

คุณสมบัติของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงในการต้านอนุมูลอิสระ
และยับยั้งปฏิกิริยาการไกลเคชั่น



นางสาว ณัฐา จริยภมรกุล

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต


สาขาวิชาเภสัชวิทยาทางสัตวแพทยศาสตร์ ภาควิชาเภสัชวิทยา

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ANTIOXIDANT AND ANTIGLYCATION ACTIVITIES OF RED GRAPE SKIN EXTRACT



Miss Nattha Jariyapamornkoon

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Veterinary Pharmacology
Department of Veterinary Pharmacology
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2010
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

คุณสมบัติของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงในการต้าน
อนุมูลอิสระและยับยั้งปฏิกิริยาไกลเคชั่น

โดย

นางสาว ณัฐรา จริยภมรกร

สาขาวิชา

เภสัชวิทยาทางสัตวแพทยศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. ศิรินทร หีบไชคณันต์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม


ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิริชัย อติศักดิ์วัฒนา

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้แก่นักวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต



..... คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. (มงคล เตชะกำพูน)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร. สุพัตรา ศรีไชยรัตน์)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. ศิรินทร หีบไชคณันต์)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิริชัย อติศักดิ์วัฒนา)


..... กรรมการ
(อาจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. นัทธรา เทพวัลย์)


..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.กาญจนา อิมคิจิต)

ณัฐา จริยภมรกร : คุณสมบัติของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งปฏิกิริยาไกลเคชัน. (ANTIOXIDANT AND ANTIGLYCATION ACTIVITIES OF RED GRAPE SKIN EXTRACT) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.สพ.ญ.ดร. ศรินทร หยิบโชคนันต์, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ผศ.ดร.สิริชัย อติศักดิ์วัฒนา, 118หน้า

วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เพื่อทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งกระบวนการไกลเคชันร่วมกับการวิเคราะห์ส่วนประกอบของสารพฤกษเคมี โดยพบว่าสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงประกอบด้วยสารประกอบฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ สาร condensed tannin และสารแอนโธไซยานิน และสำหรับการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2, 2 - diphenyl - 1 - picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity, trolox equivalent antioxidant capacity assay (TEAC), hydroxyl radical scavenging activity, superoxide radical scavenging activity และ ferrous ion chelating power พบว่า มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.027 ± 0.001 , 0.811 ± 0.003 , 5.4 ± 0.04 , 0.575 ± 0.008 และ 1.05 ± 0.01 mg/ml ตามลำดับ และค่า EC ของการทดสอบวิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP) เท่ากับ 0.671 ± 0.006 mg/ml

นอกจากนี้ยังพบว่า สารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงสามารถยับยั้งการเกิด advanced glycation end products (AGEs) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) และสามารถลดปริมาณสารโปรตีนคาร์บอนิล สาร cross beta amyloid structure ฟรุกโตซามีนและ AGEs ชนิด N^E-(carboxymethyl) lysine (CML) รวมทั้งช่วยลดการสูญเสียโปรตีน thiol ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) จากผลการทดลองดังกล่าวจึงสรุปได้ว่า สารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งกระบวนการไกลเคชัน ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ต่อการป้องกันภาวะแทรกซ้อนจากเบาหวานได้

ภาควิชาเภสัชวิทยา.....
สาขาวิชาเภสัชวิทยาทางสัตวแพทยศาสตร์
ปีการศึกษา 2553.....

ลายมือชื่อ.....ณัฐา จริยภมรกร.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....Dr. Sirintra.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....Dr. Sirichai.....

5275556631 : MAJOR VETERINARY PHARMACOLOGY

KEYWORDS : ANTIGLYCATION / ANTIOXIDANT / BOVINE SERUM ALBUMIN /
GLYCATION / RED GRAPE SKIN EXTRACT

NATTHA JARIYAPAMORNKOON : ANTIOXIDANT AND ANTIGLYCATION
ACTIVITIES OF RED GRAPE SKIN EXTRACT. ADVISOR : ASSOC. PROF.
SIRINTORN YIBCHOK-ANUN, D.V.M., Ph.D., CO-ADVISOR : ASST. PROF.
SIRICHA ADISAKWATTANA, Ph.D., 118 pp.

The objective of this study was to determine antioxidant and antiglycation activities of red grape skin extract (RGSE). The phytochemical analysis revealed that RGSE contains phenolic compounds, flavonoids, condensed tannin and anthocyanin content. The antioxidant potential evaluation of RGSE was investigated by using 2, 2 - diphenyl - 1 - picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenger, trolox equivalent antioxidant capacity assay (TEAC), hydroxyl radical scavenging activity, superoxide radical scavenging activity and ferrous ion chelating power. The IC_{50} values were 0.027 ± 0.001 , 0.811 ± 0.003 , 5.4 ± 0.04 , 0.575 ± 0.008 and 1.05 ± 0.01 mg/ml, respectively. Furthermore, RGSE showed the effective ferric reducing antioxidant power (FRAP) with EC value of 0.671 ± 0.006 mg/ml.

In addition, RGSE significantly inhibited the formation of advanced glycation end products (AGEs) and decreased protein carbonyl content, cross beta amyloid content, fructosamine content and the content of N^{ϵ} -(carboxymethyl) lysine (CML) whereas increased free thiol group of fructose-modified BSA in a concentration-dependent manners. Taken together, the results from this study revealed that RGSE exerted antiglycation and antioxidant activities, which may be beneficial for prevention of diabetic complications

Department : Veterinary Pharmacology.....	Student's Signature <u>ณัฏฐา จาริยาปมอรณคูน</u>
Field of Study : Veterinary Pharmacology.....	Advisor's Signature <u>ศิริศรณ ยิบชอก-อนุน</u>
Academic Year : 2010.....	Co-advisor's Signature <u>ศิริชัย อาดิสาควัตตนา</u>

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์สัตวแพทย์หญิง ดร. ศีรินทร หยิบโชคอนันต์ อาจารย์ที่ปรึกษา และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริชัย อติศักดิ์วัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้ความเมตตา ช่วยเหลือและให้คำปรึกษาชี้แนะแนวทาง รวมทั้งให้ความรู้ต่างๆในการทำวิจัยและเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ เกศจักรหญิง ดร. สุพัตรา ศรีไชยรัตน์, อาจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. นิภัทรา เทพวัลย์, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. กาญจนา อิมศิริป์ คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และโครงร่างวิทยานิพนธ์ทุกท่านที่กรุณาใช้เวลาและให้คำแนะนำต่างๆ ซึ่งทำให้วิทยานิพนธ์นี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณบุคลากรประจำภาคิษาเภสัชวิทยาคณะสัตวแพทยศาสตร์และบุคลากรประจำหลักสูตรโภชนาการและการกำหนดอาหารคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความรู้และอำนวยความสะดวกและความช่วยเหลือทางด้านเทคนิคต่างๆ

ขอขอบคุณคณะสัตวแพทยศาสตร์และคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับการเอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัยและขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย สำหรับทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฏ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฑ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	2
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 โรคเบาหวาน.....	4
2.2 ภาวะแทรกซ้อนเรื้อรังของโรคเบาหวาน.....	6
2.3 ไกลเคชั่น.....	8
2.4 อนุมูลอิสระ.....	21
2.5 สารต้านอนุมูลอิสระ.....	22
2.6 แอนโทไซยานิน.....	27
2.7 องุ่น.....	31
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	34
3.1 วัสดุและอุปกรณ์.....	34
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย.....	36

บทที่	ช หน้า
3.2.1 การวิเคราะห์สารพฤษเคมีของสารสกัดจากองุ่น.....	36
3.2.1.1 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก.....	36
3.2.1.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์.....	37
3.2.1.3 การวิเคราะห์หาปริมาณสาร condensed tannin.....	38
3.2.1.4 การวิเคราะห์หาปริมาณสารแอนโทไซยานิน.....	38
3.2.2 การทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ.....	40
3.2.2.1 วิธี DPPH radical scavenging activity.....	40
3.2.2.2 วิธี Trolox equivalent antioxidant Capacity Assay (TEAC).....	41
3.2.2.3 วิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP).....	42
3.2.2.4 วิธีทดสอบหา hydroxyl radical scavenging activity.....	43
3.2.2.5 วิธีทดสอบหา superoxide radical scavenging activity.....	45
3.2.2.6 วิธีทดสอบหา ferrous ion chelating power.....	47
3.2.3 การทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเกิดกระบวนการบrowning ใน BSA.....	49
3.2.3.1 การวัดปริมาณการเกิด AGEs ชนิดเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์.....	49
3.2.3.2 การวัดค่าการเกิดสารกลุ่มโปรตีน carbonyl.....	50
3.2.3.3 การวัดปริมาณ cross beta amyloid structure ด้วย thioflavinreagent.....	52
3.2.3.4 การวัดปริมาณ cross beta amyloid structure ด้วย congo red reagent.....	52
3.2.3.5 การวัดค่าการเกิดสารฟรุกโตซามีน.....	53
3.2.3.6 การวัดค่าการเกิดสารกลุ่มโปรตีนThiol.....	53
3.2.3.7 การวัดค่าการเกิดN ^ε -(carboxymethyl) lysine (CML).....	54
3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	55

บทที่	หน้า
4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	56
4.1 ผลการวิเคราะห์สารพิษเคมีของสารสกัดจากองุ่น.....	56
4.1.1 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก.....	56
4.1.2 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์.....	57
4.1.3 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสาร condensed tannin.....	58
4.1.4 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารแอนโทไซยานิน.....	59
4.2 ผลการทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ.....	60
4.2.1 วิธี DPPH radical scavenging activity.....	60
4.2.2 วิธี Trolox equivalent antioxidant Capacity Assay (TEAC).....	62
4.2.3 วิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP).....	64
4.2.4 วิธีทดสอบหา hydroxyl radical scavenging activity.....	66
4.2.5 วิธีทดสอบหา superoxide radical scavenging activity.....	68
4.2.6 วิธีทดสอบหา ferrous ion chelating power.....	70
4.3 ผลการทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเกิดกระบวนการไกลเคชันใน BSA.....	73
4.3.1 การวัดปริมาณการเกิด AGEs ชนิดเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์.....	78
4.3.2 การวัดค่าการเกิดสารกลุ่มโปรตีน carbonyl.....	77
4.3.3 การวัดปริมาณ cross beta amyloid structure	
ด้วย thioflavin T reagent.....	81
4.3.4 การวัดปริมาณ cross beta amyloid structure	
ด้วย congo red reagent.....	84
4.3.5 การวัดค่าการเกิดสารฟรุกโตซามีน.....	87
4.3.6 การวัดค่าการเกิดสารกลุ่มโปรตีนthiol.....	90
4.3.7 การวัดค่าการเกิด N ^ε - (carboxymethyl) lysine (CML).....	93

บทที่	หน้า
5 อภิปรายผล สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	95
รายการอ้างอิง.....	103
ภาคผนวก.....	116
ภาคผนวก ก.....	117
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	118



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2-1	ตัวอย่างปริมาณแอนโทไซยานินในผลไม้.....	28
4-1	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง.....	55
4-2	ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง.....	56
4-3	ปริมาณสาร condensed tannin ในสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง.....	57
4-4	ปริมาณสารแอนโทไซยานินในสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง.....	58
4-5	สรุปค่าสารพิษเคมีที่ตรวจพบในสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง.....	59
4-6	สรุปผลการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง.....	72
4-7	ผลของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงในแต่ละความเข้มข้นต่อการยับยั้ง AGEs ชนิดเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์.....	74
4-8	ค่า %inhibition ของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงในแต่ละความเข้มข้นต่อการยับยั้ง AGEs ชนิดเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์.....	75
4-9	ผลของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงในแต่ละความเข้มข้นต่อการลดปริมาณโปรตีน carbonyl.....	79
4-10	ผลของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงต่อการลดปริมาณ cross beta amyloid structure โดยทำการวัดด้วย thioflavin T reagent.....	82
4-11	ผลของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงต่อการลดปริมาณ cross beta amyloid structure โดยทำการวัดด้วย congo red reagent.....	85
4-12	ผลของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงในแต่ละความเข้มข้นต่อการลดปริมาณสารฟรุกโตซามีน.....	88
4-13	ผลของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงต่อการช่วยลดการสูญเสียปริมาณโปรตีน thiol.....	91
4-14	ผลของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงต่อการลดปริมาณ CML.....	94

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2-1	ขั้นตอนการเกิดกระบวนการไกลเคชั่น.....	9
2-2	ขั้นตอนการเกิดสารประกอบคาร์บอนิล.....	10
2-3	ขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาออกไซด์ออกซิเดชันและปฏิกิริยาไกลคอกซิเดชันของ กระบวนการไกลเคชั่น.....	11
2-4	AGEs ชนิด crosslinks และมีคุณสมบัติการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์.....	12
2-5	AGEs ชนิด crosslinks แต่ไม่มีคุณสมบัติการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์.....	13
2-6	AGEs ชนิดโปรตีนเดี่ยวที่เปลี่ยนแปลงโครงสร้าง.....	14
2-7	โครงสร้างของตัวอย่างยาด้าน AGEs ชนิดต่างๆ.....	20
2-8	โครงสร้างของฟลาโวนอยด์ในการต้านอนุมูลอิสระ.....	26
2-9	โครงสร้างของแอนโทไซยานิน.....	27
2-10	โครงสร้างทางเคมีของแอนโทไซยานิน.....	28
2-11	ตำแหน่งการจับกับอนุมูลอิสระของแอนโทไซยานิน.....	30
4-1	กราฟมาตรฐานของสาร gallic acid ของการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก....	56
4-2	กราฟมาตรฐานของสาร catechin ของการหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์.....	57
4-3	กราฟมาตรฐานของสาร catechin ของการหาปริมาณสาร condense tannin...	58
4-4	ค่า IC ₅₀ และความสามารถในการยับยั้ง DPPH [•] radical ของสารสกัดจาก เปลือกองุ่นแดง.....	61
4-5	ค่า IC ₅₀ และความสามารถในการยับยั้ง DPPH [•] radical ของ ascorbic acid...	61
4-6	ค่า IC ₅₀ และความสามารถในการยับยั้ง ABTS ^{•+} ของสารสกัดจาก เปลือกองุ่นแดง.....	63
4-7	แสดงค่า IC ₅₀ และความสามารถในการยับยั้ง ABTS ^{•+} ของ trolox.....	63
4-8	ความสามารถในรีดิวซ์ Fe ³⁺ -TPTZ ของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง.....	65
4-9	ความสามารถในรีดิวซ์ Fe ³⁺ -TPTZ ของสารมาตรฐาน FeSO ₄	65
4-10	ค่า IC ₅₀ และความสามารถในการยับยั้ง OH [•] radical ของสารสกัดจาก เปลือกองุ่นแดง.....	67
4-11	ค่า IC ₅₀ และความสามารถในการยับยั้ง OH [•] radical ของ trolox.....	67

4-12	ค่า IC ₅₀ และความสามารถในการยับยั้ง O ₂ ⁻ radical ของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง.....	69
4-13	ค่า IC ₅₀ และความสามารถในการยับยั้ง O ₂ ⁻ radical ของ trolox.....	69
4-14	ค่า IC ₅₀ และความสามารถในการแย่งจับกับโลหะของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง.....	71
4-15	ค่า IC ₅₀ และความสามารถในการแย่งจับกับโลหะของ EDTA.....	71
4-16	ผลของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงในแต่ละความเข้มข้นต่อการยับยั้ง AGEs ชนิดเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์.....	76
4-17	ค่า %inhibition ของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงต่อการยับยั้ง AGEs ชนิดเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์.....	77
4-18	กราฟมาตรฐานแสดงค่าการดูดกลืนแสงของ BSA ในการหาปริมาณโปรตีน carbonyl.....	78
4-19	กราฟแสดงผลของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงต่อการลดปริมาณโปรตีน carbonyl.....	80
4-20	กราฟแสดงผลของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงต่อการลดปริมาณ cross beta amyloid structure โดยทำการวัดด้วย thioflavin T reagent.....	83
4-21	กราฟแสดงผลของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงต่อการลดปริมาณ cross beta amyloid structure โดยทำการวัดด้วย congo red reagent.....	86
4-22	กราฟมาตรฐานแสดงค่าการดูดกลืนแสงของ 1-deoxy-1-morpholino-fructose (DMF) ในการหาปริมาณฟรุกโตซามีน....	87
4-23	กราฟแสดงผลของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงต่อการลดปริมาณสารฟรุกโตซามีน.....	89
4-24	กราฟมาตรฐานแสดงค่าการดูดกลืนแสงของ L-cysteine ในการหาปริมาณโปรตีน thiol.....	90
4-25	กราฟแสดงผลของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงต่อการช่วยลดการสูญเสียปริมาณโปรตีน thiol.....	92
4-26	กราฟมาตรฐานแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสาร BSA-CML ในการหาปริมาณ CML.....	93
4-27	กราฟแสดงผลของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงต่อการลดปริมาณ CML.....	94

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AGEs	advanced glycation end products
BSA	bovine serum albumin
CML	N ^ε - (carboxyethyl) lysine
COX-2	cyclooxygenase -2
DPPH	1, 1- diphenyl - 2 - picrylhydrazyl
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FRAP	ferric reducing antioxidant power
HCl	hydrochloric acid
HDL	high density lipoprotein
LDL	low density lipoprotein
PBS	phosphate buffer solution
PGE ₂	prostaglandin E ₂
RAGE	receptor of AGEs
RGSE	red grape skin extract
ROS	reactive oxygen species
TBARS	thiobarbituric acid reactive substances
TCA	trichloroacetic acid
TPTZ	2, 4, 6 – tripyridyl - S - triazine

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันโรคเบาหวานในสัตว์เลี้ยงเริ่มมีอุบัติการณ์เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากสภาพการเลี้ยงดูที่เปลี่ยนไป รวมทั้งสัตว์เลี้ยงมีอายุที่ยืนยาวมากกว่าในอดีต สาเหตุของโรคเบาหวานเกิดจากความผิดปกติของต่อมไร้ท่อ โดยร่างกายเกิดความบกพร่องในการสร้างหรือตอบสนองต่อฮอร์โมนอินซูลิน ทำให้ไม่สามารถรักษาระดับน้ำตาลในเลือดให้อยู่ในเกณฑ์ปกติได้ ปัญหาสำคัญของโรคเบาหวานคือ การมีระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูงแบบเรื้อรัง และเป็นสาเหตุทำให้เกิดภาวะโรคแทรกซ้อนต่างๆตามมา ปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนนั้นเกิดจากกระบวนการไกลเคชัน (glycation) ซึ่งมีการสร้างผลิตภัณฑ์สุดท้าย (advanced glycation end products; AGEs) อันนำไปสู่การเสื่อมสภาพของเซลล์และเกิดพยาธิสภาพของอวัยวะต่างๆ บทบาทของ AGEs ที่เกี่ยวข้องกับภาวะแทรกซ้อนของโรคเบาหวานที่สำคัญและมีการรายงานมาก่อนหน้านี้ คือ การเกิดความผิดปกติของไต ตา ระบบประสาท ระบบหลอดเลือดและหัวใจ เป็นต้น (Brownlee, 1995; Schmidt and Stern, 2000; Takeuchi et al., 2004)

กระบวนการไกลเคชันหรือ ปฏิกิริยาเมลลาร์ด (maillard reaction) เกิดจากการจับกันระหว่างน้ำตาลรีดิวซิ่งและหมู่อะมิโนของโปรตีน ซึ่งโปรตีนทุกชนิดในร่างกายสามารถเกิดปฏิกิริยานี้ได้ โดยเป็นการทำปฏิกิริยากันแบบไม่อาศัยเอนไซม์และเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง กระบวนการไกลเคชันจะเกิดขึ้นมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับระดับของน้ำตาลเป็นหลัก นอกจากนี้อนุมูลอิสระและโลหะหนักในร่างกาย เช่น ธาตุทองแดง หรือ ธาตุเหล็ก สามารถเข้าร่วมทำปฏิกิริยาในขั้นตอนต่างๆของกระบวนการดังกล่าว และนำไปสู่การเกิด AGEs ในที่สุด ซึ่ง AGEs จะทำให้โปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพและสูญเสียหน้าที่การทำงานต่อไป นอกจากนี้ AGEs ยังสามารถเพิ่มการสร้างอนุมูลอิสระภายในเซลล์และทำให้เกิดภาวะ oxidative stress ตามมา

การป้องกัน และลดการเกิด AGEs เป็นส่วนหนึ่งที่ช่วยป้องกันการเกิดภาวะแทรกซ้อนจากโรคเบาหวาน การใช้สารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเกิด AGEs เป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ ปัจจุบันมีการค้นพบยาและสารเคมีหลายชนิดที่สามารถยับยั้งขั้นตอนต่างๆของกระบวนการไกลเคชั่น แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการนำมาใช้ในทางคลินิก เนื่องจากยาส่วนใหญ่ยังอยู่ภายในขั้นตอนการทดสอบในสัตว์ทดลองและคน นอกจากนี้ยังพบว่ายาและสารเคมีบางชนิดมีผลข้างเคียงต่อหลายระบบในร่างกาย จึงอาจไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เพื่อการป้องกันหรือรักษา (Miyata et al., 2003; Thomas et al., 2005) การแพทย์ทางเลือกมีการใช้สารต้านอนุมูลอิสระเพื่อช่วยป้องกันภาวะแทรกซ้อนจากโรคเบาหวานโดยใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ หรือสมุนไพร แต่อย่างไรก็ตามในทางสัตวแพทย์พบว่าการใช้สารต้านอนุมูลอิสระยังอยู่ในช่วงเริ่มต้นเท่านั้น และมีข้อมูลสนับสนุนค่อนข้างน้อย

เปลือกของผลองุ่นประกอบด้วยสารสำคัญชนิดหนึ่ง คือ แอนโทไซยานิน ซึ่งเป็นสารรงควัตถุที่ทำให้เกิดสีส้มต่างๆในพืช จัดเป็นสารประกอบฟีนอลิกซึ่งอยู่ในกลุ่มสารประกอบฟลาโวนอยด์ งานวิจัยหลายผลงานพบว่าแอนโทไซยานินมีคุณสมบัติช่วยเสริมการทำงานของระบบต่างๆในร่างกาย เช่น ช่วยในการทำงานของระบบหัวใจและหลอดเลือด โดยการลดระดับของ low density lipoprotein (LDL) และช่วยให้หลอดเลือดเกิดการขยายตัว หรือช่วยยับยั้งการเกิดมะเร็งโดยมีผลเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติเป็นสารลดการอักเสบ โดยมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cyclooxygenase - 2 (COX-2) ทำให้ช่วยลดระดับของ prostaglandin (PGE₂) หรือการเป็นสารต้านจุลชีพ รวมทั้งการมีคุณสมบัติเป็นสารลดระดับน้ำตาลกลูโคสในกระแสเลือดและสารต้านอนุมูลอิสระ (Dell et al., 2005; Yi et al., 2005; Panico et al., 2006; Rodriguez-Vaguero et al., 2007)

ปัจจุบันมีงานวิจัยที่กล่าวว่า แอนโทไซยานินจากพืช ผักและผลไม้ สามารถยับยั้งการเกิดกระบวนการไกลเคชั่นและต้านอนุมูลอิสระได้ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานที่แน่ชัดเกี่ยวกับคุณสมบัติดังกล่าวจากเปลือกองุ่น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายที่จะศึกษาถึงคุณสมบัติของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งกระบวนการไกลเคชั่น ข้อมูลที่ได้จะนำไปสู่การพัฒนาเป็นสารเสริมสุขภาพที่สามารถใช้ได้ ในมนุษย์และสัตว์ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาถึงความสามารถของสารสกัดจากเปลือกของงุ่นแดงในการยับยั้งกระบวนการไกลโคซิเลชันของ bovine serum albumin (BSA) ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาไกลโคซิเลชันด้วยน้ำตาลฟรุกโตส
2. เพื่อศึกษาถึงความสามารถของสารสกัดจากเปลือกของงุ่นแดงในการต้านอนุมูลอิสระโดยสามารถลดจำนวนอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากการทดสอบได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบข้อมูลของสารสกัดจากงุ่นแดงในเรื่องต่อการต้านกระบวนการไกลโคซิเลชันและการต้านอนุมูลอิสระ รวมทั้งสามารถนำข้อมูลที่ได้มาใช้ประโยชน์ทางคลินิกต่อไป



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. โรคเบาหวาน

เบาหวานเป็นโรคที่เกี่ยวกับความผิดปกติของต่อมไร้ท่อ โดยร่างกายเกิดความบกพร่องในการสร้างหรือตอบสนองต่อฮอร์โมนอินซูลิน ทำให้ไม่สามารถรักษาระดับน้ำตาลในเลือดให้อยู่ในเกณฑ์ปกติได้ ส่งผลให้ร่างกายเกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูงอย่างเรื้อรัง รวมทั้งเกิดความผิดปกติเกี่ยวกับการเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน นอกจากนี้ยังนำไปสู่การเกิดภาวะแทรกซ้อนเรื้อรังต่างๆ ตามมา เช่น การเกิดต้อกระจก โรคหลอดเลือดและหัวใจ โรคไต การเสื่อมของระบบประสาท

อุบัติการณ์ของการเกิดโรคในสัตว์เลี้ยงพบว่า สุนัขที่เป็นเบาหวาน จะอยู่ในช่วงอายุระหว่าง 4 -14 ปี โดยมักพบในช่วงอายุ 7-9 ปี และสุนัขเพศเมียมีแนวโน้มเป็นเบาหวานมากกว่าสุนัขเพศผู้ นอกจากนี้ยังมีสาเหตุจากพันธุกรรมเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย (Feldman and Nelson, 1996) ส่วนเบาหวานในแมว มักพบในแมวที่อายุมากกว่า 10 ปี และพบในแมวเพศผู้มากกว่าเพศเมีย โดยเฉพาะในแมวเพศผู้ที่ทำหมันแล้ว (Nelson et al., 1990)

การจำแนกประเภทของเบาหวาน

เบาหวานสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ตามกลไกและพยาธิวิทยาของการเกิดโรคได้แก่

1. เบาหวานประเภทที่ 1 (Type1 Diabetes Mellitus)

คือ เบาหวานที่มีการหลั่งฮอร์โมนอินซูลินในปริมาณที่น้อย หรือไม่มีการสร้าง จึงจำเป็นต้องได้รับฮอร์โมนอินซูลินทดแทนจากภายนอก ดังนั้นเบาหวานประเภทนี้เป็นเบาหวานชนิดพึ่งอินซูลิน (Insulin dependent diabetes mellitus: IDDM) ในสุนัขมักเป็นเบาหวานประเภทนี้ อาการที่พบคือ อาการกินน้ำมาก ปัสสาวะมาก น้ำหนักตัวลดลง เบื่ออาหารและอาเจียน รวมทั้งการเกิดต้อกระจกซึ่งเป็นภาวะแทรกซ้อนของโรค

เบาหวานประเภทที่ 1 เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย กล่าวคือ เบต้าเซลล์ของตับอ่อนถูกทำลายจากภาวะภูมิคุ้มกันทำลายตัวเอง โดยร่างกายมีการสร้างแอนติบอดีต่อเบต้าเซลล์ ได้แก่ islet cell antibody (ICA), anti glutamic acid decarboxylase (anti GAD), insulin antibody (IA-2) โดยกลไกการทำลายเบต้าเซลล์ เกิดจากความผิดปกติของ T-cell เริ่มจาก

แมคโครเฟจจับกับเบต้าเซลล์ แล้วไปกระตุ้น T-helper cell ให้หลั่ง cytokine เช่น interleukine-1(IL-1), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), nitric oxide (NO) และสารอนุมูลอิสระ เช่น อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ อนุมูลไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ทำให้เบต้าเซลล์เกิดความเสียหายและถ้าหากเซลล์ถูกทำลายมากกว่า 80%จะทำให้เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูงตามมา (Pietropaolo et al., 1994)

นอกจากนี้ยังมีกรณีที่ขาดอินซูลินโดยไม่พบภาวะภูมิคุ้มกันทำลายตัวเอง เช่น ในกรณีภาวะตับอ่อนอักเสบ ภาวะ amyloidosis (Feldman and Nelson, 1996)

2. เบาหวานประเภทที่สอง (Type1 Diabetes Mellitus)

คือ โรคเบาหวานที่เกิดจากภาวะดื้ออินซูลินร่วมกับการลดการหลั่งอินซูลินของเบต้าเซลล์ ภาวะดื้อต่ออินซูลินคือ ภาวะที่ความสามารถของอินซูลินในการทำให้กลูโคสเข้าเซลล์ลดลง เนื่องจากตัวรับอินซูลินของเซลล์เป้าหมายมีการตอบสนองต่ออินซูลินลดลง ในระยะแรกเมื่อเกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูง ร่างกายพยายามปรับสภาพด้วยการเพิ่มการสร้างอินซูลินจากเบต้าเซลล์ แต่หากระดับน้ำตาลยังคงสูงอย่างต่อเนื่อง ทำให้เบต้าเซลล์เกิดการล้าและค่อยๆเสื่อมสภาพในที่สุด อย่างไรก็ตาม ถ้าสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดก่อนที่เบต้าเซลล์จะถูกทำลาย ก็จะช่วยลดความรุนแรงของโรค รวมทั้งการหายจากเบาหวานได้ (Feldman and Nelson 1996)

ปัจจัยเสี่ยงของเบาหวานประเภทนี้คือ อายุ ความอ้วน และการขาดการออกกำลังกาย ในแมวมักเป็นเบาหวานประเภทนี้ อาการที่พบคือ กินน้ำมาก ปัสสาวะมาก น้ำหนักตัวลดลง เบื่ออาหารและอาเจียน รวมทั้งการเดินผิดปกติ โดยใช้ส่วนปลายของขาหลังเดิน เนื่องจากความผิดปกติของระบบประสาทส่วนปลายซึ่งเป็นภาวะแทรกซ้อนที่เกิดจากความเป็นพิษของกลูโคส (Nelson et al., 1990) นอกจากนี้พบว่าฮอร์โมน เช่น ฮอร์โมนกลูโคคอร์ติคอยด์ ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน หรือความผิดปกติของ growth hormone, thyroxine มีผลทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดสูงขึ้นและทำให้เพิ่มการเกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน (Feldman and Nelson, 1996)

2. ภาวะแทรกซ้อนเรื้อรังของเบาหวาน

ปัญหาที่สำคัญของเบาหวาน คือ การเกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูง เป็นเวลานาน ทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆ ก่อให้เกิดพยาธิสภาพขึ้นมาอย่างช้าๆ และกลายเป็นภาวะแทรกซ้อนเรื้อรังในที่สุด ซึ่งพยาธิสภาพต่างๆนั้นเป็นผลจากความเปลี่ยนแปลงของระบบหลอดเลือดร่วมกับอวัยวะนั้นๆ เช่น ตา ระบบประสาท หรือการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็งตัว เป็นต้น (Peppas and Vlassara, 2005) โดยพยาธิสภาพที่เกี่ยวกับหลอดเลือดสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่

1. Microangiopathy

เป็นความผิดปกติที่เส้นเลือดฝอย โดยเกิดจากเนื้อเยื่อชั้น basement membrane หนาตัวมากขึ้น ร่วมกับการลดลงของเซลล์ pericyte รวมทั้งความผิดปกติของเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือด ทำให้ผนังหลอดเลือดมี permeability เพิ่มขึ้นเป็นสาเหตุของการเกิดการเคลื่อนย้ายของเซลล์อักเสบตามมา อวัยวะที่มักเกิดความผิดปกติ เช่น ตา ไต เป็นต้น

2. Macroangiopathy

เป็นความผิดปกติที่หลอดเลือด ทำให้เกิดลักษณะของภาวะหลอดเลือดแดงแข็งตัว เนื่องจากความผิดปกติของเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดมีความสามารถในการเพิ่มจำนวนและเคลื่อนย้ายลดลง ร่วมกับการลดการสร้างไนตริกออกไซด์ภายในเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดการเพิ่มปริมาณและขนาดของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ รวมทั้งการเพิ่มปริมาณและขนาดของ arterial smooth muscle cells ซึ่งภาวะหลอดเลือดแดงแข็งทำให้เกิดปัญหาของระบบหัวใจและหลอดเลือดตามมาได้

ปัจจัยที่ทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อน

ภาวะระดับน้ำตาลในเลือดสูงอาจทำให้เกิดความผิดปกติจากหลายปัจจัยหรือต้นเหตุหลายๆอย่างเป็นส่วนร่วม ได้แก่

1. Polyol pathway

ใน polyol pathway หรือ sorbitol pathway น้ำตาลกลูโคสถูกเปลี่ยนเป็น ซอร์บิทอล ด้วยเอนไซม์ aldose reductase จากนั้นซอร์บิทอลจะถูกเปลี่ยนเป็นฟรุคโตสด้วยเอนไซม์ sorbitol dehydrogenase ในภาวะปกติจะมีกลไกนี้เกิดขึ้นน้อยมาก แต่หากมีภาวะน้ำตาลในเลือดสูงเกิดขึ้นภายในเซลล์ชนิดไม่พั้งอินซูลินในการพากลูโคสเข้าเซลล์ เช่น เลนส์ เบรินา glomeruli และ

เซลล์ประสาท จะมีระดับกลูโคสเพิ่มขึ้นภายในเซลล์ ทำให้มีซอร์บิทอลเพิ่มมากขึ้น แต่การเปลี่ยนจากซอร์บิทอลเป็นฟรุกโตสจะเกิดได้ช้า เนื่องจากซอร์บิทอลไม่สามารถแทรกซึมผ่านชั้นพลาสมาเมมเบรนได้ การสะสมของซอร์บิทอลภายในเซลล์ทำให้ภายในเซลล์มี osmolarity สูง ส่งผลให้น้ำเข้ามาในเซลล์เพิ่มมากขึ้น ทำให้เซลล์บวมและเกิดความเสียหายได้ ถ้าเกิดที่เลนส์จะทำให้เกิดการบวมและเกิดการที่บวม ส่งผลให้การมองเห็นลดลง นอกจากนี้การเมตาบอลิซึมของกลูโคสโดย polyol pathway ทำให้มีการเพิ่มอัตราส่วนของ NADH/NAD⁺ ซึ่งมีผลต่อกระบวนการต่างของเซลล์ การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันอิสระ การซ่อมแซมดีเอ็นเอ เป็นต้น (Sheetz and King, 2002)

2. Protein kinase C (PKC)

ภาวะน้ำตาลในเลือดสูง ทำให้เพิ่มการสร้าง diacylglycerol (DAG) ภายในเซลล์ ผ่านทางกระบวนการ glycolysis DAG กระตุ้น PKC ภายในเซลล์ ซึ่งมีหน้าที่สำคัญเกี่ยวกับการควบคุมการทำงานของระบบหลอดเลือด การแข็งตัวของเลือด การสร้าง basement membrane และ growth factors ต่างๆ นอกจากนี้ยังมีผลต่อการเพิ่ม arachidonic acid และ prostaglandin E₂ (Koya and King, 1998)

3. Oxidative stress

ภาวะ oxidative stress เกิดจากความไม่สมดุลระหว่างอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ โดยในภาวะที่ระดับน้ำตาลในเลือดสูง จะทำให้มีอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น เช่น การเกิด glucose autoxidation การเกิด redox imbalance เป็นต้น ในขณะที่ร่างกายมีสารต้านอนุมูลอิสระเช่น วิตามินอี วิตามินซี เอนไซม์ catalase หรือ reduced glutathione ลดลง ซึ่งภาวะ oxidative stress ทำให้เซลล์ต่างๆในร่างกายเกิดความเสียหายจากการทำลายของอนุมูลอิสระ รวมทั้งการเกิดความผิดปกติต่างๆ เช่น ภาวะหลอดเลือดแดงแข็งตัว การเกิดมะเร็ง (Pennathur et al., 2001)

4. Non enzymatic protein glycation

เมื่อระดับน้ำตาลในเลือดสูงขึ้น หมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนสามารถจับกับน้ำตาลกลูโคส โดยเป็นการทำปฏิกิริยากันแบบไม่อาศัยเอนไซม์ที่เรียกว่า ไกลเคชัน (glycation) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาสามารถเกิดขึ้นได้อย่างต่อเนื่อง จนสุดท้ายจะมีการสร้างผลิตภัณฑ์ คือ advanced glycation end products (AGEs) และ AGEs จะเหนี่ยวนำให้โปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพ สูญเสียหน้าที่การทำงานและนำไปสู่การเกิดความผิดปกติของระบบอวัยวะต่างๆในที่สุด

3. ไกลเคชั่น

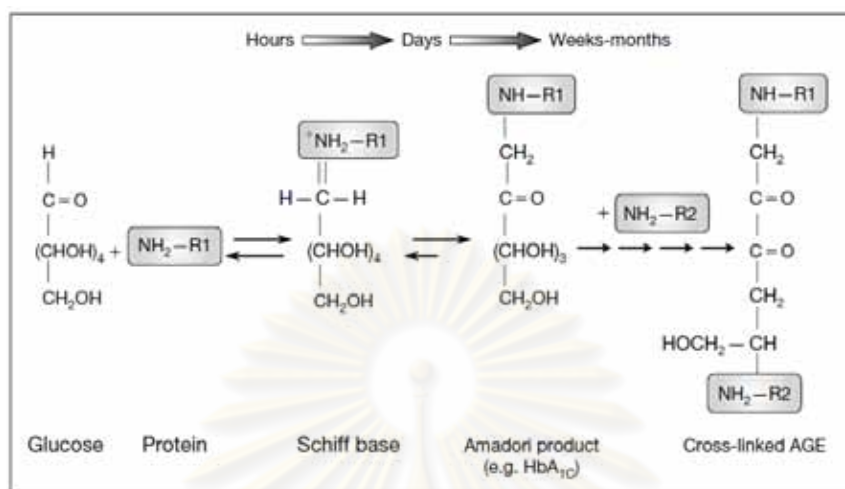
กระบวนการไกลเคชั่น หรือปฏิกิริยาเมลลาร์ด ถูกค้นพบในปี ค.ศ.1912 โดยนักวิทยาศาสตร์ชาวฝรั่งเศสชื่อ Louis Camille Maillard พบว่า การเกิดสีน้ำตาลของอาหาร หรือปฏิกิริยา browning เกิดจากน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนในสภาพที่มีอุณหภูมิสูงนำไปสู่การอธิบายถึงการเปลี่ยนแปลงสี รสชาติโครงสร้าง ตลอดจนการสูญเสียคุณภาพของโปรตีนของอาหาร (Ulrich and Cerami, 2001) ทำให้เริ่มมีการศึกษาอย่างต่อเนื่องเกี่ยวกับปฏิกิริยาเมลลาร์ดโดยเฉพาะในอุตสาหกรรมอาหาร ในแง่ของการพัฒนาคุณค่าเพื่อควบคุมโครงสร้างของอาหาร หลังจากนั้นมีการค้นพบถึงความเกี่ยวข้องระหว่างปฏิกิริยาเมลลาร์ดและการเกิดพยาธิสภาพของโรคต่างๆ โดยเฉพาะโรคเบาหวาน โรคอัลไซเมอร์ และนำไปสู่การพัฒนาคุณค่ายาที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาดังกล่าว เพื่อให้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการควบคุมโรคเหล่านั้น

