

Thesis Title	Effects of <i>Cleistocalyx nervosum</i> var. <i>paniala</i> Extracts on Antioxidant System and Its Hepatoprotective Effect on Acetaminophen Treated Rats
Author	Miss. Waristha Thuschana
Degree	Master of Science (Biochemistry)
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Rawiwan Wongpoomchai

ABSTRACT

Cleistocalyx nervosum var. *paniala*, or Ma-kiang in Thai, is a purplish red fruit cultivated in northern Thailand. The fruit is edible and is used to make juice, wine and jam. The previous study reported that the aqueous extract Ma-kiang pulp showed antioxidant activity and anti-carcinogenicity. The present study investigated chemical constituents and both *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities of various extracts of Ma-kiang. The results showed the amount of polyphenols, flavonoids and cyanidin-3-glucoside and radical-scavenging capacity of the ethanol extract were greater than those of the aqueous extract. The ethanol extract of Ma-kiang was further investigated for its safety according to OECD guideline 425 and antioxidant activity in rats. The administration of the ethanol extract of Ma-kiang at 5000 mg/kg bw was safe in Wistar rats. Various concentrations of the ethanol extract of Ma-kiang, ranged from 100 to 1000 mg/kg bw, were intragastric fed to male Wistar rats for 90 days. The ethanol extract of Ma-kiang significantly decreased malondialdehyde, MDA, the end-product of lipid peroxidation, levels in liver, but not in serum. It also induced hepatic glutathione peroxidase activity.

Due to the mild antioxidant activity of the ethanol extract of Ma-kiang, the next step was to explore an anthocyanin-rich fraction by using various concentrations of ethanol (0-95%, v/v) for extraction. The 80%(v/v) ethanol extract of Ma-kiang provided the highest phytochemical contents and antioxidant activity. Moreover, the

anthocyanin content and antioxidant activity were increased in mild acidic condition, 0.5%(v/v) citric acid in 80%(v/v) ethanol. The acidified ethanol extract of Ma-kiang was further investigated in animal models. At a dose 5000 mg/kg bw, an anthocyanin-rich extract was safety in rat without any acute toxicity. The next study was to evaluate the effect of acidified ethanol extract of Ma-kiang at concentrations of 100, 300 and 1000 mg/kg bw on antioxidant and hepatoprotective effects on acetaminophen (APAP) treated rats. Silymarin was used as a standard reference antioxidant and hepatoprotective drug. APAP caused marked liver damage as noted by significant increased serum alanine aminotransferase (ALT) activity and histopathological changes in rat liver. It also resulted in a significant decrease in hepatic glutathione content and glutathione peroxidase and catalase activities. Pretreatment of 300 mg/kg bw of the acidified ethanol extract of Ma-kiang and silymarin significantly decreased in the serum levels of ALT, reduced hepatic MDA levels and increased hepatic glutathione peroxidase activity. Moreover, a trend toward increased glutathione-S-transferase activity was observed in the pretreatment with acidified ethanol extract of Ma-kiang and silymarin. Histopathological evaluation of the livers was also revealed abnormal lesions caused by acetaminophen toxicity. A medium dose of acidified ethanol extract of Ma-kiang could ameliorate pathological changes in liver of APAP treated rats. However, high dose of acidified ethanol extract of Ma-kiang seem to enhance hepatotoxicity.

In conclusion, the appropriate dose of this anthocyanin-rich extract of acidified ethanol extract of *Cleistocalyx nervosum* var. *paniala* might reduce oxidative stress induced hepatotoxicity in overdose APAP treated rats by suppression of free radicals and enhancement of antioxidant system in rat liver.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

ผลของสารสกัดมะเขี๋ยงต่อระบบต้านอนุมูลอิสระและ
ฤทธิ์ปกป้องตับในหนูที่ได้รับอะเซตามิโนเฟน

