คณะสหเวชศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานโครงการวิจัย
เรื่อง

การพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารประเภทเลซิทินผสมที่มีสัดส่วนของฟอสโฟลิปิดและกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดต่างตามที่กำหนดโดยใช้ผลผลิตทางการประมงและการเกษตรในประเทศเป็นแหล่งวัตถุดิบ : การตรวจสอบความปลอดภัยของเลซิตินที่ผลิตขึ้นได้และการศึกษาผลที่มีต่อเมเทบอลิซึมของไลโปโปรตีนในสัตว์ทดลอง

The Development of Blended Lecithin Health Food Products with Certain Proportions of Phospholipid Subclasses and Polyunsaturated Fatty Acid Composition Utilizing Domestic Fishery and Agricultural Products as Sources of Raw Material : The Safety Evaluation of Produced Lecithins and Study of Their Effects on Lipoprotein Metabolism in Animal Model

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร.วินัย ดะห์ลัน

ศูนย์วิจัยวิทยาลิพิดและไขมัน
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กรกฎาคม 2550

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารประเภทเลซิทินผสมที่มีสัดส่วนของฟอสโฟลิปิดและกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดต่างตามที่กำหนดโดยใช้ผลผลิตทางการประมงและการเกษตรในประเทศเป็นแหล่งวัตถุดิบ : การตรวจสอบความปลอดภัยของเลซิตินที่ผลิตขึ้นได้และการศึกษาผลที่มีต่อเมเทบอลิซึมของไลโปโปรตีนในสัตว์ทดลอง

The Development of Blended Lecithin Health Food Products with Certain Proportions of Phospholipid Subclasses and Polyunsaturated Fatty Acid Composition Utilizing Domestic Fishery and Agricultural Products as Sources of Raw Material : The Safety Evaluation of Produced Lecithins and Study of Their Effects on Lipoprotein Metabolism in Animal Model

รายชื่อคณะผู้ทำวิจัย

ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย	รศ.ดร.วินัย ดะห์ลัน (Assoc.Prof.Dr.Winai Dahlan)
ผู้ประสานงานวิจัย	ผศ.ดร.วนิดา นพพรพันธุ์ (Asst.Prof.Dr.Vanida Nopponpunth)
หัวหน้าโครงการวิจัย	รศ.ดร.วินัย ดะห์ลัน (Assoc.Prof.Dr.Winai Dahlan)
ผู้ร่วมงานวิจัย	นางสาวสถาพร งามอุโฆษ (Miss Sataporn Ngarm-Ukos)
	นางสาวจุลจิตร องค์ปรีชากุล (Julajit Ongpreechakul)
	รศ.ภก.จงจิตร อังคทะวานิช (Assoc.Prof.Jongjit Angkatavanich)
	ผศ.ดร.ทิพยเนตร อริยปิติพันธ์ (Asst.Prof.Dr.Tipayanate Ariyapitipunt)
	อ.ระวีนันท์ สิทธิวิเชียรวงศ์ (Miss Raveenun Sittivichainvongse)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารประเภทเลซิทินผสมที่มีสัดส่วนของฟอสโฟลิปิดและกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดต่างตามที่กำหนดโดยใช้ผลผลิตทางการประมงและการเกษตรในประเทศเป็นแหล่งวัตถุดิบ : การตรวจสอบความปลอดภัยของเลซิตินที่ผลิตขึ้นได้และการศึกษาผลที่มีต่อเมเทบอลิซึมของไลโปโปรตีนในสัตว์ทดลอง

The Development of Blended Lecithin Health Food Products with Certain Proportions of Phospholipid Subclasses and Polyunsaturated Fatty Acid Composition Utilizing Domestic Fishery and Agricultural Products as Sources of Raw Material : The Safety Evaluation of Produced Lecithins and Study of Their Effects on Lipoprotein Metabolism in Animal Model

รศ.ดร.วินัย ดะห์ลัน, นางสาวสถาพร งามอุโฆษ, นางสาวจุลจิตร องค์ปรีชากุล, ผศ.ดร.วนิดา นพพรพันธุ์, ผศ.ดร.ทิพยเนตร อริยปิติพันธ์, รศ.ภก.จงจิตร อังคทะวานิช, อ.ระวีนันท์ สิทธิวิเชียรวงศ์
ศูนย์วิจัยวิทยาลิพิดและไขมัน คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

ปัจจุบันมีการผลิตเลซิทินในเชิงอุตสาหกรรมโดยใช้ถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบเพื่อเป็นอาหารเพื่อสุขภาพ รายงานวิจัยจำนวนไม่น้อยสนับสนุนการใช้เลซิทินเพื่อป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือดซึ่งเป็นปัญหาด้านสุขภาพสำคัญของสังคมไทย อย่างไรก็ตามมีข้อมูลบ่งชี้ว่าสมดุลของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงกลุ่ม โอเมก้า 3 และ 6 เป็นปัจจัยหนึ่งของการป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือด เลซิทินจากถั่วเหลืองที่นิยมใช้กันอยู่แม้มีกรดไขมันโอเมก้า 6 และโอเมก้า 3 แต่ขาดกรดไขมันโอเมก้า 3 ที่สำคัญอยู่ หากสามารถหาเลซิทินจากวัตถุดิบทางการเกษตรอื่นๆ ที่มีสัดส่วนของกรดไขมันต่างๆ กันโดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดไขมันโอเมก้า 3 ชนิดที่ถั่วเหลือง ขาดอยู่ย่อมเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ งานวิจัยครั้งนี้ทำการศึกษาผลของเลซิทินจากปลาทะเล (LE-FM) ถั่วเหลือง (LE-SB) และเลซิทินผสมที่ได้จากการใช้เลซิทินสองชนิดผสมกันในสัดส่วน 1:1 และ 1:2 (LE-FS 1:1, LE-FS 1:2) ต่อไลโปโปรตีนและกรดไขมันในพลาสมาของหนูทดลอง ซึ่ง LE-FM มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงชนิดโอเมก้า 3 ได้แก่ C20:5n-3 และ C22:6n-3 สูงกว่า LE-SB ที่ใช้ทั่วไปทางการค้า และมีกรดไขมันชนิดโอเมก้า 6 ได้แก่ C18:2n-6 และ C20:4n-6 ต่ำกว่า LE-SB จากการศึกษาองค์ประกอบของเลซิทินพบว่า LE-FM และ LE-SB มีปริมาณ phosphatidylcholine (PC) 47.3% และ 36.2%; phosphatidylinositol (PI) 17.9% และ 46.3%; sphingomyelin (SM) 22.9% และ 0% กรดไขมัน C18:2n-6 1.06% และ 54.83%; C18:3n-3 0.37% และ 4.93%; C20:5n-3 5.2% และ 0%; C22:6n-3, 21.11% และ 0% ตามลำดับ

ภายหลังการเสริมเลซิทินในสัตว์ทดลองเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าไขมันในเลือดไม่เปลี่ยนแปลง แต่สัดส่วนของ VLDL-TG/HDL-TG ของหนูกลุ่ม LE-FM และ LE-SB ลดลง (p<0.05) แสดงถึงอัตราการไหลเวียนและเมแทบอลิซึมของ TG-rich lipoproteins ที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ particles size ของ VLDL และ LDL ในหนูที่ได้รับเลซิทินทุกกลุ่มมีขนาดเล็กลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (p<0.05) รวมถึง particle size ของ HDL ด้วย ยกเว้น HDL particles ในกลุ่มที่ได้รับ LE-SB มีขนาดใหญ่ขึ้น (p<0.05) ความแตกต่างเช่นนี้อาจเป็นผลมาจากชนิดของฟอสโฟลิพิด ได้แก่ SM และ PI ในเลซิทินทั้งสองกลุ่มที่แตกต่างกัน ในกรณีการขนส่งกรดไขมันเพื่อแลกเปลี่ยนกับเซลล์ต่างๆในกระแสเลือด พบว่าสัดส่วนของ C20:5n-3 + C22:6n-3 /C18:2n-6 + C20:2n-6 ซึ่งเป็นกรดไขมันตั้งต้นในการสร้าง eicosanoids serie 2 และ serie 3 ในพลาสมาสูงขึ้นในกลุ่มที่ได้รับ LE-FM เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ LE-SB บ่งชี้ถึงฤทธิ์ของ LE-FM ในการป้องกันการเกิด thrombogenesis ที่สูงกว่า LE-SB สรุปว่าการเสริมเลซิทินส่งผลดีต่อเมแทบอลิซึมของ TG-rich lipoproteins การตรวจหาค่าสารเคมีในกระแสเลือดหนูหลังจากป้อนเลซิทินไปแล้ว 8 สัปดาห์ พบว่า ค่าHDL-cholesterol ของกลุ่มหนูที่ป้อนด้วย LE-SB and LE-FS 1:1 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p< 0.05) นอกจากนั้น ค่าCreatinine ของหนูที่ป้อนด้วย LE-FS 1:1 และ LE-FS 1:2 นั้นจะสูงกว่ากลุ่มหนูที่ป้อนด้วย LE-FM และ LE-SB (p< 0.05) แม้ว่าค่าของ liver function และค่าของ kidney functions อื่นๆ จะไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติก็ตาม (Tabel 3) เนื่องจากข้อมูลความปลอดภัยในสัตว์ทดลองให้ผลไม่ชัดเจน จึงยังไม่สามารถยืนยันความปลอดภัยในสัตว์ทดลองในระดับที่นำมาใช้ในมนุษย์ได้ จำเป็นต้องระงับโครงการการทดลองใช้เลซิทินในมนุษย์ไว้ก่อน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

ในร่างกาย เลซิทินหรือฟอสโฟลิปิดทำหน้าที่สำคัญหลายประการ เป็นต้นว่า การเป็นเยื่อบุผิวเซลล์และส่วนย่อยของเซลล์ ช่วยขนส่งไขมันในทางเดินโลหิต ช่วยย่อยไขมันในทางเดินอาหาร ช่วยสร้างโมเลกุลทำงานบางชนิด ช่วยเร่งเมแทบอลิซึมของคอเลสเตอรอล เป็นแหล่งของสารอาหารหลายชนิด ช่วยการทำงานของเซลล์สมองและประสาท และช่วยการดูดซึมวิตามินชนิดที่ละลายในไขมัน มีรายงานวิจัยจำนวนไม่น้อยยืนยันว่าการบริโภคเลซิทินให้ผลดีของต่อสุขภาพ จึงมีการเตรียมเลซิทินเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในหลายลักษณะ ทั้งแคปซูลในขนาดต่างๆ เม็ดอัด ผง เกล็ด ของเหลว เครื่องดื่ม หรือแม้กระทั่งการเสริมในอาหาร

เนื้อหาต่อไปนี้คือสรรพคุณบางด้านที่มีการกล่าวอ้างโดยมีหลักฐานทางวิชาการประกอบ ได้แก่ การลดคอเลสเตอรอลในเลือด เมแทบอลิซึมของเลซิทินในร่างกายอาจสร้างกลไกให้คอเลสเตอรอลในแอลดีแอลลดลงและคอเลสเตอรอลในเอชดีแอลเพิ่มขึ้นซึ่งมีรายงานวิจัยสนับสนุนอยู่หลายรายงาน การศึกษาของ บรูคและคณะ (Brook et al 1986) พบว่าเมื่อให้ผู้ป่วยที่มีปัญหาคอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูงรับประทานเลซิทิน 12 กรัม/วัน เป็นเวลานาน 3 เดือน คอเลสเตอรอลในรูปของแอลดีแอล (คอเลสเตอรอลกลุ่มที่เลว) ในเลือดลดลง ขณะที่คอเลสเตอรอลในเอชดีแอล (คอเลสเตอรอลกลุ่มที่ดี) สูงขึ้น การศึกษาของทอมพ์กินและพาร์กิน (Tompkins and Parkin 1980, Cobb et al 1980) ในผู้ป่วยที่มีปัญหาไขมันสูงในเลือดให้ผลไปในทิศทางเดียวกัน หากเสริมเลซิทินปริมาณสูงในผู้ที่ไม่มีภาวะไขมันสูงในเลือดมีรายงานว่าไม่มีผลทำให้ระดับไขมันในเลือดเปลี่ยนแปลง เซเมนและคณะ (Zemen et al 1995) พบว่าการเสริมเลซิทินอาจให้ผลในเชิงบวกต่อเมแทบอลิซึมของกลูโคส

หลายรายงานการวิจัยให้ผลว่าผู้ที่รับประทานเลซิทินปริมาณสูงอย่างสม่ำเสมออาจมีเอชดี แอลสูงขึ้นในเลือด (Brook et al 1986 และ Tompkins and Parkin 1980) มีบางรายงานเสนอความเห็นว่าการที่เลซิทินสามารถลดคอเลสเตอรอลลงได้น่าจะเป็นผลมาจากการทำงานของกรดไลโนเลอิกที่มีอยู่สูงในเลซิทินจากถั่วเหลืองที่นิยมบริโภค อย่างไรก็ตาม วิลสันและคณะ (Wilson et al 1998) ทำการศึกษาและรายงานไว้ว่าผลของการลดคอเลสเตอรอลโดยเลซิทินนั้นมิได้เป็นผลมาจากกรดไลโนเลอิกแต่เป็นผลของโมเลกุลของเลซิทินเอง นอกจากนี้นักวิจัยกลุ่มดังกล่าวยังพบอีกว่าเลซิทินช่วยลดการเกิดการสะสมไขมันบนผนังหลอดเลือดได้ด้วย

มีบางรายงานกล่าวถึงผลดีของการเสริมเลซิทินกับการลดนิ่วในถุงน้ำดี โดยทั่วไปผู้ที่มีปัญหาคอเลสเตอรอลสูงในเลือดเป็นเวลานานย่อมเสี่ยงต่อการเกิดปัญหานิ่วในถุงน้ำดี มีการทดลองเสริมเลซิทินปริมาณสูงเพื่อลดปัญหาดังกล่าว ผลการศึกษาในผู้ป่วยให้ผลไม่ชัดเจนนัก ทูอูลีและคณะ (Toouli et al 1975) ให้ผู้ป่วยนิ่วในถุงน้ำดี 9 คนเสริมเลซิทินเป็นเวลานาน 6 เดือน ได้ผลว่าผู้ป่วย 3 คน

