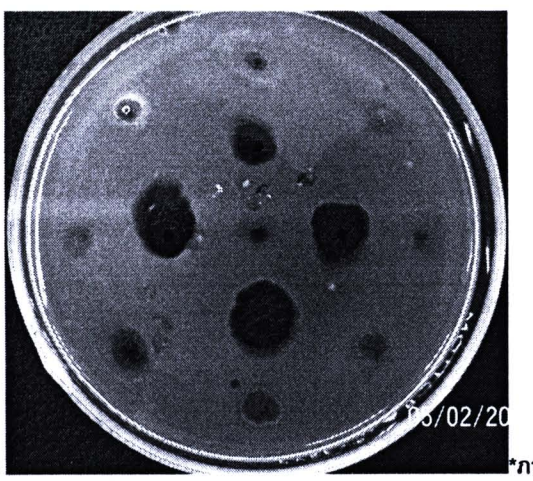
a)



b.1)



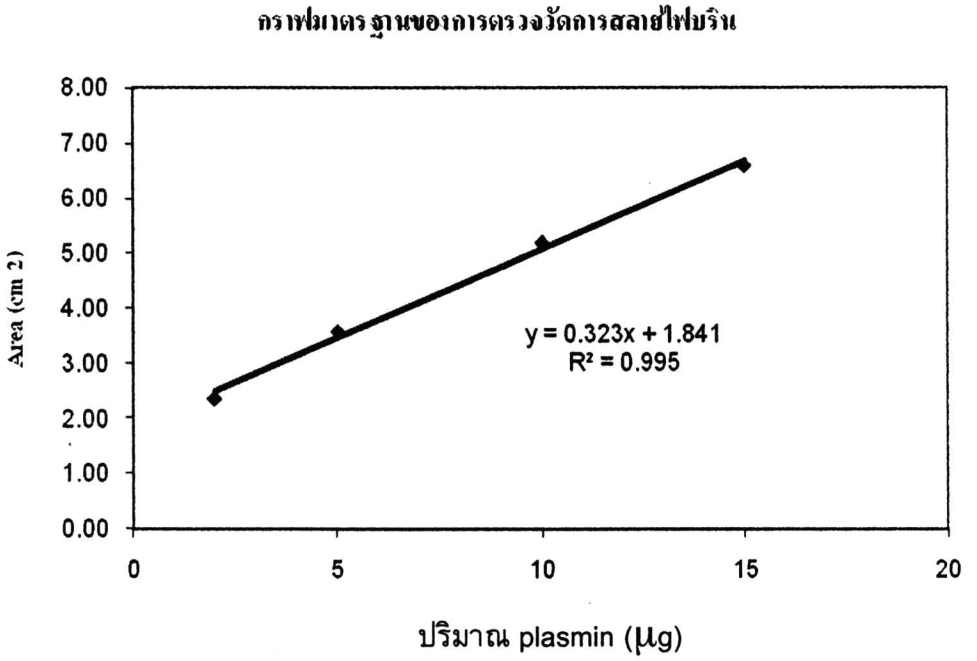
b.2)



*ภาพ b.1 กับ b.2 เป็นภาพเดียวกัน

รูปที่ 24 การก่อตัวของไฟบริน (a) และ (b) แสดงผลการสลายไฟบริน (fibrinolytic activity) แสดงดังส่วนใสที่ปรากฏ โดยสารมาตรฐาน thrombin และสารสกัดผลไม้ต่างๆ ปริมาณ 2 mg

A = plasmin 2 µg, B = plasmin 5 µg, C = plasmin 10 µg, D = plasmin 15 µg, E = น้ำกลั่น (negative control), 1 = สารสกัดมังคุด, 2 = สารสกัดมะม่วงดิบ, 3 = สารสกัดมะม่วงสุก, 4 = สารสกัดส้มโอ, 5 = สารสกัดมะละกอดิบ, 6 = สารสกัดมะละกอสุก, 7 = สารสกัดกล้วยน้ำว้าสุก, 8 = สารสกัดฝรั่ง



รูปที่ 25 แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ผลการสลายไฟบรินโดยวิธี *in vitro* modified fibrin plate ที่ใช้ plasmin เป็นสารมาตรฐาน

ตารางที่ 9 แสดงผลการสลายไฟบรินโดย plasmin และสารสกัดมะละกอสุก

สารสกัด	ปริมาณ	พื้นที่ (cm^2)	fibrinolytic activity
Plasmin	2 µg	2.36	-
	5 µg	3.58	-
	10 µg	5.18	-
	15 µg	6.61	-
สารสกัดมะละกอสุก	2 mg	1.69	< 2 µg