ผู้เขียน

นางสาววิรัชญา ทักษนะ

ปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ.ดร. รวีวรรณ วงศ์ภูมิชัย

บทคัดย่อ

มะเขี๋ยง (*Cleistocalyx nervosum* var. *paniala*) เป็นผลไม้ที่มีสีม่วงแดงปลูกมากในเขตภาคเหนือของประเทศไทย ผลมะเขี๋ยงสามารถรับประทานทั้งในรูปสดและแปรรูปเป็นน้ำผลไม้ ไวน์ และแยม มีรายงานพบว่าเนื้อมะเขี๋ยงที่สกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ป้องกันการเกิดมะเร็ง การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาองค์ประกอบสำคัญ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ทั้งในหลอดทดลองและสัตว์ทดลองของสารสกัดมะเขี๋ยงชนิดต่างๆ ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดมะเขี๋ยงที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลองโดยใช้วิธี DPPH สูงกว่าสารสกัดส่วนน้ำ สารสกัดมะเขี๋ยงความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว มีความปลอดภัยในสัตว์ทดลอง และเมื่อทำการป้อนสารสกัดมะเขี๋ยง 100, 300 และ 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวให้แก่หนูวิสตาร์เพศผู้เป็นเวลา 90 วัน พบว่าสารสกัดมะเขี๋ยงที่สกัดด้วยเอทานอลสามารถลดปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ (ผลผลิตสุดท้ายของ lipid peroxidation) ในตับแต่ไม่มีผลในซีรัม นอกจากนี้ยังเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ glutathione peroxidase ในตับหนูอีกด้วย

เนื่องจากสารสกัดมะเขี๋ยงที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอย่างอ่อน การศึกษาต่อมาจึงสกัดมะเขี๋ยงด้วยเอทานอลความเข้มข้น 0-95%(v/v) เพื่อให้ได้สารสกัดส่วนที่มีแอนโทไซยานินปริมาณสูงที่สุด ผลการทดลองพบว่าการสกัดด้วย 80%(v/v) เอทานอล ทำให้มีปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด นอกจากนี้สารสกัด 80% (v/v) เอทานอลที่ประกอบด้วย 0.5% (v/v) กรดซิตริก ให้ปริมาณแอนโทไซยานินและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระให้สูงที่สุด ดังนั้นจึงทำการทดสอบความเป็นพิษและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะเขี๋ยงส่วนกรดเอทานอลในหนูทดลอง สารสกัดมะเขี๋ยงส่วนกรดเอทานอลความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว มี

ความปลอดภัยในสัตว์ทดลอง การศึกษาของสารผลของสารสกัดมะเขือม่วงส่วนกรดเอทานอล 100, 300 และ 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ต่อระบบต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ปกป้องตับในหนูที่ได้รับอะเซตามิโนเฟนและใช้ซีสทีมารีนเป็นสารมาตรฐานต้านอนุมูลอิสระและสารปกป้องพิษต่อตับ ผลการทดลองพบว่าอะเซตามิโนเฟนเพิ่มระดับเอนไซม์ *aminotransferase* ในซีรัมและเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพตับของหนู ลดปริมาณกลูตาไธโอนใน ลดการทำงานของเอนไซม์ *glutathione peroxidase* และ *catalase* ในตับหนู สารมะเขือม่วงความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว และซีสทีมารีนสามารถลดระดับเอนไซม์ *aminotransferase* ในซีรัม ลดปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ อีกทั้งยังเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ *glutathione peroxidase* ในตับหนูที่ได้รับอะเซตามิโนเฟน หนูที่ได้รับสารสกัดมะเขือม่วงและซีสทีมารีนยังพบแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของการทำงานของเอนไซม์ *glutathione-S-transferase* และจากการศึกษาพยาธิสภาพของตับหนูที่ได้รับสารสกัดมะเขือม่วงความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว พบรอยโรคที่ตับจากพิษของอะเซตามิโนเฟนลดลง ในทางตรงกันข้ามสารสกัดความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ส่งเสริมความเป็นพิษของอะเซตามิโนเฟนในตับหนู

ผลของการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดมะเขือม่วงที่ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัว ที่มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงสามารถลดภาวะเครียดออกซิเดชันในตับหนูที่ถูกเหนี่ยวนำโดยอะเซตามิโนเฟนปริมาณสูงโดยยับยั้งอนุมูลอิสระและเหนี่ยวนำระบบต้านอนุมูลอิสระในตับหนู