มีอาการดีขึ้นอย่างชัดเจน ผู้ป่วย 5 คนมีแนวโน้มของอาการป่วยดีขึ้นเล็กน้อย อย่างไรก็ตาม การศึกษาของโฮลันและคณะ (Holan et al 1979) ซึ่งให้ผู้ป่วยนิ่วในถุงน้ำดีเสริมเลซิทินจากถั่วเหลืองพบว่าเลซิทินแม้จะส่งผลให้องค์ประกอบของน้ำดีเปลี่ยนแปลงไปแต่กลับมิได้ช่วยให้นิ่วบรรเทาลงแต่อย่างใด

ทางด้านผลของเลซิทินต่อสมอง เลซิทินเกี่ยวข้องกับสมองในสองสามประการ ประการแรกเลซิทินเป็นองค์ประกอบของเยื่อบุผิวของเซลล์สมองและเซลล์ประสาท ประการต่อมาเลซิทินเป็นแหล่งของสารโคลีนซึ่งเป็นสารเริ่มต้นสร้างสารสื่อประสาท (neurotransmitter) ตัวสำคัญที่ชื่อว่า “อะเซติลโคลีน” แต่โดยปกติแล้วร่างกายสามารถสร้างโคลีนเองได้ไม่จำเป็นต้องได้รับโคลีนจากอาหาร อย่างไรก็ตาม มีรายงานวิจัยหลายรายงานเช่น มากิลและคณะ (Magil SG et al 1981) เบลล์และสล็อตกิน (Bell and Slotkin 1985) ระบุว่าการเสริมเลซิทินจะช่วยให้สารอะเซติลโคลีนในสมองเพิ่มขึ้นได้ โดยโคลีนจากเลซิทินถูกนำไปสร้างเป็นอะเซติลโคลีน การทดสอบนี้ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในสัตว์ทดลอง การศึกษาของมานโดวานิและคณะ (Mandovani et al 1976) ให้ข้อมูลเพิ่มเติมว่านอกเหนือจาก ฟอสฟาติดิลโคลีนหรือพีซีจะเพิ่มโคลีนในเลือดและสมองได้แล้ว ฟอสโฟลิปิดหรือเลซิทินอีกสองชนิดคือฟอสฟาติดิลเซอรีน และฟอสฟาติดิลเอธาโนลามีนช่วยเพิ่มการสังเคราะห์โคลีนได้เช่นกัน อะเซติลโคลีนที่เพิ่มขึ้นในเลือดส่งผลดีต่อการทำงานของสมอง การศึกษาในผู้ป่วยอัลไซเมอร์ซึ่งเป็นโรคที่ผู้ป่วยมีอาการหลงลืมอย่างรุนแรง มีพฤติกรรมเปลี่ยนไป การเสริมเลซิทินอาจทำให้อาการของผู้ป่วยกลุ่มนี้ดีขึ้นได้บ้าง ลิตเติล และคณะ (Little et al 1986) ทำการศึกษาในผู้ป่วยอัลไซเมอร์จำนวน 51 คน โดยเปรียบเทียบผลของการเสริมเลซิทินกับการเสริมยาหลอกในกลุ่มควบคุม การเสริมเลซิทินชนิด พีซีบริสุทธิ์ 90% ขนาด 20-25 กรัม/วัน ให้ผลต่อการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมไปในเชิงบวกในผู้ป่วยอายุมากที่มีโคลีนในเลือดระดับกลางแต่มิได้ให้ผลในผู้ป่วยอัลไซเมอร์ทุกกลุ่ม การตอบคำถามว่า การเสริมเลซิทินจะช่วยส่งเสริมการทำงานของสมองได้หรือไม่นั้นจึงต้องรอผลการศึกษาเพิ่มเติม

เลซิทินประกอบไปด้วยฟอสโฟลิปิดหลายชนิด ในกรณีของถั่วเหลืองพบว่าเลซิทินมีฟอสฟาติดิลเซอรีนประมาณร้อยละ 5-7 ฟอสโฟติดิลเซอรีนนี้เป็นที่สนใจของนักวิจัยทางชีวเคมีโภชนาการ ดังเช่น เปเปาและคณะ (Pepau et al 1996) เชื่อมั่นว่าเลซิทินกลุ่มนี้ให้ผลดีต่อการทำงานของสมอง ครูกและคณะ (Crook et al 1992) รายงานว่าฟอสฟาติดิลเซอรีนสามารถปรับปรุงประสิทธิภาพการทำงานของสมองในผู้ป่วยอัลไซเมอร์ได้ หากเสริมในปริมาณ 100 มิลลิกรัม 3 เวลา ต่อวัน อย่างไรก็ตาม ฟอสฟาติดิลเซอรีนที่ใช้ในการทดลองได้มาจากสมองวัวซึ่งมีฟอสฟาติดิลเซอรีนต่างจากที่พบในพืช จึงยังไม่มีข้อมูลที่ศึกษาในมนุษย์ที่จะช่วยตอบได้ว่าหากเตรียมเลซิทินจากถั่วเหลืองให้มีฟอสฟาติดิลเซอรีนสูงขึ้นจะสามารถใช้ประโยชน์แก้ไขอาการของโรคอัลไซเมอร์ได้หรือไม่ มีเพียงข้อมูลในสัตว์ศึกษาโดยซากาอิและคณะ (Sakai et al 1996) ที่รายงานผลการทดลองว่าฟอสฟาติดิลเซอรีนที่

เตรียมจากถั่วเหลืองเมื่อเสริมในหนูทดลองสามารถแก้ไขปัญหาสมองเสื่อมด้วยโรคจิตเสื่อมในวัยชรา (senile dementia) ได้

มีอาการทางระบบประสาทส่วนกลางอีกกลุ่มหนึ่งที่มีการกล่าวอ้างว่าการเสริมเลซิทินปริมาณมากจะช่วยบรรเทาอาการนี้ อาการดังกล่าวได้แก่ Tardive dyskinesia หรือ TD การศึกษาเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมของโดมิโนและคณะ (Domino et al 1985) โดยให้ผู้ป่วย TD จำนวน 19 คนเสริมเลซิทินชนิดพีซีสูง 30 กรัม/วันเป็นเวลานาน 6-12 สัปดาห์ ผลการศึกษาพบว่าผู้ป่วยบางรายมีอาการดีขึ้น อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแล้วไม่พบว่าการเสริมเลซิทินให้ผลแตกต่างจากการได้รับยาหลอก ยกเว้นแต่ระดับโคลีนในเลือดเท่านั้นที่สูงขึ้นอย่างชัดเจนในผู้ป่วยที่เสริมเลซิทิน

ในกรณีการเสริมเลซิทินในหญิงมีครรภ์ ไม่มีรายงานใดที่กล่าวว่าการเสริมดังกล่าวจะช่วยในการพัฒนาสมองทารกในครรภ์ได้ นอกจากนี้ เบลล์และสล็อตกิน (Bell and Slotkin 1985) รายงานในสัตว์ทดลองว่าการเสริมเลซิทินในปริมาณสูงอาจก่อผลกระทบบางประการแก่สมองและพฤติกรรมของลูกในครรภ์ได้

ในส่วนของเลซิทินกับการทำงานของตับ มีรายงานวิจัยที่น่าสนใจนำเสนอข้อมูลการนำเลซิทินประเภทฟอสฟาติดิลโคลีนชนิดที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงอันได้แก่เลซิทินจากถั่วเหลืองมาใช้ในการบรรเทาอาการของโรคตับในผู้ป่วยด้วยพิษสุราเรื้อรัง ลีเบอร์และคณะ (Lieber 1994) ทำการศึกษาในลิงบาบูนพบว่าลิงบาบูนที่มีปัญหาการสะสมไขมันในตับและตับแข็งอันเป็นผลมาจากแอลกอฮอล์ หากได้รับการเสริมเลซิทินชนิดที่มีฟอสฟาติดิลโคลีนที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงจะสามารถบรรเทาอาการลงได้ นอกจากนี้การเสริมเลซิทินชนิดดังกล่าวยังสามารถชะลอปัญหาการสะสมไขมันในตับของลิงบาบูนอันจะนำไปสู่ปัญหาตับแข็งในภายหลังได้ รายงานวิจัยในสัตว์ทดลองหลายรายงานให้ผลทั้งสอดคล้องและขัดแย้งกันกับรายงานของลีเบอร์ การศึกษาของเบรดี และคณะ (Brady et al 1998) ในหนูให้ผลที่บ่งชี้ว่าเลซิทินชนิดพีซีที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงซึ่งสกัดได้จากถั่วเหลืองมีคุณสมบัติในการยับยั้งการสร้างคอลลาเจนในตับซึ่งนำไปสู่ภาวะตับแข็ง การศึกษาของอะบากูโมวาและคณะ (Abakumova et al 1996) ให้ผลในทำนองเดียวกัน อย่างไรก็ตาม ยังไม่ปรากฏรายงานเรื่องนี้ในมนุษย์มาก่อน ยกเว้นรายงานของฮายาชิและคณะ (Hayashi et al 1999) ให้ผู้ป่วยที่มีปัญหาเรื่องตับเสริมเลซิทินที่มีพีซีสูง เป็นพีซีชนิดที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงกลุ่มโอเมก้าสามในระดับ 40% ซึ่งเป็นเลซิทินที่สกัดได้จากปลา ผลการศึกษาแม้จะมีแนวโน้มว่าการเสริมอาจให้ผลดีบ้างแต่ยังไม่อาจสรุปได้ชัดเจนว่าการเสริมเลซิทินชนิดที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงมากจะเป็นประโยชน์ต่อตับของมนุษย์ เรื่องนี้จึงจำเป็นต้องรอข้อมูลที่ชัดเจนอีกระยะหนึ่ง

สรุปว่าเลซิทินให้ผลดีต่อสุขภาพหลายประการ นอกจากนี้ยังมีรายงานชัดเจนถึงข้อดีของกรดไขมันไม่อิ่มตัวกลุ่มโอเมก้าสามที่มีต่อการป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือดด้วย แต่เลซิทินจาก

ถั่วเหลืองมีกรดกลุ่มนี้โดยเฉพาะอย่างยิ่งในรูปของอีพีเอและดีเอชเอต่ำ การศึกษาของวินัย ดะห์ลันและคณะ (Dahlan et al 1996) ให้ข้อมูลว่าเลซิทินจากปลาทะเลมีกรดไขมันโอเมก้าสามสูงเป็นประโยชน์ต่อการป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือด การพัฒนาเลซิทินจากหลายแหล่งจึงน่าจะให้ผลดีต่อการทำหน้าที่ของเลซิทินในร่างกายมากกว่าการใช้เลซิทินของถั่วเหลืองเพียงอย่างเดียวดังเช่นที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน

ในทางอุตสาหกรรม เลซิทินเป็นสารฟอสโฟลิปิดที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อของพืชหรือสัตว์ เป็นสารที่ทำหน้าที่สำคัญหลายประการในสิ่งมีชีวิต มีรายงานทางการแพทย์ว่าการบริโภคเลซิทินปริมาณ 500-1,000 มิลลิกรัม/วันอาจส่งผลให้เมแทบอลิซึมของคอเลสเตอรอลดีขึ้นโดยการดูดซึมคอเลสเตอรอลในทางเดินอาหารลดลง การขนส่งคอเลสเตอรอลภายในเลือดดีขึ้น ส่งผลให้ระดับความเข้มข้นของคอเลสเตอรอลในเลือดลดลงได้ ความเสี่ยงของโรคหัวใจและหลอดเลือดลดลง อีกทั้งมีรายงานประโยชน์ของเลซิทินทางด้านอื่นอีก รวมถึงการเพิ่มระดับ HDL ซึ่งเป็นไขมันชนิดที่ดี นอกจากนี้ยังมีรายงานข้อดีของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงชนิดโอเมก้าสามต่อการลดความเสี่ยงของโรคหัวใจและหลอดเลือด

ปัจจุบันมีความนิยมเสริมเลซิทินในรูปของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารกันเป็นจำนวนมากเพื่อประโยชน์ในการลดความเสี่ยงของโรคหัวใจและหลอดเลือดโดยเลซิทิน เกือบทั้งหมดที่มีจำหน่ายในท้องตลาดเป็นเลซิทินที่เป็นผลพลอยได้จากการสกัดน้ำมันถั่วเหลือง ซึ่งมีทั้งข้อดีและข้อด้อย หากพิจารณาถึงข้อด้อย เลซิทินจากถั่วเหลืองไม่มีกรดไขมันชนิดโอเมก้าสามชนิดอีพีเอและดีเอชเอซึ่งพบในปลาทะเล ขณะเดียวกันมีฟอสโฟลิปิดชนิดฟอสฟาติดิลโคลีนค่อนข้างต่ำ (~15%) ในขณะที่การศึกษาของวินัย ดะห์ลัน และคณะ (1996) พบว่าเลซิทินจากปลาทะเลมีกรดไขมันโอเมก้าสามชนิดดีเอชเอและอีพีเอสูง อีกทั้งมีฟอสฟาติดิลโคลีนรวมถึงฟอสฟาติดิลเซอรีนที่เป็นประโยชน์ต่อการทำงานของเซลล์ประสาทในปริมาณสูง ขณะเดียวกันรำข้าวและปาล์มน้ำมันมีเลซิทินที่มีคุณสมบัติต่างจากถั่วเหลืองโดยมีกรดไขมันชนิดโอเลอิกซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวตำแหน่งเดียวในปริมาณสูง การผสมผสานเลซิทินหลายชนิดเพื่อเพิ่มจุดแข็งลดจุดอ่อนของกันและกันจึงเป็นแนวคิดที่ดี ปัจจุบันการผสมผสานเลซิทินในลักษณะนี้ยังไม่มีการทำ การพัฒนาเลซิทินที่นำเสนอในโครงการนี้จึงนับเป็นครั้งแรก

การนำรำข้าวก็ดี ปาล์มน้ำมันก็ดี ปลาทะเลโดยเฉพาะอย่างยิ่งปลาทะเลที่เข้าสู่กระบวนการทำปลากระป๋องมีการขจัดน้ำมันบางส่วนทิ้งมาสกัดเลซิทินจะทำให้เลซิทินในแหล่งน้ำมันเหล่านี้ซึ่งไม่ได้รับความสนใจมานาน เกิดความสำคัญมากขึ้น เป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้แก่ผลผลิตทางการประมงและเกษตรเหล่านี้

