เอกสารอ้างอิง

1. Ames B.N., Shigenaga M.K. and Hagen T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proc Natl Acad Sci U S A 90(17):7915-7922, 1993.
2. Arshad M.A., Bhadra S., Cohen R.M. and Subbiah M.T. Plasma lipoprotein peroxidation potential: a test to evaluate individual susceptibility to peroxidation. Clin Chem 37(10 Pt 1):1756-1758, 1991.
3. Astrup T. and Mullertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. Arch Biochem Biophys 40(2):346-351, 1952.
4. Bachorik P.S. and Albers J.J. Precipitation methods for quantification of lipoproteins. Methods Enzymol 129:78-100, 1986.
5. Beal M.F. Oxidatively modified proteins in aging and disease. Free Radic Biol Med 32(9):797-803, 2002.
6. Buege J.A. and Aust S.D. Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol 52:302-310, 1978.
7. Coudray C. and Favier A. Determination of salicylate hydroxylation products as an in vivo oxidative stress marker. Free Radic Biol Med 29(11):1064-1070, 2000.
8. Coudray C., Talla M., Martin S., Fatome M. and Favier A. High-performance liquid chromatography-electrochemical determination of salicylate hydroxylation products as an in vivo marker of oxidative stress. Anal Biochem 227(1):101-111, 1995.
9. Coussons P.J., Jacoby J., McKay A., Kelly S.M., Price N.C. and Hunt J.V. Glucose modification of human serum albumin: a structural study. Free Radic Biol Med 22(7):1217-1227, 1997.
10. Davies K.J. Protein oxidation and proteolytic degradation. General aspects and relationship to cataract formation. Adv Exp Med Biol 264:503-511, 1990.
11. Deneo-Pellegrini H., De Stefani E. and Ronco A. Vegetables, fruits, and risk of colorectal cancer: a case-control study from Uruguay. Nutr Cancer 25(3):297-304, 1996.
12. Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H. and Jurgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. Free Radic Biol Med 13(4):341-390, 1992.
13. Ferreira A.L. and Matsubara L.S. [Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress]. Rev Assoc Med Bras 43(1):61-68, 1997.
14. Forman H.J., Torres M. and Fukuto J. Redox signaling. Mol Cell Biochem 234-235(1-2):49-62, 2002.

15. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. Annu Rev Nutr 16:33-50, 1996.
16. Halliwell B., Rafter J. and Jenner A. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? Am J Clin Nutr 81(1 Suppl):268S-276S, 2005.
17. Hunt J.V., Dean R.T. and Wolff S.P. Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. Biochem J 256(1):205-212, 1988.
18. Jain A.K., Lim G., Langford M. and Jain S.K. Effect of high-glucose levels on protein oxidation in cultured lens cells, and in crystalline and albumin solution and its inhibition by vitamin B6 and N-acetylcysteine: its possible relevance to cataract formation in diabetes. Free Radic Biol Med 33(12):1615-1621, 2002.
19. Johnson I.T. and Fenwick G.R. Dietary anticarcinogens and antimutagens: chemical and biological aspects. The royal society of chemistry.
20. Leong L.P. and Shui G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. Food chemistry 76:69-75, 2002.
21. Lloyd R.V., Hanna P.M. and Mason R.P. The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction. Free Radic Biol Med 22(5):885-888, 1997.
22. Long L.H., Kwee D.C. and Halliwell B. The antioxidant activities of seasonings used in Asian cooking. Powerful antioxidant activity of dark soy sauce revealed using the ABTS assay. Free Radic Res 32(2):181-186, 2000.
23. Lyons T.J. Oxidized low density lipoproteins: a role in the pathogenesis of atherosclerosis in diabetes? Diabet Med 8(5):411-419, 1991.
24. Maffei F., Tarozzi A., Carbone F., Marchesi A., Hrelia S., Angeloni C., Forti G.C. and Hrelia P. Relevance of apple consumption for protection against oxidative damage induced by hydrogen peroxide in human lymphocytes. Br J Nutr 97(5):921-927, 2007.
25. Miller H.E., Rigelhof F., Marquart L., Prakash A. and Kanter M. Antioxidant content of whole grain breakfast cereals, fruits and vegetables. J Am Coll Nutr 19(3 Suppl):312S-319S, 2000.
26. Neiva T.J., Benedetti A.L., Tanaka S.M., Santos J.I. and D'Amico E.A. Determination of serum aluminum, platelet aggregation and lipid peroxidation in hemodialyzed patients. Braz J Med Biol Res 35(3):345-350, 2002.
27. Oh W.K., Lee C.H., Lee M.S., Bae E.Y., Sohn C.B., Oh H., Kim B.Y. and Ahn J.S. Antidiabetic effects of extracts from Psidium guajava. J Ethnopharmacol 96(3):411-415, 2005.

