

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการต้านความเป็นพิษของ
แคดเมียมของสารสกัดกระเทียมเพื่อการประยุกต์ใช้ในเนื้อปลาบด

The antioxidant and anti-cadmium toxicity properties of garlic extracts
to apply in minced fish

นางสุนิสา ศิริพงษ์วุฒิกร
นางสาวสุวรรณภรณ์ บุญเพ็ง

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ประจำปีงบประมาณ 2558 รหัสโครงการ AGR581207S

1. ชื่อชุดโครงการ -

2. ชื่อโครงการเดี่ยว: การศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการต้านความเป็นพิษของแคดเมียมของสารสกัดกระเทียมเพื่อการประยุกต์ใช้ในเนื้อปลาบด (The antioxidant and anti-cadmium toxicity properties of garlic extracts to apply in minced fish)

3. คณะนักวิจัยและหน่วยงานต้นสังกัด:

1). นางสุนิสา ศิริพงษ์สุวรรณ ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร

2). นางสาวสุวรรณภรณ์ บุญเพ็ง ภาควิชาอาหารเพื่อสุขภาพและโภชนาการ คณะอุตสาหกรรมเกษตร

4. กิตติกรรมประกาศ

I would like to express my appreciation to the Aquatic Animal Biotechnology Research Center, Faculty of Science and Industrial Technology, Prince of Songkla University, Surat Thani Campus, and Graduate School of Prince of Songkla University, Hat-Yai campus, for financial support.

I also wish to express my thankfulness to all members of Nutraceutical and Functional Food laboratory, Fishery laboratory and Product development laboratory, Faculty of Agro-Industry, Prince of Songkla University, for their help.

5. Abstract (Thai)

แคดเมียมเป็นโลหะที่มีการใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น การผลิตพลาสติก สี การผลิตแบตเตอรี่ชนิดที่เติมประจุใหม่ได้ และเป็นองค์ประกอบในสารกำจัดศัตรูพืช ดังนั้น การปนเปื้อนโลหะแคดเมียมจึงเป็นปัญหาที่ร้ายแรงระดับนานาชาติ เนื่องจากแคดเมียมสามารถส่งผ่านเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารและเกิดผลกระทบที่เป็นอันตรายแก่มนุษย์อย่างรุนแรง โดยความเป็นพิษของแคดเมียมจะก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อตับและไต และการขับแคดเมียมออกจากร่างกายเป็นไปได้ช้ามาก เนื่องจากค่าครึ่งชีวิตของแคดเมียมในคนมีค่าเท่ากับ 17-30 ปี การลดความเป็นพิษของแคดเมียมยังคงเป็นปัญหาในการรักษา เพราะยาต้านพิษของแคดเมียมที่ใช้กันอยู่คือ EDTA มีผลข้างเคียงทำให้เกิดความระคายเคืองต่อไต ปวดกล้ามเนื้ออย่างรุนแรง เบื่ออาหาร คลื่นไส้ และอาเจียน ดังนั้นการค้นหาพืชสมุนไพรหรือเครื่องเทศ ที่มีความปลอดภัยและบริโภคกันอย่างแพร่หลายจึงเป็นประเด็นที่กำลังได้รับความสนใจ กระเทียม มีการใช้เป็นอาหาร เครื่องเทศ และตำรับยาพื้นบ้านมากกว่า 5000 ปี โดยสรรพคุณของกระเทียมที่มีรายงานวิจัยอย่างชัดเจน ได้แก่ มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ต้านการเกิดเนื้องอก และต้านอนุมูลอิสระ โดยปกติคนไทยมีการบริโภคกระเทียมทั้งในรูปแบบกระเทียมสดและกระเทียมดองซึ่งในการศึกษารั้วนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินคุณสมบัติการต้านอนุมูล

อิสระ การต้านความเป็นพิษของแคดเมียม และการประยุกต์ใช้ในเนื้อปลากระพงบด (สารสกัดกระเทียมสด และกระเทียมดอง) ผลการศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ในหลอดทดลอง 7 วิธี ได้แก่ DPPH, ABTS, FRAP, การกำจัดอนุมูลอิสระ superoxide และ hydroxyl พบว่า กระเทียมดองมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่า กระเทียมสดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตามความสามารถในการจับกับโลหะหนักในรูปของเหล็กของกระเทียมดองมีฤทธิ์ในการจับกับเหล็กน้อยกว่ากระเทียมสด และฤทธิ์ในการจับกับทองแดงไม่แตกต่างกัน