มีการคาดการณ์ว่าการผลิตข้าวของประเทศไทยกว่า 35 ล้านตันต่อปี มีรำข้าวเข้าสู่ตลาดมากกว่า 3 ล้านตัน รำข้าวเหล่านี้ไม่มีการนำไปสกัดเลซิทินทำให้สารลิพิดที่มีคุณค่าตัวนี้ถูกทิ้งหรือมองข้ามไปอย่างน่าเสียดาย ประมาณการณ์กันว่าเลซิทินที่ถูกขจัดทิ้งหรือไม่ได้รับความใส่ใจนี้มีปริมาณมาก

กว่า 5 แสนตัน มูลค่าหลายร้อยล้านบาท เลซิทินจากอุตสาหกรรมปาล์มน้ำมัน ตลอดจนผลิตภัณฑ์ปลาทะเลกระป๋องมูลค่ามหาศาลถูกละเลย หากนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารประเภทเลซิทินย่อมสร้างมูลค่าได้อย่างมากมาย

ในการศึกษาวิจัยที่ผ่านมา ได้พัฒนาผลิตภัณฑ์เลซิทินจากแหล่งอื่นๆ นอกเหนือจากถั่วเหลือง อันได้แก่ ปลาป่นและรำข้าวทำให้ได้เลซิทินที่มีคุณสมบัติเด่นหลายประการเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภค อย่างไรก็ตาม ในกรณีของปาล์มน้ำมันไม่สามารถผลิตเลซิตินได้เนื่องจากมีปริมาณต่ำ แหล่งวัตถุดิบที่ดีสำหรับการเตรียมเลซิทินคือปลาป่น รำข้าว และถั่วเหลือง

งานวิจัยครั้งนี้ทำการศึกษาผลของเลซิทินจากปลาทะเล (LE-FM) ถั่วเหลือง (LE-SB) และเลซิทินผสมที่ได้จากการใช้เลซิทินสองชนิดผสมกันในสัดส่วน 1:1 และ 1:2 (LE-FS 1:1, LE-FS 1:2) ต่อไลโปโปรตีนและกรดไขมันในพลาสมาของหนูทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย

1. เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดใหม่ที่อาจช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดชนิดที่ไม่มีการวางจำหน่ายในท้องตลาดมาก่อน
2. เพื่อพัฒนาเลซิทินที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวและอนุพันธุ์แอลกอฮอล์หลายชนิดอยู่บนโมเลกุลของฟอสโฟลิปิดแตกต่างจากเลซิทินที่วางจำหน่ายทั่วไป
3. เพื่อนำเลซิทินที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาเมแทบอลิซึมของฟอสโฟลิปิดทำให้เข้าใจกลไกการทำงานของสารฟอสโฟลิปิดตลอดจนเมแทบอลิซึมของไลโปโปรตีนมากขึ้นอันเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนายาใหม่ๆ
4. เพื่อนำเลซิทินชนิดใหม่ไปใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารทางการแพทย์ชนิดใหม่ๆ
5. เพื่อเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มแก่ผลิตผลทางการเกษตรของประเทศไทย อันได้แก่ ผลิตภัณฑ์ประมง ปาล์มน้ำมัน รำข้าว
6. เพื่อศึกษาคุณค่าที่ถูกมองข้ามไปของเลซิทินในผลิตผลทางการเกษตร

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยศึกษาผลของเลซิทินในสัตว์ทดลอง

1. เพื่อศึกษาในหนูทดลองถึงผลของการให้เลซิตินสูตรต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งชนิดที่มีกรดไขมันโอเมก้าสามที่มีต่อเมแทบอลิซึมของไขมันในเลือด
2. เพื่อเป็นการพัฒนาเลซิตินที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงทั้งกลุ่มโอเมก้าสามและโอเมก้าหกและอนุพันธุ์แอลกอฮอล์หลายชนิดอยู่บนโมเลกุลของฟอสโฟลิปิดแตกต่างจากเลซิตินที่วางจำหน่ายทั่วไป
3. เพื่อนำเลซิตินชนิดใหม่ไปใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารทางการแพทย์ชนิดใหม่ๆ
4. เพื่อเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มแก่ผลิตผลทางการเกษตรของประเทศไทย อันได้แก่ ผลิตภัณฑ์ประมง ปาล์มน้ำมัน รำข้าว
5. เพื่อศึกษาคุณค่าที่ถูกมองข้ามไปของเลซิตินในผลิตผลทางการเกษตร

วัตถุดิบ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

การจัดเตรียมวัตถุดิบและอุปกรณ์

วัตถุดิบที่ใช้

วัตถุดิบที่นำมาใช้ในงานวิจัยครั้งนี้มี 2 ชนิด ได้แก่

1. ปลาป่น (Fishmeal หรือ FM) ซึ่งเป็นปลาป่นไทย ได้จากโรงงานป่นปลาเล็กปลาน้อย จากโรงงานที่สมุทรสาคร ตัวอย่างปลาป่นประกอบด้วย โปรตีน 65% ไขมัน 12% มีความชื้น ทราย และเกลือ ดังแสดงในภาพที่ 1

2. เลซิทินถั่วเหลือง ได้จากบริษัท Bangkok Vetlab ที่สมุทรสาคร

Figure 1 ตัวอย่างปลาป่น

การจัดเตรียมสารเคมีและเครื่องแก้ว

TLC chambers (Wheaton model 276860) จาก Wheaton, Millville, NJ, USA. Micro-reaction vessels (2 ml) with screw cap seals model C4013-1 and target polyspringe inserts (0.3 ml) model C4010-630 จาก National (National Scientific, USA). Borosilicate glass tubes (16×125 mm) with Teflon-lined screw caps จาก Pyrex และต้องทำการตรวจสอบก่อนว่าเครื่องแก้วไม่รั่วโดยการเติมสารละลายอินทรีย์ปิดจุกและทำการต้มที่ 100 องศาเซลเซียสและชั่งน้ำหนักเปรียบเทียบก่อนและหลังการต้ม หากพบว่าเครื่องแก้วรั่วโดยน้ำหนักภายหลังการต้มลดลงอย่างสังเกตเห็นได้ชัดต้องทิ้งหรือระงับการใช้เครื่องแก้วชิ้นนั้นโดยทันที ทั้งนี้เนื่องจากรอยรั่วที่เกิดขึ้นจะทำให้การวิเคราะห์สัดส่วนของกรดไขมันแต่ละตัวที่พบในตัวอย่างเกิดปัญหาการสูญเสียออกไปในสัดส่วนที่ไม่เท่ากัน ทำให้ผลการวิเคราะห์ไม่ถูกต้อง การล้างเครื่องแก้วทุกชิ้นที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดไขมันผ่านการล้างด้วยกรดไนตริกสำหรับเครื่องแก้วที่ใช้ในการวิเคราะห์ฟอสฟอรัสหรือฟอสโฟลิปิด หรือชะล้างด้วยสารละลาย dichloromethane-methanol (2:1, v/v) และเป่าให้แห้งสำหรับเครื่องแก้วที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดไขมัน

Nitrogen gas เป็น oxygen-free. Compressed gases จากบริษัทฉัตรกร สารเคมีทั้งหมดเป็น analytical grade สารเคมีสำหรับงาน liquid chromatography-mass spectrometer- mass spectrometer (LC-MS-MS) system เป็น HLPC grade จากบริษัท Merck (Darmstadt, Germany). Acetylchloride used for transesterifying lipids จาก Sigma (St Louis, MO, USA). Fatty acid methyl ester (FAME) mixtures code no. 189-19 จาก Supelco (Bellefonte, PA, USA). Internal standard (IS) of fatty acid; pentadecanoic acid (FA-C15:0) code no. P6125 and IS of Triacylglycerol; tripentadecanoin (TG-C15:0) code no. T4257 จาก Sigma (St Louis, MO, USA). IS of phospholipids; 1-heptadecanoyl-2-hydroxy-*sn*-glycero-3-phosphocholine (LPC-C15:0) code no. 855676P, 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-[phosphoethanolamine] (DMPE) code no. 850745, 1,2-dimyristelaidoyl-*sn*-glycero-3-[phosphocholine] (PC-C14:1) code no. 850346 and 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-[phosphor-l-serine] (DMPS) code no. 840033 จาก Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL, USA). เตรียม working ISs ให้มีความเข้มข้น 1 mg/ml ใน dichloromethane-methanol (2:1, v/v). น้ำกลั่นและ deionized water เตรียมจาก Milli-Q synthesis system (Millipore, Milford, MA, USA) ที่ติดตั้งในศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thin-layer chromatographic plates (20×20 cm TLC) precoated ด้วย silica gel 60 without fluorescent indicator โดยมีความหนา 0.25 mm ซื้อมาจาก Merck (Merck 5721, E.Merck, Darmstadt, Germany). TLC แต่ละเพลทถูก prerun ด้วย dichloromethane-methanol (2:1, v/v)

และถูก activated ที่ 120°C ในตู้อบนาน 30 นาทีก่อนใช้งาน Reagent kits for Cholesterol (Chol) and Triacyglycerol (TG) determination จาก Human, Germany.

เครื่องมืออุปกรณ์

เครื่องมืออุปกรณ์จากศูนย์วิทยาลิพิดและไขมัน คณะสหเวชศาสตร์ (The Lipid and Fat Science Research Center (LiFARC), Faculty of Allied Health Science) และศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (The Halal Science Center (HASCI), Chulalongkorn University) ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ

1. Gas Chromatograph GC-2010 with Auto injector AOC-20i, Shimadzu, Tokyo, Japan
2. DB-23 Silica column, J&W Scientific, USA
3. Microultracentrifuge CS 150 GXL, Hitachi, Tokyo, Japan
4. Tube sealer STF 2, Hitachi, Tokyo, Japan
5. Tube slicer TSU 2, Hitachi, Tokyo, Japan
6. Refrigerated centrifuge CF 7D2, Hitachi, Tokyo, Japan
7. Photometer Humalyzer 3000, Human, Germany
8. Electronic balance with 4 digits CP2245, Sartorius, germany
9. Rotary evaporator R–114, Buchi, Switzerland
10. Vacuum system, model B–169 Buchi, Switzerland
11. Nitrogen evaporator / heater / stirring module, Pierce, IL, USA
12. Suction pump, model 523-V4-G21DX, MI, USA
13. Deep freezer -80°C, Shin Lab, Japan
14. Hot air oven Thermotec 2300, Contherm, Hutt City, New Zealand
15. Vacuum oven VD 115, Binder, Incheon, Korea
16. Sequential Plasma Spectrometer ICPS-7510 with Autosample Changer, Shimadzu, Tokyo, Japan
17. Microwave Laboratory System Ethos, Milestone, Sorisole, Italy

18. HPLC system HP 1100 series, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA coupled on-line to Esquire HCT Ion trap mass spectrometer, Bruker Daltonics, GmbH, Germany with an Electrospray ionization source
19. TLC plate scraping system (home-made at LiFARC, Chulalongkorn University)

TLC plate scraping system (แสดงในภาพที่ 2) ดัดแปลงทำขึ้นบนพลาสติกแข็งโดย LiFARC จากการออกแบบของ Hegstrand (1985). วิธีการนี้ใช้เวลาน้อยลงกว่าวิธีเก่าถึง 2–3 เท่า และสามารถลด oxidation of PUFA ซึ่งเกิดขึ้นในช่วงที่แผ่น TLC เริ่มแห้ง (Dahlan, 1989).

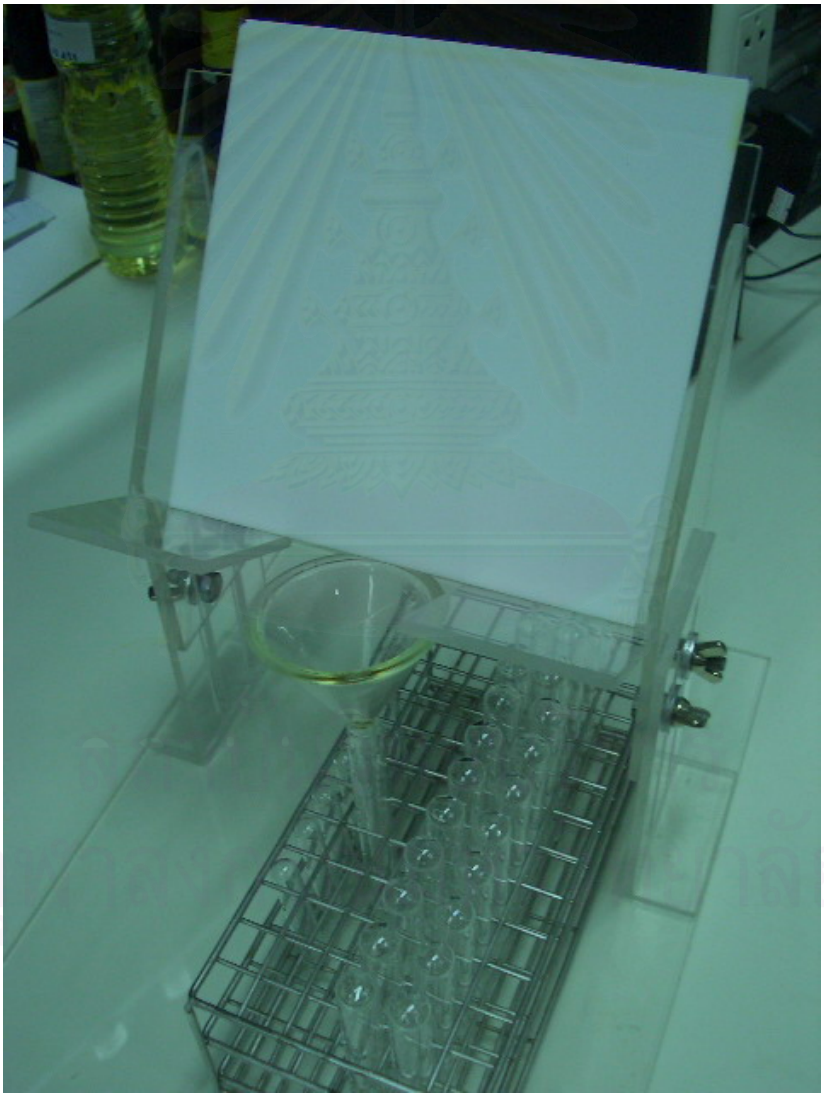

Figure 2 Thin-layer chromatography plate-scraping system made in house by LiFARC according to the design of Hegstrand (1985)