กระบวนการไกลเคชั่น คือ กระบวนการของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง เริ่มจากการเกิดปฏิกิริยากันแบบไม่อาศัยเอนไซม์ระหว่างหมู่คาร์บอนของน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งกับหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีน ซึ่งสารที่เกิดขึ้นจากแต่ละปฏิกิริยาสามารถเป็นสารเริ่มต้นของปฏิกิริยาถัดไปได้เรื่อยๆ จนเกิดผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือ advanced glycation end products (AGEs) จะทำให้โปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพ สูญเสียหน้าที่การทำงานและนำไปสู่การเกิดความผิดปกติของระบบอวัยวะต่างๆในที่สุด กระบวนการดังกล่าวจะเกิดขึ้นมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับระดับของน้ำตาลระยะเวลาที่เกิดปฏิกิริยา รวมทั้งค่าครึ่งชีวิตของโปรตีนก็มีผลต่อการเกิดกระบวนการไกลเคชั่นได้เช่นกัน อนุมูลอิสระและโลหะหนักในร่างกาย เช่น ทองแดงหรือธาตุเหล็ก สามารถเข้าร่วมทำปฏิกิริยาในขั้นตอนต่างๆ และนำไปสู่การเกิด AGEs ในที่สุด นอกจากนี้ AGEs ที่เกิดขึ้นยังสามารถเพิ่มการสร้างอนุมูลอิสระภายในเซลล์และทำให้เกิดภาวะ oxidative stress ตามมาได้

3.1 ขั้นตอนการเกิดกระบวนการไกลเคชั่น

ไกลเคชั่นเป็นปฏิกิริยาแบบไม่อาศัยเอนไซม์ ระหว่างหมู่คาร์บอนของน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งกับหมู่เอมีนของหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีน ทำให้เกิดสารตัวใหม่ชื่อว่า schiff base ขึ้นมา โดยโครงสร้างของ schiff base มีลักษณะของการรวมกันระหว่างน้ำตาลและหมู่อะมิโนของโปรตีน ซึ่งสารตัวนี้สามารถเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะเวลาสั้นๆเพียงไม่กี่ชั่วโมง แต่มีความไม่เสถียรสูง โครงสร้างของหมู่อะมิโนสามารถผันกลับมาเป็นอย่างเดิมได้หากระดับน้ำตาลลดลง แต่ถ้าปฏิกิริยายังดำเนินต่อไป schiff base จะมีการจัดเรียงโครงสร้างใหม่กลายเป็นสารชื่อว่า

amadori product ซึ่งมีความคงตัวมากขึ้นแต่ยังคงไม่เสถียร สามารถผันกลับได้เช่นกัน สารตัวนี้ใช้ระยะเวลาการเกิดในหน่วยวันถึงสัปดาห์ (ภาพที่ 2-1)

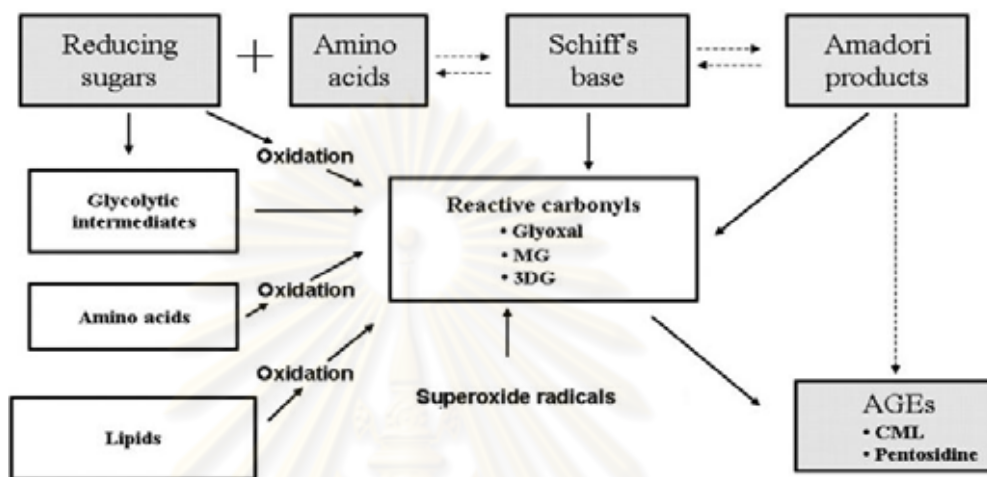


ภาพที่ 2-1 แสดงขั้นตอนการเกิดกระบวนการไกลเคชั่น (Fisman and Tenenbaum, 2008)

ตัวอย่างของ amadori product คือ ฮีโมโกลบินเอวันซี หรือ HbA_{1c} ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากกระบวนการไกลเคชั่นของฮีโมโกลบิน โดยเกิดจากการจับกันระหว่างกลูโคสและหมู่อะมิโนกลุ่ม valine ของฮีโมโกลบิน เกิดเป็นสารโครงสร้างใหม่ขึ้นมา การจับกันมากน้อยขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำตาลในเลือดเป็นหลัก ซึ่งระดับของ HbA_{1c} สามารถเพิ่มขึ้นหรือลดลงได้แต่จะเป็นการเปลี่ยนแปลงอย่างช้าๆ เมื่อพิจารณาจากอายุของเม็ดเลือดแดงที่ 120 วัน ดังนั้น HbA_{1c} จึงถูกนำมาใช้เป็นตัววัดค่าระดับน้ำตาลในเลือดแบบระยะยาว โดยค่า HbA_{1c} จะสัมพันธ์กับระดับน้ำตาลในระยะ 2 เดือนก่อนหน้าการวัด (Fisman and Tenenbaum, 2008)

Amadori product อาจเกิดปฏิกิริยาต่อไป ด้วยการเข้าไปจับกับหมู่อะมิโนอื่นๆ โดยเรียกโปรตีนที่ถูก amadori product เกาะว่า glycated protein ซึ่ง amadori product สามารถเกิดปฏิกิริยาต่อไปได้ 2 รูปแบบ แบบที่หนึ่งคือ เกิดการเชื่อมต่อกับหมู่อะมิโนอื่นๆแล้วมีการจัดเรียงตัวใหม่เป็น AGEs หรือแบบที่สองคือ เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน มีอนุมูลอิสระและโลหะหนัก เช่น ธาตุเหล็กหรือทองแดง เข้าร่วมทำปฏิกิริยา ทำให้เกิดสารที่มีการจัดเรียงโครงสร้างใหม่คือ สารประกอบคาร์บอนิล ซึ่งเป็นสาร reactive intermediates หรือ AGEs precursor (ภาพที่ 2-2) โดยสารตัวนี้สามารถไปทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนอื่นๆ แล้วก่อให้เกิด ผลิตภัณฑ์ตัวใหม่คือ AGEs ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความเสถียร ไม่สามารถคืนสู่สภาพเดิมได้ ขั้นตอนนี้ใช้เวลาในการเกิด

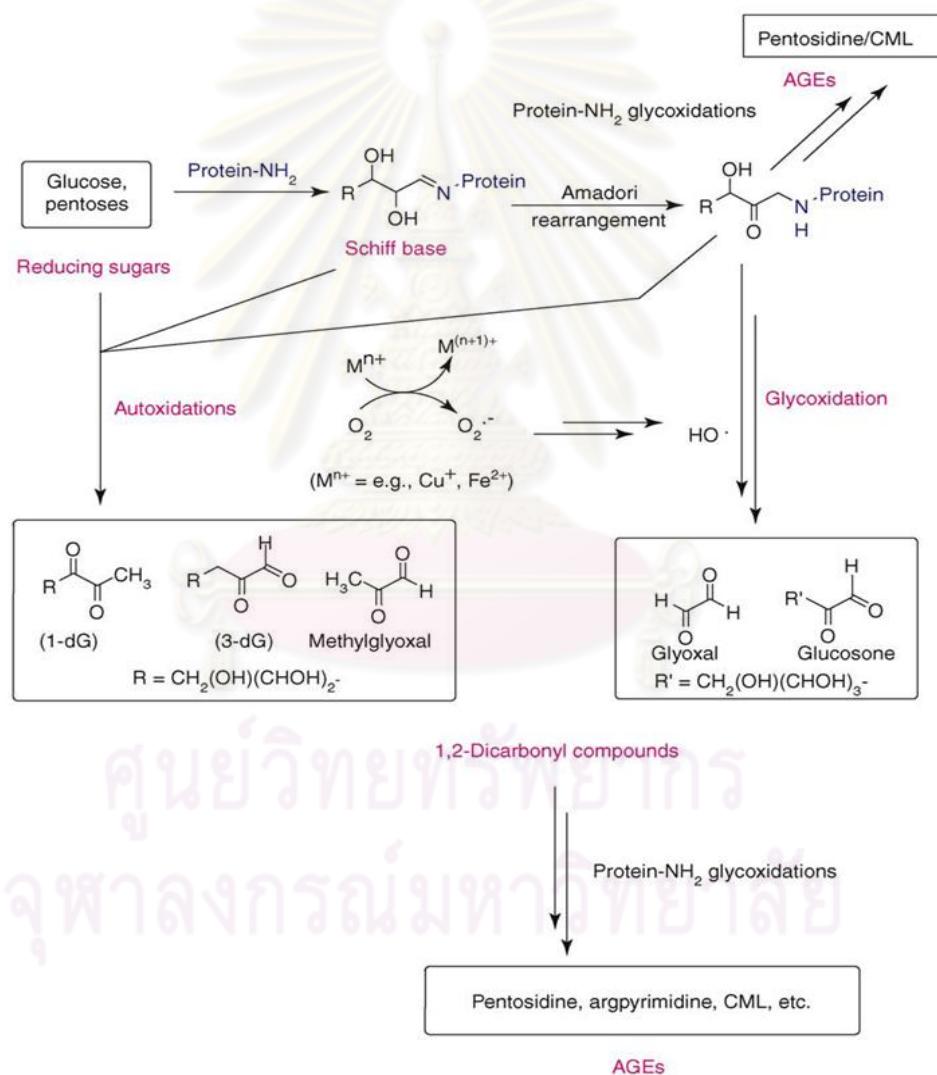
เป็นหน่วยเดือน โดย AGEs สามารถเกิด crosslink กับโปรตีนตัวอื่นๆ หรือ AGEs อาจจับกับหมู่อะมิโนของโปรตีนแล้วทำให้โปรตีนนั้นๆเกิดโครงสร้างใหม่ขึ้นมา ซึ่งโปรตีนที่ถูก AGEs เข้าไปจับจะเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพและทำให้การทำงานเปลี่ยนไป (Fisman and Tenenbaum, 2008) (ภาพที่ 2-1)



ภาพที่ 2-2 แสดงขั้นตอนการเกิดสารประกอบคาร์บอนิล (Uribarri, 2006)

น้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่ง เช่น น้ำตาลกลูโคส สามารถเกิดปฏิกิริยาออกได้ออกซิเดชัน (autoxidations) โดยมีโลหะหนัก เช่น ธาตุเหล็ก หรือธาตุทองแดง เข้าร่วมทำปฏิกิริยา ทำให้เกิดอนุมูลไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และสารประกอบคาร์บอนิลซึ่งเป็นสาร reactive intermediates หรือ AGEs precursor จากนั้นสารตัวใหม่นี้จะเข้าไปทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนอื่นๆ แล้วเกิดการจัดเรียงโครงสร้างใหม่และกลายเป็น AGEs ในที่สุด ในขณะที่อนุมูลไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถเกิดปฏิกิริยาฟีนตันแล้วเกิดเป็นอนุมูลไฮดรอกซิลต่อไป กระบวนการดังกล่าวเรียกว่า ออกได้ออกซิเดทีฟ ไกลเคชัน (autoxidative glycation) นอกจากนี้สารตัวอื่นๆ เช่น หมู่อะมิโน ไขมัน หรือ schiff base สามารถเกิดปฏิกิริยาออกได้ออกซิเดชันและทำให้เกิดสารประกอบคาร์บอนิลได้เช่นกัน แต่หากกระบวนการดังกล่าวเกิดจาก amadori product จะเรียกว่าปฏิกิริยาไกลคอกซิเดชัน (glycoxidation) กล่าวคือ amadori product เกิดปฏิกิริยาไกลคอกซิเดชัน โดยมีอนุมูลอิสระและโลหะหนัก เช่น ธาตุเหล็กหรือทองแดงเข้าร่วมทำปฏิกิริยา ทำให้เกิดสารประกอบคาร์บอนิลและอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาฟีนตัน แล้วเกิดเป็นอนุมูลไฮดรอกซิลต่อไป (Wolff and Dean, 1987; Reddy and Beyaz, 2009) (ภาพที่ 2-2 และ 2-3)

สารประกอบคาร์บอนิลที่เกิดจากปฏิกิริยาออกได้ออกซิเดชันที่ฟ ไกลเคชั่น ได้แก่ methyl glyoxal (MGO), 1 - deoxyglucosone (1-dG) และ 3 - deoxyglucosone (3-dG) ส่วนสารประกอบคาร์บอนิลที่เกิดจากปฏิกิริยาไกลคอกซิเดชัน ได้แก่ glycosal และ glycosone โดยสารประกอบคาร์บอนิลเหล่านี้สามารถไปทำปฏิกิริยาไกลคอกซิเดชันกับหมู่อะมิโนอื่นๆ แล้วก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ตัวใหม่คือ AGEs และ AGEs สามารถเกิด crosslink กับโปรตีนตัวอื่นๆ หรือ AGEs อาจจับกับหมู่อะมิโนของโปรตีนแล้วทำให้โปรตีนนั้นๆเกิดโครงสร้างใหม่ขึ้นมา ซึ่งโปรตีนที่ถูก AGEs เข้าไปจับจะเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพและทำให้การทำงานเปลี่ยนไป (Reddy and Beyaz, 2009) (ภาพที่ 2-3)



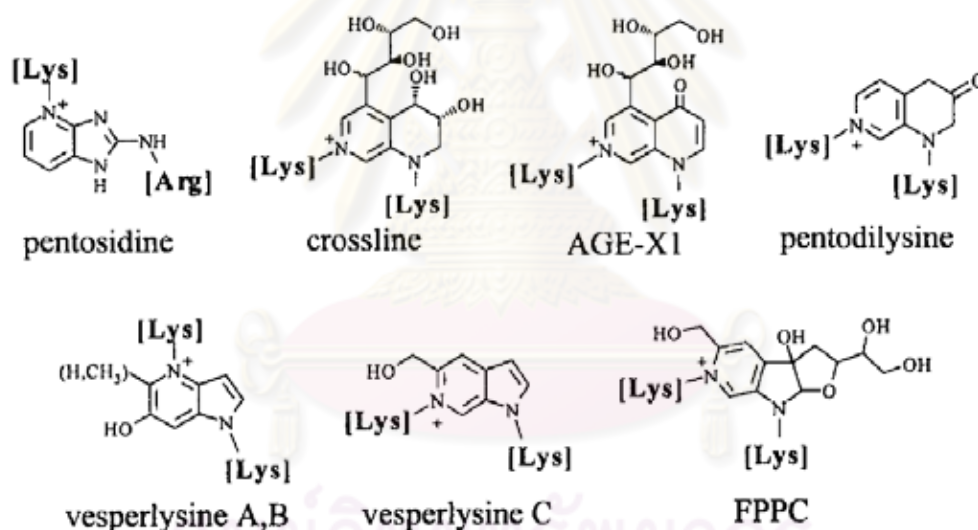
ภาพที่ 2-3 แสดงขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาออกได้ออกซิเดชันและปฏิกิริยาไกลคอกซิเดชันของกระบวนการไกลเคชั่น (Reddy and Beyaz, 2009)

3.2 ประเภทของ AGEs

แบ่งตามลักษณะการเข้าจับกับโปรตีนและคุณสมบัติการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ (Ulrich and Cerami, 2001) ได้เป็น 3 ประเภท

3.2.1 Fluorescence AGEs crosslinks

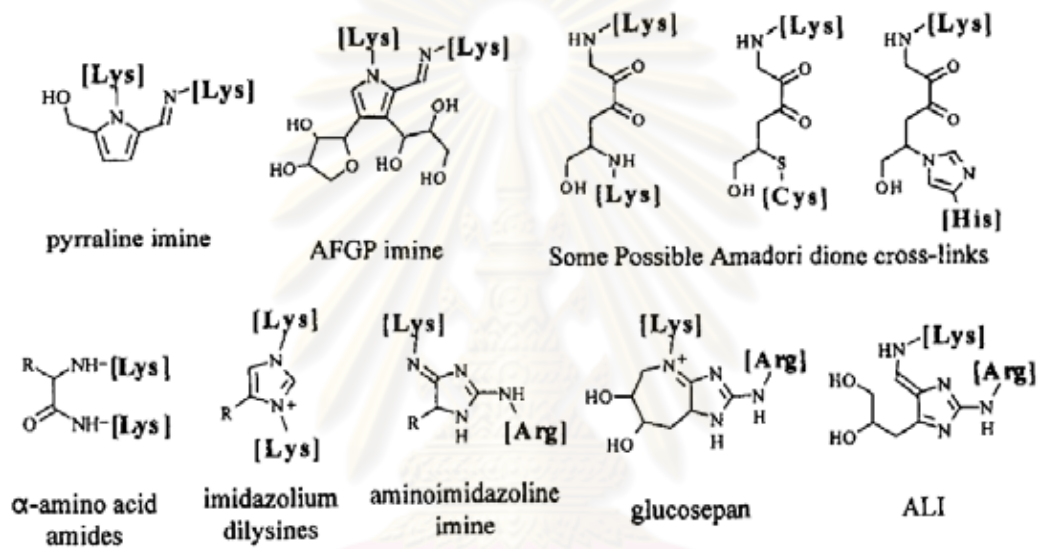
เกิดจากสารประกอบคาร์บอนิลที่สามารถเกิด crosslink หรือเข้าเป็นตัวเชื่อมระหว่างหมู่อะมิโนของโปรตีนอื่นๆ และมีคุณสมบัติการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ เช่น pentosidine, crossline, pentodilysine, AGEs-XI, vesperlysine A-B, FPPC เป็นต้น (ภาพที่ 2-4)



ภาพที่ 2-4 แสดง AGEs ชนิด crosslink และมีคุณสมบัติการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ (Ulrich and Cerami, 2001)

3.2.2 Nonfluorescence AGEs crosslink

เกิดจากสารประกอบคาร์บอนิลที่สามารถเกิด crosslink หรือเข้าเป็นตัวเชื่อมกับหมู่อะมิโนของโปรตีนอื่นๆ แต่ไม่มีคุณสมบัติการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ เช่น imidazolium dilysine crosslinks (GOLD/MOLD crosslinks), pyrroline crosslinks, arginine-lysine-imidazole crosslinks (ALI crosslinks), amadori dione crosslinks เป็นต้น (ภาพที่ 2-5)

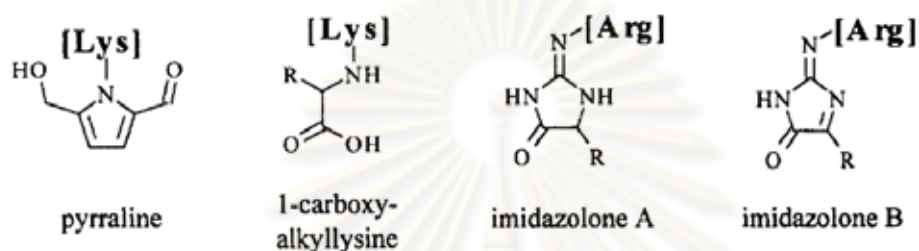


ภาพที่ 2-5 AGEs ชนิด crosslink แต่ไม่มีคุณสมบัติการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ (Ulrich and Cerami, 2001)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.3 Noncrosslinking AGEs

เกิดจากสารประกอบคาร์บอนิลที่สามารถเข้ารวมกับหมู่อะมิโนของโปรตีนอื่นๆ แล้วทำให้โปรตีนเกิดโครงสร้างใหม่ขึ้นมา หรืออาจกล่าวได้ว่า AGEs ชนิดนี้เกิดจากโปรตีนเดี่ยวที่เปลี่ยนแปลงโครงสร้าง เช่น N^E- (carboxymethyl) lysine (CML), N^E-(1-carboxyethyl) lysine (CEL), Imidazolones A-B เป็นต้น (ภาพที่ 2-6)



ภาพที่ 2-6 AGEs ชนิดโปรตีนเดี่ยวที่เปลี่ยนแปลงโครงสร้าง (Ulrich and Cerami, 2001)

3.3 AGEs และอนุมูลอิสระ

กระบวนการไกลเคชั่นเกี่ยวข้องกับอนุมูลอิสระ ทั้งในขั้นตอนของปฏิกิริยาไกลคอกซิเดชันและปฏิกิริยาออกได้ออกซิเดชัน ซึ่งมีการถ่ายเทประจุกับโลหะหนัก เช่น ธาตุเหล็ก หรือธาตุทองแดง นำไปสู่การเกิดอนุมูลอิสระ reactive oxygen species (ROS) เช่น อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ อนุมูลไฮดรอกซิล อนุมูลไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Wolff and Dean, 1987) และสารประกอบคาร์บอนิล เช่น methylglyoxal (MGO), glycosal และ glycosone (Reddy and Beyaz, 2009)

AGEs ทำให้ภายในเซลล์มีการสร้างสารอนุมูลอิสระโดยผ่านทาง การจับกับตัวรับของ AGEs หรือ receptor of AGEs (RAGE) แล้วเกิดการสร้างสารประเภท pro-oxidant ขึ้นมาภายในเซลล์ หากมีสารดังกล่าวจำนวนมากเกินกว่าที่สารต้านอนุมูลอิสระ เช่น เอนไซม์ glutathione dismutase สามารถจัดการได้ ก็จะเกิดภาวะ oxidative stress และก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อต่อไป (Fisman and Tenenbaum, 2008)

3.4 Receptor of AGEs (RAGE)

ในระดับเซลล์ AGEs จะมีตัวรับ AGEs (Receptor of AGEs : RAGE) เป็นสื่อกลางในการเข้าไปมีบทบาทต่อการทำงานของเซลล์ โดย RAGE เป็นตัวรับแบบ multiligands จัดอยู่ในกลุ่ม superfamily ของ อิมมูโนโกลบูลินจี หรือ IgG พบบริเวณผิวของเซลล์ทั่วไป รวมทั้งเซลล์โมโนไซต์ แมคโครเฟจ เซลล์เยื่อปมั่งหลอดเลือด เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ RAGE ทำงานโดยการดักจับ AGEs หรือเป็นสื่อในการส่งสัญญาณภายในเซลล์ โดยทั่วไปในสัตว์พบว่า มีการปรากฏของ RAGE บริเวณผิวเซลล์ค่อนข้างน้อย แต่ถ้าหากเกิดความผิดปกติหรือมีพยาธิสภาพเกิดขึ้น RAGE จะมีการเพิ่มขึ้นอย่างมาก เนื่องจากมีการสะสมของ AGEs (Schmidt et al., 2001)

ตัวรับ AGEs นอกจาก RAGE แล้ว ยังมีตัวรับสำหรับ AGEs ตัวอื่น ได้แก่ macrophages scavenger receptor class A โดยพบว่า ในกระบวนการของการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็งตัว ตัวรับนี้จะทำหน้าที่เป็นสื่อกลางในการพา AGEs เข้าไปในเซลล์แมคโครเฟจ รวมทั้งกำจัด AGEs ออกจากเซลล์ด้วย (Buccherelli et al., 2002) อีกประการหนึ่งคือ CD36 ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม family scavenger receptor class B ทำหน้าที่เป็นตัวรับที่เกี่ยวข้องกับ AGEs และการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress (Goldin et al., 2006) ในขณะเดียวกัน RAGE ทำงานร่วมกับ ligand อื่นๆนอกเหนือจาก AGEs เช่น beta amyloid หรือ amphoterin หรือ S-100-calculinins ซึ่งเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับ proinflammatory cytokine เป็นต้น

3.5 เมตาบอลิซึมของ AGEs

AGEs ในเนื้อเยื่อต่างๆภายในร่างกายจะถูกกำจัดด้วยเซลล์แมคโครเฟจโดยถูกย่อยให้อยู่ในรูปอนุภาคโปรตีนขนาดเล็กที่ละลายน้ำได้ แล้วขับออกทางไต นอกจากนี้พบว่า kupffer cell และเซลล์เยื่อปมั่งหลอดเลือดของตับ มีบทบาทสำคัญในการกำจัด AGEs ในพลาสมา โดยเซลล์เหล่านี้จะมีตัวรับคอยดักจับ AGEs เข้ามากำจัดภายในเซลล์ (Smedsrod et al., 1997) ดังนั้นในกรณีที่มีความผิดปกติเกี่ยวกับไต ตับ หรือในกรณีที่ร่างกายมีปริมาณ AGEs มากเกินกว่าที่อวัยวะดังกล่าวจะจัดการการได้หมด ก็อาจส่งผลทำให้เกิดการสะสมของ AGEs ภายในร่างกาย

3.6 ผลของ AGEs ต่อระบบต่างๆภายในร่างกาย

3.6.1 ระบบหลอดเลือดและหัวใจ

AGEs ทำให้เกิดพยาธิสภาพที่ระบบหลอดเลือด เนื่องจากการเชื่อมต่อกันระหว่าง AGEs กับหมู่อะมิโนของโปรตีนที่อยู่ในพลาสมา เช่น อัลบูมิน LDL และ อิมมูโนโกลบูลิน โดย AGEs จะจับกับโปรตีนอัลบูมิน แล้วนำมาสะสมอยู่ที่บริเวณชั้น subendothelium ของหลอดเลือด ทำให้เกิดการหนาตัวของชั้น basement membrane และเป็นสาเหตุทำให้ช่องว่างของหลอดเลือดแคบลง หรือ AGEs สามารถจับ LDL แล้วนำมาสะสมบริเวณผนังหลอดเลือด และ LDL อาจถูกออกซิไดซ์กลายเป็นอนุมูลอิสระ ทำให้หลอดเลือดเสียหาย นอกจากนี้ AGEs สามารถจับกับ IgG และคอมพลีเมนต์ต่างๆ แล้วทำให้เกิดกระบวนการอักเสบต่อไป (Gugliucci, 2000)

ในกรณีนี้ AGEs จับกับ RAGE ที่อยู่บนผนังของเซลล์เยื่อหลอดเลือด จะกระตุ้นให้ภายในเซลล์เกิดการสร้างอนุมูลอิสระ คือ ROS ซึ่งจะไปกระตุ้น NF-KB ซึ่งเป็น transcription factor ที่ตอบสนองต่ออนุมูลอิสระ และนำไปสู่การปรากฏของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ นอกจากนี้ยังไปกระตุ้น adhesion molecule เช่น VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1), ICAM-1 (inter-cellular adhesion molecule 1) ให้เพิ่มมากขึ้น จากทั้งหมดนี้ก็จะนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของ permeability ในหลอดเลือดและการเคลื่อนย้ายของเซลล์อักเสบให้มาที่บริเวณเซลล์เยื่อหลอดเลือด (Wautier et al., 1996)

เมื่อ AGEs จับกับตัวรับ RAGE ที่อยู่บนเซลล์แมคโครเฟจ จะกระตุ้นให้เกิดกระบวนการอักเสบ ได้แก่ การเกิดเคลื่อนย้ายของเซลล์อักเสบหรือ mononuclear cell การสร้าง inflammatory cytokine คือ interleukin-1(IL-1), tumor necrosis factor (TNF), platelet-derived growth factor (PDGF), insulin growth factor-I (IGF-1) และ granulocyte/macrophage AGEs colony stimulating factor (GCSF) ซึ่งจะไปทำให้เกิดการเพิ่มของ collagen type VI และเป็นสาเหตุทำให้เกิดการหนาตัวของชั้น basement membrane นอกจากนี้ยังกระตุ้นให้เซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดแดง และแมคโครเฟจให้เกิดการแบ่งตัวเพิ่มมากขึ้น (Kirstein et al., 1990)

3.6.2 ระบบไต

AGEs ที่สะสมในไต จะทำหน้าที่เป็น chemotactic factors ของเซลล์ โมโนไซต์ และแมคโครเฟจโดย AGEs จะจับกับ RAGE กระตุ้นการหลั่งสื่อต่างๆ ได้แก่ IL-1, TNF, PDGF และ IGF-1 ซึ่งสื่อเหล่านี้จะกระตุ้นการสร้าง collagen type VI นอกจากนี้ AGEs จะไปจับกับเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดของเส้นเลือดฝอยที่หน่วยกรองไต ทำให้ลดการสร้างสาร anticoagulant tissue factors ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดลิ่มเลือดได้ง่าย และ AGEs ยังไปยับยั้งฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์ทำให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือด และเกิดภาวะขาดเลือดตามมา (Gugliucci, 2000)

นอกจากนี้ AGEs จะเกาะอยู่ที่หน่วยกรองไตและท่อไต คอยดักจับอัลบูมิน อิมมูโนโกลบูลิน และ ไลโปโปรตีนในเลือดให้มาสะสมที่ชั้น basement membrane ของหน่วยกรองไต มีผลทำให้ชั้น basement membrane หนาตัวมากขึ้น ทำให้หน่วยกรองไตเสียหายที่และเกิดภาวะโปรตีนในปัสสาวะตามมา (Saito et al., 2005)

3.6.3 ระบบประสาท

AGEs เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิด amyloid plaque ซึ่งเป็นพยาธิสภาพที่สำคัญในโรคอัลไซเมอร์ กล่าวคือ เมื่อโปรตีน amyloid จับกับกลูโคส เกิดปฏิกิริยาไกลเคชัน ทำให้โปรตีน amyloid มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจากโปรตีนหุติยภูมิที่มีโครงสร้างเป็นเกลียวหรือมีลักษณะเป็น helical protein เกิดการยึดออกเป็นแผ่นหรือ beta sheet แทน กลายเป็น cross beta amyloid structure ที่สามารถไปเชื่อมต่อกับ amyloid ตัวอื่นได้ต่อไป เมื่อมีการสะสมของ beta sheet มากขึ้นเรื่อยๆ ก็เกิดการรวมตัวกลายเป็นไฟบริลที่ไม่ละลายน้ำและมีการเกาะกลุ่มกันในรูปของ plaque ต่อไป ซึ่ง amyloid plaque จะกระตุ้นกระบวนการอักเสบ รวมทั้งทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้น ส่งผลให้เซลล์ประสาทเกิดความเสียหายในที่สุด และ amyloid plaque สามารถเปลี่ยนแปลงเป็น amadori product และเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างกลายเป็น AGEs ต่อไป (Sasaki et al., 1998) นอกจากนี้พบว่า เมื่อ amyloid เชื่อมต่อ AGEs จะทำให้ขั้นตอนการเกาะกลุ่มของ amyloid เกิดเร็วขึ้นกว่าปกติ (Obrenovich and Monnier, 2004)

AGEs เข้าจับกับ RAGE ทำให้เกิดเซลล์ประสาทถูกทำลายทั้งทางตรงและทางอ้อม กล่าวคือ การทำลายแบบทางตรง เกิดจากการที่ AGEs จับกับ RAGE แล้วทำให้เซลล์เกิดกระบวนการ apoptosis, calcium - influx, ภาวะ oxidative stress ส่วนแบบทางอ้อม เกิดจาก AGEs เข้าจับกับ RAGE แล้วเรียกเซลล์แมคโครเฟจเข้ามาที่เซลล์แล้วกระตุ้นให้เกิดการหลั่ง cytokine เกิดกระบวนการอักเสบและทำให้เซลล์เกิดความเสียหาย (Sima and Sugimoto, 1999)

3.6.4 ผิวหนังและเนื้อเยื่อ

AGEs ทำให้เนื้อเยื่อเกิดความหยابกระด้างและเกิดการเปลี่ยนแปลงของสีผิว การเกิดไกลเคชันมีผลต่อคอลลาเจน ทำให้หลอดเลือดหนาขึ้น ข้อต่อมีความยืดหยุ่นลดลง (Gugliucci, 2000) และการสะสม AGEs ที่บริเวณผิวหนัง มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างหน้าที่ของเซลล์และนำไปสู่ความผิดปกติในที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่า AGEs ทำให้การสมานของแผลเกิดช้าลง (Peppia et al., 2003)

3.7 ยาต้านการเกิด AGEs

ยาต้านการเกิด AGEs สามารถแบ่งตามรูปแบบการทำงานออกเป็น 3 กลุ่ม (Reddy and Beyaz, 2006) ได้แก่

- 1) Carbonyl trapping agents โดยจะเข้าไปจับกับหมู่คาร์บอนิลของน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่ง amadori product และสารประกอบคาร์บอนิล ทำให้สารเหล่านี้ไม่สามารถไปทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนอื่นได้อีกต่อไป
- 2) Metal ion chelators โดยช่วยดักจับกับโลหะหนัก ทำให้สามารถลดการเกิดปฏิกิริยาไกลโคคอกซิเดชันและปฏิกิริยาออกไซด์ออกซิเดชัน
- 3) Cross-link breakers โดยยาจะเข้าไปสลาย crosslink ที่เกิดจาก AGEs ที่ไปเชื่อมกับโปรตีนตัวอื่นๆได้อีก

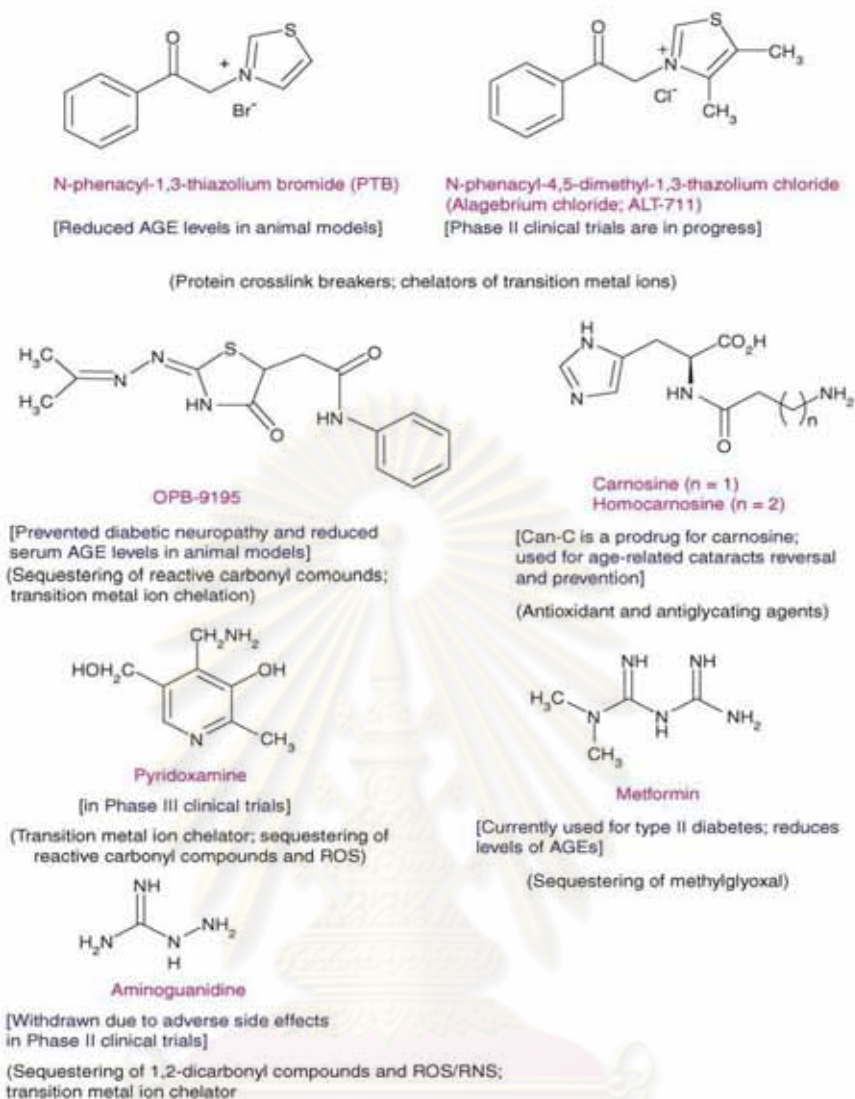
ตัวอย่างยาต้านการเกิด AGEs

3.7.1 ยา aminoguanidine

เป็นยามีคุณสมบัติในการเป็น trapping carbonyl compound คือ สามารถดักจับหมู่คาร์บอนิลของน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่ง amadori product และสารประกอบคาร์บอนิลได้ เนื่องจากยามีหมู่เอมีนเป็นส่วนประกอบ ทำให้เหล่านี้จากเดิมที่จะจับกับหมู่อะมิโนของโปรตีนอื่นๆ หันมาจับที่หมู่เอมีนของยาแทน ปฏิกิริยาไกลโคเคชันจึงไม่สามารถเกิดต่อไปได้ นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการดักจับโลหะหนักด้วย ปัจจุบันยาดังกล่าวนี้ถูกถอนออกจากการทดลองในชั้นเฟส 2 ของการทดลองในผู้ป่วยเบาหวาน (Reddy and Beyez, 2006) เนื่องจากพบว่ายามีผลข้างเคียงต่อหลายระบบในร่างกาย รวมทั้งมีรายงานว่า ยาทำให้เกิดภาวะขาดวิตามินบี 6 (Singh et al., 2001)

3.7.2 ยา pyridoxamine

Pyridoxamine หรือ วิตามิน B6 มีคุณสมบัติเป็นตัวดักจับโลหะหนัก โดยเข้าไปป้องกันการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ในช่วงหลังการเกิด amadori product ทำให้ช่วยลดการเกิดสารประกอบคาร์บอนิลได้ นอกจากนี้ยังสามารถดักจับคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลต่ำของน้ำตาลหรือไขมันได้ (Voziyan et al, 2002) ปัจจุบันยากำลังอยู่ในขั้นตอนเฟส 3 ของการทดลองในผู้ป่วยเบาหวาน (Reddy and Beyaz, 2006)



ภาพที่ 2-7 โครงสร้างของตัวอย่างยาด้าน AGEs ชนิดต่างๆ (Reddy and Beyaz, 2009)

3.7.3 ยา N-phenacyl-1, 3-thiazolium bromide (PTB)

ยา PTB สามารถช่วยลดการเกิด crosslink ระหว่าง AGEs และโปรตีน ด้วยการสลายพันธะคาร์บอน-คาร์บอน โดยแยกไดคีโตนที่เป็นตัวเชื่อมระหว่างหมู่คาร์บอนของแต่ละโมเลกุลโปรตีนที่มาจับ crosslink กัน (Vasan et al., 1996; Reddy and Beyaz, 2006)