คุณสมบัติการต้านความเป็นพิษของแคดเมียม ซึ่งทำการทดสอบในเซลล์เนื้อเยื่อจากไตมนุษย์ (human embryonic kidney cells) พบว่า สารสกัดกระเทียมสด กระเทียมดอง และสารมาตรฐานไคเอเรล ไดซัลไฟด์ มีฤทธิ์ในการต้านความเป็นพิษของแคดเมียม อย่างไรก็ตามพบว่า การได้รับกระเทียมสดและกระเทียมดองที่ระดับความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เซลล์มีอัตราการรอดชีวิต 81.91% และ 83.54% ตามลำดับ ในขณะที่อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ที่ได้รับสารมาตรฐานไคเอเรล ไดซัลไฟด์ที่ระดับความเข้มข้น 29.26 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีค่า 84.97% นอกจากนี้เซลล์ที่ได้รับสารสกัดกระเทียมสด กระเทียมดอง และสารมาตรฐานไคเอเรล ไดซัลไฟด์ ก่อนที่จะได้รับแคดเมียมสามารถป้องกันความเป็นพิษในเซลล์ได้ดีกว่าเซลล์ที่ได้รับ สารสกัดกระเทียมสด กระเทียมดอง และสารมาตรฐานไคเอเรล ไดซัลไฟด์ พร้อมกันหรือหลังจากได้รับแคดเมียม และการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเนื้อปลาบดที่มีการเติมแคดเมียมที่ระดับความเข้มข้น 135.8 ไมโครโมลาร์ร่วมกับสารสกัดกระเทียมสด กระเทียมดอง และสารมาตรฐานไคเอเรล ไดซัลไฟด์ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ สามารถยืดอายุการเก็บรักษาเนื้อปลาบดได้ แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อตรวจสอบโดยการวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง สี ความหืน คุณภาพทางจุลชีววิทยา และการยอมรับทางประสาทสัมผัส

Cadmium (Cd) is used in many industrial plants including plastic production, paint production, rechargeable battery manufactures and pesticide plants etc. Therefore, Cd contamination is highly dangerous international problem because it can transfer into the food chain and becomes bioaccumulated, endangering human health. Cd largely accumulates in the liver and kidneys and the excretion of cadmium from the body is very slow because biological half-life as 17-30 years. Cd detoxification is burdened task for curing because negative side effect of EDTA solution besides long half-life such as renal irritation, myalgia, anorexia, nausea and vomiting. Thus, using natural materials as herbs or spices having more safety and worldwide consumed are more interesting. Garlic is used as food, spices and folk medicine for more than 5000 years. Its biological properties have been scientific reported as antibacterial, antitumor, and antioxidant (Murugavelet al., 2007). Thais consume garlic as fresh and pickled forms. This present work aimed to investigate antioxidant and anti-Cd properties of fresh and pickled garlic extracts and their application in minced seabass meat. The result showed that 7 vitro antioxidant activities determined as DPPH, ABTS, FRAP, superoxide and hydroxyl scavenging assay of pickled garlic extract were higher than

fresh extract ($p < 0.05$). However, Fe chelating activity of pickled one was lower than fresh one ($p < 0.05$). There was no significant different found in Cu chelating activity of both fresh and pickled extracts. The result showed that the garlic extracts (fresh and pickled) and diallyl disulfide (DADS) possessed anti-Cd using human embryonic kidney cells (HEK 293). However, fresh and pickled garlic extracts at 200 ug/ml exhibited cell viability as 81.91% and 83.54% respectively, while cells treated with DADS at 29.26 ug/ml provided cell viability as 84.97%. In addition, the cytoprotective effect of the cells treated with the extracts and DADS before induced with Cd was higher than the cells treated together and after induced with Cd. After the minced fish were added with Cd at 135.8 μM , the extracts and DADS, it was found that shelf-life of the minced fish did not significantly extend when evaluated at various concentrations were followed by pH, color, TBARS value, microbiological qualities and sensory acceptability.

6. บทสรุปผู้บริหาร (Executive Summary)

● Introduction

The cadmium (Cd) contamination in environmental is a subject of serious international recognition as metal could transfer into the food chain and becomes bioaccumulated, therefore endangering human health (Morkmeket *et al.*, 2011). Industrial products including electroplating, plastic production, pigments, battery manufactures and pesticides are the main source of Cd contamination. Both vegetable and marine products are a major carrier of Cd contamination in food for non-occupationally exposed people (Pariet *et al.*, 2007). World Health Organization (WHO) addressed that limiting of tolerable in take for cadmium is 7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight/week (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2013).

The main line of Cd exposure to humans is by ingestion of water or food contaminate with Cd and by inhalation of fumes or particles during industrial operations (Morkmeket *et al.*, 2011). Cd generally accumulates in the liver and the kidney. Its cytotoxicity is closely related with interaction with protein of carboxyl and thiol groups and able to generate free radicals including persuasion of oxidative stress. And apoptosis possibly plays an important role in acute and chronic intoxication with Cd (Pariet *et al.*, 2007). However, living cells possess diverse mechanism to maintain free metal concentrations at levels that do not exceed cellular requirements. One of the best described mechanisms against heavy metals toxicity is found in some yeast such as algae, photosynthetic protists, and plants that involves their intracellular chelation by either glutathione (GSH) or phytochelatin (PCs), low molecular weight sulfur containing peptides derived from GSH, or both (Mendoza-Cózatlet *et al.*, 2005).

GSH is found in all organisms participating in multiple metabolic processes; for example, intracellular redox state regulation, inactivation of reactive oxygen species (ROS), transport of GSH-conjugated amino acids and other molecules, and storage of sulfur and cysteine affording up to 90% of the non-protein sulfur in the cell. GSH synthesis, starting from inorganic sulfate, requires the sulfur assimilation pathway (SAP) and the cysteine biosynthetic (Cys) pathway (Mendoza-Cózatlet *al.*, 2005). Thus sulfur element is proposed to be an important factor to GSH synthesis for reducing toxicity of Cd.

Though, many synthetic chelating agents and antagonists are determined to reduce the Cd toxicity, part of them reveal the undesirable side effects. Because of the intrinsic limitations and variability of efficacy of heavy metal chelating agents, Cd detoxication is eagerly searching/ researching for the development of novel generation therapeutic agents with varies modes of actions especially from medicinal plants. As well know that, garlic clove generally used in food and medicine. The unique organosulfur compounds (OSCs) contained in garlic, are believed to play key roles in its biological effect. Many studies showed that garlic's rich OSCs reveals diverse biological activity including antitumorogenic, antimutagenic, antioxidant detoxification and other activities (Murugavelet *al.*, 2007).

Seabass, *Latescalcarifer* is an economically aquaculture fish in tropical and subtropical regions of Asia and Pacific. In Thailand, Songkhllalake, Songkhla province is a good source for rearing this fish because of brackish water quality (Siripongvutikorn, 2004). Though, seabass is claimed as white and lean flesh fish leading to high consumer acceptability, strong rancid off-odors is easily to be noticed (Buaniawet *al.*, 2010). It was hypothesized that rancid odors generating in fish meat may related to heavy metal contamination.

Thai garlic is smaller and has a stronger smell compared with Chinese garlic (Chinawong, 2000). Garlic is consumed in several forms: bulbs, crushed or chopped and pickled. The pickling process of garlic generally aims to extend shelf life and reduce the strong odor of garlic as well as generate a new product. Pickled garlic or Thai word named Gratiem Dong (Thai) is frequently used in many Thai dishes. It is used for providing a salty, sour and rich flavor to dishes. Moreover, many Thai salads and soups have added pickled garlic or gratiem dong in. For making pickled garlic, root and stem of the fresh garlic are cut then the bulbs are washed and drained before subjected to soak in a pickled solution consisting of vinegar, sugar and salt. However, the recipe for pickled garlic may differ from producer to producer in terms of ingredients used in pickled solution or the steps of pickling. In addition, it is believed that pickled garlic processing in Thailand also differ from the methods in other countries. Furthermore, pickling process may have both positive and negative effects used on

antioxidant and cadmium detoxification properties. Therefore, in this present study, fresh and pickled garlic were monitored for their antioxidant, anti-cadmium toxicity abilities and application in minced fish was also investigated.

- **Objectives**

1. To study the antioxidant activities of fresh and pickled garlic extracts
2. To evaluate the cytotoxicity, anti-Cd toxicity properties and Cd accumulation in cell line as affected of fresh and pickled garlic extracts and diallyl disulfide
3. To evaluate lipid oxidation and quality changes in minced fish added CdCl₂ and treated with fresh and pickled garlic extracts and diallyl disulfide

- **Conclusion**

According to the results, it was found that pickled garlic extract showed more potent scavenging radical activity than fresh garlic extract. While fresh garlic seemed to have higher chelating activity than pickled garlic. For the anti-Cd properties and Cd accumulation, pickled garlic was more effective than fresh garlic and less toxicity than standard diallyl disulfide. The possible effects of garlic extracts and DADS to protect HEK 293 cells were induced GSH and GST production for reduce toxicity. The garlic extracts and DADS had more protective effect than curing effect. However, the minced fish treated with garlic extracts and DADS did not extended shelf-life. Therefore, pickled garlic was better alternative choice for consumption compared with fresh and standard diallyl disulfide for the antioxidant and the anti-Cd properties.