วิธีการวิจัย

1. ***การสกัดเลซิทินจากวัตถุดิบ***

1.1 การกำจัดไขมันออกจากปลาป่น

นำตัวอย่างปลาป่นมาอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสนาน 30 นาทีเพื่อลดความชื้นและทำลายเอนไซม์ที่อาจมีอยู่โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ไลเปส แล้วชั่งปลาป่น 400 กรัมใส่ในบิกเกอร์ขนาด 2ลิตร นำไปสกัดแยกเอาไขมันออกด้วย acetone 1,200 มิลลิลิตร สองครั้ง (อัตราส่วน fish meal : acetone ratio of 1:3 (w/v)) กรองสารละลายผ่านกระดาษกรอง จากนั้นจึงระเหย acetone ออกที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสภายใต้แรงดูดของเครื่อง rotary evaporator ไขมันที่ได้ส่วนนี้เรียกว่า crude fish oil ประกอบด้วย triacylglycerol (TG) เป็นหลัก

1.2 การสกัด Polar lipid

นำเอาตะกอนของวัตถุดิบที่ผ่านการสกัด TG ออกแล้วไปสกัดด้วย methanol สองครั้ง ด้วยอัตราส่วน fish meal : methanol เท่ากับ 1:3 (w/v) กรองสารละลายผ่านกระดาษกรอง จากนั้นจึงระเหย methanol ออกที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสภายใต้แรงดูดของเครื่อง rotary evaporator จากนั้นนำเอาตะกอนไปสกัดต่อด้วย n-hexane สองครั้ง (อัตราส่วน fish meal : n-hexane ratio of 1:3 (w/v)) ทำการรวมสารละลายจากการสกัดด้วย methanol และ n-hexane เข้าด้วยกัน ทำการระเหยสารละลายอินทรีย์ออกจะได้เลซิทินเป็นยางเหนียวที่ก้นขวด ทำการชั่งปริมาณ เลซิทินที่ได้บันทึกข้อมูลไว้

2. ***การเตรียมเลซิทิน***

นำเลซิทินที่สกัดได้จากปลาป่น มารวมกับเลซิทินเหลือง เป็น 4 สูตร แต่ละสูตรจะมีเลซิทินความเข้มข้น 0.5 g/ml .o 1% Tween-20 ดังนี้

- สูตรที่ 1 เลซิทินจากปลาป่นอย่างเดียว เรียกว่า LE-FM.
- สูตรที่ 2 เลซิทินจากถั่วเหลืองอย่างเดียว เรียกว่า LE-SB.
- สูตรที่ 3 ผสมเลซิทินจากปลาป่นกับเลซิทินจากถั่วเหลืองในอัตราส่วน FM : SB เท่ากับ 1:1 (w/w) เรียกว่า LE-FS 1:1

- สูตรที่ 4 ผสมเลซิทินจากปลาป่นกับเลซิทินจากถั่วเหลืองในอัตราส่วน FM : SB เท่ากับ 1:2 (w/w) เรียกว่า LE-FS 1:2

3. การศึกษาในสัตว์ทดลอง

การศึกษาในสัตว์ทดลองผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมในการวิจัยของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University) การทดลองนี้ใช้หนู Wistar ตัวผู้ขนาด 180-190 g จาก the National Laboratory Animal Center มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา เลี้ยงหนูในกรงสเตนเลสแยกกันกรงละตัว ที่คณะสัตวแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลี้ยงด้วยอาหารเม็ด *ad libitum* และน้ำที่อุณหภูมิ 24 ± 1°C อาหารเม็ดประกอบด้วย corn, soybean meal, fullfat soybean, rice, rice by-product, fishmeal, corn gluten meal, vegetable oil, salt, vitamins and minerals.

หลังจากเลี้ยงหนูไว้ 7 วัน หนู 30 ตัวจะถูกแบ่งเป็น 5 กลุ่มๆละ 6 ตัว (n=6). แต่ละกลุ่มจะถูกป้อนเลซิทินชนิดต่างๆ 600 มิลลิกรัม / น้ำหนักเป็นกิโลกรัม เป็นเวลา 8 สัปดาห์

กลุ่ม 1. Control group ถูกป้อนด้วย 1% Tween-20 ในปริมาตรเดียวกับกลุ่มอื่นๆ ที่ได้รับเลซิทิน

กลุ่ม 2. LE-FM group ถูกป้อนด้วย fishmeal lecithin

กลุ่ม 3 LE-SB group ถูกป้อนด้วย soybean lecithin

กลุ่ม 4 LE-FS 1:1 group ถูกป้อนด้วยส่วนผสมของ fish meal lecithin : soybean lecithin เท่ากับ 1:1 (w/w)

กลุ่ม 5 LE-FS 1:2 group ถูกป้อนด้วยส่วนผสมของ fish meal lecithin : soybean lecithin เท่ากับ 1:2 (w/w)

จะต้องชั่งน้ำหนักหนู น้ำหนักอาหาร น้ำหนักน้ำที่หนูกินเข้าไปทุกวันจนครบ 8 สัปดาห์ หนูจะถูกงดให้อาหารและเจาะเลือดจากหัวใจเป็น heparinized blood ทำการแยกพลาสมาออกมาเพื่อใช้วิเคราะห์ต่อไป

4 การตรวจวิเคราะห์ทางเคมี

4.1 Phospholipids analysis

Phosphorus (P) ใน phospholipids (PL) ถูกเปลี่ยนเป็น inorganic phosphorus โดยการย่อยเลซิทินด้วยวิธี acid digestion และวัดปริมาณด้วย Inductively Coupled Plasma Spectrometer (ICPS) และ Sequential Plasma Spectrometer ICPS-7510.

4.2 Phospholipids profiling โดยใช้ liquid chromatography mass spectrometer (LC-MS)

4.3 แยก TG free FA และ PL ด้วยเทคนิค TLC

4.4 วิเคราะห์ Fatty acid

4.5 วัด lipoprotein particle diameter

4.6 วัด triacylglycerol และ cholesterol

5. สถิติในการวิจัย

ข้อมูลทั้งหมดนำเสนอในรูปของ Mean หรือ Mean ± S.E.M. การวิเคราะห์ค่านัยสำคัญทางสถิติทำโดยใช้ one-way analysis of variance (ANOVA) by SPSS version 11.5 for windows (SPSS Inc., IL, USA) The Least Significant Difference test (LSD) ถูกใช้ในการเปรียบเทียบ mean comparisions กำหนดให้ $p < 0.5$ เป็นค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

Characterization of lipid content in lecithin

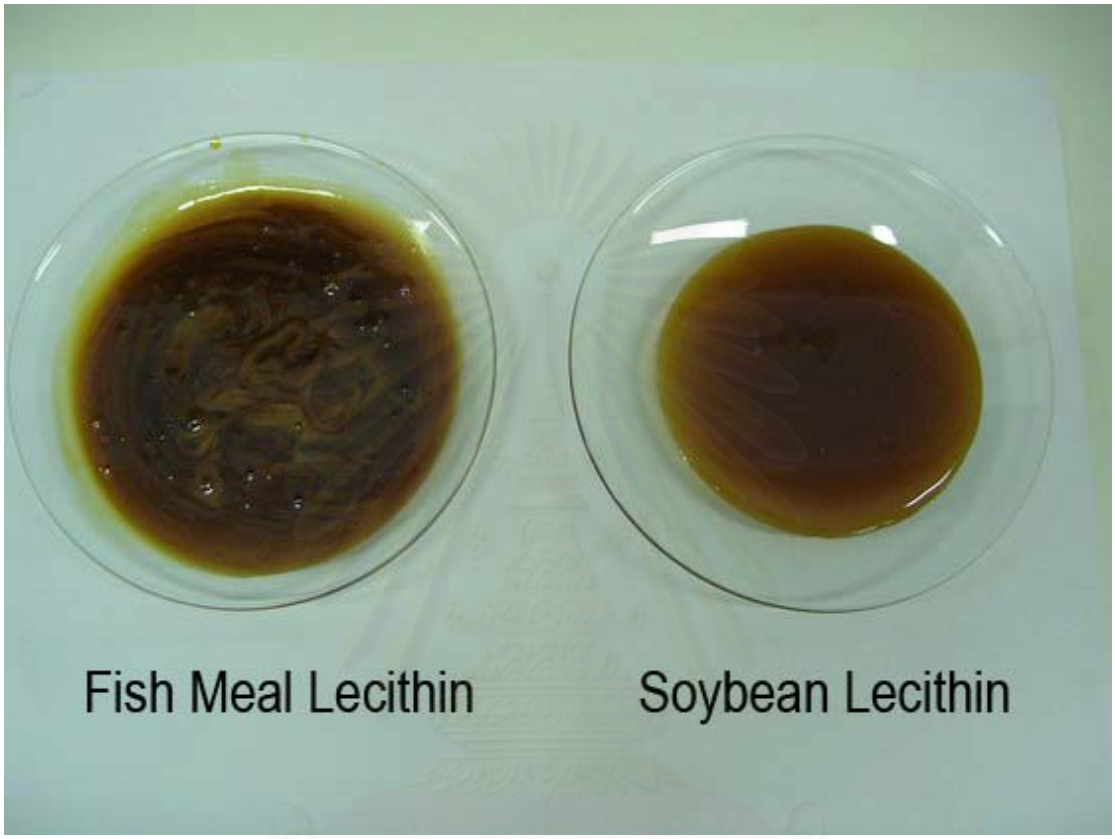

Figure 3 The lecithin extracted from fish meal (left) and soybean (right). Fish meal lecithin was prepared as described in the context whereas soybean lecithin was supplied from the commercial firm.

งานวิจัยครั้งนี้พบว่าเลซิทินจากปลาป่น (LE-FM) มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงชนิดโอเมก้า 3 ได้แก่ eicosapentaenoic acid (EPA; C20:5n-3) และ docosahexaenoic acid (DHA; C22:6n-3) สูงกว่าเลซิทินจากถั่วเหลือง (LE-SB) ที่ใช้ทั่วไปทางการค้า และมีกรดไขมันชนิดโอเมก้า 6 ได้แก่ linoleic acid (LA; C18:2n-6) และ alpha-linolenic acid (ALA; C18:3n-3) ต่ำกว่า LE-SB