3.7.4 ยา metformin

ยา metformin เป็นที่รู้จักกันทั่วไปในรูปของยาเม็ดลดระดับน้ำตาลในเลือดในผู้ป่วยโรคเบาหวานประเภทที่ 2 แต่ในปัจจุบันนี้พบว่ายามีคุณสมบัติในการยับยั้งปฏิกิริยาไกลโคเคชั่นได้เช่นกัน โดยพบว่ายามีลักษณะการทำงานเป็น trapping carbonyl compound คือ ช่วยดักจับหมู่คาร์บอนิลและสามารถลดการเกิดสารประกอบคาร์บอนิล เช่น MGO ได้ (Reddy and Beyaz, 2006) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า ยาสสามารถยับยั้งได้หลายช่วงของกระบวนการไกลโคเคชั่น คือทั้งในช่วงต้นหรือช่วงเกิด amadori product ช่วง intermediate และช่วงหลังเกิด amadori product (Khalifah et al, 1999)

ในปัจจุบัน แม้จะมีการสังเคราะห์ยาต้านการเกิด AGEs หลายตัวยา แต่ยังไม่มีการใช้กันโดยทั่วไปเนื่องจากยาส่วนใหญ่ยังอยู่ในระหว่างการทดลองยา (Miyata et al., 2003; Thomas et al., 2005) ส่วนผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ หรือสมุนไพร พบว่าพืชบางชนิด สามารถลดการเกิด AGEs ได้ เช่น สารสกัดพืชที่มีส่วนประกอบของฟลาโวนอยด์ สามารถลดปริมาณของสารประกอบคาร์บอนิลและ AGEs ได้ (Urios et al., 2007) หรือสารสกัดจากสมุนไพรที่มีส่วนประกอบของสารประกอบฟีนอลิก สามารถยับยั้งการเกิด AGEs ได้ โดยมีความสัมพันธ์กับการต้านอนุมูลอิสระ (Harris et al., 2010)

4. อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว อยู่ในวงอิเล็กตรอนนอกสุดของวงโคจร ทำให้โมเลกุลไม่เสถียร และเป็นสารที่มีความว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารอื่นสูงมาก โดยอนุมูลอิสระจะไปรับอิเล็กตรอนจากสารที่อยู่ใกล้เคียงเพื่อให้ตัวเองเสถียร ในขณะที่สารใกล้เคียงที่สูญเสียอิเล็กตรอนไปก็จะมีอิเล็กตรอนไม่ครบคู่ กลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ขึ้นมา ซึ่งอนุมูลอิสระตัวใหม่นี้จะไปทำปฏิกิริยากับสารอื่นต่อไป เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อเนื่องไปเรื่อยๆ (Halliwell, 1992) หากเกิดกลไกดังกล่าวในสิ่งมีชีวิตมักเกี่ยวข้องกับการใช้ออกซิเจนในการเผาผลาญเพื่อสร้างพลังงาน โดยผ่านทางปฏิกิริยาออกซิเดชัน ก็จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและหน้าที่การทำงานของสารชีวโมเลกุลต่างๆ เช่น โปรตีน ไขมัน ดีเอ็นเอ เอนไซม์ ส่งผลให้เกิดอันตรายต่อเซลล์และกลายเป็นพยาธิสภาพของระบบอวัยวะต่างๆตามมา เช่น โรคมะเร็ง โรคอัลไซเมอร์ โรคหลอดเลือดแดงแข็งตัว ต้อกระจก เป็นต้น อนุมูลอิสระที่มีความสำคัญในทางชีวภาพ ได้แก่ อนุมูลไฮดรอกซิล (OH^\cdot), อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (O_2^\cdot), อนุมูลไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นต้น (Halliwell, 1995)

อย่างไรก็ตาม แม้ว่าร่างกายจะมีการสร้างอนุมูลอิสระจากกระบวนการเผาผลาญต่างๆ แต่ร่างกายก็มีระบบที่ป้องกันความเสียหายจากปฏิกิริยาดังกล่าว โดยการสร้างสารที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระขึ้นมา ซึ่งประกอบไปด้วยสารหรือเอนไซม์ต่างๆ ที่แม้ว่ามีความเข้มข้นต่ำ แต่สามารถชะลอหรือป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระได้ เมื่อเกิดการเสียสมดุลระหว่างอนุมูลอิสระและระบบต้านอนุมูลอิสระ กล่าวคือ ภาวะที่ปริมาณอนุมูลอิสระมีมากเกินไปที่ระบบต้านอนุมูลอิสระจะป้องกันได้ จะเกิดภาวะ oxidative stress ขึ้นมา (Bonnefont, 2002) ซึ่งอนุมูลอิสระที่ยังเหลืออยู่ก็อาจทำลายเซลล์เกิดความเสียหายและกลายเป็นพยาธิสภาพหรือโรคต่างๆตามมาในที่สุด (Ames, 1993)

5. สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารที่ทำหน้าที่ยับยั้งหรือต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันและป้องกันไม่ให้เกิดการดิงอิเล็คตรอน โดยจะเข้าไปจับกับอนุมูลอิสระแล้วทำให้อนุมูลอิสระไม่สามารถก่อปฏิกิริยาที่สร้างความเสียหายได้อีกต่อไป (Halliwell, 1992) โดยทั่วไปร่างกายมีสารต้านออกซิเดชันหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นในรูปแบบของเอนไซม์ เช่น เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) เอนไซม์กลูตาไธโอน เพอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) เอนไซม์แคทาเลส (catalase) หรือในรูปแบบที่ไม่ใช่เอนไซม์ เช่น ทองแดง สังกะสี วิตามินอี เบต้า-แคโรทีน วิตามินซี บิลิรูบิน กรดยูริก เป็นต้น (Peppia et al., 2005) สารต้านอนุมูลอิสระ สามารถแบ่งตามกลไกการยับยั้งได้เป็น 3 ชนิด ได้แก่ 1) ป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ 2) ดักจับอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น 3) ทำลายปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระ (Bonnefont, 2002)

แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระ

5.1 สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์

สารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ ส่วนใหญ่จะถูกออกแบบโดยใช้โครงสร้างของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีในธรรมชาติมาดัดแปลงให้มีการออกฤทธิ์ที่ดีขึ้น เช่น สารต้านออกซิเดชันที่พัฒนามาจากโครงสร้างของวิตามินอี หรือโครงสร้างสารประกอบฟีนอลิก อย่างไรก็ตามแม้ว่าสารสังเคราะห์เหล่านี้จะมีประสิทธิภาพและความเสถียรมากกว่าสารจากธรรมชาติ แต่ก็มีข้อจำกัดในด้านผลข้างเคียงจากการนำมาบริโภค (Yang et al., 2000) ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ ได้แก่

5.1.1 Trolox

Trolox หรือ 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid มีสูตรโมเลกุลทางเคมี คือ $C_{14}H_{18}O_4$ เป็นอนุพันธ์ของวิตามินอีที่ดัดแปลงโครงสร้างโดยการเปลี่ยนสูตรโครงสร้าง ทำให้มีความสามารถละลายได้ดีในน้ำ และจากความสามารถดังกล่าวจึงทำให้ trolox สามารถออกฤทธิ์เร็วกว่าวิตามินอี กล่าวคือการออกฤทธิ์ของวิตามินอีต้องใช้เวลาเป็นชั่วโมงหรือเป็นวัน ในขณะที่ trolox สามารถออกฤทธิ์ได้ทันที (โสภา วัชรคุปต์และคณะ, 2549) ดังนั้นในการวิจัยนิยมใช้ trolox เป็นสารมาตรฐานในการตรวจสอบคุณสมบัติการต้านออกซิเดชัน (Pryor et al., 1993)

5.1.2 กรดแกลลิก

กรดแกลลิก (Gallic acid) หรือ 3,4,5-hydroxybenzoic acid เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีสูตรโมเลกุลทางเคมีคือ $C_7H_6O_5$ เป็นส่วนประกอบของแทนนิน พบมากในองุ่น ใบชา เปลือกไม้ไผ่ และพืชอื่นๆ โดยทั่วไปจะใช้เกี่ยวกับอุตสาหกรรมทางยา คุณสมบัติของกรดแกลลิกคือ สามารถยับยั้งเชื้อรา เชื้อไวรัส และมีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันได้ดี (โสภา วัชรคุปต์และคณะ, 2549)

5.1.3 EDTA

EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) มีสูตรโมเลกุลทางเคมีคือ $C_{10}H_{16}N_2O_8$ มีคุณสมบัติเป็นสารคีเลต คือ สามารถจับกับธาตุโลหะที่มีประจุ เช่น ตะกั่ว เหล็ก สังกะสี แคดเมียม แมงกานีส และทองแดง มีประโยชน์ทางการแพทย์โดยนำมาใช้กำจัดไอออนของโลหะต่างๆได้ (โสภา วัชรคุปต์และคณะ, 2549)

5.2 สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ

สารต้านอนุมูลอิสระในธรรมชาติ สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั่วไป โดยอาจอยู่ในรูปแบบของวิตามินหรือสารพฤกษเคมีที่มีโครงสร้างเป็นสารประกอบฟีนอลิก เช่น โพลีฟีนอล ฟลาโวนอยด์ เป็นต้น ปัจจุบันด้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติกำลังเป็นที่สนใจและมีการศึกษาค้นคว้าอย่างกว้างขวาง เนื่องจากแนวคิดเรื่องการประยุกต์ใช้สารจากธรรมชาติเพื่อเสริมสุขภาพ ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ ได้แก่

5.2.1 วิตามินซี

วิตามินซี (Vitamin C) หรือ กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) เป็นวิตามินที่มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ มีฤทธิ์เป็นกรด สลายตัวอย่างรวดเร็วและมีความไวต่อออกซิเจนสูง มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์เข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลไฮดรอกซิล อนุมูลเพอร์ออกไซด์ และอนุมูลไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ป้องกันไม่ให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ (Tolbert and Ward, 1982) นอกจากนี้ยังเป็นตัวเสริมประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของวิตามินอีด้วย (Traber and Atkinson, 2007)

5.2.2 วิตามินอี

วิตามินอี (Vitamin E) หรือ tocopherol เป็นวิตามินที่มีคุณสมบัติละลายในไขมันและเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยวิตามินอีเป็นสารที่ไวต่อการถูกออกซิไดซ์มากจึงเป็นตัวถูกออกซิไดซ์แทนสารอื่นที่มีความไวน้อยกว่า นอกจากนี้ยังสามารถทำงานร่วมกับสารต้านอนุมูลอิสระตัวอื่นๆ เช่น วิตามินซีหรือ ซีลีเนียม เป็นต้น (Traber and Atkinson, 2007) ในธรรมชาติมีวิตามินอีอยู่หลายชนิด โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ tocopherols และ tocotrienols และในแต่ละกลุ่มจะแยกเป็นวิตามินย่อยๆ อีก 4 ชนิด ได้แก่ alpha, beta, gamma และ delta ซึ่ง alpha tocopherols จัดเป็นกลุ่มที่มีบทบาทสำคัญในด้านการปกป้องเซลล์เมมเบรนจากการเกิดปฏิกิริยา ลูกโซ่ลิปิดเพอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation chain reaction) ของอนุมูลอิสระ (Mukai et al, 2007)

5.2.3 พฤษเคมี

พฤษเคมี (phytochemicals) หมายถึง สารเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบเฉพาะในพืช สารกลุ่มนี้อาจเป็นสารที่ทำให้พืชผักชนิดนั้นๆ มีสี กลิ่นหรือรสชาติที่เป็นลักษณะเฉพาะตัว สารพฤษเคมีเหล่านี้มีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยเสริมการทำงานของเอนไซม์ เป็นต้น ปัจจุบันพบสารพฤษเคมีแล้วมากกว่า 15,000 ชนิด ตัวอย่างสารพฤษเคมี ได้แก่

5.2.3.1 สารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) เป็นสารที่พบได้ในพืชทั่วไป มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนอะโรมาติกที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อยหนึ่งหมู่หรือมากกว่านั้น สามารถละลายน้ำได้ โดยทั่วไปจะมีฤทธิ์เป็นกรด สารประกอบฟีนอลิกที่พบในพืชมักจะรวมอยู่กับโมเลกุลของน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ นอกจากนี้ยังพบว่าอาจมีการรวมตัวกันระหว่างสารประกอบฟีนอลิกด้วยกันเอง หรือสารประกอบฟีนอลิกรวมตัวกับกับสารประกอบอื่นๆ เช่น กรดคาร์บอกซิลิก กรดอินทรีย์ หมู่เอมีน และไขมันอีกด้วย (Sato et al, 1996) สารประกอบฟีนอลิกในธรรมชาติมีอยู่หลายชนิด เช่น สารประกอบฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิก กรดไฮดรอกซินามิกและอนุพันธ์ หรือสารลิกนิน เป็นต้น (Rice-Evans et al., 1997)

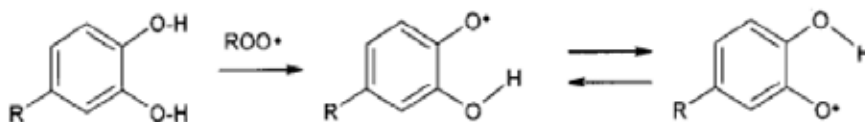
สารประกอบฟีนอลิกจะทำหน้าที่ดักจับอนุมูลอิสระและโลหะหนักที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและโมเลกุลอื่นๆ ด้วยการให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระอย่างรวดเร็ว เมื่อสารประกอบฟีนอลิกให้หมู่ไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระไปแล้ว อนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกเกิดความเสถียรภาพ จึงไม่ทำปฏิกิริยาอื่นต่อไป นอกจากนี้อนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกบางชนิดยังคงสามารถรวมตัวกับอนุมูลอิสระอื่นต่อไปได้อีกด้วย จึงทำให้สามารถลดจำนวนอนุมูลอิสระลงได้มากขึ้น (Rice-Evans et al., 1997; Williamson, 2000)

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า สารประกอบฟีนอลิกมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ โดยสามารถดักจับอนุมูลอิสระ ดักจับไอออนของโลหะ ยับยั้งการเกิดลิพิดเพอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) ช่วยลดการเกิดอนุมูลไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ นอกจากนี้ สารประกอบฟีนอลิกยังทำหน้าที่ทั้งเป็นสารให้อิเล็กตรอน หรือเป็นตัวให้ไฮโดรเจน และกำจัดออกซิเจนที่อยู่ในรูปแอกทีฟ ด้วยจากหน้าที่ต่างๆ ดังกล่าวจึงทำให้สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารต้านออกซิเดชันที่สำคัญชนิดหนึ่งในพืชทั่วไป (Sato et al., 1996; Meyer et al., 1997; Soobrattee et al., 2005)

5.2.3.2 สารประกอบฟลาโวนอยด์

สารประกอบฟลาโวนอยด์ (flavonoids) จัดอยู่ในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิก ชนิดหนึ่ง พบมากในพืช ผักและผลไม้ มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยความสามารถของการต้านออกซิเดชันจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับโครงสร้างเป็นหลัก ฟลาโวนอยด์มีหลายชนิด เช่น แอนโทไซยานิดิน (anthocyanidins) ฟลาโวนอนส์ (flavonones) ฟลาวัน-3-อลส์ (flavan-3-ols) ฟลาโวนส์ (flavones) และฟลาโวนอลส์ (flavonols) แทนนิน (tannin) หรือโปรแอนโทไซยานิดิน (proanthocyanidins) เป็นต้น

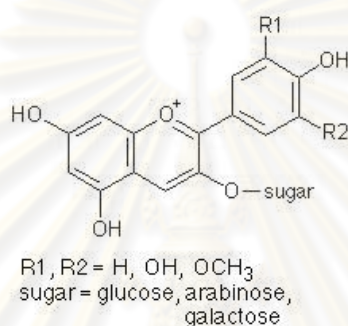
จากการศึกษาของ Arora และคณะในปี ค.ศ.1998 พบว่า สารฟลาโวนอยด์ มีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน โดยสามารถดักจับอนุมูลอิสระ ดักจับไอออนของโลหะ โดยเป็นสารให้อิเล็กตรอน หรือเป็นตัวให้อิโตรเจน เนื่องจากโครงสร้างของโมเลกุลฟลาโวนอยด์ มีตำแหน่งและจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลที่ทำให้มีความสามารถในการต้านออกซิเดชัน กล่าวคือ หมู่ไฮดรอกซิลของวงแหวน B ซึ่งถือเป็นปัจจัยหลักที่ใช้ในการพิจารณาความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน โดยพบว่าตำแหน่ง 3 และ 4 - ไฮดรอกซิลของวงแหวน B จะมีผลอย่างมากต่อการมีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน นอกจากนี้การที่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง C5 ของวงแหวน A หรือที่ตำแหน่ง C3 ของวงแหวน C ร่วมกับการมีกลุ่มคีโตที่ตำแหน่ง C4 ของวงแหวน C จะทำให้มีความไวต่อการทำปฏิกิริยากับโลหะ ซึ่งเป็นการช่วยลดการเกิดออกซิเดชันได้อีกทางหนึ่ง ส่วนตำแหน่ง 3 - ไฮดรอกซิลของวงแหวน C และพันธะคู่ระหว่าง C2 และ C3 ในวงแหวน C จะมีผลเล็กน้อยต่อคุณสมบัติการเป็นสารต้านออกซิเดชัน นอกจากนี้จำนวนของหมู่ไฮดรอกซิลก็ส่งผลต่อคุณสมบัติดังกล่าว โดยพบว่าเมื่อเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่ฟลาโวนอยด์ นิวเคลียส จะช่วยเพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระแต่หากเติมหมู่เมทอกซิล จะทำให้ความสามารถดังกล่าวลดลง (Majo et al., 2005)



ภาพที่ 2-8 โครงสร้างของฟลาโวนอยด์ในการต้านอนุมูลอิสระ (Pedrielli et al., 2001)

6. แอนโทไซยานิน

แอนโทไซยานินเป็นสารรงควัตถุที่ละลายน้ำ ทำให้เกิดสีแดง หรือน้ำเงินม่วงในพืช จัดเป็นสารประกอบฟีนอลิกอยู่ในกลุ่มสารฟลาโวนอยด์ โดยแอนโทไซยานินเป็นสารที่ประกอบจากส่วนที่เป็นน้ำตาล หรือ glycoside และส่วนที่เป็นแอนโทไซยานิดิน หรือ aglycone มีโครงสร้างพื้นฐานทางเคมี ประกอบด้วยวงแหวน benzopyran จำนวน 2 วง ต่อกับวงแหวน phenyl 1วง ซึ่งจะมีน้ำตาลมาติดอยู่ เช่น กลูโคส กาแลคโตส อราบิโนส เป็นต้น (ภาพที่ 2-9) (Von Elbe, 1996)



ภาพที่ 2-9 โครงสร้างของแอนโทไซยานิน

ที่มา: Kong et al., 2003

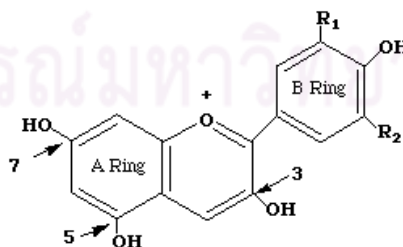
ปัจจุบันมีการค้นพบแอนโทไซยานินแล้วมากกว่า 400 ชนิด โดยจะแบ่งตามชนิดของแอนโทไซยานิดินและน้ำตาลที่มาจับ พบว่าแอนโทไซยานิดินที่เป็นส่วนประกอบในแอนโทไซยานินที่พบมากในผักและผลไม้มีเพียงประมาณ 6 ชนิดเท่านั้น ได้แก่ pelargonidin, peonidin, cyanidin, malvidin, petunidin และ delphinidin โดยในพืชแต่ละชนิดก็จะมีอัตราส่วนและปริมาณของแอนโทไซยานินแตกต่างกันออกไป (Kong et al., 2003)

ตารางที่ 2-1 แสดงตัวอย่างปริมาณแอนโทไซยานินในผลไม้ (Wrolstad et al., 2000)

ผลไม้	แอนโทไซยานิน (mg ต่อ 100 g น.น.ผลสด)
แบล็คเบอร์รี่	83 - 326
บลูเบอร์รี่	25 - 497
ใช้คเบอร์รี่	560
แคนเบอร์รี่	60 - 200
องุ่น	60 - 600
สตรอเบอร์รี่	15 - 35

6.1 คุณสมบัติทางเคมีของแอนโทไซยานิน

แอนโทไซยานินจัดเป็น 2-phenylbenzopyrylium หรือ flavylium salt ประกอบด้วยคาร์บอน 15 ตัว ($C_{15}H_{11}O_6$) ซึ่งแอนโทไซยานินแต่ละชนิดจะมีโครงสร้างแตกต่างกันออกไปเนื่องจากกระบวนการทางเคมี เช่น การเติม การย้ายออก หรือการเติมหมู่เมทิลที่หมู่ไฮดรอกซิลของแอนโทไซยานิน จะทำให้เกิดแอนโทไซยานินชนิดต่างๆที่มีโครงสร้างแตกต่างกันออกไป แอนโทไซยานินมักพบในรูปของ monoglycoside หรือ diglycoside โดยการจับกับหมู่น้ำตาลมักเกิดที่ตำแหน่ง 3 -ไฮดรอกซิล และถ้าเกิดมากกว่า 1 ตำแหน่งก็จะไปจับที่ตำแหน่ง 5 - ไฮดรอกซิล ในขณะที่ตำแหน่ง 7-ไฮดรอกซิล เกิดขึ้นน้อยกว่า (ภาพที่ 2-10)



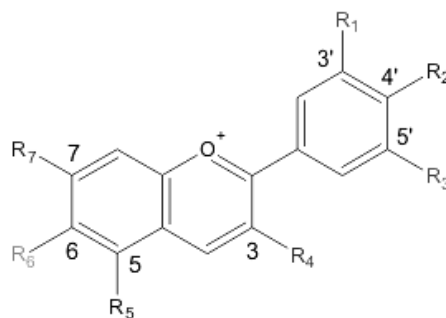
ภาพที่ 2-10 โครงสร้างทางเคมีของแอนโทไซยานิน

ที่มา: Kong et al., 2003

แอนโธไซยานินสามารถเป็นได้ทั้งกรดและเบส เนื่องจากมี oxonium ion ที่วงแหวน pyrylium ทำให้เหมาะสำหรับการเกิด nucleophilic attack ส่งผลให้แอนโธไซยานินเกิดเกลือกับกรดได้ และจากการที่แอนโธไซยานินประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิลจำนวนมาก จึงช่วยแสดงความเป็นกรดหรือเบสก็ได้ ขึ้นอยู่กับค่ากรดเบสตัวทำละลายเป็นหลัก (Fuleki and Francis, 1968) และนอกจากนี้หมู่ไฮดรอกซิล ยังมีผลต่อสีของแอนโธไซยานิน กล่าวคือ ถ้ามีหมู่ไฮดรอกซิลมากก็จะเกิดสีน้ำเงินมาก ในขณะที่ถ้ามีการแทนที่ด้วยหมู่เมทอกซิลที่ตำแหน่ง 3 และ 5 ก็จะทำให้เกิดสีแดงมากขึ้น ซึ่งสีของแอนโธไซยานินจะขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรดเบส โดยในภาวะที่เป็นกรดจะเกิดเป็นสีแดง ส่วนในภาวะที่เป็นกลางหรือเป็นเบสจะเกิดเป็นสีน้ำเงินม่วง นอกจากนี้ flavylum nucleus ในแอนโธไซยานินจัดเป็นสารที่มีอิเล็กตรอน ทำให้วงแหวนในการเกิดปฏิกิริยา เช่น ปฏิกิริยาออกซิเดชัน และการถูกออกซิไดซ์ที่มักทำให้เกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เกิดการเปลี่ยนสีของรงควัตถุตามมา (Kong et al., 2003)

6.2 คุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของแอนโธไซยานิน

แอนโธไซยานินจัดเป็นสารอยู่ในกลุ่มสารฟลาโวนอยด์ เป็นสารประกอบฟีนอลิกซึ่งมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระและไอออนของโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลต่างๆด้วยการให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระเหล่านั้น ทำให้อนุมูลอิสระเหล่านั้นอยู่ในสภาพที่เสถียร ปัจจัยที่มีผลต่อความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญคือตำแหน่งและจำนวนของหมู่ไฮดรอกซิล โดยตำแหน่ง 3, 4 และ 5 - ไฮดรอกซิลของวงแหวน B จะเป็นตำแหน่งหลักในการจับกับอนุมูลอิสระ (ภาพที่ 2-11) แล้วทำให้เกิดการยับยั้งปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระ (Tsai et al., 2002)



ภาพที่ 2-11 ตำแหน่งการจับกับอนุมูลอิสระของแอนโทไซยานิน

ที่มา: Kong et al., 2003

6.3 ประโยชน์ของแอนโทไซยานินต่อร่างกาย

6.3.1 ด้านอนุมูลอิสระ

แอนโทไซยานินสามารถดักจับอนุมูลอิสระด้วยการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และมีคุณสมบัติเป็นตัวดักจับโลหะหนัก จึงช่วยลดการเกิดอนุมูลไฮดรอกซิลและซูเปอร์ออกไซด์ได้ (Sarma et al., 1997; Noda et al., 1998) และจากการศึกษาของ Tsuda และคณะในปี ค.ศ. 1994 พบว่า cyanidin และ cyanidin -3-glucoside สามารถป้องกันการเกิดลิพิดเพอร์ออกซิเดชันของเซลล์เมมเบรนที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยสารดังกล่าวมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระแรงกว่า α -tocopherol นอกจากนี้ยังพบว่า cyanidin -3-glucoside สามารถเป็นตัวต้านอนุมูลอิสระด้วยการให้หมู่ไฮโดรเจนและเป็นตัวดักจับโลหะหนัก โดยช่วยดักจับอนุมูลไฮดรอกซิลและอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (Tsuda et al., 1996) รวมทั้งช่วยลดการสร้าง thiobarbituric acid reactive substances หรือ TBARS และเพิ่มการต้านการเกิดลิพิดเพอร์ออกซิเดชันของซีรัมในหนูทดลอง (Tsuda et al., 1999)

6.3.2 ระบบหลอดเลือดและหัวใจ

แอนโทไซยานินช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด โดยสามารถช่วยลดระดับคอเลสเตอรอล ช่วยลดไลโปโปรตีนชนิด LDL และเพิ่มปริมาณของไลโปโปรตีนชนิด HDL (Reed, 2002) รวมทั้งช่วยป้องกันการเกาะรวมกันของเกล็ดเลือด ช่วยให้หลอดเลือดคลายตัวโดยทำให้เซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดเพิ่มการสร้างและหลั่งไนตริกออกไซด์ (Tsuda et al., 2002)

6.3.3 ด้านการอักเสบ

แอนโธไซยานินสามารถต้านการอักเสบ โดยมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cyclooxygenase2 (COX-2) ทำให้ช่วยลดระดับของ PGE₂ (Garbacki et al., 2002) นอกจากนี้ยังสามารถช่วยยับยั้งการ degradation ของ mast cell จึงช่วยลด IL-2 และ TNF- α ได้ (Lin et al., 2000; Middleton et al., 2002)

6.3.4 ด้านมะเร็ง

แอนโธไซยานินสามารถช่วยป้องกันการเกิดมะเร็ง โดยจะไปเหนี่ยวนำการปรากฏของ ยีน Bcl-2 ซึ่งเป็นยีนที่ต้านการเกิด apoptosis และมีผลยับยั้งยีน e-myc และ p21 ซึ่งเป็นยีนที่ทำให้ apoptosis ให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็ง (bagchi et al., 2002)

6.3.5 ด้านเบาหวาน

แอนโธไซยานินสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลฟาไกลูโคซิเดส จึงสามารถช่วยชะลอการเพิ่มขึ้นของระดับน้ำตาลในกระแสเลือดได้ (Matsui et al., 2001) และสามารถช่วยป้องกันเบต้าเซลล์ของตับอ่อนจากความเสียหายของกลูโคสที่ทำให้เกิดภาวะ oxidative stress ได้ (Al - Awwadi et al., 2005)

6.3.6 ด้านไกลโคซีน

แอนโธไซยานินชนิด cyanidine-3- α -rhamnoside และ pelargonidins-3- α -rhamnoside ในอะเซโรลาเซอริสามารถยับยั้งการเกิด AGEs ได้ (Hanamaru et al., 2005)

7. องุ่น

องุ่นมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ คือ *Vitis vinifera* Linn. อยู่ในวงศ์ Vitidaceae ปัจจุบันอาจแบ่งองุ่นออกเป็น 3 สายพันธุ์ใหญ่ๆ ได้แก่ สายพันธุ์ยุโรป (*Vitis vanisfera*) สายพันธุ์อเมริกาเหนือ (*Vitis labrusca* และ *Vitis rotundifolia*) สายพันธุ์ลูกผสมฝรั่งเศส (Xia et al., 2010)

องุ่นเป็นผลไม้ที่มีการเพาะปลูกอย่างกว้างขวางทั่วโลกและมีการนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ มากมาย เป็นพืชที่ประกอบด้วยสารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น วิตามิน แร่ธาตุ

ไฟเบอร์ รวมทั้งสารพฤกษเคมี เช่น สารประกอบฟลาโวนอยด์ โพลีฟีนอล โพรแอนโทไซยานิน แอนโทไซยานิน

จากการศึกษาของ Cantos และคณะในปี ค.ศ. 2002 พบว่าส่วนเปลือกของงุ่นประกอบด้วยสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ กรดไฮโดรซินิก สารฟลาโวนอล โอลิโกเมอริก โพรแอนโทไซยานิน และสารแอนโทไซยานิน เช่นเดียวกับการศึกษาของ Mattivi และคณะในปี ค.ศ. 2006 พบว่า เปลือกของงุ่นแดงมีสารสำคัญคือ แอนโทไซยานินและสารฟลาโวนอลส์ ซึ่งสารฟลาโวนอลส์ประกอบด้วย quercetin (43.99%), myricetin (36.81%), kaempferol (6.43%), laricitrin (5.65%), isorhamnetin (3.89%), syringetin (3.22%) และ isorhamnetin (1.74%) ส่วนแอนโทไซยานินที่พบ ได้แก่ 3-glucosides, 3-acetyl-glucosides, 3-coumaroyl-glucosides, 3-caffeoyl-glucosides, 3,5-diglucosides, 3-acetyl-5-diglucosides, 3-coumaroyl-5-diglucosides, 3-caffeoyl-5-diglucosides of cyanidin, delphinidin, peonidin, petunidin, และ malvidin (Anderson et al., 1970)

ประโยชน์ของงุ่นต่อร่างกาย

1. ด้านอนุมูลอิสระ

งุ่นมีคุณสมบัติเป็นตัวดักจับอนุมูลอิสระ สามารถยับยั้งปฏิกิริยาไลโปเปอร์ออกซิเดชันได้ และสามารถลดการเกิดอนุมูลไฮดรอกซิลได้ มีรายงานว่า สารสกัดจากงุ่นสามารถลดการเกิดภาวะ oxidative stress ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้เกิดจากงุ่นมีสารพฤกษเคมีคือ สารประกอบฟีนอลิกซึ่งมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ สามารถพบได้แทบทุกส่วนของงุ่น (Xia et al., 2010)

2. ระบบหลอดเลือดและหัวใจ

งุ่นช่วยลดการเกิดภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด ลดโอกาสเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็งตัว โดยจะช่วยป้องกันการเกิดภาวะไขมันในเลือดสูง ช่วยลดไลโปโปรตีนชนิด LDL ในขณะที่เพิ่มปริมาณของไลโปโปรตีนชนิด HDL (Dell et al., 2005) รวมทั้งช่วยป้องกันการเกาะรวมกันของเกล็ดเลือด ช่วยให้หลอดเลือดคลายตัวโดยทำให้เซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดเพิ่มการสร้างและหลั่งไนตริกออกไซด์ (Falchi et al., 2006)

3. ด้านมะเร็ง

จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าสารสกัดจากเปลือกองุ่นสามารถเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากได้ (Hudson et al., 2007) และ ช่วยป้องกันการเกิด angiogenesis ในเซลล์มะเร็งได้ (Yi et al., 2005)

4. ด้านการอักเสบ

สารประกอบฟีนอลิกในองุ่น สามารถยับยั้งการปล่อย proinflammatory factors และมีคุณสมบัติเป็น immunomodulators (Panico et al., 2006)

5. ด้านจุลชีพ

สารประกอบฟีนอลิกในองุ่นสามารถต้านเชื้อต่างๆ เช่น *Escherichia coli* (Rodriguez-Vaguero et al., 2007) เชื้อ *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* และเชื้อ *Candida albicans* (Radovanovic et al., 2009)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. สารสกัดจากเปลือกของงุ่นแดง

สารสกัดจากเปลือกของงุ่นแดงได้รับมาจากบริษัท Breko GmbH (Bremen , Germany)

2. สารเคมี

2.1 การวิเคราะห์สารพิษเคมีของสารสกัดจากงุ่น

- | | | |
|-------|------------------------------------|------------------------------|
| 2.1.1 | Folin–Ciocalteu’s phenol reagent | (Fluka, Switzerland) |
| 2.1.2 | Aluminium chloride | (Merck, Germany) |
| 2.1.3 | Gallic acid | (Fluka, Switzerland) |
| 2.1.4 | Sodium nitrite (NaNO_2) | (Sigma Chemical Co., U.S.A.) |
| 2.1.5 | Catechin | (Sigma Chemical Co., U.S.A.) |
| 2.1.6 | Vanillin | (Merck, Germany) |

2.2 การทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

- | | | |
|--------|---|------------------------------|
| 2.2.1 | 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) | (Sigma Chemical Co., U.S.A.) |
| 2.2.2 | 2,2-azinobis3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) | (Sigma Chemical Co., U.S.A.) |
| 2.2.3 | Potassium persulfate ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) | (Merck, Germany) |
| 2.2.4 | 2,4,6- tripyridyl-S-triazine (TPTZ) | (Sigma Chemical Co., U.S.A.) |
| 2.2.5 | Iron (III) chloride (FeCl_3) | (Merck, Germany) |
| 2.2.6 | Tris-HCl | (Merck, Germany) |
| 2.2.7 | Trichloroacetic acid (TCA) | (Sigma Chemical Co., U.S.A.) |
| 2.2.8 | Thiobarbituric acid (TBA) | (Sigma Chemical Co., U.S.A.) |
| 2.2.9 | Iron sulfate (FeSO_4) | (Sigma Chemical Co., U.S.A.) |
| 2.2.10 | Xanthine | (Sigma Chemical Co., U.S.A.) |

- 2.2.11 Xanthine oxidase (Sigma Chemical Co., U.S.A.)
 2.2.12 EDTA (Merck, Germany)

2.3 การทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งปฏิกิริยาไกลโคซิเลชันใน BSA

- 2.3.1 Bovine serum albumin (BSA) (Fisher, U.S.A.)
 2.3.2 Fructose (Fluka, Switzerland)
 2.3.3 Nitroblue tetrazolium (NBT) (Sigma Chemical Co., U.S.A.)
 2.3.4 1-deoxy-1 morpholinofructose (DMF) (Sigma Chemical Co., U.S.A.)
 2.3.5 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) (Sigma Chemical Co., U.S.A.)
 2.3.6 Ethyl acetate (Merck, Germany)
 2.3.7 Trichloroacetic acid (TCA) (Sigma Chemical Co., U.S.A.)
 2.3.8 Ethanol (Merck, Germany)
 2.3.9 Thioflavin T reagent (Sigma Chemical Co., U.S.A.)
 2.3.10 Congo red reagent (Sigma Chemical Co., U.S.A.)
 2.3.11 5, 5'-dithiobisnitro benzoic acid (DTNB) (Sigma Chemical Co., U.S.A.)
 2.3.12 L-cysteine (Sigma Chemical Co., U.S.A.)
 2.3.13 N^ε -(carboxymethyl)lysine (CML) test kit (Cell Biolabs Inc., U.S.A)

3. เครื่องมือ

- 3.1.1 Spectrofluorometer (BioTek, SynergyTx, U.S.A.)
 3.1.2 UV-vis spectrophotometer (Shimadzu UV-160A, Japan)
 3.1.3 Vortex mixer (Gemmy industrial, Taiwan)
 3.1.4 Centrifuge (Heraeus, Biofuge 22R, Germany)
 3.1.5 Analytical balance (Sartorius, Germany)
 3.1.6 Water bath (Grant, England)
 3.1.7 Cuvette (Bibby sterilin)
 3.1.8 Autopipets (Gilson, France)
 3.1.9 pH meter (Hanna, Italy)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การวิเคราะห์สารพฤกษเคมีของสารสกัดจากงุ่น

1.1 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

เป็นวิธีตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetry โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลิกคำนวณได้จากกราฟมาตรฐานของสาร gallic acid รายงานผลเป็น mg gallic acid/g dried extract (Slinkard and Singleton, 1977)

- 1.1.1 Folicin – ciocalteu reagent (FCR) reagent (dilute 1:10 v/v)
นำ FCR มา 3 ml เติมลงในน้ำกลั่น 30 ml
- 1.1.2 7.5% Na_2CO_3
ชั่งสาร Na_2CO_3 หนัก 3.75 g ลงในน้ำกลั่น 50 ml
- 1.1.3 เตรียมสารสกัดจากเปลือกงุ่นแดงที่ความเข้มข้น 1 mg/ml (ทำ 3 ซ้ำ)
- 1.1.4 เตรียม gallic acid (สารมาตรฐาน) ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml (ทำ 3 ซ้ำ)
- 1.1.5 เติมสารละลายมาตรฐาน หรือสารสกัดจากเปลือกงุ่นแดง 0.5 ml (กลุ่ม control เติมน้ำกลั่นแทนสารทดสอบ)
- 1.1.6 เติมสาร FCR 2.5 ml
- 1.1.7 เติมสาร Na_2CO_3 2.0 ml
- 1.1.8 Incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที
- 1.1.9 วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร
- 1.1.10 หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารทดสอบ โดยเปรียบเทียบค่าที่วัด
ได้กับกราฟมาตรฐานที่ได้จาก gallic acid

1.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์

เป็นวิธีตรวจสอบปริมาณของสารฟลาโวนอล และฟลาโวนอลส์ ซึ่งเป็นสารประเภทหนึ่งในกลุ่มของสารฟลาโวนอยด์ ด้วยวิธี aluminium chloride colorimetry อ่านน้ำหนักโดยใช้สาร catechin ในการทำกราฟมาตรฐาน รายงานผลเป็น mg catechin/g dried extract (Zhishen et al., 1999)

- 1.2.1 เตรียม 15 % NaNO_2
ซึ่งสาร NaNO_2 หนัก 0.75 g ลงในน้ำกลั่น 5 ml
- 1.2.2 เตรียม 10 % $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
ซึ่งสาร $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ หนัก 0.5 g ลงในน้ำกลั่น 5 ml
- 1.2.3 เตรียม 4% NaOH
ซึ่งสาร NaOH หนัก 2 g ลงในน้ำกลั่น 50 ml
- 1.2.4 เตรียมสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงที่ความเข้มข้น 1 mg/ml (ทำ 3 ซ้ำ)
- 1.2.5 เตรียม catechin (สารมาตรฐาน) ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml (ทำ 3 ซ้ำ)
- 1.2.6 เติมสารละลายมาตรฐาน หรือสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง 0.5 ml (กลุ่ม control เติมน้ำกลั่นแทนสารทดสอบ)
- 1.2.7 เติมสาร NaNO_2 0.15 ml
- 1.2.8 เติมสาร AlCl_3 0.15 ml
- 1.2.9 เติมสาร NaOH 2 ml
- 1.2.10 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 5 ml
- 1.2.11 Incubate ที่อุณหภูมิห้องนาน 6 นาที
- 1.2.12 วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร
- 1.2.13 หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ในสารทดสอบ โดยเปรียบเทียบค่าที่วัดได้กับกราฟมาตรฐานที่ได้จาก catechin