28. P. Surinut S.K., R. Surakarnkul. RADICAL SCAVENGING ACTIVITY IN FRUIT EXTRACTS. In: E. Brovelli S.C., D. Farias, T. Hongratanaworakit, M. Botero Omary, S. Vejabhikul, L.E. Craker, Z.E. Gardner (Ed), III WOCMAP Congress on Medicinal and Aromatic Plants - Volume 5: Quality, Efficacy, Safety, Processing and Trade in Medicinal and Aromatic Plants, 2005.
29. Paolini M., Pozzetti L., Pedulli G.F., Marchesi E. and Cantelli-Forti G. The nature of prooxidant activity of vitamin C. Life Sci 64(23):PL 273-278, 1999.
30. Pearson D.A., Tan C.H., German J.B., Davis P.A. and Gershwin M.E. Apple juice inhibits human low density lipoprotein oxidation. Life Sci 64(21):1913-1920, 1999.
31. Phelps S. and Harris W.S. Garlic supplementation and lipoprotein oxidation susceptibility. Lipids 28(5):475-477, 1993.
32. Salleh M.N., Runnie I., Roach P.D., Mohamed S. and Abeywardena M.Y. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation and up-regulation of low-density lipoprotein receptor in HepG2 cells by tropical plant extracts. J Agric Food Chem 50(13):3693-3697, 2002.
33. Santos M.T., Valles J., Aznar J. and Vilches J. Determination of plasma malondialdehyde-like material and its clinical application in stroke patients. J Clin Pathol 33(10):973-976, 1980.
34. Scoccia A.E., Molinuevo M.S., McCarthy A.D. and Cortizo A.M. A simple method to assess the oxidative susceptibility of low density lipoproteins. BMC Clin Pathol 1(1):1, 2001.
35. Stadtman E.R. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. Annu Rev Biochem 62:797-821, 1993.
36. Stadtman E.R. Protein oxidation in aging and age-related diseases. Ann N Y Acad Sci 928:22-38, 2001.
37. Stadtman E.R. and Berlett B.S. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. Chem Res Toxicol 10(5):485-494, 1997.
38. Steinberg D., Parthasarathy S., Carew T.E., Khoo J.C. and Witztum J.L. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. N Engl J Med 320(14):915-924, 1989.
39. Stohs S.J. and Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. Free Radic Biol Med 18(2):321-336, 1995.
40. Zhang C.X., Ho S.C., Chen Y.M., Fu J.H., Cheng S.Z. and Lin F.Y. Greater vegetable and fruit intake is associated with a lower risk of breast cancer among Chinese women. Int J Cancer 125(1):181-188, 2009.

41. http://www.y2khealthanddetox.com/gshcomplex2.html#food

<u>เอกสารแนบหมายเลข 3</u>

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

เสนอผลงานแบบโปสเตอร์ ในงานวันวิชาการ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ครั้งที่ 5

“ วิถีวิจัย: ทรรศวรรษที่ 5 สู่ความเป็นเลิศ“ ระหว่างวันที่ 26 – 27 พฤศจิกายน พ.ศ. 2552

ณ หอประชุมมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (เอกสารดังแนบ)

ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้และกิจกรรมที่ดำเนินมา และผลที่ได้รับตลอดโครงการ

วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่วางแผนไว้	กิจกรรมที่ดำเนินมา	ผลที่ได้รับ
1. เพื่อตรวจวัดฤทธิ์ทางชีวภาพด้านต่างๆ ของผลไม้ไทยตามข้อ 1.3.1-1.3.5	1.1 การเตรียมสารสกัดจากผลไม้ไทย 1.2 การเก็บตัวอย่างเลือดจากคนที่มีสุขภาพดี และ ผู้ป่วยโรคเบาหวาน 1.3 ประเมินศักยภาพของผลไม้ไทยในการนำไปใช้ในโรคต่างๆ ได้แก่ โรคหลอดเลือดหัวใจ, โรคเบาหวาน, โรคความจำเสื่อม 1.4 รวบรวมผลและวิเคราะห์ทาง สถิติ พร้อมจัดทำรายงานวิจัยและเผยแพร่	1.1.1 เตรียมสารสกัดหยาบ (crude extract) จากผลไม้ไทย 1.2.1 ขอรับรองจริยธรรมการวิจัย 1.2.2. เก็บตัวอย่างเลือดจากคนที่มีสุขภาพดีและผู้ป่วยโรคเบาหวาน 1.3.1 เพื่อตรวจวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้ง Lipoprotein oxidation ในผลไม้ไทย 1.3.2 เพื่อตรวจวัดฤทธิ์ Fibrinolytic activities ในผลไม้ไทย 1.3.3 เพื่อตรวจวัดฤทธิ์ป้องกันการเกิด plasma peroxidation ในผลไม้ไทย 1.3.4 เพื่อตรวจวัดฤทธิ์การยับยั้งออกซิเดชันของโปรตีนจากการชักนำด้วยกลูโคสความเข้มข้นสูงในผลไม้ไทย 1.3.5 เพื่อตรวจหาฤทธิ์ป้องกันการเกิดออกซิเดชันของโปรตีนด้วย Cu^{2+}/H_2O_2 โดยวิธี SDS-PAGE ในผลไม้ไทย 1.4 รวบรวมผลและ วิเคราะห์ทางสถิติ พร้อมจัดทำรายงานวิจัยและเผยแพร่	-ได้สารสกัดหยาบจากผลไม้ไทยในรูปผงแห้ง - ได้ใบรับรองจริยธรรมการวิจัย -ได้ข้อมูลฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆของสารสกัดจากผลไม้ที่สมบูรณ์ เพื่อนำไปวิเคราะห์และเผยแพร่ - เผยแพร่งานวิจัยทางโปสเตอร์

ภาคผนวก

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้เป็น Analytical Reagent grade (AR grade) ส่วนใหญ่มาจากบริษัท Sigma- Aldrich chemicals® ที่เหลือมาจากบริษัทอื่นตามที่ระบุไว้ในขั้นตอนการเตรียมสารละลาย

การเตรียมสารละลาย

1. TCA (Trichloroacetic acid) reagent 100 % (W/V)
   ชั่ง TCA 100 g ละลายใน 0.6 M HCl 100 ml
   (เตรียม 0.6 M HCl โดยดูดกรด HCl เข้มข้น มา 25 ml เติมน้ำกลั่นในครบ 100 ml)

2. TBA (Thiobarbituric acid) reagent
   ชั่ง TBA 17.298 g ละลายใน 0.26 M 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (Tris) 1,000 ml (เตรียม 0.26 M โดยชั่ง Tris มา 31.496 g เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 ml)

3. 0.85% NaCl
   ชั่ง NaCl 0.85 g ละลายด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 ml

4. Stock TEP; Tetraethoxy propane 10 mmol/L
   TEP (Sigma-Aldrich®) 20.8 µl เติม HCl เข้มข้น 5-8 หยด เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น10 ml

5. Working TEP 100 µmol/L
   เจือจาง Stock TEP ด้วยน้ำกลั่น โดยใช้ Stock TEP 1 ส่วน : น้ำกลั่น 99 ส่วน

6. Butanol (Merck®)

7. 0.2 mM dextran sulphate, 0.5M $MgCl_2.6H_2O$
   ชั่ง dextran sulphate 5 g และ $MgCl_2.6H_2O$ 5.075 g ละลายด้วยน้ำกลั่นจนครบ 50 ml

8. 6% Bovine serum albumin (BSA)
   ชั่ง BSA 12 g ละลายด้วยน้ำกลั่นจนครบ 200 ml

9. 4% NaCl
   ชั่ง NaCl 8 g ละลายด้วยน้ำกลั่นจนครบ 200 ml

10. 5 mM $CuSO_4$. $5H_2O$

ชั่ง $CuSO_4$. $5H_2O$ 0.125 g ละลายด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 ml

11. 1.39 mM H_2O_2

นำ 30% H_2O_2 (1.39 M) มาเจือจางเป็น 1000 เท่า จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1.39 mM

12. stock 1M potassium phosphate buffer (pH 7.0)

ผสม 1M KH_2PO_4 39 ml (เตรียม 1M KH_2PO_4 โดยชั่ง KH_2PO_4 6.8045 g ละลายด้วยน้ำกลั่นจนครบ 50ml) กับ 1M K_2HPO_4 61 ml (เตรียม 1M K_2HPO_4 โดยชั่ง K_2HPO_4 17.42 g ละลายด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 ml)

13. 20 mM potassium phosphate buffer

ดูด stock 1M potassium phosphate buffer (pH 7.0) มา 40 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 2,000 ml

14. 0.6% human fibrinogen ใน 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)

ชั่ง human fibrinogen (Fluka analytical®) 0.06 g ละลายด้วย 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) 10 ml

15. 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) 0.1 M NaCl

ผสม 1M potassium phosphate buffer 1ml, 1M NaCl 5 ml

(เตรียม 1M NaCl โดยชั่ง NaCl 29.25 g ละลายด้วยน้ำกลั่นจนครบ 500 ml) และน้ำกลั่น 44 ml

16. Thrombin 100 NIH U/ml ใน 20 mM potassium buffer (pH 7.0), 0.1 M NaCl

ละลาย thrombin จาก human plasma (Sigma-Aldrich®) 195 U/ml ด้วย 20 mM potassium buffer , pH 7.0. 0.1 M NaCl 1.95 ml

17. plasmin

ละลาย Plasmin จาก human plasma (Sigma-Aldrich®) 1 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ml

18. Stacking gel buffer (0.5 M Tri HCl/SDS (pH 6.8), ปริมาตร 500 ml)

Tris	30.275	g
SDS	2.000	g
น้ำกลั่น	400	ml

ปรับ pH ให้ได้ 6.8 ด้วย 6N HCl หรือ saturated NaOH แล้วปรับปริมาตร ให้ครบ 500 ml ด้วยน้ำกลั่น

19. Running gel buffer (1.5 M Tris HCl/SDS (pH 8.8), ปริมาตร 500 ml)

Tris	90.825	g
SDS	2.000	g
น้ำกลั่น	400	ml

ปรับ pH ให้ได้ 8.8 ด้วย 6N HCl หรือ saturated NaOH แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 500 ml ด้วยน้ำกลั่น

20. Electrophoresis buffer (Tank buffer)

Tris	3.020	g
SDS	1.000	g
Glycine	14.400	g
น้ำกลั่น	1,000	ml

ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

21. 0.1% SDS (Overlaying buffer)

SDS	0.100	g
น้ำกลั่น	100	ml

ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

22. 10% Ammoniumpersulfate (APS) (Initiator)

Ammoniumpersulfate	0.010	g
น้ำกลั่น	1.0	ml

เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4° C

23. Protein staining solution

Commassies Brilliant Blue	0.125	g
Absolute Methanol	200	ml

ใช้แท่งแก้วช่วยคนเพื่อให้สีละลายเข้ากันดีกับ methanol

Glacial acetic acid	35	ml
เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร	500	ml

กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 6 เดือน

24. Destain solution I

Absolute Methanol	250	ml
Glacial acetic acid	37.50	ml
เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร	500	ml

เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

25. Destain solution II

Absolute Methanol	25	ml
Glacial acetic acid	37.50	ml
เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร	500	ml

เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

26. 1 mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA)

BSA	0.010	g
Phosphate buffer	10	ml

แบ่งเป็น aliquots เก็บไว้ที่ -20° C

27. Sorrensen's phosphate buffer (150 mM Phosphate buffer)

Solution A

$Na_2HPO_4.2H_2O$	11.876	g
dH_2O	1,000	ml

Solution B

KH_2PO_4	9.080	g
dH_2O	1,000	ml

1 M Sorrensen's phosphate buffer (pH 7.3) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

Solution A	7.770	ml
Solution B	2.230	ml

150 mM Sorrensen's phosphate buffer ปริมาตร 10 ml

1 M Sorrensen's phosphate buffer	1.50	ml
น้ำกลั่น	10	ml

เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

28. Glutathione (GSH)

เตรียม stock 16 mM Glutathione ปริมาตร 10 ml ได้โดยผสม

Glutathione	0.098	g
0.15 M PBS	10	ml

เก็บไว้ที่ 4° C

29. 5 M D-Glucose

D-Glucose	45	g
dH_2O	100	ml

เก็บไว้ที่ 4° C

32. 2 mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA)

BSA	0.02	g
PBS	10	ml

เก็บไว้ที่ 4° C

33. 2 M HCl

16 N HCl	50	ml
dH_2O	250	ml

เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

34. 10 mM 2,4 Dinitrophenylhydrazine (DNPH)

DNPH	0.594	กรัม
2 M HCL	300	มิลลิลิตร

เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

35. 10% Trichloroacetic acid (TCA)

TCA	50.000	g
dH_2O	500	ml

เก็บไว้ที่ 4° C

36. Ethanol : Ethyl acetate อัตราส่วน 1:1 (v/v)

Ethanol	500	ml
Ethyl acetate	500	ml

ผสมให้เข้ากันใส่ขวดแก้วปิดฝาให้สนิท เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

37. 6 M Guanidine hydrochloride pH 2.3

Guanidine hydrochloride	45.850	g
dH_2O	80	ml

ปรับ pH ด้วยกรดเข้มข้น HCl เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

38. 300 mM Sodium azide

Sodium azide	0.975	g
dH_2O	50	ml

ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ผลไม้ไทยต้านการเกิดออกซิเดชันต่อลิโปโปรตีนและโปรตีนในหลอดทดลอง

รุ้งสิริ โชติปฏิเวชกุล*, ธีรเดช ธิเจริญกุล, ธนัยวัฒน์ ดีงาม
แขนงวิชาเคมีคลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
c_roongsiri@hotmail.com

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้ได้ทดสอบฤทธิ์การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระต้านการยับยั้งลิโปโปรตีนออกซิเดชันและโปรตีนออกซิเดชันของผลไม้ไทย ได้แก่ 1) มังคุด 2) มะม่วงเขียวเสวย (ดิบ) 3) มะม่วงน้ำดอกไม้(สุก) 4) ส้มโอ 5) มะละกอ (ดิบ) 6) มะละกอ(สุก) 7) กล้วยน้ำว้าและ 8) ฝรั่ง โดยเตรียมสารสกัดน้ำจากผลไม้ในรูปผงด้วยวิธีระเหิดแห้ง ความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้คือ 5, 50, 100, 200, 400 µg/ml โดยใช้ glutathione เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานที่ความเข้มข้นเดียวกันผลของสารสกัดผลไม้ในการยับยั้งปฏิกิริยาลิโปโปรตีนออกซิเดชันแสดงในรูปของ MDA ที่ลดลงเมื่อเทียบกับลิโปโปรตีนที่ถูกออกซิไดซ์ในสภาวะที่ไม่มีสารสกัด ผลการทดลองพบว่า glutathione ยับยั้งปฏิกิริยาลิโปโปรตีนออกซิเดชันได้ขึ้นกับความเข้มข้น สารสกัดผลไม้ทุกชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งลิโปโปรตีนออกซิเดชันโดยมีค่า IC50 เรียงตามลำดับจากน้อยไปหามากดังนี้คือฝรั่ง(59.7 µg/ml) < มะละกอดิบ (85.0 µg/ml) < กล้วยน้ำว้า(144.9 µg/ml) ~ มะละกอสุก(146.9.0 µg/ml) ~ มะม่วงน้ำดอกไม้สุก(148.5.0 µg/ml) < ส้มโอ(231.6 µg/ml) < มังคุด(236.5 µg/ml) < มะม่วงเขียวเสวยดิบ (522.7 µg/ml) แสดงว่าฝรั่งมีฤทธิ์การยับยั้งลิโปโปรตีนออกซิเดชันที่ดีที่สุด ส่วนมะม่วงเขียวเสวยดิบมีฤทธิ์การยับยั้งลิโปโปรตีนออกซิเดชันน้อยที่สุด นอกจากนั้นผลไม้ทุกชนิดยังแสดงฤทธิ์การยับยั้งโปรตีนออกซิเดชันในรูปของแถบโปรตีนที่ปรากฏบน SDS-PAGE จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าผลไม้ไทยมีศักยภาพในการนำมาใช้ป้องกันโรคต่างๆที่เกี่ยวข้องกับสารอนุมูลอิสระได้

Keywords ผลไม้ไทย, สารสกัดน้ำจากผลไม้ไทย, ลิโปโปรตีนออกซิเดชัน, โปรตีนออกซิเดชัน, MDA

ที่มา

อนุมูลอิสระ (Free radicals) เป็นสาเหตุพื้นฐานที่สำคัญในการเกิดโรคต่างๆเช่นโรคมะเร็งโรคหลอดเลือดหัวใจโรคประสาทเสื่อมและโรคไขข้ออักเสบโดยอนุมูลอิสระเหล่านี้เกิดขึ้นในร่างกาย (endogenous) และเกิดจากสิ่งแวดล้อมภายนอก (exogenous) (JittawanKubola. et al. 2008) อนุมูลอิสระทำลายโมเลกุลสารชีวโมเลกุลพวกไขมันโปรตีน DNA และคาร์โบไฮเดรต ผลไม้และผักต่างๆมีสารในกลุ่ม flavonoids ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ, กระตุ้นการทำงานของวิตามินซี, ยับยั้งการเกิด blood clot formation และยังมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Mary Ann S. et al. 2000) การรับประทานผลไม้ที่มีสารต้านอนุมูลอิสระสามารถช่วยป้องกันการเกิดมะเร็งและโรคหัวใจและหลอดเลือดหัวใจได้ (Kyung-Ah Jung. et al. 2005)

วัตถุประสงค์

เพื่อการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชันต่อลิโปโปรตีนและโปรตีนในหลอดทดลองของผลไม้ไทย ได้แก่ 1) มังคุด 2) มะม่วงเขียวเสวย (ดิบ) 3) มะม่วงน้ำดอกไม้ (สุก) 4) ส้มโอ 5) มะละกอ (ดิบ) 6) มะละกอ (สุก) 7) กล้วยน้ำว้า 8) ฝรั่ง

การเตรียมสารสกัดหยาบจากน้ำ (water extract)

(ขั้นตอนในกรอบพิมพ์จางจนอ่านไม่ได้)

การตรวจวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชันต่อลิโปโปรตีน (Lipoprotein oxidation)

แยกส่วน Lipoprotein ใน serum 500 µl
ด้วย dextran sulphate/MgCl 50 µl
↓
ละลายตะกอนใน 4% NaCl 500 µl
↓
เติมสารสกัดผลไม้ที่ความเข้มข้น 5, 50, 100, 200 และ 400 µg/ml บ่มที่ 37 C 30 นาที
↓
เติม 250 mM Cu และ 1.39 mM H_2O_2 บ่มที่ 37 C, 3 ชั่วโมง
↓
วัด MDA โดยวิธี TBARS

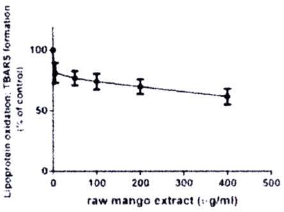
วิธีตรวจวัดปริมาณ Malondialdehyde (MDA) โดยวิธี TBARS

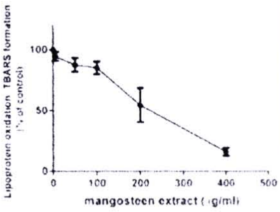
หลักการ MDA จะทำปฏิกิริยากับ Thiobarbituric acid (TBA) ในสภาวะที่เป็นกรดและมีความร้อนเกิด MDA-TBA complex เกิดขึ้นซึ่งมีสีชมพูสามารถวัดการดูดกลืนแสงที่ 532 nm

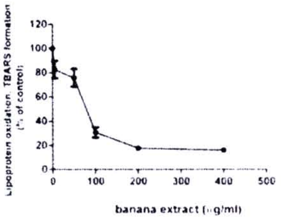
Sample 100 µl + HSS 450 µl
↓
เติม TBA reagent 200 µl และ TCA reagent 100 µl
↓
เติม butanol 2.5 ml
↓
นำส่วนใสที่มีสีชมพูมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 nm

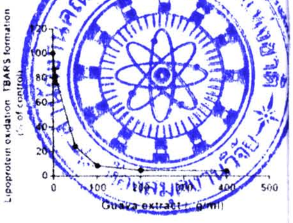
ผลการทดลอง

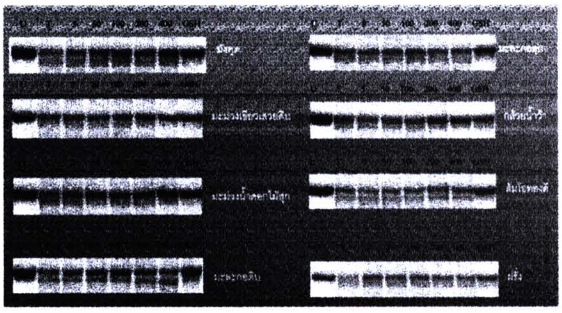
สารสกัดผลไม้ทุกชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งลิโปโปรตีนออกซิเดชัน (รูปที่ 1-4) โดยมีค่า IC_{50} เรียงตามลำดับจากน้อยไปหามากดังนี้คือฝรั่ง (59.7 µg/ml) < มะละกอดิบ (85.0 µg/ml) < กล้วยน้ำว้า (144.9 µg/ml) ~ มะละกอสุก(146.9.0 µg/ml) ~ มะม่วงน้ำดอกไม้สุก(148.5.0 µg/ml) < ส้มโอ(231.6 µg/ml) < มังคุด(236.5 µg/ml) < มะม่วงเขียวเสวยดิบ (522.7 µg/ml) แสดงว่าฝรั่งมีฤทธิ์การยับยั้งลิโปโปรตีนออกซิเดชันที่ดีที่สุด ส่วนมะม่วงเขียวเสวยดิบมีฤทธิ์การยับยั้งลิโปโปรตีนออกซิเดชันน้อยที่สุด นอกจากนั้นผลไม้ทุกชนิดยังแสดงฤทธิ์การยับยั้งโปรตีนออกซิเดชันในรูปของแถบโปรตีน BSA ที่ถูกออกซิไดซ์ที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับในสภาวะที่ไม่มีสารสกัดผลไม้ (รูปที่ 5)











รูปที่ 5 ฤทธิ์ของสารสกัดผลไม้ชนิดต่างๆที่ความเข้มข้น ... ในการต้านออกซิเดชันต่อโปรตีน BSA ที่ถูกออกซิไดซ์ด้วย Cu/H_2O_2 ... untreated (BSA) ... treated (BSA+Cu/H_2O_2) ... GSH ... Glutathione

วิจารณ์ผลการทดลอง

การเกิด LDL oxidation ซึ่งนำไปสู่การสะสมใต้ชั้นเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด มีบทบาทสำคัญต่อการเกิด atherosclerosis ในระยะแรก (earliest events)

การศึกษาเพื่อหาสารที่มีฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชันของลิโปโปรตีน จึงน่าจะมีประโยชน์ ในการลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจได้

LDL oxidation ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงทั้งโครงสร้างและหน้าที่ของ lipid และ apo-B เกิด fragmentation ตามด้วย cross-linking กับ reactive aldehydes วัดเป็น oxidation end products ในรูปของ Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (Scoccia et al. ,200

การใช้ Copper เป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดออกซิเดชัน เป็นโมเดลซึ่งเป็นที่นิยม โดยสภาวะที่ใช้คือ Cu^{2+} 250 mM และ H_2O_2 1.39 mM ที่ 3 ชั่วโมง สามารถออกซิไดซ์ลิโปโปรตีนได้ ~ 113 เท่าจากเดิม (basal level) สภาวะเช่นนี้จัดว่ารุนแรง ไม่ค่อยพบในร่างกาย แต่เหมาะที่จะนำมาทดสอบฤทธิ์การต้าน Oxidation ของสารต่างๆ ได้

มีรายงานถึงสาร Beta carotene, lycopene, vitamin E(alpha - tocopherol) ที่มีในผลไม้ไทย (R. Charoensiri et al. (2009) ผลไม้ 8 ชนิด ที่แสดงฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชันต่อลิโปโปรตีนและโปรตีน น่าจะมาจากส่วนผสม (cocktails) ของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในสารสกัดหยาบและเป็นส่วนที่ละลายน้ำได้ แต่ผลที่ได้นี้ ทำในหลอดทดลอง จึงควรจะศึกษาในผู้ป่วยโรคต่างๆ ต่อไป

สรุปผลการทดลอง

ผลไม้ไทยทั้ง 8 ชนิดได้แก่ 1) มังคุด 2) มะม่วงเขียวเสวย (ดิบ) 3) มะม่วงน้ำดอกไม้ (สุก) 4) ส้มโอ 5) มะละกอ (ดิบ) 6) มะละกอ (สุก) 7) กล้วยน้ำว้า 8) ฝรั่งมีฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชันต่อลิโปโปรตีนและโปรตีนในหลอดทดลองได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่สนับสนุนทุนวิจัย

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์รุจาภา นิมสังข์และคณาจารย์แขนงวิชาเคมีคลินิกคณะเทคนิคการแพทย์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือจนงานสำเร็จลงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

Adriana E Scoccia, Maria Silvia Molinuevo et al. A simple method to assess the oxidative susceptibility of low density lipoproteins. BMC Clinical Pathology, 2001 1:1 R. Charoensiri et al. Beta-carotene, lycopene, and alpha-tocopherol contents of selected Thai fruits. Food Chemistry, 2009 113:202-207