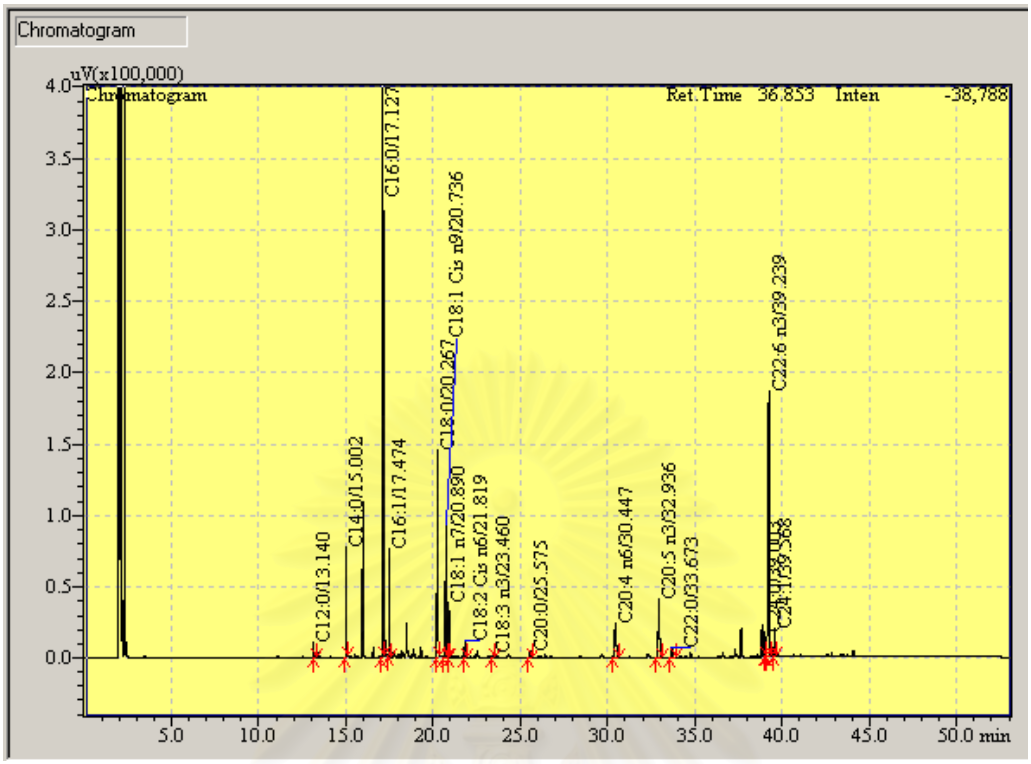

Figure 4a Fatty acid chromatogram of LE-FM

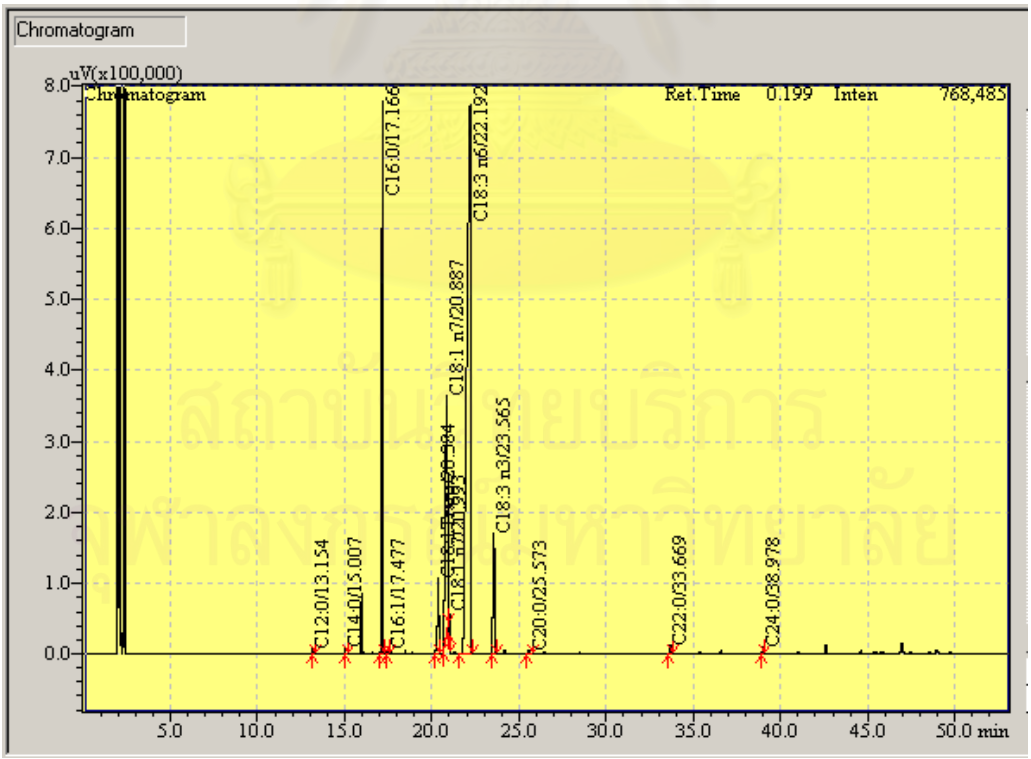

Figure 4b Fatty acid chromatogram of LE-SB

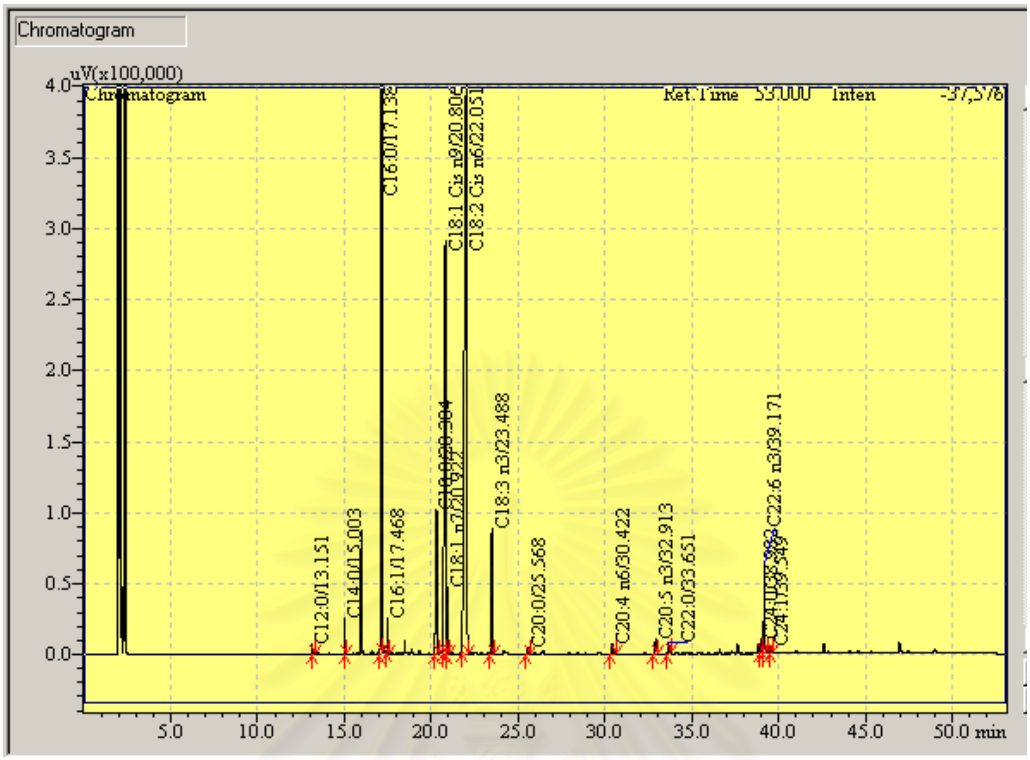

Figure 4c Fatty acid chromatogram of LE-FS 1:1

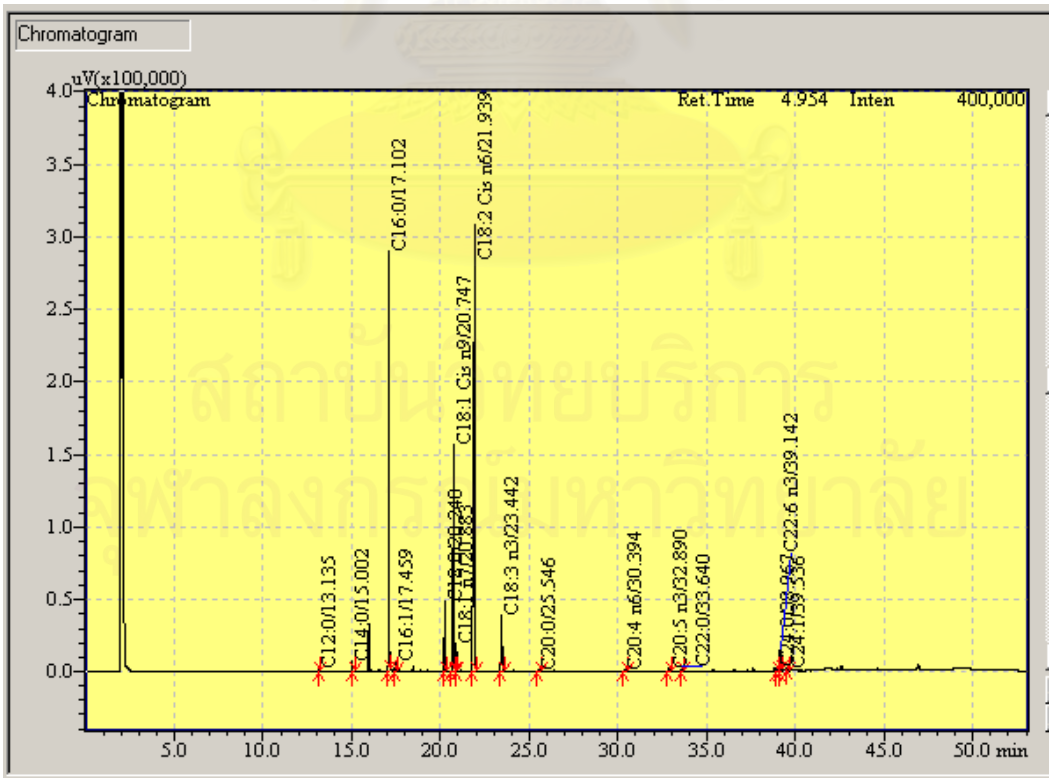

Figure 4d Fatty acid chromatogram of LE-FS 1:2

Table 1 Fatty acid profile of each lecithin in form of fatty acid methyl esters (FAMEs) (g/100g fatty acid)

Fatty Acid	LE-FM	LE-SB	LE-FS 1:1	LE-FS 1:2
C12:0	0.67 ± 0.00	0.11 ± 0.01	0.19 ± 0.17	0.16 ± 0.01
C14:0	3.64 ± 0.19	0.14 ± 0.00	0.58 ± 0.02	0.39 ± 0.00
C16:0	30.73 ±0.01	18.22 ±0.18	19.70 ± 6.01	18.88 ± 0.04
C16:1 n-7	4.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.57 ± 0.01	0.39 ± 0.00
C18:0	13.58 ± 0.01	3.43 ± 0.09	4.76 ± 0.26	4.13 ± 0.03
C18:1 n-9	8.10 ± 0.01	15.30 ± 1.45	16.06 ± 0.06	16.68 ± 0.04
C18:1 n-7	3.07 ± 0.00	2.18 ±1.06	1.79 ± 0.04	1.63 ±0.03
C18:2 n-6	1.06 ± 0.02	54.83 ± 0.48	47.48 ± 0.15	50.02 ± 0.14
C18:3 n-3	0.37 ± 0.00	4.93 ± 0.08	4.20 ± 0.02	4.45 ± 0.04
C20:0	0.54 ± 0.01	0.20 ± 0.00	0.23 ± 0.02	0.24 ± 0.00
C20:4 n-6	3.98 ± 0.01	-	0.44 ± 0.02	0.29 ± 0.00
C20:5 n-3	5.20 ± 0.00	-	0.63 ± 0.02	0.39 ± 0.00
C22:0	0.85 ± 0.01	0.33 ± 0.01	0.38 ± 0.16	0.38 ± 0.01
C22:6 n-3	21.11 ± 0.02	-	2.42 ± 0.06	1.52 ± 0.01
C24:0	1.33 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.32 ± 0.04	0.31 ± 0.01
C24:1 n-9	1.67 ± 0.01	-	0.26 ± 0.05	0.14 ± 0.01

Data were expressed as Mean ± S.E.M.; n=3 independent experiments.

Phospholipids profiling in lecithin

จากการศึกษาองค์ประกอบของเลซิทินพบว่า LE-FM และ LE-SB มีปริมาณ phosphatidylcholine (PC) 47.3% และ 36.2%; phosphatidylinositol (PI) 17.9% และ 46.3%; sphingomyelin (SM) 22.9% และ 0% กรดไขมัน C18:2n-6 1.06% และ 54.83%; C18:3n-3 0.37% และ 4.93%; C20:5n-3 5.2% และ 0%; C22:6n-3, 21.11% และ 0% ตามลำดับ

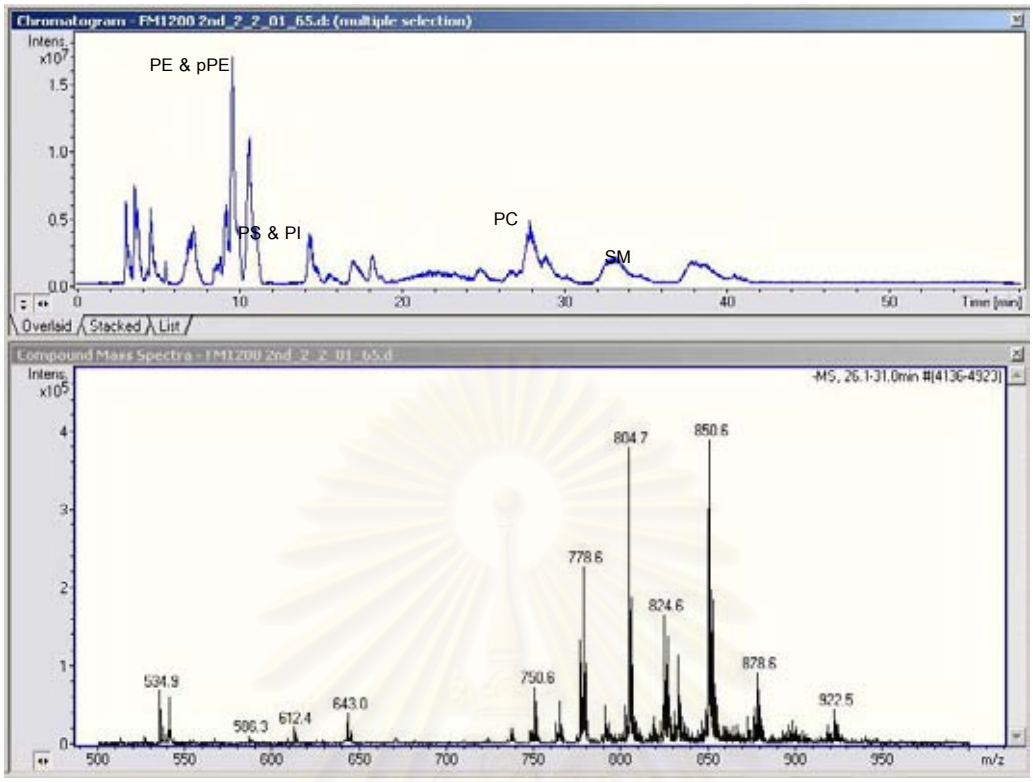

Figure 5a LC-chromatogram (upper part) and mass spectrum (lower part) of LE-FM

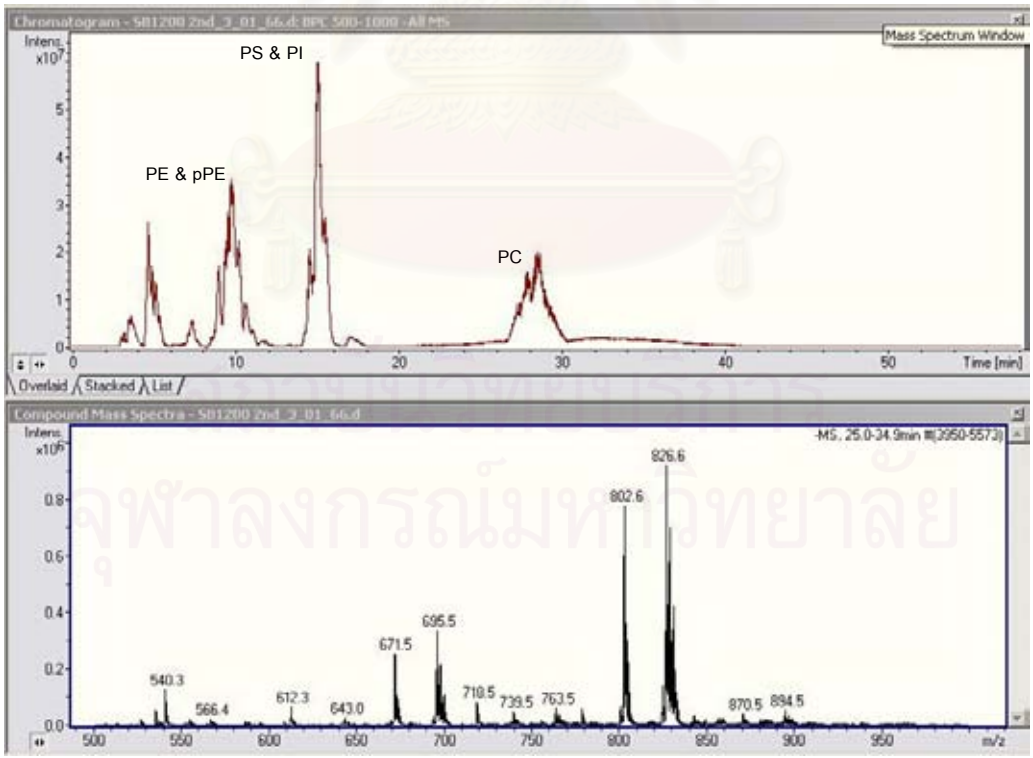

Figure 5b LC-chromatogram (upper part) and mass spectrum (lower part) of LE-SB

Table 2 Distribution of phospholipids in lecithin (%)

Phospholipids Class	LE-FM	LE-SB	LE-FS 1:1	LE-FS 1:2
PC	47.3	36.2	39.8	37.3
PS	2.1	0.5	0.4	0.5
PI	17.9	46.3	40.6	44.0
PE & pPE	9.8	17.0	14.5	15.6
SM	22.9	0	4.7	2.6

N=2 independent experiments

PC = phosphatidylcholine

PS = phosphatidylserine

PI = phosphatidylinositol

PE = phosphatidylethanolamine

pPE = phosphatidylethanolamine plasmalogen

SM = sphingomyelin

ภายหลังการเสริมเลซิทินในสัตว์ทดลองเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าไขมันในเลือดไม่เปลี่ยนแปลง แต่สัดส่วนของ VLDL-TG/HDL-TG ของหนูกลุ่ม LE-FM และ LE-SB ลดลง ($p<0.05$) แสดงถึงอัตราการไหลเวียนและเมแทบอลิซึมของ TG-rich lipoproteins ที่เพิ่มขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

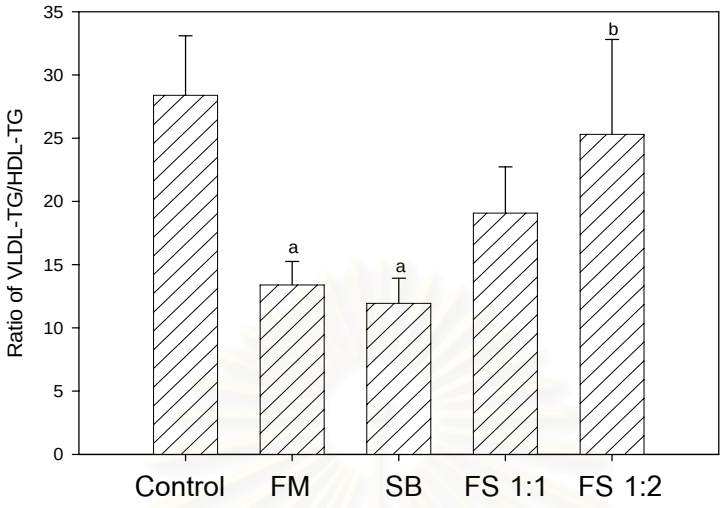

Figure 6 Ratio of VLDL-TG to HDL-TG of rats fed with lecithin after 8 weeks administration

[a] $p < 0.05$ compared to control. [b] $p < 0.05$ compared to LE-SB.

นอกจากนี้ particles size ของ VLDL และ LDL ในหนูที่ได้รับเลซิทินทุกกลุ่มมีขนาดเล็กลง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.05$) รวมถึง particle size ของ HDL ด้วย ยกเว้น HDL particles ในกลุ่มที่ได้รับ LE-SB มีขนาดใหญ่ขึ้น ($p<0.05$) ความแตกต่างเช่นนี้อาจเป็นผลมาจากชนิดของฟอสโฟลิพิด ได้แก่ SM และ PI ในเลซิทินทั้งสองกลุ่มที่แตกต่างกัน

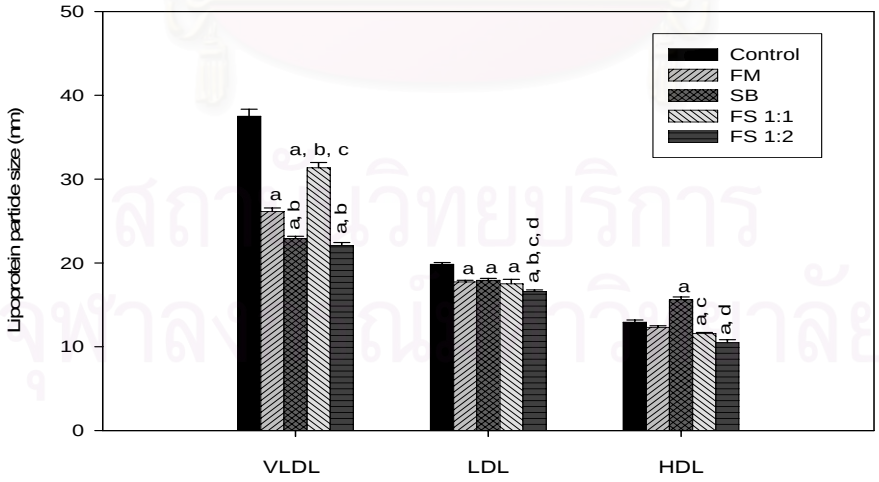

Figure 7 Lipoprotein particle size of rats fed with lecithin after 8 weeks administration (nm)

[a] $p < 0.05$ compared to control. [b] $p < 0.05$ compared to LE-FM.

[c] $p < 0.05$ compared to LE-SB. [d] $p < 0.05$ compared to LE-FS 1:1.

ในกรณีการขนส่งกรดไขมันเพื่อแลกเปลี่ยนกับเซลล์ต่างๆในกระแสเลือด พบว่าสัดส่วนของ C20:5n-3 + C22:6n-3 /C18:2n-6 + C20:2n-6 ซึ่งเป็นกรดไขมันตั้งต้นในการสร้าง eicosanoids serie 2 และ serie 3 ในพลาสมาสูงขึ้นในกลุ่มที่ได้รับ LE-FM เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ LE-SB บ่งชี้ถึงฤทธิ์ของ LE-FM ในการป้องกันการเกิด thrombogenesis ที่สูงกว่า LE-SB สรุปว่าการเสริมเลซิทินส่งผลดีต่อเมแทบอลิซึมของ TG-rich lipoproteins

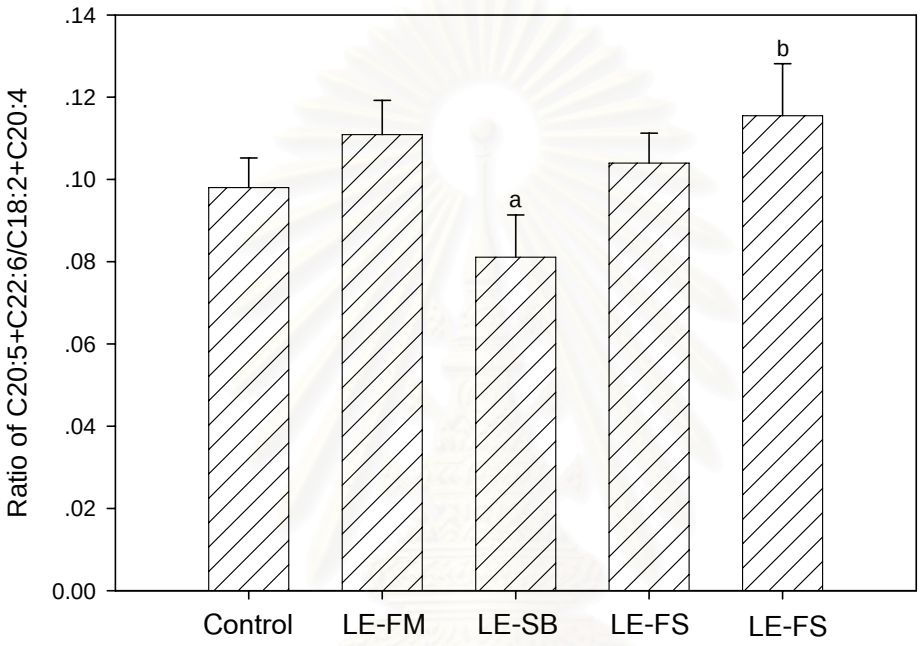

Figure 8 The ratio of C20:5+C22:6/C18:2+C20:4 of rats fed with lecithin after 8 weeks administration

[a] $p < 0.05$ compared to LE-FM. [b] $p < 0.05$ compared to LE-SB.

การตรวจหาค่าสารเคมีในกระแสเลือดหนูหลังจากป้อนเลซิทินไปแล้ว 8 สัปดาห์ พบว่า ค่า HDL-cholesterol ของกลุ่มหนูที่ป้อนด้วย LE-SB and LE-FS 1:1 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p< 0.05$) นอกจากนั้น ค่าCreatinine ของหนูที่ป้อนด้วย LE-FS 1:1 และ LE-FS 1:2 นั้นจะสูงกว่ากลุ่มหนูที่ป้อนด้วย LE-FM และ LE-SB ($p< 0.05$). แม้ว่าค่าของ liver function และค่าของ kidney functions อื่นๆ จะไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติก็ตาม (Tabel 3) เนื่องจากข้อมูลความปลอดภัยในสัตว์ทดลองให้ผลไม่ชัดเจน จึงยังไม่สามารถยืนยันความปลอดภัยในสัตว์ทดลองในระดับที่นำมาใช้ในมนุษย์ได้ จำเป็นต้องระงับโครงการการทดลองใช้เลซิทินในมนุษย์ไว้ก่อน

Table 3 Blood chemical parameters of rats after 8 weeks administration

Parameters	Control (1% Tween-20; n=6)	LE-FM (n=6)	LE-SB (n=6)	LE-FS 1:1 (n=6)	LE-FS 1:2 (n=6)
Triacylglycerol (mg/dl)	138.5 ± 20.02	117 ± 20.27	106.5 ± 14.5	97.7 ± 7.21	108.3 ± 8.4
Cholesterol (mg/dl)	67 ± 2.89	65.2 ± 3.89	68.5 ± 1.78	59 ± 3.67	67.5 ± 4.93
HDL (mg/dl)	34.68 ± 1.77	31.9 ± 1.84	35.98 ± 1.15	30.5 ± 2.03 [a]	34.48 ± 2.1
Creatinine (mg/dl)	0.8 ± 0.03	0.83 ± 0.02	0.77 ± 0.04	0.88 ± 0.02 [a, b]	0.93 ± 0.03 [a, b]
BUN (mg/dl)	25.78 ± 0.1	24.47 ± 1.13	25.93 ± 1.04	24.82 ± 1.5	25.98 ± 0.99
Uric (mg/dl)	1.38 ± 0.2	1.37 ± 0.14	1.42 ± 0.27	1.23 ± 0.24	1.03 ± 0.18
SGOT (u/l)	88.5 ± 5.7	97 ± 17.6	91.67 ± 11.58	99.83 ± 7.68	98.67 ± 8.69
SGPT (u/l)	35 ± 2.37	33.17 ± 3.68	30.83 ± 1.74	33.33 ± 1.89	29.83 ± 3.23
Alkaline Phosphatase (u/l)	95.5 ± 8.16	85.5 ± 6.87	99.83 ± 12.29	87 ± 3.62	79.5 ± 2.81

Data were expressed as Mean ± S.E.M.

[a] $p < 0.05$ compared to LE-SB.

[b] $p < 0.05$ compared to control and LE-FM.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

Albert, C. M., Campos, H., Stampfer, M. J., et al. 2002. Blood levels of long chain n-3 fatty acids and the risk of sudden death. New England Journal of Medicine 346: 1113-8.

Artaud-Wild, S. M., Connor, S. L., Sexton, G., et al. 1993. Differences in coronary mortality can be explained by differences in cholesterol and saturated fat intakes in 40 countries but not in France and Finland. A paradox. Circulation 88: 2771-9.

Atoba, M. A., Ayoola, E. A., and Ogunseyinde, O. 1985. Effects of essential phospholipid choline on the course of acute hepatitis-B infection. Tropical Gastroenterology 6:96-9.

Berry, S. E., and Sanders, T. A. B. 2005. Influence of triacylglycerol structure of stearic acid-rich fats on postprandial lipaemia. Proceedings of the Nutrition Society 64: 205-12.

Bickerstaff, G. 2007. Lipids[online]. Available from: http://www-biol.paisley.ac.uk/courses/stfunmac/glossary.html[2007, March 17].

Bird, A. R., Brown, I. L., and Topping, D. L. 2000. Starches, resistant starches, the gut microflora and human health. Current Issues in Intestinal Microbiology 1: 25-37.

Bjerregaard, P.,and Dyerberg, J. 1988. Mortality from ischaemic heart disease and cerebrovascular disease in Greenland. International Journal of Epidemiology17: 514-9.

BNF (British Nutrition Foundation) 1992. Task Force Report. Unsaturated Fatty Acids: Nutritional and Physiological Significance. BNF:

Bolin, D. J., and Jonas, A. 1996. Sphingomyelin Inhibits the Lecithin-Cholesterol Acyltransferase Reaction with Reconstituted High Density Lipoproteins by Decreasing Enzyme Binding. Journal of Biological Chemistry 271 (32): 19152-8.

Brewer, H. B., 1999. Hypertriglyceridemia: changes in the plasma lipoproteins associated with an increased risk of cardiovascular disease. American Journal of Cardiology 83: 3F-12F.

British Nutrition Foundation. 1999. N-3 fatty acids and health. Briefing paper. BNF .

Brouwer, I. A., Katan, M. B., and Zock, P. L. 2004. Dietary alpha-linolenic acid is associated with reduced risk of fatal coronary heart disease, but increased prostate cancer risk: a meta-analysis. Journal of Nutrition 134: 919-22.

Brown, A. M., Baker, P. W., and Gibbons, G. F. 1999. Changes in fatty acid metabolism in rat hepatocytes in response to dietary n-3 fatty acids are associated with changes in the intracellular metabolism and secretion of apolipoprotein B48. Journal of Lipid Research 38: 469-81.

Bucher, H. C., Hengstler, P., Schindler, C., et al. 2002. N-3 polyunsaturated fatty acids in coronary heart disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. American Journal of Medicine 112: 298-304.

Buhman, K. K., Accad, M., Novak, S., et al. 2000. Resistance to diet-induced hypercholesterolemia and gallstone formation in ACAT2 deficient mice. Nature Medicine 6: 1341-7.

Buko, V., Lukivskaya, O., Nikitin, V., et al. 1996. Hepatic and pancreatic effects of polyenoylphosphatidylcholine in rats with alloxan-induced diabetes. Cell Biochemistry and Function 14:131-7.

Burdge, G. C., and Calder, P. C. 2005. Conversion of alpha-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in humans. Reproduction, Nutrition and Development 45: 581-97.

Burdge, G. C., and Wootton, S. A. 2002. Conversion of alpha-linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women. British Journal of Nutrition 88: 411-20.

Burdge, G. C., Jones, A. E., and Wootton, S. A. 2002. Eicosapentaenoic and docosapentaenoic acids are the principal products of alpha-linolenic acid metabolism in young men. British Journal of Nutrition 88: 355-63.

Burgess, J. W., et al. 2003. Phosphatidylinositol promotes cholesterol transport and excretion. Journal of Lipid Research 44: 1355-63.

Burgess, J. W., Neville. T. A-M., Rouillard, P., Harder, Z., Beanlands, D. S., and Sparks, D. L. 2005. Phosphatidylinositol increases HDL-C levels in humans. Journal of Lipid Research 46: 350-5.

Burr, M. L., Ashfield-Watt, P. A., Dunstan, F. D., et al. 2003. Lack of benefit of dietary advice to men with angina: results of a controlled trial. European Journal of Clinical Nutrition 57: 193-200.

Burr, M. L., Fehily, A. M., Gilbert, J. F., et al. 1989. Effects of changes in fat, fish and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). Lancet 2: 757-61.

Buttriss, J. 2005. Diet and cardiovascular disease: where are we now? In: Cardiovascular Disease: Diet, Nutrition and Emerging Risk Factors. The Report of the British Nutrition Foundation Task Force (S Stanner ed.), 196-233. Blackwell Publishing.

Calabresi, L., Donati, D., Pazzacconi, F., Sirtori, C. R., and Franceschini, G. 2000. Omacor in familial combined hyperlipidemia effects on lipids and low density lipoprotein subclasses. Atherosclerosis 148: 387-96.

Calder, P. C. 2004. n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored. Clinical Science 107: 1-11.

Canty, D. J., and Zeisel, S. H. 1994. Lecithin and choline in human health and disease. Nutrition Reviews 52: 327-39.

Carpentier, Y. A. 1989. Intravascular metabolism of fat emulsions: the Arvid Wretline lecture, ESPEN. Clinica Chimica Acta 8: 115-25.

Cases, S., Smith, S. J., Zheng, Y. W., et al. 1998. Identification of a gene encoding an acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95: 13018-23.

Castelli, W. P., Garrison, R.J., Wilson, P. W. F., Abbot, R. D., Kalousdian, S., and Kannel, W. B. 1996. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels: the Framingham study. Journal of the American Medical Association 256: 2835-8.

Chanprasert, S. 1997. The modification of human platelet fatty acid composition induced by lecithin-rich fat emulsions with different triacylglycerol cores and phospholipid surfaces. M.Sc. dissertation. Chulalongkorn University.

Chatnilbandhu, S. 1996. Fish meal-derived lecithin-rich fat emulsion and its application as a supplier of omega-3 polyunsaturated fatty acids to blood cells. M.Sc. dissertation. Chulalongkorn University.

Chu, Y. H., and Lin, J. Y. 1993. Factors affecting the content of tocopherol in soybean oil. Journal of the American Oil Chemists' Society 70: 1263-8.

Clarke, S. D. 2001. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. Journal of Nutrition 131: 1129-32.

Clarke, S. D., Turini, M., Jump, D. B., Abraham, S., and Reedy, M. 1998. Polyunsaturated fatty acid inhibition of fatty acid synthase transcription is independent of PPAR activation. Zeitschrift fur Ernahrungswissenschaft 37: 14-20.

Claudel, T., Inoue, Y., Barbier, O., et al. 2003. Farnesoid X receptor agonists suppress hepatic apolipoprotein CIII expression. Gastroenterology 125: 544-55.

Claudel, T., Staels, B., and Kuipers, F. 2005. The Farnesoid X receptor a molecular link between bile acid and lipid and glucose metabolism. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 25: 2020–30.

Cohen, B. M., Lipinski, J. F., and Altesman, R. I. 1982. Lecithin in the treatment of mania: double-blind, placebo-controlled trials. American Journal of Psychiatry 139:1162-4.

Coleman, R. A., and Lee, D. P. 2004. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. Progress in Lipid Research 43: 134-76.

Coppack, S., Mohamed-Ali, V., and Karpe, F. 2005. Metabolic syndrome: insulin resistance, obesity, diabetes mellitus, hypertension, physical activity and genetic factors. In: Cardiovascular Disease: Diet, Nutrition and Emerging Risk Factors. The Report of the British Nutrition Foundation Task Force (S Stanner ed.), 22-49. Blackwell Publishing.

Cremesti, A. E., Goni, F. M., and Kolesnick, R. 2002. Role of sphingomyelinase and ceramide in modulating rafts: do biophysical properties determine biologic outcome? Federation of European Biochemical Societies Letters 531: 47-53.

Dahlan, W. 1989. Intravenous infusion of triacylglycerol-phospholipid complexes in man: effects on fatty acid pattern of plasma and on erythrocyte membrane lipid composition. Ph.D. dissertation. Universite Libre De BruXelles.

Dahlan, W., Richelle, M., Kulapongse, S., Rosle, C., Deckellbaum, R. J., and Carpentier, Y.A. 1992a. Modification of erythrocyte membrane lipid composition induced by a single intravenous infusion of phospholipid triacylglycerol emulsions in man. Clinical Nutrition 11: 255-61.

Dahlan, W., Richelle, M., Kulapongse, S., Rosle, C., Deckellbaum, R. J., and Carpentier, Y.A. 1992b. Effects of essential fatty acid contents of lipid emulsions on erythrocyte

polyunsaturated fatty acid composition in patients on long-term parenteral nutrition. Clinical Nutrition 11: 262-8.

Dayton, S., Pearce, M. L., Hashimoto, S., et al. 1969. Controlled clinical trial of a diet high in unsaturated fat in preventing complications of atherosclerosis. Circulation 40: 1-63.

Department of Health. 1991. Report on Health and Social Subjects, No 41. Dietary Reference Values for Food Energy and Nutrients for the UK. Report of the Committee on Medical Aspects of Food Policy. HMSO, .

Department of Health. 1994. Report on Health and Social Subjects, No 46. Nutritional Aspects of Cardiovascular Disease. Report of the Cardiovascular Review Group Committee on Medical Aspects of Food Policy. HMSO, .

Eritsland, J., Arnesen, H., Seljeflot, I., and Hostmark, A. T. 1995. Long-term metabolic effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in patients with coronary artery disease. American Journal of Clinical Nutrition 61: 831-6.

Expert Panel. 1993. Summary of the second report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel II). Journal of the American Medical Association 269: 3015-23.

Fall, C. 2005. Fetal and maternal nutrition. In: Cardiovascular Disease: Diet, Nutrition and Emerging Risk Factors. The Report of the British Nutrition Foundation Task Force (S Stanner ed.), 177-195. Blackwell Publishing.

Fehily, A. M., Yarnell, J. W., and Butland, B. K. 1987. Diet and ischaemic heart disease in the Caerphilly Study. Human Nutrition: Applied Nutrition 41: 319-26.

Frayn, K., and Stanner, S. 2005. The aetiology and epidemiology of cardiovascular disease. In: Cardiovascular Disease: Diet, Nutrition and Emerging Risk Factors. The Report of

the British Nutrition Foundation Task Force (S Stanner ed.), 1-21. Blackwell Publishing.

Freese, R. and Mutanen, M. 1997. Alpha-linolenic acid and marine long-chain n-3 fatty acids differ only slightly in their effects on hemostatic factors in healthy subjects. American Journal of Clinical Nutrition 66: 591-8.

Garcia-Palmieri, M. R., Sorlie, P., Tillotson, J., et al. 1980. Relationship of dietary intake to subsequent coronary heart disease incidence: The Puerto Rico Heart Health Program. American Journal of Clinical Nutrition 33: 1818-27.

Gelenberg, A. J., Dorer, D. J., Wojcik, J. D., et al. 1990. A crossover study of lecithin treatment of tardive dyskinesia. Journal of Clinical Psychiatry 51: 149-53.

GISSI 1999. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. Lancet 354: 447-55.

GISSI-Prevenzione Investigators. 1999. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated

Gordon, T., Kagan, A., Garcia-Palmieri, M., et al. 1981. Diet and its relation to coronary heart disease and death in three populations. Circulation 63: 500-515.

Growdon, J. H., Gelenberg, A. J., Doller, J., et al. 1978. Lecithin can suppress tardive dyskinesia. New England Journal of Medicine 298: 1029-30.

Han, X., and Gross, R.W. 2001. Quantitative analysis and molecular species fingerprinting of triacylglyceride molecular species directly from lipid extracts of biological samples by electrospray ionization tandem mass spectrometry. Analytical Biochemistry 295: 88-100.

Hanin, I., and Ansell, G. B., eds. 1987. Lecithin. Technological, Biological and Therapeutic Aspects. New York and London: Plenum Press

Harris, W. J., Connor, W. E., Illingworth, D. R., Rothrock, D. W., and Foster, D. M. 1990. Effects of fish oil on VLDL triglyceride kinetics in humans. Journal of Lipid Research 31: 1549-58.

Heart Protection Study Collaborative Group, MRC/BHF Heart Protection, 2002. Study of antioxidant vitamin supplementation in 20,536 high-risk individuals a randomised placebo-controlled trial. Lancet 360: 23-33.

Hedrick, C. C., Castellani, L. W., Wong, H., and Lusis, A. J. 2001. *In vivo* interactions of apoA-II, apoA-I, and hepatic lipase contributing to HDL structure and antiatherogenic functions. Journal of Lipid Research 42: 563-70.

Hegstrand, L. R. 1985. A time-saving thin-layer chromatography plate-scraping system. Analytical Biochemistry 144: 186-8.

Hertz, R., Sheena, V., Kalderon, B., Berman, I., and Bar-Tana, J. 2001. Suppression of hepatocyte nuclear factor-4α by acyl-CoA thioesters of hypolipidemic peroxisome proliferators. Biochemical Pharmacology 61: 1057-62.

Hirai, A., Hamazaki, T., Terano, T., et al. 1980. Eicosapentaenoic acid and platelet function in Japanese. Lancet 2: 1132-3.

Hirsch, M. J., Growdon, J. H., and Wurtman, R. J. 1978. Relations between dietary choline or lecithin intake, serum choline levels, and various metabolic indices. Metabolism 27: 953-60.

Hooper, L., Thompson, R. L., Harrison, R., A., et al. 2006. Risks and benefits of omega 3 fats for mortality, cardiovascular disease, and cancer: systematic review. British Medical Journal 332: 752-60.

Hu, F. B, Manson, J. E., and Willett, W. C. 2001. Types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a critical review. Journal of the American College of Nutrition 20: 5-19.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Hu, F. B., Bronner, L., Willett, W. C., et al. 2002. Fish and omega-3 fatty acid intake and risk of coronary heart disease in women. Journal of the American Medical Association 287: 1815-21.

Hu, F. B., Stampfer, M. J., Manson, J. E., et al. 1997. Dietary fat intake and the risk of coronary heart disease in women. New England Journal of Medicine 337: 1491-9.

Jackson, I. V., Nuttall, E. A., Ibe, I. O., and Perez-Cruet, J. 1979. Treatment of tardive dyskinesia with lecithin. American Journal of Psychiatry 136: 1458-60.

Jenkins, P. J., Portmann, B. P., Eddleston, A. L., and Williams, R. 1982. Use of polyunsaturated phosphatidylcholine in HBsAg negative chronic active hepatitis: results of prospective double-blind controlled trial. Liver 2: 7-81.

Joyce, C., Skinner, K., Anderson, R. A., and Rudel, L. L. 1999. Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase 2. Current Opinion in Lipidology 10: 89-95.

Jump, D. B. 2002. The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids. Journal of Biological Chemistry 277: 8755-58.

Jump, D. B., and Clarke, S. D. 1999. Regulation of gene expression by dietary fat. Annual Review of Nutrition 19: 63-90.

Kersten, S. 2001. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. European Molecular Biology Organisation Report 2: 282-6.

Kersten, S., Seydoux, J., Peters, J. M., Gonzalez, F. J., Desvergne, B., and Wahli, W. 1999. Peroxisome proliferator-activated receptor α mediates the adaptive response to fasting. Journal of Clinical Investigation 103: 1489-98. J.P. Pegorier,

King, M. W. 2006. Biochemistry of Lipids[online]. Available from: http://web.indstate.edu/thcme/mwking/lipids.html[2007, March 17].

King, M. W., and Marchesini, S. 2003. Lipid metabolism: Part II[online]. Available from: http://www.med.unibs.it/~marchesi/lipsynth2.html[2007, March 18].

Kosina, F., Budka, K., Kolouch, Z., et al. 1981. Essential cholinephospholipids in the treatment of virus hepatitis. Casopis Lekaru Ceskych 120: 957-60.

Krauss, R. M. 2004. Hold the antioxidants and improve plasma lipids? Journal of Clinical Investigation 113: 1253-5.

Krey, G., Braissant, O., L'Horset, F., et al. 1997. Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. Molecular Endocrinology 11: 779-91.

Kris-Etherton, P. M. 1999. Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease. Circulation 100: 1253-8.

Kromhout, D., Feskens, E. J., and Bowles, C. H. 1995. The protective effect of a small amount of fish on coronary heart disease mortality in an elderly population. International Journal of Epidemiology 24: 340-5.

Laaksonen, D. E., Nyyssonen, K., Niskanen, L., et al. 2005. Prediction of cardiovascular mortality in middle-aged men by dietary and serum linoleic and polyunsaturated fatty acids. Archives of Internal Medicine 165: 193-9.

Layne, K. S., Goh, K. Y., Jumpsen, J. A., et al. 1996. Normal subjects consuming physiological levels of 18:3 (n-3) and 20:5 (n-3) from flaxseed or fish oils have characteristic differences in plasma lipid and lipoprotein fatty acid levels. Journal of Nutrition 126: 2130-40.

Le May, C., and Girard, J. 2004. Control of gene expression by fatty acids. Journal of Nutrition 134: 2444-9.

Lee, R. G., Willingham, M. C., Davis, M. A., Skinner, K. A., and Rudel, L. L. 2000. Differential expression of ACAT1 and ACAT2 among cells within liver, intestine, kidney, and adrenal of nonhuman primates. Journal of Lipid Research 41: 1991-2001.

Lepage, G., and Roy, C. C. 1984. Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. Journal of Lipid Research 25: 1391-6.

Lepage, G., and Roy, C. C. 1986. Direct transesterification of all classed of lipids in a one-step reaction. Journal of Lipid Research 27: 114-20.

Leren, P. 1970. The Oslo diet-heart study. Eleven-year report. Circulation 42: 935-42.

Li, H., Ruan, X. Z., Powis, S. H., et al. 2005. EPA and DHA reduce LPS-induced inflammation responses in HK-2 cells evidence for a PPAR-gamma-dependent mechanism. Kidney International 67: 867-74.

Lieber, C. S., De Carl, L. M., Mak, K. M., et al. 1990. Attenuation of alcohol-induced hepatic fibrosis by polyunsaturated lecithin. Hepatology 12: 1390-8.

Lieber, C. S, Leo, M. A., Aleynik, S. I., et al. 1997. Polyenylphosphatidylcholine decreases alcohol-induced oxidative stress in the baboon. Alcoholism, Clinical and Experimental Research 21: 375-9.

Little, A., Levy, R., Chuaqui-Kidd, P., and Hand, D. 1985. A double-blind, placebo-controlled trial of high-dose lecithin in Alzheimer's disease. Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry 48: 736-42.

Lorgeril, de M., Renaud, S., Mamelle, N., et al. 1994. Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. Lancet 343: 1454-1459.

Martin, M. J., Hulley, S. B., Browner, W. S., Kuller, I. H., and Wentworth, D. 1986. Serum cholesterol, blood pressure, and mortality, implications from a cohort of 361,662 men. Lancet 2: 933-6.

Mason, T. M. 1998. The role of factors that regulate the synthesis and secretion of very-low-density lipoprotein by hepatocytes. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences 35: 461-87.

Mater, M. K., Thelen, A. P., Pan, D. A., and Jump, D. B. 1999. Sterol response element binding protein 1c (SREBP-1c) is involved in the polyunsaturated fatty acid suppression of hepatic S14 gene transcription. Journal of Biological Chemistry 274: 32725-32.

McGee, D. L., Reed, D. M., Yano, K., et al. 1984. Ten-year incidence of coronary heart disease in the Honolulu Heart Program. Relationship to nutrient intake. American Journal of Epidemiology 119: 667-76.

Miettinen, T. A., Naukkarinen, V., Huttunen, J. K., et al. 1982. Fatty-acid composition of serum lipids predicts myocardial infarction. British Medical Journal 285: 993-6.

Miller, M. 2000. Current perspectives on the management of hypertriglyceridemia. American Heart Journal 140: 232–40.

MRC (Research Committee to the Medical Research Council) 1968. Controlled trial of soya-bean oil in myocardial infarction. Lancet 2: 693-700.

Natvig, H., Borchgrevink, C. F., Dedichen, J., et al. 1968. A controlled trial of the effect of linolenic acid on incidence of coronary heart disease. The Norwegian vegetable oil experiment of 1965–66. Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation. Supplementum 105: 1-20.

Nilsson, a., and Duan, R. 2006. Absorption and lipoprotein transport of sphingomyelin. Journal of Lipid Research 47: 154-71.

Oomen, C. M., Feskens, E. J., Rasanen, L., et al. 2000. Fish consumption and coronary heart disease mortality in Finland, Italy, and the Netherlands. American Journal of Epidemiology 151: 999-1006.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Ordovas, M. J., editor. 1998. Fast ultracentrifugation methods for the separation of plasma lipoproteins In: Method in molecular biology: lipoprotein protocols. New Jersey: Humana Press.

Pan, M., Cederbaum, A. I., Zhang, Y. -L., Ginsberg, H.,N., Williams, K. J., and Fisher, E. A. 2004. Lipid peroxidation and oxidant stress regulate hepatic apolipoprotein B degradation and VLDL production. Journal of Clinical Investigation 113: 1277-87.

Pawar, A., and Jump, D. B. 2003. Unsaturated fatty acid regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity in rat primary hepatocytes. Journal of Biological Chemistry 278: 35931–9.

Pawar, A., Botolin, D., Mangelsdorf, D. J., and Jump, D. B. 2003. The role of liver X receptor-α in the fatty acid regulation of hepatic gene expression. Journal of Biological Chemistry 278: 40736-43.

Pawlosky, R. J., Hibbeln, J. R., Novotny, J. A., et al. 2001. Physiological compartmental analysis of alpha-linolenic acid metabolism in adult humans. Journal of Lipid Research 42: 1257-65.

Philipson, B. E., Rothrock, D. W., Connor, W. E., Harris, W. S., and Illingworth, D. R. 1985. Reduction of plasma lipids, lipoproteins and apoproteins by dietary fish oils in patients with hypertriglyceridemia. New England Journal of Medicine 312: 1210-6.

Pietinen, P., Ascherio, A., Korhonen, P., et al. 1997. Intake of fatty acids and risk of coronary heart disease in a cohort of Finnish men. The Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study. American Journal of Epidemiology 145: 876-87.

Pike, L. J. 2005. Growth factor receptors, lipid rafts and caveolae: an evolving story. Biochimica et Biophysica Acta 1746: 260-73.

Posner, B, M., Cobb, J. L., Belanger, A. J., et al. 1991. Dietary lipid predictors of coronary heart disease in men. The Framingham Study. Archives of Internal Medicine 151: 1181-7.

Pound, E. M., Kang, J. X., and Leaf, A. 2001. Journal of Lipid Research 42: 346-51.

Price, P. T., Nelson, C. M., and Clarke, S. D. 2000. Omega-3 polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. Current Opinion in Lipidology 11: 3-7.

Ramsamy, T. A., Boucher, J., Brown, R. J., Zemin, Y., and Sparks, D. L. 2003. HDL regulates the displacement of hepatic lipase from cell surface proteoglycans and the hydrolysis of VLDL triacylglycerol. Journal of Lipid Research 44: 733-41.

Ribiero, A., Mangeney, M., Cardot, P., et al. 1991. Effect of dietary fish oil and corn oil on lipid metabolism and apolipoprotein gene expression by rat liver. European Journal of Biochemistry 196: 499-507.

Sanders, T., and Emery, P. 2003. Molecular Basis of Human Nutrition. Taylor & Francis:

Sattar, N., and Ferns, G. 2005. Endothelial dysfunction. In: Cardiovascular Disease: Diet, Nutrition and Emerging Risk Factors. The Report of the British Nutrition Foundation Task Force (S Stanner ed.), 63-77. Blackwell Publishing.

Schaefer, E. J. 1997. Effects of dietary fatty acids on lipoproteins and cardiovascular disease risk: Summary. American Journal of Clinical Nutrition 65(s): 1655-6s.

Shelness, G. S., and Sellers, J. A. 2001. Very-low-density lipoprotein assembly and secretion. Current Opinion in Lipidology 12: 151-7.

Shelness, G. S., and Sellers, J. A. 2001. Very-low-density lipoprotein assembly and secretion. Current Opinion in Lipidology 12: 151-7.

Shepherd, J., Packard, C. J., Grundy, S. M., Yeshurun, A. M., Gotto, A. M., and Taunton, O. D. 1980. Effects of saturated and polyunsaturated fat diets on the chemical

composition and metabolism of low density lipoproteins in man. Journal of Lipid Research 21: 91-9.

Simpson, H. C., Barker, K., Carter, R. D., et al. 1982. Low dietary intake of linoleic acid predisposes to myocardial infarction. British Medical Journal (Clin Res Ed) 285:683-4.

Sims, P. J., and Wiedmer, T. 2001. Unraveling the mysteries of phospholipid scrambling. Thrombosis and Haemostasis 86: 266-75.

Singh, R. B., Niaz, M. A., Sharma, J. P., et al. 1997. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of fish oil and mustard oil in patients with suspected acute myocardial infarction: the Indian experiment of infarct survival-4. Cardiovascular Drugs and Therapy 11: 485-91.

Sirvent, A., Claudel, T., Martin, G., et al. 2004. The farnesoid X receptor induces very low density lipoprotein receptor gene expression. Federation of European Biochemical Societies Letters 566: 173-7.

Sittiwicheanwong, R. 2006. *In vitro* and *in vivo* studies on low-density lipoprotein subpopulations influenced by other lipoproteins. Ph.D. dissertation. Mahidol University.

Sprecher, H. 2000. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. Biochimica et Biophysica Acta 1486: 219-31.

Stanner, S. 2000. N-3 fatty acids and health. Nutrition Bulletin 25(1): 81-4.

Stremmel W., Pohl L., Ring A., et al. 2001. A new concept of cellular uptake and intracellular trafficking of long-chain fatty acids. Lipids 36: 981-989.

Thomas, L. H., Olpin, S. O., Scott, R. G., et al. 1987. Coronary heart disease and the composition of adipose tissue taken at biopsy. Human Nutrition and Food Science Nutrition 41F: 167-72.

Thornberg, J. T., and Rudel, L. L., 1992. How do polyunsaturated fatty acids lower lipids? Current Opinion in Lipidology 3:17-21.

Tso, P., Nauli, A., and Lo, C. M. 2004. Enterocyte fatty acid uptake and intestinal fatty acid-binding protein. Biochemical Society Transactions 32: 75-8.

Tsui-Pierchala, B. A., Encinas, M., Milbrandt, J., and Johnson, E. M., Jr. 2002. Lipid rafts in neuronal signaling and function. Trends in Neurosciences 25: 412-7.

Turpeinen, O., Karvonen, M. J., Pekkarinen, M., et al. 1979. Dietary prevention of coronary heart disease: the Finnish Mental Hospital Study. International Journal of Epidemiology 8: 99-118.

Vasandani, C., Kafrouni, A. I., Caronna, A., et al. 2002. Upregulation of hepatic LDL transport by n-3 fatty acids in LDL receptor knockout mice. Journal of Lipid Research 43: 772-84.

Vermunt, S. H., Mensink, R. P., Simonis, M. M., et al. 2000. Effects of dietary alpha-linolenic acid on the conversion and oxidation of 13C-alpha-linolenic acid. Lipids 35: 137-42.

Visco, G. 1985. Polyunsaturated phosphatidylcholine in association with vitamin B complex in the treatment of acute viral hepatitis B. results of a randomized double-blind clinical study. Clinical Therapeutics 114: 183-8.

Von Lossonczy, T. O., Ruiter, A., Brosengeest-Schoute, H. C., Von Gent, C. M., and Hermus, R. J. J. 1978.The effect of a fish oil diet on serum lipids in healthy subjects. American Journal of Clinical Nutrition 31: 1340-6.

Wang, C., Xie, S., Yang, Q., and Xu, G. 2004. Structural identification of human blood phospholipids using liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry. Analytica Chimica Acta 525: 1-10.

Watanabe, M., Houten, S. M., Wang, L., et al. 2004. Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. Journal of Clinical Investigation 113: 1408-18.

White, C. 2005. Suspected research fraud: difficulties of getting at the truth. British Medical Journal 331: 281-8.

Wood, D. A., Riemersma, R. A., Butler, S., et al. 1987. Linoleic and eicosapentaenoic acids in adipose tissue and platelets and risk of coronary heart disease. Lancet 1: 177-83.

Worgall, T. S., Sturley, S. L., Seo, T., Osborne, T. F., and Deckelman, R. J. 1998. Polyunsaturated fatty acids decrease expression of promoters with sterol regulatory elements by decreasing levels of mature sterol regulatory element binding protein. Journal of Biological Chemistry 273: 25537-40.

Wurtman, R. J., Hefti, F., and Melamed, E. 1981. Precursor control of neurotransmitter synthesis. Pharmacological Reviews 32: 315-35.

Wurtman, R. J., Hirsch, M. J.,and Growdon, J. H. 1977. Lecithin consumption raises serum-free-choline levels. Lancet 2(8028): 68-9.

Xu, J., Nakamura, M. T., Cho H. P., and Clarke, S. D. 1999. Sterol regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids a mechanism for the coordinate suppression of lipogenic genes by polyunsaturated fats. Journal of Biological Chemistry 274: 23577-83.

Yli-Jokipii, K., Kallio, H., Schwab U., et al. 2001. Effects of palm oil and transesterified palm oil on chylomicron and VLDL triacylglycerol structures and postprandial lipid response. Journal of Lipid Research 42: 1618-25.

Yoshikawa, T., Ide, T., Shimano, H., et al. 2003. Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of

fatty acid metabolism. I. PPARs suppress sterol regulatory element binding protein-1c promoter through inhibition of LXR signaling. Molecular Endocrinology17:1240-54.

Zhao, A., Yu, J., Lew, J. L., Huang, L., Wright, S. D., and Cui, J. 2004. Polyunsaturated fatty acids are FXR ligands and differentially regulate expression of FXR targets. DNA and Cell Biology 23: 519-26.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงบประมาณที่ให้การสนับสนุนทุนในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ในปีงบประมาณ 2549 ผ่านทางกระทรวงศึกษาธิการและจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ขอขอบคุณนิสิตนักศึกษาระดับปริญญาตรี ทั้งของคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และโครงการอื่นที่ช่วยในงานการวิเคราะห์ต่างๆ ในงานวิจัยชิ้นนี้

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์วิทยาลิพิดและไขมัน คณะสหเวชศาสตร์ (The Lipid and Fat Science Research Center (LiFARC), Faculty of Allied Health Science) และศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (The Halal Science Center (HASCI), Chulalongkorn University) ที่เอื้อเฟื้อเครื่องมืออุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปัญหาอุปสรรคในการทำการวิจัย

ด้านปัจจัยการวิจัย

1. นิสิตที่เข้าร่วมการวิจัยเดินทางไปต่างประเทศ จำเป็นต้องเปลี่ยนแปลงผู้ทำวิจัย
2. เทคนิคการสกัดสารออกฤทธิ์เกิดปัญหาทำให้ไม่สามารถสกัดสารได้ในปริมาณที่คาดหวัง ทำให้การรวบรวมสารออกฤทธิ์เกิดปัญหาความล่าช้ากว่าที่ควรจะเป็น
3. เกิดอุปสรรคด้านสถานที่และอุปกรณ์การเลี้ยงสัตว์ทดลอง เนื่องจากต้องใช้สถานที่จากคณะวิชาอื่น จำเป็นต้องปรับโครงสร้างผู้ร่วมวิจัย
4. การศึกษาในสัตว์ทดลองประสบปัญหาหลายด้าน ทั้งเรื่องความไม่สมบูรณ์ของสัตว์ทดลอง สภาพการเลี้ยงสัตว์ทดลอง การทดลองหาปริมาณเลซิทินที่เหมาะสมในการให้แก่สัตว์ทดลอง ซึ่งแต่ละขั้นตอนใช้เวลามากกว่าที่คาดไว้
5. ข้อมูลความปลอดภัยในสัตว์ทดลองให้ผลไม่ชัดเจน จำเป็นต้องตรวจสอบความปลอดภัยในการใช้เลซิทินในสัตว์ทดลองเพิ่มขึ้นอีก เพื่อให้สามารถนำผลมาปรับใช้ในมนุษย์ได้

รายงานการใช้จ่ายเงินงบประมาณ

ได้รับการจัดสรรงบประมาณการวิจัยรวม 3,534,000 บาท แบ่งเป็น

- งบประมาณปี 2547	1,724,000	บาท
- งบประมาณปี 2548	910,000	บาท
- งบประมาณปี 2549	900,000	บาท

งบประมาณที่เบิกจ่ายไปแล้ว 3,354,000 บาท

ขอเบิกเงินส่วนที่เหลืออีก 180,000 บาท

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย