สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย

วิธีการทดลอง

ผลไม้ที่นำมาทดสอบ

1. มังคุด (Mangosteen) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Garcinia mangostana* L. เป็นพันธุ์พื้นเมือง ซึ่งเป็นพันธุ์เดียวที่ปลูกในเมืองไทย มาจากภาคใต้
   ส่วนที่นำมาทดสอบคือ ผล
2. มะม่วง (Mango) ชื่อวิทยาศาสตร์ Mangifera indica Linn.
   พันธุ์ที่ทดสอบคือ พันธุ์เขียวเสวย (ดิบ), พันธุ์น้ำดอกไม้ (สุก)
   ส่วนที่นำมาทดสอบคือ ผล
3. ส้มโอ (Pomelo) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Citrus maxima* (Burm.f.) Merr.
   พันธุ์ที่ทดสอบคือ พันธุ์ทองดี ส่วนที่นำมาทดสอบคือผล
4. มะละกอ (Papaya) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Carica papaya* L.
   พันธุ์ที่ทดสอบคือ พันธุ์แขกดำ ส่วนที่นำมาทดสอบคือ ผล
5. กล้วยน้ำว้า (Banana) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Musa sapientum* L.
   ส่วนที่นำมาทดสอบคือ ผล
6. ฝรั่ง (Guava) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Psidium guajava* L.
   ส่วนที่นำมาทดสอบคือ ผล

การเตรียมตัวอย่างสารสกัดจากผลไม้ไทย

เนื้อผลไม้ 100 กรัม กับน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำไปปั่นให้ละเอียด คนโดยใช้ magnetic stirrer ที่ 4°C ข้ามคืน กรองเอากากผลไม้โดยใช้ผ้าขาวบาง 2 ครั้ง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman® NO. 1 นำไปเข้าเครื่องระเหยแห้ง (Lyophilizer) เก็บสารสกัดที่ -20°C ในภาชนะทึบแสง

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 13 ธ.ค. 2555
เลขทะเบียน 246720
เลขเรียกหนังสือ

การเตรียมสารสกัดผลไม้ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

หลังจากได้สารสกัดผลไม้ในรูปผงแห้ง เตรียม stock สารสกัดโดยนำสารสกัดมาชั่งในอัตราส่วน 5 mg ในน้ำกลั่น 1 ml (ความเข้มข้นสุดท้าย 5 mg/ml) เจือจางในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 5, 50, 100, 200, 400 μg/ml การทดลองแต่ละครั้ง ทำ triplicates ไม่น้อยกว่า 2-independent experiments

การตรวจวิเคราะห์ว่าผลไม้ไทยชนิดใดมีฤทธิ์ในการยับยั้ง Lipoprotein oxidation(31)

<u>ผลไม้ที่นำมาทดสอบ</u> ได้แก่ 1) มังคุด 2) มะม่วงเขียวเสวย (ดิบ) 3) มะม่วงน้ำดอกไม้ (สุก) 4) ส้มโอ 5) มะละกอ (ดิบ) 6) มะละกอ (สุก) 7) กล้วยน้ำว้า 8) ฝรั่ง

<u>ตัวอย่างพลาสมา</u> เก็บในรูป pooled plasma จากพลาสมาที่เหลือใช้จากการตรวจทางห้องปฏิบัติการของผู้ที่มีสุขภาพดี และต้องผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะเทคนิคการแพทย์ มช.

<u>วิธีการ</u> ตกตะกอน apo B-containing lipoprotein (LDL & VLDL) จากพลาสมา 500 μl ด้วยสารละลาย 0.2 mM dextran sulphate, 0.5 M $MgCl_2.6H_2O$ ตามวิธีของ Bachorik และ Albers ((Bachorik and Albers 1986) หลังจากปั่นที่ 3000 x g, 20°C, 10 นาที ดูด supernatant ทิ้งไป แล้วเติม 6% BSA 1 ml และ 0.2 mM dextran sulphate, 0.5 M $MgCl_2.6H_2O$ 50 μl เขย่าโดยการ vortex สั้นๆ และปั่นซ้ำ เพื่อกำจัด HDL และโปรตีนในซีรัมที่อาจตกค้างอยู่ ดูด supernatant ทิ้งไป ส่วนตะกอน (LDL&VLDL) ให้ละลายใน 4% NaCl 2.5 μl นำส่วนตะกอนที่มี non-HDL cholesterol อยู่ ~ 100 μg มาผสมกับ 4% NaCl ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 500 μl (เจือจาง ~1:5) เติมสารสกัดผลไม้ อุ่นที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที ทำควบคู่กับหลอดควบคุมที่ไม่ได้เติมสารสกัดผลไม้ จากนั้นออกซิไดซ์ด้วย $CuSO_4$ และ H_2O_2 ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 250 μM และ 0.198 mM ตามลำดับ อุ่นที่ 37°C, 3 ชั่วโมง โดยเขย่าตลอดเวลา วัด TBARS โดยการเติมสารละลาย TBARS ต้มที่ 100 °C 15 นาที

แช่หลอดให้เย็นลงใน ice bath แล้วเติม butanol 2.5 ml vortex และปั่นที่ 3000 rpm 15 นาที ดูดเอาส่วนใส สีชมพูไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 532 nm ตามวิธี Modified's Smith method

การตรวจสอบหาปริมาณ MDA โดยวิธี Modified's Smith method (33)

หลักการ

MDA จะทำปฏิกิริยากับ Thiobarbituric acid (TBA) ในสภาวะที่เป็นกรดและมีความร้อน เกิด MDA-TBA_2 complex เกิดขึ้นซึ่งมีสีชมพูอมส้ม วัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ 532 nm.

วิธีการทดลอง

1. เตรียมหลอดทดลองขนาด 16 x 100 mm. เติมสารต่าง ๆ ดังตารางต่อไปนี้

สารเคมี	ปริมาตร
Sample (µl)	100
NSS (µl)	450
TBA reagent (µl)	200
TCA reagent (µl)	100

2. ผสมให้เข้ากัน แล้วต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที
3. ครบเวลาแล้วยกออก เติม Butanol 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
4. ปั่นด้วยความเร็ว 3,000 rpm. เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
5. นำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 nm. โดยใช้ Butanol ปรับ 0

การทำ Standard Tetraethoxypropane (TEP)

นำ Working TEP 100 µmol/L มาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง เพื่อให้มีความเข้มข้นดังต่อไปนี้

ความเข้มข้น µM	TEP 100 µM (µl.)	น้ำกลั่น(µl.)
10	10	90
20	20	80
30	30	70
40	40	60
50	50	50
60	60	40
70	70	30
80	80	20

วิธีการทดลอง

1. Standard, Unknown 25 µl ลงใน microplate
2. เติม BCA reagent 200 µl mix plate โดยใช้ plate shaker นาน 30 วินาที
3. ปิดฝา plate และ อุ่นที่ 37°C 30 นาที
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 nm โดยใช้ plate reader

การทำกราฟมาตรฐานของ BSA

นำ Stock BSA ความเข้มข้น 2,000 µg/ml มาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ตามอัตราส่วนดังต่อไปนี้

Vial	น้ำกลั่น (µl)	Stock BSA(µl)	ความเข้มข้น (µg/ml)
A	0	60	2,000
B	25	75	1,500
C	65	65	1,000
D	35	35 µl of Vial B dilution	750
E	65	65 µl of Vial C dilution	500
F	65	65 µl of Vial E dilution	250
G	65	65 µl of Vial F dilution	125
H	80	20 µl of Vial G dilution	25
I	80	0	0 = Blank

นำ Standard ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ไปวิเคราะห์หาค่าโปรตีน ดังวิธีที่กล่าวมาข้างต้น จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน

การตรวจวิเคราะห์ว่าผลไม้ไทยชนิดใด ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง plasma peroxidation ในคนที่มีสุขภาพดีและในผู้ป่วยโรคเบาหวาน (6,26)

<u>ผลไม้ที่นำมาทดสอบ</u> เลือกผลไม้ที่มีรสหวานน้อย ได้แก่ 1) มะม่วงเขียวเสวย (ดิบ) 2) ส้มโอ 3) มะละกอ (ดิบ) 4) ฝรั่ง

<u>ตัวอย่างพลาสมา</u> เก็บในรูป pooled plasma จากพลาสมาที่เหลือใช้จากการตรวจทางห้องปฏิบัติการของผู้ป่วยโรคเบาหวาน (n=5) และผู้ที่มีสุขภาพดี (n=5) โดยต้องผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทย์ศาสตร์และคณะเทคนิคการแพทย์ มช.

<u>วิธีการ</u> นำ pooled plasma 1 ส่วน ผสมกับ PBS (pH 7.4) 4 ส่วน จากนั้นนำพลาสมาที่เจือจางแล้วมา 2 ml เติมสารสกัดจากผลไม้ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 5, 50, 100, 200 และ 500 µg/ml ในปริมาตร 250 µl ลงในแต่ละหลอด โดยหลอดควบคุมคือ หลอดที่ไม่ใส่สารสกัดผลไม้ แต่เติมน้ำกลั่นลงไปแทน จากนั้นเติม $CuSO_4$ ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 250 µM โดยปริมาตรรวมเท่ากับ 500 µl อบที่ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ในที่มืด เขย่าตลอดเวลา ตรวจวัด plasma peroxidation โดยวิธีมาตรฐาน TBARS (Phelps and Harris 1993) ในสภาวะที่มีและไม่มีสารสกัดผลไม้เปรียบเทียบกัน คำณวนปริมาณ MDA จากค่า extinction coefficient 1.56 x 10^5 $M^{-1}Cm^{-1}$

การตรวจหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในผลไม้ไทยที่สามารถป้องกันการเกิดออกซิเดชันของโปรตีน

<u>ผลไม้ที่นำมาทดสอบ</u> ได้แก่ 1) มังคุด 2) มะม่วงเขียวเสวย (ดิบ) 3) มะม่วงน้ำดอกไม้ (สุก) 4) ส้มโอ 5) มะละกอ (ดิบ) 6) มะละกอ (สุก) 7) กล้วยน้ำว้า 8) ฝรั่ง

วิธีการ ละลายโปรตีนอัลบูมิน (BSA) ใน 150 mM phosphate buffer (pH 7.3) ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 1 mg/ml ชักนำให้เกิดการทำลายโปรตีนโดยอนุมูลอิสระที่เกิดจาก ปฏิกิริยาของ 0.05 mM Cu^{2+} และ 0.625 mM H_2O_2 ภายใต้สภาวะที่มีและไม่มีสารสกัดจากผลไม้ ที่ 37°C

เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไป run ใน 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis ย้อมด้วย 0.15% Coommassie brilliant blue 30 นาที และ destain ให้พื้นหลังใส การประเมินผลการยับยั้งโปรตีนออกซิเดชัน ทำโดยการวัดความเข้มของแถบโปรตีนโดยโปรแกรม Scion Image Beta 4.02 for Windows ™ ดาวน์โหลดจากเว็บไซต์ http://www.scioncorp.com ในการทดลองนี้ใช้ glutathione เป็นสารมาตรฐาน

การตรวจวิเคราะห์ว่าผลไม้ไทยชนิดใด มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดโปรตีนคาร์โบนิล

ผลไม้ที่นำมาทดสอบ เลือกผลไม้ที่มีรสหวานน้อย ได้แก่ 1) มะม่วงเขียวเสวย (ดิบ) 2) ส้มโอ 3) มะละกอ (ดิบ) 4) ฝรั่ง

วิธีการ ผสมสารละลาย 2% BSA ใน PBS เติมสารละลายกลูโคสให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5, 50, 100, 500 mM ในปริมาตร 3 ml ในสภาวะที่มีและไม่มีสารสกัดผลไม้ โดยเติม penicillin G-streptomycin 10 µl/ml เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย นำไปอุ่นที่ 37 °C เป็นเวลา 4-8 สัปดาห์ วัดความขุ่นของสารละลาย โดยดูจากค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นที่ความยาวคลื่น 370 nm รวมทั้งสังเกตความขุ่นโดยการวางทาบบนตัวอักษร เปรียบเทียบกับหลอดที่มีแต่สารละลายกลูโคสเพียงอย่างเดียว และหลอดที่มีวิตามินซี

หมายเหตุ เนื่องจากการทดสอบความขุ่นโดยการวางทาบบนตัวอักษร สังเกตไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงใดๆ ถึงแม้จะทำซ้ำแล้ว จึงได้ทำการทดสอบเพิ่มเติมโดยการทำ protein carbonyl content (Levine, *et al* 2000) ดังนี้

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณ Protein carbonyl content

นำตัวอย่างทดสอบปริมาตร 1 ml มาเติม 10 mM DNPH ใน 2 M HCl ปริมาตร 1 ml ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer จากนั้น incubate ไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาทีพอดี เติม 10% cold TCA ลงไป ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer จากนั้นนำไปปั่นที่ 3500

rpm นาน 20 นาที เมื่อครบเวลา เทน้ำส่วนบนทิ้งให้เหลือตะกอนของโปรตีนไว้ (ระวังในการเทน้ำส่วนบนออก อย่าให้ตะกอนโปรตีนฟุ้งกระจาย เพราะจะมีผลต่อปริมาณที่ทดสอบ) จากนั้นล้างตะกอนโปรตีนด้วย ethanol:ethyl acetate (1:1 v/v) 2 ml จำนวน 3 ครั้ง แล้วจึงเติม 6 M guanidine hydrochloride (pH 2.3) ลงไป 1 ml ผสมให้เข้ากันด้วย เครื่อง vortex mixer จากนั้น incubate 37° C นานเป็นเวลา 10 นาที ขั้นตอนสุดท้าย ปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 3500 rpm เป็นเวลา 2 นาที ดูดเอาน้ำใสส่วนบนไปวัดค่าการ ดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นที่ 370 nm บันทึกค่า absorbance เพื่อนำไปคำนวณหาค่า protein carbonyl content โดยใช้ค่า molar extinction coefficient ของ DNPH รายงานค่าออกมาในหน่วย nmol/mg protein โดยใช้สูตรการคำนวณ ดังนี้

$$\text{Protein carbonyl content (nmol/mg protein)} = \frac{OD_{370} \times 10^6 \times \text{sample volume (ml)}}{\varepsilon \times \text{total volume (ml)} \times \text{mg protein}}$$

หมายเหตุ ค่า $\varepsilon = 22{,}000\ M^{-1}cm^{-1}$

การตรวจวิเคราะห์ว่า ผลไม้ไทยชนิดใดที่มีฤทธิ์ Fibrinolytic activities ด้วยวิธี *in vitro* modified fibrin plate assay ของ Astrup และ Mullertz (3)

<u>ผลไม้ที่นำมาทดสอบ</u> ได้แก่ 1) มังคุด 2) มะม่วงเขียวเสวย (ดิบ) 3) มะม่วงน้ำดอกไม้ (สุก) 4) ส้มโอ 5) มะละกอ (ดิบ) 6) มะละกอ (สุก) 7) กล้วยน้ำว้า 8) ฝรั่ง

<u>วิธีการ</u> ใช้ plasmin เป็นสารมาตรฐาน ทำโดยปิเปตสารละลาย fibrinogen (0.6% human fibrinogen in 20 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0) 10 ml ลงในจานอาหารผสมเข้ากันกับสารละลาย thrombin (100 NIH U/ml ใน 20 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, 0.1 M NaCl) 0.1 มล. ทิ้งไว้ให้เกิดการสร้าง fibrin layer เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นหยด sample ที่เป็นสารสกัดผลไม้ความเข้มข้น 40 mg/ml ลงไป 50 µl อุ่นที่ 37 °C 8 ชม. วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของแถบใส (cleared zone) Fibrinolytic activity แสดงในรูปของพื้นที่ ของแถบใส (cleared zone) ที่เกิดขึ้น