1.3 การวิเคราะห์หาปริมาณสาร condensed tannin

เป็นวิธีตรวจสอบปริมาณสาร condensed tannin ด้วยวิธี vanillin-HCl อ่านน้ำหนักจากกราฟมาตรฐานของสาร catechin รายงานผลเป็น mg catechin/g dried extract (Brodhurst and Jones, 1978)

- 1.3.1 vanillin reagent (4% w/v in methanol)
ซึ่งสาร vanillin หนัก 1.2 g ลงใน methanol 30 ml
- 1.3.2 เตรียมสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงที่ความเข้มข้น 1 mg/ml โดยทำละลายใน methanol (ทำ 3 ซ้ำ)
- 1.3.3 เตรียม catechin (สารมาตรฐาน) ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml โดยทำละลายใน methanol (ทำ 3 ซ้ำ)
- 1.3.4 เติมสารละลายมาตรฐาน หรือสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง 0.25 ml (กลุ่ม control เติม methanol แทนสารทดสอบ)
- 1.3.5 เติมสาร vanillin reagent 1.5 ml
- 1.3.6 เติมสาร 37% HCl ปริมาตร 0.75 ml
- 1.3.7 incubate ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3-4 วินาที
- 1.3.8 วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร
- 1.3.9 หาปริมาณสารแทนนินในสารทดสอบ โดยเปรียบเทียบค่าที่วัดได้กับกราฟมาตรฐานที่ได้จาก catechin

1.4 การวิเคราะห์หาปริมาณสารแอนโทไซยานิน

ตรวจสอบปริมาณสารประกอบแอนโทไซยานินทั้งหมดด้วยวิธี pH-differential method โดยแอนโทไซยานินจะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเมื่อค่าความเป็นกรดต่างเปลี่ยนแปลงไป กล่าวคือ เมื่อมีค่า pH 1 สีของแอนโทไซยานินจะออกเป็นสีแดง สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ในขณะที่ pH 4.5 จะอยู่ในสภาพ colorless โดยจะเห็นเป็นสีของสารและตัวทำละลายเท่านั้น ในขณะที่แอนโทไซยานินที่ถูกทำลายโครงสร้าง จะมีการดูดกลืนแสงได้ทั้งใน pH 1 และ pH 4.5 โดยใช้ cyanidin-3-glucoside เป็นสารมาตรฐาน รายงานผลเป็น mg cyanidin-3-glucoside /g dried extract (Fuleki and Francis, 1968)

- 1.4.1 เตรียม acidic methanol containing 2% 12.0 M HCl (v/v)
เติม 12.0 M hydrochloric acid 200 ul ลงใน methanol 9.8 ml

- 1.4.2 0.025 M potassium chloride (pH 1.0)
- 1.4.3 ชั่ง potassium chloride (MW= 74.551) 0.186 g ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 98 ml แล้วปรับค่า pH 1.0
- 1.4.4 0.4 M sodium acetate (pH 4.5)
ชั่ง sodium acetate (MW= 82.03) 0.544 g ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 96 ml แล้วปรับค่า pH 4.5
- 1.4.5 เตรียมสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงที่ความเข้มข้น 1 mg/ml โดยทำละลายใน acidic methanol ข้อ 3.3.1 (ทำ 3 ขั้ว)
- 1.4.6 เติมสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงจากข้อ 3.3.5 ปริมาณ 0.1 ml ลงใน potassium chloride buffer (pH 1.0) 2.9 ml
- 1.4.7 เติมสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงจากข้อ 3.3.5 ปริมาณ 0.1 ml ลงใน sodium acetate buffer (pH 4.5) 2.9 ml
- 1.4.8 Incubate ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที
- 1.4.9 นำสารจากข้อ 3.3.6 และ 3.3.7 มาวัดที่ความยาวคลื่น 510 และ 700 นาโนเมตร
- 1.4.10 นำค่าความยาวคลื่นที่ได้มาคำนวณหาค่าแอนโธไซยานิน

1.4.10.1 หาค่า absorbance (A)

$$A = (A_{510\text{nm}, \text{pH}1} - A_{700\text{nm}, \text{pH}1}) - (A_{510\text{nm}, \text{pH}4.5} - A_{700\text{nm}, \text{pH}4.5})$$

1.4.10.2 หาค่า anthocyanin concentration (C) (mg/l)

$$C \text{ (mg/L)} = \frac{A \times \text{M.W.} \times \text{dilution factor (DF)} \times 1000}{\epsilon \times 1}$$

กำหนดให้

ϵ = molar absorptivity (26,900)

M.W.cyanidin-3-glucoside = 449.2 g/mol

DF=30

1.4.10.3 หาค่า anthocyanins concentration (mg/g grape extract)

Anthocyanins (mg/g grape extract) = C (mg/L)/ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารทดสอบ

2. การทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

2.1 วิธี DPPH radical scavenging activity

เป็นวิธีทดสอบการยับยั้งอนุมูลอิสระของตัวทดสอบที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยอาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยา hydrogen atom transfer (HAT) ระหว่างอนุมูลอิสระคือ DPPH (2, 2 – diphenyl - 1 - picrylhydrazyl) และสารต้านอนุมูลอิสระที่ต้องการทดสอบที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของ DPPH จากสีม่วงเป็นสีเหลือง ซึ่งการทดสอบวิธีนี้จะวัดค่าการดูดกลืนแสงที่เกิดขึ้นจากความเข้มข้นต่างๆของสารต้านอนุมูลอิสระ โดยกำหนดความยาวคลื่นที่ 515 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาหาค่า% inhibition และ IC_{50} ต่อไป (Blois et al., 1958)

2.1.1 0.2 mM DPPH

ซึ่ง DPPH (M.W. = 394.4) 3.95 mg ใส่ลงใน ethanol 50 ml

2.1.2 เตรียมสารสกัดจากเปลือกของงุ่นแดงที่ความเข้มข้น 0 – 0.1 mg/ml (0, 0.0125, 0.025, 0.05 และ 0.1 mg/ml) (ทำ 3 ซ้ำ)

2.1.3 เตรียม ascorbic acid (สารมาตรฐาน) ที่ความเข้มข้น 0 – 0.1 mg/ml (0, 0.0125, 0.025, 0.05 และ 0.1 mg/ml) (ทำ 3 ซ้ำ)

2.1.4 เติมสาร DPPH ในข้อ 2.1.1 ปริมาณ 0.5 ml

2.1.5 เติมสารละลายมาตรฐาน หรือสารทดสอบในแต่ละความเข้มข้น ปริมาณ 0.5 ml (กำหนด control คือสารละลาย DPPH + น้ำกลั่น)

2.1.6 ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

2.1.7 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV – vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร

2.1.8 นำค่าที่วัดได้ในแต่ละความเข้มข้นมาคำนวณ % inhibition จากสมการ

$$\% \text{ Radical scavenging} = [(AB - AA) / AB] \times 100$$

เมื่อ AA = absorbance ที่วัดได้ของสารตัวอย่าง + DPPH radical

AB = absorbance ที่วัดจากน้ำกลั่น + DPPH radical (control)

2.1.9 สร้างกราฟระหว่างค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานหรือสารสกัดจากเปลือกของงุ่นแดง (แกน x) และ% inhibition (แกน y) เพื่อหาค่า IC_{50} ในการเปรียบเทียบความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระระหว่างสารทดสอบกับสารละลายมาตรฐาน

2.2 วิธี trolox equivalent antioxidant capacity assay (TEAC)

เป็นวิธีการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยการใช้สาร ABTS (2, 2-azinobis (3-ethyl benzothiazoline- 6- sulfonic acid) diamoniumsalt) ทำปฏิกิริยากับ potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) ได้เป็น $ABTS^{\cdot+}$ ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระ มีสีเขียวเข้มและสามารถเกิดปฏิกิริยา hydrogen atom transfer (HAT) ได้เมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไป ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจากสีเขียวเข้มเป็นไม่มีสี จากนั้นนำค่าที่อ่านได้มาหาค่า IC_{50} และนำไปอ่านน้ำหนักจากกราฟมาตรฐานของ trolox เพื่อหาค่า trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) (Madhujith et al., 2006)

2.2.1 7 mM ABTS

ชั่ง ABTS (M.W. = 514.62) 74.43 mg ใน 0.1 M PBS (pH 7.4) 20 ml

2.2.2 2.45 mM $K_2S_2O_8$

ชั่ง $K_2S_2O_8$ (M.W. = 270.322) 13.2 mg ในน้ำกลั่น 20 ml

2.2.3 เตรียมสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงที่ความเข้มข้น 0 – 4 mg/ml (0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 3 และ 4 mg/ml) (ทำ 3 ซ้ำ)

2.2.4 เตรียม trolox (สารมาตรฐาน) ที่ความเข้มข้น 0 – 1 mg/ml (0, 0.125, 0.25, 0.5 และ 1 mg/ml) (ทำ 3 ซ้ำ)

2.2.5 ผสมสารละลายข้อ 2.2.1 และ 2.2.2 ด้วยอัตราส่วน 1:1 และเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อให้ ABTS เปลี่ยนเป็น $ABTS^{\cdot+}$

2.2.6 วัดค่าการดูดกลืนแสงของ $ABTS^{\cdot+}$ ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร แล้วทำการปรับให้ค่าอยู่ในช่วง 0.700 (\pm 0.020) ด้วย PBS

2.2.7 เติมสารทดสอบ $ABTS^{\cdot+}$ ในข้อ 2.2.6 ปริมาตร 0.99 ml

2.2.8 เติมสารละลายมาตรฐาน หรือสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงในแต่ละความเข้มข้น ปริมาณ 0.5 ml (กำหนด control คือสารละลาย $ABTS^{\cdot+}$ + น้ำกลั่น)

2.2.9 ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 6 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

2.2.10 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV – vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 734 nm

2.2.11 นำค่าที่วัดได้ในแต่ละความเข้มข้นมาคำนวณ % inhibition จากสมการ

$$\% \text{Radical Scavenging} = [(AB - AA) / AB] \times 100$$

เมื่อ AA = absorbance ที่วัดได้ของสารตัวอย่าง + ABTS^{o+} radical

AB = absorbance ที่วัดจากน้ำกลั่น + ABTS^{o+} radical (control)

2.2.12 สร้างกราฟระหว่างค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน หรือสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง (แกน x) และ % inhibition (แกน y) เพื่อหาค่า IC₅₀ ในการเปรียบเทียบความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระระหว่างสารทดสอบกับสารละลายมาตรฐาน

2.3 วิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP)

เป็นการวัดความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระที่อยู่ในสารตัวอย่าง โดยอาศัยหลักการที่ ferric (Fe³⁺) รับอิเล็กตรอน (e⁻) จากสารต้านอนุมูลอิสระแล้วกลายเป็น ferrous (Fe²⁺) จากการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ Fe³⁺ โดยเริ่มจากการทำ ferric tripyridyltriazine (Fe³⁺-TPTZ) complex ซึ่งเป็นสารละลายไม่มีสี เมื่อถูกรีดิวซ์ด้วยสารต้านอนุมูลอิสระจะกลายเป็น ferrous tripyridyl-s-triazine (Fe²⁺-TPTZ) complex ซึ่งเป็นสารละลายสีม่วงน้ำเงิน นั่นคือ ถ้าตัวอย่างที่ทดสอบมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้สูง จะเกิด Fe²⁺-TPTZ มากทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร มีค่ามากขึ้น จากนั้นนำค่าที่อ่านได้มาหาค่า EC (Equivalent concentration) จากสารมาตรฐาน ferrous sulfate (FeSO₄) 1 mM (Benzie and Strain, 1996)

2.3.1 เตรียมสารละลาย FRAP

2.3.1.1 เตรียม sodium acetate buffer solution (0.3 M, pH 3.6)

ซึ่ง sodium acetate trihydrate 0.15 g ละลายใน acetic acid ปริมาตร 0.8 ml แล้วเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 50 ml

2.3.1.2 เตรียม 10 mM 2,4,6- tripyridyl-S-triazine (TPTZ)

ซึ่ง 2,4,6- tripyridyl-S-triazine (TPTZ) 0.0312 g ละลายใน 40 mM HCl (37% HCl 0.123 ml ในน้ำกลั่น 100 ml) 10 ml

2.3.1.3 เตรียม 20 mM FeCl₃

ซึ่ง FeCl₃ 54 mg เติมน้ำกลั่น 10 ml

2.3.1.4 ผสมสารข้อ 2.3.1.1-2.3.1.3 และต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนการ

วิเคราะห์ โดยใช้ปริมาตร 25, 2.5 และ 2.5 ml ตามลำดับ

- 2.3.2 เตรียมสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงที่ความเข้มข้น 0 - 1 mg/ml (0, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 และ 1 mg/ml) (ทำ 3 ซ้ำ)
- 2.3.3 เตรียม FeSO_4 (สารมาตรฐาน) ที่ความเข้มข้น 0.1 – 0.8 mM (0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 และ 0.8 mM) (ทำ 3 ซ้ำ)
- 2.3.4 เติมสารละลาย FRAP ในข้อ 2.3.1 ปริมาณ 1.8 ml
- 2.3.5 เติมสารละลายมาตรฐาน หรือสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงในแต่ละความเข้มข้น ปริมาณ 0.2 ml (กำหนด control คือสารละลาย FRAP + น้ำกลั่น)
- 2.3.6 ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
- 2.3.7 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV – vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร
- 2.3.8 นำค่าที่วัดได้ในแต่ละความเข้มข้นมาคำนวณหาค่า equivalent concentration (EC) โดยนำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงที่ได้มาอ่านจากกราฟมาตรฐานของสาร FeSO_4 เพื่อเปรียบเทียบกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารทดสอบกับ 1mM FeSO_4 (pulido et al., 2000)

2.4 วิธีทดสอบหา hydroxyl radical scavenging activity

เป็นการทดสอบความสามารถในการขจัดอนุมูลไฮดรอกซิล (OH^\cdot) ของสารทดสอบ โดยทำการสังเคราะห์อนุมูลไฮดรอกซิลจากปฏิกิริยาเฟนตัน จากนั้นอนุมูลไฮดรอกซิลจะเข้าไปทำให้น้ำตาลดีออกซีไรโบสเสียหาย แล้วเกิดเป็นสารอัลดีไฮด์ขึ้นมา ซึ่งสามารถทดสอบได้ด้วยการเติม thiobarbituric acid (TBA) และ trichloroacetic acid (TCA) จะเกิดเป็นสีชมพูของสารประกอบเชิงซ้อน TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) ถ้าในสารทดสอบมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลไฮดรอกซิลก็จะทำให้สีชมพูของ TBARS จางลง รายงานผลเป็นค่า IC_{50} (Halliwell et al., 1987)

- 2.4.1 เตรียม 0.3 mM FeCl_3
ซึ่งสาร FeCl_3 (MW=162.2) 7.26 mg ละลายใน potassium phosphate buffer 10 ml
- 2.4.2 เตรียม 0.6 mM ascorbic acid
ซึ่งสาร ascorbic acid (MW= 176.12) 15.77 mg ละลายใน potassium phosphate buffer 10 ml

- 2.4.3 เตรียม 1.2 mM EDTA
 ชั่งสาร EDTA (MW= 292.24) 106 mg ละลายใน
 potassium phosphate buffer 10 ml
- 2.4.4 เตรียม 34 mM hydrogenperoxide solution (H₂O₂)
 ดูดสาร 30% hydrogenperoxide (8.82 M) มา 38.54 ul ลงในน้ำกลั่น 10 ml
- 2.4.5 เตรียม 17 mM deoxyribose
 ชั่ง deoxyribose (MW= 134.13) 34 mg ละลายใน
 potassium phosphate buffer 1 ml
- 2.4.6 เตรียม TCA (2.8% w/v)
 ชั่งสาร TCA 0.28 g ละลายในน้ำกลั่น 10 ml
- 2.4.7 เตรียม TBA (1% ใน NaOH 0.05 M)
 ชั่งสาร TBA 0.3 g ละลายใน NaOH 0.06 g ในน้ำกลั่น 30 ml
- 2.4.8 เตรียมสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงที่ความเข้มข้น 0 - 30 mg/ml
 (0, 0.5, 1, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 mg/ml) (ทำ 3 ซ้ำ)
- 2.4.9 เตรียม trolox (สารมาตรฐาน) ที่ความเข้มข้น 0 – 7 mg/ml
 (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 mg/ml) (ทำ 3 ซ้ำ)
- 2.4.10 ผสมสารละลายข้อ 2.4.1 - 2.4.5 ปริมาณ 67, 67, 33, 33 และ 33 ul
 ตามลำดับ
- 2.4.11 เติมสารละลายมาตรฐาน หรือสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงในแต่ละความ
 เข้มข้น ปริมาณ 33 ul (กลุ่ม control เติมน้ำกลั่นแทนสารทดสอบ)
- 2.4.12 Incubate ที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมง ในที่มืด
- 2.4.13 เติม TCA ในข้อ 2.4.6 ปริมาณ 0.33 ml
- 2.4.14 เติม TBA ในข้อ 2.4.7 ปริมาณ 0.33 ml
- 2.4.15 incubate ที่ 100 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที
- 2.4.16 วัดค่าการดูดกลืนแสงของ TBARS ที่ความยาวคลื่น 522 นาโนเมตร
- 2.4.17 นำค่าที่วัดได้แต่ละความเข้มข้นมาคำนวณ % inhibition จากสมการ

$$\% \text{ Radical scavenging} = [(AB - AA) / AB] \times 100$$

เมื่อ AA = absorbance ที่วัดได้ของสารตัวอย่าง + OH[•] radical

AB = absorbance ที่วัดจากน้ำกลั่น + OH[•] radical (control)

- 2.4.18 สร้างกราฟระหว่างค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน หรือสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง (แกน x) และ% inhibition (แกน y) เพื่อหาค่า IC_{50} ในการเปรียบเทียบความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระระหว่างสารทดสอบกับสารละลายมาตรฐาน

2.5 วิธีทดสอบหา superoxide radical scavenging activity

การทดสอบนี้ประยุกต์มาจากวิธีการทดลองของ Kweon และคณะในปีค.ศ.2001 เป็นการศึกษาถึงฤทธิ์การขจัดอนุมูลอิสระ ซุปเปอร์ออกไซด์ anion radical (O_2^-) ของสารทดสอบ ซึ่ง O_2^- มาจากปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ xanthine oxidase ในการเปลี่ยนสาร xanthine ให้เป็นกรดยูริก โดย O_2^- ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับ NBT (nitroblue tetrazolium) และให้ผลิตภัณฑ์เป็นสาร diformazan (DF) ที่มีสีม่วง ถ้าในสารทดสอบมีความสามารถในการยับยั้ง O_2^- จะทำให้สีม่วงของสารละลายจางลง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร รายงานผลเป็นค่า IC_{50} (Kweon et al., 2001)

- 2.5.1 เตรียม 0.3 mM xanthine
ซึ่ง xanthine (MW=152.11) 4.56 mg ละลายใน potassium phosphate buffer 50 ml
- 2.5.2 เตรียม 0.15 mM NBT
ซึ่ง NBT (MW= 817.64) 4.9 mg ละลายใน potassium phosphate buffer 10 ml
- 2.5.3 เตรียม 0.6 mM EDTA
ซึ่งสาร EDTA (MW= 292.24) 7 mg ละลายใน potassium phosphate buffer 10 ml
- 2.5.4 เตรียม xanthine oxidase 0.5 unit/ml
นำ xanthine oxidase (5 unit/ml) 0.1 ml ลงใน potassium phosphate buffer 0.9 ml
- 2.5.5 เตรียม 2 M HCl
นำสาร 37% HCl 3.65ml ลงน้ำกลั่น 46.35 ml
- 2.5.6 เตรียมสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงที่ความเข้มข้น 0 - 5 mg/ml (0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4 และ 5 mg/ml) (ทำ 3 ซ้ำ)

- 2.5.7 เตรียม trolox (สารมาตรฐาน) ที่ความเข้มข้น 0 – 2 mg/ml
(0, 0.125, 0.25, 0.5, 1 และ 2 mg/ml) (ทำ 3 ซ้ำ)
- 2.5.8 ผสมสารละลายข้อ 2.5.1 - 2.5.3 ปริมาณ 0.5, 0.25 และ 0.25 ml ตามลำดับ
- 2.5.9 เติมสารละลายมาตรฐาน หรือสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงในแต่ละความเข้มข้น ปริมาณ 0.05 ml (กลุ่ม control เติมน้ำกลั่นแทนสารทดสอบ)
- 2.5.10 เติม xanthine oxidase ในข้อ 2.5.4 ปริมาณ 0.05 ml
- 2.5.11 Incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที
- 2.5.12 เติม 2 M HCl ในข้อ 2.5.5 ปริมาณ 0.05 ml
- 2.5.13 incubate ที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
- 2.5.14 วัดการเกิดสีของ NBT-diformazan ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร
- 2.5.15 นำค่าที่วัดได้ในแต่ละความเข้มข้นมาคำนวณ % inhibition จากสมการ

$$\% \text{ Radical scavenging} = [(AB - AA) / AB] \times 100$$

เมื่อ AA = absorbance ที่วัดได้ของสารตัวอย่าง + O_2^- radical

AB = absorbance ที่วัดจากน้ำกลั่น + O_2^- radical (control)

- 2.5.16 สร้างกราฟระหว่างค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน หรือสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง (แกน x) และ % inhibition (แกน y) เพื่อหาค่า IC_{50} ในการเปรียบเทียบความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระระหว่างสารทดสอบกับสารละลายมาตรฐาน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.6 วิธีทดสอบหา ferrous ion chelating power

เป็นการวัดความสามารถในการแย่งจับกับโลหะ โดยธาตุเหล็กที่อยู่ในรูป ferrous หรือ Fe^{2+} ทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับออกซิเจนในอากาศ เกิดเป็น Fe^{3+} ซึ่งปฏิกิริยานี้สามารถเกิดแบบย้อนกลับได้เช่นกัน ในการทดสอบของวิธีนี้จึงเป็นการวัดความสามารถในการแย่งจับโลหะ Fe^{2+} ของสารทดสอบ โดยเมื่อเติมสาร 2,2'-bipyridyl ลงไป สารนี้จะไปจับกับ Fe^{2+} แล้วอยู่ในรูป 2,2'-bipyridyl- Fe^{2+} complex ซึ่งให้สีแดง ถ้าสารทดสอบมีความสามารถในการแย่งจับโลหะ Fe^{2+} ได้ก็จะเกิดเป็น antioxidant- Fe^{2+} complex แทน และทำให้สีแดงของ 2,2'-bipyridyl - Fe^{2+} complex จางลง วัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ 522 นาโนเมตร รายงานผลเป็นค่า IC_{50} (Yamaguchi et al., 2001)

2.6.1 เตรียม 0.1M Tris-HCl buffer (pH 7.4) 200 ml

2.1.1.1 ชั่งสาร Tris (hydroxymethyl) aminomethane
(MW= 121.14) 1.2 g ละลาย ในน้ำกลั่น 100 ml

2.1.1.2 นำสาร 37% HCl มา 0.3 ml ลงน้ำกลั่น 84 ml

1.6.2 0.1% 2,2'- bipyridal in 0.2 M HCl (2,2'-bipyridyl solution)

ชั่งสาร 2,2'- bipyridyl 0.1 g ใน 0.2 M HCl 100ml
(37% HCl 0.73 ml ในน้ำกลั่น 100 ml)

2.6.3 เตรียม 1mM $FeSO_4$ (MW= 278.05)

ชั่ง $FeSO_4$ (MW= 278.05) 0.556 g ละลายในน้ำ 100 ml

2.6.4 เตรียม 10% (w/v) hydroxylamine-HCl

ชั่งสาร hydroxylamine-HCl 1 g ละลายในน้ำกลั่น 10 ml

2.6.5 เตรียมสารสกัดจากเปลือกของงุ่นแดงที่ความเข้มข้น 0 - 5 mg/ml

(0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4 และ 5 mg/ml) (ทำ 3 ซ้ำ)

2.6.6 เตรียม EDTA (สารมาตรฐาน) ที่ความเข้มข้น 0 - 3 mg/ml

(0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 และ 3 mg/ml) (ทำ 3 ซ้ำ)

2.6.7 ผสมสารละลายข้อ 2.5.1 - 2.5.3 ปริมาณ 1, 1 และ 0.25 ml

ตามลำดับ

- 2.6.8 เติมสารละลายมาตรฐาน หรือสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงในแต่ละความเข้มข้น ปริมาณ 0.25 ml (กลุ่ม control เติมน้ำกลั่นแทนสารทดสอบ)
- 2.6.9 เติม hydroxylamine-HCl ในข้อ 2.6.5 ปริมาณ 0.4 ml
- 2.6.10 เติม ethanol ลงไป 1.5 ml
- 2.6.11 เติมน้ำกลั่นให้ครบ 5 ml
- 2.6.12 วัดการเกิดสีของ 2,2'-bipyridyl - Fe^{2+} complex ที่ความยาวคลื่น 522 นาโนเมตร
- 2.6.13 นำค่าที่วัดได้ในแต่ละความเข้มข้นมาคำนวณ % inhibition จากสมการ

$$\% \text{ Radical scavenging} = [(AB - AA) / AB] \times 100$$

เมื่อ AA = absorbance ที่วัดได้ของสารตัวอย่าง + Fe^{2+}

AB = absorbance ที่วัดจากน้ำกลั่น + Fe^{2+} (control)

- 2.6.14 สร้างกราฟระหว่างค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน หรือสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง (แกน x) และ % inhibition (แกน y) เพื่อหาค่า IC_{50} ในการเปรียบเทียบความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระระหว่างสารทดสอบกับสารละลายมาตรฐาน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเกิดกระบวนการไกลเคชันใน BSA

การเหนี่ยวนำให้เกิดAGEs

เตรียม BSA ที่ความเข้มข้น 10 mg/ml และฟรุกโตสที่ความเข้มข้น 1.1 M จากนั้นเติมสารทดสอบโดยเตรียมสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.03 – 1 mg/ml ละลายใน 0.1 M phosphate buffer saline หรือ PBS (pH 7.4) กำหนดให้หลอดทดลองที่มีเพียง BSA และ ฟรุกโตสเป็น negative control และหลอดทดลองที่มียา aminoguanidine ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.25 – 1 mg/ml เป็น positive control ส่วนกลุ่มควบคุมใช้ PBS แทน BSA ในการทดสอบ

เมื่อเตรียมสารทดลองในแต่ละกลุ่มแล้ว นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 7, 14, 21 และ 28 วันตามลำดับ (เตรียมกลุ่มการทดลองออกเป็น 5 ชุดตามระยะเวลาการ incubate) โดยแต่ละชุดการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง เมื่อครบกำหนดการ incubate ของแต่ละชุดแล้ว นำสารในหลอดทดลองมาตรวจวัดผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการไกลเคชันต่อไป

3.1 การวัดปริมาณการเกิด AGEs ชนิดเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์

(Tupe and Agte, 2009)

3.1.1 ดูดสาร glycated BSA มา 50 ul ลง 96 well plate

3.1.2 วัดค่าการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ด้วยเครื่อง spectrofluorometer กำหนดค่า excitation 355 นาโนเมตร และค่า emission 460 นาโนเมตร

3.1.3 นำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AGEs จากสูตร

$$\% \text{ inhibition} = \left[1 - \frac{(\text{Abs}_{\text{sample}})}{(\text{Abs}_{\text{blank}})} \right] \times 100$$

3.2 การวัดค่าการเกิดสารกลุ่มโปรตีน carbonyl

เป็นการทดสอบการเกิดปฏิกิริยา glycoxidation ด้วยการวัดปริมาณโปรตีน carbonyl ที่เกิดขึ้น โดยใช้สาร 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร (UV-VIS spectrophotometer) แล้วนำค่าที่ได้มาแปลผลเป็นความเข้มข้นของโปรตีน carbonyl ที่หน่วย nmol carbonyl/mg protein (Ardestani and Yazdanparast, 2007)

3.2.1 การหาค่า protein carbonyl (carbonyl nmol/ml)

- 3.2.1.1 ดูดสาร glycated BSA มา 200 ul ลง eppendorf tube ขนาด 2 ml
- 3.2.1.2 เติมสาร 10mM DNPH ใน 2.5 M HCl ลงไป 800 ul
(กลุ่ม control เติมสาร 2.5 M HCl แทน DNPH)
- 3.2.1.3 Incubate ในที่มีดที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมงโดยทำการ vortex ทุก 15 นาที
- 3.2.1.4 เติม 20% TCA กลุ่มละ 1 ml โดยให้หลอดแช่อยู่บนน้ำแข็งและ incubate นาน 5 นาทีแล้ว vortex
- 3.2.1.5 นำมาปั่นที่ 10,000 rpm นาน 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- 3.2.1.6 ทิ้ง supernatant แล้วเติม 10% TCA กลุ่มละ 1ml โดยให้หลอดแช่อยู่บนน้ำแข็งและ incubate นาน 5 นาที
- 3.2.1.7 นำมาปั่นที่ 10,000 rpm นาน 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- 3.2.1.8 ทิ้ง supernatant แล้วเติม ethanol/ethyl acetate (dilution 1:1, v/v)
- 3.2.1.9 กวนล้างตะกอนและ vortex แล้วนำมาปั่นที่ 10,000 rpm นาน 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- 3.2.1.10 ทำซ้ำ 3.2.1.7- 3.2.1.8 ซ้ำอีก 2 ครั้ง
- 3.2.1.11 เติม 6 M guanidine hydrochloride หลอดละ 500 ul
- 3.2.1.12 นำมาปั่นที่ 10,000 rpm นาน 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- 3.2.1.13 นำ supernatant มา 220 ul ลง 96 well plate

3.2.1.14 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง
UV-vis spectrophotometer

3.2.2 การหาค่า protein concentration (mg/ml)

เป็นการคำนวณหาปริมาณโปรตีนสุทธิ เนื่องจากมีโปรตีนบางส่วนหายไป
ระหว่างขั้นตอนการล้างตะกอนโปรตีน

3.2.2.1 นำ supernatant ของตัวอย่างกลุ่ม blank 20 ul ลง 96 well plate แล้ว
เติม 6M guanidine hydrochloride 180 ul

3.2.1.2 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง
UV-vis spectrophotometer

3.2.3 การทำกราฟมาตรฐานของ BSA ที่ความเข้มข้น 0.125-2.0mg/ml

3.2.3.1 ชั่ง BSA มา 0.01g ละลายใน 6M guanidine hydrochloride 5 ml จะได้
ที่ความเข้มข้น 2 mg/ml

3.2.3.2 นำสารละลายข้อ 1 มาเจือจางต่อให้ได้ความเข้มข้น 0.125 - 1 mg/ml

3.2.3.3 นำ BSA มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร

3.2.4 การคำนวณผล

$$3.2.4.1 \text{ Protein carbonyl (nmol/ml)} = [(abs_{\text{sample}} - abs_{\text{blank}}) / (0.011 * uM^{-1})] (500ul/200ul)$$

$$3.2.4.2 \text{ Protein concentration (mg/ml)} = [(abs_{280} - (y\text{-intercept})/slope)] \times 2.5^{**} \times 10^{***}$$

$$3.2.4.3 \text{ Carbonyl content (nmol/mg protein)} = (\text{carbonyl nmol/ml}) / (\text{protein mg/ml})$$

กำหนดให้

* Extinction coefficient ของ DNPH ที่ 370 nm = $22,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ($0.022uM^{-1}\text{cm}^{-1}$)

**Correction factor = $(500ul/200ul) = 2.5$

***Dilution factor (DF = ปริมาณสุดท้าย/ปริมาณเริ่มต้น) = $(200ul/20ul) = 10$

3.3 การวัดปริมาณ cross beta amyloid structure ด้วย thioflavin T reagent

เป็นการวัดปริมาณ cross beta amyloid structure ซึ่งเป็น protein crosslink ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการไกลเคชัน โดยการใช้สาร reagent thioflavin T (4-(3,6-dimethyl-1,3-benzothiazol-3-ium-2-yl)-N,N-dimethylaniline chloride) เป็นตัวตรวจจับผลิตภัณฑ์ดังกล่าว โดยทำซ้ำ 3 ครั้ง แสดงผลด้วยค่าการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนซ์ (Tupe and Agte, 2009)

- 3.3.1 ดูดสาร glycated BSA มา 50 ul ลง 96 well plate
- 3.3.2 เติม 64 uM thioflavinT reagent ใน 0.1 mM PBS (pH 7.4) 50ul
(กลุ่ม control เติม PBS แทน reagent)
- 3.3.3 Incubate ที่อุณหภูมิห้องนาน 60 นาที
- 3.3.4 วัดค่าการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ด้วยเครื่อง spectrofluorometer
กำหนดค่า excitation 435 นาโนเมตร และค่า emission 485 นาโนเมตร

3.4 การวัดปริมาณ cross beta amyloid structure ด้วย congo red reagent

เป็นการวัดปริมาณ cross beta amyloid structure ซึ่งเป็น protein crosslink ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการไกลเคชัน โดยการใช้สาร reagent congo red (1-naphthalenesulfonic acid, 3,3-(4,4-biphenylenebis (azo)) bis (4- amino-) disodium salt) เป็นตัวตรวจจับผลิตภัณฑ์ดังกล่าว ทำซ้ำ 3 ครั้ง แสดงผลด้วยค่าการดูดกลืนแสง (Tupe and Agte, 2009)

- 3.4.1 ดูดสาร glycated BSA มา 50 ul ลง 96 well plate
- 3.4.2 เติม 100 uM congo red reagent ใน 0.1M PBS (pH 7.4)
+ ethanol (dilution 10% v/v) 100 ul
(กลุ่ม control เติม PBS + ethanol แทน reAGEsnt)
- 3.4.3 Incubate ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที
- 3.4.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง
UV-vis spectrophotometer

3.5 การวัดค่าการเกิดสารฟรุกโตซามีน

เป็นการวัดระดับของฟรุกโตซามีนซึ่งเป็น amadori product ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาไกลเคชันจากการจับกันของน้ำตาลกับอัลบูมิน โดยใช้สาร nitroblue tetrazolium (NBT) และใช้สาร 1-deoxy-1-morpholino-D-fructose (DMF) ซึ่งเป็น ketoamine สังเคราะห์เป็นสารมาตรฐานในการหาปริมาณฟรุกโตซามีนในหน่วย mg/ml (Ardestani and Yazdanparast, 2007)

- 3.5.1 ดูดสาร glycated BSA มา 10 ul ลง 96 well plate
- 3.5.2 เติม 0.5 mM NBT ใน 2 M sodium carbonate buffer (pH 10.3) 90 ul (กลุ่ม control เติม carbonate buffer แทน reagent)
- 3.5.3 Incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
- 3.5.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 nm ในเวลาที่ 10 และ 15 ด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer
- 3.5.5 นำการดูดกลืนแสงที่ได้มาหาค่าปริมาณฟรุกโตซามีน จากกราฟมาตรฐานของ DMF ที่ความเข้มข้น 0.125 - 2.5 mg/ml (0.5 - 10 mM)

3.6 การวัดค่าการเกิดสารกลุ่มโปรตีน thiol

เป็นการทดสอบการเกิดปฏิกิริยา glycooxidation ด้วยการวัดปริมาณโปรตีน thiol โดยใช้หลักการคือ เมื่อเกิดปฏิกิริยา glycooxidation จะมีผลทำให้โปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพ ดังนั้นปริมาณโปรตีน thiol จะลดลงเรื่อยๆตามระยะเวลาที่เกิดปฏิกิริยา โดยใช้สาร 5, 5'-dithiobisnitro benzoic acid (DTNB) หรือ Ellman's reagent ในการทดสอบ แล้วนำมาแปลผลเป็นความเข้มข้นของโปรตีน thiol ที่หน่วย nmol thiol/mg protein กำหนดสารมาตรฐานคือ L-cysteine (Ardestani and Yazdanparast, 2007)

- 3.6.1 ดูดสาร glycated BSA มา 70 ul ลง 96 well plate
- 3.6.2 เติม 2.5 mM DTNB ใน 0.1M PBS (pH 7.4) 130 ul (กลุ่ม control เติม PBS แทน reagent)
- 3.6.3 incubate ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที
- 3.6.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

3.6.5 นำการดูดกลืนแสงที่ได้มาหาค่าปริมาณโปรตีน thiol จากกราฟมาตรฐานของ L-cysteine ที่ความเข้มข้น 0.1 – 5 nM

3.7 การวัดค่าการเกิด N^E-(carboxymethyl) lysine (CML)

เป็นการตรวจวัดระดับของ CML ด้วยชุดตรวจ CML-ELISA จากบริษัท cell biolabs (San Diego, USA) โดยใช้ anti-CML antibody ในการตรวจจับ CML ที่เกิดขึ้น วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm โดยทำ 3 ซ้ำ แล้วนำมาหาค่า CML ในหน่วย ng/ml จากกราฟมาตรฐาน CML-BSA

3.7.1 เตรียมสาร glycated BSA ที่ความเข้มข้น 10 ug/ml ด้วย PBS มา 100 ul ลง 96 well plate ที่มี antibody CML

3.7.2 Incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

3.7.3 ล้างในแต่ละหลุมด้วย 0.1M PBS (pH 7.4) ปริมาตร 250 ul 2 ครั้ง

3.7.4 เติมน้ำยา assay diluent 200 ul แล้ว incubate ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง

3.7.5 ล้างในแต่ละหลุมด้วย 0.1M PBS (pH 7.4) ปริมาตร 250 ul 3 ครั้ง

3.7.6 เติมน้ำยา diluted anti-CML antibody 100ul แล้ว incubate ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง

3.7.7 ล้างในแต่ละหลุมด้วย 0.1M PBS (pH 7.4) ปริมาตร 250 ul 3 ครั้ง

3.7.8 เติมน้ำยา diluted Secondary antibody-HRP conjugate 100ul แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง

3.7.9 ล้างในแต่ละหลุมด้วย 0.1M PBS (pH 7.4) ปริมาตร 250 ul 3 ครั้ง

3.7.10 เติมน้ำยา substrate Solution 100ul แล้ว incubate ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที

3.7.11 เติมน้ำยา stop enzyme reaction 100ul แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรทันที

3.7.12 นำการดูดกลืนแสงที่ได้มาหาค่า CML จากกราฟมาตรฐานของ BSA-CML ที่ความเข้มข้น 0-50 ng/ml

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

คำนวณค่า IC_{50} และ EC ของการทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยโปรแกรม sigma plot และวิเคราะห์ข้อมูลการทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งกระบวนการไกลเคชันด้วย one-way analysis of variance (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลองใช้ post hoc range test โดยใช้ tukey's HSD ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.01$ ในกรณีทดสอบความสามารถในการลดปริมาณ AGEs ชนิดเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์, โปรตีน carbonyl, cross beta amyloid และ CML ส่วนในกรณีทดสอบความสามารถในการลดปริมาณฟรุกโตซามีนและโปรตีน thiol ใช้ tukey's HSD ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ และนำเสนอข้อมูลด้วย mean \pm standard error of mean (S.E.M)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

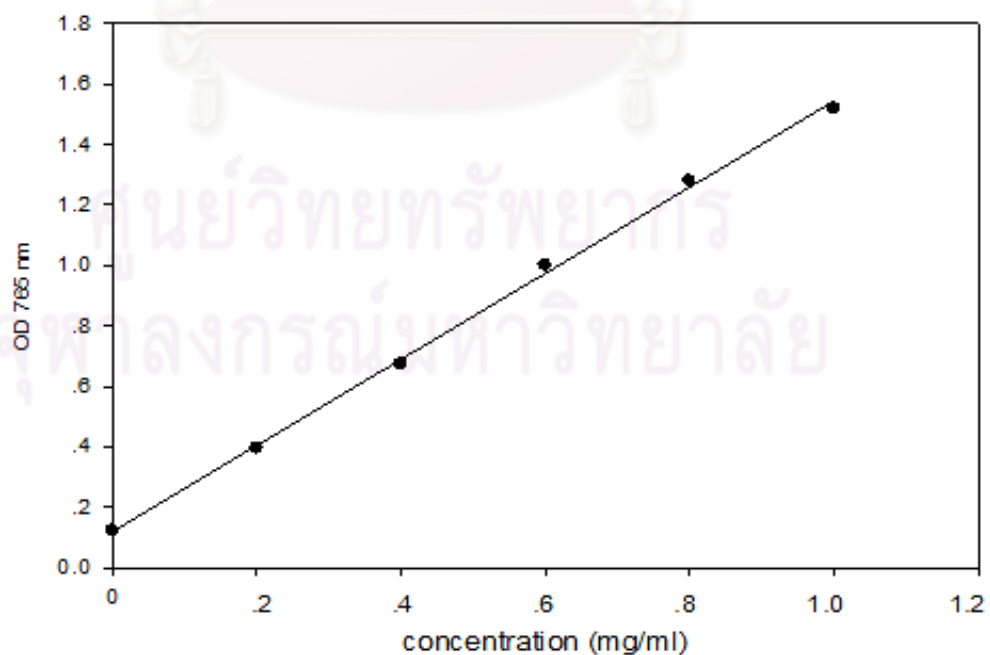
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดลองที่ 1 การตรวจหาสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง

ตารางที่ 4-1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง

ครั้งที่	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (mg gallic acid / g dried extract)
1	244.79
2	247.77
3	246.12

ในการตรวจหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก โดยวิธี Folin-Ciocalteu's colorimetry ทำซ้ำ 3 ครั้ง พบว่าสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง 1 g มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 246.23 ± 0.9 mg gallic acid / g dried extract จากสมการ $y = 3.021(X) + 0.0954$ ของกราฟมาตรฐานจากสาร gallic acid และ $R^2 = 0.9981$ (ภาพที่ 4-1)

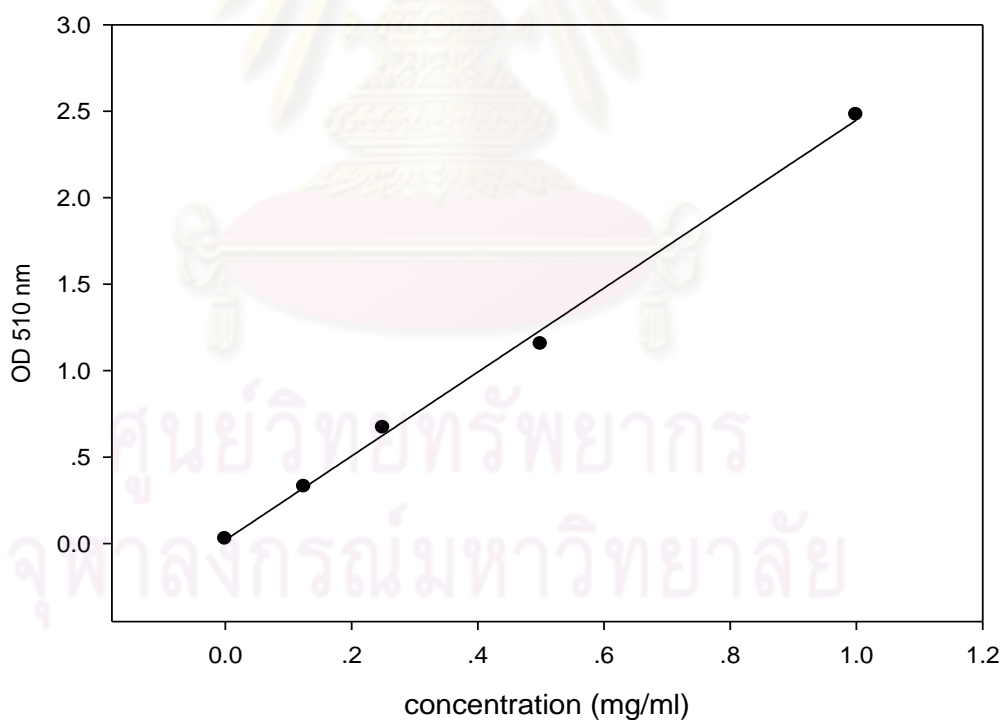


ภาพที่ 4-1 กราฟมาตรฐานของสาร gallic acid ในช่วงความเข้มข้น 1 mg/ml

ตารางที่ 4-2 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง

ครั้งที่	ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (mg catechin / g dried extract)
1	215.03
2	218.33
3	214.21

ปริมาณของสารฟลาโวนส์และฟลาโวนอลส์ซึ่งเป็นสารประเภทหนึ่งในกลุ่มของสารฟลาโวนอยด์ ตรวจพบในสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงโดยวิธี aluminum chloride colorimetry ทำซ้ำ 3 ครั้ง พบว่าในสารสกัดเปลือกองุ่นแดง 1 g มีปริมาณสารฟลาโวนส์และฟลาโวนอลส์เท่ากับ 215.857 ± 1.3 mg catechin/g dried extract จากสมการ $y = 2.428(X) + 0.0209$ ของกราฟมาตรฐานจากสาร catechin และ $R^2 = 0.9975$ (ภาพที่ 4-2)

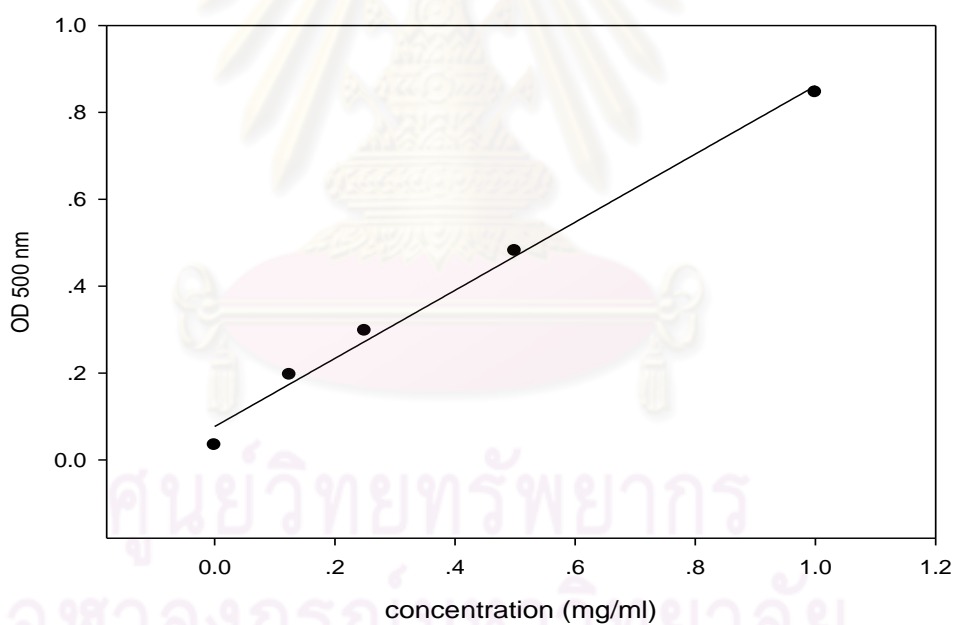


ภาพที่ 4-2 กราฟมาตรฐานของสาร catechin ในช่วงความเข้มข้น 1 mg/ml

ตารางที่ 4-3 ปริมาณสาร condensed tannin ในสารสกัดจากเปลือกขุ่นแดง

ครั้งที่	ปริมาณ condensed tannin vanillin (mg catechin / g dried extract)
1	175.000
2	181.375
3	182.653

ปริมาณ condensed tannin โดยวิธี vanillin-HCl ทำการตรวจ 3 ครั้ง พบว่าในสารสกัดจากเปลือกขุ่นแดง 1 g มีปริมาณสาร condensed tannin เท่ากับ 179.677 ± 2.4 mg catechin/g dried extract จากสมการ $y = 0.784(X) + 0.0768$ ของกราฟมาตรฐานจากสาร catechin และ $R^2 = 0.9916$ (ภาพที่ 4-3)



ภาพที่ 4-3 กราฟมาตรฐานของสาร catechin ในช่วงความเข้มข้น 1 mg/ml

ตารางที่ 4-4 ปริมาณสารแอนโทไซยานินในสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง

ครั้งที่	ปริมาณ total anthocyanins content (mg cyanidin -3-glucoside / g dried extract)
1	37.68
2	35.11
3	37.45

ปริมาณ total anthocyanins content โดยด้วยวิธี pH-differential method ทำซ้ำ 3 ครั้ง พบว่าในสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง 1 g มีปริมาณสารแอนโทไซยานินเท่ากับ 36.74 ± 0.8 mg cyanidin -3-glucoside/g dried extract

ตารางที่ 4-5 สรุปค่าสารพฤกษเคมีที่ตรวจพบในสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง

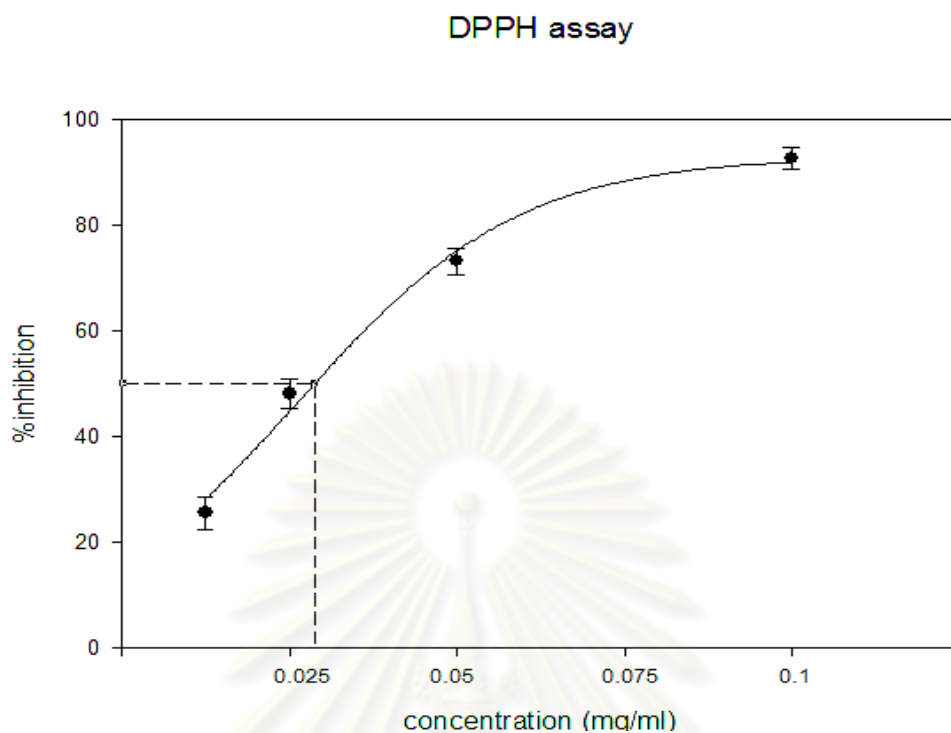
สารพฤกษเคมี	ปริมาณที่ตรวจพบ	หน่วย
Total phenolic content	246.23 ± 0.9	mg gallic acid / g dried extract
Total flavonoids content	215.86 ± 1.3	mg catechin / g dried extract
Condensed tannin	179.68 ± 2.4	mg catechin / g dried extract
Total anthocyanins content	36.74 ± 0.8	mg cyanidins-3-glucoside / g dried extract

ผลการทดลองที่ 2 การทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

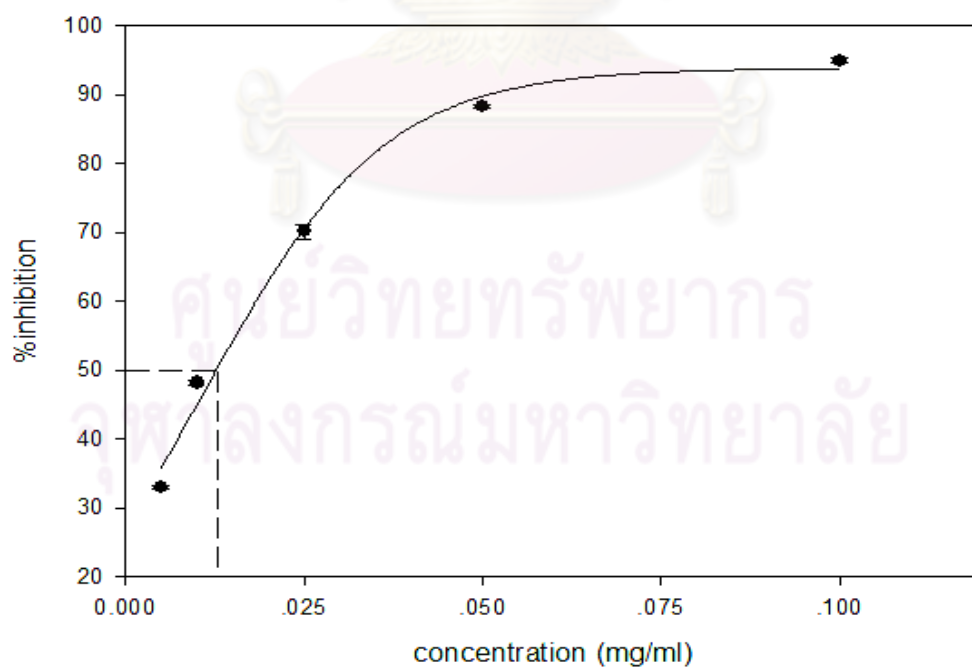
2.1 วิธี DPPH radical scavenging activity

เมื่อนำสารสกัดจากเปลือกของทุเรียนแดงที่ความเข้มข้นต่างๆมาทำปฏิกิริยากับสารละลายของ 0.2 mM DPPH radical พบว่า สารสกัดจากเปลือกของทุเรียนแดงในช่วงความเข้มข้น 0.0125 - 0.1 mg/ml สามารถยับยั้ง DPPH radical ระหว่าง 30 - 93% โดยที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml มีความสามารถในการยับยั้งสูงสุดที่ 93 % และมีค่า IC_{50} ของการยับยั้งเท่ากับ 0.027 ± 0.001 mg/ml จากสมการ $y = 29.95\ln(x) + 160.3$ ($R^2 = 0.9961$) (ภาพที่ 4-4)

สารมาตรฐาน ascorbic acid ที่ช่วงความเข้มข้น 0.005 - 0.1 mg/ml สามารถยับยั้ง DPPH radical ระหว่าง 41 - 96 % และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.012 ± 0.001 mg/ml จากสมการ $y = 33.379\ln(x) + 195.04$ ($R^2 = 0.9989$) (ภาพที่ 4-5) และสารสกัดจากเปลือกของทุเรียนเมื่อเปรียบเทียบกับค่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน ascorbic acid พบว่า มีค่า IC_{50} น้อยกว่าของสารสกัดจากเปลือกของทุเรียนเท่ากับ 0.44 เท่า



ภาพที่4-4 IC_{50} และความสามารถในการยับยั้ง DPPH[•] radical ของสารสกัดจากเปลือกขุ่นแดง ในช่วงความเข้มข้น 0.0125 - 0.1 mg/ml



ภาพที่4-5 ค่า IC_{50} และความสามารถในการยับยั้ง DPPH[•] radical ของ ascorbic acid ในช่วงความเข้มข้น 0.005 - 0.1 mg/ml

2.2 วิธี trolox equivalent antioxidant capacity assay (TEAC)

เมื่อนำสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงที่ความเข้มข้นต่างๆมาทำปฏิกิริยากับสารละลายของ ABTS^{•+} radical พบว่าสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงที่ช่วงความเข้มข้น 0.125 - 4 mg/ml สามารถยับยั้ง ABTS^{•+} radical ระหว่าง 15 - 86% โดยที่ความเข้มข้น 4 mg/ml มีความสามารถในการยับยั้งสูงสุดที่ 86 % และมีค่า IC₅₀ ของการยับยั้งเท่ากับ 0.914 ± 0.004 mg/ml จากสมการ $y = 20.312\ln(x) + 57.548$ ($R^2 = 0.9902$) (ภาพที่ 4-6)

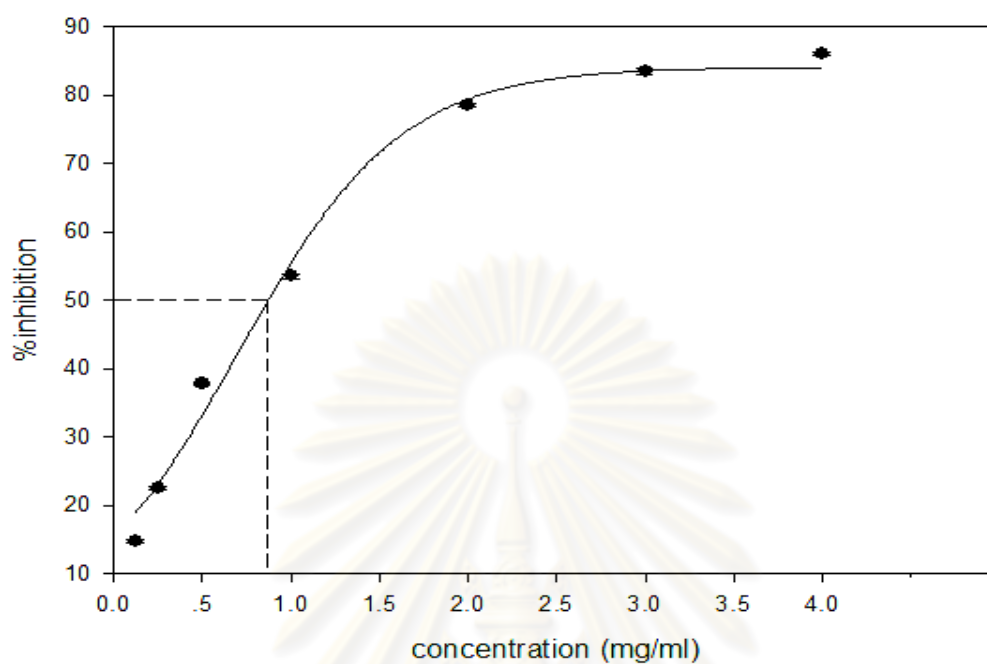
สารมาตรฐาน trolox ที่ช่วงความเข้มข้น 0.05 - 1 mg/ml สามารถยับยั้ง ABTS^{•+} radical ระหว่าง 10 - 98 % และมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.321 ± 0.001 mg/ml จากสมการ $y = 41.99\ln(x) + 97.529$ ($R^2 = 0.9927$) (ภาพที่ 4-7) และสารสกัดจากเปลือกองุ่นเมื่อเปรียบเทียบกับค่า IC₅₀ ของสารมาตรฐาน trolox พบว่ามีค่า IC₅₀ น้อยกว่าของสารสกัดจากเปลือกองุ่นเท่ากับ 0.35 เท่า

ความสามารถในการยับยั้ง ABTS^{•+} radical ของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงสามารถเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน trolox ได้ในรูปของ TEAC ดังสมการ

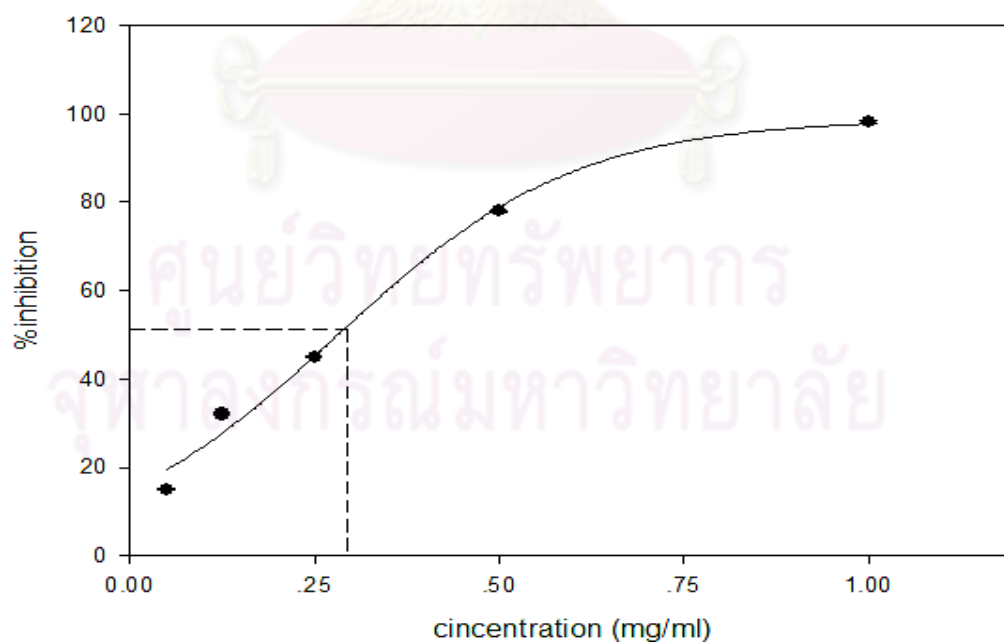
$$\text{TEAC (mg trolox /g grape extract)} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ ของ trolox (mg/ml)}}{\text{IC}_{50} \text{ ของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง (g/ml)}}$$

พบว่า สารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงมีค่า TEAC ของการยับยั้ง ABTS^{•+} radical เท่ากับ 341.11 ± 1.13 mg trolox /g grape extract

TAE assay



ภาพที่4-6 ค่า IC_{50} และความสามารถในการยับยั้ง $ABTS^{+}$ ของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง ในช่วงความเข้มข้น 0.125 – 4 mg/ml



ภาพที่4-7 ค่า IC_{50} และความสามารถในการยับยั้ง $ABTS^{+}$ ของ trolox ในช่วงความเข้มข้น 0.05 - 1 mg/ml

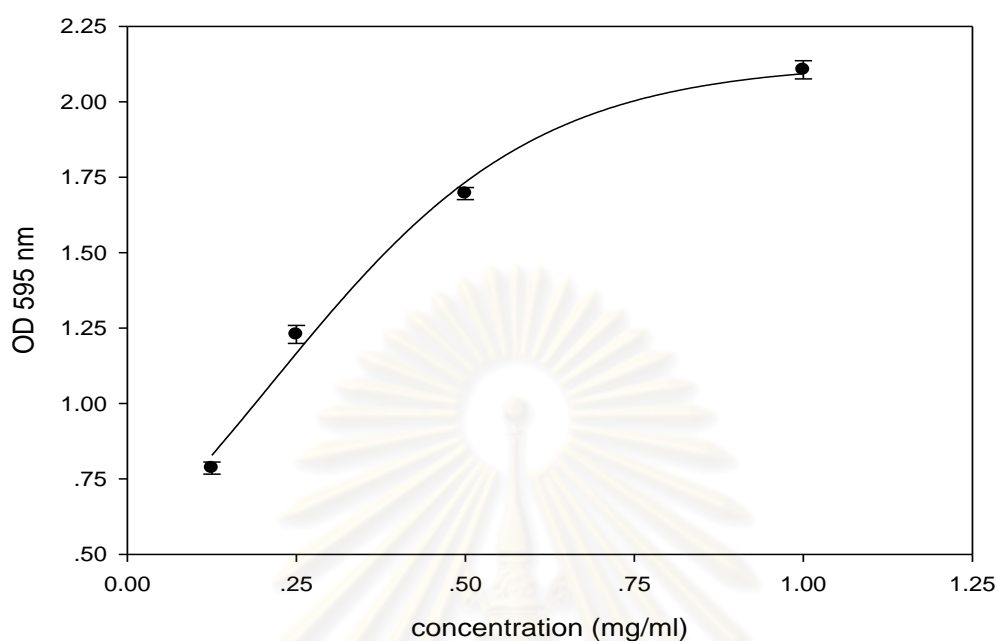
2.3 วิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

เมื่อนำสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงที่ความเข้มข้นต่างๆมาทำปฏิกิริยากับ Fe^{3+} - TPTZ complex เพื่อหาค่า EC หรือความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงที่สามารถรีดิวซ์ Fe^{3+} - TPTZ ได้เท่ากับ สารมาตรฐาน FeSO_4 1 mM พบว่า สารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงมีค่า EC เท่ากับ 0.671 ± 0.006 mg/ml จากสมการ $y = 0.6387\ln(x) + 2.1183$ ($R^2 = 0.9994$) (ภาพที่ 4-8) หรือ สารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงมีค่า EC = 1.49 mM FeSO_4 /mg RGSE โดยสารมาตรฐาน FeSO_4 1 mM มีค่าการดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 595 nm เท่ากับ 1.872 nm จากสมการ $y = 0.9163\ln(x) + 4,4581$ ($R^2 = 0.977$) (ภาพที่ 4-9)

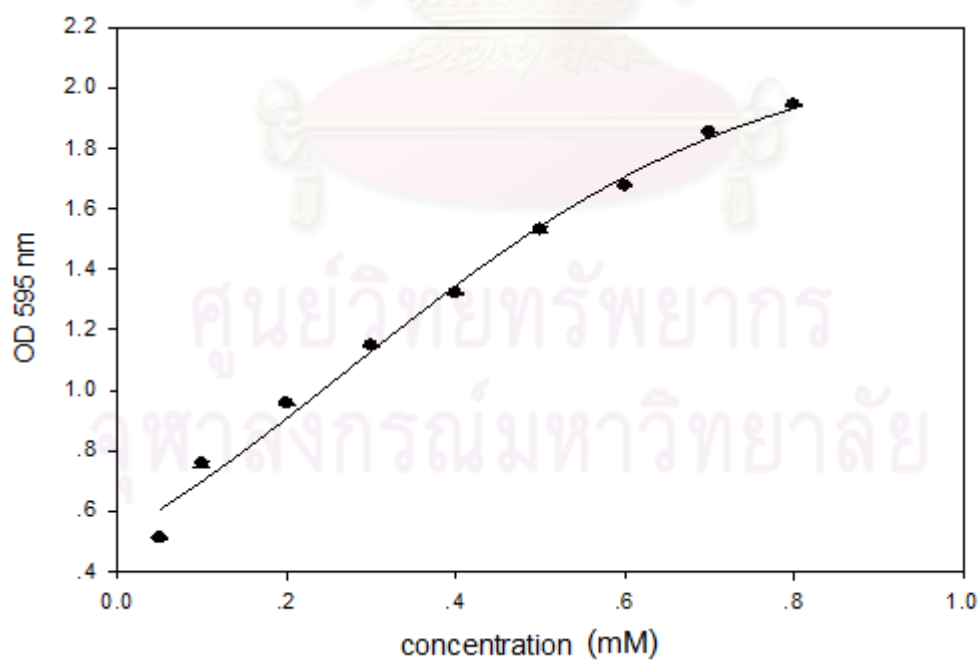


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

FRAP assay



ภาพที่4-8 ความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} -TPTZ ของสารสกัดจากเปลือกของุ่นแดงในช่วงความเข้มข้น 0.125-1.0 mg/ml



ภาพที่4-9 ความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} -TPTZ ของสารมาตรฐาน FeSO_4 ในช่วงความเข้มข้น 0.05-0.8 mM

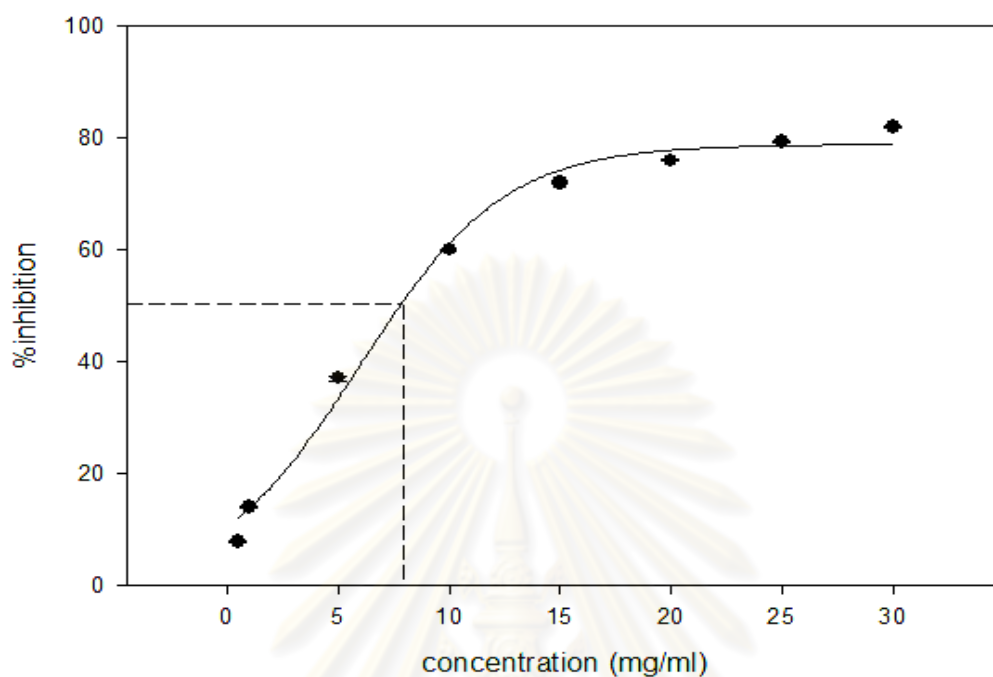
2.4 วิธีทดสอบหา hydroxyl radical scavenging activity

เมื่อนำสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงที่ความเข้มข้นต่างๆมาทดสอบความสามารถในการยับยั้ง OH[•] radical พบว่าสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงในช่วงความเข้มข้น 0.5 - 30 mg/ml สามารถยับยั้ง OH[•] radical ระหว่าง 8 - 82 % โดยที่ความเข้มข้น 30 mg/ml มีความสามารถในการยับยั้งสูงสุดที่ 82 % และมีค่า IC₅₀ ของการยับยั้งเท่ากับ 7.82 ± 0.065 mg/ml จากสมการ $y = 21.265 \ln(x) + 20.39$ ($R^2 = 0.9917$) (ภาพที่ 4-10)

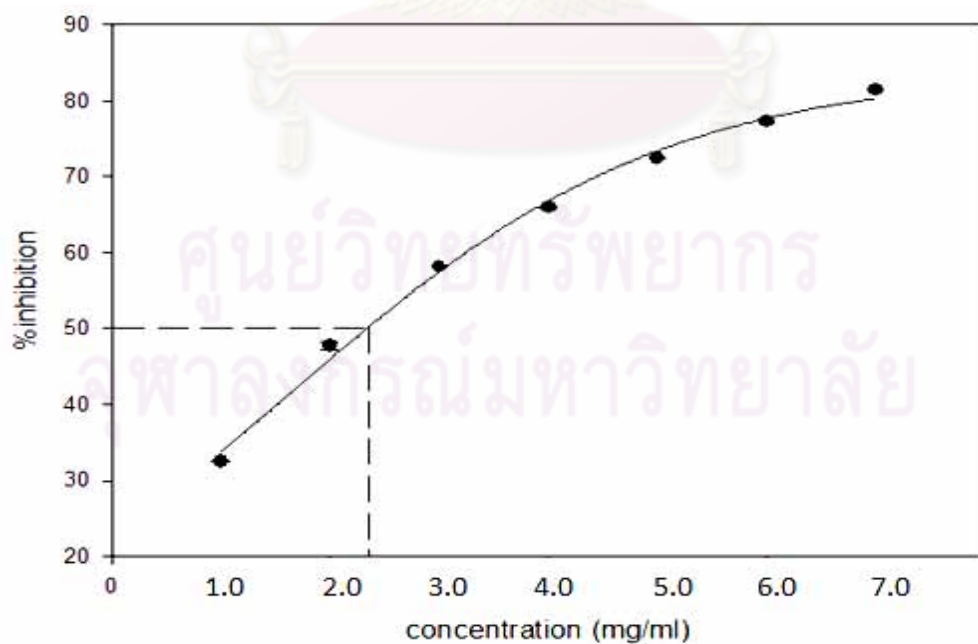
สารมาตรฐาน trolox ที่ช่วงความเข้มข้น 1 - 7 mg/ml สามารถยับยั้ง OH[•] radical ระหว่าง 32 - 81 % และมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 2.38 ± 0.06 mg/ml จากสมการ $y = 25.284 \ln(x) + 31.549$ ($R^2 = 0.9989$) (ภาพที่ 4-11) และสารสกัดจากเปลือกองุ่นเมื่อเปรียบเทียบกับค่า IC₅₀ ของสารมาตรฐาน trolox พบว่า มีค่า IC₅₀ น้อยกว่าของสารสกัดจากเปลือกองุ่นเท่ากับ 0.30 เท่า

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

HRSA assay



ภาพที่4-10 ค่า IC_{50} และความสามารถในการยับยั้ง OH^{\cdot} radical ของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงในช่วงความเข้มข้น 0.5 – 30 mg/ml



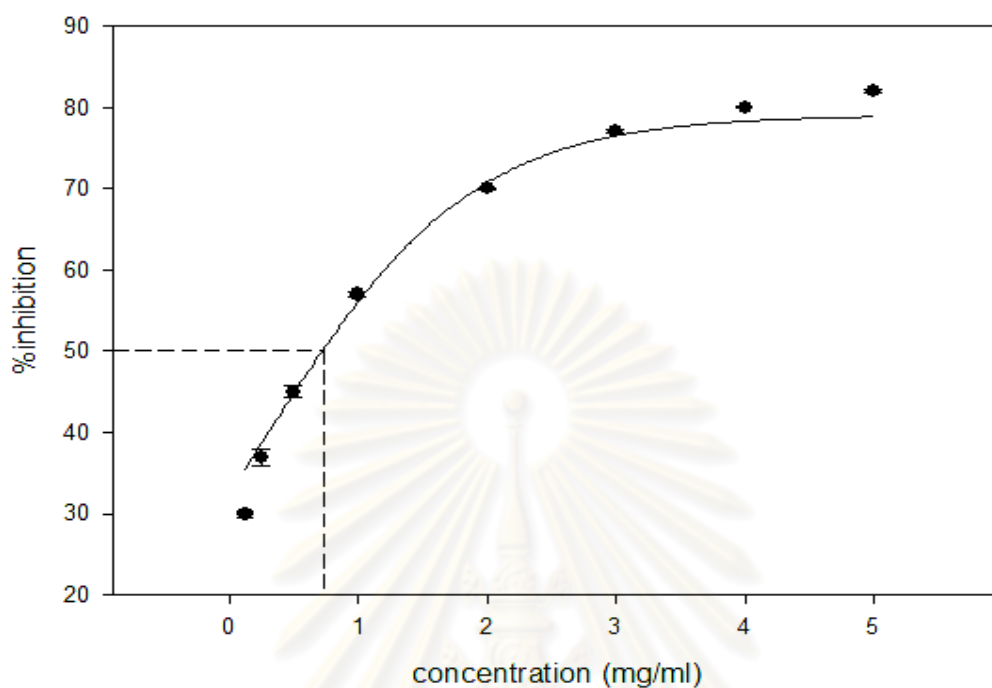
ภาพที่4-11 ค่า IC_{50} และความสามารถในการยับยั้ง OH^{\cdot} radical ของ trolox ในช่วงความเข้มข้น 1 - 7 mg/ml

2.5 วิธีทดสอบหา superoxide radical scavenging activity

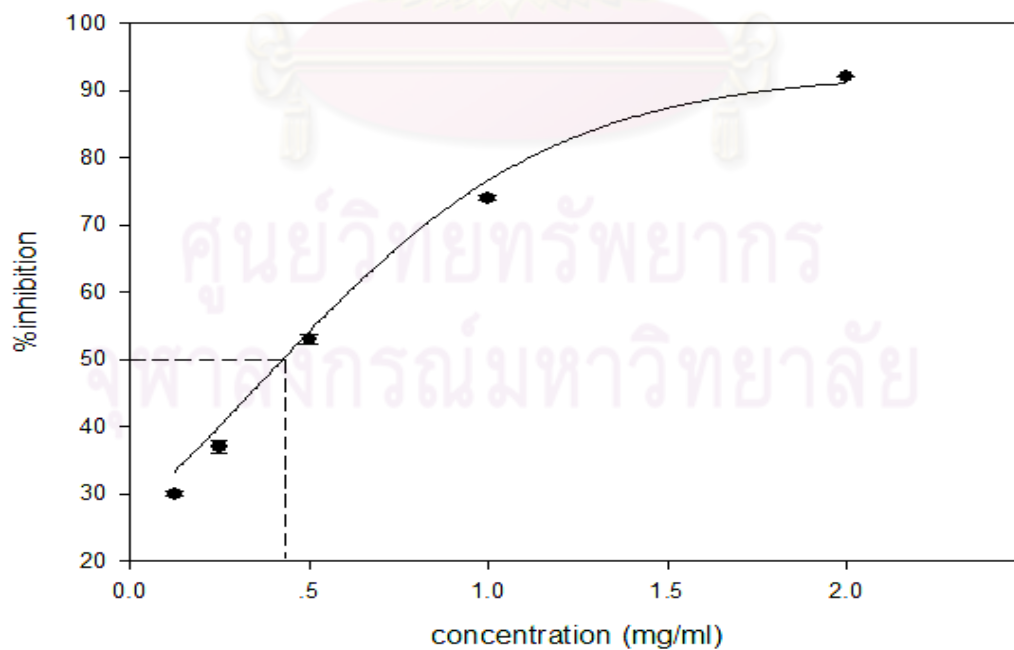
เมื่อนำสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงที่ความเข้มข้นต่างๆมาทดสอบความสามารถในการยับยั้ง O_2^- radical พบว่าสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงที่ช่วงความเข้มข้น 0.125 - 5 mg/ml สามารถยับยั้ง O_2^- radical ระหว่าง 30 - 83 % โดยที่ความเข้มข้น 5 mg/ml มีความสามารถในการยับยั้งสูงสุดที่ 82 % และมีค่า IC_{50} ของการยับยั้งเท่ากับ 0.864 ± 0.005 mg/ml จากสมการ $y = 16.375\ln(x) + 60.32$ ($R^2 = 0.9928$) (ภาพที่ 4-12)

สารมาตรฐาน trolox ที่ช่วงความเข้มข้น 0.125 - 2 mg/ml สามารถยับยั้ง O_2^- radical ระหว่าง 32 - 81 % และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.485 ± 0.004 mg/ml จากสมการ $y = 24.214\ln(x) + 77.631$ ($R^2 = 0.9935$) (ภาพที่ 4-13) และสารสกัดจากเปลือกองุ่นเมื่อเปรียบเทียบกับค่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน trolox พบว่า มีค่า IC_{50} น้อยกว่าของสารสกัดจากเปลือกองุ่นเท่ากับ 0.56 เท่า

SRSA assay



ภาพที่4-12 ค่า IC_{50} และความสามารถในการยับยั้ง O_2^- radical ของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง ในช่วงความเข้มข้น 0.125 – 5 mg/ml



ภาพที่4-13 ค่า IC_{50} และความสามารถในการยับยั้ง O_2^- radical ของ trolox ในช่วงความเข้มข้น 0.125 – 2 mg/ml

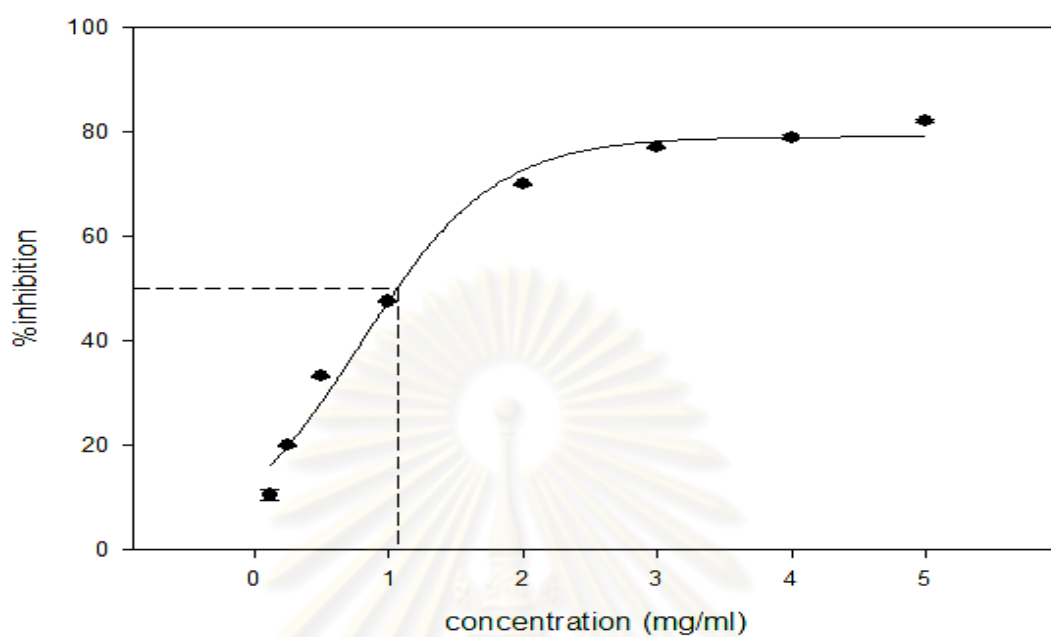
2.6 วิธีทดสอบหา ferrous ion chelating power

เมื่อนำสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงที่ความเข้มข้นต่างๆมาทดสอบความสามารถในการแย่งจับกับโลหะ Fe^{2+} ของสาร 2, 2' bipyridyl - Fe^{2+} complex พบว่า สารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงที่ช่วงความเข้มข้น 0.125 - 5 mg/ml สามารถแย่งจับกับโลหะระหว่าง 12 - 83 % โดยที่ความเข้มข้น 5 mg/ml มีความสามารถในการแย่งจับกับโลหะสูงสุดที่ 83 % และมีค่า IC_{50} ของการยับยั้งเท่ากับ 1.05 ± 0.012 mg/ml จากสมการ $y = 19.473\ln(x) + 49.287$ ($R^2 = 0.9915$) (ภาพที่ 4-14)

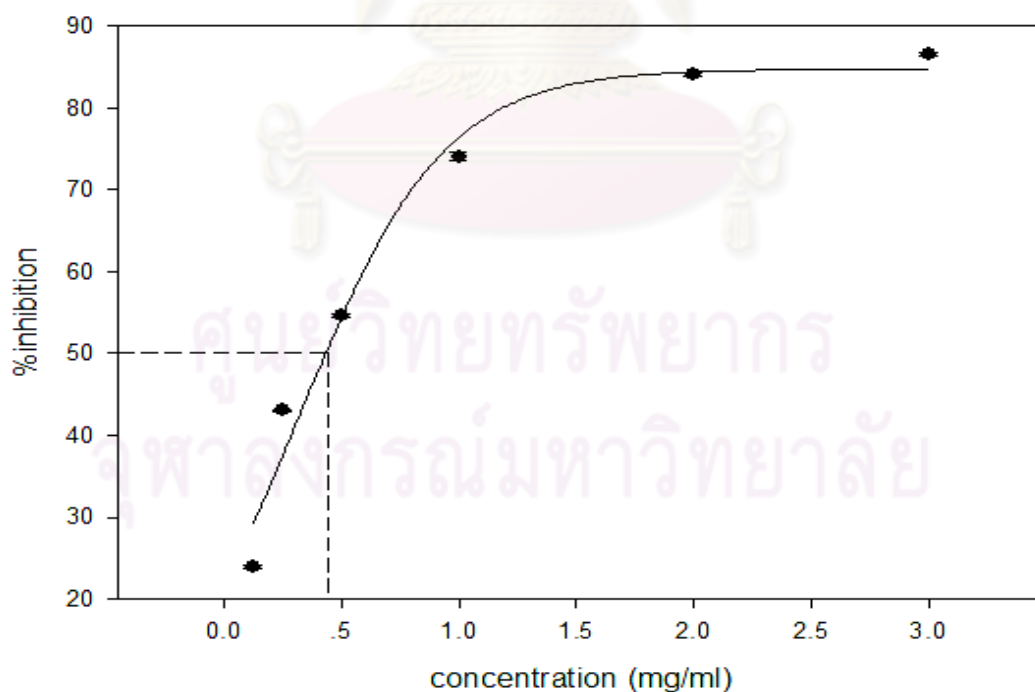
สารมาตรฐาน EDTA ที่ช่วงความเข้มข้น 1 - 7 mg/ml สามารถแย่งจับกับโลหะระหว่าง 32 - 81 % และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.491 ± 0.007 mg/ml จากสมการ $y = 19.643\ln(x) + 69.867$ ($R^2 = 0.9898$) (ภาพที่ 4-15) และสารสกัดจากเปลือกองุ่นเมื่อเปรียบเทียบกับค่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน EDTA พบว่า มีค่า IC_{50} น้อยกว่าของสารสกัดจากเปลือกองุ่นเท่ากับ 0.47 เท่า

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Ferrous ion chelating power



ภาพที่4-14 ค่า IC₅₀ และความสามารถในการแย่งจับกับโลหะของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง ในช่วงความเข้มข้น 0.125 - 5mg/ml



ภาพที่4-15 ค่า IC₅₀ และความสามารถในการแย่งจับกับโลหะของ EDTA ในช่วงความเข้มข้น 0.125 - 3mg/ml

ตารางที่ 4-6 สรุปผลการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง

วิธีทดสอบ	สารมาตรฐาน	IC ₅₀ ของRGSE (mg/ml)	ค่าเทียบเท่าสาร มาตรฐาน	หมายเหตุ
DPPH assay	ascorbic acid	0.027± 0.001	0.44	
TEAC assay	trolox	0.91 ± 0.004	0.35	
FRAP assay	FeSO ₄ 1 mM	-	-	EC=0.671± 0.006 mg/ml
HRSA assay	trolox	7.82± 0.078	0.30	
SRSA assay	trolox	0.86± 0.005	0.56	
Ferrous ion chelating power	EDTA	1.05 ± 0.012	0.47	

(RGSE = สารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง, HRSA = hydroxyl radical scavenging activity
, SRSA = superoxide radical scavenging activity, EC = equivalent concentration)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการทดลองที่ 3 การทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเกิดกระบวนไกลเคชั่นใน BSA

3.1 การวัดปริมาณการเกิด AGEs ชนิดเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์

ผลจากการทดลองสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงในการยับยั้ง AGEs ที่เกิดจาก BSA - น้ำตาลฟรุกโตส โดยทำการ incubate ติดต่อกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ค่าการเรืองแสง AGEs ของทุกกลุ่มมีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นในแต่ละสัปดาห์ โดยตั้งแต่วันที่ 1 เป็นต้นไป พบว่า กลุ่มสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงมีค่าการเรืองแสงของ AGEs ลดลงตามค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงที่ 0.03, 0.06, 0.125, 0.25, 0.5 และ 1 mg/ml ตามลำดับ โดยที่ค่าความเข้มข้น 1 mg/ml มีการเรืองแสงน้อยที่สุด แต่เมื่อเทียบกับกลุ่มยา aminoguanidine (positive control) ที่ความเข้มข้นเท่ากันคือ 1 mg/ml พบว่า กลุ่มยา aminoguanidine มีค่าการเรืองแสงของ AGEs น้อยกว่าและกลุ่มสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงทุกความเข้มข้น มีค่าการเรืองแสงของ AGEs น้อยกว่ากลุ่ม negative control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) (ตารางที่ 4-7 และรูปที่ 4-16)

กลุ่มสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงมีค่า % inhibition ลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นในแต่ละสัปดาห์เช่นเดียวกับกลุ่มยา aminoguanidine โดยพบว่าแต่ละกลุ่มมีค่า %inhibition มากที่สุดในสัปดาห์ที่ 1 (day 7) และค่า %inhibition เพิ่มขึ้นตามค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงที่ 0.03, 0.06, 0.125, 0.25, 0.5 และ 1 mg/ml ตามลำดับ โดยในสัปดาห์ที่ 1 ของกลุ่มสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงที่ค่าความเข้มข้น 1 mg/ml มีค่า %inhibition มากที่สุด (86.77 ± 2.48) และเมื่อเทียบกับกลุ่มยา aminoguanidine (positive control) ที่ความเข้มข้นเท่ากันคือ 1 mg/ml (87.52 ± 0.49) พบว่า กลุ่มยา aminoguanidine มีค่า %inhibition มากกว่า ในขณะที่สัปดาห์ที่ 4 (day 28) ของกลุ่มสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงที่ค่าความเข้มข้น 1 mg/ml มีค่า %inhibition ลดลง คือ 71.06 ± 0.64 % และกลุ่มยา aminoguanidine ที่ค่าความเข้มข้น 1 mg/ml มีค่า %inhibition เท่ากับ 73.33 ± 0.59 % (ตารางที่ 4-8 และรูปที่ 4-17)

ตารางที่ 4-7 ผลของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง (red grape skin extract; RGSE) ในแต่ละความเข้มข้นต่อการยับยั้ง AGEs ชนิดเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ในสัปดาห์ที่ 1, 2, 3 และ 4

กลุ่มทดลอง	ค่าการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ (nm)			
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4
Negative control	61,000 ± 349.20	68,000 ± 261.45 [#]	75,200 ± 367.73 [#]	85,100 ± 367.45 [#]
AG 0.25 mg/ml	13,800 ± 175.71*	22,300 ± 435.06 [#]	29,900 ± 425.19 [#]	34,500 ± 746.43 [#]
AG 0.5 mg/ml	9,830 ± 351.56*	18,600 ± 473.14 [#]	23,900 ± 401.30 [#]	28,900 ± 261.26 [#]
AG 1.0 mg/ml	7,661 ± 41.24*	14,300 ± 271.23*	18,200 ± 479.32*	22,400 ± 294.74*
RGSE 0.03 mg/ml	12,600 ± 363.45*	22,200 ± 674.38 [#]	28,800 ± 501.82 [#]	37,600 ± 324.04 [#]
RGSE 0.06 mg/ml	12,300 ± 234.74*	21,000 ± 207.56 [#]	28,100 ± 465.48 [#]	37,400 ± 936.20 [#]
RGSE 0.125 mg/ml	12,100 ± 497.71*	19,900 ± 606.04 [#]	26,800 ± 978.84 [#]	35,900 ± 575.44 [#]
RGSE 0.25 mg/ml	11,100 ± 434.35*	17,600 ± 545.71 [#]	28,100 ± 465.48 [#]	31,100 ± 509.97 [#]
RGSE 0.5 mg/ml	10,300 ± 188.57*	17,000 ± 480.69*	25,100 ± 901.68 [#]	30,600 ± 916.15 [#]
RGSE 1.0 mg/ml	6,793 ± 217.31*	16,800 ± 290.28*	22,900 ± 103.37 [#]	22,600 ± 928.53*

หมายเหตุ : ยา aminoguanidine (positive control) แทนด้วย AG

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (MEAN ± S.E.M., n=3)

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม negative control ในสัปดาห์เดียวกัน

[#] แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม AG 1.0 mg/ml ในสัปดาห์เดียวกัน

ตารางที่ 4-8 ค่า % inhibition ของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง (red grape skin extract; RGSE) ในแต่ละความเข้มข้นต่อการยับยั้ง AGEs ชนิดเรืองแสงฟลูออเรสเซนตีในสัปดาห์ที่ 1, 2, 3 และ 4

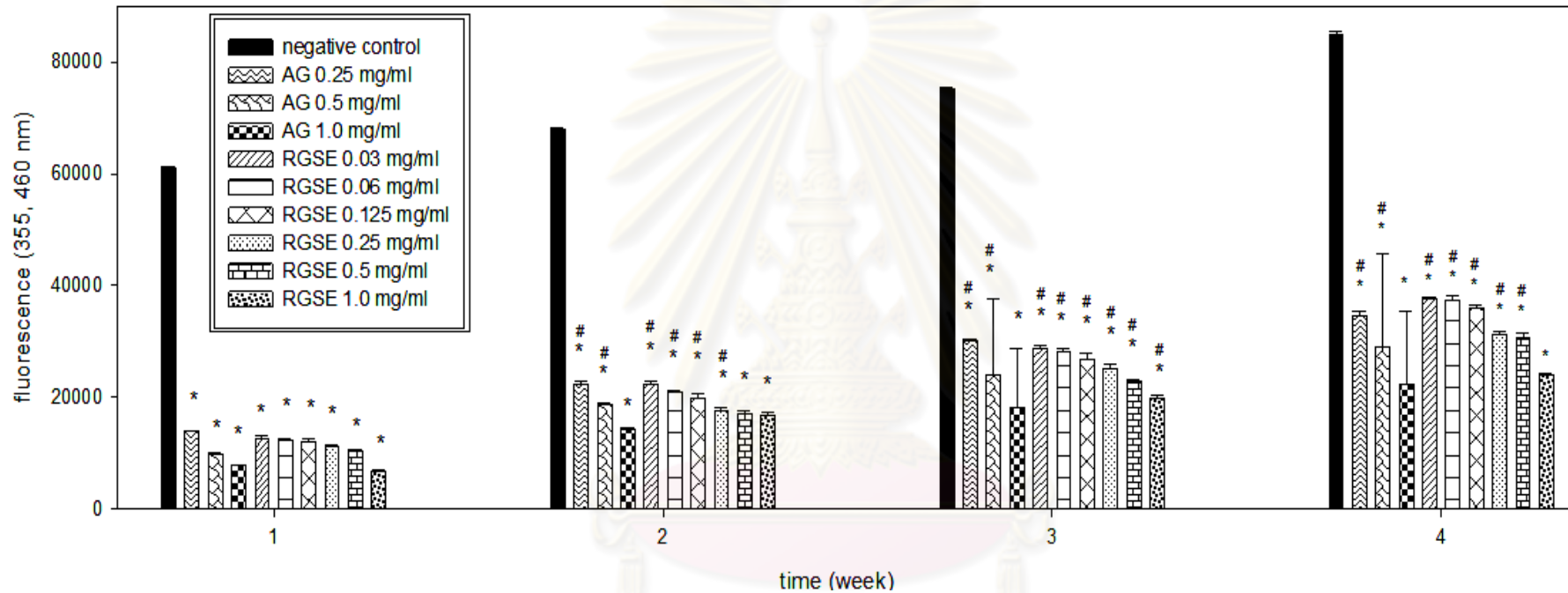
กลุ่มทดลอง	ค่า %inhibition			
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4
AG 0.25 mg/ml	77.49 ± 0.44	67.22 ± 0.73	59.66 ± 0.94	58.86 ± 1.36
AG 0.5 mg/ml	83.97 ± 0.70	72.19 ± 0.18	67.80 ± 0.11	65.60 ± 0.74
AG 1.0 mg/ml	87.52 ± 0.48	79.01 ± 0.43	75.48 ± 0.44	73.33 ± 0.60
RGSE 0.03 mg/ml	79.47 ± 0.46	67.41 ± 0.97	60.30 ± 2.11	55.23 ± 0.34
RGSE 0.06 mg/ml	79.99 ± 0.25	69.10 ± 0.42	62.05 ± 1.12	55.50 ± 1.73
RGSE 0.125 mg/ml	80.35 ± 0.78	70.25 ± 1.13	63.82 ± 1.67	58.42 ± 1.91
RGSE 0.25 mg/ml	81.93 ± 0.76	74.07 ± 0.90	67.98 ± 3.19	62.93 ± 0.96
RGSE 0.5 mg/ml	83.26 ± 0.20	74.99 ± 0.78	69.14 ± 0.47	63.52 ± 1.54
RGSE 1.0 mg/ml	86.11 ± 0.118	75.23 ± 0.52	73.42 ± 1.23	71.60 ± 0.64

หมายเหตุ: ยา aminoguanidine (positive control) แทนค่าด้วย AG

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (MEAN±S.E.M., n=3)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 4-16 ผลของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง (Red grape skin extract; RGSE) ในแต่ละความเข้มข้น ต่อการยับยั้ง AGEs ชนิดเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ในสัปดาห์ที่ 1, 2, 3 และ 4

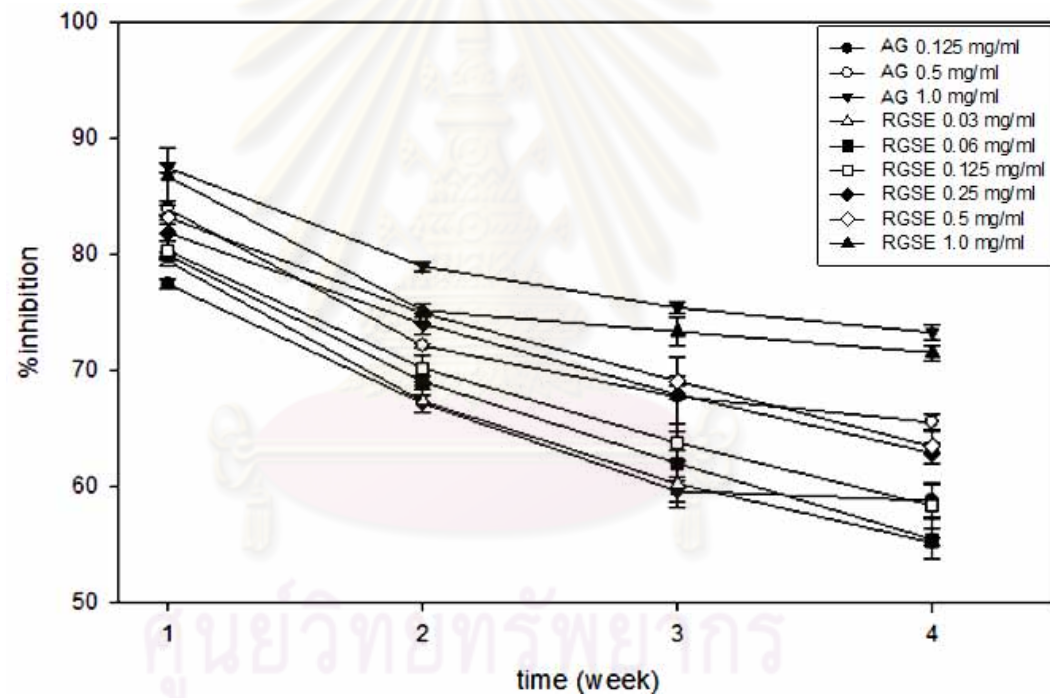


ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (MEAN±S.E.M., n=3)

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม negative control ในสัปดาห์เดียวกัน

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม AG 1.0 mg/ml ในสัปดาห์เดียวกัน

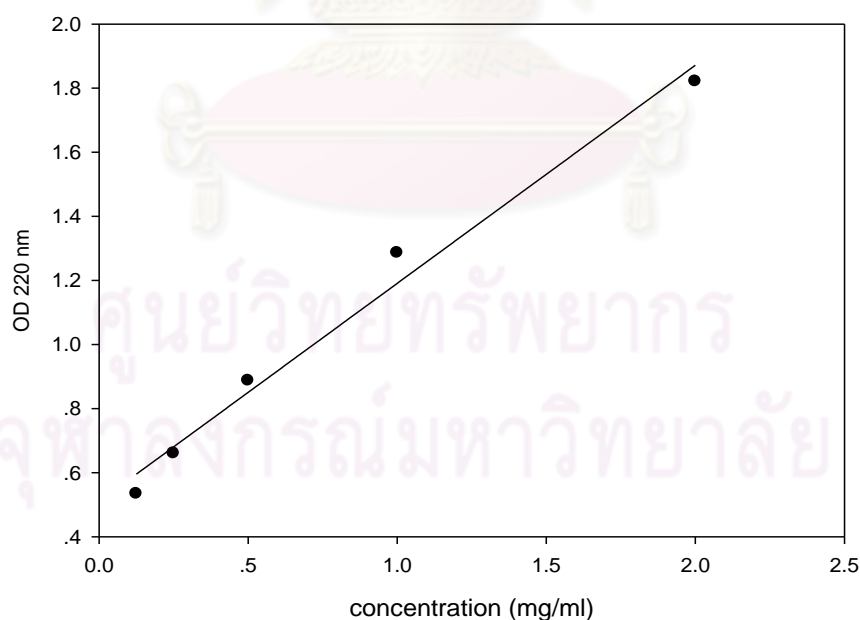
ภาพที่ 4-17 ค่า %inhibition ของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง (red grape skin extract; RGSE) ในแต่ละความเข้มข้นต่อการยับยั้ง AGEs ชนิดเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ในสัปดาห์ที่ 1, 2, 3 และ 4



ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (MEAN \pm S.E.M., n=3)

3.2 การวัดค่าการเกิดสารกลุ่มโปรตีน carbonyl

ผลจากการทดสอบสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงในการลดปริมาณโปรตีน carbonyl ที่เกิดจากกระบวนการไกลเคชัน โดยทำการวัดจาก glycated BSA ที่ incubate ติดต่อกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยคำนวณหาปริมาณโปรตีน carbonyl จากสมการ $y = 0.3763(X) - 0.0873$ ของกราฟมาตรฐานจาก BSA ที่ $R^2 = 0.9844$ (ภาพที่ 4-18) พบว่าปริมาณโปรตีน carbonyl ของทุกกลุ่มมีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นในแต่ละสัปดาห์ โดยกลุ่มสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงพบว่า ปริมาณโปรตีน carbonyl มีค่าลดลงตามค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงที่ 0.03, 0.06, 0.125, 0.25, 0.5 และ 1 mg/ml ตามลำดับ โดยที่ค่าความเข้มข้น 1 mg/ml มีปริมาณโปรตีน carbonyl น้อยที่สุด และเมื่อเทียบกับกลุ่มยา aminoguanidine (positive control) ที่ความเข้มข้นเท่ากันคือ 1 mg/ml พบว่า กลุ่มยา aminoguanidine มีปริมาณโปรตีน carbonyl น้อยกว่าแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและกลุ่มสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงทุกความเข้มข้น มีปริมาณโปรตีน carbonyl น้อยกว่ากลุ่ม negative control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) (ตารางที่ 4-9 และรูปที่ 4-19)



ภาพที่ 4-18 กราฟมาตรฐานแสดงค่าการดูดกลืนแสงของ BSA ในช่วงความเข้มข้น 0.125 - 2 mg/ml

ตารางที่ 4-9 ผลของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง (red grape skin extract; RGSE) ในแต่ละความเข้มข้นต่อการลดปริมาณโปรตีน carbonyl ในสัปดาห์ที่ 1, 2, 3 และ 4

กลุ่มทดลอง	ค่า protein carbonyl (nmol carbonyl/mg protein)			
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4
Negative control	14.89 ± 0.54	25.99 ± 0.57	34.79 ± 0.49	44.37 ± 0.55
AG 0.25 mg/ml	11.67 ± 0.47* [#]	17.32 ± 0.44* [#]	23.91 ± 0.24* [#]	28.50 ± 0.39* [#]
AG 0.5 mg/ml	10.38 ± 0.54*	14.28 ± 0.23*	22.15 ± 0.14*	24.38 ± 0.16*
AG 1.0 mg/ml	8.70 ± 0.14*	17.32 ± 0.44*	20.50 ± 0.31*	23.14 ± 0.15*
RGSE 0.03 mg/ml	12.09 ± 0.14* [#]	17.84 ± 0.64* [#]	24.15 ± 0.13* [#]	29.20 ± 0.19* [#]
RGSE 0.06 mg/ml	12.58 ± 0.37* [#]	17.97 ± 0.64* [#]	24.12 ± 0.21* [#]	27.61 ± 0.51* [#]
RGSE 0.125 mg/ml	11.32 ± 0.25* [#]	15.99 ± 0.24*	22.76 ± 0.34* [#]	27.55 ± 0.45* [#]
RGSE 0.25 mg/ml	10.74 ± 0.30*	14.93 ± 0.65*	23.39 ± 0.15* [#]	27.18 ± 0.24* [#]
RGSE 0.5 mg/ml	9.94 ± 0.13*	14.51 ± 0.23*	22.35 ± 0.38* [#]	25.86 ± 0.24* [#]
RGSE 1.0 mg/ml	8.75 ± 0.38*	13.98 ± 0.46*	20.83 ± 0.34*	24.77 ± 0.48*

หมายเหตุ: AG =aminoguanidine (positive control)

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (MEAN ± S.E.M., n=3)

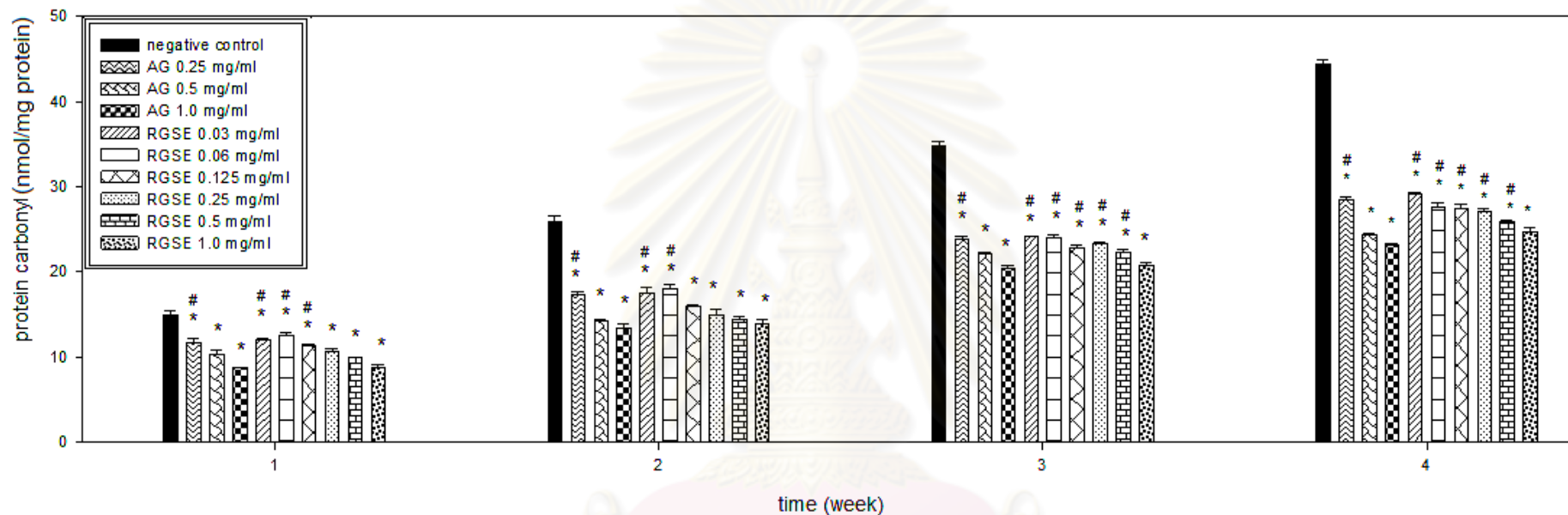
*

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม negative control ในสัปดาห์เดียวกัน

#

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม AG 1.0 mg/ml ในสัปดาห์เดียวกัน

ภาพที่ 4-19 แสดงผลของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง (red grape skin extract; RGSE) ในแต่ละความเข้มข้นต่อการลดปริมาณโปรตีน carbonyl ในสัปดาห์ที่ 1, 2, 3 และ 4



ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (MEAN±S.E.M., n=3)

*

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม negative control ในสัปดาห์เดียวกัน

#

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม AG 1.0 mg/ml ในสัปดาห์เดียวกัน

3.3 การวัดปริมาณ cross beta amyloid structure ด้วย thioflavin T reagent

ผลจากการทดสอบสารสกัดจากเปลือกงุ่นแดงในการลดปริมาณ cross beta amyloid structure ที่เกิดจากกระบวนการไกลเคชัน โดยทำการวัดจาก glycated BSA ด้วย thioflavin T reagent พบว่าปริมาณ cross beta amyloid structure ของทุกกลุ่มมีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นในแต่ละสัปดาห์ โดยกลุ่มสารสกัดจากเปลือกงุ่นแดงพบว่า ปริมาณ cross beta amyloid structure มีค่าลดลงตามค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกงุ่นแดงที่ 0.03, 0.06, 0.125, 0.25, 0.5 และ 1 mg/ml ตามลำดับ โดยที่ค่าความเข้มข้น 1 mg/ml มีปริมาณ cross beta amyloid structure น้อยที่สุด และเมื่อเทียบกับกลุ่มยา aminoguanidine (positive control) ที่ความเข้มข้นเท่ากันคือ 1 mg/ml พบว่า กลุ่มยา aminoguanidine มีปริมาณ cross beta amyloid structure น้อยกว่าแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และกลุ่มสารสกัดจากเปลือกงุ่นแดงทุกความเข้มข้น มีปริมาณ cross beta amyloid structure น้อยกว่ากลุ่ม negative control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) (ตารางที่ 4-10 และรูปที่ 4-20)

ตารางที่ 4-10 แสดงผลของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง (red grape skin extract; RGSE) ในแต่ละความเข้มข้นต่อการลดปริมาณ cross beta amyloid structure โดยทำการวัดด้วย thioflavin T reagent ในสัปดาห์ที่ 1, 2, 3 และ 4

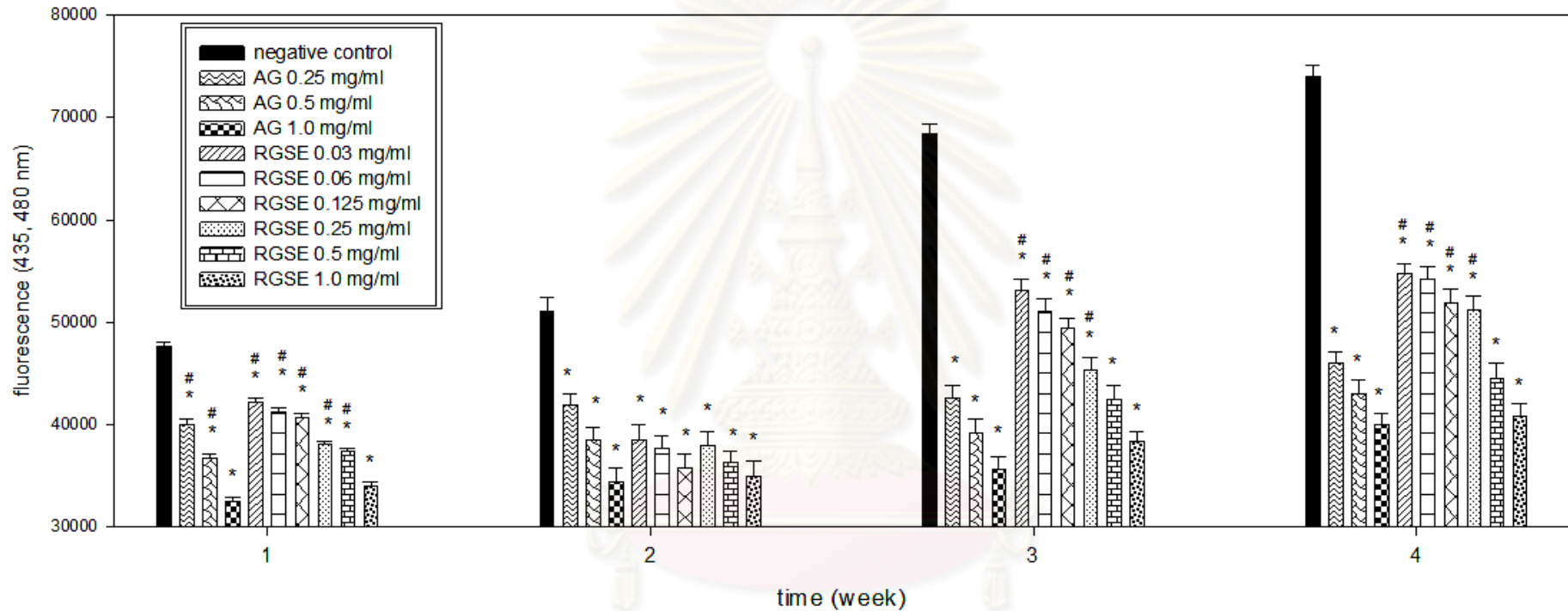
กลุ่มทดลอง	ค่าการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนซ์(nm)			
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4
Negative control	47,600 ± 471.15	51,100 ± 1,322.89	68,500 ± 936.41	74,100 ± 1,041.38
AG 0.25 mg/ml	40,000 ± 533.73* [#]	42,000 ± 1,084.41*	42,700 ± 1,151.92*	46,100 ± 977.73*
AG 0.5 mg/ml	36,700 ± 402.45* [#]	38,500 ± 1,259.82*	39,200 ± 1,382.72*	43,000 ± 1,331.56*
AG 1.0 mg/ml	32,500 ± 466.23*	34,400 ± 1,294.10*	35,600 ± 1,258.11*	40,000 ± 1,017.05*
RGSE 0.03 mg/ml	42,300 ± 324.97* [#]	38,500 ± 1,517.94*	53,200 ± 1,068.62* [#]	54,800 ± 979.60* [#]
RGSE 0.06 mg/ml	41,200 ± 525.40* [#]	37,700 ± 1,208.40*	51,100 ± 1,231.41* [#]	54,200 ± 1,263.62* [#]
RGSE 0.125 mg/ml	40,700 ± 499.24* [#]	35,800 ± 1,291.00*	49,400 ± 1,027.63* [#]	51,900 ± 1,387.14* [#]
RGSE 0.25 mg/ml	38,000 ± 318.45* [#]	38,000 ± 1,377.71*	45,400 ± 1,186.67* [#]	51,200 ± 1,383.79* [#]
RGSE 0.5 mg/ml	37,400 ± 279.99* [#]	36,400 ± 1,037.18*	42,400 ± 1,367.78*	42,300 ± 1,489.68*
RGSE 1.0 mg/ml	34,000 ± 428.93*	35,000 ± 1,489.94*	38,400 ± 983.05*	40,800 ± 1,175.55*

หมายเหตุ : AG = aminoguanidine (positive control) ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (MEAN ± S.E.M., n=3)

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม negative control ในสัปดาห์เดียวกัน

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม AG 1.0 mg/ml ในสัปดาห์เดียวกัน

ภาพที่ 4-20 ผลของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง (red grape skin extract; RGSE) ในแต่ละความเข้มข้น ต่อการลดปริมาณ cross beta amyloid structure โดยทำการวัดด้วย thioflavin T reagent ในสัปดาห์ที่ 1, 2, 3 และ 4



ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (MEAN±S.E.M., n=3)

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม negative control ในสัปดาห์เดียวกัน

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม AG 1.0 mg/ml ในสัปดาห์เดียวกัน

3.4 การวัดปริมาณ cross beta amyloid structure ด้วย congo red reagent

ผลจากการทดสอบสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงในการลดปริมาณ cross beta amyloid structure ที่เกิดจากกระบวนการไกลเคชัน โดยทำการวัดจาก glycated BSA ด้วย congo red reagent พบว่าปริมาณ cross beta amyloid structure ของทุกกลุ่ม มีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นในแต่ละสัปดาห์ โดยกลุ่มสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงพบว่า ปริมาณ cross beta amyloid structure มีค่าลดลงตามค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงที่ 0.03, 0.06, 0.125, 0.25, 0.5 และ 1 mg/ml ตามลำดับ โดยที่ค่าความเข้มข้น 1 mg/ml มีปริมาณ cross beta amyloid structure น้อยที่สุด

ในสัปดาห์ที่ 3 พบว่ากลุ่มสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1 mg/ml มีปริมาณ cross beta amyloid structure น้อยกว่ากลุ่ม negative control อย่างมีนัยสำคัญ และในสัปดาห์ที่ 4 พบว่า กลุ่มสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงทุกความเข้มข้น มีปริมาณ cross beta amyloid structure น้อยกว่ากลุ่ม negative control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) แต่เมื่อเทียบกับกลุ่มยา aminoguanidine (positive control) ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) (ตารางที่ 4-11 และรูปที่ 4-21)

ตารางที่ 4-11 ผลของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง (red grape skin extract; RGSE) ในแต่ละความเข้มข้นต่อการลดปริมาณ cross beta amyloid structure โดยทำการวัดด้วย congo red reagent ในสัปดาห์ที่ 1, 2, 3 และ 4

กลุ่มทดลอง	ค่าการดูดกลืนแสง (nm)			
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4
Negative control	0.37 ± 0.006	0.41 ± 0.005	0.44 ± 0.005	0.46 ± 0.003
AG 0.25 mg/ml	0.37 ± 0.007	0.37 ± 0.006*	0.39 ± 0.001*	0.44 ± 0.003
AG 0.5 mg/ml	0.35 ± 0.009	0.37 ± 0.005*	0.38 ± 0.007*	0.42 ± 0.003*
AG 1.0 mg/ml	0.35 ± 0.005	0.36 ± 0.006*	0.38 ± 0.008*	0.41 ± 0.007*
RGSE 0.03 mg/ml	0.38 ± 0.004	0.38 ± 0.005	0.40 ± 0.006	0.43 ± 0.008*
RGSE 0.06 mg/ml	0.37 ± 0.008	0.38 ± 0.005	0.40 ± 0.006	0.43 ± 0.006*
RGSE 0.125 mg/ml	0.37 ± 0.003	0.37 ± 0.006*	0.41 ± 0.004	0.42 ± 0.002*
RGSE 0.25 mg/ml	0.37 ± 0.004	0.37 ± 0.006*	0.40 ± 0.006	0.42 ± 0.007*
RGSE 0.5 mg/ml	0.37 ± 0.003	0.36 ± 0.003*	0.39 ± 0.006*	0.40 ± 0.001*
RGSE 1.0 mg/ml	0.36 ± 0.004	0.35 ± 0.005*	0.38 ± 0.009*	0.40 ± 0.007*

หมายเหตุ: AG =aminoguanidine (positive control)

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (MEAN ± S.E.M., n=3)

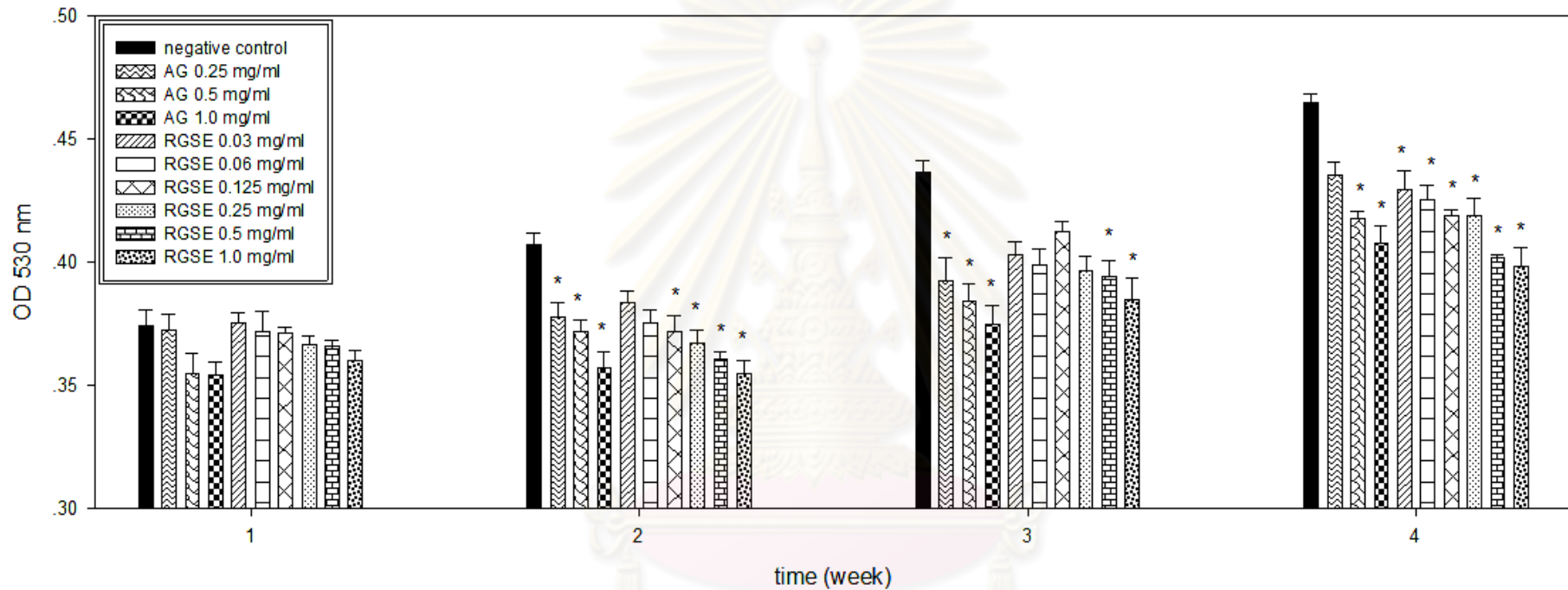
*

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม negative control ในสัปดาห์เดียวกัน

#

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม AG 1.0 mg/ml ในสัปดาห์เดียวกัน

ภาพที่ 4-21 ผลของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง (red grape skin extract; RGSE) ในแต่ละความเข้มข้นต่อการลดปริมาณ cross beta amyloid structure โดยทำการวัดด้วย congo red reagent ในสัปดาห์ที่ 1, 2, 3 และ 4



ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (MEAN \pm S.E.M., n=3)

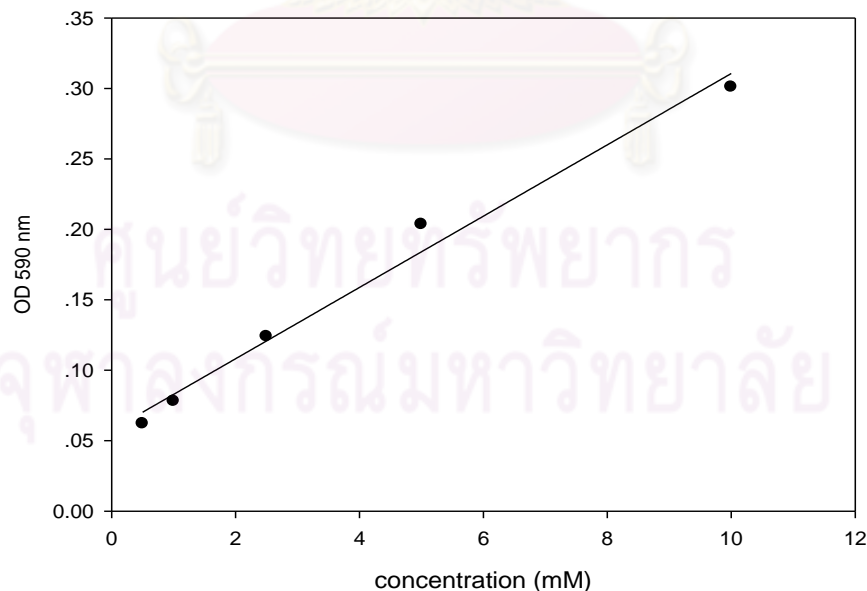
* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม negative control ในสัปดาห์เดียวกัน

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม AG 1.0 mg/ml ในสัปดาห์เดียวกัน

3.5 การวัดค่าการเกิดสารฟรุกโตซามีน

ผลจากการทดสอบสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงในการลดปริมาณสารฟรุกโตซามีนที่เกิดจากกระบวนการไกลเคชัน โดยวัดจาก glycated BSA ที่ incubate ติดต่อกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ คำนวณหาปริมาณฟรุกโตซามีนจากสมการ $y = 0.0716(X) - 0.06$ ของกราฟมาตรฐานจากสาร 1-deoxy-1-morpholino-D-fructose (DMF) ที่ $R^2 = 0.9885$ (ภาพที่ 4-22) พบว่า ปริมาณสารฟรุกโตซามีนของทุกกลุ่มมีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นในแต่ละสัปดาห์ โดยในกลุ่มสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงพบว่า ปริมาณสารฟรุกโตซามีนมีค่าลดลงตามค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงที่ 0.03, 0.06, 0.125, 0.25, 0.5 และ 1 mg/ml ตามลำดับ โดยที่ค่าความเข้มข้น 1 mg/ml มีปริมาณสารฟรุกโตซามีนน้อยที่สุด และเมื่อเทียบกับกลุ่มยา aminoguanidine (positive control) ที่ความเข้มข้นเท่ากันคือ 1 mg/ml พบว่า กลุ่มยา aminoguanidine มีปริมาณสารฟรุกโตซามีนน้อยกว่าแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ในสัปดาห์ที่ 1-3 พบว่า กลุ่มสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงทุกความเข้มข้น มีปริมาณฟรุกโตซามีนน้อยกว่ากลุ่ม negative control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ในสัปดาห์ที่ 4 พบว่า มีเพียงกลุ่มสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงที่ความเข้มข้น 1 mg/ml เท่านั้นที่มีปริมาณฟรุกโตซามีนน้อยกว่ากลุ่ม negative control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 4-12 และรูปที่ 4-23)



ภาพที่ 4-22 กราฟมาตรฐานแสดงค่าการดูดกลืนแสงของ 1-deoxy-1-morpholino-D-fructose (DMF) ในช่วงความเข้มข้น 0.5 – 10 mM (0.125 - 2.5 mg/ml)

ตารางที่ 4-12 ผลของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง (red grape skin extract; RGSE) ในแต่ละความเข้มข้นต่อการลดปริมาณสารฟรุกโตซามีนในสัปดาห์ที่ 1, 2, 3 และ 4

กลุ่มทดลอง	ค่า fructosamine (mg/ml)			
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4
Negative control	1.69 ± 0.03	2.05 ± 0.04	2.30 ± 0.05	2.47 ± 0.06
AG 0.25 mg/ml	1.37 ± 0.37*	1.90 ± 0.03* [#]	2.12 ± 0.03 [#]	2.23 ± 0.06
AG 0.5 mg/ml	1.31 ± 0.02*	1.60 ± 0.06*	2.09 ± 0.02 [#]	2.09 ± 0.06*
AG 1.0 mg/ml	1.26 ± 0.02*	1.53 ± 0.02*	1.84 ± 0.04*	1.97 ± 0.05*
RGSE 0.03 mg/ml	1.57 ± 0.02 [#]	1.99 ± 0.05 [#]	2.11 ± 0.06 [#]	2.40 ± 0.08 [#]
RGSE 0.06 mg/ml	1.46 ± 0.05* [#]	1.85 ± 0.02 [#]	2.00 ± 0.04* [#]	2.37 ± 0.01 [#]
RGSE 0.125 mg/ml	1.48 ± 0.01* [#]	1.69 ± 0.05*	2.09 ± 0.03* [#]	2.35 ± 0.03 [#]
RGSE 0.25 mg/ml	1.44 ± 0.02* [#]	1.69 ± 0.09*	2.05 ± 0.04*	2.28 ± 0.07 [#]
RGSE 0.5 mg/ml	1.35 ± 0.05*	1.66 ± 0.04*	2.00 ± 0.06*	2.21 ± 0.04 [#]
RGSE 1.0 mg/ml	1.35 ± 0.06*	1.55 ± 0.06*	1.91 ± 0.05*	2.02 ± 0.03*

หมายเหตุ : AG = aminoguanidine (positive control)

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (MEAN ± S.E.M., n=3)

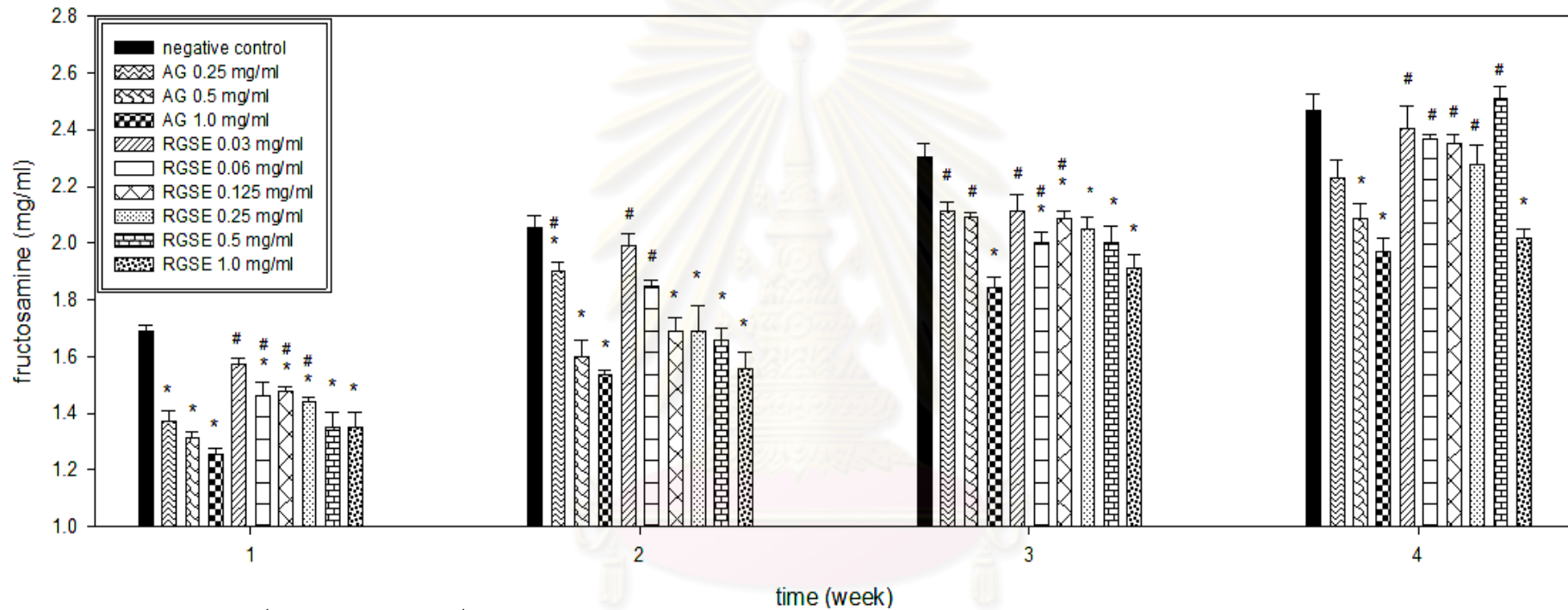
*

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม negative control ในสัปดาห์เดียวกัน

#

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม AG 1.0 mg/ml ในสัปดาห์เดียวกัน

ภาพที่ 4-23 แสดงผลของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง (Red grape skin extract; RGSE) ในแต่ละความเข้มข้นต่อการลดปริมาณสารฟรุกโตซามีนในสัปดาห์ที่ 1, 2, 3 และ 4



ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (MEAN \pm S.E.M., n=3)

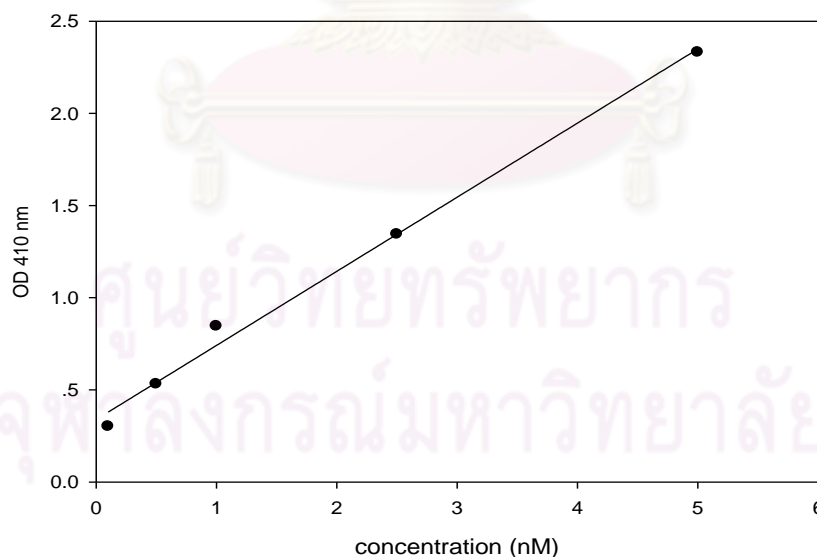
* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม negative control ในสัปดาห์เดียวกัน

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม AG 1.0 mg/ml ในสัปดาห์เดียวกัน

3.6 การวัดปริมาณโปรตีน thiol

ผลจากการทดสอบสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงในการช่วยลดการสูญเสียปริมาณโปรตีน thiol ที่เกิดจากกระบวนการไกลเคชัน โดยวัดจาก glycated BSA ที่ incubate ติดต่อกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ คำนวณหาปริมาณโปรตีน thiol จากสมการ $y = 0.4469(X) - 0.1565$ ของกราฟมาตรฐานจากสาร L-cysteine ที่ $R^2 = 0.9933$ (ภาพที่ 4-24) พบว่าปริมาณโปรตีน thiol ของทุกกลุ่มมีค่าลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นในแต่ละสัปดาห์ โดยในกลุ่มสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงพบว่า ปริมาณโปรตีน thiol มีค่าคงเหลือแปรตามค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงกล่าวคือ ที่ความเข้มข้น 0.03 mg/ml มีค่าโปรตีน thiol ต่ำที่สุด ในขณะที่ค่าความเข้มข้น 1 mg/ml มีปริมาณโปรตีน thiol เหลือมากที่สุดและเมื่อเทียบกับกลุ่มยา aminoguanidine (positive control) ที่ความเข้มข้นเท่ากันคือ 1 mg/ml พบว่า กลุ่มยา aminoguanidine มีปริมาณโปรตีน thiol มากกว่าแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 พบว่า กลุ่มสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงที่ความเข้มข้น 0.25, 0.5 และ 1 mg/ml มีปริมาณโปรตีน thiol มากกว่ากลุ่ม negative control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนในสัปดาห์ที่ 4 พบว่า มีเพียงกลุ่มสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงที่ความเข้มข้น 1 mg/ml เท่านั้นที่มีปริมาณโปรตีน thiol มากกว่ากลุ่ม negative control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 4-13 และรูปที่ 4-25)



ภาพที่ 4-24 กราฟมาตรฐานแสดงค่าการดูดกลืนแสงของ L-cysteine ในช่วงความเข้มข้น 0.1– 5 nM

ตารางที่ 4-13 ผลของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง (red grape skin extract; RGSE) ในแต่ละความเข้มข้นต่อการช่วยลดการสูญเสียปริมาณโปรตีน thiol ในสัปดาห์ที่ 1, 2, 3 และ 4

กลุ่มทดลอง	ค่า protein thiol (nmolthiol/mg protein)			
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4
Negative control	2.31 ± 0.06	1.71 ± 0.10	1.12 ± 0.10	0.69 ± 0.14
AG 0.25 mg/ml	2.34 ± 0.10	2.22 ± 0.09*	1.48 ± 0.05 [#]	1.06 ± 0.09
AG 0.5 mg/ml	2.51 ± 0.09	2.35 ± 0.07*	1.59 ± 0.09* [#]	1.09 ± 0.09
AG 1.0 mg/ml	2.75 ± 0.05	2.52 ± 0.13*	2.16 ± 0.07*	1.40 ± 0.12*
RGSE 0.03 mg/ml	2.29 ± 0.08 [#]	2.04 ± 0.09 [#]	1.57 ± 0.09* [#]	0.83 ± 0.17
RGSE 0.06 mg/ml	2.33 ± 0.09	2.15 ± 0.11	1.61 ± 0.11* [#]	0.88 ± 0.08
RGSE 0.125 mg/ml	2.51 ± 0.07	2.16 ± 0.06	1.53 ± 0.07	0.97 ± 0.15
RGSE 0.25 mg/ml	2.41 ± 0.13	2.26 ± 0.08*	1.56 ± 0.08*	0.94 ± 0.07
RGSE 0.5 mg/ml	2.60 ± 0.10	2.37 ± 0.10*	1.63 ± 0.10*	1.04 ± 0.12
RGSE 1.0 mg/ml	2.64 ± 0.10	2.38 ± 0.08*	1.95 ± 0.07*	1.31 ± 0.18*

หมายเหตุ: AG =aminoguanidine (positive control)

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (MEAN ± S.E.M., n=3)

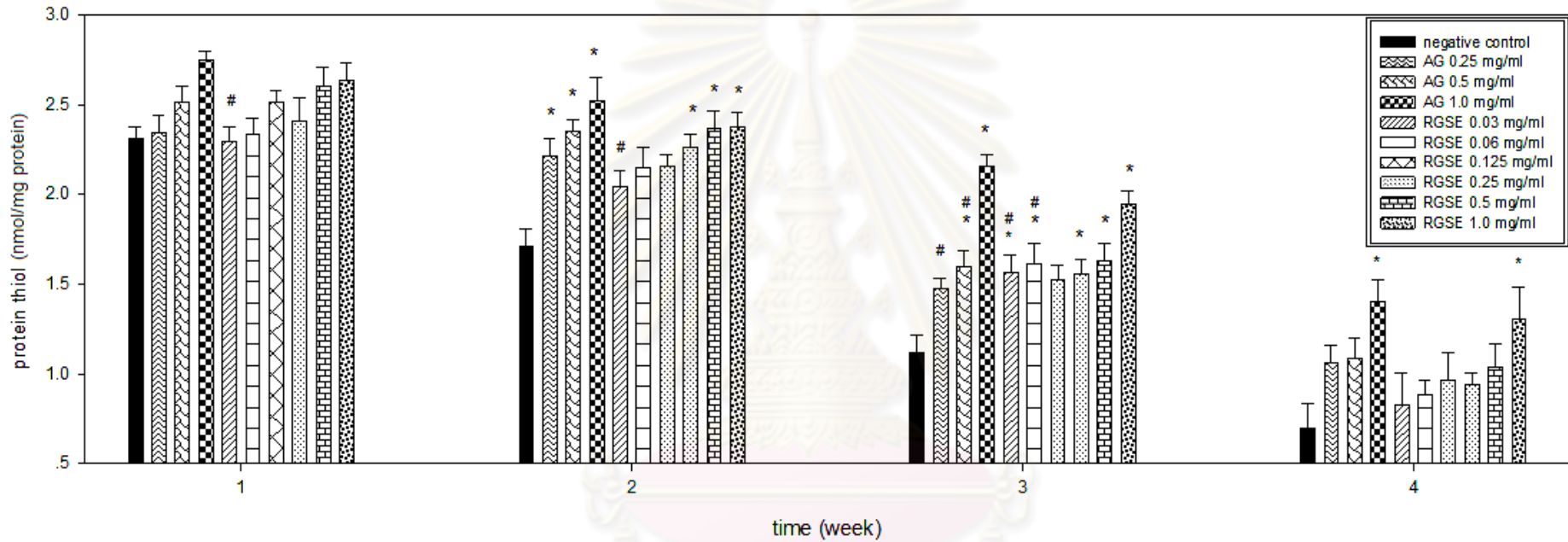
*

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม negative control ในสัปดาห์เดียวกัน

[#]

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม AG 1.0 mg/ml ในสัปดาห์เดียวกัน

ภาพที่ 4-25 ผลของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง (red grape skin extract; RGSE) ในแต่ละความเข้มข้น ต่อการช่วยลดการสูญเสียปริมาณโปรตีนthiolในสัปดาห์ที่ 1, 2, 3 และ 4



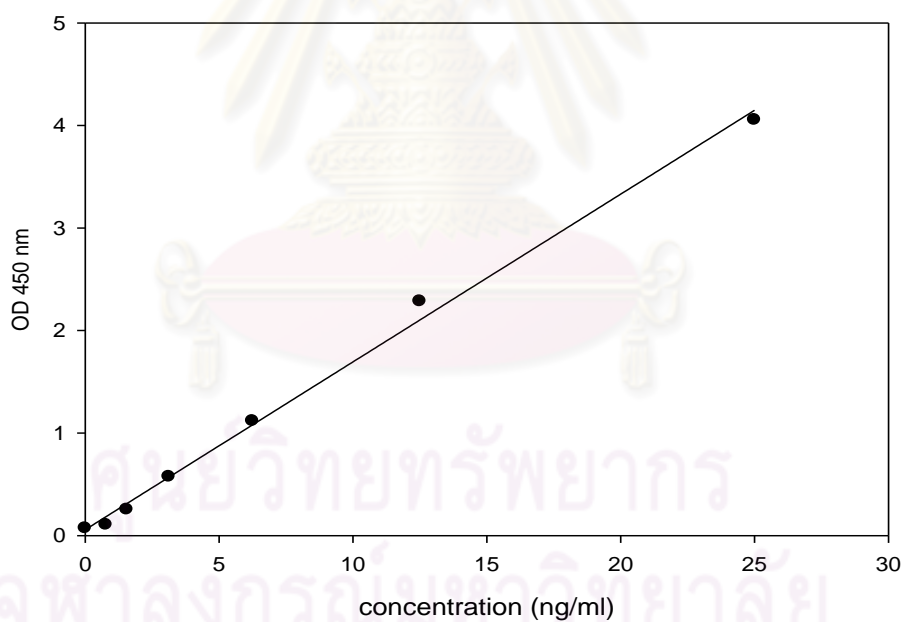
ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (MEAN±S.E.M., n=3)

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม negative control ในสัปดาห์เดียวกัน

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม AG 1.0 mg/ml ในสัปดาห์เดียวกัน

3.7 การวัดค่าการเกิด N^E - (carboxymethyl) lysine (CML)

ผลจากการทดสอบสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงในการลดปริมาณ CML ที่เกิดจากกระบวนการไกลเคชัน โดยวัดจาก glycated BSA ที่ incubate นาน 4 สัปดาห์ คำนวณหาปริมาณ CML จากสมการ $y = 0.1636(X) - 0.0578$ ของกราฟมาตรฐานจากสาร BSA-CML ที่ $R^2 = 0.996$ (ภาพที่ 4-26) พบว่า ปริมาณ CML ของทุกกลุ่มมีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นในแต่ละสัปดาห์ โดยกลุ่มสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงพบว่า ปริมาณ CML มีค่าลดลงตามค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงที่ 0.25, 0.5 และ 1 mg/ml ตามลำดับ โดยที่ค่าความเข้มข้น 1 mg/ml มีปริมาณ CML น้อยที่สุด และเมื่อเทียบกับกลุ่มยา aminoguanidine (positive control) ที่ความเข้มข้นเท่ากันคือ 1 mg/ml พบว่า กลุ่มยา aminoguanidine มีปริมาณ CML น้อยกว่าแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และกลุ่มสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงความเข้มข้นที่ 0.5 และ 1 mg/ml มีปริมาณ CML น้อยกว่ากลุ่ม negative control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) (ตารางที่ 4-14 และรูปที่ 4-27)

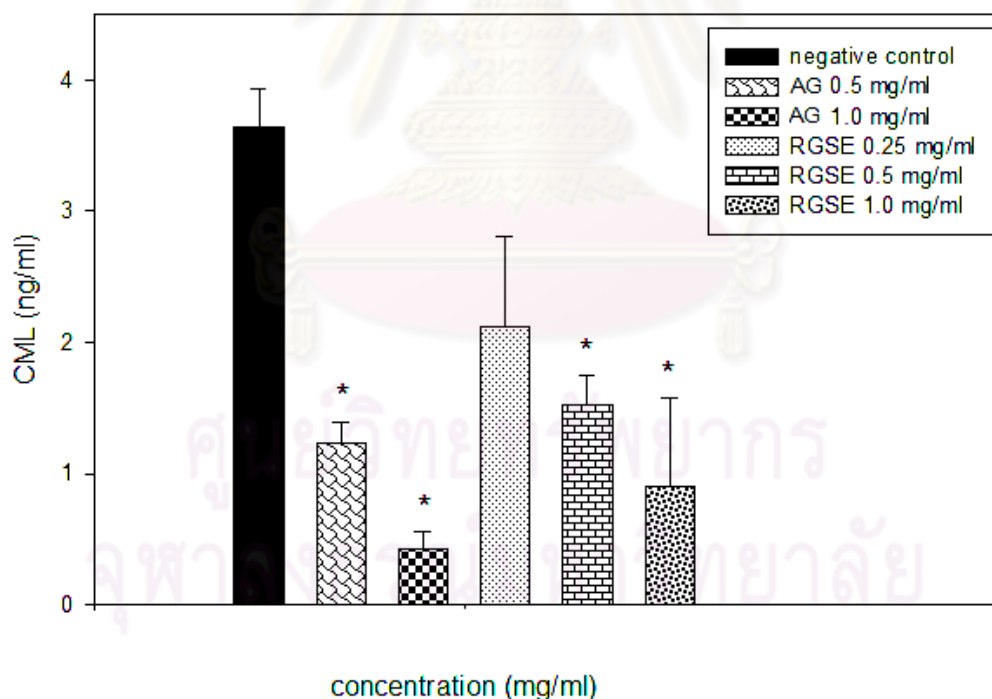


ภาพที่ 4-26 กราฟมาตรฐานแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสาร BSA-CML ในช่วงความเข้มข้น 0 – 25 ng/ml

ตารางที่ 4-14 แสดงผลของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง (red grape skin extract; RGSE) ในแต่ละความเข้มข้นต่อการลดปริมาณ CML ในสัปดาห์ที่ 4

กลุ่มทดลอง	ค่า CML (ng/ml)
	สัปดาห์ที่ 4
Negative control	3.636±0.30
AG 0.5 mg/ml	1.228±0.16*
AG 1.0 mg/ml	0.429±0.13*
RGSE 0.25 mg/ml	2.118±0.69
RGSE 0.5 mg/ml	1.523±0.23*
RGSE 1.0 mg/ml	0.898±0.21*

ภาพที่ 4-27 ผลของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง (red grape skin extract; RGSE) ในแต่ละความเข้มข้นต่อการลดปริมาณ CML ในสัปดาห์ที่ 4



หมายเหตุ: Aminoguanidine (positive control) แทนค่าด้วย AG

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (MEAN±S.E.M., n=3)

*

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม negative control

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม AG 1.0 mg/ml

บทที่ 5

อภิปรายผล สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ระดับน้ำตาลในเลือดสูงเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดภาวะแทรกซ้อนเรื้อรังในเบาหวาน เนื่องจากเซลล์และเนื้อเยื่อของร่างกายต้องอยู่ในสภาพที่มีระดับน้ำตาลสูงอย่างเรื้อรัง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์และสุดท้ายส่งผลให้เกิดความเสียหายจากความเป็นพิษของกลูโคส (glucose toxicity) โดยกลไกหลักๆที่เกี่ยวข้องได้แก่ การเกิด polyol pathway ที่มากขึ้น การเพิ่มขึ้นของ DAG อันเนื่องมาจากการทำงานของ protein kinase C การเพิ่มขึ้นของ hexoamine pathway และการเกิดกระบวนการไกลเคชั่น (Koya and King, 1998; Sheetz and King, 2002; Brownlee, 2001; Pennathur et al., 2001) ซึ่งในปัจจุบันวงการแพทย์ให้ความสนใจต่อกระบวนการไกลเคชั่น เนื่องจากกระบวนการดังกล่าวเกี่ยวข้องกับ การเกิดปฏิกิริยาไกลคอกซิเดทีฟ (glycoxidative reaction) ซึ่งทำให้โปรตีนเสียหายและ AGEs ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของกระบวนการไกลเคชั่น จัดว่าเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงของระบบการทำงานต่างๆของร่างกายและทำให้เกิดพยาธิสภาพต่างๆตามมาในที่สุด เช่น การเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็งตัว การเพิ่มขึ้นของ permeability ของหลอดเลือด และการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระ เป็นต้น โดยกระบวนการไกลเคชั่นทำให้เกิดความเสียหายของโปรตีนผ่านทาง 3 สาเหตุหลักคือ 1) amadori pathway 2) สารประกอบคาร์บอนิล และ 3) อนุมูลอิสระ ROS (Ardestani and Yazdanparast, 2007) นอกจากนี้น้ำตาลกลูโคสยังสามารถเกิดปฏิกิริยาออกไซด์ออกซิเดชัน (autoxidation) ร่วมกับโลหะหนัก เกิดเป็นอนุมูลไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และสารคีโตอัลดีไฮด์ออกมา (Hunt et al., 1988)

อนุมูลอิสระ ROS เกี่ยวข้องกับกระบวนการไกลเคชั่นในขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาออกไซด์ออกซิเดชันของน้ำตาลรีดิวซิ่งหรือปฏิกิริยาไกลคอกซิเดชันของ amadori product ซึ่งทั้ง 2 ปฏิกิริยาเกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและมีการถ่ายทอดประจุกับไอออนของโลหะเกิดขึ้น เกิดเป็นสารประกอบคาร์บอนิลและอนุมูลไฮดรอกซิลเพอร์ออกไซด์ขึ้นมา ซึ่งโลหะต่างๆ เช่น ธาตุเหล็กหรือทองแดง จะเข้ามาทำปฏิกิริยาเฟนตันกับอนุมูลไฮดรอกซิลเพอร์ออกไซด์และเกิดเป็นอนุมูลไฮดรอกซิล ซึ่งเป็นสารออกซิไดซ์แรงสูง สามารถก่อความเสียหายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อ (Wolff and Dean, 1987; Reddy and Beyaz, 2009) ดังนั้นสารที่มีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันจึงสามารถยับยั้งปฏิกิริยาไกลเคชั่นที่เกี่ยวข้องกับอนุมูลอิสระ ผ่านทางการดักจับอนุมูลอิสระและโลหะหนัก

องุ่นประกอบด้วยสารสำคัญคือ สารประกอบฟีนอลิก ซึ่งอาจแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มกว้างๆ กลุ่มที่ 1 คือ กลุ่มสารฟลาโวนอยด์ ได้แก่ สารฟลาโวนอลส์ สารฟลาโวน-3-อลส์ สารโปรแอนโทไซยานิน และสารแอนโทไซยานิน และกลุ่มที่ 2 คือ สารที่ไม่ใช่สารฟลาโวนอยด์ ได้แก่ สารไฮดรอกซีเบนโซอิก และกรดไฮดรอกซีซินามิก (Iacopini et al., 2008) ซึ่งส่วนเปลือกองุ่นประกอบด้วยสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ สารฟลาโวนอลส์ เช่น เคอร์เซติน แคมเฟอรอล รวมทั้งสารโปรแอนโทไซยานิน และสารแอนโทไซยานิน ซึ่งสารแอนโทไซยานินจัดเป็นสารสำคัญของกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่ส่วนเปลือกองุ่น โดยแอนโทไซยานินที่พบ ได้แก่ 3-glucosides, 3-acetylglucosides, 3-coumaroylglucosides, 3-caffeoyl-glucosides, 3,5-diglucosides, 3-acetyl-5-diglucosides, 3-coumaroyl-5-diglucosides และ 3-caffeoyl-5-diglucosides of cyanidin, delphinidin, peonidin, petunidin และ malvidin (Cantos et al., 2002; Mattivi et al., 2006) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งนี้ โดยพบว่า สารสกัดจากเปลือกขององุ่นแดงมีส่วนประกอบของสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ สารฟลาโวนส์และฟลาโวนอลส์ สาร condensed tannin หรือสารโปรแอนโทไซยานิน และสารแอนโทไซยานิน ซึ่งผลการหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ชี้ให้เห็นว่า สารสกัดจากเปลือกขององุ่นแดงมีส่วนประกอบของสารที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระในปริมาณที่สูง

สารประกอบฟีนอลิกที่พบในองุ่นมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ โดยสามารถดักจับอนุมูลอิสระ ดักจับไอออนของโลหะยับยั้งการเกิดลิปิดเพอร์ออกซิเดชัน ช่วยลดการเกิดอนุมูลไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ นอกจากนี้ สารประกอบฟีนอลิกยังทำหน้าที่ทั้งเป็นสารให้อิเล็กตรอนหรือเป็นตัวให้ไฮโดรเจนและกำจัดออกซิเจนที่อยู่ในรูปแอกทีฟได้ด้วย จากหน้าที่ต่างๆดังกล่าวจึงทำให้สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารต้านออกซิเดชันที่สำคัญ (Sato et al,1996; Meyer et al,1997; Soobrattee et al, 2005) สำหรับในส่วนเปลือกองุ่นแดงสารสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระคือ สารประกอบฟลาโวนอยด์ ได้แก่ สารแอนโทไซยานิน สารฟลาโวน-3-อลส์ สารฟลาโวน-3-อลส์ สารฟลาโวนส์และสารฟลาโวนอลส์ (Rice-Evan et al, 1997) โดยกลไกการต้านอนุมูลอิสระของฟลาโวนอยด์จะเป็นไปตามรูปแบบทั่วไปของสารประกอบฟีนอลิก กล่าวคือ ตำแหน่ง 3 และ 4 - ไฮดรอกซิลของวงแหวน B จะเป็นตำแหน่งที่สำคัญ โดยมีผลทำให้ฟลาโวนอยด์มีคุณสมบัติในการดักจับอนุมูลอิสระและดักจับโลหะหนัก นอกจากนี้การที่มีหมู่ฟังก์ชันไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง C5 ของวงแหวน A หรือตำแหน่ง C3 ของวงแหวน C รวมกับการที่มีกลุ่มคีโตนที่ตำแหน่ง C4 ของวงแหวน C จะทำให้ไวต่อการทำปฏิกิริยากับโลหะซึ่งเป็นการช่วยลดการเกิดออกซิเดชันได้อีกทางหนึ่ง ส่วนตำแหน่ง 3 - ไฮดรอกซิลของวงแหวน C และพันธะคู่ระหว่าง C2 และ C3 ในวงแหวน C จะมีผลเล็กน้อยต่อคุณสมบัติการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (Majo et al., 2005) จากโครงสร้างเหล่านี้ทำ

ให้ฟลาโวนอยด์สามารถกำจัดอนุมูลอิสระด้วยการให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระที่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยจะเข้าไปแย่งทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระอย่างรวดเร็วกว่าสารตั้งต้นตัวอื่นๆ แล้วทำให้ปฏิกิริยาหยุดชะงักลงหรืออาจเข้าไปดักจับกับโลหะหนักที่มีบทบาทในการร่วมสร้างอนุมูลอิสระ ดังนั้นสารแอนโทไซยานินจึงสามารถเป็นตัวต้านอนุมูลอิสระด้วยการให้หมู่ไฮโดรเจนและเป็นตัวดักจับโลหะหนัก รวมทั้งยังช่วยลดอนุมูลไฮดรอกซิลและอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ แต่อย่างไรก็ตาม การลดลงของอนุมูลไฮดรอกซิลไม่ได้เกิดจากถูกดักจับโดยตรง แต่เกิดจากการดักจับโลหะแล้วส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาเฟนตันลดลง อนุมูลไฮดรอกซิลจึงเกิดลดลงตามไปด้วย (Tsuda et al., 1996; Noda, 2000) และจากคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของเปลือกองุ่นดังกล่าวมา จึงมีความเป็นไปได้ว่า เปลือกองุ่นแดงสามารถยับยั้งขบวนการไกลโคเซชันได้ด้วยการทำงานผ่านทางารดักจับอนุมูลอิสระและโลหะหนักในปฏิกิริยาออกไซด์ออกซิเดชันหรือปฏิกิริยาไกลโคออกซิเดชัน

จากการทดลองนี้พบว่า สารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH⁺ และ ABTS^{•+} เนื่องจากมีส่วนประกอบเป็นสารฟลาโวนอยด์ ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยอาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยา hydrogen atom transfer (HAT) ระหว่างอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระกล่าวคือ สารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงจะให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ DPPH⁺ และ ABTS^{•+} ทำให้อนุมูลดังกล่าวมีความเสถียรและไม่สามารถก่อปฏิกิริยาได้อีกต่อไป ส่วนผลจากการทดสอบด้วยวิธี FRAP assay ซึ่งเป็นวิธีทดสอบความสามารถในการการต้านออกซิเดชันโดยอาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์พบว่า สารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงมีคุณสมบัติในการเป็นตัวรีดิวซ์ ทำให้อนุมูลอิสระดังกล่าวมีความเสถียรได้เช่นกัน เช่นเดียวกับผลจากผลการทดสอบเรื่อง ferrous ion chelating power ซึ่งชี้ให้เห็นว่า สารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงมีความสามารถในการดักจับโลหะ นอกจากนี้ยังพบว่า สารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงสามารถดักจับอนุมูลอนุมูลไฮดรอกซิลและอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ได้ แต่อย่างไรก็ตามความสามารถในการต้านอนุมูลไฮดรอกซิลอาจเกิดจากการดักจับโลหะหนัก แล้วยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาเฟนตัน นอกเหนือจากการดักจับอนุมูลไฮดรอกซิลด้วยการให้อิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนอะตอม (Noda, 2000) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าสารฟลาโวนอยด์ รวมทั้งสารแอนโทไซยานินซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ซึ่งพบมากในส่วนเปลือกขององุ่นแดงเป็นสารสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระโดยทำหน้าที่เป็นทั้งตัวดักจับอนุมูลอิสระและดักจับไอออนของโลหะ

AGEs เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการไกลเคชัน ซึ่งเป็นการทำปฏิกิริยาแบบไม่อาศัยเอนไซม์ระหว่างหมู่คาร์บอนของน้ำตาลรีดิวซ์กับหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีน ทำให้เกิด schiff base ขึ้นมา ซึ่งสารตัวนี้เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและสามารถผันกลับได้ แต่ถ้าหากปฏิกิริยายังดำเนินต่อไป schiff base ก็จะมีการเรียงตัวกันใหม่กลายเป็น amadori product ซึ่งมีความคงตัวมากขึ้นแต่ก็สามารถผันกลับได้ amadori product อาจเกิดปฏิกิริยาต่อไป โดยจะเข้าไปทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับหมู่อะมิโนต่างๆ สุดท้ายกลายเป็น AGEs ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความคงตัวไม่สามารถคืนสู่สภาพเดิมได้ โดย AGEs จะไปเชื่อมจับกับโปรตีนตัวอื่นๆแล้วทำให้โปรตีนนั้นเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพและทำให้การทำงานเปลี่ยนไป (Baynes and Thorpe, 1999; Peppas and Vlassara, 2005)

กระบวนการไกลเคชันเป็นปฏิกิริยาที่มีการดำเนินติดต่อกันไปเรื่อยๆ และในแต่ละขั้นตอนของปฏิกิริยาจะมีสารประกอบตัวใหม่เกิดขึ้นมา ซึ่งอาจแบ่งช่วงต่างๆของกระบวนการไกลเคชันออกเป็น 3 ระยะคือ 1) ระยะต้น (early phase) 2) ระยะกลาง (intermediate phase) 3) ระยะท้าย (late phase) ดังนั้นการศึกษานี้จึงทำจากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งกระบวนการไกลเคชัน ด้วยการวัดผลิตภัณฑ์ต่างๆที่เกิดขึ้นในช่วงต่างๆ ของกระบวนการดังกล่าว ได้แก่ การวัดฟรุกโตซามีนซึ่งเป็นสาร amadori product ที่เกิดในช่วงแรกของกระบวนการไกลเคชัน การวัดปริมาณโปรตีนคาร์บอนิลและการวัดปริมาณโปรตีน thiol ที่บ่งชี้ถึงการเกิดโปรตีนออกซิเดชัน (protein oxidation) ปริมาณ cross beta amyloid ที่บ่งชี้ถึงการเกิดการเชื่อมต่อกับโปรตีนอื่นหรือการเกิด protein crosslink รวมทั้งการวัด AGEs ทั้งชนิดเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์และชนิด CML

ฟรุกโตซามีน เป็นสารคีโตเอมีน ซึ่งจัดเป็น amadori product ที่เกิดในช่วงต้นของกระบวนการไกลเคชัน (early glycation) โดยเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาแบบไม่อาศัยเอนไซม์ระหว่างน้ำตาลฟรุกโตสและโปรตีนของ BSA ที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้เกิดการจัดเรียงโครงสร้างใหม่คือ สาร schiff base และ amadori product ตามลำดับซึ่งฟรุกโตซามีนจะเป็นสารตั้งต้นของการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและปฏิกิริยาไกลคอกซิเดชันต่อไป

มีรายงานก่อนหน้านี้พบว่า สาร diethylenetriaminepentacetic acid สามารถลดการเกิด glucose autooxidation ได้เนื่องจากสารดังกล่าวมีความสามารถในการดักจับโลหะหนัก จึงช่วยลดการเกิดพันธะโควาเลนต์ระหว่างน้ำตาลกลูโคสและ BSA ของปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคส (Wolff and Dean, 1987) และมีงานวิจัยหลายผลงานพบว่า สารสกัดจากพืชที่มี

สารประกอบฟีนอลิกสามารถลดปริมาณฟรุกโตซามีนได้ เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกมีความสามารถในการดักจับโลหะหนัก (Wu and Yen, 2005; Wu et al., 2009; Verzelloni et al., 2010) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองนี้คือ สารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงซึ่งมีส่วนประกอบของสารประกอบฟีนอลิกสามารถลดปริมาณฟรุกโตซามีนได้จึงอาจเป็นไปได้ว่า สารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงมีผลต่อกระบวนการไกลเคชันในช่วงก่อนการเกิด amadori product หรือ early glycation เนื่องจากในขั้นตอนการจัดเรียงตัวของสารตัวใหม่ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยากันระหว่างน้ำตาลและหมู่อะมิโน จะมีอนุมูลที่ไม่เสถียรหรือมีอิเล็กตรอนที่ไม่ครบคู่เกิดขึ้นมาด้วย ดังนั้นการนำสารที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเข้าไป จึงช่วยยับยั้งไม่ให้อัตราการจัดเรียงตัวสามารถดำเนินต่อไปได้ และเป็นการช่วยลดปริมาณ amadori product จากการศึกษานี้พบว่าสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงมีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระและดักจับโลหะหนักดังนั้นสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงจึงช่วยลดปริมาณฟรุกโตซามีนได้ โดยการลดการเกิดพันธะโควาเลนต์ระหว่างน้ำตาลกลูโคสและ BSA และช่วยยับยั้งปฏิกิริยาออกไซด์ออกซิเดชันของฟรุกโตสได้อีกทางหนึ่งด้วย

โปรตีนคาร์บอนิลเป็น glycated protein ที่เกิดจากจากโปรตีนออกซิเดชัน (protein oxidation) ที่เกิดในระยะ intermediate ของกระบวนการไกลเคชันและเกี่ยวข้องกับการเกิดอนุมูลอิสระ ROS และภาวะ oxidative stress เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกระบวนการไกลเคชันคือ 1) ปฏิกิริยาออกไซด์ออกซิเดชันของสารเริ่มต้นต่างๆ เช่น น้ำตาล หมู่อะมิโน ไซมันหรือสาร schiff base และ 2) ปฏิกิริยาไกลคอกซิเดชันของ amadori product ซึ่งทั้ง 2 ปฏิกิริยาทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ROS และสารประกอบคาร์บอนิลซึ่งเป็นสาร reactive intermediates หรือ AGEs precursor จากนั้นสารประกอบคาร์บอนิลจะเข้าไปจับกับหมู่อะมิโนอื่นๆ โดยทำให้เกิดการจัดเรียงโครงสร้างใหม่และกลายเป็น AGEs ต่อไป ดังนั้นการเกิดอนุมูลอิสระ ROS จำนวนมาก จึงบ่งชี้ถึงการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน รวมทั้งการเกิดโปรตีนคาร์บอนิลซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญถึงความเสียหายของโปรตีนอันเนื่องมาจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Stadtman and Levin, 2000) ในขณะที่โปรตีน thiol เป็นโปรตีนอิสระที่มีส่วนประกอบเป็นหมู่อะมิโน cysteine และมีความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ เมื่อโปรตีน thiol เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับผลิตภัณฑ์ต่างๆจากกระบวนการไกลเคชัน หรือเกิดโปรตีนออกซิเดชัน จะส่งผลให้โปรตีน thiol สูญเสียสภาพเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและนอกจากนี้ยังมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นขึ้นมาด้วย ซึ่งหากเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นจำนวนมากก็จะเกิดภาวะ oxidative stress การลดลงหรือการสูญเสียโปรตีน thiol จึงเป็นการบ่งชี้ถึงความรุนแรงของกระบวนการไกลเคชันเนื่องจากโปรตีนออกซิเดชันอีกทางหนึ่ง (Telci et al., 2000)

สารประกอบฟีนอลิก เช่น สารฟลาโวนอยด์ ซึ่งเป็นสารต้านออกซิเดชัน สามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกไซด์ออกซิเดชันหรือปฏิกิริยาไกลคอกซิเดชัน รวมทั้งช่วยดักจับอนุมูลอิสระ ROS จึงสามารถช่วยลด protein oxidation ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโปรตีนคาร์บอนิลและการสูญเสียโปรตีน thiol รวมทั้งช่วยลดการเกิด oxidative stress ได้ (Ardestani and Yazdanparast, 2007) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองนี้ คือสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงช่วยลดปริมาณโปรตีนคาร์บอนิล และสามารถลดการสูญเสียโปรตีน thiol ได้ เนื่องจากสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงมีส่วนประกอบของสารฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชัน จึงอาจสรุปได้ว่า สารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงสามารถยับยั้งกระบวนการไกลเคชันในระยะ intermediate glycation ได้ โดยช่วยลดปริมาณโปรตีนคาร์บอนิล เนื่องจากสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงมีส่วนประกอบของสารฟลาโวนอยด์ จึงสามารถยับยั้งการเกิดโปรตีนคาร์บอนิลผ่านทางกระบวนการต้านอนุมูลอิสระคือการลดการเกิดปฏิกิริยาออกไซด์ออกซิเดชันหรือปฏิกิริยาไกลคอกซิเดชัน ทำให้ช่วยลดการเกิด protein oxidation ได้ โดยระดับของโปรตีนคาร์บอนิลและโปรตีน thiol จะแปรผันตามความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง กล่าวคือ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นก็จะช่วยลดปริมาณโปรตีนคาร์บอนิลและช่วยลดการสูญเสียโปรตีน thiol ได้ดีขึ้น

cross beta amyloid structure เกิดจากปฏิกิริยาไกลเคชันระหว่างโปรตีน amyloid และน้ำตาลฟรุกโตส ทำให้โปรตีน amyloid มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจากโปรตีนทุติยภูมิที่มีโครงสร้างเป็นเกลียวหรือลักษณะของ helical protein เกิดการยึดออกเป็นแผ่นหรือ beta sheet แทนกลายเป็น cross beta amyloid structure ซึ่งโปรตีนตัวนี้สามารถไปทำให้เกิดปฏิกิริยาไกลเคชันหรือเกิดการเชื่อมต่อกับ amyloid ตัวอื่นได้ต่อไปเรื่อยๆ และเมื่อมีการสะสมของ beta sheet มากขึ้น ก็จะเกิดการเกาะกลุ่มเป็นไฟบริลที่ไม่ละลายน้ำและกลายเป็น amyloid plaque ที่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่างๆต่อไป (Sasaki et al., 1998)

มีการรายงานก่อนหน้านี้พบว่า ปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นขั้นตอนสำคัญที่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ต่างๆ ของกระบวนการไกลเคชัน รวมทั้ง AGEs (Prasad et al., 2004) ซึ่งในการศึกษาค้นคว้าพบว่า สารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงสามารถยับยั้งการเกิด AGEs และ protein crosslink หรือปริมาณ cross beta amyloid structure ได้ เนื่องจากสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงมีส่วนประกอบของสารฟลาโวนอยด์ รวมทั้งสารแอนโทไซยานิน ซึ่งมีความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน จึงสามารถยับยั้งการเกิดผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไกลเคชัน ด้วยการลดปฏิกิริยา

ออกได้ออกซิเดชันและปฏิกิริยาไกลคอกซิเดชัน ทำให้มีสารตั้งต้นหรือสารประเภท reactive intermediates ลดลง ส่งผลให้ปริมาณของ AGEs ลดลง และลดการเกิด crosslink ของหมู่อะมิโนได้ในที่สุด ส่วนการตรวจวัดด้วย thioflavin T reagent และ congo red reagent พบว่า การวัดทั้ง 2 แบบให้ผลการทดลองไปในทางเดียวกัน โดยพบว่า ระดับการลดลงของปริมาณ cross beta amyloid structure จะแปรผันตามความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกกุ้งแดง กล่าวคือ เมื่อเพิ่มความเข้มข้น ก็จะเพิ่มการยับยั้งปริมาณ cross beta amyloid structure

CML เป็น AGEs ที่เกิดจากโปรตีนเดี่ยวประกอบด้วยหมู่อะมิโนไลซีนและหมู่อาร์จินีน ถูกทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเนื่องจากปฏิกิริยาไกลคอกซิเดชันของ amadori product หรือเกิดจากสารประกอบคาร์บอนิล ซึ่งเป็นสาร reactive intermediates หรือ AGEs precursor AGEs ชนิด CML จัดเป็น AGEs กลุ่มใหญ่และมีบทบาทสำคัญในการก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่างๆในคน โดยมีรายงานการตรวจพบ CML ในพลาสมา เนื้อเยื่อไต เรตินา คอลลาเจน ในผู้ป่วยโรคเบาหวาน (Peyroux & Sternberg, 2006) รวมทั้งเซลล์ประสาทรวมทั้งภายในเซลล์ประสาทของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ (Cervantes-Lauren et al., 2006)

มีรายงานก่อนหน้านี้พบว่า สารสกัดจากพืชที่มีส่วนประกอบของสารฟลาโวนอยด์ซึ่งมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระสามารถยับยั้งกระบวนการไกลเคชัน โดยสามารถช่วยลดการเกิด CML (Verzelloni et al., 2010) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษานี้ คือสารสกัดจากเปลือกกุ้งแดงสามารถยับยั้งกระบวนการไกลเคชัน โดยสามารถช่วยลดการเกิด CML ได้ เนื่องจากสารสกัดจากเปลือกกุ้งแดงมีส่วนประกอบของสารฟลาโวนอยด์ รวมทั้งสารแอนโทไซยานินซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ ซึ่งเป็นไปในทางเดียวกับกับผลการทดลองเรื่องการลดลงของ AGEs ชนิดเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ และระดับการลดลงของ AGEs ทั้ง 2 ชนิดจะแปรผันตามความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกกุ้งแดง กล่าวคือ เมื่อเพิ่มความเข้มข้น ก็จะเพิ่มการยับยั้ง AGEs

สรุปผลการวิจัย

สารสกัดจากเปลือกขององุ่นแดงซึ่งมีส่วนประกอบของสารฟลาโวนอยด์ โดยเฉพาะสารแอนโทไซยานิน มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและสามารถยับยั้งกระบวนการไกลเคชั่นได้ด้วยการทำงานผ่านทาง การดักจับอนุมูลอิสระและโลหะหนักในปฏิกิริยาออกได้ออกซิเดชั่นหรือปฏิกิริยาไกลคอกซิเดชั่น โดยสารสกัดจากเปลือกขององุ่นแดงสามารถลดปริมาณฟรุกโตซามีน ลดการเกิดโปรตีนออกซิเดชั่น ลดการเกิด protein crosslink รวมทั้งช่วยลดปริมาณ AGEs ทั้งชนิดเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์และ CML

ข้อเสนอแนะ

การวิเคราะห์สารพิษเคมีอาจทำการศึกษาเพิ่มเติมด้วยวิธี High-performance liquid chromatography (HPLC) รวมทั้งสารประกอบอื่นๆ อันจะนำไปสู่การศึกษาเชิงลึกถึงองค์ประกอบย่อยใดในเปลือกองุ่นต่อไป และการตรวจวัดมวลโปรตีนของผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการไกลเคชั่นอาจใช้วิธี western blot ร่วมกับการทำ sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ด้วยเพื่อให้ข้อมูลของการวิจัยที่สมบูรณ์ยิ่งขึ้น และนอกจากนี้ อาจทำการศึกษาเพิ่มเติมในเชิง *in vivo* เพื่อหาข้อมูลในการนำไปประยุกต์ใช้ทางคลินิกต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

- โสภา วัชรคุปต์, ปรีชา บุญจุง, จันทนา บุญยะรัตน์ และมาลีรักษ์ อัดดีลินทอง. 2549. สารต้านอนุมูลอิสระ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: พี.เอส.พี. 101-106.
- Al-Awwadi, N.A., Araiz, C., Bornet, A., Delbosc, S., Cristol, J.P., Linck, N., Azay, J., Teissedre, P.L. and Cros, G. 2005. Extracts enriched in different polyphenolic families normalize increased cardiac NADPH oxidase expression while having differential effects on insulin resistance, hypertension, and cardiac hypertrophy in high-fructose-fed rats. *J. Agric. Food Chem.* 53: 151-157.
- Ames, B.M., Shinena, M.K., and Hagen, T.M. 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative disease of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 7915-7922.
- Anderson, D. W., Julian, E. A., Kepner, R.E. and Webb, A.D. 1970. Chromatographic investigation of anthocyanin pigments in *Vitis cinerea*. *Phytochemistry.* 9: 1569-1578.
- Ardestani, A. and Yazdanparast, R. 2007. Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Teucrium polium* on *in vitro* protein glycoxidation. *Food Chem Toxicol.* 45: 2402-2411.
- Arora, A., Nair, M.J. and Strasburg, G.M. 1998. Structure–Activity Relationships for Antioxidant Activities of a Series of Flavonoids in a Liposomal System. *Free Radic Bio Med.* 28(9): 1355-1363.
- Bagchi, D., Bagchi, M., Stohs, S., Ray, S.D., Sen, C.K. and Preuss, H.G. 2002. Cellular protection with proanthocyanidins derived from grape seeds. *Ann. NY Acad. Sci.* 957: 260–270.
- Benzie, I.F. and Strains, J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of Antioxidant Power : the FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239: 70–76.

- Blois, M.S., 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*. 181: 1199–1200.
- Bonnefont, R.D. 2002. Glucose and reactive oxygen species. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 5: 561- 568.
- Broadhurst, R.B. and Jones, W.T. 1978. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *J. Sci. Food Agric*. 29: 788-794.
- Brownlee, M. 1995. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu. Rev. Med*. 146: 223–234.
- Bucciarelli, L.G., Wendt, T., Qu, W., Lu, Y., Lalla, E., Rong, L.L., Goova, M.T., Moser, B., Kislinger, T., Lee, D.C., Kashyap, Y., Stern, D.M. and Schmidt. A.M. 2002. RAGE blockade stabilizes established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice. *Circulation*. 106: 2827–2835.
- Cantos, E., Espin, J.C. and Thomas-Barberan, F.A. 2002. Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC-DAD-MS-MS. *J. Agric. Food Chem*. 50: 5691–5696.
- Cervantes-Lauren, D., Schramm, D.D., Jacobson, E.L., Halaweish, I., Bruckner, G.G., and Boissonneault, G.A. 2006. Inhibition of advanced glycation end product formation on collagen by rutin and its metabolites. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 17: 531-540.
- Dell, A.M., Galli, G.V., Vrhovsek, U., Mattivi, F. and Bosisio, E. 2005. *In vitro* inhibition of human cGMP-specific phosphodiesterase-5 by polyphenols from red grapes. *J. Agric. Food Chem*. 53: 1960–1965.
- Falchi, M., Bertelli, A., Scalzo, R.L., Morassut, M., Morelli, R., Das, S., Cui, J.H. and Das, D.K. 2006. Comparison of cardioprotective abilities between the flesh and skin of grapes. *J. Agric. Food Chem*. 54: 6613–6622.

- Farrar, J.L., Hartle, D.K., Hargrove, J.L. and Greenspan, P. 2007. Inhibition of protein glycation by skins and seeds of the muscadine grape. *Biofactors*. 30: 193-200.
- Feldman, E.C. and Nelson, R.W. 1996. Canine diabetes mellitus. In: *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. 2nd ed. R.W. Nelson (ed.) Philadelphia: WB saunders. 330-391.
- Fisman, E.Z. and Tenenbaum, A. 2008. Cardiovascular Diabetology: Clinical, Metabolic and Inflammatory Facets. *Adv Cardiol*. 45: 1–16.
- Fuleki, T. and Francis, F. 1968. Quantitative Methods for anthocyanins. Determination of total anthocyanins and degradation index for cranberry juice. *J. Food Sci*. 33: 78-83.
- Garbacki, N., Angenot, L., Bassleer, C., Damas, J. and Tits, M. 2002. Effects of prodelfinidins isolated from *Ribes nigrum* on chondrocyte metabolism and COX activity. *Naunyn- Schmied. Arch. Pharmacol*. 365: 434–441.
- Goldin, A., Beckman, J.A., Schmidt, A.M. and Creager, M.A. 2006. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*. 114: 597–605.
- Gugliucci, A. 2000. Glycation as the glucose link to diabetic complications. *J. Am. Osteopath. Assoc*. 100: 621-634.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. and Aruoma, O.I. 1987. The deoxyribose method: a simple “test-tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal. Biochem*. 165: 215–219.
- Halliwell, B., Cross, C.E. and Gutteridge, J.M.C. 1992. Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now?. *J Lab Clin Med*. 119: 598–620.

- Halliwell, B. 1995. Antioxidant characterization; methodology and mechanism. *Biochem Pharmacol.* 49: 1341–1348.
- Hanamura, T., Hagiwara, T. and Kawagishi, H. 2005. Structural and Functional Characterization of Polyphenols Isolated from Acerola (*Malpighia emarginata* DC.) Fruit. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69: 280-286.
- Harris, C.S., Beaulieu, L.P., Fraser, M.H., McIntyre, K.L., Owen, P.L., Martineau, L.C., Cuerrier, A., Johns, T., Haddad, P.S., Bennett, S.A.L. and Arnason, J.T. 2010. Inhibition of Advanced Glycation End Product Formation by Medicinal Plant Extracts Correlates with Phenolic Metabolites and Antioxidant Activity. *Planta Med* [Epub ahead of print]
- Hudson, T.S., Hartle, D.K., Hursting, S.D., Nunez, N.P., Wang, T.T.Y., Young, H.A., Arany, P. and Green, J.E. 2007. Inhibition of prostate cancer growth by muscadine grape skin extract and resveratrol through distinct mechanisms. *Cancer Res.* 67: 8396–8405.
- Hunt, J.V., Dean, R.T. and Wolff, S.P. 1988. 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: 205–212.
- Iacopini, P., Baldi, M., Storchi, P. and Sebastiani, L. 2008. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, *in vitro* antioxidant activity and interactions. *J. Food Comp. Anal.* 21: 589-598.
- Kano, M., Takayanagi, T., Harada, K., Makino, K. and Ishikawa, F. 2005. Antioxidative activity of anthocyanins from purple sweet potato, Ipomoera batatas cultivar Ayamurasaki. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.* 69(5): 979-988.

- Khalifah, R.G., Baynes, J.W. and Hudson, B.G. 1999. Biochem Biophys Res Commun. 257: 251–258.
- Kirstein, M., Brett, J., Radoff, S., Ogawa, S., Stern, D. and Vlassara, H. 1990. Advanced protein glycosylation induces transendothelial human monocyte chemotaxis and secretion of platelet-derived growth factor: role in vascular disease of diabetes and aging. Proc Natl Acad Sci USA. 87: 9010–9014.
- Kong, J.M., Chia, L.S., Goh, N.K., Chia, T.F. and Brouillard, R. 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. Phytochemistry. 64: 923–933.
- Koya, D. and King, G.L. 1998. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. Diabetes. 47: 859–866.
- Kweon, M.H., Hwang, H.J. and Sung, H.C. 2001. Identification and Antioxidant Activity of Novel Chlorogenic Acid Derivatives from Bamboo (*Phyllostachys edulis*). J. Agric. Food Chem. 49: 4646–4655.
- Lin, L.C., Kuo, Y.C. and Chou, C.J. 2002. Immunomodulatory proanthocyanidins from *Ecdysanthera utilis*. J. Nat. Prod. 65: 505–508.
- Madhujith, T., Izydorczyk, M. and Shahidi, F. 2006. Antioxidant properties of pearled barley fractions. J. Agric. Food Chem. 54: 3283–3289.
- Majo, D.D., Giammanco, M., La Guardia, M., Tripoli, E., Giammanco, S. and Finotti, E. 2005. Flavanones in Citrus fruit: Structure-antioxidant activity relationships. Food Res. Intern. 38: 1161-1166.
- Matsui, T., Ebuchi, S., Kobayashi, M., Fukui, K., Sugita, K., Terahara, N. and Matsumoto, K. 2002. Anti-hyperglycemic effect of diacylated anthocyanin derived from *Ipomoea batatas* cultivar Ayamurasaki can be achieved through the alpha-glucosidase inhibitory action. J. Agric. Food Chem. 50: 7244–7248.

- Mattivi, F., Guzzon, R., Vrhovsek, U., Stefanini, M. and Velasco, R. 2006. Metabolite Profiling of Grape: Flavonols and Anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 54: 7692-7702.
- Meyer, A.S., Yi, O.S., Pearson, D.A., Waterhouse, A.L. and Frankel, E.N. 1997. Inhibition of Human Low-Density Lipoprotein Oxidation in Relation to Composition of Phenolic Antioxidants in Grapes (*Vitis vinifera*). *J. Agric. Food Chem.* 45(5): 1638–1643.
- Middleton, E. Jr., Kandaswami, C. and Theoharides, T.C. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol. Rev.* 52: 673–751.
- Miyata, T., Ypersele, V. and Strihou, C. 2003. Angiotensin II receptor blockers and angiotensin converting enzyme inhibitors: implication of radical scavenging and transition metal chelation in inhibition of advanced glycation end product formation. *Arch. Biochem. Biophys.* 419: 50–54.
- Mukai, K., Tokunaga, A., Itoh, S., Kanesaki, Y., Ohara, K., Nagaoka, S. and Abe, K. 2007. Structure-activity relationship of the free-radical-scavenging reaction by vitamin E (alpha-, beta-, gamma-, delta-tocopherols) and ubiquinol-10: pH dependence of the reaction rates. *J Phys Chem B Condens Matter Mater Surf Interfaces Biophys.* 111: 652–662.
- Nelson, R.W., Himsel, C.A., Feldman, E.C. 1990. Glucose tolerance and insulin response in normal-weight and obese cats. *Am J Vet Res.* 51:1357–1362.
- Noda, Y., Kaneyuki, T., Igarashi, K., Mori, A. and Packer, L. 1998. Antioxidant activity of nasunin, an anthocyanin in eggplant. *Res Comm Mol Pathol Pharmacol.* 102(2): 175–187.
- Pedrielli, P., Pedulli, G.F. and Skibsted, L.F. 2001. Antioxidant mechanism of flavonoids. Solvent effect on rate constant for chain breaking reaction of quercetin and epicatechin in autoxidation of methyl linoleate. *J. Agric. Food Chem.* 6: 3034-3040.
- Peppas, M., Brem, H., Ehrlich, P., Zhang, J.G., Cai, W., Li, Z., Croitoru, A., Thung, S. and Vlassara, H. 2003. Adverse effects of dietary glycotoxins on wound healing in genetically diabetic mice. *Diabetes.* 52: 2805-2813.

- Peyroux, J. and Sternberg, M. 2006. Advanced glycation endproducts (AGEs): Pharmacological inhibition in diabetes. *Pathol Biol (Paris)* 54: 405-419.
- Panico, A.M., Cardile, V., Avondo, S., Garufi, F., Gentile, B., Puglia, C., Bonina, F., Santagati, N.A. and Ronsisvalle, G. 2006. The *in vitro* effect of a lyophilized extract of wine obtained from Jacquéz grapes on human chondrocytes. *Phytomedicine*.13: 522–526.
- Pietropaolo, M. and Eisenbarth, G.S. 1994. Molecular targets of the auto immunity of type I diabetes. In: *Molecular biology of diabetes part 1*. B. Draznin and D. Leroith (ed.) New jersey: Human press. 1-33.
- Pennathur, S., Wagner, J.D., Leeuwenburgh, C., Litwak, K.N. and Heinecke, J.W. 2001. A hydroxyl radical-like species oxidizes cynomolgus monkey artery wall proteins in early diabetic vascular disease. *J Clin Invest*. 107: 853–860.
- Peppia, M. and Vlassara, H. 2005. Advanced glycation end products and diabetic complications: A General overview. *Hormone*. 4: 28–37.
- Prasad, A.S., Bao, B., Beck, F.W.J., Kucuk, O. and Sarkar, F.H. 2004. antioxidant effect of zinc in humans. *Free Radic Bio Med*. 37: 1182-1190.
- Pryor, W.A., Cornicelli, J.A., Devall, L.J., Tait, B., Trivedi, B.K., Witiak, D.T. and Wu, M. A. 1993. Rapid screening test to determine the antioxidant potencies of natural and synthetic antioxidants. *J Org Chem*. 58: 3521–3532
- Pulido, R., Bravo, L. and Saura-Calixto, F. 2000. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem*. 48: 3396–3402.
- Obrenovich, M.E. and Monnier, V.M. 2004. Glycation stimulates amyloid formation. *Sci Aging Knowledge Environ*. 2: 3-11.

- Radovanovic, A., Radovanovic, B. and Jovancicevic, B. 2009. Free radical scavenging and antibacterial activities of southern Serbian red wines. *Food Chem.*117: 326–331.
- Reddy, V. P. and Beyaz, A. 2006. Inhibitors of the Maillard reaction and AGE breakers as therapeutics for multiple diseases. *Drug Discov Today.* 11: 646–654.
- Reed, J. 2002. Cranberry flavonoids, atherosclerosis and cardiovascular health. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2002. 42(3): 301-316.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 2(4): 152–159.
- Rodriguez-Vaquero, M.J. Alberto, M.R. and Manca-de-Nadra, M.C. 2007. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control.*18: 93–101.
- Saito, A., Takeda, T., Sato, K., Hama, H., Tanuma, A., Kaseda, R., Suzuki, Y. and Gejyo, F. 2005. Significance of proximal tubular metabolism of advanced glycation end products in kidney diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1043: 637–643.
- Schmidt, A.M. and Stern, D. 2000. Atherosclerosis and diabetes: the RAGE connection. *Curr. Atheroscler. Rep.* 2: 430–436.
- Sheetz, M.J. and King, G.L. 2002. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. *JAMA* . 288: 2579-2588.
- Smedsrod, B., Melkko, J., Araki, N., Sano, H. and Horiuchi, S. 1997. Advanced glycation end products are eliminated by scavenger-receptor-mediated endocytosis in hepatic sinusoidal Kupffer and endothelial cells. *Biochem J.* 322 (2): 567-573.

- Sarma, A.D., Sreelakshmi, Y. and Sharma, R. 1997. Antioxidant ability of anthocyanins against ascorbic acid oxidation. *Phytochemistry*. 45: 671–674.
- Sasaki, N., Fukats, R., Tsuzuki, K., Hayashi, Y, Yoshida, T., Fujii, N., Koike, T., Wakayama, I., Yanagihara, R., Garruto, R., Amano, N. and Makita, Z. 1998. Advanced glycation end products in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Am. J. Pathol.* 153: 1149–1155.
- Sato, M., Ramarathnam, N., Suzuki, Y., Ohkubo, T., Takeuchi, M. and Ochi, H. 1996. Varietal Differences in the Phenolic Content and Superoxide Radical Scavenging Potential of Wines from Different Sources. *J. Agric. Food Chem.* 44 (1): 37–41.
- Sima, A. A.F. and Sugimoto, K. 1999. Experimental diabetic neuropathy: An update. *Diabetologia*. 42: 773–788.
- Singh, R., Barden, A. Mori, T. and Beilin, L. 2001. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*. 44: 129–146.
- Slinkard, J. and Singleton, V.L. 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *Am. J. Enol. Viticult.* 28: 49–55.
- Soobrattee, M.A., Neergheen, V.S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O.I. and Bahorun, T. 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: *Mech act Mut Res.* 579: 200–213.
- Stadtman, E.R. and Levin, R.L. 2000. Protein oxidation. *Ann. NY Acad. Sci.* 899: 191-208.
- Takeuchi, M., Kikuchi, S., Sasaki, N., Suzuki, T., Watai, T., Iwaki, M., Bucala, R. and Yamagishi, S. 2004. Involvement of advanced glycation end-products (AGEs) in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 1: 39–46.

- Telci, A., Cakatay, U., Salman, S., Satman, I. and Sivas, A. 2000. Oxidative protein damage in early stage type 1 diabetic patients. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 50: 213–223.
- Thomas, M.C., Baynes, J.W., Thorpe, S.R. and Cooper, M.E. 2005. The role of AGEs and AGE inhibitors in diabetic cardiovascular disease. *Curr. Drug Targets.* 6: 453–474.
- Tolbert, B.M. and Ward, J.B. 1982. Dehydroascorbic Acid. In: *Ascorbic Acid: Chemistry, Metabolism, and Uses.* P.A. Seib and B.M. Tolbert (ed.) Washington, DC: WB saunders. 101–123.
- Traber, M.G. and Atkinson, J. 2007. Vitamin E, Antioxidant and Nothing More. *Free Radic Biol Med.* 43: 4–15.
- Tsai, P.J., McIntosh, J., Pearce, P., Camden, B. and Jordan, B.R. 2002. Anthocyanin and antioxidant capacity in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. *Food Res. Int.* 35: 351-356.
- Tsuda, T., Watanabe, M., Ohshima, K., Norinobu, S. and Choi, S.W. 1994. Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyaniding 3-O-beta-d-glucoside and cyanidin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 42: 2407-2410.
- Tsuda, T., Shiga, K., Ohshima, K., Kawakishi, S. and Osawa, T. 1996. Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from *phaseolus vulgaris* L. *Biochemical Pharmacology.* 52: 1033-1039.
- Tsuda, T., Horio, F., Kitoh, J. and Osawa, T. 1999. Protective effects of dietary cyanidin 3-O-beta-d-glucoside on liver Ischemia-reperfusion injury in rats. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 368: 361-366.

- Tsuda, T., Horio, F. and Osawa, T. 2000. Cyanidin 3-O- β -D-glucoside suppresses nitric oxide production during a zymosan treatment in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 48: 305-310.
- Tsuji-Naito, K., Saeki, H. and Hamano, M. 2009. Inhibitory effects of *Chrysanthemum* species extracts on formation of advanced glycation end products. *Food Chemistry.* 116: 854-859.
- Tupe, R.S. and Agte, V.V. 2009. Role of zinc along with ascorbic acid and folic acid during long-term in vitro albumin glycation. *Br. J. Nutr.* 103: 370-377.
- Ulrich, P. and Cerami, A. 2001. Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent Prog Horm Res.* 56: 1-21.
- Uribarri, J. and Tuttle, K.R. 2006. Advanced Glycation End Products and Nephrotoxicity of High-Protein Diets. *Clin J Am Soc Nephrol.* 1: 1293-1299.
- Urios, P., Grigorova-Borsos, A.M. and Sternberg, M. 2007. Flavonoids inhibit the formation of the cross-linking AGE pentosidine in collagen incubated with glucose, according to their structure. *Eur. J. Nutr.* 46: 139-146.
- Vasan, S., Zhang, X., Zhang, X., Kapurniotu, A., Bernhagen, J., Teichberg, S., Basgen, J., Wagle, D., Shih, D., Terlecky, I., Bucala, R., Cerami, A., Egan, J. and Ulrich, P. 1996. An agent cleaving glucose-derived protein crosslinks in vitro and in vivo. *Nature.* 382: 275-278.
- Verzelloni, E., Tagliazucchi, D., Rio, D., Calani, L. and Conte, A. 2010. Antiglycative and antioxidative properties of coffee fractions. *Food Chemistry.* 124: 1430-1435.
- Von Elbe, J.H. and Schwartz, S.J. 1996. Colorants. In: *Food chemistry.* 3rd ed. O.R. Fennema (ed.) New York. Marcel Dekker, Inc. 651-722.

- Voziyan, .PA., Metz, T.O., Baynes, J.W. and Hudson, B.G. 2002. A post Amadori inhibitor pyridoxamine. *J Biol Chem.* 277: 3397-3403.
- Wautier, J.L., Zoukourian, C., Chappey, O., Wautier, M.P., Guillausseau, P.J., Cao, R., Hori, O., Stern, D. and Schmidt, A.M. 1996. Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy: soluble receptor for advanced glycation end products blocks hyperpermeability in diabetic rats. *J Clin Invest.* 97: 238–243.
- Williamson, G., Day, A.J., Plumb, G.W. and Couteau, D. 2000. Human metabolic pathways of dietary flavonoids and cinnamates. *Biochemical Society Transactions.* 28: 16–22.
- Wolff, S.P. and Dean, R.T.1987. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem. J.* 245: 243–250.
- Wrolstad, R. E. 2000. Anthocyanins. In : *Natural Food Colorants.* F.J. Francis and J.G. Lauro (ed.) New York: Marcel Dekker. 798-875.
- Wua, J.W., Hsieh, C., Wang, H. and Chen, H. 2009. Inhibitory effects of guava (*Psidium guajava* L.) leaf extracts and its active compounds on the glycation process of protein. *Food Chemistry.* 113: 78-84.
- Xia, E.Q., Deng, G.F., Guo, Y.J. and Li, H.B. 2010. Biological activities of polyphenols from grapes. *Int J Mol Sci.* 11: 622-646.
- Yamaguchi, F., Ariga, T., Yoshimura, Y. and Nakazawa, H. 2000. Antioxidative and anti-glycation activity of garcinol from *Garcinia indica* fruit rind. *J Agric Food Chem.* 48: 180-185.
- Yang, O.H., Mau, J.L., Ko, P.T. and Huang, L.C. 2000. Antioxidant properties of fermented soybean broth. *Food Chemistry.* 71: 249-254.

Yi, W.G., Fischer, J. and Akoh, C.C. 2005. Study of anticancer activities of muscadine grape phenolics *in vitro*. J. Agric. Food Chem. 53: 8804–8812.

Zhishen, J., Mengcheng, T. and Jianming, W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem. 64: 555–559.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

การคำนวณหาค่า EC (equivalent concentration)

EC หมายถึง ความเข้มข้นของสารต้านออกซิเดชันที่มีความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} -TPTZ ได้เท่ากับ FeSO_4 1 mM

จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน

$$\text{สมการ} \quad y = 0.9163 \ln(x) - 4.4581$$

$$\text{แทนค่า} \quad y = \text{absorbance } 595\text{nm}$$

$$x = \text{ความเข้มข้นของ } \text{FeSO}_4$$

$$\text{เมื่อแทนค่าด้วย } x = 1\text{mM } (1000\mu\text{M})$$

$$\text{ในสมการ} \quad y = 0.9163 \ln(1) - 4.4581$$

$$y = 1.872$$

$$\text{ดังนั้น } \text{FeSO}_4 \text{ 1 mM ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง } (\Delta\text{OD } 595\text{nm}) = 1.872$$

จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง

$$\text{สมการ} \quad y = 0.6387 \ln(x) + 2.1183$$

$$\text{เมื่อแทนค่าด้วย} \quad y = 1.872 \text{ (เท่ากับ } \Delta \text{OD ของ } \text{FeSO}_4 \text{ 1 mM)}$$

$$\text{ในสมการ} \quad 1.872 = 0.6387 \ln(x) + 2.1183$$

$$x = 0.680 \text{ mg}$$

ดังนั้น EC ของสารสกัดจากองุ่นแดง = 0.68mg หรือสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง

0.86 mg ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง ΔOD เท่ากับ FeSO_4 1 mM หรือ สกัดจากเปลือกองุ่นแดงมีค่า EC = 1.49 mM $\text{FeSO}_4/\text{mg dried extract}$

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวณัฐา จริยภมรกร เกิดเมื่อวันที่ 15 ตุลาคม พ.ศ. 2525 ที่กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สัตวแพทยศาสตรบัณฑิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ในปี พ.ศ. 2550 หลังจากนั้นทำงานเป็นสัตวแพทย์ประจำโรงพยาบาลสัตว์เมืองเอก กรุงเทพฯ และลาเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชศาสตร์วิทยาศาสตร์ทางสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี พ.ศ. 2552



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย